



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN POR VÍA ORAL DE EXTRACTO  
METANÓLICO DE *TRIDAX PROCUMBENS*, (3S)-  
16,17-DIDESHIDROFALCARINOL Y EXTRACTO  
ACUOSO DE *ALLIUM SATIVUM* EN RATONES  
BALB/c INFECTADOS CON *LEISHMANIA (L.)  
MEXICANA***

Tesis que presenta

LAURENI FERRER LINO

En opción al título de

MAESTRO EN  
CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán,  
México

2021

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de Laurení Ferrer Lino, titulado “**Evaluación por vía oral de extracto metanólico de *Tridax procumbens*, (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol y extracto acuoso de *Allium sativum* en ratones BALB/c infectados con *Leishmania (L.) mexicana*”, fue realizado en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y la Dra. Elsy Nalleli Loría Cervera, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.**

Atentamente:



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 18 de mayo de 2021.

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

Lic. Laurení Ferrer Lino

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado "Fitomedicamento para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea localizada" (Conacyt #2015-01-88), bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y la Dra. Elsy Nalleli Loría Cervera.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CONACYT por la oportunidad brindada de cursar la maestría y por la beca otorgada.

Igualmente agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán y al Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” por permitir desarrollarme profesionalmente en sus instalaciones.

A mis asesores la Dra. Elsy Nalleli Loría Cervera y el Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, por aceptarme tan cálidamente en sus grupos de investigación y brindarme la oportunidad de adquirir conocimientos y trabajar con ellos.

Mi más sincera gratitud a la M. en C. Erika Ivett Sosa Bibiano, la Q.F.B. Karina Beatriz López Ávila y el M. en C. Luis W. Torres Tapia, por su apoyo constante en el laboratorio y los seminarios de grupo.

A mis sinodales las Dras. Blanca Marina Vera Ku y Miriam Rubí Gamboa León, por sus consejos, sugerencias y revisiones del manuscrito de tesis en cada semestre.

Agradezco también al M. en C. Leonardo Guillermo Cordero por su ayuda desinteresada en el análisis de muestras histológicas.

A mis padres, mi hermana y mi esposo, mi gratitud eterna hacia ellos, puesto que sin su ayuda hubiese sido imposible la realización de esta tesis.

A todos muchas gracias.

## **DEDICATORIAS**

A mi familia, por su cariño y apoyo constante durante todo este tiempo.

## **LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS**

Participación en el Primer Encuentro sobre Enfermedades Tropicales (modalidad virtual), celebrado del 19 al 21 de octubre de 2020, Mérida, Yucatán. Presentación de cartel.

---

---

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES .....	3
1.1 ENFERMEDADES INFECCIOSAS DESATENDIDAS .....	3
1.2 LEISHMANIOSIS .....	3
1.3 LEISHMANIOSIS EN MÉXICO.....	5
1.4 LEISHMANIOSIS EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.....	7
1.5 AGENTE ETIOLÓGICO Y SU CICLO BIOLÓGICO .....	8
1.6 VECTORES.....	10
1.7 RESPUESTA INMUNE ANTE LA INFECCIÓN CON <i>LEISHMANIA SPP.</i> .....	11
1.8 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CONTRA <i>LEISHMANIA SPP.</i> .....	13
1.9 TRATAMIENTO ALTERNATIVO A PARTIR DE PLANTAS.....	14
1.10 <i>TRIDAX PROCUMBENS</i> .....	16
1.11 <i>ALLIUM SATIVUM</i> .....	18
1.12 MEZCLA <i>TRIDAX PROCUMBENS</i> Y <i>ALLIUM SATIVUM</i> .....	20
HIPÓTESIS .....	21
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
CAPÍTULO II.....	25
ESTABLECIMIENTO DE DOSIS TERAPÉUTICA DE LOS EXTRACTOS Y LA OXILIPINA ADMINISTRADOS POR VÍA ORAL EN RATONES BALB/c INFECTADOS CON <i>L. (L.) MEXICANA</i> .....	25
2.1 INTRODUCCIÓN.....	25
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
2.1.1 Extractos de plantas.....	26
2.1.2 Animales .....	26
2.1.3 Parásitos.....	27
2.1.4 Infección de ratones BALB/c con <i>L. (L.) mexicana</i> .....	27
2.1.5 Establecimiento de la dosis terapéutica .....	27
2.1.6 Análisis estadístico.....	28

---



---

2.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
CAPÍTULO III .....		37
EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS Y LA OXILIPINA EN EL CURSO CLÍNICO Y LA REDUCCIÓN DE LA CARGA PARASITARIA .....		37
3.1	INTRODUCCIÓN.....	37
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.2.1	Animales, parásitos e infección de roedores con <i>L. (L.) mexicana</i> .....	37
3.2.2	Evaluación de las dosis terapéuticas de los extractos y la oxilipina y sus combinaciones.....	37
3.2.3	Toma de biopsias y extracción de ADN .....	38
3.2.4	Determinación de la carga parasitaria.....	38
3.2.5	Análisis estadístico.....	39
3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
CAPÍTULO IV .....		43
EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS ASOCIADOS A LA ADMINISTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y LA OXILIPINA EN RATONES BALB/c ....		43
4.1	INTRODUCCIÓN.....	43
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
4.2.1	Toma de muestras y tinción con hematoxilina-eosina.....	46
4.2.2	Análisis histológico.....	46
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
CAPÍTULO V.....		53
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE IFN- $\gamma$ PARA EVALUAR LA RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A LA ADMINISTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y LA OXILIPINA POR VÍA ORAL .....		53
5.1	INTRODUCCIÓN.....	53
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
5.2.1	Toma de biopsias y extracción de ARN.....	54
5.2.2	Expresión de citocinas mediante PCR- tiempo real.....	54
5.2.3	Análisis estadístico .....	55
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
CAPÍTULO VI .....		59
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....		59

---

---

<b>6.1 CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	59
<b>6.2 PERSPECTIVAS</b> .....	59
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	61

---

---

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**ANOVA:** *Analysis of variance* (Análisis de varianza)

**ARN:** Ácido ribonucleico

**A. sativum:** *Allium sativum*

**ATP:** Adenosina trifosfato

**Cat.:** Catálogo

**CD:** Células dendríticas

**CENAVECE:** Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades

**CI<sub>50</sub>:** Concentración mínima que inhibe el 50%

**CICY:** Centro de Investigación Científica de Yucatán

**CIR:** Centro de Investigaciones Regionales

**cm:** Centímetros

**Ct:** *Cycle Treshold* (Ciclo umbral)

**D:** Diámetro mayor

**d:** Diámetro menor

**DE:** Dermis

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**E:** Epidermis

---

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EID:** Enfermedades infecciosas desatendidas

**Fw:** *Forward* (Delantero)

**g:** Gramos

**GTP:** Guanosina trifosfato

**h:** Horas

**HCl:** Ácido clorhídrico

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**IgE:** Inmunoglobulina E

**IL:** Interleucina

**iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible

**Kg:** Kilogramos

**L:** Litro

**LCL:** Leishmaniosis cutánea localizada

**LCD:** Leishmaniosis cutánea difusa

***L. (L.) mexicana:*** *Leishmania (Leishmania) mexicana*

**LMC:** Leishmaniosis mucocutánea

**LV:** Leishmaniosis visceral

**mg:** Miligramos

**mL:** Mililitros

---

---

**NK:** *Natural killer* (células asesinas naturales)

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ON:** Óxido nítrico

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud

**PBS:** *Phosphate buffered saline* (Buffer de fosfato salino)

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa

**Rv:** *Reverse* (Reverso)

**S:** Tamaño de lesión

**Sb<sup>III</sup>:** Antimonio trivalente

**SINAVE:** Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

**TE:** Tris-HCl-EDTA

**TGF- $\beta$ :** *Transforming growth factor beta* (factor de crecimiento transformante beta)

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

***T. procumbens:*** *Tridax procumbens*

**Th1:** *T1 helper* (respuesta cooperadora tipo 1)

**Th2:** *T2 helper* (respuesta cooperadora tipo 2)

**U:** Unidades

**UADY:** Universidad Autónoma de Yucatán

**UV-Vis:** Ultravioleta-visible

**°C:** Grados Celsius

---

**µg:** Microgramos

**µL:** Microlitros

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Urna olmeca del período 1200 a.C.-100 d.C. con signos de lesiones cutáneas muy similares a la LCD .....	6
<b>Figura 1.2</b> Lesiones comunes de LCL en humanos (península de Yucatán). A: lesión en antebrazo; B: lesión en oreja.....	7
<b>Figura 1.3</b> Incidencia de casos de LCL en la península de Yucatán, México. ....	8
<b>Figura 1.4</b> Micrografía electrónica de parásitos de <i>Leishmania</i> spp., promastigote metacíclico (A) y amastigotes. ....	9
<b>Figura 1.5</b> Mosca de arena, <i>Lutzomyia</i> , vector de <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> ..	11
<b>Figura 1.6</b> Estructuras químicas de los compuestos antimoniato de N-metilglucamina (A) y estibogluconato de sodio (B).....	13
<b>Figura 1.7</b> Planta de <i>Tridax procumbens</i> L.....	16
<b>Figura 1.8</b> Estructura química del compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol .....	17
<b>Figura 1.9</b> Bulbos germinados de <i>Allium sativum</i> L.....	199
<b>Figura 1.10</b> Estrategia experimental.....	233
<b>Figura 2.1</b> Lesión cutánea causada por <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> en ratón BALB/c (A) y úlcera observada en paciente con LCL (B).....	288
<b>Figura 2.2</b> A: Tamaño de las úlceras en ratones BALB/c después del tratamiento (día 15) con extracto metanólico de <i>Tridax procumbens</i> (raíz); B: Evolución del tamaño de las úlceras con las diferentes dosis. ....	299
<b>Figura 2.3</b> Evolución de úlceras en ratones BALB/c infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> . A: Dosis 40 mg/Kg/día de extracto metanólico de <i>Tridax procumbens</i> ; B: grupo control con disolución salina.....	30

---

<b>Figura 2.4</b> A: Tamaño de las úlceras en ratones BALB/c después del tratamiento (día 15) con extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> ; B: Evolución del tamaño de las úlceras con las diferentes dosis.....	31
<b>Figura 2.5</b> Evolución de úlceras en ratones BALB/c infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> . A: Dosis 20 mg/Kg/día de extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> ; B: grupo control con disolución salina. ....	32
<b>Figura 2.6</b> A: Tamaño de las úlceras en ratones BALB/c después del tratamiento (día 15) con el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol; B: Evolución del tamaño de las úlceras con las diferentes dosis. ....	33
<b>Figura 2.7</b> Evolución de úlceras en ratones BALB/c infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> . A: Dosis 40 mg/Kg/día del compuesto oxilipina; B: grupo control con disolución salina.....	34
<b>Figura 3.1</b> A: Tamaño de las úlceras en ratones BALB/c después de todos los tratamientos (día 15); B: Evolución del tamaño de las úlceras en el tiempo a diferentes tratamientos. ....	40
<b>Figura 3.2</b> Carga parasitaria de lesiones de roedores BALB/c infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> . ....	41
<b>Figura 4.1</b> Diferentes zonas de tejido piel o tegumento.....	43
<b>Figura 4.2</b> Microscopía de las diferentes capas de la epidermis (tinción con hematoxilina-eosina).....	44
<b>Figura 4.3</b> Microscopía de tejido de la piel normal (tinción hematoxilina-eosina).....	45
<b>Figura 4.4</b> Espectro de cambios histológicos visualizados en epidermis de ratones BALB/c infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> . Tinción hematoxilina-eosina.....	48

---

---

**Figura 4.5** Patrones histológicos observados en la zona dérmica de ratones BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*. Tinción hematoxilina-eosina.....49

**Figura 5.1** Niveles de IFN- $\gamma$  en lesiones de BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*, semana 4 postratamiento.....56

---

---

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1</b> Especies de <i>Leishmania</i> responsables de enfermedad en el Nuevo Mundo: LCL, LCD, LMC y LV .....	5
<b>Cuadro 1.2</b> Clasificación taxonómica de parásitos <i>Leishmania</i> spp. ....	8
<b>Cuadro 1.3</b> Clasificación taxonómica de los vectores de <i>Leishmania</i> .....	10
<b>Cuadro 1.4</b> Plantas medicinales con actividad leishmanicida probada .....	15
<b>Cuadro 1.5</b> Categoría taxonómica de <i>Tridax procumbens</i> L.....	17
<b>Cuadro 1.6</b> Categoría taxonómica de <i>Allium sativum</i> L.....	18
<b>Cuadro 4.1</b> Patrones histológicos hallados en epidermis (E) de roedores BALB/c infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> .....	47
<b>Cuadro 4.2</b> Patrones histológicos encontrados en dermis (DE) de roedores BALB/c infectados con <i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> .....	49

---

## RESUMEN

La leishmaniosis cutánea localizada (LCL), causada por *Leishmania (Leishmania) mexicana*, se caracteriza por la aparición de una úlcera de evolución crónica que deja cicatrices desfigurantes. El tratamiento actual en la península de Yucatán consiste en la inyección de antimonio de meglumina (Glucantime®), el cual es tóxico, costoso y con efectos adversos. Aunque en el 100% de los pacientes resuelve la lesión, la cura es clínica, pero no parasitológica. Una alternativa para tratar la LCL es el empleo de plantas medicinales como *Tridax procumbens*, la cual ha mostrado actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. (L.) mexicana*. Este efecto se asoció al compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, una oxilipina tipo acetilénica C17. Asimismo, se ha comprobado la actividad inmunomoduladora del extracto de *Allium sativum*, la cual evitó el progreso de la lesión causada por *L. (L.) mexicana*. En el presente estudio se evaluó *in vivo* el extracto metanólico de *T. procumbens* (raíz) y el compuesto oxilipina, en combinación con el extracto acuoso de *A. sativum* como una cura alternativa para la LCL. Para ello, en la primera fase del estudio, se probaron diferentes dosis de cada uno de los tratamientos, con el objetivo de establecer la dosis terapéutica. Con base en los resultados obtenidos, en la segunda fase, se analizaron las dosis efectivas de los tratamientos, así como sus combinaciones. Se incluyó, además, un grupo control positivo al que se le administró Glucantime®. Finalizada esta etapa, se procedió a la eutanasia de los roedores y posterior toma de muestras para cuantificar carga parasitaria, evaluar los cambios histológicos y analizar la expresión de IFN- $\gamma$  asociada a la administración de los tratamientos. La dosis terapéutica fue establecida, *T. procumbens* (40 mg/Kg/día), *A. sativum* (20 mg/Kg/día) y la oxilipina (40 mg/Kg/día). En los grupos tratados con Glucantime® y la mezcla oxilipina-*Allium* se observó una tendencia a disminuir la carga parasitaria respecto al grupo control. Los niveles de IFN- $\gamma$  fueron bajos, excepto en el grupo tratado con *T. procumbens*, correspondiéndose con la respuesta de tipo Th2 reportada en ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana*. Los patrones histológicos se caracterizaron por presencia de necrosis y espongirosis en epidermis e infiltrado inflamatorio difuso con presencia de macrófagos en la dermis. Los resultados sugieren que el extracto de *T. procumbens* y la oxilipina podrían ser útiles en el tratamiento de la LCL, sin embargo, es necesario realizar más estudios para demostrar su efectividad.

---

---

---

## ABSTRACT

Localized cutaneous leishmaniasis (LCL), caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana*, is characterized by the appearance of an ulcer of chronic evolution that leaves disfiguring scars. The current treatment in the Yucatan peninsula consists of the injection of meglumine antimoniate (Glucantime®), which is toxic, expensive and with adverse effects. Although in 100% of the patients it resolves the lesion, the cure is clinical, but not parasitological. An alternative to treat the LCL is the use of medicinal plants such as *Tridax procumbens*, which has shown *in vitro* activity against promastigotes of *L. (L.) mexicana*. This effect has been associated to the compound (3S)-16,17-didehydrofalconol, an oxylipin of acetylene C17 type. Likewise, the immunomodulatory activity of the extract of *Allium sativum* was demonstrated, preventing the progress of the lesion caused by *L. (L.) mexicana*. In the present study, the *in vivo* effect of the methanolic extract of *T. procumbens* (root) and the oxylipin compound, in combination with the aqueous extract of *A. sativum*, was evaluated as an alternative cure for LCL. To do this, in the first phase of the study, different doses of each of the treatment were tested, with the aim of establishing the therapeutic dose of each. Based on the results obtained, for the second phase, the effective doses of the treatments were analyzed, as well as their combinations. In addition, a positive control group administered with Glucantime® was included. At the end of this stage, the rodents were euthanized, and samples were taken to quantify the parasite load, evaluate the histological changes, and analyze the IFN- $\gamma$  expression associated with the administration of each of these alternative treatments. The therapeutic doses of *T. procumbens* (40 mg/Kg/day), *A. sativum* (20 mg/Kg/day), and the oxylipin (40 mg/Kg/day) were established. The groups treated with Glucantime® and the oxylipin-*Allium* mixture showed a tendency to decrease the parasite load with respect to the control group. The IFN- $\gamma$  levels were low except for the group treated with *T. procumbens*, corresponding to the Th2-type response reported for BALB/c mice infected with *L. (L.) mexicana*. The histological patterns were characterized by the presence of necrosis and spongiosis in the epidermis and diffuse inflammatory infiltrate with the presence of macrophages in the dermis. The results suggest that the extract of *T. procumbens* and the oxylipin might be useful in the treatment of LCL, however, more studies are needed to demonstrate its effectiveness.

---



## INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una parasitosis producida por protozoos del género *Leishmania*, clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad infecciosa desatendida. Estos parásitos, de localización intracelular, se caracterizan por causar lesiones cutáneas (localizadas o difusas), mucocutáneas o viscerales y se transmiten mediante la picadura de insectos flebótomos hembras de la familia Psychodidae (Dolat *et al.*, 2020; Andrade-Narváez *et al.*, 2001).

Actualmente, esta parasitosis se distribuye en 98 países, tanto de zonas áridas como tropicales, y se estima que más de 350 millones de personas habitan en zonas de riesgo (Paniz *et al.*, 2019; Alvar *et al.*, 2012). En la península de Yucatán, México, la forma clínica más frecuente de la enfermedad es la leishmaniosis cutánea localizada (LCL), la cual afecta predominantemente a hombres que trabajan la tierra y que viven en zonas endémicas (Andrade-Narváez *et al.*, 2001).

En los últimos años, el empleo de antimoniales pentavalentes, como tratamiento de primera línea, ha disminuido en muchos países debido a los eventos adversos y tóxicos que éstos provocan. Además, existen otros fármacos de segunda línea como la anfotericina B y la miltefosina, que presentan toxicidad e ineficacia (Gillespie *et al.*, 2016). Debido a la gran variedad de eventos adversos que presentan estos fármacos, así como los tratamientos tan prolongados, y su baja disponibilidad en el mercado o poca eficacia, se hace imperiosa la necesidad de encontrar o desarrollar alternativas efectivas, económicas y menos tóxicas.

Una de las posibles alternativas fue identificada mediante la evaluación *in vitro* del extracto metanólico de *T. procumbens* y el compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, los cuales presentaron una significativa actividad inhibitoria sobre el crecimiento de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (L.) mexicana* (Martín-Quintal *et al.*, 2010). Paralelo a este estudio, se evaluó la actividad inmunomoduladora del extracto acuoso de *A. sativum*, el cual estimula la proliferación de linfocitos y la fagocitosis mediada por macrófagos, estimulando a su vez la liberación del interferón gamma (Gamboa-León *et al.*, 2007). Debido a los buenos resultados obtenidos en ambos estudios, Gamboa-León *et al.* (2014) realizaron un ensayo *in vivo* donde evaluaron la actividad del extracto metanólico de

*T. procumbens*, el extracto acuoso de *A. sativum* y la mezcla de ambos extractos aplicados vía intraperitoneal. Este estudio arrojó que el extracto metanólico de *T. procumbens* puede tener un efecto directo sobre los amastigotes de *L. (L.) mexicana* y que la aplicación de ambos extractos simultáneamente tiene un mayor efecto terapéutico en la eliminación del parásito y disminución de la lesión.

Por todo lo anterior, este proyecto tuvo por objetivo evaluar el extracto metanólico de *T. procumbens* (raíz) y su principio activo la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, en combinación con el extracto acuoso liofilizado de *A. sativum* (bulbos), administrados por vía oral como un tratamiento alternativo para la LCL causada por *L. (L.) mexicana*.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 ENFERMEDADES INFECCIOSAS DESATENDIDAS

Las enfermedades infecciosas desatendidas (EID), son un conjunto de enfermedades que afectan a más de mil millones de personas en el mundo (Hotez y Pecoul, 2010). Las EID se localizan principalmente en poblaciones vulnerables, es decir, que se encuentran en lugares o zonas donde las condiciones socioeconómicas son de extrema pobreza, total o parcialmente aisladas y con barreras para el acceso al agua segura y el saneamiento básico (OPS/OMS, 2016; Schneider *et al.*, 2011).

La mayoría de las EID son zoonóticas, es decir, se transmiten de hospederos animales a humanos. Algunas de ellas se transmiten de forma directa y otras indirectamente, a través de alimentos, agua o mediante un vector (Choffnes y Relmar, 2011). Estas enfermedades son ocasionadas principalmente por bacterias, protozoos o helmintos, causando en las personas que las padecen desfiguración de rostro, secuelas a largo plazo en el desarrollo, el crecimiento y la reproducción (Hotez *et al.*, 2007).

Dentro de las enfermedades infecciosas desatendidas destacan la rabia, el dengue, la úlcera de Buruli, la lepra (enfermedad de Hansen), la enfermedad de Chagas, la tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), la dracunculosis (enfermedad del gusano de Guinea), la equinococosis, las infecciones por tremátodos transmitidas por los alimentos, la filariasis linfática, la oncocercosis (ceguera de los ríos) y la leishmaniosis (OMS, 2009).

#### 1.2 LEISHMANIOSIS

La leishmaniosis, clasificada entre las EID (Ejov y Dagne, 2014), comprende un conjunto de enfermedades clínicamente heterogéneas causadas por agentes protozoarios de la familia Trypanosomatidae y del género *Leishmania* (Ribeiro-Moreira *et al.*, 2017). Estos parásitos son transmitidos de una persona o animal infectados mediante la picadura de insectos hembra hematófagos de la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae. En

América, el vector es una mosca del género *Lutzomyia*, mientras que en Europa es del género *Phlebotomus* (Van der Auwera *et al.*, 2016).

Hasta la fecha, existen aproximadamente 30 especies de *Leishmania* identificadas alrededor del mundo; la enfermedad es endémica en 98 países y tres territorios en cinco continentes (Alvar *et al.*, 2012), reportándose una incidencia anual estimada de 2 millones de casos, con 350 millones adicionales en riesgo de infección (Ezatpour *et al.*, 2015; OMS, 2013). Estas especies afectan tanto al Viejo Mundo (regiones del lejano y medio Oriente, Europa central y oriental y África) como el Nuevo Mundo (regiones del centro y sur de América) (McGwire y Satoskar, 2014).

El amplio rango de síntomas y signos clínicos que presentan van desde lesiones cutáneas que pueden curar espontáneamente hasta lesiones en mucosas y afectaciones viscerales fatales, los cuales dependen de las interacciones entre la respuesta inmune del hospedero y la especie de *Leishmania* involucrada (Andrade-Narváez *et al.*, 2001).

La leishmaniosis puede presentarse en formas clínicas diferentes, clasificándose de acuerdo con la región o zona del cuerpo afectada, así como la respuesta inmune del organismo infectado y el grado de morbilidad y mortalidad (Singh *et al.*, 2012). Las clasificaciones son: leishmaniosis cutánea (localizada o difusa/LCL o LCD), leishmaniosis mucocutánea (LMC) y leishmaniosis visceral (LV). Esta última es considerada la forma más grave y es comúnmente conocida como Kala-azar (OMS, 2020; Ribeiro-Moreira *et al.*, 2017).

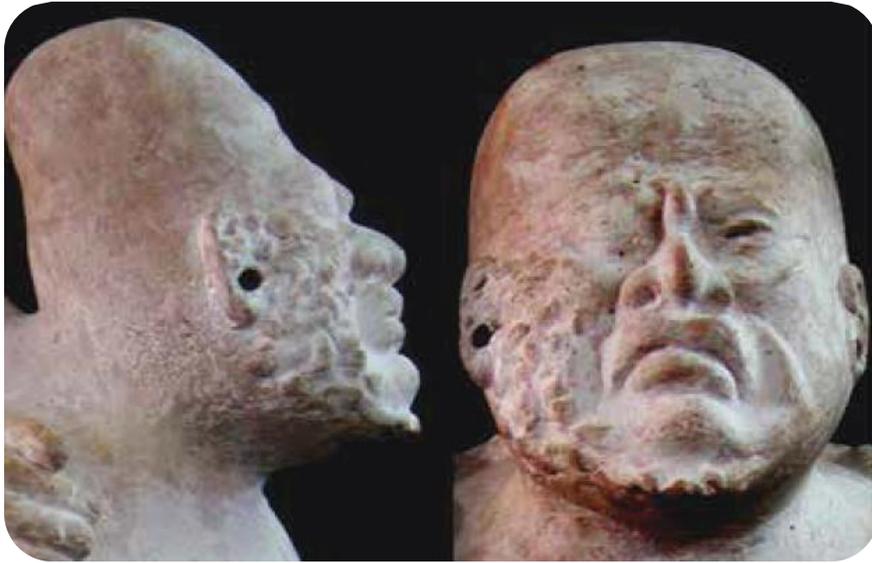
En América, la LC es causada principalmente por *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana*, mientras que *L. major* y *L. tropica* afectan al Oriente medio y Asia central. La LV es causada generalmente por *L. donovani*, *L. infantum* y *L. infantum chagasi*. La LMC es una severa y crónica complicación de la LC, que se extiende hacia las mucosas, originada por *L. braziliensis*, principalmente (Gillespie *et al.*, 2016). En el Cuadro 1.1 se muestra un mejor acercamiento de la distribución geográfica de las diferentes especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo, así como sus variedades clínicas.

**Cuadro 1.1.** Especies de *Leishmania* responsables de enfermedad en el Nuevo Mundo: LCL, LCD, LMC y LV (Vargas-Martínez *et al.*, 2011).

<b><i>Leishmania</i> en el Nuevo Mundo</b>	<b>Variedad clínica de leishmaniosis</b>	<b>Ciclo de transmisión</b>	<b>Principal distribución geográfica</b>
<i>Leishmania braziliensis</i>	LCL, LMC	Zoonosis	Sudamérica, Centroamérica y México
<i>Leishmania panamensis</i>	LCL, LMC		Sur de Centroamérica y Norte de Sudamérica
<i>Leishmania peruviana</i>	LCL		Perú
<i>Leishmania guayanensis</i>	LCL		Sudamérica
<i>Leishmania lainsoni</i>	LCL		Sudamérica
<i>Leishmania colombiensis</i>	LCL		Norte de Sudamérica
<i>Leishmania amazonensis</i>	LCL, LCD		Sudamérica
<i>Leishmania mexicana</i>	LCL, LCD		Estados Unidos, México, Centroamérica
<i>Leishmania pifanoi</i>	LCL		Sudamérica
<i>Leishmania venezuelensis</i>	LCL		Centro de Sudamérica
<i>Leishmania garnhami</i>	LCL		Sudamérica
<i>Leishmania infantum</i> (Viejo y Nuevo Mundo)	LCL, LV		Europa, Norte de África, Centroamérica, Sudamérica

### 1.3 LEISHMANIOSIS EN MÉXICO

La LC fue descrita por primera vez en el año 1912 por Seidelin (Andrade-Narváez *et al.*, 2017; Canto-Lara *et al.*, 1998), aunque es posible que la misma existiera desde el florecimiento de la cultura olmeca, ya que se han encontrado urnas del período preclásico (1200 a.C.-100 d.C.) con signos de lesiones cutáneas muy similares a la LCD (Figura 1.1) (Carrada-Figueroa *et al.*, 2014).



**Figura 1.1.** Urna olmeca del período 1200 a.C.-100 d.C. con signos de lesiones cutáneas muy similares a la LCD (Carrada-Figueroa *et al.*, 2014).

Seidelin no sólo la denominó "úlceras de los chicleros", sino que además identificó al parásito mediante la técnica de impronta y lo consideró indistinguible morfológicamente de *L. tropica* (Andrade-Narváez *et al.*, 2017; Canto-Lara *et al.*, 1998). A partir de este momento, investigadores de la época publicaron diversos trabajos sobre esta parasitosis.

La especie *L. (L.) mexicana* es endémica en países como Belice, Guatemala y México, en este último, se considera que la enfermedad es un problema de salud pública y de notificación obligatoria, por lo que existe un registro epidemiológico nacional.

De acuerdo con el Boletín del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la República Mexicana (SINAVE), la leishmaniosis se presenta principalmente en zonas agrícolas, donde la siembra de cultivos de cacao, café o árboles chicleros son predominantes, puesto que los desechos orgánicos de los mismos favorecen el desarrollo de la mosca o flebótomo transmisor del parásito (SINAVE, 2019).

En México, la ocupación tiene un papel muy importante en la adquisición de la enfermedad, por lo que es considerada un factor de riesgo. Los más afectados son los agricultores, cazadores, militares, taladores, biólogos, etc. La enfermedad predomina en hombres, aunque no es determinante. También puede afectar a niños, mujeres y ancianos expuestos

a la picadura de los vectores en dichas zonas endémicas (Andrade-Narváez *et al.*, 2017; Vargas-González *et al.*, 1999). Los estados con casos reportados de leishmaniosis son, entre otros: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Morelos, Puebla, Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán (SINAVE, 2019).

#### 1.4 LEISHMANIOSIS EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

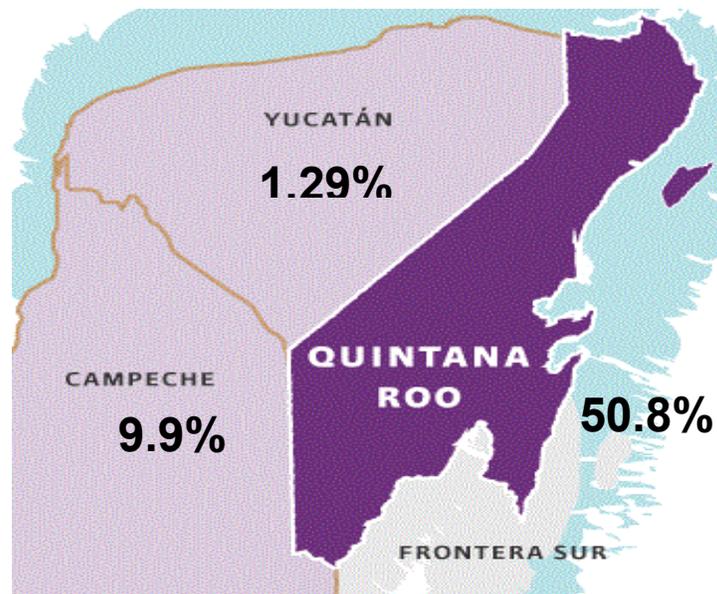
La LCL, causada por *L. (L.) mexicana*, es una zoonosis silvestre estacional endémica de la península de Yucatán, México. En esta área, la LCL produce una lesión ulcerada única en el 84.5% de los pacientes y se localiza comúnmente en la oreja en el 39.9% de los casos (Figuras 1.2 A y B). La tasa de incidencia anual de infección sintomática en el estado de Campeche es de 0.5%, mientras que la tasa de prevalencia de infección asintomática es de 19% (Andrade-Narváez *et al.*, 2017).



**Figura 1.2.** Lesiones comunes de LCL en humanos (península de Yucatán). A: lesión en antebrazo; B: lesión en oreja (Laboratorio de Inmunología del CIR "Dr. Hideyo Noguchi", UADY).

Según los reportes del SINAVE, hasta la semana epidemiológica número 52 del año 2019, se reportaron 14 casos de LCL (todos hombres) en el estado de Yucatán, 107 (91 hombres y 16 mujeres) en el estado de Campeche y 550 (471 hombres y 79 mujeres) en el estado de Quintana Roo.

A continuación, se muestra la incidencia epidemiológica de LCL en la península de Yucatán, México (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Incidencia de casos de LCL en la península de Yucatán, México (SINAVE, 2019).

## 1.5 AGENTE ETIOLÓGICO Y SU CICLO BIOLÓGICO

En la leishmaniosis el agente causal es un protozoo unicelular obligado de la familia Trypanosomatidae, suborden Trypanosomatida y género *Leishmania* (Ross, 1903). Estos parásitos son digenéticos, lo que quiere decir que su ciclo de vida se alterna entre dos huéspedes: uno es un invertebrado que, generalmente, representa al hospedador intermediario o vector; y el otro, un vertebrado u hospedero representado por algunos animales y el hombre (Akhoundi *et al.*, 2016; Vargas-Martínez *et al.*, 2011).

**Cuadro 1.2.** Clasificación taxonómica de parásitos *Leishmania* spp. (Akhoundi *et al.*, 2016)

<b>Reino</b>	<b>Protista</b>
<b>Phyllum</b>	Euglenozoa
<b>Clase</b>	Kinetoplastea
<b>Orden</b>	Trypanosomatida
<b>Familia</b>	Trypanosomatidae
<b>Género</b>	<i>Leishmania</i>
<b>Especie</b>	<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i> , <i>Leishmania (Leishmania) major</i> , etc.

El parásito se puede presentar de dos formas diferentes, de acuerdo con el hospedero en el que se encuentre; éstas pueden ser:

**Promastigotes:** microorganismos flagelados, alargados y extracelulares que constituyen la forma infectante (Figura 1.4 A). Éstos se desarrollan de procíclicos a metacíclicos en el tracto digestivo de los insectos transmisores (Sarkar *et al.*, 2018; Nagle *et al.*, 2014).

**Amastigotes:** constituyen la forma replicativa, son aflagelados, redondeados e intracelulares obligados, por lo que se localizan en el interior de macrófagos fagocíticos del hospedero (Figura 1.4 B) (Sarkar *et al.*, 2018; Nagle *et al.*, 2014). Miden de 2.0 a 3.0  $\mu\text{m}$  de diámetro (Ross, 1903).



**Figura 1.4.** Micrografía electrónica de parásitos de *Leishmania* spp., promastigote metacíclico (A) y amastigotes (B) (Sarkar *et al.*, 2018).

Cuando el díptero hembra pica a un animal infectado con *Leishmania* spp, éste absorbe junto con la sangre las formas amastigotes del parásito. Una vez en el intestino del insecto, el parásito inicia un proceso de transformación donde los amastigotes cambian a promastigotes procíclicos y, posteriormente, mediante fisión binaria, se multiplican y pasan a promastigotes metacíclicos con alta capacidad infectante, capaces de sobrevivir en el organismo vector. Una vez transformados en promastigotes metacíclicos, los parásitos migran a la válvula faríngea del insecto vector, desde donde son regurgitados en el sitio de la picadura (Nagle *et al.*, 2014; Naderer y McConville *et al.*, 2011).

Los promastigotes son fagocitados posteriormente por células dendríticas, neutrófilos, fibroblastos y macrófagos del huésped donde inducen la formación de vacuolas

parasitóforas. Estas vacuolas son compartimentos ácidos con propiedades de fagolisosomas donde las formas amastigotes altamente virulentas se replican (fisión binaria), resistiendo la degradación por enzimas lisosomales. Tras la lisis de macrófagos infectados y células dendríticas, los parásitos se diseminan a través de la linfa y sistema circulatorio e infectan otros macrófagos del sistema reticuloendotelial. Los parásitos que persisten en los macrófagos pueden estar presentes en bazo, médula ósea, hígado y linfa. Durante infecciones crónicas, los amastigotes persistentes en los tejidos del huésped pueden transmitirse a moscas de arena no infectadas, completando el ciclo de transmisión (Sarkar *et al.*, 2018).

## 1.6 VECTORES

Durante el ciclo de transmisión de la leishmaniosis, los vectores (insectos) juegan un papel muy importante. Estos insectos, de diámetro pequeño (1.5 a 2 mm de longitud corporal), habitan fundamentalmente en regiones tropicales y subtropicales, aunque existen algunos que se localizan en regiones áridas o semidesérticas. De los géneros de insectos vectores conocidos, *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) son de importancia médica, puesto que son capaces de transmitir la parasitosis (Cuadro 1.3) (Dostálová y Volf, 2012).

**Cuadro 1.3.** Clasificación taxonómica de los vectores de *Leishmania* (Vargas-Martínez *et al.*, 2011).

<b>Reino</b>	<b>Animal</b>
<b>Phyllum</b>	Arthropoda
<b>Clase</b>	Insecta/Hexápoda
<b>Orden</b>	Diptera
<b>Suborden</b>	Nematóceras
<b>Familia</b>	Psychodidae
<b>Subfamilia</b>	Phlebotominae
<b>Géneros</b>	Viejo Mundo: <i>Phlebotomus/Sergentomya</i> Nuevo Mundo: <i>Lutzomyia/ Brumptomya/ Warileya/ Psychodopygus</i>
<b>Especie</b>	<i>Lutzomyia olmeca</i> , <i>Lutzomyia flaviscutellata</i> , <i>Lutzomyia trapidoi</i> , <i>Lutzomyia diabolica</i> , <i>Lutzomyia longipalpis</i>

El género *Lutzomyia* es uno de los más abundantes en América Latina y se caracteriza por presentar patas largas, alas ampliamente lanceoladas, tórax giboso y cuerpo cubierto de

pelos (Figura 1.5). En México, se reconocen como posibles responsables de la transmisión a 11 especies, las cuales varían en importancia de acuerdo con la localización geográfica de las zonas endémicas, a la especie de parásito que transmite y a la variedad clínica de la enfermedad que ha sido asociada a su presencia (CENAVECE, 2015).



**Figura 1.5.** Mosca de arena, *Lutzomyia*, vector de *Leishmania (Leishmania) mexicana* (Infobioquímica, 2017).

Estos insectos pueden adquirir la infección de humanos y reservorios tales como roedores, cánidos y primates. En la península de Yucatán, uno de los reservorios primarios de *L. (L.) mexicana* es el roedor silvestre *Peromyscus yucatanicus* (Loría-Cervera *et al.*, 2013).

### **1.7 RESPUESTA INMUNE ANTE LA INFECCIÓN CON *LEISHMANIA* SPP.**

La respuesta inmune generada en un organismo ante la infección con *Leishmania* spp. es muy compleja puesto que, los macrófagos, principales células involucradas en la eliminación del parásito, son también las principales células hospedadoras (Andrade-Narváez *et al.*, 2017).

Cuando un hospedero es inoculado con parásitos de *Leishmania* spp. se desencadenan las respuestas inmune innata y adquirida. La inmunidad innata actúa desde la fase inicial de la infección, fomentando una respuesta inflamatoria rica en células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas), que actúan como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T, necesarios para iniciar la modulación de la respuesta inmune tipo celular. Por otra parte, la inmunidad adquirida, específica de antígeno, se desencadena cuando los linfocitos del

sistema inmune reconocen determinantes antigénicos del patógeno que han sido previamente presentados a los linfocitos T (Novais y Scott, 2015).

Los macrófagos y demás células fagocíticas tienen la capacidad de eliminar los patógenos intracelulares por medio de diferentes mecanismos que incluyen la respuesta oxidativa [formación de óxido nítrico (ON)] y la producción de enzimas lisosómicas y proteínas catiónicas. Dichos mecanismos se pueden potenciar por las citocinas producidas por los linfocitos T y conllevar a la eliminación del microorganismo fagocitado. La producción de citocinas al inicio de la infección es lo que determinará el perfil subsecuente de citocinas y el establecimiento o no de la infección (Novais y Scott, 2015).

Luego del contacto con los antígenos del parásito, expresados en la membrana del macrófago infectado, y dependiendo de la célula presentadora de antígeno, los niveles de citocinas endógenas y la naturaleza del antígeno reconocido, las células TCD4+ y TCD8+ proliferan y secretan un patrón de citocinas definidas con funciones efectoras diferentes. Las citocinas de tipo Th1, como IL-12, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , participan en la regulación del granuloma y la activación de macrófagos para aumentar su capacidad microbicida, además de inducir una respuesta celular, mientras que las citocinas de tipo Th2, como IL-10, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 y TGF- $\beta$ , regulan la producción de IgE por los linfocitos B que participan en la activación de reacciones de hipersensibilidad inmediata (Hernández-Ruiz y Becker, 2006).

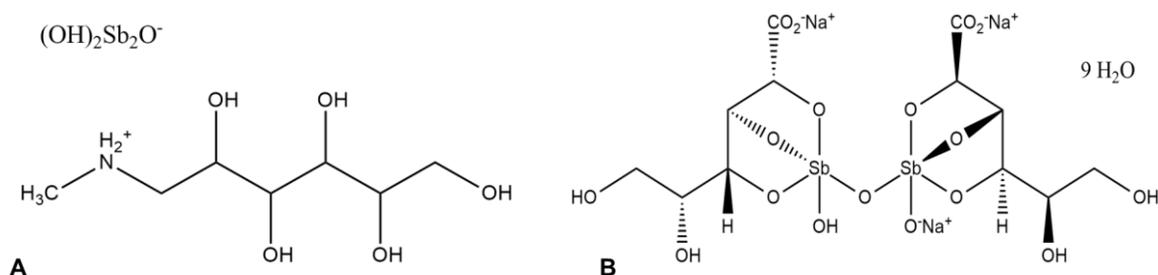
En la leishmaniosis, la eliminación del parásito depende de la activación de la célula hospedera, observándose que la producción de citocinas activadoras del macrófago se correlaciona con la curación. Respecto a esto, se sabe que el mecanismo por el cual se activa una respuesta Th1 o Th2 es de vital importancia para dirigir la reacción inmunitaria hacia la protección y curación o susceptibilidad y patogenia, respectivamente. Por otro lado, en la LMC se ha descrito la presencia de un perfil mixto de citocinas de tipo Th1 y Th2 con elevados niveles séricos de IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-5. Se ha señalado que el padecimiento se presenta por una sobreactivación de la respuesta proinflamatoria y la presencia de bajos niveles de IL-10; por lo que la curación depende en gran medida del balance entre las citocinas producidas. En este sentido, la participación de las células de la reacción inmunitaria innata, como células dendríticas (CD), NK (*natural killer*) y macrófagos, es motivo de intensa investigación. Se sabe que la producción de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 y TGF- $\beta$

por estas células en respuesta a *Leishmania* puede modificar notablemente la respuesta inmunitaria hacia un sinergismo o antagonismo de la replicación del parásito y por ende un agravamiento o resolución de la lesión, respectivamente (Novais y Scott, 2015; Hernández-Ruiz y Becker, 2006).

### 1.8 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CONTRA *LEISHMANIA* SPP.

El poder enfrentar EIDs como la LCL, supone contar, entre otros aspectos, con fármacos eficaces, seguros, fáciles de utilizar y asequibles a la población. A pesar de que la ciencia y la tecnología han avanzado lo suficiente como para proporcionar los medicamentos necesarios, son muy pocos los nuevos fármacos desarrollados contra esta enfermedad.

A nivel mundial se emplean como primera línea de tratamiento ante la LCL los antimoniales pentavalentes (Oliveira *et al.*, 2011). De los antimoniales existen dos presentaciones, el antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) (Figura 1.6 A) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®) (Figura 1.6 B).



**Figura 1.6.** Estructuras químicas de los compuestos antimoniato de N-metilglucamina (A) y estibogluconato de sodio (B) (Nagle *et al.*, 2014).

Estos medicamentos han sido el estándar de tratamiento por más de 60 años (Lezama-Dávila *et al.*, 2014), administrándose por vía intramuscular, intravenosa y en algunos casos intralesional, a una dosis de 20 mg/Kg/día durante un período de 20-28 días (Andrade-Narváez *et al.*, 2017; Kermanjani *et al.*, 2015). Sus mecanismos de acción son muy poco conocidos, hasta la fecha se sospecha que ingresan a las células huésped, cruzan la membrana fagolisosómica y se convierten en antimonio trivalente (Sb<sup>III</sup>). Una vez allí, comprometen el potencial redox de las células inhibiendo enzimas glucolíticas y oxidando ácidos grasos de los amastigotes de *Leishmania*, lo que a su vez se traduce en la inhibición

de adenosina trifosfato (ATP) y guanosina trifosfato (GTP) (Freitas-Junior *et al.*, 2012; Nilforoushzadeh *et al.*, 2008).

En la península de Yucatán, el tratamiento por excelencia es el Glucantime®. Durante el período de enero 1990 a diciembre 1994, Vargas-González *et al.* (1999) llevaron a cabo una investigación donde evaluaron la respuesta de la “úlceras de los chicleros” al tratamiento con antimonio de N-metilglucamina. Al finalizar el estudio, los 105 casos tratados presentaron una re-epitelización completa de la lesión, sin eritema residual ni recaída durante el seguimiento mensual de un año. Desde este momento, en la península de Yucatán, los casos con LCL causada por *L. (L.) mexicana* son tratados exitosamente con una dosis diaria de 10 mg/Kg/día de antimonio de N-metilglucamina durante 20 días, aproximadamente (Andrade-Narváez *et al.*, 2017; Vargas-González *et al.*, 1999).

Actualmente, el empleo de los antimoniales pentavalentes ha disminuido en muchos países debido a las reacciones adversas que producen, su elevado costo, largos períodos de administración y eventos tóxicos que provocan (Gillespie *et al.*, 2016; Ezatpour *et al.*, 2015). Entre los efectos adversos reportados se encuentran dolor musculoesquelético, anorexia, fatiga, fiebre, diarrea, náuseas, vómitos, cefalea, mareos, palpitations, prurito, disfunción renal, pancreática y hepática, así como cardiotoxicidad, asociada especialmente a altas dosis y tiempo prolongado (Ribeiro-Moreira *et al.*, 2017).

## **1.9 TRATAMIENTO ALTERNATIVO A PARTIR DE PLANTAS**

A lo largo de la historia, el empleo de plantas como medicina ha tenido como principal objetivo mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades, principalmente las crónicas. Esta práctica es denominada medicina tradicional o no convencional y es considerada el pilar principal de la prestación de servicios de salud en todo el mundo (OMS, 2013).

A consecuencia de la escasez de medicamentos eficaces, seguros y disponibles a la población para el tratamiento de la leishmaniosis, en los últimos años, la OMS ha recomendado el empleo de plantas medicinales para la búsqueda de nuevas moléculas con actividad leishmanicida, siempre y cuando la seguridad/toxicidad se tengan en cuenta (Gutiérrez-Rebolledo *et al.*, 2017; Lawal *et al.*, 2016).

Actualmente, se le ha atribuido actividad biológica leishmanicida a un sinnúmero de moléculas activas provenientes de plantas medicinales, tal es el caso de alcaloides, quinonas, terpenos, flavonoides, esteroides, neolignanos, fenilpropanoides, entre otros (Kermanjani *et al.*, 2015; Nilforoushzadeh *et al.*, 2008).

En México, se han realizado evaluaciones *in vitro* e *in vivo* a numerosas plantas medicinales con el objetivo de encontrar un nuevo fitofármaco que sea efectivo y eficaz contra la leishmaniosis. Peraza-Sánchez *et al.* (2007) describieron la evaluación de extractos metanólicos de 18 plantas medicinales del estado de Yucatán contra promastigotes de *L. (L.) mexicana*. Durante este estudio encontraron que los extractos de *T. procumbens* (planta completa), entre otras plantas, tenían potencial como posibles drogas leishmanicidas. En el Cuadro 1.4 podemos encontrar otras especies de plantas con actividad leishmanicida reportada y probadas en ensayos *in vitro*.

**Cuadro 1.4.** Plantas medicinales con actividad leishmanicida probada.

<b>Nombre científico</b>	<b>Familia</b>	<b>Parte empleada</b>	<b>Valor CI<sub>50</sub> contra promastigotes</b>	<b>Fuente</b>
<i>Allium sativum</i>	Amaryllidaceae	Bulbo	37 µg/mL	Khademvatan <i>et al.</i> , 2011
<i>Tridax procumbens</i>	Asteraceae	Planta completa	3 µg/mL	Peraza-Sánchez <i>et al.</i> , 2007
<i>Aphelandra scabra</i>	Acanthaceae	Hojas	15 µg/mL	
<i>Dorstenia contrajerva</i>	Moraceae	Planta completa	23 µg/mL	
<i>Clusia flava</i>	Guttiferae	Hojas	32 µg/mL	
<i>Byrsonima bucidaefolia</i>	Malpighiaceae	Corteza	60 µg/mL	
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Malpighiaceae	Corteza	14 µg/mL	
<i>Cupania dentata</i>	Fagaceae	Corteza	13 µg/mL	
<i>Peschiera australis</i>	Apocynaceae	Corteza	12 µg/mL	Gutiérrez-Rebolledo <i>et al.</i> , 2017
<i>Kopsia griffithii</i>	Apocynaceae	Hojas y corteza	6.25 µg/mL	
<i>Calophyllum brasiliense</i>	Calophyllaceae	Savia, Hojas	3 µg/mL	Tiuman <i>et al.</i> , 2012
<i>Pistacia khinjuk</i>	Anacardiaceae	Frutos	58.6 µg/mL	Ezatpour <i>et al.</i> , 2015

Otra especie de planta investigada y evaluada contra *Leishmania* es *A. sativum* (ajo), debido a su efecto inmunomodulador, el cual es capaz de inducir una respuesta de tipo Th1, aumentando las concentraciones de IFN-γ y la estimulación de la producción de ON

en macrófagos, impidiendo que la infección avance (Gamboa-León *et al.*, 2014; Ghazanfari *et al.*, 2006).

### 1.10 *TRIDAX PROCUMBENS*

*Tridax procumbens* L. (Figura 1.7), comúnmente conocida como hierba del toro, es una planta nativa de regiones tropicales y subtropicales como Centro y Sudamérica. Perteneciente a la familia Asteraceae, este género presenta la mayor concentración de especies en México (Martín-Quintal *et al.*, 2010; Powell, 1965).



**Figura 1.7.** Planta de *Tridax procumbens* L.

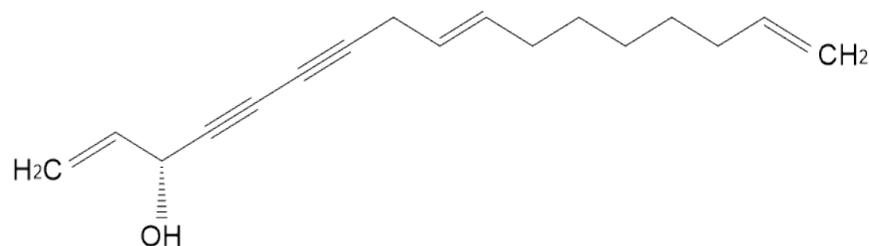
Esta planta herbácea es semiprostrada de 15 a 40 cm de altura; presenta hojas alargadas, opuestas, ovadas a lanceoladas con los márgenes cerrados, triplicadas, dentadas o dentadas onduladas a dentadas gruesas (Martín-Quintal *et al.*, 2010; Powell, 1965). La inflorescencia es un capítulo con tres dientes blancos sobre pedúnculos largos (de 10 a 20 cm), cubiertos de pelos erectos o recostados apuntando hacia la base, que pueden ser transportados por el viento por largas distancias, haciendo de esta especie una especie potencial invasiva si no se controla (Beck *et al.*, 2018).

**Cuadro 1.5.** Categoría taxonómica de *Tridax procumbens* L.

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliopsida
<b>Clase</b>	Asterales
<b>Subclase</b>	Asteridae
<b>Familia</b>	Asteraceae
<b>Subfamilia</b>	Asteroideae
<b>Género</b>	<i>Tridax</i>
<b>Especie</b>	<i>Tridax procumbens</i> L.

Investigadores a nivel mundial han evaluado la planta *T. procumbens* contra enfermedades tan diversas como la anemia, el resfriado, las inflamaciones, las hepatopatías, entre otras. Su amplio espectro contra enfermedades se debe al sin número de metabolitos secundarios con actividad probada como alcaloides, carotenoides, saponinas, flavonoides, taninos, etc., lo que la hace farmacológicamente activa como planta antimicrobiana, hepatoprotectora, antiviral, antifúngica, antioxidante, analgésica, antidiabética, antiinflamatoria, capaz de curar heridas, inmunomoduladora y antiprotozoaria (Beck *et al.*, 2018; Martín-Quintal *et al.*, 2010).

Novelo-Castilla (2005) aisló el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (Figura 1.8), una oxilipina tipo acetilénica C17, de *T. procumbens*. Este compuesto es un poliacetileno que se origina mediante la oxidación de ácidos grasos, predominantemente los ácidos linoleico y linolénico, una clase de lípidos oxigenados en las plantas que participan en las respuestas al daño físico causado por animales o insectos, estrés y ataque por patógenos (Martín-Quintal *et al.*, 2010).



**Figura 1.8.** Estructura química del compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol aislado de *Tridax procumbens* L. (Novelo-Castilla, 2005).

A partir de este hallazgo, Martín-Quintal *et al.* (2009) realizaron ensayos *in vitro* con el extracto metanólico de *T. procumbens* (planta completa) y el compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol contra promastigotes de *L. (L.) mexicana*. El resultado obtenido en esta investigación fue muy prometedor, puesto que los valores de concentración mínima que inhibe el 50% (CI<sub>50</sub>), fueron de 3.0 y 0.478 µg/mL para *T. procumbens* y la oxilipina, respectivamente.

Un año después, el mismo grupo de investigación, evaluó *in vitro* el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (L.) mexicana* de la cepa LV4 (MNYC/BZ62/M379). Los valores de CI<sub>50</sub> obtenidos en este estudio contra los promastigotes y amastigotes intracelulares fueron de 0.55 µM y 0.48 µM, respectivamente, lo que reafirma la elevada actividad leishmanicida de este compuesto *in vitro*. El estudio también arrojó que la inhibición de los amastigotes intracelulares fue independiente de la producción de ON.

### 1.11 ALLIUM SATIVUM

*Allium sativum* L., comúnmente conocida como ajo, es una especie vegetal que pertenece a la familia Liliaceae (Cuadro 1.6). La planta es originaria de Asia central y desde la antigüedad en la región mesoamericana en México (Geck *et al.*, 2020), se emplea como condimento culinario. Esta planta también es utilizada por sus múltiples propiedades terapéuticas con actividad antioxidante, hipoglicemiante, antiagregante y fibrinolítica, antihipertensiva, anticancerígena, antimicrobiana, antifúngica e inmunomoduladora (Shang *et al.*, 2019; Ghazanfari *et al.*, 2006).

**Cuadro 1.6.** Categoría taxonómica de *Allium sativum* L.  
(Foroutan-Rad *et al.*, 2015).

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Orden</b>	Asparagales
<b>Familia</b>	Amaryllidaceae
<b>Género</b>	<i>Allium</i>
<b>Especie</b>	<i>Allium sativum</i> L.

Esta planta perenne por lo general crece entre los 30 y 60 cm de altura y presenta flores. Sus frutos se presentan en forma de cápsula ovoidea divididos entre seis a 12 partes llamadas bulbos o dientes de ajo (Figura 1.9). Además, tienen un aroma muy característico y una gran variedad de texturas y sabores cuando está cocido o fresco (Lawal *et al.*, 2016).



**Figura 1.9.** Bulbos germinados de *Allium sativum* L.

Las propiedades organolépticas presentes en las plantas de este género se deben a la presencia de metabolitos secundarios farmacológicamente activos como los compuestos organosulfurados (Cavagnaro *et al.*, 2007). Entre los compuestos más importantes presentes en los extractos acuosos se destacan la aliina, alicina, *E*-ajoeno (*trans*-ajoeno), *Z*-ajoeno (*cis*-ajoeno), disulfuro de dialilo y el sulfuro de alilo (Martins *et al.*, 2016). De acuerdo con lo reportado por Isaac *et al.* (2014), la ingesta de estos compuestos por ratas no evidencia efectos tóxicos visibles, convirtiendo a la especie *A. sativum* en una candidata ideal para el tratamiento de diversas enfermedades.

Numerosos estudios que han realizado pruebas *in vitro* e *in vivo* destacan la capacidad inmunomoduladora de los componentes del ajo en la síntesis o secreción de citocinas de tipo Th1 y Th2, como IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , además de modular la activación de macrófagos e inducir la producción de ON por parte de éstos (Martins *et al.*, 2016; Foroutan-Rad *et al.*, 2015; Ghazanfari *et al.*, 2006).

### 1.12 MEZCLA *TRIDAX PROCUMBENS* Y *ALLIUM SATIVUM*

Gamboa-León *et al.* (2007) reportaron el efecto terapéutico del extracto acuoso liofilizado de bulbos de *A. sativum* en ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana*. En este estudio la actividad leishmanicida estuvo mediada por la presencia de células T productoras de IFN- $\gamma$  y la subsecuente activación de macrófagos y producción de ON, confirmando las propiedades de *A. sativum* como inmunomodulador.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente y los alentadores resultados obtenidos *in vitro* con el extracto metanólico de *T. procumbens* frente a promastigotes de *Leishmania*, Gamboa-León *et al.* (2014) realizaron un estudio *in vivo* evaluando ambos extractos por separado y sus mezclas. Los extractos y la mezcla fueron aplicados durante dos semanas vía intraperitoneal a roedores de la cepa CD-1, inoculados con  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. (L.) mexicana* en el cojinete plantar izquierdo. Las dosis empleadas en el estudio fueron de 20 mg/Kg/día de cada extracto por separado y 40 mg/Kg/día de la mezcla de ambos.

Este estudio arrojó que tanto el extracto metanólico de *T. procumbens* como el extracto acuoso de *A. sativum* por separado tienden a la reducción del desarrollo de la lesión cutánea, mientras que la mezcla de estos extractos lo hace de forma significativa. De acuerdo con los autores, estos resultados se deben al mecanismo de acción de *A. sativum* como agente inmunomodulador de la respuesta inmune en roedores y a la elevada actividad leishmanicida del compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol presente en el extracto metanólico de *T. procumbens*, el cual tuvo una actividad *in vitro* frente a amastigotes intracelulares de 0.48  $\mu\text{g/mL}$  como valor de  $\text{CI}_{50}$ . Esto sugiere que el extracto metanólico de *T. procumbens* pudiese tener un efecto directo no sólo sobre los amastigotes de *L. (L.) mexicana*, sino también un efecto aditivo con el extracto acuoso de *A. sativum* en la modulación de la respuesta inmune.

## JUSTIFICACIÓN

La LCL es una enfermedad desatendida en México y muchos otros países de bajos ingresos. El tratamiento actual consiste en la aplicación intramuscular o intravenosa de antimoniales pentavalentes como esquema de primera línea. Estos fármacos son muy tóxicos, ineficientes en ocasiones, poco asequibles a la población más necesitada y debido a la vía de administración empleada, su aplicación es dolorosa, lo que conlleva a que los pacientes bajo tratamiento lo abandonen. Por tales motivos, es de extrema necesidad la búsqueda de un tratamiento alternativo que sea efectivo, económico, lo más inocuo posible y menos doloroso. La vía de administración oral es una candidata excelente para evaluar debido a su facilidad, rapidez y ausencia de dolor al ejecutarla. Estudios *in vitro* del compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (L.) mexicana* revelan actividad leishmanicida muy prometedora, así como el empleo del extracto metanólico de *T. procumbens* y extracto acuoso de *A. sativum* como agente inmunomodulador. Por ello, establecer la dosis efectiva de los mismos sería un paso hacia adelante en la obtención de posibles fármacos. Además, no constan antecedentes del empleo de la oxilipina tipo acetilénica C17 como agente leishmanicida *in vivo*. Por lo tanto, se considera que el empleo del extracto metanólico de *T. procumbens* (raíz) y de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, en combinación con el extracto acuoso liofilizado de *A. sativum* (bulbos) es una propuesta esperanzadora para los habitantes de las regiones con muy escasa asistencia médica.

## HIPÓTESIS

El extracto metanólico de *T. procumbens* (raíz) y su principio activo oxilipina, en combinación con el extracto acuoso liofilizado de bulbos de *A. sativum*, administrados por vía oral son efectivos contra *L. (L.) mexicana* en ratones BALB/c.

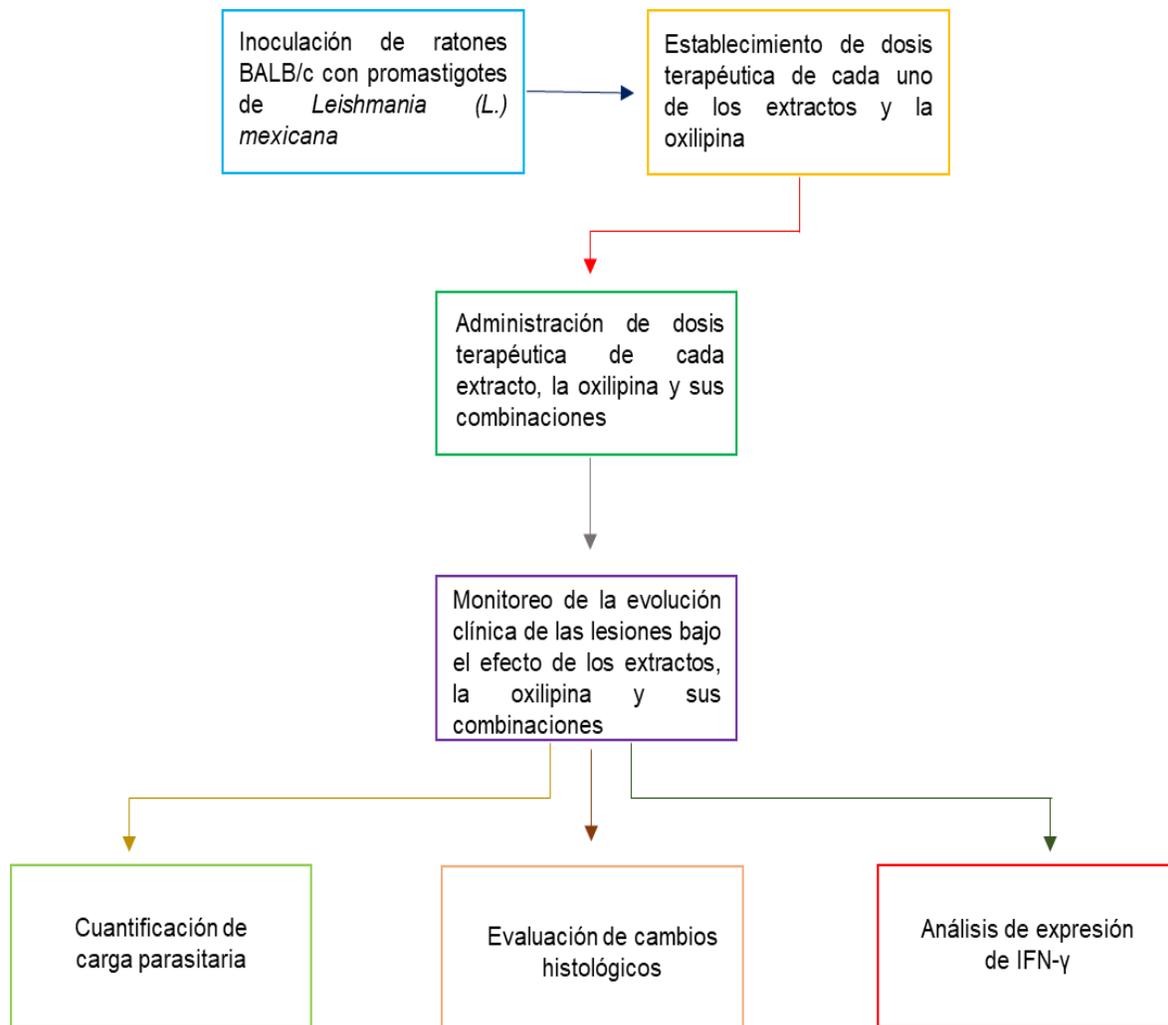
## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar *in vivo* el extracto metanólico de *T. procumbens* (raíz) y su principio activo oxilipina en combinación con el extracto acuoso liofilizado de bulbos de *A. sativum* por vía oral en ratones BALB/c infectados con *L. (L) mexicana*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer la dosis terapéutica de los extractos y la oxilipina administrados por vía oral para la reducción de las lesiones cutáneas en ratones BALB/c.
2. Evaluar la efectividad del extracto de *T. procumbens* y la oxilipina en combinación con *A. sativum* en la reducción de las lesiones y la carga parasitaria en ratones BALB/c.
3. Evaluar los cambios histológicos asociados a la administración de los extractos y sus combinaciones en ratones BALB/c.
4. Determinar la respuesta inmune asociada a la administración de los extractos y sus combinaciones en ratones BALB/c, mediante el análisis de expresión de IFN- $\gamma$ .

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

**Figura 1.10.** Estrategia experimental.

---

## CAPÍTULO II

### ESTABLECIMIENTO DE DOSIS TERAPÉUTICA DE LOS EXTRACTOS Y LA OXILIPINA ADMINISTRADOS POR VÍA ORAL EN RATONES BALB/c INFECTADOS CON *L. (L.) MEXICANA*

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

El descubrimiento, desarrollo y empleo de una nueva molécula o medicamento depende de un largo y costoso proceso. Durante este proceso se demuestra en diferentes fases la eficacia, seguridad y calidad de este (Genoma España, 2012). Una de las fases realizadas es la preclínica o estudios en animales de laboratorio, donde el principal propósito es evaluar *in vivo* la actividad biológica de la sustancia (Marovac, 2001). Durante esta etapa, además, se establece la dosis terapéutica, que se define como la capacidad que tiene una sustancia de producir el efecto terapéutico o efecto deseado en un organismo (Aristil, 2010), el vehículo de administración y las rutas por las cuales se puede administrar dicha sustancia (Diehl *et al.*, 2001).

Diversos reportes científicos plantean que las vías de administración más empleadas para hacerle frente a la leishmaniosis son la vía intramuscular, intravenosa, tópica y oral. En México, la terapia contra la LCL consiste en aplicaciones diarias durante 20-25 días de antimonio pentavalente vía intramuscular o intravenosa (McGwire y Satoskar, 2014).

El empleo de estas vías parenterales suponen como principales ventajas: efecto farmacológico muy rápido o inmediato, obtención de la concentración deseada con exactitud y posibilidad de aplicar sustancias levemente irritantes; sin embargo, su aplicación durante un período prolongado de tiempo provoca en ocasiones el abandono de la terapia por parte del paciente debido a que las reacciones adversas se presentan con mayor intensidad, es una terapia muy dolorosa y se requiere personal médico capacitado para su aplicación (Aristil, 2010). Por otra parte, el empleo de la vía oral o enteral, presume ser la vía más común para la administración de medicamentos debido a su facilidad, inocuidad y comodidad a la hora de ingerir uno o varios fármacos. Además, es segura, práctica,

económica, eficaz y sobre todo no se requiere de personal médico para su aplicación (Aristil, 2010; Brunton *et al.*, 2007).

Por lo anteriormente mencionado, en este proyecto, se evaluó la efectividad de los extractos y la oxilipina por vía oral, como una ruta de administración alternativa en el tratamiento de la leishmaniosis.

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1.1 Extractos de plantas**

Se usaron 1.5 Kg de raíz de *T. procumbens* L., que fue colectada en Mérida, Yucatán, México, en febrero 2004. El espécimen fue autenticado por F. May-Pat y depositado en el herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) bajo el vóucher FMay-1955. El extracto metanólico de *T. procumbens* (raíz) fue obtenido de acuerdo con el método descrito por Martín-Quintal *et al.* (2009). La identificación, aislamiento y purificación previa del compuesto activo (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol fue realizada por el método descrito por Martín-Quintal *et al.* (2009).

Se emplearon 1.5 Kg de bulbos de *A. sativum* L. que fueron pelados y secados en una estufa de desecación a 100 °C. Posterior a las 48 h, los bulbos se recuperaron a peso constante. Los bulbos secos de ajo fueron homogeneizados con 1 L de agua destilada, filtrados a través de papel de filtro Whatman No. 1, centrifugados y liofilizados según Gamboa-León *et al.* (2007).

Los extractos y la oxilipina se re-disolvieron en una disolución al 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) en cloruro de sodio 0.9% y dosificados para el tratamiento.

### **2.1.2 Animales**

En el estudio se emplearon roedores BALB/c hembras, adultas jóvenes entre 6 y 8 semanas de edad y peso entre 17-22 g. Durante la experimentación los animales fueron alojados en el bioterio del Centro de Investigaciones Regionales (CIR) “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), agrupados en jaulas medianas (seis por jaula) y alimentados con comida estándar y agua *ad libitum*. Los mismos se mantuvieron bajo temperatura estándar de 22 ± 2 °C y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h. Los experimentos

---

se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999 (lineamientos para el empleo de animales de laboratorio), y los Estándares del Comité de Bioética en Investigación del CIR-UADY con ID: CEI-003-2018.

### 2.1.3 Parásitos

Promastigotes de *L. (L.) mexicana*, cepa MHET/MX/97/Hd18, fueron mantenidos por pases seriados en el cojinete plantar de hámster sirio dorado con el fin de mantener su virulencia. Los parásitos fueron obtenidos mediante la técnica de aspirado y cultivados en medio 199 con 10% de suero fetal bovino, 0.1%  $\beta$ -mercaptoetanol, 10 mM L-Glutamina, 20 mM piruvato sódico y 100 U/mL penicilina-estreptomina durante 7 días a 23.5 °C. Los promastigotes en fase estacionaria fueron lavados tres veces con fosfato salino buferado (PBS) 1X, contados en cámara de Neubauer y ajustados al tamaño de inóculo.

### 2.1.4 Infección de ratones BALB/c con *L. (L.) mexicana*

Los roedores fueron inoculados subcutáneamente en la parte superior afeitada de la pata trasera derecha (Bruzual *et al.*, 2008) con 40  $\mu$ L de la suspensión de parásitos que contenía  $2.5 \times 10^6$  promastigotes de *L. (L.) mexicana*. Posterior a la inoculación, todos los animales fueron examinados clínicamente durante ocho semanas hasta la aparición de las lesiones ( $3.57 \pm 1.36$  mm de diámetro). Luego, los roedores se dividieron en 15 grupos diferentes.

### 2.1.5 Establecimiento de la dosis terapéutica

Se evaluó el efecto de diferentes dosis de los extractos (*T. procumbens* y *A. sativum*) y el compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol sobre las lesiones causadas por *L. (L.) mexicana*. Las dosis evaluadas fueron 20, 40, 80, 160 y 320 mg/Kg/día durante 14 días, mientras que para el tratamiento con la oxilipina sólo se administraron dosis desde 20 a 160 mg/Kg/día, puesto que 320 mg durante 14 días correspondería a una dosis acumulada de 4,480 mg, muy cercana a la tóxica (Burgos, 2020). Las dosis se administraron por vía oral mediante una cánula intragástrica. Cada grupo experimental contó con un grupo control al que sólo se le administró disolución salina. Los diámetros de las lesiones fueron medidos antes de iniciar el tratamiento (día 0) y una vez por semana durante cuatro semanas (7, 15, 21 y 28 días) y analizados con el software ImageJ. El tamaño de la lesión se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$S = \frac{(D+d)}{2}$$

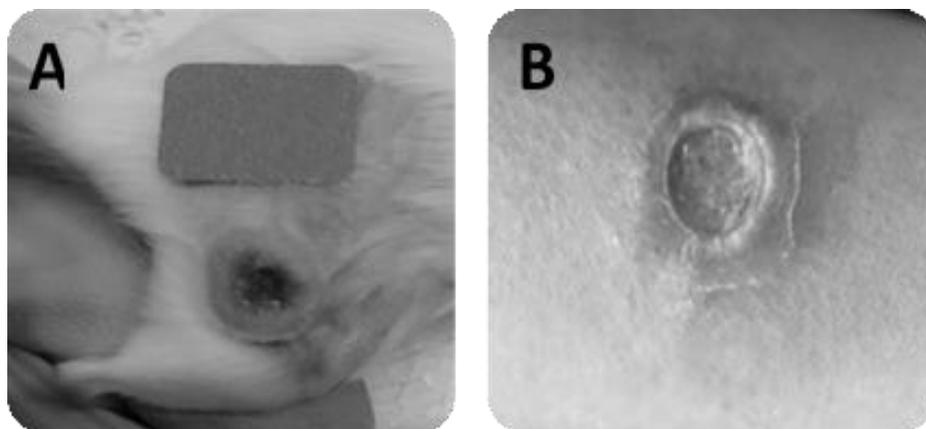
donde, S: tamaño de la lesión, D: diámetro mayor, d: diámetro menor.

### 2.1.6 Análisis estadístico

Los datos son presentados como las medias  $\pm$  desviación estándar. La comparación del tamaño de la lesión entre las dosis de cada grupo y su correspondiente grupo control se llevó a cabo mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la post-prueba de Dunnett. Este método se emplea en el ANOVA para identificar las diferencias entre la media de cada nivel de factor y la media de un grupo control. El valor  $p$  menor a 5% fue considerado estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

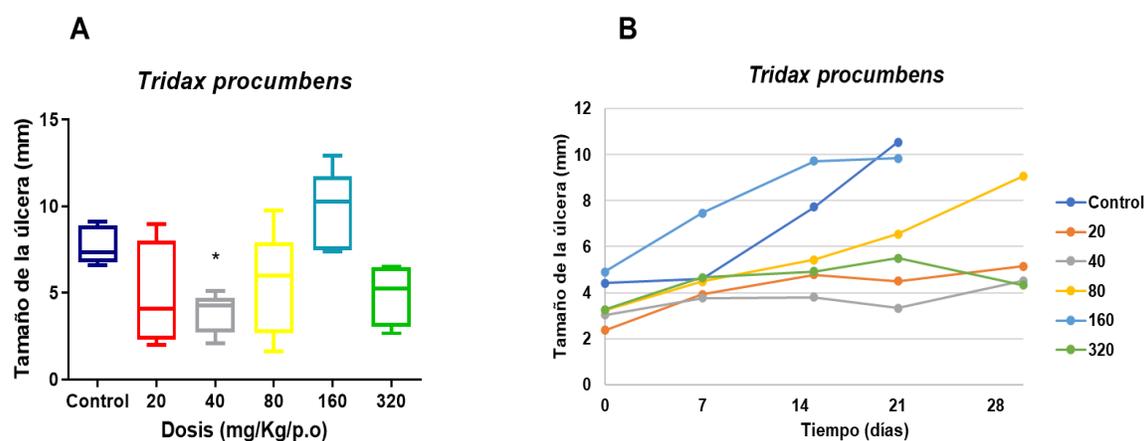
En la semana número cuatro después de realizar la inoculación, los ratones comenzaron a presentar signos de LCL. Las lesiones en los ratones fueron muy semejantes a las observadas en pacientes humanos, es decir, una única lesión, ulcerada, de bordes indurados y fondo limpio (Andrade-Narváez *et al.*, 2001). La Figura 2.1A corresponde a una lesión causada por *L. (L.) mexicana* en ratones BALB/c, mientras que la Figura 2.1B representa una lesión de un paciente infectado con la misma especie de parásito.



**Figura 2.1.** (A) Lesión cutánea causada por *Leishmania (Leishmania) mexicana* en ratón BALB/c y (B) úlcera observada en paciente con LCL. Ambas úlceras corresponden a la típica lesión de LCL causada por esta especie.

El efecto de la administración oral del extracto metanólico de *T. procumbens*, el extracto acuoso de *A. sativum* y el compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol sobre las lesiones cutáneas en ratones BALB/c fue analizado en esta etapa del estudio. Durante la administración de los tratamientos ningún animal murió o mostró signos de toxicidad. El elevado margen de seguridad del extracto metanólico de *T. procumbens* y el extracto acuoso de *A. sativum* ya ha sido demostrado previamente (Gamboa-León *et al.*, 2014).

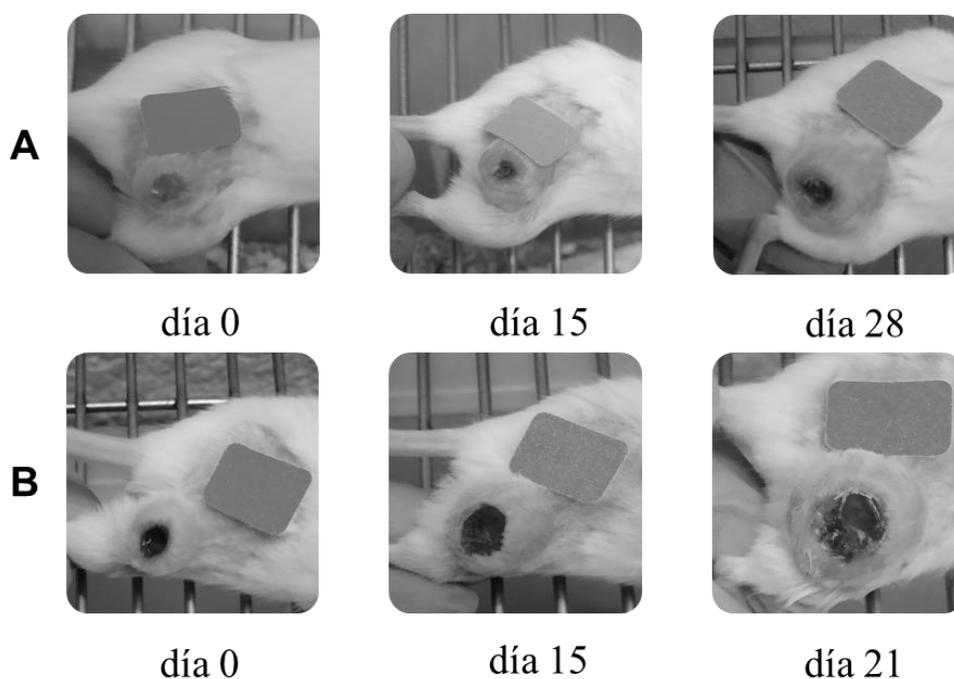
Como se mencionó anteriormente, el tamaño de las lesiones en todos los grupos fue medido antes de iniciar el tratamiento (día 0) y a los días 7, 15 (fin del tratamiento), 21 y 28. Se realizó el análisis estadístico comparando todos los grupos en los diferentes tiempos, sin embargo, sólo se observaron diferencias significativas en el día 15. El análisis estadístico reveló una reducción significativa del tamaño de la úlcera en el grupo tratado con la dosis de 40 mg/Kg/día del extracto metanólico de *T. procumbens* en comparación con el grupo control ( $p = 0.0036$ ) (Figura 2.2A). Además, las lesiones de los ratones tratados con esta dosis no aumentaron significativamente después de dos semanas post- tratamiento (día 28) en comparación con los ratones tratados con las otras dosis y el grupo de control (Figura 2.2B).



**Figura 2.2.** A: Tamaño de las úlceras en ratones BALB/c después del tratamiento (día 15) con extracto metanólico de *Tridax procumbens* (raíz); B: Evolución del tamaño de las úlceras con las diferentes dosis.

En un estudio previo, la inyección intraperitoneal de 20 mg Kg/día del extracto metanólico de *T. procumbens* mostró una tendencia a reducir el desarrollo de lesiones cutáneas en ratones CD-1 infectados con *L. (L.) mexicana* en comparación con el grupo control

(Gamboa-León *et al.*, 2014). Por el contrario, en este estudio, la reducción significativa del tamaño de la úlcera se observó con la administración oral de 40 mg/Kg/día al término del tratamiento (día 15) (Figura 2.3).



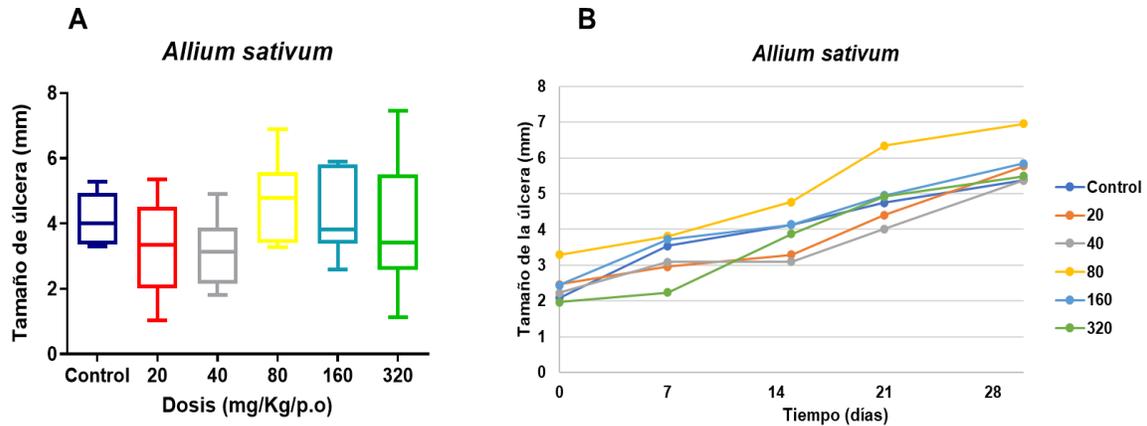
**Figura 2.3.** Evolución de úlceras en ratones BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*. A: Dosis 40 mg/Kg/día de extracto metanólico de *Tridax procumbens*; B: grupo control con disolución salina.

La diferencia en el efecto de *T. procumbens* sobre las lesiones cutáneas causadas por *L. (L.) mexicana* pudiera atribuirse a las diferencias en el sitio de inoculación de los parásitos, la vía de administración y la cepa del ratón empleada, así como al efecto dosis dependiente señalado en el estudio realizado por Yaduvanshi *et al.* (2011), donde el aumento de la dosis de *T. procumbens* exhibió propiedades anti cicatrizantes en lesiones dérmicas.

Nuestros resultados sugieren que la dosis de 40 mg/Kg/día del extracto metanólico de *T. procumbens* podría estudiarse más a fondo para investigar su potencial actividad leishmanicida y cicatrizante.

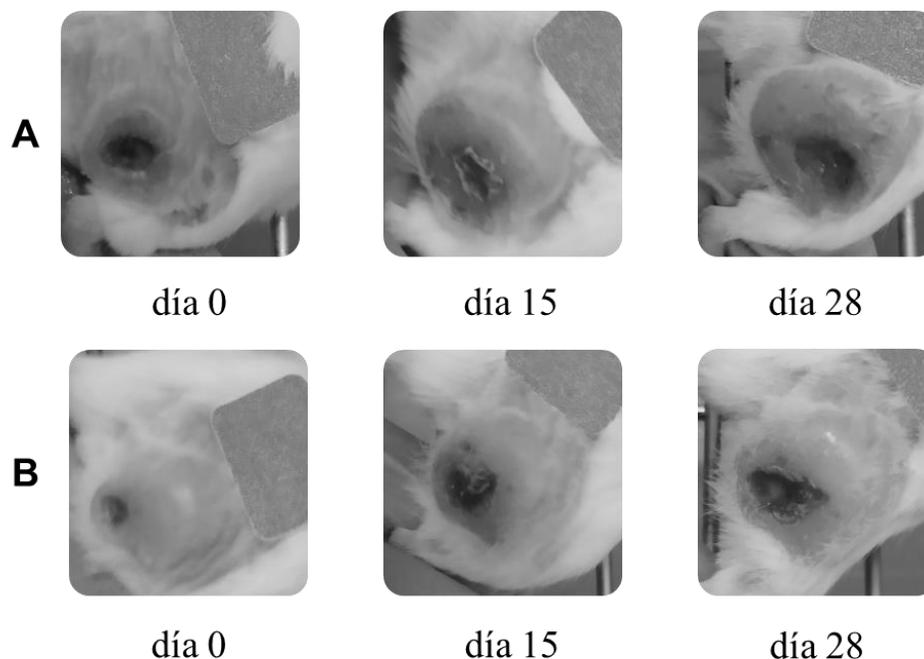
Respecto al grupo tratado con extracto acuoso de *A. sativum*, no se observaron diferencias significativas ( $p = 0.2547$ ) entre los tamaños de las úlceras de las diferentes dosis y el grupo control (Figura 2.4A), sin embargo, se pudo observar que los efectos asociados a las dosis

de 20 y 40 mg/Kg/día fueron muy similares (Figura 2.4B) mostrándose el menor tamaño de lesión entre estos grupos al término del tratamiento (día 15).



**Figura 2.4.** A: Tamaño de las úlceras en ratones BALB/c después del tratamiento (día 15) con extracto acuoso de *Allium sativum*; B: Evolución del tamaño de las úlceras con las diferentes dosis.

A pesar de ello, las lesiones aumentaron las siguientes dos semanas de terminado el tratamiento (días 21 y 28) alcanzando niveles similares a los otros grupos (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** Evolución de úlceras en ratones BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*. A: Dosis 20 mg/Kg/día de extracto acuoso de *Allium sativum*; B: grupo control con disolución salina.

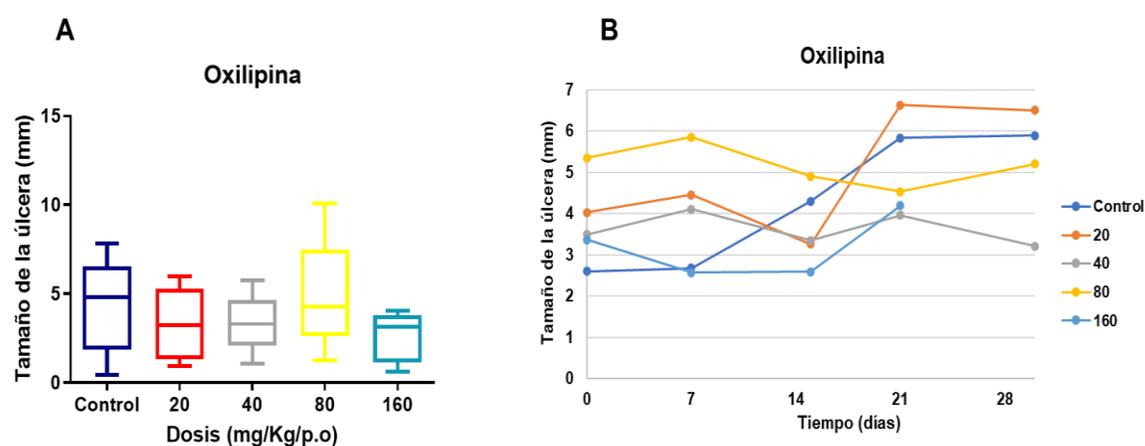
En la Figura 2.5 se puede apreciar la reducción del tamaño de la úlcera en el ratón BALB/c al concluir con el tratamiento de extracto acuoso de *A. sativum* (día 15) con respecto al día 0 (sin tratamiento). Posterior a esta etapa, la lesión volvió a aumentar su tamaño considerablemente. Por otra parte, también se puede observar que la úlcera del grupo control, a pesar de ser más pequeña al día 0 respecto al grupo tratado, al día 15 el aumento de ésta era considerable comparada con la inicial.

La actividad leishmanicida *in vivo* de los extractos metanólico y acuoso de *A. sativum* ha sido demostrada previamente. Gamboa-León *et al.* (2014) demostraron la reducción de las lesiones en el cojinete plantar de ratones CD-1 causadas por *L. (L.) mexicana* después de la inyección intraperitoneal de 20 mg/Kg/día (durante dos semanas) del extracto acuoso de *A. sativum*.

Actualmente, la mayoría de los estudios referentes al tema evalúan los extractos de *A. sativum* sobre la hinchazón del cojinete plantar, sin embargo, en este estudio evaluamos su efecto sobre las úlceras cutáneas, úlceras muy similares a las que se producen en pacientes. Si bien, es cierto que diferencias en la cepa de parásitos, tamaño y sitio del

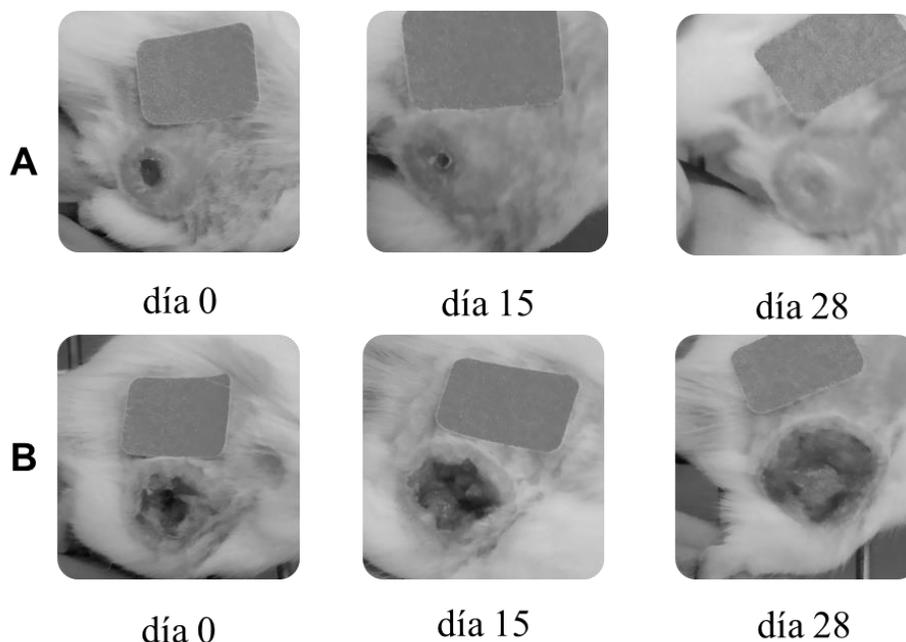
inóculo y la vía de administración pueden generar datos contradictorios, es necesario realizar más estudios para demostrar el potencial de los extractos de *A. sativum*, solos o en combinación con otros compuestos bioactivos, como una alternativa terapéutica para el tratamiento de LCL. Para ello, se propone el empleo de la dosis vía oral de 20 mg/Kg/día.

Respecto al grupo tratado con el compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, aislado de *T. procumbens*, no se observaron diferencias significativas ( $p = 0.5523$ ) entre los tamaños de la úlcera de las diferentes dosis administradas con respecto al grupo control (Figura 2.6 A).



**Figura 2.6.** A: Tamaño de las úlceras en ratones BALB/c después del tratamiento (día 15) con el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol; B: Evolución del tamaño de las úlceras con las diferentes dosis.

En la Figura 2.6B se observa que ninguna dosis permitió la reducción significativa de las lesiones respecto al grupo control. Sin embargo, durante el tratamiento con las dosis de 40 y 80 mg/Kg/día, al menos un roedor logró resolver la úlcera (Figura 2.7), lo que sugiere que dichas dosis podrían tener un efecto farmacológico sobre la LCL.



**Figura 2.7.** Evolución de úlceras en ratones BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*. A: Dosis 40 mg/Kg/día del compuesto oxilipina; B: grupo control con disolución salina.

En la Figura 2.7 se observa evidencia de la evolución clínica de uno de los roedores curados (dosis 40 mg/Kg/día de oxilipina) respecto a uno del grupo control. En ella se aprecia cómo la úlcera cerró completamente al día 28 con respecto al día 0, sin embargo, el borde indurado de la lesión permaneció. De acuerdo con lo reportado por Andrade-Narváez *et al.* (2005), la mayoría de los amastigotes se ubican en el borde de la lesión, lo que sugiere que el tratamiento con la oxilipina pudo haber logrado la cura clínica pero no parasitológica. Estos mismos autores describen que el tamaño de la lesión en pacientes con LCL es inversamente proporcional a la cantidad de parásitos presentes, por lo que nuestros resultados podrían sugerir una posible propiedad cicatrizante del compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol. Esto pudiera estar muy relacionado con el reporte realizado por Yaduvanshi *et al.* (2011), donde el empleo tópico del jugo de las hojas de *T. procumbens* sobre heridas dérmicas en ratones suizos albinos estimuló la síntesis de colágeno (paso esencial para la curación rápida de una herida), la proliferación de fibroblastos y la neovascularización de la zona dañada. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evalúa el efecto de la administración oral del compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol sobre las lesiones cutáneas causadas por *Leishmania*. Sin embargo,

se necesitan más estudios que evalúen tanto la carga parasitaria como el infiltrado celular después del tratamiento para confirmar su actividad leishmanicida. Por tanto, en el presente estudio se propone evaluar la dosis de 40 mg/Kg/día, ya que es la dosis más baja que permitió la cura de las lesiones en al menos un ratón.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante esta primera fase del estudio, la dosis terapéutica establecida para el extracto metanólico de *T. procumbens* (raíz) es de 40 mg/Kg/día, mientras que para el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol y el extracto acuoso de *A. sativum* se propone probar 40 y 20 mg/Kg/día, respectivamente.



## CAPÍTULO III

### EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS Y LA OXILIPINA EN EL CURSO CLÍNICO Y LA REDUCCIÓN DE LA CARGA PARASITARIA

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Durante más de 60 años, el empleo de antimoniales pentavalentes contra la leishmaniosis ha sido la terapia más empleada. Una de las implicaciones de emplear estos fármacos, entre otras, es que la cura en los pacientes tratados es clínica, pero no parasitológica, lo que conlleva a la reaparición de la infección pasado el tiempo (Andrade-Narváez *et al.*, 2001). Por estos motivos, conocer la capacidad que tienen las nuevas moléculas en estudio en eliminar completamente a los parásitos es atractivo para el diseño de nuevas formulaciones leishmanicidas, siendo la cuantificación de la carga parasitaria en tejidos lesionados una de estas vías.

#### 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

##### 3.2.1 Animales, parásitos e infección de roedores con *L. (L.) mexicana*

Durante esta fase del estudio se emplearon roedores BALB/c hembras, adultas jóvenes entre 6 y 8 semanas de edad y peso entre 17-22 g. Sus condiciones de alojamiento y alimentación fueron descritas anteriormente en el Capítulo II. De igual manera, en este capítulo se describen las condiciones de cultivo de los parásitos y el tamaño de inóculo empleado para la infección de los roedores con promastigotes de *L. (L.) mexicana*.

##### 3.2.2 Evaluación de las dosis terapéuticas de los extractos y la oxilipina y sus combinaciones

Posterior a la inoculación, todos los animales fueron examinados clínicamente durante ocho semanas hasta la aparición de las lesiones ( $4.03 \pm 0.15$  mm de diámetro). Luego, los roedores se dividieron en siete grupos diferentes para su posterior estudio. Los grupos comprendían las dosis terapéuticas del extracto metanólico de *T. procumbens* (raíz), el extracto acuoso de *A. sativum* (bulbos), el compuesto puro (3S)-16,17-disdehidrofalcarinol, la combinación *T. procumbens*-*A. sativum* y oxilipina-*A. sativum*, así como los controles

positivos y negativos, Glucantime® y disolución salina, respectivamente. A partir del día uno de la administración de los extractos, se realizó un seguimiento clínico de 4 semanas para determinar la efectividad de las combinaciones. A los días 7, 15, 21 y 28 se realizaron mediciones del tamaño de la lesión con el software ImageJ.

### **3.2.3 Toma de biopsias y extracción de ADN**

Dos semanas después de haber concluido la administración de los tratamientos y la disolución salina para el grupo control, los roedores fueron eutanizados con una sobredosis de isoflurano. Las muestras de tejidos tomadas del sitio de la lesión se pesaron y almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en crioviales hasta su uso. El ADN genómico fue extraído a partir de 50-100 mg de tejido empleando el método de proteinasa K y fenol: cloroformo/alcohol isoamílico (protocolo descrito en el Laboratorio de Inmunología del CIR-UADY), seguido de un paso de precipitación con isopropanol. Las muestras se lavaron con etanol al 70%, se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron con una disolución de Tris/HCl/EDTA (TE 1X). Posterior a este paso, se cuantificaron en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific NanoDrop) y se almacenaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo.

### **3.2.4 Determinación de la carga parasitaria**

La cuantificación de la carga parasitaria se llevó a cabo mediante la generación de una curva estándar realizada a partir de ADN extraído de promastigotes de la cepa de referencia MHET/MX/97/Hd18 de *L. (L.) mexicana*. Los parásitos se cultivaron en medio 199 suplementado con suero fetal bovino al 10% durante siete días a  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después de este tiempo, los promastigotes en fase estacionaria se lavaron con PBS 1X y se ajustaron a una concentración final de  $5 \times 10^7$  parásitos/mL. A partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas para obtener una curva de  $1 \times 10^6$  hasta 1 parásito.

La amplificación se llevó a cabo empleando el kit iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) y los iniciadores JW11 (5'-CCTATTTTACACCAACCCCGAGT-3') y JW12 (5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAA-3') a una concentración final de  $10\text{ }\mu\text{M}$ . La amplificación se realizó por triplicado en un volumen final de  $10\text{ }\mu\text{L}$  ( $20\text{ ng}$  de ADN) bajo las siguientes condiciones de reacción:  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 min,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 min, seguido por 40 ciclos de  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 s, y  $67\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min. Para descartar la presencia de amplificaciones inespecíficas se

realizó el análisis de curva de disociación a 95 °C por 15 s, 67 °C por 1 min y 95 °C por 15 s, con incrementos de la temperatura de 0.3 °C.

Se graficó el logaritmo de la cantidad de parásitos correspondiente contra el valor de *Ct* (*Cycle Threshold*, por sus siglas en inglés) obtenido de la amplificación por PCR en tiempo real de cada dilución. Con un análisis de regresión lineal se interpolaron los *Ct* obtenidos de la amplificación de las muestras de tejido tomadas de los ratones BALB/c de cada uno de los grupos experimentales. Los resultados se expresan en número de parásitos en 20 ng de ADN.

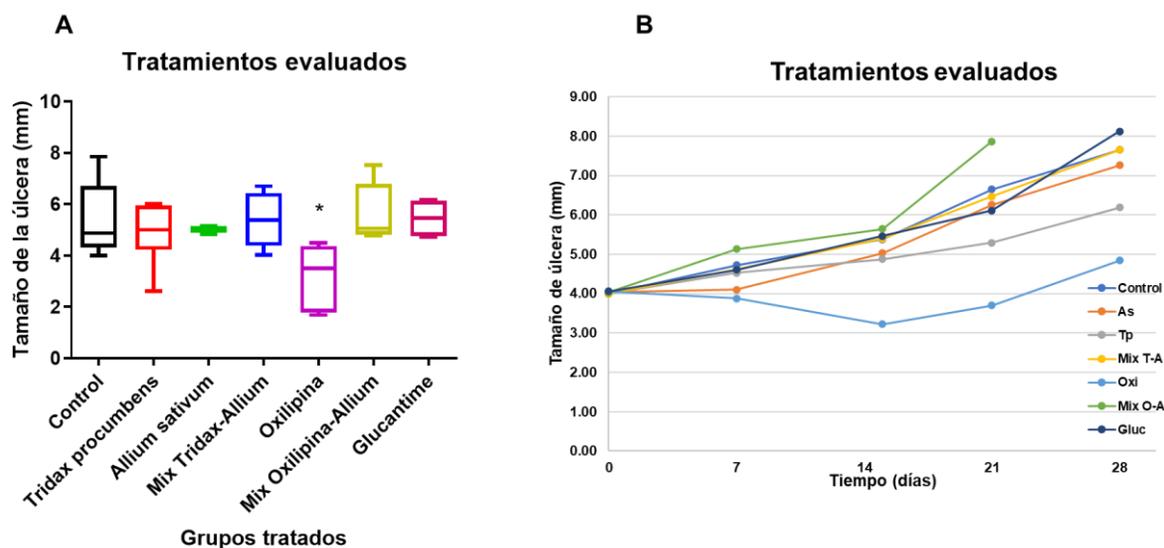
### **3.2.5 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó empleando el software Graph Pad Prism 8.0.6. Se determinó mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov si los datos se ajustaban a una distribución normal. Además, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar. Los valores *p* menores a 5% fueron considerados estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

## **3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Posterior a la inoculación, a partir de la semana número cuatro, los roedores comenzaron a presentar signos de LCL, enrojecimiento de la zona de inoculación y posterior aparición de una única úlcera, redondeada, fondo limpio y con ausencia de linfangitis y adenopatía (Andrade-Narváez *et al.*, 2017). No fue hasta la semana 8 que ya establecidas las lesiones se comenzó con las administraciones de los diferentes tratamientos. Los análisis realizados corresponden a los datos obtenidos para el día 15.

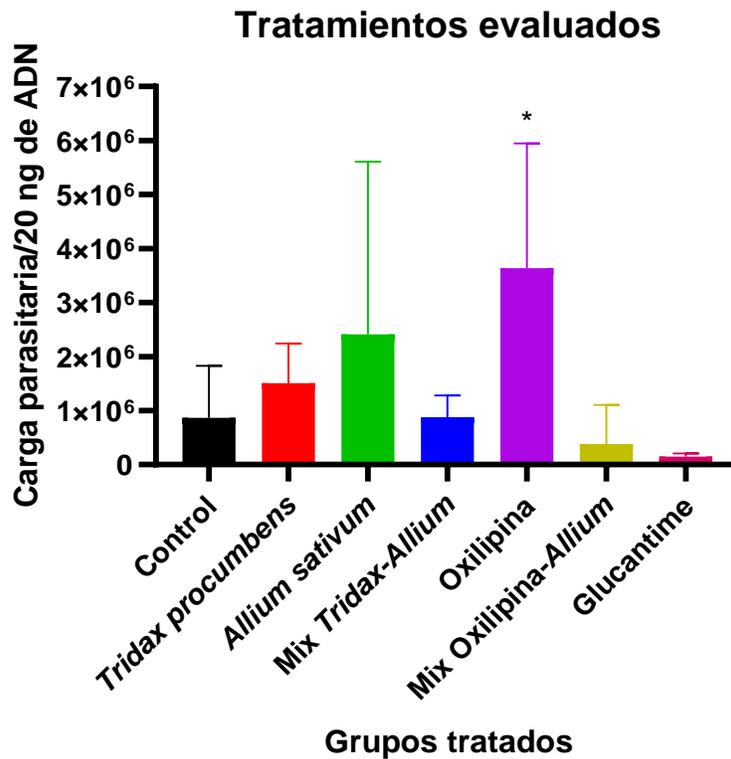
El análisis estadístico realizado a los datos obtenidos para todos los tratamientos (incluyendo el control positivo) reveló que sólo existen diferencias significativas entre el tamaño de la lesión del grupo tratado con la oxilipina y el grupo control negativo ( $p = 0.0170$ ) (Figura 3.1A).



**Figura 3.1.** A: Tamaño de las úlceras en ratones BALB/c después de todos los tratamientos (día 15); B: Evolución del tamaño de las úlceras en el tiempo a diferentes tratamientos.

En la Figura 3.1B se puede observar claramente la disminución del tamaño de la úlcera del grupo tratado con la oxilipina (día 15) respecto al resto de los tratamientos. En este caso, al concluir con la administración del compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, las úlceras tendieron a aumentar su tamaño (día 28). Sin embargo, este aumento no fue significativo en comparación con los ratones administrados con los otros tratamientos. Durante esta etapa, el grupo tratado con la oxilipina presentó al menos un roedor que resolvió la lesión, correspondiéndose con los resultados obtenidos en la primera fase.

Respecto a la carga parasitaria, se observó que el grupo tratado con la oxilipina tuvo diferencias significativas comparado con el grupo control ( $p = 0.0252$ ). Sin embargo, se encontró que las diferencias están relacionadas con un aumento considerable de la carga parasitaria, lo cual no fue esperado, puesto que en el capítulo anterior se mencionó que fue precisamente en este grupo donde al menos un roedor logró resolver la lesión (Figura 3.2). En este caso puntual, en el roedor se observa una re-epitelización o cicatrización del sitio de la lesión. Este resultado se relaciona con lo reportado por Yaduvanshi *et al.* (2011), donde los autores plantean las propiedades cicatrizantes del extracto de *T. procumbens*, extracto donde el principio activo es la oxilipina. Referente a este tema se recomienda continuar realizando más estudios a fondo para obtener una respuesta más certera.



**Figura 3.2.** Carga parasitaria de lesiones de roedores BALB/c infectados con *Leishmania* (*Leishmania mexicana*). \*Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control.

Como se puede observar en la Figura 3.2, en los grupos tratados con Glucantime® y la mezcla oxilipina-*Allium* se aprecia una tendencia a disminuir la carga parasitaria respecto al grupo control. Ambos tratamientos fueron los que más disminuyeron la carga parasitaria en los roedores, sin embargo, cuando comparamos estos resultados con los tamaños de lesión obtenidos, vemos que no existe una relación directa en ninguno de los casos. Los resultados obtenidos guardan estrecha relación con los reportados por Andrade-Narváez *et al.* (2005), en los cuales el análisis de la correlación entre las características clínicas e histopatológicas de la muestra estudiada arrojó que existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño de la lesión y la abundancia de amastigotes, lo que sugiere que en lesiones de LCL el mayor número de parásitos se concentra en los bordes eritematosos sobreelevados de las lesiones (Pearson, 2019), y no en el fondo de la úlcera, donde el tejido presenta células epidermales muertas producto de la necrosis (Valencia-Tobón, 2010).

En cuanto al tamaño de las lesiones, este estudio reveló que las mezclas de extracto metanólico de *T. procumbens* y la oxilipina con el extracto acuoso de *A. sativum* no presentan efectos satisfactorios en cuanto a la reducción o disminución del tamaño de las úlceras por la vía de administración empleada. Los resultados obtenidos para las mezclas corresponden a valores de tamaño de la úlcera similares a los obtenidos para el grupo control negativo, al que sólo se le administró disolución salina. En este caso, los resultados obtenidos difieren de los reportados por Gamboa-León *et al.* (2014). Como se mencionó anteriormente, el cambio de la vía de administración, el esquema de tratamiento, la cepa de parásito empleada, etc., pudiera cambiar o modificar el curso de la investigación, lo que pudiera estar ocurriendo en este caso.

El empleo de Glucantime® como control positivo, fármaco recomendado por la OMS como droga de primera línea de tratamiento ante cualquier forma de leishmaniosis (Ribeiro-Moreira *et al.*, 2017), no mostró diferencias significativas en la reducción del tamaño de las lesiones con respecto a las del grupo control negativo. Diversos reportes manifiestan la poca efectividad del Glucantime® en modelos murinos infectados con *Leishmania* spp. (Nilforoushzadeh *et al.*, 2008). Sin embargo, en humanos (dependiendo de la región) la respuesta farmacológica es 100% efectiva, propiciando la cura clínica de todos los pacientes tratados (Vargas-González *et al.*, 1999) y en este estudio pudimos observar que desde el punto de vista de control del parásito sí tuvo un efecto más marcado.

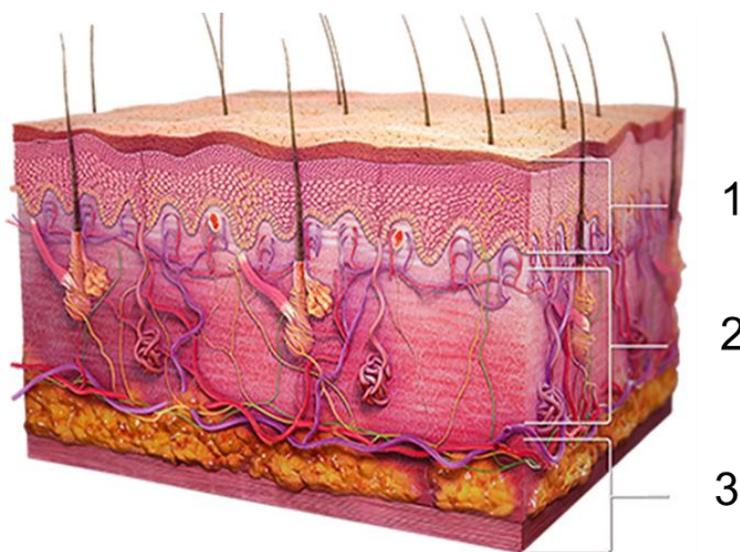
Entonces, a modo de conclusión podemos plantear que los grupos tratados con Glucantime® y la mezcla oxilipina-*Allium* reflejan una tendencia a disminuir la carga parasitaria con respecto al grupo control.

## CAPÍTULO IV

## EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS ASOCIADOS A LA ADMINISTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y LA OXILIPINA EN RATONES BALB/c

## 4.1 INTRODUCCIÓN

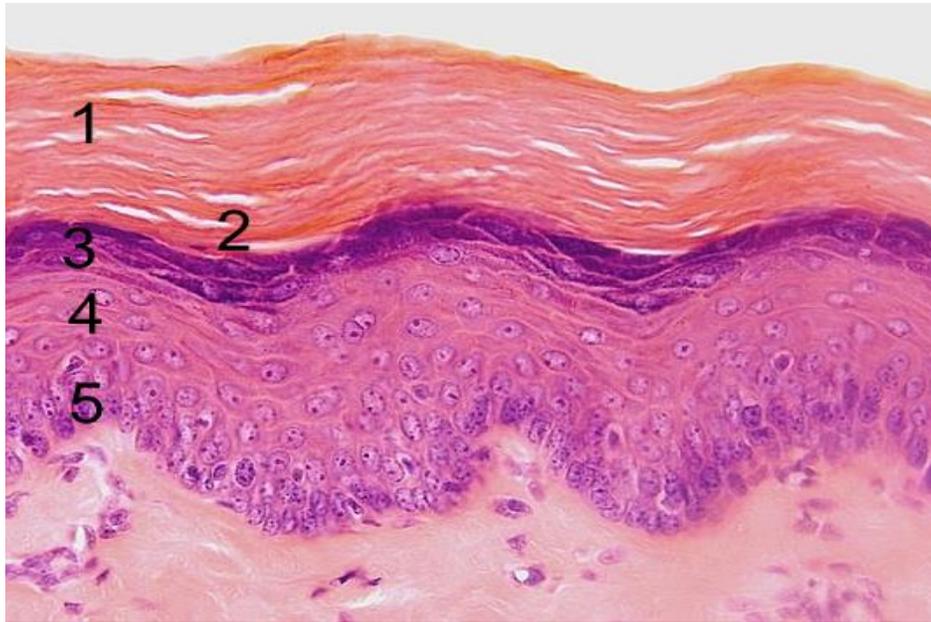
La piel o tegumento, como también se le conoce, es considerado el órgano de mayor extensión en los animales. Ésta consiste en una envoltura resistente, compleja y flexible que permite delimitar anatómicamente un cuerpo del medio ambiente. Dentro de las principales funciones de la piel se encuentran la de barrera protectora contra gérmenes y patógenos externos, termorregulación, excreción de sustancias tóxicas y fotoprotección, además de mantener la hidratación corporal restringiendo la pérdida de agua. En presencia de piel normal se pueden distinguir las tres zonas por las que está compuesta. Estas zonas son, desde la parte más externa a la interna, la epidermis, dermis e hipodermis (Figura 4.1) (Jubb *et al.*, 2016; Navarrete-Franco, 2003).



**Figura 4.1.** Diferentes zonas de tejido piel o tegumento: 1) epidermis, 2) dermis y 3) hipodermis (Bimedica, 2020).

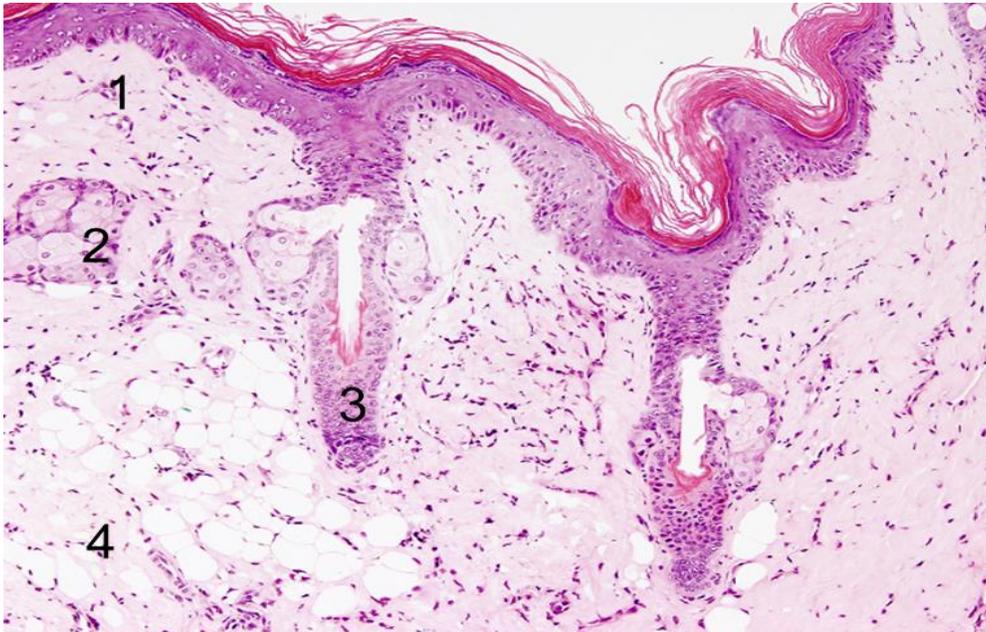
La epidermis está compuesta por células dendríticas y queratinocitos, éstos a su vez se organizan en diferentes capas o estratos (Figura 4.2), que van desde la parte más

superficial a la más interna (córneo, lúcido, granuloso, espinoso y basal) (Navarrete-Franco, 2003).



**Figura 4.2.** Microscopía de las diferentes capas de la epidermis (tinción con hematoxilina-eosina): 1) estrato córneo, 2) estrato lúcido, 3) estrato granuloso, 4) estrato espinoso y 5) estrato basal (Megías *et al.*, 2019).

Por su parte, la dermis, ubicada bajo la epidermis, se involucra en el mantenimiento y reparación de la piel al estar compuesta principalmente por colágeno y fibras elásticas. Además, la componen vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, células, las estructuras anexas o apéndices de la piel (folículos pilosos simples y compuestos, glándulas apocrinas y ecrinas, glándulas sebáceas y músculo erector del pelo) y algunas células linfoides (Jubb *et al.*, 2016; Navarrete-Franco, 2003). Enseguida de la dermis se encuentra la hipodermis, también conocida como panículo adiposo o tejido celular subcutáneo. La hipodermis se caracteriza por contener tejido conjuntivo laxo y se encuentra adyacente o seguida por el tejido muscular liso (Navarrete-Franco, 2003). En la Figura 4.3 se pueden observar las diferentes capas anteriormente mencionadas.



**Figura 4.3.** Microscopía de tejido de la piel normal (tinción hematoxilina-eosina): 1) dermis, 2) glándulas sebáceas, 3) folículo piloso y 4) hipodermis (Megías *et al.*, 2020).

La histología, anatomía microscópica o micro anatomía, son algunos de los términos empleados para denominar a la disciplina de la biología que examina los tejidos de organismos a través de un microscopio para conocer sus estructuras y sus funciones (Raffino, 2020).

Por lo general, para la visualización histológica de tejidos se requieren técnicas de tinción específicas que involucran sustancias fijadoras de tejidos y colorantes que facilitan la visualización de cada una de las estructuras. Un ejemplo de esta técnica es la tinción con hematoxilina-eosina. Esta tinción es una de las más empleadas en la microscopía óptica, es de tipo permanente y su mecanismo de acción se basa en la afinidad entre la eosina con propiedades ácidas y las proteínas del citoplasma, tiñéndolas de color rosado, mientras que los núcleos se tiñen de color azul oscuro o violeta intenso debido a las propiedades básicas de la hematoxilina y su afinidad por las estructuras nucleares (Jubb *et al.*, 2016).

En la leishmaniosis, la histología es una herramienta básica y clave para su estudio. El poder visualizar y conocer detalladamente las propiedades de un organismo en condiciones normales y en presencia de patologías posibilitan brindar información sobre su evolución, posible diagnóstico y mecanismos de acción de moléculas y fármacos (Raffino, 2020).

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Toma de muestras y tinción con hematoxilina-eosina

Concluida la etapa de seguimiento clínico, posterior a la administración de los tratamientos, se practicó la eutanasia de los roedores como se describe en el Capítulo III. Una porción de la lesión fue tomada y almacenada en formol al 10% hasta su procesamiento. Posterior a este procedimiento, las muestras fueron procesadas y deshidratadas para luego ser embebidas en parafina. Este paso permitió la realización de los diferentes micro cortes histológicos, la fijación en los portaobjetos y la tinción con los reactivos hematoxilina-eosina.

El primer paso de la tinción consistió en desparafinar los diferentes cortes y luego teñir durante un minuto con el reactivo hematoxilina. Seguido, se lavó y se diferenció la muestra para posteriormente ser teñida con eosina durante 30 s (IvyRoses, 2003). Una vez secas las láminas, se observaron bajo el microscopio óptico en búsqueda de patrones histológicos característicos de LCL (necrosis, granulomas, infiltrado inflamatorio, amastigotes extracelulares, entre otros).

### 4.2.2 Análisis histológico

El análisis histológico se realizó empleando un microscopio óptico Nikon Eclipse E600 con objetivos de 4x, 10x, 20x, 40x y 100x. El análisis realizado a la piel de los roedores se llevó a cabo en las zonas epidermis y dermis en búsqueda de determinados patrones histológicos. En la epidermis se determinó la presencia de hiperqueratosis (engrosamiento del estrato córneo y aumento de queratina), que a su vez se divide en ortoqueratosis (ausencia de núcleos en las células del estrato córneo) y paraqueratosis (presencia de núcleos en las células del estrato córneo), acantosis (aumento en la proliferación celular), espongirosis (visualización de los desmosomas), además de úlceras, necrosis y bacterias. Por otra parte, se analizó la dermis en búsqueda de granulomas (acumulación de células inflamatorias), infiltrado inflamatorio (invasión de linfocitos y macrófagos), y la presencia de amastigotes extracelulares, eosinófilos, necrosis, úlceras y bacterias (Neira *et al.*, 2019; Jubb *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos en el análisis se expresaron en ausente (-), leve (+), moderada (++) y grave (+++), teniendo en cuenta una escala semicuantitativa de acuerdo con el

número de campos afectados a 4x (0%, < 30%, ≥ 30, ≤ 50% y ≥ 50%, respectivamente), de acuerdo con el reporte realizado por Lago *et al.* (2019).

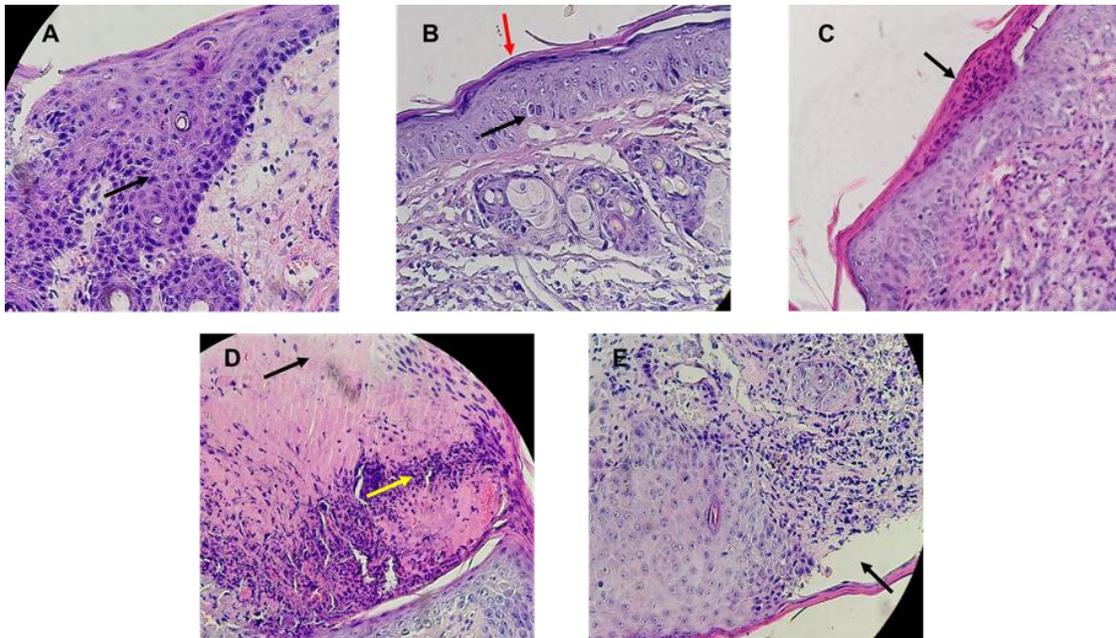
### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 36 muestras por triplicado fue analizado durante esta etapa del proyecto. Todos los grupos de roedores evaluados en este estudio mostraron alteraciones morfológicas tanto en la epidermis como en la dermis, observándose todos los patrones histológicos anteriormente mencionados a excepción de los granulomas.

De manera general, las alteraciones observadas en la epidermis se caracterizaron por la presencia leve de acantosis, espongiosis, para y ortoqueratosis, úlceras, necrosis y bacterias, principalmente, con una distribución además variable, de focal a difusa. En el Cuadro 4.1 y Figura 4.4 se puede observar la distribución y presencia de estas alteraciones, respectivamente.

**Cuadro 4.1.** Patrones histológicos hallados en epidermis (E) de roedores BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*. Se representa la intensidad de las apariciones [ausentes (-), leve (+), moderada (++) y grave (+++)], por grupos.

Patrón histológico	Grupos tratados						
	Control Negativo n = 5	<i>A. sativum</i> n = 4	<i>T. procumbens</i> n = 6	<i>Tridax-Allium</i> n = 5	Oxilipina n = 6	Oxilipina- <i>Allium</i> n = 5	Glucantime n = 5
Acantosis	+	+	+	+	+	+	+
Espongiosis	+	+	+	+	+	+	+
Paraqueratosis	-	-	+	-	-	-	-
E Ortoqueratosis	+	+	-	+	+	+	+
Bacterias	-	-	+	-	-	-	-
Necrosis	+	-	-	+	+	-	+
Úlceras	+++	+	+	+	+	+	++

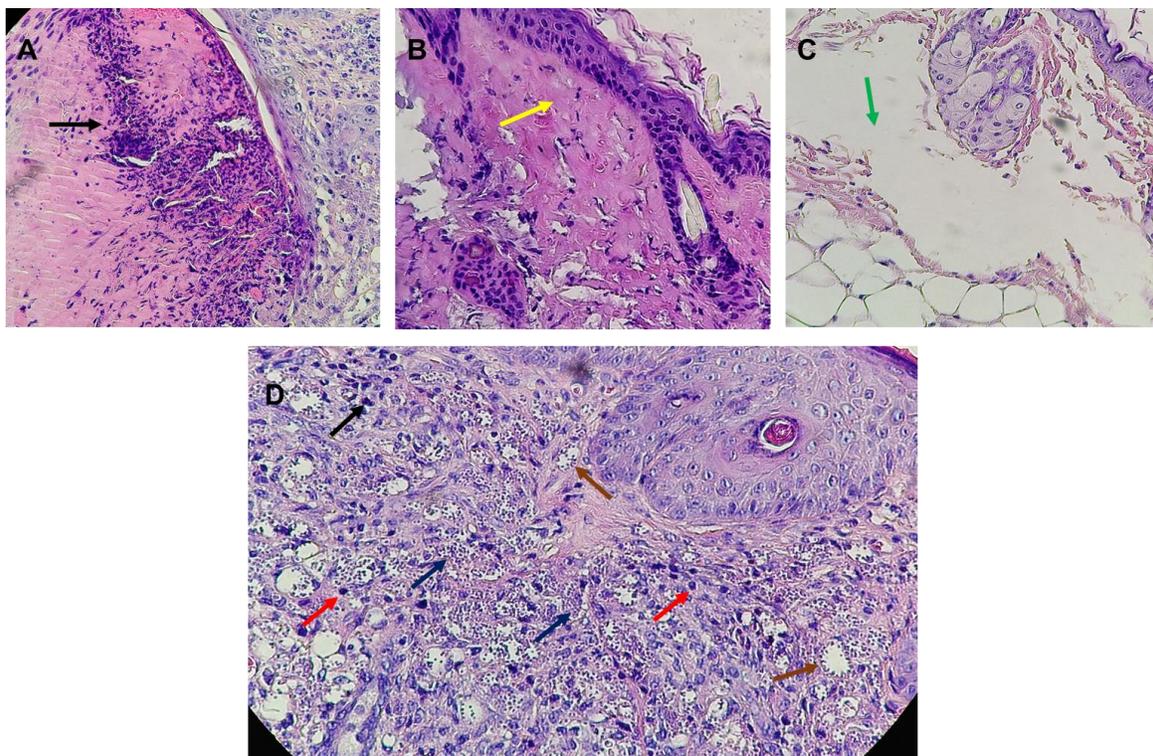


**Figura 4.4.** Espectro de cambios histológicos visualizados en epidermis de ratones BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*. A) acantosis, B) espongiosis (flecha negra), ortoqueratosis (flecha roja), C) paraqueratosis, D) necrosis (flecha negra), infección bacteriana (flecha amarilla) y E) úlcera. Observados bajo microscopio óptico, objetivo 40x. Tinción hematoxilina-eosina.

Por otra parte, las alteraciones histológicas observadas en la zona de la dermis de todos los grupos tratados (incluyendo controles) estuvieron caracterizadas por la presencia leve a moderada de bacterias. Además, en todas las muestras evaluadas se identificó la presencia de necrosis y úlceras graves con distribución focal y difusa. Se pudo distinguir también un infiltrado inflamatorio de intensidad versátil (leve a moderada), con infiltración masiva de eosinófilos, amastigotes extracelulares y macrófagos vacuolados muy infectados de amastigotes. En todos los casos evaluados no se evidenció la presencia de granulomas, cambios en los folículos pilosos ni glándulas sebáceas (Cuadro 4.2). En la Figura 4.5 se pueden observar los patrones histológicos identificados en la zona dérmica.

**Cuadro 4.2.** Patrones histológicos encontrados en dermis (DE) de roedores BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*. Se representa la intensidad de las apariciones [ausentes (-), leve (+), moderada (++) y grave (+++)], por grupos.

Patrón histológico	Grupos tratados						
	Control Negativo n = 5	<i>A. sativum</i> n = 4	<i>T. procumbens</i> n = 6	<i>Tridax-Allium</i> n = 5	Oxilipina n = 6	Oxilipina- <i>Allium</i> n = 5	Glucantime n = 5
DE							
Linfocitos	++	++	++	++	++	+	++
Eosinófilos	+	+	+	-	+	+	+
Macrófagos infectados	++	++	++	++	++	+	++
Amastigotes extracelulares	++	+++	++	++	++	+	++
Granulomas	-	-	-	-	-	-	-
Úlceras	+++	+++	++	+++	+++	+++	+ +++
Necrosis	+++	+	+	-	+	+	+++
Bacterias	-	-	-	-	-	-	-



**Figura 4.5.** Patrones histológicos observados en la zona dérmica de ratones BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*. A) bacterias, B) necrosis, C) úlceras, D)

infiltrado inflamatorio: eosinófilos (flecha negra), linfocitos (flecha roja), amastigotes extracelulares (flecha azul), macrófagos vacuolados infectados con amastigotes (flecha café). Observados bajo microscopio óptico, objetivo 40x. Tinción hematoxilina-eosina.

Como se mencionó anteriormente, los cambios histológicos observados en las zonas de la dermis y epidermis son similares en todos los grupos de roedores tratados, incluyendo los controles positivo y negativo. Los cambios en los patrones histológicos descritos en la piel de los roedores corresponden con los reportados por Ramos-Martínez *et al.* (2013), en roedores BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana* en el cojinete plantar, bajo tratamiento farmacológico con  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (vitamina D3). En este estudio, además, los BALB/c presentaron la misma composición celular en la dermis, exceptuando la presencia de neutrófilos.

Tanto en el estudio realizado por Ramos-Martínez *et al.* (2013) como en el presente se describe un infiltrado inflamatorio con presencia de eosinófilos, macrófagos parasitados con amastigotes intracelulares y grandes superficies de necrosis. Estas descripciones confirman lo reportado para roedores BALB/c, modelo murino ampliamente empleado en el estudio de la LCL causada por *L. (L.) mexicana*, debido a su marcada susceptibilidad (Falú *et al.*, 2009).

Falú *et al.* (2009) también reflejan en su investigación una gran respuesta inflamatoria y gran cantidad de amastigotes en ratones BALB/c, correlacionándolo clínicamente con progresivas y grandes tumefacciones. Además, se plantea que este modelo murino es capaz de reflejar los rasgos clínicos e histopatológicos similares a los que se producen en humanos durante la infección con dicha especie.

En las muestras evaluadas se identificó también la presencia de eosinófilos. Los eosinófilos son un tipo de leucocitos que abundan en sitios de inflamación causados por parásitos y se encuentran en tejidos que tienen contacto con el exterior. Estas células son atraídas por mediadores químicos y sustancias quimioatrayentes liberadas durante el proceso inflamatorio, lo que posibilita la liberación de sus gránulos sobre los parásitos y la acción parasiticida (López *et al.*, 2017; Ramos-Martínez *et al.*, 2013). Además, los eosinófilos tienen la capacidad de regular mastocitos mediante la neutralización de las enzimas que producen, evitando la inflamación excesiva.

En el presente estudio se determinó la presencia de elevadas cantidades de macrófagos infectados en todos los grupos evaluados, incluyendo los grupos controles. En cepas de animales susceptibles a especies de *Leishmania* spp., causantes de leishmaniosis cutánea, es conocido que los macrófagos son los principales reservorios y los responsables a su vez de la eliminación del parásito mediante mecanismos microbicidas que involucran la producción de ON por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Ramos-Martínez *et al.*, 2013; Cortez *et al.*, 2011).

A pesar de este mecanismo, en nuestro trabajo se identificó la presencia abundante de macrófagos infectados tanto en animales tratados con los extractos y sus mezclas como en los animales bajo la administración de disolución salina. Esto pudiera sugerir que el efecto inmunomodulador que producen los extractos (Beck *et al.*, 2018; Ghazanfari *et al.*, 2006) no afecta la supervivencia del parásito.

Por otra parte, Jubb *et al.* (2016) plantean el concepto sistema inmune de la piel y en él agrupan a las células asociadas a la respuesta inmune específica de la piel. Estas células claves son los queratinocitos, las células de Langerhans, la unidad perivascular dérmica y las células T que se dirigen a la piel. Los autores plantean que los queratinocitos producen citocinas inflamatorias, factores quimiotácticos y moléculas de adhesión que a la larga producen un efecto proinflamatorio inespecífico y regulador positivo. Además, creen que las células de Langerhans pueden atrapar antígenos en la zona epidérmica, migrar a los ganglios linfáticos regionales y presentarlos a las células T.

La unidad perivascular dérmica compuesta por monocitos, células dendríticas tisulares, mastocitos, macrófagos y células T permite la liberación de IL-1 y TNF- $\alpha$  por parte de los queratinocitos dañados, promoviendo la adhesión de leucocitos circulantes. Este efecto proinflamatorio y regulador de los queratinocitos prepara la dermis para una actividad inmunológica específica, mientras que las células de Langerhans presentadoras de antígenos que migran inducen la expansión de linfocitos específicos en los ganglios linfáticos que posteriormente drenan la piel, lo que pudiera explicar los resultados obtenidos para el grupo bajo la administración de disolución salina en este estudio (Jubb *et al.*, 2016).

Rosas *et al.* (2005) también plantean que diversos estudios con *L. (L.) mexicana* han demostrado que factores como el número de parásitos y la vía de infección juegan un papel

fundamental en la regulación de la respuesta inmunitaria del huésped y en el curso de la infección. Los BALB/c pueden desarrollar una respuesta de tipo Th1 y resolver las lesiones en la almohadilla plantar; sin embargo, cuando son infectados en la rabadilla, que es la parte superior afeitada de la pata trasera derecha, desarrollan una respuesta de tipo Th2 donde se reclutan macrófagos y se desarrollan grandes lesiones llenas de parásitos.

Como conclusión, los cortes histológicos de piel de todas las muestras analizadas presentan un patrón caracterizado por la presencia de espongiosis, necrosis, bacterias, acantosis, úlceras e hiperqueratosis en la zona epidérmica, mientras que en la dermis se evidenció la presencia de infiltrado inflamatorio difuso compuesto por eosinófilos, linfocitos y macrófagos vacuolados infectados con amastigotes, además de úlceras, bacterias y necrosis. Esto sugiere que los tratamientos y sus combinaciones pueden presentar una actividad inmunomoduladora, pero no la suficiente para eliminar los parásitos de *Leishmania*.

## CAPÍTULO V

### ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE IFN- $\gamma$ PARA EVALUAR LA RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A LA ADMINISTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y LA OXILIPINA POR VÍA ORAL

#### 5.1 INTRODUCCIÓN

La eliminación satisfactoria de parásitos de *Leishmania* spp. depende en gran medida de la acción coordinada y eficiente del sistema inmunológico del organismo infectado (Gupta *et al.*, 2013). Durante muchos años se han empleado modelos murinos en la investigación contra la leishmaniosis, los que han aportado importantes conocimientos acerca de los mecanismos inmunológicos desarrollados contra esta enfermedad (Vidal-Cagigas, 2003).

Existen dos grupos principales de modelos murinos empleados en las investigaciones relacionadas con *Leishmania* spp., los resistentes y los susceptibles. Para el primer caso, donde se encuentra la cepa C57BL/6, se reportan lesiones en la piel que curan espontáneamente (Díaz *et al.*, 2003). En este grupo la respuesta inmune reportada es de tipo Th1, donde la producción de IFN- $\gamma$  es elevada, así como los niveles de ON (Gamboa-León *et al.*, 2014). El IFN- $\gamma$  promueve el control de los parásitos mediante la activación de macrófagos infectados (principales células hospederas), desencadenando mecanismos microbicidas (Scorza *et al.*, 2017), como la producción de ON mediante la enzima iNOS, lo que conlleva a la destrucción de los parásitos intracelulares (Ramos-Martínez *et al.*, 2013; Vidal-Cagigas, 2003; Díaz *et al.*, 2003).

Por otra parte, en cepas susceptibles como BALB/c, las lesiones producidas en la piel son de tipo crónicas y progresivas que no curan espontáneamente. La respuesta inmune reportada para esta cepa murina es de tipo Th2, donde la producción de interleucinas IL-4 e IL-10 predominan (Vidal-Cagigas, 2003). Díaz *et al.* (2003) reportan que estas interleucinas actúan inhibiendo la producción de ON mediante la reducción de iNOS, lo que propicia la supervivencia del parásito y la progresión de la enfermedad.

El conocimiento de los mecanismos de defensa desarrollados por los mamíferos ante esta infección es una de las principales estrategias para poder combatirla (Loría-Cervera *et al.*,

2014). En el caso de la cepa murina BALB/c, el empleo de sustancias inmunomoduladoras como el extracto acuoso de *A. sativum*, ha demostrado resultados positivos en la inducción de la respuesta Th1, aumentando los niveles de IFN- $\gamma$ , la producción de ON por parte de macrófagos activados y por ende el control de la enfermedad (Gamboa-León *et al.*, 2014).

En el presente capítulo se presenta la evaluación de IFN- $\gamma$  asociado a la administración del extracto metanólico de *T. procumbens*, el extracto acuoso de *A. sativum*, el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol y sus combinaciones mediante el análisis de expresión a través de la técnica reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

## 5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1 Toma de biopsias y extracción de ARN

Finalizado el tratamiento, los roedores fueron eutanizados bajo las mismas condiciones descritas en el capítulo anterior. Las muestras de tejidos del sitio de la lesión se pesaron y almacenaron a  $-70$  °C en crioviales hasta su uso. La extracción del ARN total a partir de 50 mg de tejido se llevó a cabo empleando TRIzol, seguido de una precipitación con isopropanol y un lavado con etanol al 75% y 100%. Posterior a este paso, las muestras se secaron a temperatura ambiente y se eluyeron con agua estéril (grado biología molecular). La integridad del ARN extraído se comprobó mediante una electroforesis con gel de agarosa al 2% y bromuro de etidio (5  $\mu$ g/mL). Todas las muestras se trataron con DNasa (1 U/ $\mu$ L) y se cuantificaron con espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific NanoDrop).

### 5.2.2 Expresión de citocinas mediante PCR- tiempo real

El ARN (200 ng) fue transcrito reversamente a ADNc empleando el kit comercial “Improm-II Reverse Transcription System” (Promega, # Cat. A3800) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se diluyó 1:5 en un volumen final de 100  $\mu$ L, el cual se alicuotó y se almacenó a  $-20$  °C hasta su uso. Para el análisis de expresión del gen INF- $\gamma$  se emplearon los iniciadores Fw (5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3') y Rv (3'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-5'), y se llevó a cabo una PCR en tiempo real utilizando 1  $\mu$ L de ADNc en un volumen final de reacción de 10  $\mu$ L, empleando el kit comercial iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) y 1  $\mu$ L de cada iniciador delantero y reverso.

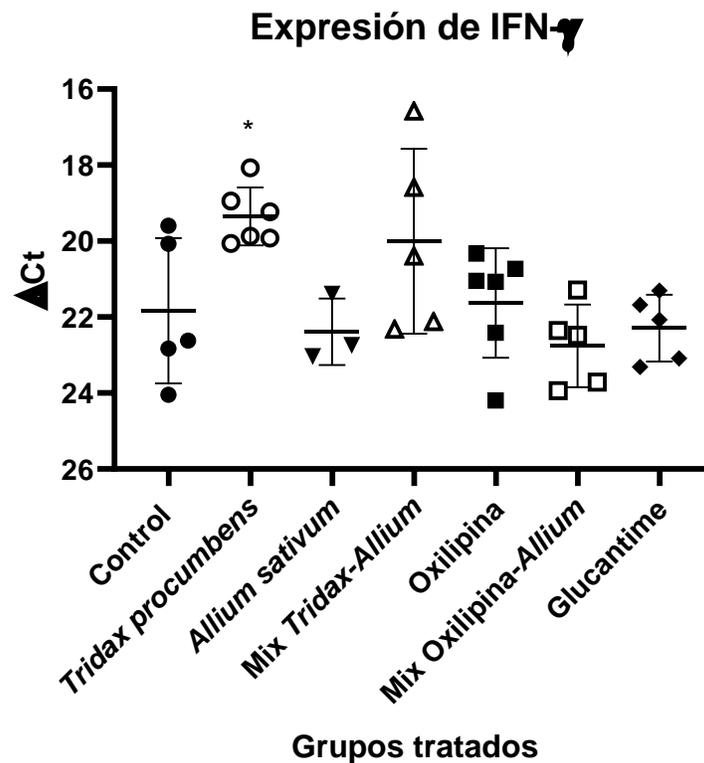
La amplificación se realizó por triplicado utilizando el equipo StepOne (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones de reacción: 90 °C 30 s, seguido de 40 ciclos de 95 °C 15 s y 63 °C 1 min. La curva de disociación para el análisis de los productos de amplificación fue 95 °C 15 s, 63 °C 1 min con incrementos de la temperatura de 0.3 °C. La normalización de los datos se realizó empleando el gen endógeno 18s utilizando los iniciadores Fw (5'-ACCGCAGCTAGGAATAATGGA-3') y Rv (3'-GCCTCAGTTCCGAAAACCA-5'), donde se obtuvo los valores de  $\Delta Ct$  que fueron utilizados para realizar el análisis estadístico y comparar la expresión relativa de los genes en cada uno de los grupos de estudio, puesto que el  $\Delta Ct$  es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial en cada reacción.

### 5.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se desarrolló con el software Graph Pad Prism 8.0.6. Mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov se determinó si los datos se ajustaban a una distribución normal. Además, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con los valores de las medias  $\pm$  desviación estándar. Los valores  $p$  menores a 5% fueron considerados estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En organismos resistentes a parásitos de *Leishmania* spp. el IFN- $\gamma$  es una de las moléculas responsables de la activación de macrófagos. Esto en gran medida propicia la expresión de iNOS, la cual induce la producción de ON y por tanto la eliminación de los parásitos (Loría-Cervera *et al.*, 2014). En el presente capítulo se realizó la cuantificación relativa de IFN- $\gamma$  a partir de muestras de piel de ratones BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana*. En la Figura 5.1 se observan los niveles de IFN- $\gamma$  obtenidos para cada grupo de trabajo evaluado bajo la administración de los diferentes tratamientos.



**Figura 5.1.** Niveles de IFN- $\gamma$  en lesiones de BALB/c infectados con *Leishmania (Leishmania) mexicana*, semana 4 postratamiento. \*El grupo tratado con *T. procumbens* demostró diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control.

El análisis estadístico realizado a las muestras evaluadas arrojó diferencias estadísticamente significativas en el grupo tratado con *T. procumbens* ( $p = 0.0451$ ) respecto al grupo control. Igualmente, en el grupo tratado con la mezcla *Tridax-Allium* se observa una tendencia a aumentar los niveles de expresión de IFN- $\gamma$ . En ambos grupos los niveles de IFN- $\gamma$  expresados fueron más elevados que en el resto de los tratamientos analizados.

En función de lo planteado, diversos reportes científicos avalan la actividad inmunomoduladora de *T. procumbens*. En su estudio, Tiwari *et al.* (2004) hacen referencia a la acción inmunoestimulante del extracto acuoso de *T. procumbens* tanto en la respuesta humoral como en la celular. Los autores mencionan que el extracto de *T. procumbens* mejora y aumenta la hemaglutinación del título de anticuerpos, así también es capaz de aumentar la infiltración de macrófagos en el sitio de inflamación mediante una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada.

De acuerdo con lo observado en la Figura 5.1, los niveles de expresión de IFN- $\gamma$  para el resto de los grupos son muy similares entre ellos y bajos, lo que no se corresponde con reportes de autores que evalúan sustancias inmunomoduladoras como *A. sativum* en ratones BALB-c infectados con *Leishmania* spp.

Se conoce que la cepa murina BALB/c, cepa susceptible frente a la infección por *L. (L.) mexicana*, desarrolla una respuesta inmune de tipo Th2, donde las citocinas que predominan son la IL-4 e IL-10. Estas citocinas suprimen la producción de IFN- $\gamma$ , y, por ende, la activación de macrófagos y la producción de ON mediante la reducción de iNOS, lo que favorece la replicación y supervivencia de los parásitos. Sin embargo, en este estudio se esperaban valores más elevados debido a la administración de sustancias inmunomoduladoras, puesto que Gamboa-León *et al.* (2007) reportaron que el extracto acuoso de *A. sativum* logró un aumento notable en la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células T extraídas de bazo y un cambio de la respuesta Th2 hacia la Th1, estimulando la producción de ON por parte de los macrófagos activados, favoreciendo en gran medida la eliminación de los parásitos.

De acuerdo con lo reportado por Rosas *et al.* (2005) diversos factores como el número de parásitos inoculados y la vía de infección juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmunitaria del huésped. En el reporte, los autores plantean que los roedores BALB/c despliegan una respuesta Th1 y desarrollan lesiones menos graves después de la infección en la almohadilla plantar, mientras que en infecciones en la rabadilla las lesiones no cicatrizan y se observa una respuesta de tipo Th2.

Las diferencias existentes entre el estudio realizado por Gamboa-León *et al.* (2014) y el presente estudio pudieran justificar porqué no se observó la respuesta inmunomoduladora tipo Th1 del extracto acuoso de *A. sativum* esperada. En el estudio de Gamboa-León *et al.* (2014) el sitio de inoculación fue el cojinete plantar, el tamaño de inóculo fue de  $1 \times 10^6$  parásitos, la vía de administración de los extractos fue intraperitoneal y la medición de las citocinas fue a partir de linfocitos CD3 de bazo, mientras que en el presente estudio se inocularon  $2.5 \times 10^6$  parásitos en la parte superior de la pata trasera derecha, la vía de administración de los tratamientos fue oral y la medición de citocinas fue a partir de una fracción de tejido de la lesión. Teniendo en cuenta todo lo antes mencionado, se recomienda realizar el análisis de expresión de otras citocinas, tanto proinflamatorias como

antiinflamatorias, para tener una idea más certera acerca de la actividad de los extractos y la respuesta inmunológica de los roedores ante éstos.

A modo de conclusión, exceptuando el grupo tratado con el extracto metanólico de *T. procumbens*, los niveles de IFN- $\gamma$  observados en los roedores fueron bajos, lo que concuerda con la respuesta de tipo Th2 reportada para BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana*.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

#### 6.1 CONCLUSIONES GENERALES

La dosis terapéutica establecida para el extracto metanólico de *T. procumbens* (raíz) y para el compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol fue de 40 mg/Kg/día, mientras que para el extracto acuoso liofilizado de *A. sativum* fue de 20 mg/Kg/día.

El tratamiento con el compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol a la dosis de 40 mg/Kg/día resultó ser efectivo, ya que logró la cura clínica de al menos un roedor infectado con *L. (L.) mexicana*.

Los tratamientos con el medicamento Glucantime® y la mezcla oxilipina-*Allium* fueron los más activos, pues se observó una tendencia a disminuir la carga parasitaria con respecto al grupo control negativo.

El patrón histológico de todas las muestras analizadas está caracterizado por la presencia de espongiosis, acantosis, úlceras e hiperqueratosis en la zona epidérmica, mientras que en la dermis, además de la presencia de úlceras, bacterias y necrosis, se evidenció infiltrado inflamatorio difuso compuesto por eosinófilos, linfocitos y macrófagos vacuolados infectados con amastigotes, lo que indica una respuesta inmunomoduladora por parte de los tratamientos, pero no la suficiente como para eliminar los parásitos.

Los niveles de IFN- $\gamma$  observados en los roedores, exceptuando al grupo tratado con *T. procumbens* fueron bajos, indicando una respuesta inmunológica de tipo Th2, una respuesta reportada para BALB/c infectados con *L. (L.) mexicana*, la cual no es suficiente para eliminar los parásitos.

#### 6.2 PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, las perspectivas son las siguientes:

1. Evaluar otras vías de administración de los extractos y el compuesto puro oxilipina, además de otros vehículos.
2. Se recomienda evaluar otras dosis y realizar otros estudios fisicoquímicos con el fin de mejorar la solubilidad del extracto metanólico de *T. procumbens* y el compuesto puro oxilipina.
3. Evaluar otros sistemas de liberación de sustancias como nanopartículas, liposomas y microencapsulación, entre otros, en aras de dirigir las moléculas al sitio de acción y por ende obtener un mejor resultado.
4. Se recomienda continuar el estudio preclínico del compuesto oxilipina, así como, evaluar su actividad cicatrizante.
5. Realizar un análisis de expresión de citocinas más amplio empleando citocinas inflamatorias y proinflamatorias.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votýpka, P. Marty, P. Delaunay. y D. Sereno (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10, 1-40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Alvar J., I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Canto, J. Jannin y M. Der Boer (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7, 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Andrade-Narváez, F.J., A. Vargas-González, S.B. Canto-Lara y A.G. Damián-Centeno (2001). Clinical picture of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 163-167. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000200005>
- Andrade-Narváez, F.J., S. Medina-Peralta, A. Vargas-González, S.B. Canto-Lara y S. Estrada-Parra (2005). The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 47, 191-194. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652005000400003>
- Andrade-Narváez, F.J., N. Raymonde Van Wynsberghe, E.I. Sosa-Bibiano y E.N. Loría-Cervera (2017). Eco-Epidemiological and immunological features of localized cutaneous leishmaniasis in southeastern Mexico: thirty years of study, en: *INTECH Open Science*. pp. 137-152.
- Aristil, P.M. (2010). *Manual de Farmacología Básica y Clínica*. McGraw Hill. pp. 25-28, 46.
- Beck, S., H. Mathison, T. Todorov, E.A. Calderón-Juárez y O.R. Kopp (2018). A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Tridax procumbens* (L.). *Journal of Plant Studies*, 7, 19-35. <https://doi.org/10.5539/jps.v7n1p19>

- Bimedica. ABS, 2020. Todo lo que tienes que saber sobre la piel. [Online] (Actualizado noviembre 2020). Disponible en: <https://abs.bimedica.com/cuidado-corporal/todo-lo-que-tienes-que-saber-sobre-la-piel/> [Acceso 5 noviembre 2020]
- Brunton, L.L., J.S. Lazo y K.L. Parker (2007). Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw Hill. pp. 4.
- Bruzual, E., L. Arcay y M.A. de la Parte-Pérez (2008). Diseminación tisular y efectos histopatológicos producidos por *Leishmania mexicana amazonensis* en roedores infectados experimentalmente. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 28, 139-144.
- Burgos, J. M. (2020). Evaluación de la toxicidad oral aguda de los extractos metanólico de *Tridax procumbens*, acuoso de *Allium sativum* y su mezcla en ratones BALB/c. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán, México. pp. 27-28.
- Canto-Lara, S.B., M.F. Cárdenas-Maruffo, A. Vargas-González y F.J. Andrade-Narváez (1998). Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolated from human cases with localized cutaneous leishmaniasis from the state of Campeche, Yucatan peninsula, Mexico. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 58, 444-447. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.444>
- Carrada-Figueroa, G.C., V.J. Leal-Ascencio, A. Jiménez-Sastré y J. López-Álvarez (2014). Transmission of cutaneous leishmaniasis associated with cacao (*Theobroma cacao*) plantations in Tabasco. Gaceta Médica de México, 150, 499-508.
- Cavagnaro, P.F., A. Camargo, C.R. Galmarini y P. Simon (2007). Effect of cooking on garlic (*Allium sativum* L.) antiplatelet activity and thiosulfinates content. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 1280-1288. <https://doi.org/10.1021/jf062587s>
- CENAVECE (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades). Dirección General de Programas Preventivos. Programa de Enfermedades Transmitidas por Vector (2015). Manual para el Diagnóstico, Tratamiento y Control de las Leishmaniasis. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. (Actualizado 2015). Disponible en:

- 
- <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/Ma-nualLeishmaniasis2015.pdf> [Acceso 16 octubre 2018].
- Choffnes, E.R. y D.A. Relman (2011). *The Causes and Impacts of Neglected Tropical and Zoonotic Diseases*. The National Academies Press, Washington, D.C. pp. 2.
- Cortez, M., C. Huynh, M.C. Fernandes, K.A. Kennedy, A. Aderem y N.W. Andrews (2011). *Leishmania* promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. *Cell Host and Microbe*, 9, 463-471. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.014>
- Díaz, N.L., M. Fernández, E. Figueira, R. Ramírez, I.B. Monsalve, F.J. Tapia (2003). Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 28, 288-293. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2003.01206.x>
- Diehl, K.H., R. Hull, D. Morton, R. Pfister, Y. Rabemampianina, D. Smith, J. Vidal y C. van de Vorstenbosch (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21, 15-23. <https://doi.org/10.1002/jat.727>
- Dolat, E., S. Soudmand Salarabadi, P. Layegh, M. Reza Jaafari, S. Sazgarnia y A. Sazgarnia (2020). The effect of UV radiation in the presence of TiO<sub>2</sub>-NPS on *Leishmania major* promastigotes. *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects*, 1864, 129558-129564. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129558>
- Dostálová, A. y P. Volf (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interaction overview. *Parasites and Vectors*, 5, 276-287. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
- Ejov, M. y D. Dagne (2014). Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014-2020. World Health Organization. pp. 1.
- Ezatpour, B., E. Saedi Dezaki, H. Mahmoudvand, M. Azadpour y F. Ezzatkah (2015). *In vitro* and *in vivo* antileishmanial effects of *Pistacia khinjuk* against *Leishmania tropica*

- and *Leishmania major*. Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 149707-149712. <https://doi.org/10.1155/2015/149707>
- Falú, M.A., M.F. García Bustos, C.M. Parodi Ramoneda, E.M. de Raspi, R. Marino Cardozo, R. Cimino, J.F. Gil, J.L. Vasvari y M.A. Basombrío (2009). Susceptibility of different mouse strains to *Leishmania amazonensis* infection. Revista Argentina de Dermatología, 15, 334-339.
- Foroutan-Rad, M., K. Hazrati Tappeh y S. Khademvatan (2015). Antileishmanial and immunomodulatory activity of *Allium sativum* (garlic): a review. Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 22, 141-155. <https://doi.org/10.1177/2156587215623126>
- Freitas-Junior, L.H., E. Chatelain, H. Andrade-Kim y J.L. Siqueira-Neto (2012). Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 2, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003>
- Gamboa-León, M.R., I. Aranda-González, M. Mut-Martín, M.R. García-Miss y E. Dumonteil (2007). *In vivo* and *in vitro* control of *Leishmania mexicana* due to garlic-induced NO production. Scandinavian Journal of Immunology, 66, 508-514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02000.x>
- Gamboa-León, M.R., B.M. Vera-Ku, S.R. Peraza-Sánchez, C. Ku-Chulim, A. Horta-Baas y M. Rosado-Vallado (2014). Antileishmanial activity of a mixture of *Tridax procumbens* and *Allium sativum* in mice. Parasite, 21, 15-21. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014016>
- Geck, M.S., S. Cristians, M. Berger-González, L. Casu, M. Heinrich y M. Leonti (2020). Traditional Herbal medicine in Mesoamerica: Toward its evidence base for improving universal health coverage. Frontiers in Pharmacology 11,1160. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01160>

- Genoma España, 2012. Guía de desarrollos preclínicos. [Online] (Actualizado marzo 2012)  
Disponible en: [https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/2012\\_-\\_guia\\_de\\_desarrollos\\_preclinicos.pdf](https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/2012_-_guia_de_desarrollos_preclinicos.pdf) [Acceso 11 noviembre 2020].
- Ghazanfari, T., Z.M. Hassan y A. Khamesipour, (2006). Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium sativum*) treatment. Journal of Ethnopharmacology, 103, 333-337.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.026>
- Gillespie, P.M., C.M. Beaumier, U. Strych, T. Hayward, P.J. Hotez y M.E. Bottazzi (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. Vaccine, 34, 2992-2995. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.071>
- Gupta, G., S. Oghumu y A.R. Satoskar (2013). Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. Advances in Applied Microbiology, 82, 155–184.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>
- Gutiérrez-Rebolledo, G.A., S. Drier-Jonas y M.A. Jiménez-Arellanes (2017). Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 10, 1105-1110.  
<https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.016>
- Hernández-Ruiz, J. y I. Becker (2006). CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. Salud Pública de México, 48, 430-439. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342006000500009>
- Hotez, P.J., D.H. Molyneux, A. Fenwick, J. Kumaresan, S. Ehrlich Sachs, J.D. Sachs y L. Savioli (2007). Control of neglected tropical diseases. The New England Journal of Medicine, 357, 1018-1027. <https://doi.org/10.1056/NEJMra064142>
- Hotez, P.J. y B. Pecoul (2010). “Manifiesto” for advancing the control and elimination of neglected tropical diseases. PLoS Neglected Tropical Diseases, 4, e718.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000718>
- Infobioquímica.org (2017). Un nuevo dispositivo simplifica la identificación de hospedadores de *Leishmania*. [Online] (Actualizado julio 2017). Disponible en:

- 
- <https://www.infobioquimica.com/new/2017/07/21/un-nuevo-dispositivo-simplifica-la-identificacion-de-hospedadores-de-leishmania/> [Acceso mayo 2020].
- Isaac, J.A., A. Charles y A. Daniel (2014). Absence of visible toxic effects accompanying the short-term administration of an aqueous extract of *Allium sativum* Linn. in male Sprague-Dawley rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 9, 53-67. <https://doi.org/10.3844/ajptsp.2014.53.67>
- IvyRoses Holistic (2003). How to Prepare Histology Slides. [Online] (Actualizado 7 abril 2020). Disponible en: <https://www.ivyroses.com/HumanBody/Histology/How-to-Prepare-Histology-Slides.php> [Acceso 6 noviembre 2020]
- Jubb, K., P. Kennedy y N. Palmer (2016). *Pathology of domestic animals*. Elsevier. pp. 25, 763-766.
- Kermanjani, A., B. Jalalizadegan y F. Tabatabaie (2015). Comparison of *Hyssopus officinalis*, *Tussilage farfara*, *Carum copticum* extracts versus systemic Glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Advanced Studies in Biology*, 7, 49-54.
- Khademvatan, S., J. Saki, M.J. Gharavi y F. Rahim (2011). *Allium sativum* extract induce apoptosis in *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) promastigotes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 3725-3732.
- Lago J., J.A. Silva, L. Borja, D.B.M. Fraga, A. Schriefer, S. Arruda, E. Lago, E. Carvalho y O. Bacellar (2019) Clinical and histopathologic features of canine tegumentary leishmaniasis and the molecular characterization of *Leishmania braziliensis* in dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13, e0007532. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007532>
- Lawal, B., O. Kudirat Shittu, F. Inje Oibiokpa, H. Mohammed, S. Itop Umar y G. Muhammed Haruna (2016). Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. *Journal of Acute Disease*, 5, 296-301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joad.2016.05.002>

- Lezama-Dávila, C.M., L. Pan, A.P Isaac-Márquez, C. Terrazas, S. Oghumu, R. Isaac-Márquez, M.Y. Pech-Dzib, J. Barbi, E. Calomeni, N. Parinandi, A.D. Kinghorn y A.R. Satoskar (2014). *Pentalinon andrieuxii* root extract is effective in the tropical treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. *Phytotherapy Research*, 28, 909-916. <https://doi.org/10.1002/ptr.5079>
- López Mayagoitia, A., L.C. Martínez Chavarría, I. Martínez Racine, L. Romero Romero, G. Salas Garrido, F.J. Trigo Tavera, G. Valero Elizondo y B. Vanda Cantón (2017). *Patología General Veterinaria*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. pp. 125-127.
- Loría-Cervera, E.N., E.I. Sosa-Bibiano, L.E. Villanueva-Lizama, N. Raymonde Van Wynsberghe, S.B. Canto-Lara, J.L. Batún-Cutz y F.J. Andrade-Narváez (2013). Nitric oxide production by *Peromyscus yucatanicus* (Rodentia) infected with *Leishmania (Leishmania) mexicana*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 108, 172-177. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108022013008>
- Loría-Cervera, E.N., E.I. Sosa-Bibiano, L.E. Villanueva-Lizama, N. Raymonde Van Wynsberghe, T. Schountz y F.J. Andrade-Narváez (2014). Cloning and sequence analysis of *Peromyscus yucatanicus* (Rodentia) Th1 (IL-12p35, IFN- $\gamma$  and TNF) and Th2 (IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$ ) cytokines. *Cytokine*, 65, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.09.006>
- Marovac, J. (2001). Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Revista Médica de Chile*, 129, 99-106. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872001000100015>
- Martín-Quintal, Z., R. Moo-Puc, F. González-Salazar, M.J. Chan-Bacab, L.W. Torres-Tapia y S.R. Peraza-Sánchez (2009). *In vitro* activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 463-467. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.037>
- Martín-Quintal, Z., M.R. García-Miss, M. Mut-Martín, A. Matus-Moo, L.W. Torres-Tapia y S.R. Peraza-Sánchez (2010). The leishmanicidal effect of (3S)-16,17-didehydrofalcariinol, an oxylipin isolated from *Tridax procumbens*, is independent of

- NO production. *Phytotherapy Research*, 24, 1004-1008.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.3052>
- Martins, N., S. Petropoulos y I. Ferreira, (2016). Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chemistry*, 211, 41-50.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.029>
- McGwire, B.S. y A. R. Satoskar (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Quarterly Journal of Medicine: Monthly Journal of the Association of Physicians* 107, 7-14. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>
- Megías, M., Molist, P., Pombal, M.A. (2019). Atlas de histología vegetal y animal. Tejidos animales. [Online] (Actualizado 30 diciembre 2019). Disponible en: [http://mmegias.webs.uvigo.es/a-imagenes-grandes/epitelio\\_estrat\\_plano.php](http://mmegias.webs.uvigo.es/a-imagenes-grandes/epitelio_estrat_plano.php) [Acceso 5 noviembre 2020]
- Megías, M., Molist, P., Pombal, M.A. (2020). Atlas de histología vegetal y animal. Órganos animales. [Online] (Actualizado 13 enero 2020). Disponible en: <http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/tegumento-piel-fina.php> [Acceso 5 noviembre 2020]
- Naderer, T. y M.J. McConville (2011). Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. *Essays in Biochemistry*, 51, 81-95. <https://doi.org/10.1042/bse0510081>
- Nagle, A.S., S. Khare, A. Babu Kumar, F. Supek, A. Buchynskyy, C.J.N. Mathison, N. Kumar Chennamaneci, N. Pendem, F.S. Buckner, M.H. Gelb y V. Molteni (2014). Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. *Chemical Reviews*, 114, 11305-11347.  
<https://doi.org/10.1021/cr500365f>
- Navarrete-Franco, G. (2003) Histología de la piel. *Revista de la Facultad de Medicina (UNAM)*, 46, 130-133.
- Neira L.F., D.P. Peña, A.M. Vera, J.C. Mantilla y P. Escobar (2019). Leishmaniasis cutánea inducida por especies de *Leishmania Viannia* en ratones BALB/c y eficacia de un

- tratamiento tópico. Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud, 51, 33-42. doi: <http://dx.doi.org/10.18273/revsal.v51n1-2019004>
- Nilforoushzadeh, M.A., L. Shirani-Bidabadi, A. Zolfaghari-Baghbaderani, S. Saberi, A.H. Siadat y M. Mahmoudi (2008). Comparison of *Thymus vulgaris* (Thyme), *Achillea millefolium* (yarrow) and propolis hydroalcoholic extracts versus systemic Glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. Journal of Vector Borne Diseases, 45, 301-306.
- Novais, F.O. y P. Scott (2015). CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad and the ugly. Seminars in Immunopathology, 37, 251-259. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0475-7>
- Novelo-Castilla, J.S. (2005). Oxilipina con actividad leishmanicida aislada de *Tridax procumbens* L. Tesis de licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.
- Oliveira, L.F., A.O. Schubach, M.M. Martins, S.L. Passos, R.V. Oliveira, M.C. Marzochi y C.A. Andrade (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta Tropica, 118, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2009). Neglected tropical diseases. Neglected tropical diseases. [Online] (Actualizado 2013) Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44214/9789241598705\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44214/9789241598705_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y) [Acceso mayo 2020].
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2013). WHO traditional medicine strategy 2014-2023. [Online] (Actualizado 2013) Disponible en: [https://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm\\_strategy14\\_23/en/](https://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/) [Acceso 14 noviembre 2018]
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2020). Leishmaniasis. [Online] (Actualizado 2 marzo 2020) Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> [Acceso 26 mayo 2020].

OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud) (2016). Neglected Infectious Diseases in the Americas: Success Stories and Innovation to Reach the Neediest [Online] (Actualizado noviembre 2016). Disponible en:

[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12406:neglected-infectious-diseases-americas-success-stories-innovation-reach-neediest&Itemid=42097&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12406:neglected-infectious-diseases-americas-success-stories-innovation-reach-neediest&Itemid=42097&lang=en) [Acceso 7 septiembre 2018].

Paniz Mondolfi, A.E., A. Colmenares Garmendia, Y. Mendoza Pérez, C.E. Hernández-Pereira, C. Medina, F. Vargas, D. Sandoval, J. Agüero, D. Román, M. Forlano-Riera, Y. Salas, M. Peraza, P. Romero, F. Aldana, T. Castillo, S. Santeliz, G. Pérez, M.J. Suarez-Alvarado, R.J. Morales-Panza y H Kato (2019). Autochthonous cutaneous leishmaniasis in urban domestic animals (*Felis catus/Canis lupus familiaris*) from central-western Venezuela. *Acta Tropica*, 191, 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.006>

Pearson, R. D. (2019). Leishmaniasis. [Online] (Actualizado mayo 2019). Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-extraintestinales/leishmaniasis#> [Acceso 1 marzo 2021]

Peraza-Sánchez, S.R., F. Cen-Pacheco, A. Noh-Chimal, F. May-Pat, P. Simá-Polanco, E. Dumonteil, M.R. García-Miss y M. Mut-Martín (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.013>

Powell, A.M. (1965). Taxonomy of *Tridax* (Compositae). The New York Botanical Garden, Brittonia. pp. 80.

Raffino, M. E. (2020). Concepto de Histología. [Online] (Actualizado 28 julio 2020). Disponible en: <https://concepto.de/histologia/> [Acceso 5 noviembre 2020]

Ramos-Martínez, E., M.I. Villaseñor-Cardoso, M.R. López-Vancell, F.J. García-Vázquez, A. Pérez-Torres, N. Salaiza-Suazo y R. Pérez-Tamayo (2013). Effect of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. *Experimental Parasitology*, 134, 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.009>

- Ribeiro-Moreira, V., L.C. Lima de Jesús, R.E. Pereira Soares, L.D. Miranda Silva, B.A. Serra Pinto, M. Norma Melo, A.M. de Andrade Paes y S.R. Ferreira Pereira (2017). Meglumine antimoniate (Glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice Infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e02360-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02360-16>
- Rosas, L.E., T. Keiser, J. Barbi, A.A. Satoskar, A. Septer, J. Kaczmarek, C.M. Lezama-Davila y A.R. Satoskar (2005). Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *International Immunology*, 17, 1347–1357. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh313>
- Ross, R. (1903). Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *The British Medical Journal*, 2, 1261-1262. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2237.1261>
- Sarkar, A., Y.A. Khan, M.F. Laranjeira-Silva, N.W. Andrews y B. Mitra (2018). Quantification of intracellular growth inside macrophages is a fast and reliable method for assessing the virulence of *Leishmania* parasites. *Journal of Visualized Experiments*, 133, 57486-57495. <https://doi.org/10.3791/57486>
- Schneider, M.C., X. Paz Aguilera, J. Barbosa da Silva Junior, S. Kenyon Ault, P. Najera, J. Martínez, R. Requejo, R.S. Nichols, Z. Yadon, J.C. Silva, L.F. Leanes y M. Roses Periago (2011). Elimination of neglected diseases in Latin America and the Caribbean: a mapping of selected diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, 964-976. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000964>
- Scorza, B.M., E.M. Carvalho y M.E. Wilson (2017). Cutaneous manifestations of human and murine Leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1296. <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>
- Shang, A., S.-Y. Cao, X.-Y. Xu, R.-Y. Gan, G.-Y. Tang, H. Corke, V. Mavumengwana y H.-B. Li (2019). Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). *Foods* 8, 1-31. <https://www.mdpi.com/2304-8158/8/7/246>
- SINAVE (Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica). Sistema Único de Información. Secretaría de Salud, 2019. [Online] (Actualizado 4 marzo

- 2019). Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>. [Acceso junio 2019]
- Singh, N., M. Kumar y R. Kumar Singh (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5, 485-497. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60084-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60084-4)
- Tiuman, T.S., M.A. Brenzan, T. Ueda-Nakamura, B. Prado Días Filho, D.A. García Cortez y C. Vataru Nakamura (2012). Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (-) mammea A/BB. *Phytomedicine*, 19, 1196-1199. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.08.001>
- Tiwari, U., B. Rastogi, P. Singh, D.K. Saraf y S.P. Vyas (2004). Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. *Journal of ethnopharmacology*, 92, 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.001>
- Valencia-Tobón, A. (2010). Manual: Diagnóstico y control de la leishmaniasis en Centroamérica. [Online] (Actualizado agosto 2010). Disponible en: [https://issuu.com/alejandrovalenciat/docs/manual\\_centroamerica\\_leishmaniasis](https://issuu.com/alejandrovalenciat/docs/manual_centroamerica_leishmaniasis) [Acceso marzo 2021]
- Van der Auwera, G., A. Bart, C. Chicharro, S. Cortes, L. Davidsson, T. Di Muccio, J. Dujardin, I. Felger, M.G. Paglia, F. Grimm, G. Harms, C.L. Jaffe, M. Manser, C. Ravel, F. Robert, J. Roelfsema, S. Töz, J.J. Verweij y P.L. Chiodini (2016). Comparison of *Leishmania* typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Euro Surveillance Journal*, 21, 1-11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.49.30418>
- Vargas-González, A., S.B. Canto-Lara, A.G. Damián-Centeno, F.J. Andrade-Narváez (1999). Response of cutaneous leishmaniasis (chiclero's ulcer) to treatment with meglumine antimoniate in Southeast Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, 960-963. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.960>

- Vargas-Martínez, F., E. Torres-Guerrero, R. Arenas y M. Quintanilla-Cedillo (2011). Leishmaniasis en México. *Medicina Cutánea Ibero Latino Americana*, 39, 163-183.
- Vidal-Cagigas, A. (2003). Inmunología de la Leishmaniasis cutánea americana. *Revista Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 11, 211-224. <http://doi.org/10.29176/issn.2590-843X>
- Yaduvanshi, B., R. Mathur, S.R. Mathur y T. Velpandian (2011). Evaluation of wound healing potential of topical formulation of leaf juice of *Tridax procumbens* L. in mice. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73, 303-306. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.93523>