



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

EVALUACIÓN TÓPICA DE *Allium sativum*, *Tridax procumbens* Y (3S)-16,17-DIDESHIDROFALCARINOL EN RATONES BALB/c INFECTADOS CON *Leishmania mexicana*

Tesis que presenta

KARLA LIZETH CASTRO VALENCIA

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 Karla Lizeth Castro Valencia titulado “**Evaluación tóxica de *Allium sativum*, *Tridax procumbens* y (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol en ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana***” fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” - UADY bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y la Dra. Miriam Rubí de los Milagros Gamboa León, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

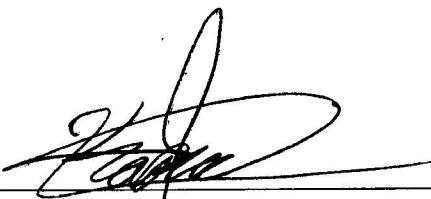


Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México a 21 de octubre de 2021.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación 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.



Karla Lizeth Castro Valencia

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., así como en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi UADY y forma parte del proyecto titulado “Fitomedicamento para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea localizada” PDCPN-2015-88 en el que participé bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y la Dra. Miriam Rubí de los Milagros Gamboa León.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada 907563 para cursar la maestría.

Al proyecto “Fitomedicamento para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea localizada” PDCPN-2015/88, por el financiamiento para la parte experimental.

Al Laboratorio de Inmunología del CIR Hideyo Noguchi UADY Unidad Biomédica, por permitir el desarrollo de la parte experimental de esta tesis, así como al Laboratorio de Biología Celular y de Enfermedades Emergentes y Reemergentes por permitirme usar sus instalaciones y equipo de laboratorio cuando fue necesario.

A mis asesores el Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y a la Dra. Miriam Rubí de los Milagros Gamboa León, por brindarme la oportunidad de pertenecer a sus grupos de investigación y por su apoyo durante toda mi estancia como estudiante para adquirir nuevos conocimientos.

Al sínodo conformado por las Dras. Ana Paulina Haro Álvarez, Blanca Marina Vera Ku y la Dra. María Marcela Gamboa Angulo, por sus aportaciones, consejos, sugerencias y revisiones del manuscrito de tesis.

A la Dra. Elsy Nalleli Loría Cervera, por su apoyo constante en cada etapa de los procedimientos experimentales, su paciencia, consejos, las enseñanzas y sobre todo por el tiempo que me brindó durante este trayecto.

Al personal del Laboratorio de Inmunología, la M. en C. Erika Sosa Bibiano y la QFB Karina López Ávila, por siempre resolver mis dudas y su apoyo en el laboratorio y seminarios de grupo.

Al M. en C. Luis W. Torres Tapia, técnico del Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del CICY, por sus consejos y apoyo con los métodos de extracción.

Agradezco también al M. en C. Leonardo Guillermo Cordero, por brindarme su ayuda durante el análisis de muestras histopatológicas.

A mis amigos y compañeros, quienes hicieron que esta travesía fuera más amena, por la motivación y apoyo incondicional siempre. Les agradezco infinitamente.

A mi familia por acompañarme y apoyarme durante este trayecto.

Gracias infinitas.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Participación en el Primer Encuentro de Enfermedades Tropicales Desatendidas (Modalidad virtual) del 19 al 21 de octubre de 2020. Presentación de Cartel.

Participación en el X Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste. (Modalidad virtual) del 08 al 12 de febrero de 2021. Presentación de Cartel.

DEDICATORIAS

A mi familia.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 Enfermedades Tropicales Desatendidas	3
1.2 Leishmaniosis.....	3
1.3 Leishmaniosis en las Américas	7
1.4 Biología del parásito	10
1.4.1 Ciclo de vida.....	11
1.5 Reservorios	12
1.6 Respuesta inmune ante una infección por <i>Leishmania</i>	13
1.7 Tratamientos	16
1.8 Alternativas para el tratamiento de la infección por <i>Leishmania</i>	19
1.8.1 <i>Tridax procumbens</i>	21
1.8.2 Oxilipina	23
1.8.3 <i>Allium sativum</i> (ajo)	24
1.9 Formulaciones.....	25
1.10 Modelo murino, cepa BALB/c	27
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS.....	28

OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
DIAGRAMA DE FLUJO	30
CAPÍTULO II.....	31
DETERMINACIÓN DE DOSIS TERAPÉUTICA Y EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LAS FORMULACIONES TÓPICAS EN EL DESARROLLO DE LAS LESIONES CUTÁNEAS OCASIONADAS POR <i>L. mexicana</i> EN RATONES BALB/c	31
2.1 INTRODUCCIÓN	31
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.2.1 Extractos de <i>A. sativum</i> , <i>T. procumbens</i> y compuesto activo oxilipina.....	32
2.2.2 Animales experimentales.....	32
2.2.3 Cultivo de parásitos	33
2.2.4 Inoculación de ratones BALB/c con promastigotes de <i>L. mexicana</i>	33
2.2.5 Determinación del tamaño de las lesiones.....	34
2.2.6 Evaluación de los extractos vía tópica	35
2.2.7 Análisis estadístico	36
2.3 RESULTADOS	36
2.3.1 Determinación de dosis terapéutica y efecto del tratamiento tópico con el extracto acuoso de <i>Allium sativum</i> sobre la infección con <i>L. mexicana</i>	39
2.3.2 Efecto del tratamiento tópico con la fracción hexánica de <i>Tridax procumbens</i>	42
2.3.3 Efecto del tratamiento tópico con el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina).....	45

2.4 DISCUSIÓN	46
CAPITULO III.....	51
ANÁLISIS DE LA CARGA PARASITARIA ASOCIADA A LA ADMINISTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS POR VÍA TÓPICA	51
3.1 INTRODUCCIÓN	51
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.2.1 Extracción de ADN	51
3.2.2 Determinación de la carga parasitaria	52
3.2.3 Análisis estadístico	53
3.3 RESULTADOS	54
3.3.1 Efecto de la administración tópica del extracto de <i>Allium sativum</i> sobre la carga parasitaria	54
3.3.2 Efecto de la administración tópica de la fracción hexánica de <i>Tridax procumbens</i> en la carga parasitaria.....	55
3.3.3 Efecto de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol en la carga parasitaria	56
3.4 DISCUSIÓN	57
CAPÍTULO IV	61
EVAUACIÓN DE LOS CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS ASOCIADOS A LA ADMINISTRACIÓN TÓPICA DE <i>A. sativum</i> , <i>T. procumbens</i> Y (3S)-16,17-DIDESHIDROFALCARINOL EN RATONES BALB/c INFECTADOS CON <i>L. mexicana</i> ...	61
4.1 INTRODUCCIÓN	61
4.2 METODOLOGÍA.....	63

4.2.1 Obtención de muestras para cortes histológicos.....	63
4.3 RESULTADOS	64
4.3.1 Histopatología del grupo control (excipiente y Glucantime®).....	66
4.3.2 Análisis histopatológico de los grupos tratados con <i>Allium sativum</i>	68
4.3.3 Análisis histopatológico de los grupos tratados con <i>Tridax procumbens</i>	71
4.3.4 Análisis histopatológico del grupo tratado con (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol al 1%	72
4.4 DISCUSIÓN	73
CAPITULO V	77
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE INF- γ E IL-10 PARA EVALUAR LA RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A LA ADMINISTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS POR VÍA TÓPICA	77
5.1 INTRODUCCIÓN	77
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	78
5.2.1 Extracción de ARN	78
5.2.2 Análisis de expresión de citocinas	79
5.2.3 Análisis estadístico	80
5.3 RESULTADOS	80
5.3.1 Efecto de la administración tópica del extracto de <i>Allium sativum</i> sobre la expresión de INF- γ e IL-10.....	80
5.3.2 Efecto de la administración tópica de la fracción hexánica de <i>Tridax procumbens</i> sobre la expresión de INF- γ e IL-10.....	81

5.3.3 Efecto de la administración tópica del compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol sobre la expresión de INF- γ e IL-10.....	82
5.4 DISCUSIÓN	83
CAPITULO VI	87
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	87
6.1 CONCLUSIONES.....	87
6.2 PERSPECTIVAS.....	88
BIBLIOGRAFÍA.....	89
ANEXOS.....	100
Anexo 1. Preparación de las formulaciones.....	100
Anexo 2. Extracción de ADN por el método de fenol-cloroformo	102
Anexo 3. Extracción de ARN mediante el kit comercial AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen)	104

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 <i>Lutzomyia</i> . Vector transmisor de <i>Leishmania</i> (Manzaba, 2019).	4
Figura 1.2 Tipos de leishmaniosis. LCL (A); LM (B); LV (C) y LCD (D) (CDC, 2016).	6
Figura 1.3 Casos de leishmaniosis cutánea en el mundo (OMS, 2018).	7
Figura 1.4 Manifestación clínica de LCL en el sureste de México. (A) Lesión ulcerada aguda en la oreja; (B) lesión típica pequeña, redondeada, ulcerada en el antebrazo; (C) lesión crónica en la oreja (Andrade et al., 2017).	9
Figura 1.5 Imágenes de microscopía electrónica de barrido donde se observa la forma promastigote (izquierda) y amastigote (derecha) de <i>Leishmania</i> (Basteiro, 2007).	11
Figura 1.6 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> (CDC, 2016).	12
Figura 1.7 Tipos de respuesta inmune ante una infección por <i>Leishmania</i> . A) Respuesta tipo Th1; B) Respuesta tipo Th2 (Hernández-Ruíz y Becker, 2006).	15
Figura 1.8 Estructura química de (A) anfotericina, (B) pentamidina y (C) paromomicina. 17	
Figura 1.9 Imagen de la planta <i>T. procumbens</i>	21
Figura 1.10 Estructura química de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol aislada de <i>T. procumbens</i>	23
Figura 1.11 Imagen de la planta <i>A. sativum</i> (Farmacopea Caribeña, 2014).	24
Figura 1.12 Estrategia experimental.	30
Figura 2.1 Fotografía de una lesión de un ratón BALB/c infectado con <i>L. mexicana</i> en el cual se puede observar una etiqueta que es usada como referencia de medida para obtener el tamaño de úlcera y borde indurado.	34
Figura 2.2 Secuencia para determinar el tamaño de úlcera y bordes indurados de una lesión ocasionada por <i>L. mexicana</i> en ratones BALB/c. (A) diámetro mayor de úlcera; (B) diámetro	

menor de úlcera; (C) diámetro mayor de borde indurado; (D) diámetro menor de borde indurado..... 35

Figura 2.3 (A) Lesión cutánea causada por *L. 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. 37

Figura 2.4 Evolución de la lesión ocasionada por *L. mexicana* en ratón BALB/c tratado con el excipiente en crema desde la semana 0 hasta la semana 5 de seguimiento (grupo 1, control negativo). 38

Figura 2.5 Evolución a partir de la semana 0 de tratamiento y hasta la semana 5 de seguimiento de una úlcera de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana*, tratado con Glucantime® (grupo 9)..... 38

Figura 2.6 Evolución de la lesión ocasionada por *L. mexicana* en ratones BALB/c tratados con 1, 5 y 10% del extracto acuoso liofilizado de *A. sativum*. Antes, durante y después del tratamiento..... 39

Figura 2.7 Evolución de una lesión de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana* y tratado con la formulación de *A. sativum* al 1% desde el día 0 hasta la semana 5 de seguimiento (grupo 2)..... 40

Figura 2.8 Evolución de una lesión de ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con una formulación de *A. sativum* al 5% desde el día 0 hasta la semana 5 de seguimiento (grupo 3). 41

Figura 2.9 Evolución durante 5 semanas de seguimiento de una lesión de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana*, tratado con una formulación de *A. sativum* al 10%..... 41

Figura 2.10 Evolución de la lesión ocasionada por *L. mexicana* en ratones BALB/c tratados con 1, 2 y 5% de la fracción hexánica de *T. procumbens*..... 42

Figura 2.11 Evolución de una úlcera tratada con el 1% de la fracción hexánica de *Tridax procumbens* en un ratón BALB/c infectado con *L. mexicana* desde la semana 0 de tratamiento hasta la semana 5 de seguimiento. 43

Figura 2.12 Evolución de úlceras de ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> y tratados con el 2% de la fracción hexánica de <i>T. procumbens</i> . A) Reducción del tamaño de úlcera. B) Aumentó del tamaño de úlcera.....	44
Figura 2.13 Evolución de úlcera de ratón BALB/c infectado con <i>L. mexicana</i> y tratado con el 5% de la fracción hexánica de <i>T. procumbens</i>	44
Figura 2.14 Evolución a partir de la semana 0 de tratamiento y hasta la semana 5 de seguimiento de una lesión de ratón BALB/c infectado con <i>L. mexicana</i> , tratado con el 5% de la fracción hexánica de <i>T. procumbens</i>	45
Figura 2.15 Evolución de la lesión desde la semana 0 de tratamiento y hasta la semana 5 de seguimiento de una úlcera de ratón BALB/c infectado con <i>L. mexicana</i> , tratado con el 1% de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina).....	45
Figura 2.16 Evolución de las úlceras de ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> , tratados con el compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol.....	46
Figura 3.1 Carga parasitaria en los grupos evaluados con la formulación de <i>A. sativum</i> .	54
Figura 3.2 Carga de parásitos en los diferentes grupos evaluados con la formulación que contiene la fracción hexánica de <i>T. procumbens</i> a diferentes porcentajes.....	55
Figura 3.3 Carga parasitaria en el grupo evaluado con (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol al 1%.....	56
Figura 4.1 A) Capas de la piel; B) Muestra histológica de tejido de piel sano, Epidermis (flecha azul), dermis (flecha verde) y panículo (flecha roja) (Megías et al., 2019)	61
Figura 4.2 Imagen de cambios histopatológicos visualizados en epidermis de ratón BALB/c infectado con <i>L. mexicana</i> . A) acantosis (flecha verde); B) ortoqueratosis (flecha azul); C) paraqueratosis (flecha negra); D) Espongiosis (flecha roja). Observados bajo microscopio óptico con objetivo 40x.	64
Figura 4.3 Imagen histopatológica de ratones BALB/c hembra, infectados con <i>L. mexicana</i> y tratados con el excipiente en crema. A) Ulceración (flecha roja) e infiltrado inflamatorio a partir del panículo (flecha negra) (4x). B) Muestra que indica afección desde la unión	

dermoepidérmica (flecha azul) (4x). C) Macrófagos (flechas rojas) y amastigotes (flechas verdes) (100x). 67

Figura 4.4 Muestra histopatológica de ratones BALB/c hembras, infectados con *L. mexicana* y tratados con Glucantime®. A) Indica ulceración e infiltrado inflamatorio a partir del panículo (flecha azul) (10x); B) Macrófagos infectados (flecha negra) y amastigotes vacuolados (flecha roja) (100x). 68

Figura 4.5 Tejido de piel teñido con HE de ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con la formulación de *A. sativum* al 1%. A) Daño focal en la zona panicular (marcado en rojo) (4x). (B) Fibrosis flecha negra, indica reparación de tejido dañado (40x). 69

Figura 4.6 Muestra histopatológica de un ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con la formulación de *A. sativum* al 5%. A) Vista general del corte histopatológico con presencia de necrosis (flecha azul) (10x). B) Macrófagos (flecha roja), amastigotes (flecha negra), linfocito (flecha verde) observados en tejido muscular (100x). 70

Figura 4.7 Histopatología de ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con una formulación de *A. sativum* al 10%. A) Infiltrado inflamatorio marcado en rojo, (4x). B) Macrófagos (flechas rojas) y amastigotes (flecha negra) de *L. mexicana* (100x). C) Zona del tejido que no se encuentra dañado, epidermis (flecha azul, dermis (flecha verde), panículo (flecha amarilla) (40x). 70

Figura 4.8 Histopatología de un ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con *T. procumbens* al 1%. A) Infiltrado inflamatorio que abarca desde la dermis hasta la región del panículo marcada en rojo (10x). B) Amastigotes vacuolados (flecha negra) (100x). 71

Figura 4.9 Imagen de corte histopatológico teñido con HE observada al microscopio de un ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con *T. procumbens* al 2%. A) Infiltrado inflamatorio observado a partir de la zona del panículo (flecha roja) hasta la zona del músculo (flecha azul) (10x). B) Macrófagos (flecha amarilla) y amastigotes vacuolados en tejido muscular (flecha negra) (100x). 72

Figura 4.10 Imagen de corte histopatológico teñido con HE observada al microscopio a 40x de ratón hembra BALB/c infectado con *L. mexicana*, tratado con la formulación de (3S)-16,17 dideshidrofalcarinol (oxilipina) al 1%. A) Zona de daño a partir del panículo (flecha roja), necrosis (flecha azul) (10x). B) Macrófagos y amastigotes (100x)..... 73

Figura 5.1 Expresión de INF- γ e IL-10 en los grupos evaluados con *A. sativum*..... 81

Figura 5.2 Expresión de INF- γ e IL-10 en los grupos evaluados con *T. procumbens*..... 82

Figura 5.3 Expresión de INF- γ e IL-10 en el grupo evaluado con (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol al 1%. 83

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Plantas medicinales con actividad leishmanicida <i>in vitro</i>	20
Cuadro 3.1 Secuencias de iniciadores utilizados para determinación de la carga parasitaria.	52
Cuadro 3.2 Cantidad de reactivos utilizados para la q-PCR en la determinación de la carga parasitaria.....	53
Cuadro 4.1 Patrones histopatológicos encontrados en la epidermis de roedores BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> . Se representa la intensidad de las apariciones ausentes (-), leve (+), moderada (++) y grave (+++), por grupos.	65
Cuadro 4.2 Patrones histopatológicos encontrados en dermis de roedores BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> . Se representa la intensidad de las apariciones, ausentes (-), leve (+), moderada (++) y grave (+++), por grupos.	66
Cuadro 5.1 Cantidad de reactivos utilizados para la q-PCR en el análisis de expresión de citocinas.....	80

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA	Analysis of variance (análisis de varianza)
ARN	Ácido ribonucleico
<i>A. sativum</i>	<i>Allium sativum</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Cat.	Catálogo
CD	Células dendríticas
CICY	Centro de Investigación Científica de Yucatán
CIR	Centro de Investigaciones Regionales
Cm	Centímetros
Ct	Cycle threshold (ciclo umbral)
D	Diámetro mayor
d	Diámetro menor
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Fw	Forward (delantero)
g	Gramos
GTP	Guanosina trifosfato

H	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
IC₅₀:	Concentración mínima que inhibe el 50%
INF-γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
Kg	Kilogramos
L	Litro
LCL	Leishmaniosis cutánea localizada
LCD	Leishmaniosis cutánea difusa
<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
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

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
Rv	Reverse (reverso)
S	Lesión
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
TE	Tris-HCl-EDTA
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>T. procumbens</i>	<i>Tridax procumbens</i>
Th1	T1 helper (respuesta cooperadora tipo 1)
Th2	T2 helper (respuesta cooperadora tipo 2)
UADY	Universidad Autónoma de Yucatán
°C	Grados Celsius
μg	Microgramos
μL	Microlitros

RESUMEN

En México, la leishmaniosis cutánea localizada (LCL) es endémica de la península de Yucatán y su agente causal es *Leishmania L. mexicana*. Este parásito provoca lesiones cutáneas localizadas, conocidas comúnmente como “úlceras del chiclero”. En esta región, la quimioterapia con antimonio de meglumina (Glucantime®) es el único tratamiento aprobado. Este tiene costos altos, es tóxico, prolongado y presenta efectos secundarios graves; además, se cura de manera clínica pero no parasitológica. Por ello, es importante la búsqueda de otras alternativas terapéuticas y una opción asequible son las plantas medicinales. *Tridax procumbens* y *Allium sativum* son dos especies de plantas que han demostrado actividad leishmanicida a través de diversos estudios, los extractos de ambas plantas administrados vía intraperitoneal a ratones infectados mostraron actividad leishmanicida contra amastigotes de *L. mexicana* y evitaron el progreso de la enfermedad. De *T. procumbens* se ha aislado el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, una oxilipina tipo acetilénica, con una buena actividad leishmanicida *in vitro*. En el presente estudio se evaluó vía tópica la efectividad de los extractos de ambas especies, así como de la oxilipina a diferentes porcentajes en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*. Se evaluaron los tamaños de lesión, la carga parasitaria, los cambios histopatológicos y la expresión de INF- γ e IL-10 asociados a la administración de los diferentes tratamientos. *A. sativum* al 1% mostró cura clínica en el 60% de los roedores y disminuyó de manera significativa la carga parasitaria respecto al grupo control; los cambios histopatológicos revelaron cicatrización y reepitelización. El tratamiento con *T. procumbens* al 1 y 5% redujo el tamaño de las lesiones, pero no promovió la reepitelización ni disminuyó significativamente la carga parasitaria. La oxilipina no logró actividad, por lo que será necesario evaluar otros porcentajes para conocer su efectividad. El patrón histopatológico en estos grupos se caracterizó por la presencia de espongiosis, acantosis, úlceras e hiperqueratosis en la zona epidérmica y la dermis presentó infiltrado inflamatorio difuso compuesto por eosinófilos y macrófagos vacuolados infectados con amastigotes. Los niveles de INF- γ e IL-10 observados en todos los grupos fueron similares entre sí, indicando una respuesta inmunológica de tipo Th2, la cual es reportada para ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*. Los resultados sugieren que las formulaciones evaluadas podrían representar una alternativa de tratamiento tópico para la LCL.

ABSTRACT

In Mexico, the Yucatan peninsula is an endemic area of localized cutaneous leishmaniasis (LCL) whose causative agent is *Leishmania L. mexicana*, which causes localized cutaneous lesions, commonly known as “chiclero’s ulcer”. In this region, chemotherapy with meglumine antimoniate (Glucantime®) is the only approved treatment. It is highly expensive, toxic, prolonged, and presents serious side effects, and the injury of the patients resolves clinically but not parasitologically. Therefore, the search for therapeutic alternatives is important and one option are medicinal plants. *Tridax procumbens* and *Allium sativum* are two species of plants that have demonstrated leishmanicidal activity through various studies, both extracts administered intraperitoneally to infected mice showed leishmanicidal activity against amastigotes of *L. mexicana* and prevented the progression of the disease. From *T. procumbens*, the compound (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol was isolated, an acetylenic type oxylin with good *in vitro* leishmanicidal activity. In this study, the effectiveness of the extracts of both mentioned medicinal species and the pure oxylin was evaluated topically at different percentages in BALB/c mice infected with *L. mexicana*. Lesion sizes, parasite load, histopathological changes, and expression of INF- γ and IL-10 associated with the administration of the different treatments were evaluated. *A. sativum* at 1% achieved clinical cure in 60% of the rodents and significantly decreased the parasite load compared to the control group; histopathological changes revealed scarring and re-epithelialization. Treatment with *T. procumbens* at 1 and 5% reduced the size of the lesions, but did not promote re-epithelialization or significantly decrease the parasite load. Oxylin at 1% did not achieve clinical cure; therefore, it is necessary to evaluate other percentages to know their effectiveness. The histopathological pattern in these groups was characterized by the presence of spongiosis, acanthosis, ulcers and hyperkeratosis in the epidermal area and the dermis presented a diffuse inflammatory infiltrate composed of eosinophils and vacuolated macrophages infected with amastigotes. The levels of INF- γ and IL-10 observed in all groups were similar to each other, indicating an immune response of the Th2 type, which is reported for BALB/c mice infected with *L. mexicana*. The results suggest that the formulations evaluated could represent an alternative topical treatment for LCL.

INTRODUCCIÓN

Las leishmaniosis son enfermedades causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania* pertenecientes al filo Sarcomastigophora, familia Trypanosomatidae. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019), las leishmaniosis se catalogan como enfermedades tropicales desatendidas que se transmiten a los humanos por moscos hembra del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, comúnmente llamados “mosca de la arena” o “mosca chiclera”. Las leishmaniosis son endémicas en 98 países y se estima que 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraerlas. Se presentan en una amplia variedad de manifestaciones clínicas, desde lesiones cutáneas localizadas o difusas, hasta lesiones mucocutáneas o viscerales. (Del Rosal *et al.*, 2010; Andrade-Narváez *et al.*, 2001).

La leishmaniosis cutánea (LC) es la más predominante a nivel mundial. En la península de Yucatán, la especie *Leishmania (L.) mexicana* es el principal agente causal de la leishmaniosis cutánea localizada (LCL), comúnmente conocida como “úlceras del chiclero”. El tratamiento actual requiere inyecciones de un antimonial pentavalente (Glucantime®) altamente tóxico, de elevado costo, y que posee efectos secundarios graves. La vía de administración es parenteral y por 21 días resultando muy doloroso, en consecuencia, muchos pacientes abandonan el tratamiento. Además, las lesiones de los pacientes se resuelven de manera clínica, pero no parasitológica; por lo tanto, es de gran importancia la búsqueda de alternativas que puedan dar solución al problema. Una alternativa viable es el uso de la medicina tradicional que emplea plantas medicinales (Barros *et al.*, 2021; Gutiérrez-Rebolledo, 2017; Del Rosal *et al.*, 2010).

Desde tiempos ancestrales se han usado las plantas medicinales para el tratamiento de diversos padecimientos y actualmente es un hecho conocido que las plantas medicinales son una importante fuente de nuevas moléculas con actividad farmacológica. Entre estas plantas se encuentra *Tridax procumbens* de la familia Asteraceae. De dicha planta se ha aislado el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol que ha revelado tener actividad

antiprotozoaria muy eficiente a través de los bioensayos *in vitro* contra *L. mexicana* (Martín-Quintal, 2010).

Por otra parte, se ha demostrado el efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Allium sativum* evitando el progreso de la lesión causada por *L. mexicana* y estimulando la proliferación de linfocitos y la producción de interferón gamma (INF- γ) mediante la activación de macrófagos, favoreciendo el desarrollo de la respuesta Th1, responsable de la resolución de las lesiones (Gamboa-León *et al.*, 2007). Por lo anterior, Gamboa-León *et al.* (2014) evaluaron *in vivo* el extracto metanólico de *T. procumbens* y el extracto acuoso de *A. sativum*, así como una mezcla de ambos extractos vía intraperitoneal en ratones infectados con *L. mexicana*, reportando que la mezcla de ambos extractos tiene un efecto terapéutico más eficiente en la eliminación del parásito y reducción de la lesión. Sin embargo, la vía intraperitoneal sigue siendo invasiva y dolorosa tanto para animales, como para humanos, por lo que es necesaria una alternativa que sea segura, eficaz, asequible y fácil de administrar como la vía tópica. Según estudios, el tratamiento tópico puede ofrecer varias ventajas comparado con el tratamiento convencional, como la fácil administración, menor incidencia de reacciones adversas, así como una atractiva relación costo beneficio, principalmente si se considera que la LCL se presenta en regiones con escasa atención médica (Corpas-López *et al.*, 2016; Vidal *et al.*, 2007).

Lezama *et al.* (2014) plantea que un tratamiento tópico que evite la toxicidad provocada por la administración sistémica y pueda ser aplicado después de una picadura de la mosca de la arena o después del desarrollo de una lesión ulcerante, sería ideal para la LCL, ya que podría evitarse el desarrollo de la enfermedad y la propagación de la infección, además de mejorar el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

En el presente trabajo se planteó evaluar la aplicación tópica de la fracción hexánica de *T. procumbens*, el metabolito activo (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina) y el extracto acuoso de *A. sativum* en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*, esto con el fin de desarrollar un fitomedicamento útil contra la LCL.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Enfermedades Tropicales Desatendidas

De acuerdo con la OMS (2019), las enfermedades tropicales son aquellas que se dan sólo o principalmente en los trópicos, esto quiere decir, enfermedades infecciosas que son abundantes en climas calientes y húmedos. Son llamadas desatendidas, pues durante muchos años no han tenido la atención suficiente por parte de la industria farmacéutica y los organismos enfocados a la salud, por lo que se han visto postergadas en las prioridades de las políticas de salud pública.

Las enfermedades tropicales desatendidas afectan a alrededor de 1,000 millones de personas y frecuentemente coexiste más de una de ellas en una misma región, por lo que muchas veces las personas presentan comorbilidad. Así mismo, se asocian a la situación de pobreza, concentrándose casi exclusivamente en los países en vías de desarrollo y afectando a personas que residen en zonas rurales remotas, barrios suburbanos marginales y zonas en donde el agua es insalubre y/o demasiado escasa para la higiene personal, donde existe precariedad en las viviendas y cercanía con el hábitat de insectos portadores de enfermedades (OMS, 2019). Entre este grupo de enfermedades infecciosas se encuentran 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 las leishmaniosis (OMS, 2019).

1.2 Leishmaniosis

Las leishmaniosis son un conjunto de enfermedades zoonóticas causadas por parásitos protozoos de la familia Trypanosomatidae, género *Leishmania*. Este parásito se transmite

por la picadura de insectos hematófagos perteneciente a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae. En América, los vectores responsables pertenecen al género *Lutzomyia*, mientras que en África, Asia y Europa se ha incriminado a diversas especies del género *Phlebotomus* (Figura 1.1) (Manzaba, 2019).



Figura 1.1 *Lutzomyia*. Vector transmisor de *Leishmania* (Manzaba, 2019).

Las enfermedades ocasionadas por *Leishmania* spp. se presentan en una amplia variedad de manifestaciones clínicas, lo que depende principalmente de la especie de *Leishmania* infectante. En la actualidad se han identificado más de 20 especies que tienen la capacidad de infectar al ser humano, así, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana*, *L. major* y *L. tropica* son causantes de leishmaniosis cutánea localizada (LCL), la más predominante a nivel mundial. La leishmaniosis mucocutánea (LM) es causada principalmente por *L. braziliensis*, mientras que *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi* son causantes de la leishmaniosis visceral (LV), también conocida como Kala-azar, considerada la más peligrosa y mortal si no se trata a tiempo y la leishmaniosis cutánea difusa (LCD) es la forma más rara, en el nuevo mundo el agente causal es *L. mexicana* y *L. amazonensis*.

- **Leishmaniosis cutánea localizada:** Es la forma más común en el mundo, se presenta como lesiones ulcerosas o nodulares, que se localizan cerca o en el sitio inicial de la picadura del insecto. El primer signo clínico es una pápula roja que aparece entre dos semanas y dos meses después de la picadura, posteriormente se va irritando y aumenta de tamaño dejando una úlcera, la cual se va endureciendo y recubriendo gradualmente de una costra con exudación serosa poco densa (Figura 1.2A). Existe un porcentaje de pacientes (20-45%) en los que la lesión puede curar clínicamente sin tratamiento en algunos meses, sin embargo, suele dejar una cicatriz deformante (Ben *et al.*, 2016). Los casos de leishmaniosis cutánea en su mayoría (aproximadamente 95%) se producen en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central (OMS, 2019).
- **Leishmaniosis mucocutánea:** Se presenta como múltiples lesiones similares a la LCL, pudiendo ser una extensión de ésta, pero debido a la extensión del parásito a través de los vasos linfáticos o por circulación sanguínea afecta los tejidos nasofaríngeos ocasionando inflamación y necrosis en el tejido afectado (Figura 1.2B). Este tipo de leishmaniosis es de las más severas pues conlleva a la destrucción parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta; las lesiones producidas no se curan de forma espontánea y frecuentemente se dan infecciones bacterianas, lo que puede ocasionar mutilación facial grave con deformaciones en el rostro y puede provocar la muerte (OMS, 2019; Jiménez, 2015).
- **Leishmaniosis visceral:** Es la forma más grave de la enfermedad y es mortal si no se trata, se encuentra asociada con disfunciones inmunológicas. Resulta de la infección de los fagocitos dentro del sistema reticuloendotelial, involucrando órganos internos, de los cuales, los más afectados suelen ser el hígado y el bazo debido al gran aumento de tamaño que la enfermedad provoca (Figura 1.2C) (Gupta *et al.*, 2011). Es endémica en el subcontinente indio y África Oriental. De todos los casos producidos en el mundo al año (aproximadamente 50,000 y 90,000) sólo un 25 a 45% son notificados a la OMS (OMS, 2019).

- **Leishmaniosis cutánea difusa:** Es una variante de la LC, se presenta como múltiples lesiones cutáneas, pápulas o nódulos eritematosos en áreas localizadas, frecuentemente en extremidades. Las lesiones tienden a diseminarse comprometiendo grandes extensiones de superficie corporal (Figura 1.2 D). A diferencia de la LCL, esta presentación es difícil de tratar, y no presenta regresión espontánea de las lesiones (OPS, 2019; Jiménez, 2016).



Figura 1.2 Tipos de leishmaniosis. LCL (A); LM (B); LV (C) y LCD (D) (CDC, 2016).

Estas enfermedades se han convertido en un serio problema de salud pública a nivel mundial, ocupando el sexto lugar en importancia entre todas las enfermedades tropicales, debido a que causa mutilaciones, deformaciones e incapacidades. Su distribución se da en todo el mundo (Figura 1.3), son endémicas en 98 países y alrededor de 350 millones de personas están en riesgo de contraerlas. La incidencia y prevalencia real es desconocida, y sólo en 52 de los países endémicos es obligatorio notificar el padecimiento de alguna de las leishmaniosis. Sin embargo, se estima una prevalencia mundial de 20 millones de casos y se calcula una incidencia entre 1.5 y 2 millones de casos nuevos al año para las leishmaniosis cutáneas y 500,000 para leishmaniosis visceral (Zambrano, 2014).

1.3 Leishmaniosis en las Américas

En América Latina se ha vuelto un reto el control de la enfermedad, su distribución va desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina; la epidemiología es muy compleja debido a varios factores como son: las variaciones en los ciclos de transmisión, los reservorios, los vectores, las manifestaciones clínicas, la respuesta al tratamiento y la convergencia de varias especies de *Leishmania* en la misma zona geográfica (OMS, 2019). La leishmaniosis cutánea es la más predominante en América Latina con un aproximado de 60,000 casos por año (Figura 1.3) (Torres-Guerrero y Arenas, 2018).

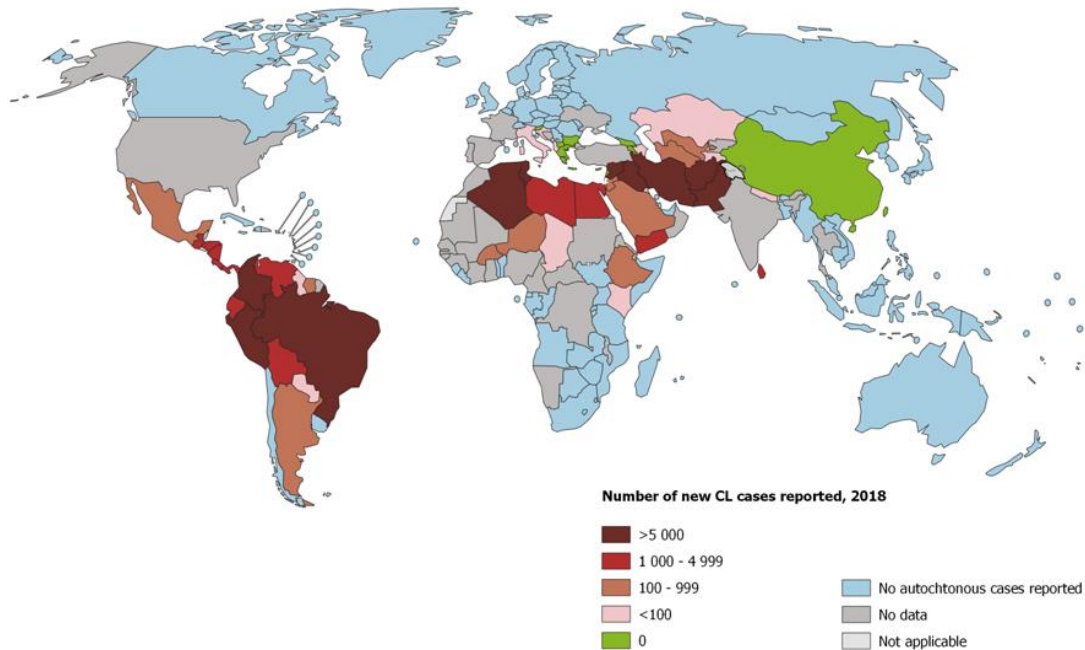


Figura 1.3 Casos de leishmaniosis cutánea en el mundo (OMS, 2018).

En México se han registrado 22 estados con incidencia de leishmaniosis y la forma clínica predominante es la LCL, cuyo principal agente causal es *L. mexicana*. Se considera

endémica en los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y la península de Yucatán.

En la península de Yucatán se tiene evidencia de la leishmaniosis desde la época precolombina, pues Diego López de Cogolludo relató en su libro “Historia de Yucatán” que los primeros franciscanos encontraron un gran número de indígenas con “orejas podridas” (Vargas-Martínez *et al.*, 2011). Sin embargo, en la cultura maya esta enfermedad es conocida como “Cheech” y fue descrita clínicamente por Seidelin, quien identificó el parásito causante de la enfermedad mediante el análisis de impresiones de la úlcera en portaobjetos y posteriormente utilizando una tinción diferencial (Giemsa); esta técnica de diagnóstico es conocida como impronta y con esta técnica pudo observar al parásito y clasificarlo como *L. mexicana*. La forma en que se manifiesta la enfermedad es como leishmaniosis cutánea localizada (LCL) y se denomina “úlceras del chiclero” debido a que frecuentemente afectaba a los recolectores del producto del árbol del chicle (*Manilkara zapota*). Sus reservorios principales son los roedores silvestres *Ototylomys phyllotis* y *Peromyscus yucatanicus* y el único vector comprobado es *Lutzomya olmeca olmeca* (Andrade-Narváez, 2005).

Entre 2015 y 2018 se registraron 1,558 casos de leishmaniosis en la República Mexicana, de los cuales el 99% fueron de forma cutánea y entre 2018 y 2019 hubo un reporte de 1,675 casos, afectando principalmente a personas del sexo masculino hasta en un 80%. En el año 2020 se tiene un reporte de 1,234 casos confirmados y 304 casos sospechosos (SINAVE, 2021).

El sureste mexicano, es la región que reporta el mayor número de casos. En 2020 se diagnosticaron un total de 1,212, de los cuales 742 pertenecen a la península de Yucatán (SINAVE, 2021).

En cuanto a la península de Yucatán, los casos de LCL se han restringido a pueblos como La Malacona, La Virgen, El Carmen, Cristóbal Colón, Niños Héroe, Dos Naciones, entre otros, ubicados en el sur, cerca de las áreas endémicas caracterizadas de Campeche y Quintana Roo; este último estado en 1999, ocupó la tasa más alta de infección y para 2002

se ubicó en segundo lugar después de Tabasco (Jheman, 2008). En el año 2014, se presentó un caso en el municipio de Tinum, Yucatán, municipio ubicado al oeste del estado y donde no se habían reportado casos previamente. En 2015 fueron reportados 17 casos, de los cuales 11 pertenecían a Tinum. Este aumento fue alarmante y se ha atribuido a posibles cambios en los patrones epidemiológicos de la leishmaniosis en la península (Andrade-Narváez, 2017).

El cuadro clínico de LCL ocasionado por *L. mexicana* se describe como una lesión ulcerada, indolora y única que aparece principalmente en áreas expuestas como cara, brazos y piernas; que tiende a curarse espontáneamente. Sin embargo, puede dejar cicatrices graves y permanentes. Cuando la lesión se encuentra en la oreja tiende a volverse crónica si no es tratada, provocando la destrucción gradual del pabellón auricular y la desfiguración. Se ha observado que con el paso del tiempo la manifestación de las lesiones ha ido evolucionando, desde la típica lesión única, redondeada, pequeña y ulcerada reconocida como benigna en el mundo, hasta lesiones nodulares de mayor tamaño (Figura 1.4) (Andrade-Narváez, 2017).



Figura 1.4 Manifestación clínica de LCL en el sureste de México. (A) Lesión ulcerada aguda en la oreja; (B) lesión típica pequeña, redondeada, ulcerada en el antebrazo; (C) lesión crónica en la oreja (Andrade *et al.*, 2017).

1.4 Biología del parásito

El género *Leishmania* pertenece a la familia Trypanosomatidae, se divide en dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, diferenciándose por el lugar de reproducción dentro del tracto digestivo del insecto vector. Para el caso del subgénero *Leishmania*, los promastigotes se desarrollan en el intestino posterior y engloba los complejos *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*, que a su vez se dividen en especies específicas para cada complejo. En el caso del subgénero *Viannia* los promastigotes se multiplican en el intestino medio-anterior y engloba los complejos *L. guayanensis*, *L. braziliensis*, *L. lainsoni* y *L. naiffi* (Bañuls *et al.*, 2007).

Leishmania fue descrita en 1903 por Leishman y Donovan en la India, se trata de un parásito protozoo flagelado perteneciente a la clase Zoomastigophora, del orden cinetoplastida. Durante su ciclo de vida presenta dos estadios principales, la forma promastigote y amastigote. Asimismo, es importante recalcar que tiene dos tipos de genoma, el nuclear y el cinetoplástico, este último equivalente al genoma mitocondrial de los mamíferos (García-Almagro, 2005).

- Promastigote: Es la forma infectante que se encuentra en el tubo digestivo del insecto vector, presenta cuerpo fusiforme que mide entre 10 y 20 μm de longitud, es extracelular y cuenta con un flagelo para su movimiento dentro del vector (Figura 1.5).
- Amastigote: Forma intracelular presente en el hospedero vertebrado, parasita a las células del sistema fagocítico mononuclear, generalmente los macrófagos. Visto al microscopio presenta forma redonda u oval de aproximadamente 2-6 μm de diámetro y carente de flagelo, en su interior se puede observar el núcleo y el cinetoplasto (Figura 1.5) (Corpas, 2015).

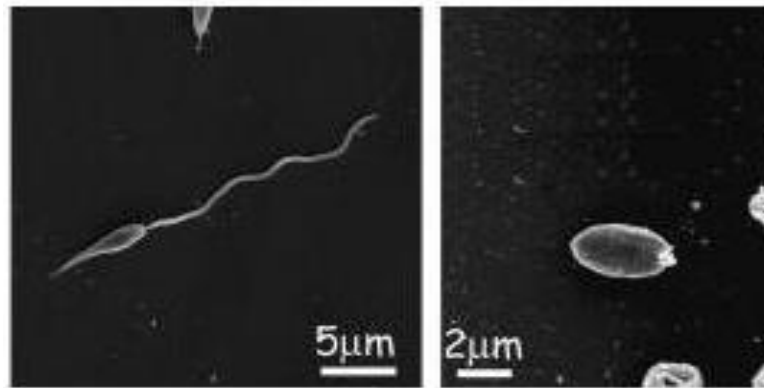


Figura 1.5 Imágenes de microscopía electrónica de barrido donde se observa la forma promastigote (izquierda) y amastigote (derecha) de *Leishmania* (Basteiro, 2007).

1.4.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de la leishmania inicia cuando el vector ingiere sangre de un hospedero infectado adquiriendo los parásitos en forma de amastigote; después de unos días (6-9 días, aproximadamente), éstos se transforman hasta convertirse en su forma infectante (promastigote metacíclico). Una vez en su forma promastigote, se replican en el intestino y se dirigen a la faringe y esófago del insecto, cuando éste pica a un nuevo hospedero, transfiere entre 10 y 100 parásitos, los parásitos son incorporados en vacuolas parasitóforas que se fusionan con lisosomas para formar fagolisosomas y en el interior se transforman en amastigotes, en un período de 12-24 h, aproximadamente, multiplicándose por fisión binaria. Los macrófagos infectados sufren una lisis liberando a los parásitos que a su vez colonizarán células adyacentes multiplicándose de nuevo (Grill y Zurmendi, 2017; McGwire y Satoskar, 2013). Los parásitos pueden persistir en el hospedero afectado y esto puede tener una duración de meses hasta años, incluso toda la vida sin presentar síntomas clínicos, dependiendo de la susceptibilidad del hospedero y de la respuesta de su sistema inmunológico (Sharma y Singh, 2008). El ciclo continúa cuando el insecto se alimenta nuevamente de sangre de un vertebrado infectado (Figura 1.5) (Hide *et al.*, 2007).

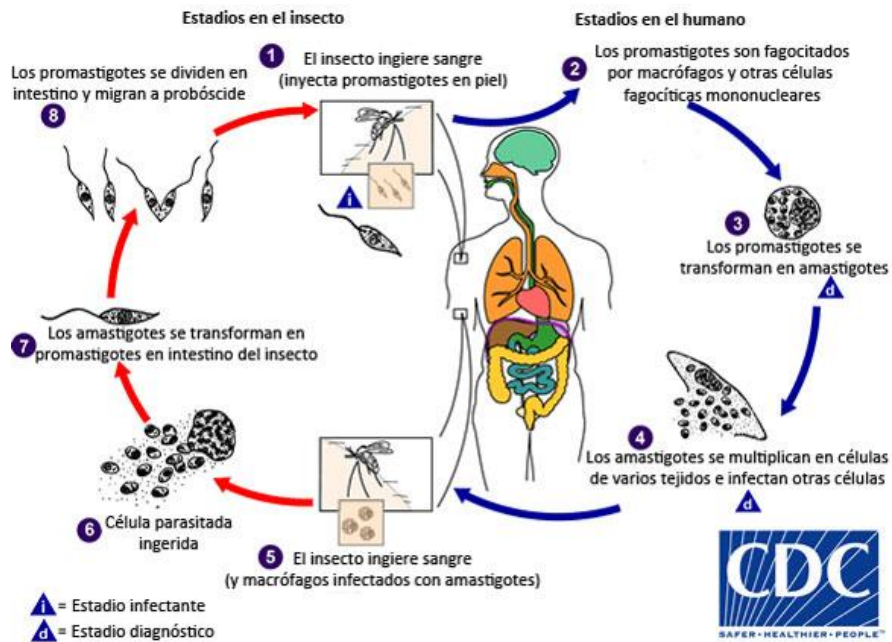


Figura 1.6 Ciclo de vida de *Leishmania* (CDC, 2016).

1.5 Reservorios

Berzunza-Cruz *et al.* (2015) definen a un reservorio como aquel organismo que garantiza la existencia del agente etiológico y facilita su transmisión. Generalmente, existen cinco criterios para definir un reservorio.

- 1) Superposición entre la distribución geográfica y temporal de los vectores y los hospederos.
- 2) Supervivencia del hospedero el tiempo suficiente para permitir la transmisión.
- 3) Una prevalencia de la infección que supere el 20%, pudiendo haber variabilidad dependiendo de la temporada (en el caso de *Leishmania*).
- 4) Disponibilidad de los parásitos en la piel o en la sangre en cantidades suficientes para ser infecciosos para el vector.

- 5) Y la especie que infecta a los humanos debería ser la misma que se encuentra presente en el reservorio (OMS, 2019).

Los hospederos reservorios de los parásitos de *Leishmania* son mamíferos salvajes y domésticos. De acuerdo con la OMS (2019), hay dos categorías en las que se clasifica esta enfermedad y dependiendo de la fuente de infección, ésta puede ser zoonótica (cuando el reservorio hospedador es algún animal) y antroponótica (cuando los reservorios son los humanos).

En la península de Yucatán los reservorios reportados para la leishmaniosis cutánea localizada son *Otodylomys phyllotis* y los roedores endémicos *Heteromys gaumeri* y *Peromyscus yucatanicus* (Andrade-Narváez, 2017).

1.6 Respuesta inmune ante una infección por *Leishmania*

La interacción entre el parásito *Leishmania* y el sistema inmune es muy compleja y varía dependiendo de la especie y las características del hospedero. En la defensa del hospedero participan múltiples componentes de respuesta inmune innata y adaptativa, principalmente a través de una respuesta tipo celular. Sin embargo, el parásito ha desarrollado múltiples estrategias de evasión, como son la inhibición de la función de los macrófagos y la alteración de las vías de señalización intracelular. Los macrófagos son las principales células involucradas en la eliminación del parásito, pero también las principales células hospedadoras (Ríos y Sousa, 2010).

El sistema inmune empieza a actuar desde el momento de la picadura del insecto, cuando introduce las piezas bucales lacerando los vasos sanguíneos de la unión dermoepidérmica provocando el sangrado. En ese momento el sistema inmune innato interviene activando una respuesta inflamatoria provocando la migración de diferentes células fagocíticas (macrófagos y células de Langerhans) hacia el sitio de la lesión con el fin de reparar el tejido dañado (Ríos y Sousa, 2010; Kamhawi, 2000). Macrófagos y células de Langerhans actúan como presentadoras de antígenos a los linfocitos T, necesarios para iniciar la modulación

de la respuesta inmune tipo celular, mediada por linfocitos T CD4+, la cual juega un papel esencial en la defensa contra *Leishmania* (Ríos y Sousa, 2010).

El conocimiento de la respuesta inmune relacionada con la infección causada por *Leishmania* se ha desarrollado fundamentalmente a partir de modelos experimentales. Los experimentos en ratones han permitido documentar dos subpoblaciones de linfocitos T colaboradores que producen citocinas que pueden favorecer o no la resolución de la enfermedad diferenciándose en dos tipos de respuesta inmune, la Th1 y la Th2 (Figura 1.7) (García, 2004).

La resolución de la infección es mediada por citocinas de tipo Th1, como interleucina 12 (IL-12), interferón gamma (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que inducen la producción de óxido nítrico (ON) en las células fagocíticas, especialmente en los macrófagos. Los macrófagos tienen la capacidad de eliminar a los patógenos intracelulares por medio de diferentes mecanismos que incluyen la respuesta oxidativa. Las citocinas involucradas en la respuesta inmunológica tipo Th1 participan en la activación de macrófagos para aumentar su capacidad microbicida (Vidal-Cagigas, 2003).

La IL-12 es importante ya que se encarga de activar la producción de INF- γ que a su vez activa la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) en los macrófagos, enzima necesaria para la conversión de arginina en citrulina y responsable de la producción de óxido nítrico (ON). El ON junto con otros radicales superóxidos elimina los amastigotes intracelulares (Awasthi, 2004).

Por el contrario, la progresión o exacerbación de la infección por leishmania, se relaciona con la activación de citocinas tipo Th2, como las interleucinas 4 y 10 (IL-4, IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que regulan la producción de IgE por los linfocitos B que participan en la activación de reacciones de hipersensibilidad inmediata (Hernández-Ruiz y Becker, 2006; García, 2004).

La IL-4 es una de las citocinas características de la respuesta tipo Th2, suprime los genes para la producción de TNF- α , alterando las funciones inmunorreguladoras y efectoras del

macrófago e impidiendo la eliminación del parásito. Por su parte IL-10 es capaz de bloquear la proliferación de células mononucleares estimuladas con *Leishmania* y de activar a la enzima L-arginasa que favorece la replicación descontrolada del parásito en los macrófagos, ocasionando la progresión de la enfermedad. Se ha reportado que IL-4 e IL-10 contribuyen a la progresión de la leishmaniosis tanto en modelos murinos como en humanos (Milena-Lenis, 1998).

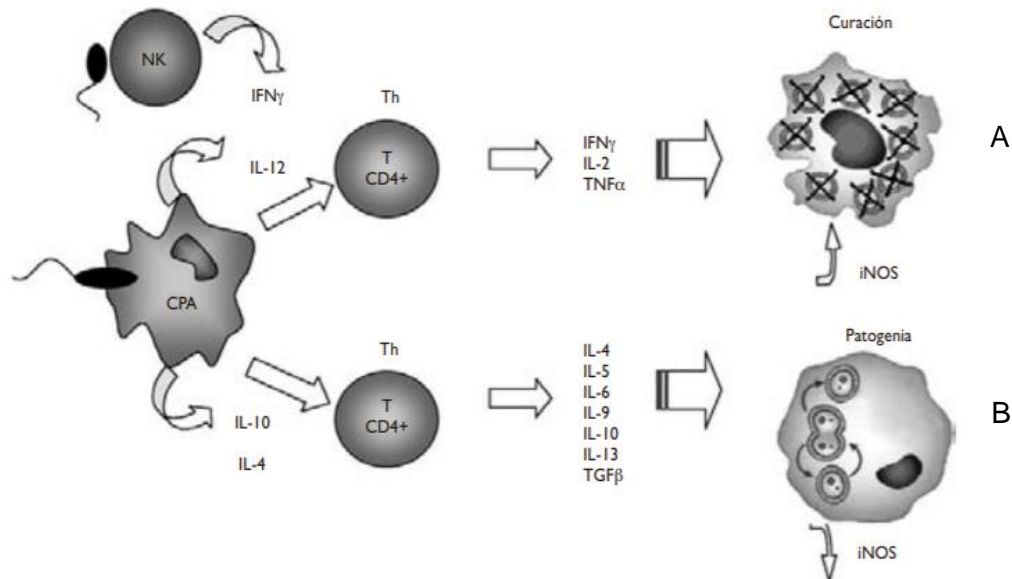


Figura 1.7 Tipos de respuesta inmune ante una infección por *Leishmania*. A) Respuesta tipo Th1; B) Respuesta tipo Th2 (Hernández-Ruíz y Becker, 2006).

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el control de la infección por *Leishmania*, requiere de una respuesta de tipo Th1, por lo que para su tratamiento se ha sugerido combinar medicamentos que actúen directamente, eliminando al parásito con moléculas

estimuladoras del sistema inmunológico y capaces de dirigir la respuesta hacia la subpoblación de células Th1; ayudando así a los macrófagos a la eliminación del parásito.

1.7 Tratamientos

Actualmente y desde su introducción en 1945, los medicamentos de primera línea para el tratamiento de la leishmaniosis han sido los antimoniales pentavalentes, el estibogluconato de sodio comercializado como Pentostam® y el antimoniato de meglumina comercializado como Glucantime®, con una eficacia de 70 a 92%. Desafortunadamente, además de que el tratamiento es caro, doloroso y largo, presentan efectos secundarios adversos tales como mialgia, pancreatitis, insuficiencia renal, neuropatía y cardiotoxicidad (Arboleda *et al.*, 2019). Así mismo, se han probado otros fármacos para uso en segunda línea como anfotericina B y pentamidina, con una eficacia mayor a 90% y entre 35 y 96%, respectivamente (Bezerra *et al.*, 2015). También se han probado preparados tópicos como la paramomicina, usada en forma de ungüento que contiene 15% de paramomicina y 12% de cloruro de metilbencetonio en parafina blanca suave, sin embargo, su eficacia es menor alcanzando el 16.6% en leishmaniosis del Nuevo Mundo y 80% en el Viejo Mundo (Figura 1.8) (Pearson, 2017).

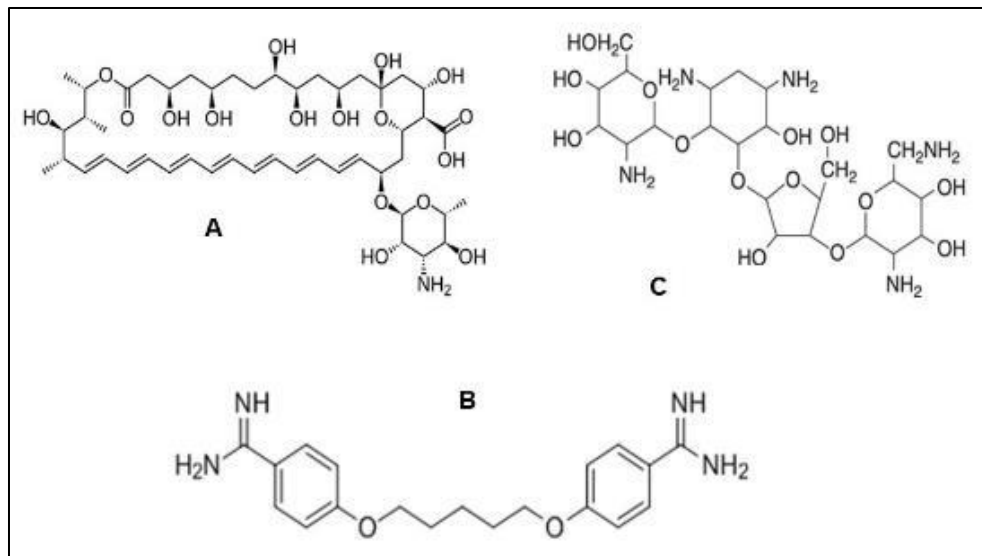


Figura 1.8 Estructura química de (A) anfotericina, (B) pentamidina y (C) paromomicina.

Los antimoniales pentavalentes son derivados de antimonio y su función es inhibir la glucólisis y la beta-oxidación de los ácidos grasos en el metabolismo del parásito, lo que ocasiona una reducción en la generación de ATP y GTP (Castro *et al.*, 2003). Se distribuyen a altas concentraciones en plasma, hígado y bazo; la vida media está estimada en 8 h para adultos y 5 h en niños, con una rápida absorción. La eliminación se da a través de la orina en un periodo de 24-76 h después de su administración (Organización Panamericana de la Salud, 2013).

Otro medicamento usado es la anfotericina B, cuyo mecanismo de acción se da mediante su unión a esteroides y ésteres de colesterol de la membrana celular del parásito, formando poros o canales que ocasionan alteraciones en la permeabilidad, y pérdida de potasio, aminoácidos y purinas. Su administración es por vía intravenosa en dextrosa al 5%, a una dosis de 0.7-10 mg/Kg al día en aproximadamente 42 sesiones. Los efectos secundarios que produce son fiebre, escalofríos, cefalea, náuseas, vómitos, malestar general,

convulsiones, pérdida de potasio y magnesio, así como anemia, entre otros (OPS, 2013; Castro *et al.*, 2003).

Otro medicamento por demás peligroso es la pentamidina, una diamidina aromática con actividad antiparasitaria, actúa inhibiendo la S-adenosilmetionina descarboxilasa, interactúa con el ácido desoxirribonucleico (ADN) del cinetoplasto inhibiendo la topoisomerasa II e interfiere con la glicólisis. Su administración es por vía intramuscular a una dosis de 3-4 mg/Kg en días alternos administrado en 3 o 4 sesiones. Este compuesto es utilizado en los casos que no responden a otros medicamentos y como complemento de la quimioterapia local. Presenta importantes reacciones adversas, que incluyen pancreatitis (que puede inducir diabetes), nefrotoxicidad, alteraciones cardíacas y mialgias, entre otras (Pérez, 2016; OPS, 2013).

De igual manera, la paramomicina es un antibiótico que pertenece a los aminoglucósidos. Se han desarrollado diversas formulaciones de administración tópica, el mecanismo de acción se basa en su capacidad para acumularse en los fagolisosomas, donde el parásito se multiplica. Está indicada principalmente en infecciones por *L. major* con lesiones únicas y pequeñas sin desarrollo linfocutáneo. Sin embargo, en el caso de la leishmaniosis del Nuevo Mundo la paramomicina resultó ser menos eficaz que la terapia parenteral con antimoniales pentavalentes (Pérez, 2016).

En México, el único tratamiento aprobado es la quimioterapia con el antimonio de meglumina (Glucantime®); la disolución contiene 81 mg/mL de antimonio y la aplicación es parenteral, lo que puede resultar muy doloroso. Desafortunadamente, este tratamiento ocasiona efectos secundarios severos (dolores de cabeza, dificultad para respirar, erupción cutánea, edema facial, pancreatitis, leucopenia y anemia), afectando la calidad de vida de las personas. Por lo tanto, es de gran importancia encontrar nuevas alternativas terapéuticas que sean capaces de actuar eficientemente contra la leishmaniosis, que sean inocuas al administrarse a mamíferos y que no sean tan costosas (Jiménez *et al.*, 2012).

1.8 Alternativas para el tratamiento de la infección por *Leishmania*

Habiendo demostrado que los actuales medicamentos contra las leishmaniosis presentan serios problemas para los pacientes, y que se requiere una alternativa menos tóxica, se encontró que una de las principales fuentes de nuevos agentes leishmanicidas son los metabolitos secundarios obtenidos de productos naturales. Los productos naturales tienen un papel importante en la terapéutica actual; de 1981 a 2006 se desarrollaron 1,184 fármacos de origen natural y de éstos el 28% fueron obtenidos de plantas. Por otra parte, el 24% de los fármacos sintéticos nuevos son derivados de metabolitos con actividad biológica obtenidos de plantas medicinales (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2014).

Las plantas medicinales constituyen una importante fuente de productos biológicamente activos como son proteínas, enzimas, aceites, minerales y metabolitos secundarios como alcaloides, quinonas, terpenoides, flavonoides, carotenoides, esteroides, glucósidos fenólicos simples, taninos, saponinas, etc. Estos han servido como modelos para la síntesis y obtención de gran cantidad de fármacos, propiciando importantes avances en la terapéutica de varias enfermedades (Rodríguez, 2015). Por otra parte, las plantas medicinales representan aproximadamente el 25% del total de las prescripciones médicas en países industrializados, mientras que en los países en desarrollo representan el 80% del arsenal terapéutico (Corpas, 2015; Sharapin, 2000).

En México, un 10% de las 30,000 especies de plantas conocidas se emplean comúnmente en la medicina tradicional y una gran parte de esas especies son utilizadas para el tratamiento de infecciones protozoarias incluidas las leishmaniosis (Sharapin, 2000). La obtención de extractos de plantas y metabolitos obtenidos de ellas es una estrategia que se ha realizado con éxito. En los últimos años se han realizado numerosos estudios que ponen de manifiesto la actividad leishmanicida de distintas especies vegetales (Gutiérrez-Rebolledo, 2017; Corpas, 2015). Por otra parte, Peraza-Sánchez *et al.* (2007) prepararon extractos de metanol de diferentes partes de 18 plantas de la península de Yucatán y se evaluaron en ensayos *in vitro* para determinar la actividad leishmanicida contra promastigotes de *L. mexicana*. Los extractos de plantas más potentes con un IC₅₀ menor a

60 µg/mL fueron *Aphelandra scabra*, *Byrsonima bucidaefolia*, *Byrsonima crassifolia*, *Clusia flava*, *Cupania dentata*, *Diphysa carthagenensis*, *Dorstenia contrajerva*, *Milleria quinqueflora*, *Vitex gaumeri* y *Tridax procumbens*. Existen otros reportes de plantas con actividad leishmanicida como *Pentalinon andrieuxii*, *Kopsia griffithi*, *Calophyllum brasiliense*, *Pastacia khinjuk* y *Allium sativum* (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1 Plantas medicinales con actividad leishmanicida *in vitro*.

Nombre científico	Familia	Parte empleada	IC ₅₀ contra promastigotes (µg/mL)	Referencia
<i>A. sativum</i>	Amaryllidaceae	Bulbo	37	Khademvatan <i>et al.</i> , 2011
<i>T. procumbens</i>	Asteraceae	Planta completa	3	Peraza-Sánchez <i>et al.</i> , 2007
<i>C. dentata</i>	Fagaceae	Corteza	13	
<i>B. crassifolia</i>	Malpighiaceae	Corteza	14	
<i>A. scabra</i>	Acanthaceae	Hojas Planta completa	15	
<i>D. contrajerva</i>	Moraceae	completa	23	
<i>C. flava</i>	Guttiferae	Hojas	32	
<i>D. carthagenensis</i>	Fabaceae	Hojas	35	
<i>B. bucidaefolia</i>	Malpighiaceae	Corteza	60	
<i>C. brasiliense</i>	Calophyllaceae	Savia y hojas	3	Tiuman <i>et al.</i> , 2012
<i>K. griffithi</i>	Apocynaceae	Hojas y corteza	6.25	Gutierrez-Rebolledo <i>et al.</i> , 2017
<i>P. australis</i>	Apocynaceae	Corteza	12	
<i>P. andrieuxii</i>	Apocynaceae	Raíz	43.04	Lezama <i>et al.</i> , 2014
<i>P. khinjuk</i>	Anacardiaceae	Frutos	58.6	Ezatzpour <i>et al.</i> , 2015

Entre las plantas más prometedoras de acuerdo con los estudios realizados se encuentra *Tridax procumbens*, una planta herbácea que es usada en la medicina tradicional maya para tratar la leishmaniosis cutánea (Cáceres *et al.*, 1998) y *A. sativum* (ajo) reportada con efecto inmunomodulador, capaz de inducir una respuesta de tipo Th1, aumentando las concentraciones de INF- γ y la producción de ON en macrófagos, impidiendo el avance de la infección (Gamboa-León *et al.*, 2007; Ghazanfari *et al.*, 2006).

1.8.1 *Tridax procumbens*

Tridax procumbens L. es una planta medicinal perteneciente a la familia Asteraceae, es conocida como hierba del toro en Guatemala y *ta'ulum* o *bakenbox* (lengua maya) en la península de Yucatán. Es una planta herbácea perenne de 15 a 40 cm de altura, una especie de maleza que se ha introducido ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, a menudo enraíza en los nudos, en ocasiones desarrolla una base leñosa y los tallos a veces son simples (Jiménez-Arellanes, 2014). La planta tiene discos de flores blancas o amarillas liguladas, de tres dientes. Sus hojas son dentadas y generalmente en forma de punta de flecha. Tiene un fruto duro cubierto de pelitos con plumas (Figura 1.9) (Pérez Cruz, 2017).



Figura 1.9 Imagen de la planta *T. procumbens*.

A esta especie medicinal se le reporta un gran número de propiedades terapéuticas. Se le ha comprobado acción antialérgica, antigripal, febrífuga y se le atribuyen otras propiedades como antiinflamatoria, antibacteriana, antiviral, antiespasmódica, antianémica, hepatoprotectora, antihemorrágica, cicatrizante, analgésica, antidiabética, inmunomoduladora y antiprotozoaria, capaz de curar heridas. Estas propiedades se deben a una gran cantidad de metabolitos secundarios como los alcaloides, carotenoides, saponinas, flavonoides, taninos, entre otros (Beck *et al.*, 2018; Pérez *et al.*, 2017).

En la medicina tradicional maya, se ha utilizado como tratamiento tópico para la “úlceras del chiclero”. También en Guatemala toda la planta es usada para tratar varias infecciones protozoarias como la malaria, vaginitis y leishmaniosis (Cáceres *et al.*, 1998).

A partir del uso tradicional que se le da a *T. procumbens* se han realizado numerosos estudios para evaluar su potencial actividad leishmanicida. Peraza-Sánchez *et al.* (2007), durante un estudio realizado para la evaluación *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana*, encontraron que el extracto de *T. procumbens* (planta completa) era idóneo como posible droga leishmanicida con un IC₅₀ de 3.0 µg/mL.

En un estudio realizado por Martín-Quintal *et al.* (2009) se aisló un compuesto que fue identificado y sometido a un bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes de *Leishmania* que resultó activo contra el parásito; así mismo, se evaluó la citotoxicidad de tal compuesto, el cual fue identificado como (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina), un aceite amarillo con fórmula molecular C₁₇H₂₂O, el cual presentó actividad leishmanicida. En otro estudio realizado por el mismo grupo de investigadores (Martín-Quintal *et al.*, 2010) se reportó que el extracto metanólico de *T. procumbens* y la oxilipina inhibieron el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana*, mostrando un CI₅₀ igual a 3.0 y 0.478 µg/mL, respectivamente, además, la oxilipina pura resultó ser activa contra los amastigotes de *L. mexicana*.

1.8.2 Oxilipina

Las oxilipinas constituyen una familia de metabolitos secundarios con diversas estructuras y actividades biológicas, son originadas mediante la oxidación de ácidos grasos, comúnmente los ácidos linoleico y linolénico, mediante la acción de dos enzimas con actividad dioxigenasa y lipoxigenasa (Figura 1.10) (Conde, 2012).

Estos metabolitos se pueden encontrar en animales, plantas, algas, bacterias y hongos, actúan en rutas de señalización relacionadas con diversas respuestas a factores ambientales y patológicos, así mismo presentan actividades biológicas importantes en animales superiores y humanos (Zubia-Mendoza *et al.*, 2013).

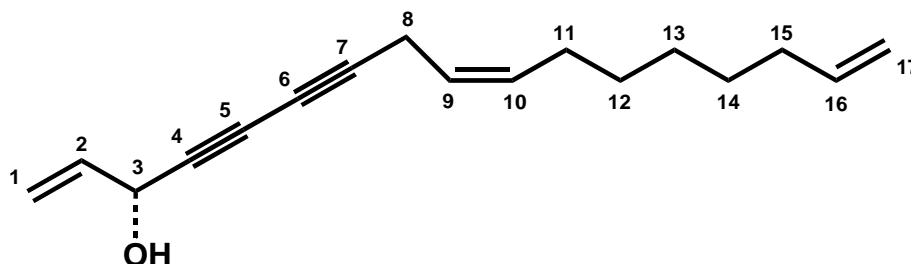


Figura 1.10 Estructura química de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol aislada de *T. procumbens*

El compuesto (3S)-16,17- dideshidrofalcarinol (Figura 1.10) fue aislado por Novelo-Castilla (2005) de la planta *T. procumbens* y se ha investigado su efecto contra *L. mexicana*, que mostró una actividad significativa *in vitro* contra los promastigotes y amastigotes con un IC₅₀ de 0.55 μ M y 0.48 μ M, respectivamente. Su efecto de inhibición sobre los amastigotes no fue debido a la activación de óxido nítrico (NO) en macrófagos estimulados con INF- γ , puesto que su producción disminuyó en presencia de oxilipina; esto representa un avance

importante en la búsqueda de nuevos agentes leishmanicidas a partir de productos naturales (Martín-Quintal *et al.*, 2010).

En el bioensayo *in vitro* contra *L. mexicana*, la oxilipina mostró una excelente actividad leishmanicida ($IC_{50} = 0.478 \mu\text{g/mL}$), siendo dos veces más efectiva que la anfotericina B ($IC_{50} = 1.0 \mu\text{g/mL}$). Además, no presentó citotoxicidad *in vitro* contra células cancerígenas humanas y normales; el extracto metanólico tuvo un efecto dañino en los amastigotes de *L. mexicana* mediante un mecanismo de acción independiente de la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos, sugiriendo que es tóxico al parásito (Martín-Quintal *et al.*, 2010).

1.8.3 *Allium sativum* (ajo)

Allium sativum L. es una especie de origen euroasiático, de la familia Amaryllidaceae, cultivada en gran parte del mundo. Es una planta herbácea con bulbos divididos y envueltos en una piel blancuzca. Hojas aplanadas de 2 a 3 cm de ancho. Inflorescencia en escapo de unos 50 cm y flores rosadas con ovario oblongo-ovoideo. Se ha usado como planta tradicional para tratar afecciones cutáneas, prurito, candidiasis, dolor de muela, parásitos intestinales, entre otros (Figura 1.11) (García-González *et al.*, 2014).



Figura 1.11 Imagen de la planta *A. sativum* (Farmacopea Caribeña, 2014).

Muchos autores han descrito el amplio número de propiedades terapéuticas del ajo que incluyen actividad antioxidante, hipoglicemiante, antiagregante y fibrinolítica, antihipertensiva, anticancerosa, antimicrobiana, antifúngica e inmunomoduladora. Por todas estas propiedades, se han realizado diversos estudios para evaluar los efectos de *A. sativum* sobre la infección por *Leishmania*. Ghazanfari *et al.* (2000) reportaron que la terapia con un extracto de ajo acuoso fresco aplicada en ratones controló de manera significativa la infección ocasionada por *L. major* y además intensificó el efecto del Glucantime®; este efecto terapéutico fue asociado con un fuerte cambio en la producción de citocinas Th2 hacia Th1. Así mismo, Gamboa-León *et al.* (2007) evaluaron el efecto del ajo mediante inyecciones intraperitoneales en ratones infectados con *L. mexicana*, encontrando que el extracto acuoso de ajo seco controló la infección al estimular directa o indirectamente el reclutamiento de células T y la producción de IFN- γ , lo que condujo a la producción de ON y la disminución de la carga parasitaria. Además, se ha reportado que el ajoeno, compuesto aislado del ajo, tiene un efecto inhibitorio significativo sobre varias especies de *Leishmania in vitro* (Ledezma *et al.*, 2002).

Con base en lo anterior, *A. sativum* es otra especie prometedora en el tratamiento de la infección causada por *L. mexicana*, debido a su capacidad de inducir una respuesta Th1 y aumentar la producción de IFN- γ y ON en macrófagos infectados, impidiendo que la infección progrese (Gamboa-León *et al.*, 2007).

Asimismo, Gamboa-León *et al.* (2014) reportaron que el extracto metanólico de *T. procumbens* mezclado con el extracto acuoso de *A. sativum* redujo de manera significativa las lesiones cutáneas provocadas por *L. mexicana* en ratones BALB/c. Lo que sugiere que la aplicación simultánea de ambos extractos tiene un efecto terapéutico más eficiente.

1.9 Formulaciones

Una formulación es una mezcla de ingredientes no activos, los cuales conforman el excipiente o vehículo de administración y el principio activo (sustancia que posee actividad biológica). La preparación de una formulación puede ser a partir de sustancias activas

obtenidas por vía sintética o a través de productos naturales. Existen diversos tipos de formulaciones como las líquidas (gotas), jarabes, disoluciones o suspensiones hasta preparaciones semisólidas para uso externo como cremas, lociones, pomadas, etc. (Lopes de Almeida, 2000).

Para este trabajo se busca evaluar la efectividad de una formulación tópica contra la leishmaniosis. Una formulación tópica es un preparado farmacéutico muy heterogéneo caracterizado por su viscosidad y consistencia semisólida, destinada para su aplicación en la piel o ciertas mucosas para ejercer una acción local o permitir que penetren los principios activos que contienen. Está constituida por una base denominada vehículo o excipiente en la que son diluidos los principios activos (López-García *et al.*, 2015).

Hay diferentes tipos de formulaciones tópicas, diferenciándose básicamente por el contenido de agua, de forma que un ungüento no contiene nada de agua, una pomada contiene agua, pero en menor cantidad que una crema, la cual posee generalmente más de un 50% de agua (López-García *et al.*, 2015).

Para la forma farmacéutica de un producto fitoterapéutico, de acuerdo con Lopes de Almeida (2000) se debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- La forma debe ser aceptable para el paciente.
- La forma debe ser química y físicamente estable.
- El producto debe ser correctamente envasado.
- El producto debe estar exento de contaminación microbiana.
- El producto debe ser capaz de proporcionar una dosis correcta de la droga.
- El producto debe ser terapéuticamente eficaz.
- El proceso debe ser económico para la fabricación a gran escala.

Por otra parte, la formulación de formas farmacéuticas para productos fitoterapéuticos debe obedecer a las buenas prácticas de fabricación (BPF o GMP = Good Manufacturing Practices).

Muchas de las formulaciones, fitofármacos y fármacos en general primero deben pasar una serie de pruebas de efectividad y baja toxicidad, para lo cual se ha usado ampliamente el modelo murino (Benavides y Gounet, 2000).

1.10 Modelo murino, cepa BALB/c

Los modelos murinos ayudan a la comprensión de la patogénesis de muchas enfermedades y desarrollo de terapias y tratamientos alternativos, por lo tanto, un animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Para el desarrollo de un nuevo medicamento, las pruebas en animales son parte importante ya que con ello se determina la seguridad y eficacia en humanos (Benavides y Gounet, 2000).

El uso de ratones presenta ciertas ventajas sobre otros animales experimentales pues tienen un ciclo reproductivo corto, tamaño de camadas grandes, además que son animales pequeños, manejables, resistentes y bien caracterizados en cuanto a su biología (Rodríguez, 2007).

Además, los ratones de la cepa BALB/c se han usado ampliamente para estudios de toxicología, farmacología y en pruebas de seguridad. Para el estudio de leishmaniosis, representan una herramienta valiosa, ya que permiten estudiar los distintos mecanismos relacionados con la enfermedad y son capaces de reflejar rasgos clínicos e histopatológicos similares a los que se producen en la infección humana, además de ser susceptibles a la infección por *Leishmania* (Falú *et al.*, 2007).

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen enfermedades tropicales de importancia nacional y mundial que son causadas por microorganismos y ocasionan el 25% de las muertes a nivel mundial. Entre las enfermedades más importantes se encuentran las leishmaniosis, causadas por uno de los parásitos protozoos más agresivos. Los tratamientos actuales para todas las formas de leishmaniosis están basados en la quimioterapia con antimoniales pentavalentes de administración parenteral con efectos secundarios graves, por lo que aún distan de ser idóneos. Por esta razón, en los últimos años se han tratado de buscar alternativas probando numerosos medicamentos indicados en segunda línea. Sin embargo, ninguno ha demostrado ser lo suficientemente bueno, puesto que presentan diversos problemas como la toxicidad, el alto costo y/o la resistencia de los parásitos. Por lo tanto, son deseables nuevas estrategias terapéuticas contra las leishmaniosis que resulten menos dolorosas y más eficientes contra la enfermedad. En este trabajo se propone elaborar una formulación tópica para la leishmaniosis cutánea localizada (LCL) compuesta de productos naturales, que se espera ofrezca ventajas en comparación con el tratamiento convencional, con una administración más factible, con menos reacciones adversas y una atractiva relación costo-beneficio si se considera que la LCL ocurre en regiones con muy escasa asistencia médica.

Por todo lo anterior, se propuso evaluar una formulación tópica con la fracción hexánica de *T. procumbens*, el metabolito activo (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina) y el extracto acuoso de *A. sativum* en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* con el fin de desarrollar un fitomedicamento útil contra la LCL.

HIPÓTESIS

Las formulaciones tópicas elaboradas con la fracción hexánica de la planta *T. procumbens*, el metabolito activo (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol y el extracto acuoso de *A. sativum* eliminarán la infección causada por *Leishmania mexicana* en ratones BALB/c.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad de formulaciones tópicas elaboradas con la fracción hexánica de *T. procumbens* (raíz), el metabolito activo (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina) y el extracto acuoso de *A. sativum* en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la dosis terapéutica de las formulaciones tópicas elaboradas con la fracción hexánica proveniente del extracto metanólico de *T. procumbens*, el metabolito activo (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina) y el extracto acuoso de *A. sativum* en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.
2. Evaluar la efectividad de las formulaciones tópicas sobre la lesión cutánea y la reducción de la carga parasitaria en los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.
3. Determinar los cambios histológicos asociados a la administración de las formulaciones tópicas en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.
4. Evaluar la respuesta inmune asociada a la administración de las diferentes formulaciones en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*, mediante el análisis de expresión de INF- γ e IL-10.

DIAGRAMA DE FLUJO

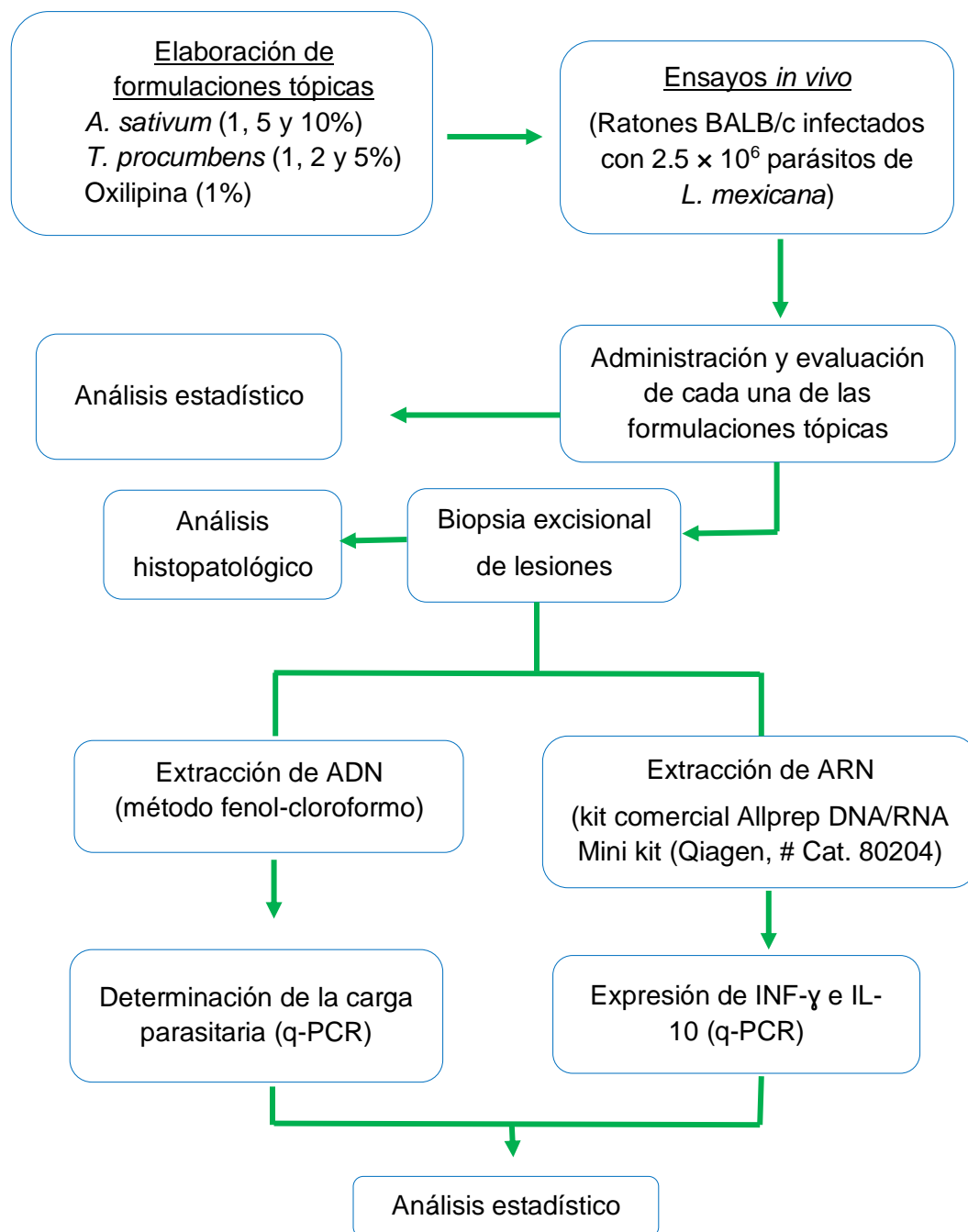


Figura 1.12 Estrategia experimental.

CAPÍTULO II

DETERMINACIÓN DE DOSIS TERAPÉUTICA Y EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LAS FORMULACIONES TÓPICAS EN EL DESARROLLO DE LAS LESIONES CUTÁNEAS OCASIONADAS POR *L. mexicana* EN RATONES BALB/c

2.1 INTRODUCCIÓN

Los ensayos *in vivo* con animales de laboratorio son de gran utilidad, ya que con ellos se puede evaluar cómo se comportan varias enfermedades que afectan a los humanos y a lo largo del tiempo han sido una valiosa herramienta, ya que han permitido la extrapolación de los resultados a la especie humana (Vallenas *et al.*, 2013).

En el caso de la leishmaniosis cutánea los modelos murinos son los más utilizados, especialmente la cepa de ratones BALB/c, ya que se ha demostrado que son susceptibles a la enfermedad. Inoculando en ellos las especies de parásitos que afectan a los humanos, nos permite entender mejor el desarrollo de la enfermedad, así como la posible evaluación y efectividad de posibles nuevos fármacos, los cuales requieren de diversos procesos y etapas para demostrar la actividad biológica de las sustancias empleadas (Neira *et al.*, 2019; Marovac, 2001). Durante la etapa de estudios preclínicos se establece la dosis terapéutica, la cual produce el efecto deseado en el paciente y se encuentra entre la dosis mínima (la menor dosis que produce el efecto terapéutico) y la dosis máxima (mayor dosis que puede ser tolerada sin aparición de efectos adversos o tóxicos). Los límites de dosis terapéutica están dados por la dosis máxima y la dosis mínima e indican el margen de utilización del principio activo (Farmacopea, 2013; Aristil, 2013).

Por otra parte, diversos reportes científicos plantean que las vías de administración más empleadas para los tratamientos de leishmaniosis son parenterales (intramuscular, intravenosa, intralesional) (McGwire y Satoskar, 2014). Los tratamientos parenterales presentan una serie de ventajas, como el efecto farmacológico muy rápido debido a la elevada biodisponibilidad, la obtención de la concentración deseada con exactitud debido al acceso del principio activo a la

circulación sistémica; no obstante, también presentan desventajas, como los efectos secundarios adversos, la aplicación prolongada que resulta dolorosa y además se requiere personal médico capacitado para la aplicación, lo que muchas veces ocasiona el abandono del tratamiento por parte del paciente (Moreno, 2012; Aristil, 2013).

Por lo anterior, los tratamientos tópicos para la leishmaniosis son una alternativa terapéutica con un gran potencial de eficiencia, teniendo la ventaja de ser más prácticos y seguros que las otras opciones de tratamiento, por su fácil administración, menor costo y por presentar baja o nula toxicidad y, sobre todo, no se requiere personal médico para su aplicación (Neira *et al.*, 2019).

Por todo lo anterior, en este estudio se evaluaron formulaciones tópicas con el extracto acuoso de *A. sativum*, la fracción hexánica de *T. procumbens*, y el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol como tratamiento alternativo en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Extractos de *A. sativum*, *T. procumbens* y compuesto activo oxilipina

Los extractos y compuesto activo evaluados en este trabajo (extracto acuoso de *A. sativum* deshidratado a 100°C, fracción hexánica proveniente del extracto metanólico de *T. procumbens* y (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol) fueron obtenidos en el Laboratorio de Química de Productos Naturales, Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán. El extracto de *T. procumbens* y el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol fueron obtenidos de acuerdo con el método descrito por Martín-Quintal *et al.* (2009). El extracto acuoso liofilizado de *A. sativum* fue obtenido de acuerdo con lo descrito previamente por Gamboa-León *et al.* (2007).

2.2.2 Animales experimentales

Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Unidad Biomédica, UADY. Para ello se utilizaron 50 ratones de la cepa BALB/c, hembras sanas de 6 a 8 semanas de edad, comprados al

proveedor Círculo ADN (Ciudad de México). Los animales fueron separados al azar en grupos de 5 ratones por jaula, teniendo un total de 9 grupos, los cuales fueron alojados en un cubículo del bioterio con ciclos de luz/oscuridad de 12 h a 24 ± 1 °C, alimentados con alimento especial para roedor y agua *ad libitum*.

Los animales fueron manejados y tratados de acuerdo con los lineamientos establecidos en la Norma Mexicana para el uso de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana-062-ZOO-1999) y a los lineamientos del comité de bioética del CIR-UADY, quién aprobó la realización de los experimentos en animales aquí descritos (clave de identificación: CEI-003-2018).

2.2.3 Cultivo de parásitos

Se emplearon parásitos de *L. mexicana* de la cepa Hd18 (MHET/MX/97/Hd18) provenientes de una lesión localizada en el miembro posterior de un hámster infectado con la finalidad de asegurar la virulencia de la cepa.

Tras un cultivo de 14 días, los parásitos en fase estacionaria se tomaron y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) centrifugando a las mismas condiciones. Al término de los lavados, los parásitos se contaron en cámara de Neubauer y se ajustaron a 2.5×10^6 células en 40 μ L de medio RPMI para la posterior inoculación en los roedores.

2.2.4 Inoculación de ratones BALB/c con promastigotes de *L. mexicana*

Para establecer la infección experimental, los roedores se inocularon intradérmicamente en la parte superior y lateral del miembro posterior derecho, entre la articulación coxofemoral y la articulación de la rodilla con 2.5×10^6 promastigotes de *L. mexicana* de la cepa Hd18 utilizando una jeringa de insulina de 0.5 mL con aguja 30G \times 13 mm BD ultra-fine.

Una vez realizada la inoculación, se llevó a cabo un seguimiento clínico semanal para verificar estado de salud general de los animales, el cual consistió en control de peso, alimentación,

observación de la forma de las heces, verificación del pelaje (piloerección), interacción entre los individuos y registro del tamaño de la lesión. Se consideró como lesión el borde indurado y la úlcera. El diámetro de las lesiones se midió semanalmente a partir de una fotografía digital introducida en el Software de medición ImageJ.

2.2.5 Determinación del tamaño de las lesiones

Para determinar el tamaño de las lesiones se tomaron en cuenta dos mediciones, el tamaño de la úlcera y el tamaño de los bordes indurados. Se le tomó una fotografía a cada lesión una vez por semana durante 5 semanas, esto con el fin de analizar su evolución y comparar sus tamaños antes, durante y al final del tratamiento aplicado.

Las medidas se generaron a partir de una fotografía digital, por lo que, para tener una medida más exacta, se utilizó como referencia una etiqueta de tamaño conocido (13 mm x 9 mm), la cual se le colocó al ratón cerca de la lesión al momento de tomar la fotografía (Figura 2.1).



Figura 2.1 Fotografía de una lesión de un ratón BALB/c infectado con *L. mexicana* en el cual se puede observar una etiqueta que es usada como referencia de medida para obtener el tamaño de úlcera y borde indurado.

Posteriormente, esta imagen se cargó en el software de medición ImageJ y se procedió a medir, tanto el tamaño de úlcera como el de los bordes indurados según se indica a continuación.

1. Se indicó en el software la medida conocida de la etiqueta (13 mm de largo × 9 mm de ancho).
2. Se midió el diámetro de mayor tamaño de la úlcera (D) y posteriormente el diámetro de menor tamaño (d) (Figuras 2.2 A y B).
3. Se midió el diámetro de mayor tamaño del borde indurado y posteriormente el diámetro de menor tamaño (Figuras 2.2 C y D).
4. Se aplica la fórmula $S = (D + d)/2$ para obtener el tamaño promedio en mm de cada una de las partes que componen la lesión (úlcera y bordes indurados).

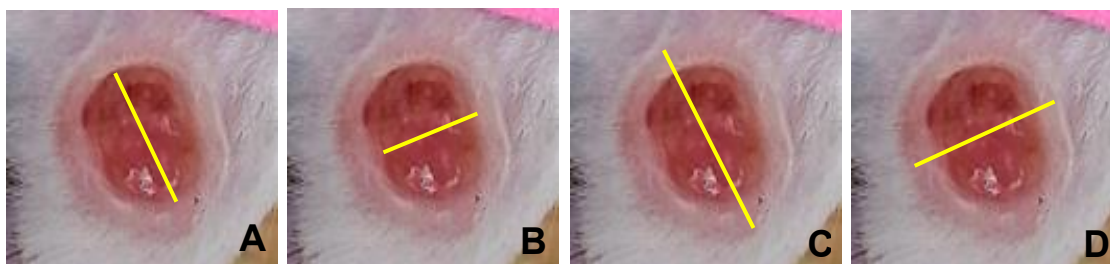


Figura 2.2 Secuencia para determinar el tamaño de úlcera y bordes indurados de una lesión ocasionada por *L. mexicana* en ratones BALB/c. (A) diámetro mayor de úlcera; (B) diámetro menor de úlcera; (C) diámetro mayor de borde indurado; (D) diámetro menor de borde indurado.

2.2.6 Evaluación de los extractos vía tópica

Se elaboró la crema a base de alcoholes esteáricos, vaselina líquida, aceites minerales y cera de abeja, posteriormente se agregaron el extracto de *A. sativum* al 1, 5 y 10%, la fracción hexánica de *T. procumbens* al 1, 2 y 5% y el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol al 1% (Anexo 1).

Los tratamientos iniciaron a partir de la semana 6 posterior a la inoculación, para lo cual los ratones fueron divididos en los siguientes grupos:

- Grupo 1.** Control negativo (sólo se administró el excipiente en crema).
- Grupo 2.** Tratamiento al 1% del extracto de *A. sativum*.
- Grupo 3.** Tratamiento al 5% del extracto de *A. sativum*.
- Grupo 4.** Tratamiento al 10% del extracto de *A. sativum*.
- Grupo 5.** Tratamiento al 1% con la fracción hexánica de *T. procumbens*.
- Grupo 6.** Tratamiento al 2% con la fracción hexánica de *T. procumbens*.
- Grupo 7.** Tratamiento al 5% con la fracción hexánica de *T. procumbens*.
- Grupo 8.** Tratamiento al 1% con el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol.
- Grupo 9.** Control positivo. Tratamiento con Glucantime® vía intramuscular (20 mg/Kg).

Como procedimiento estándar, las lesiones fueron cubiertas con 20 mg de la formulación una vez al día durante 14 días.

2.2.7 Análisis estadístico

Los datos se presentan como las medias \pm desviación estándar. Para el análisis estadístico sobre el tamaño de las lesiones se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar si los datos se ajustaban a una distribución normal. La significación estadística se determinó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación de Dunnett a través del software GraphPad Prism Versión 5. El valor p menor a 5% fue considerado estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

2.3 RESULTADOS

Las lesiones aparecieron paulatinamente a partir de la semana 4 posterior a la inoculación, alcanzando un tamaño medible (3-4 mm) de úlcera el cual se consideró para el inicio del tratamiento a partir de la semana 6 posterior a la inoculación (Schwartz *et al.*, 2014; Sifontes-Rodríguez *et al.*, 2015). Las lesiones en los ratones fueron muy semejantes a las que se observan

en pacientes humanos, que se presenta como una única lesión, ulcerada, de bordes indurados y fondo limpio (Figura 2.3) (Andrade-Narváez *et al.*, 2001).

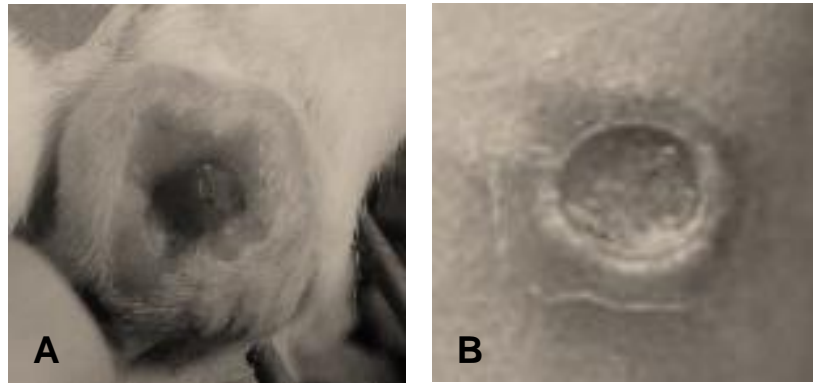


Figura 2.3 (A) Lesión cutánea causada por *L. mexicana* en ratón BALB/c y (B) úlcera observada en paciente con LCL. Ambas úlceras corresponden a la típica lesión de LCL causada por esta especie.

El tamaño de las lesiones en todos los grupos fue medido antes de iniciar el tratamiento (día 0) y a los días 7 (semana 1), 14 (semana 2, fin del tratamiento), 21 (semana 3), 28 (semana 4) y 35 (semana 5). Se realizó el análisis estadístico comparando todos los grupos en los diferentes tiempos, observando diferencias estadísticamente significativas a partir de la semana 4 de seguimiento. Se consideró como cura clínica cuando se observó una resolución completa de las úlceras teniendo una reepitelización de los tejidos.

Se observaron diferencias significativas en el tamaño de las úlceras, y, por el contrario, en el grosor de los bordes no se encontró alguna diferencia estadísticamente significativa. Por lo tanto, los datos presentados se centran en los tamaños de las úlceras.

En el grupo 1 (control negativo) la úlcera aumentó desde la primera semana de aplicación del excipiente, demostrando que no tuvo efecto en la resolución de las lesiones causadas por *L. mexicana*. El tamaño promedio de las úlceras aumentó de 2.77 ± 0.78 mm en la semana 0 hasta

7.79 ± 2.2 mm en la semana 5 de observación, representando un aumento de 64.4% (Figura 2.4).

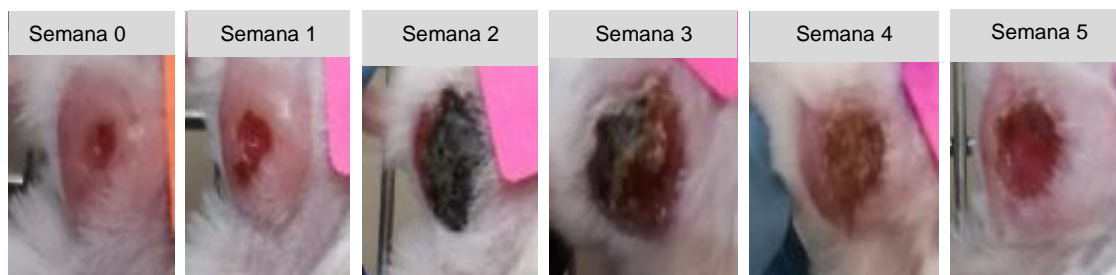


Figura 2.4 Evolución de la lesión ocasionada por *L. mexicana* en ratón BALB/c tratado con el excipiente en crema desde la semana 0 hasta la semana 5 de seguimiento (grupo 1, control negativo).

El grupo 9 de ratones (tratados con Glucantime®), al igual que el grupo 1 tratado con el excipiente, mostró una tendencia de aumento en el tamaño de las úlceras a partir de la semana 3 de seguimiento. Se pudo observar una tendencia de reducción en el tamaño de úlceras, sin embargo, a partir de la semana 4 se observó un aumento en el tamaño de las mismas. Por lo anterior, se considera que el tratamiento con Glucantime® no resultó efectivo para lograr la cura clínica en los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* (Figura 2.5).



Figura 2.5 Evolución a partir de la semana 0 de tratamiento y hasta la semana 5 de seguimiento de una úlcera de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana*, tratado con Glucantime® (grupo 9).

2.3.1 Determinación de dosis terapéutica y efecto del tratamiento tópico con el extracto acuoso de *Allium sativum* sobre la infección con *L. mexicana*

Al tratar las lesiones con el extracto acuoso liofilizado de *A. sativum* al 1% y 10% se observó la disminución significativa en el tamaño de las lesiones, además de la resolución completa de la úlcera (cura clínica) en el 60% y 40% de los roedores, respectivamente. Dicha disminución resultó ser estadísticamente significativa hasta dos semanas después de concluir con el tratamiento ($p < 0.01$) (Figura 2.6).

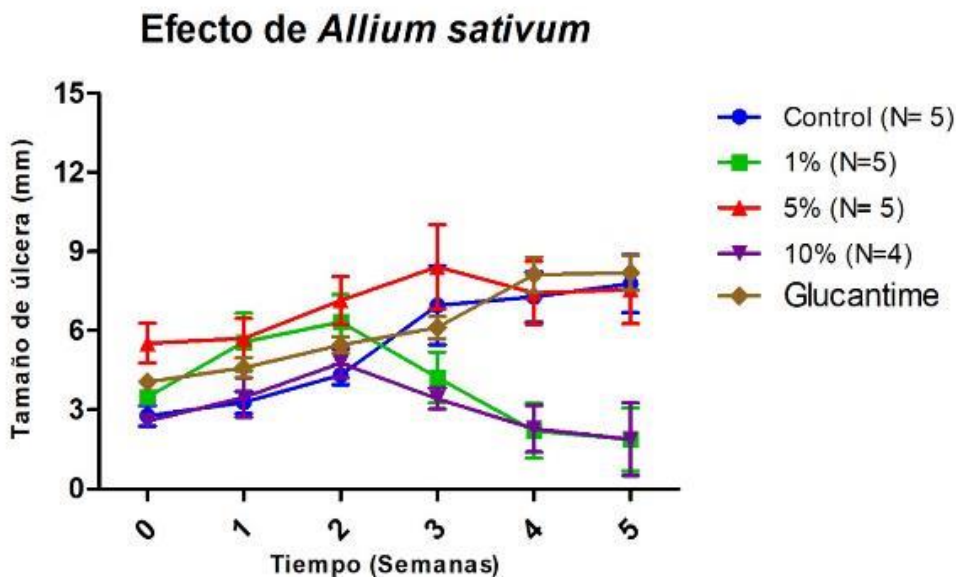


Figura 2.6 Evolución de la lesión ocasionada por *L. mexicana* en ratones BALB/c tratados con 1, 5 y 10% del extracto acuoso liofilizado de *A. sativum*. Antes, durante y después del tratamiento.

Después de la administración de la formulación al 1% de *A. sativum* se observó la completa resolución de las úlceras en tres de los cinco ratones tratados (60%), mostrando una reducción en el tamaño de la úlcera una semana después de terminar la aplicación del tratamiento. En la

segunda semana de tratamiento se formó una costra que parecía aumentar el tamaño de las lesiones, sin embargo, a la semana siguiente ésta se desprendió, observándose una notoria disminución en el tamaño de las úlceras; este fue un patrón común en todos los ratones tratados con la formulación al 1% (grupo 2). Sin embargo, a medida que la úlcera fue disminuyendo, el tamaño de los bordes tuvo un aumento entre 6.9 y 49.6%. Sólo en uno de los cinco ratones (20%) se observó una reducción del 100 y 50.12% en el tamaño de la úlcera y los bordes, respectivamente (Figura 2.7).



Figura 2.7 Evolución de una lesión de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana* y tratado con la formulación de *A. sativum* al 1% desde el día 0 hasta la semana 5 de seguimiento (grupo 2).

En el grupo 3 se observó que el tratamiento con la formulación al 5% de *A. sativum*, provocó una evolución desfavorable de las lesiones, ya que en lugar de reducir el tamaño éste aumentó entre 22 y 47% desde la primera semana de tratamiento y hasta la última semana de seguimiento (Figura 2.8). Sólo un ratón (20%) tuvo una reducción en la úlcera de 51.67% de la semana 0 de tratamiento hasta la 5 de seguimiento.

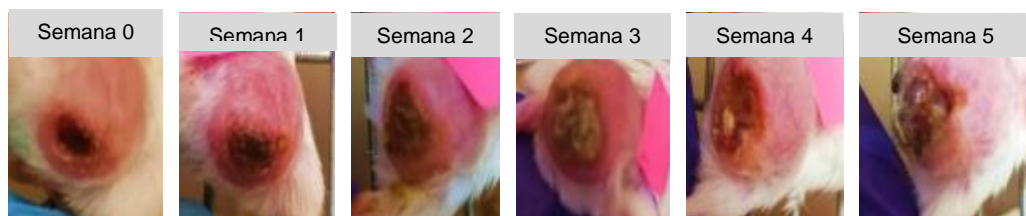


Figura 2.8 Evolución de una lesión de ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con una formulación de *A. sativum* al 5% desde el día 0 hasta la semana 5 de seguimiento (grupo 3).

El grupo de ratones al cual se le aplicó el tratamiento con *A. sativum* al 10% (grupo 4) tuvo una evolución positiva, semejante al grupo tratado con el 1%, puesto que el tamaño de las úlceras disminuyó durante el tratamiento. Posteriormente se formó la costra y, al caerse el tamaño de la úlcera había disminuido. En la Figura 2.9 se puede observar la evolución de una lesión desde el día 0 de tratamiento hasta la semana 5 de seguimiento posterior al inicio del tratamiento. El 40% de los ratones logró una cicatrización en el sitio de las úlceras entre las semanas 3 y 5 de seguimiento posterior al inicio del tratamiento, manteniendo el tamaño de los bordes, mientras que el 20% tuvo una reducción de la úlcera en un 35.89% y el otro 20% mostró un aumento de 59.15%. Uno de los ratones presentó una necrosis aguda severa, por lo que fue necesario practicarle eutanasia por razones humanitarias antes de finalizar el experimento.



Figura 2.9 Evolución durante 5 semanas de seguimiento de una lesión de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana*, tratado con una formulación de *A. sativum* al 10%.

2.3.2 Efecto del tratamiento tópico con la fracción hexánica de *Tridax procumbens*

En los ratones tratados con la fracción hexánica de *T. procumbens* al 2 y 5% se observó una reducción en el tamaño de las úlceras. Esta disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el grupo tratado con la formulación al 5% respecto al grupo control en la última semana de seguimiento.

En la Figura 2.10 se observa la evolución de las lesiones desde el día 0 de tratamiento hasta la semana 5 de seguimiento entre el grupo control y los grupos de ratones tratados con la formulación que contiene la fracción hexánica de *T. procumbens* al 1, 2 y 5%.

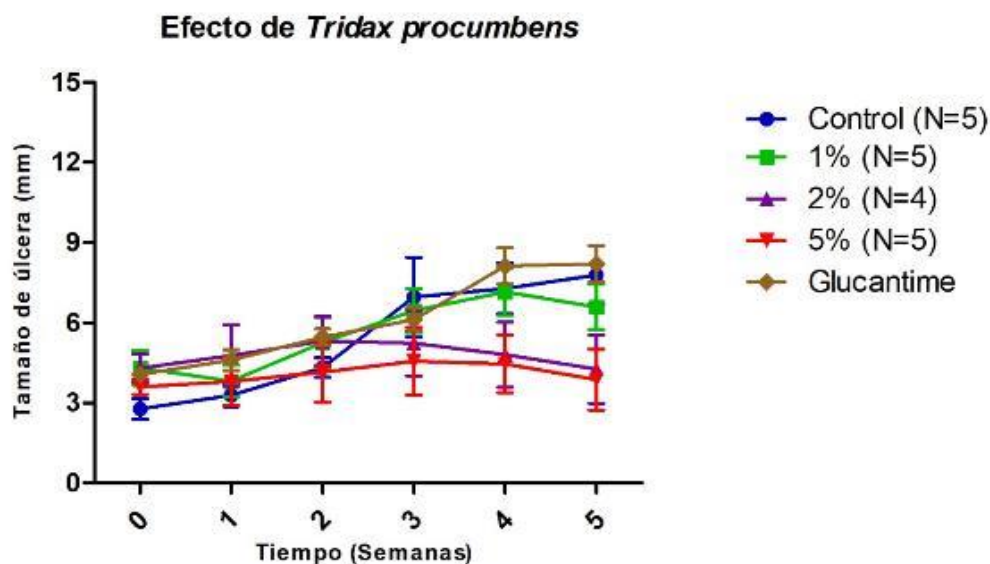


Figura 2.10 Evolución de la lesión ocasionada por *L. mexicana* en ratones BALB/c tratados con 1, 2 y 5% de la fracción hexánica de *T. procumbens*.

En la Figura 2.11 se puede observar que la formulación de la fracción hexánica de *T. procumbens* al 1% no resultó activa, ya que en el 100% de los ratones las lesiones aumentaron de tamaño, entre 0.52% hasta 67.44%.



Figura 2.11 Evolución de una úlcera tratada con el 1% de la fracción hexánica de *Tridax procumbens* en un ratón BALB/c infectado con *L. mexicana* desde la semana 0 de tratamiento hasta la semana 5 de seguimiento.

En el caso del tratamiento aplicado al 2%, en dos de los cinco ratones (40%) se observó una reducción en el tamaño de las úlceras de entre el 35.49% y el 50.36%, mientras que en el otro 60% se dio un aumento de tamaño de 16.42% hasta 37.23% (Figura 2.12).

En la Figura 2.12A se observa la evolución favorable de la úlcera de un ratón del grupo tratado con la fracción hexánica de *T. procumbens* al 2%, y, en contraste, en la Figura 2.12B se puede observar una tendencia hacia el aumento del tamaño de la úlcera a la cual se le aplicó el mismo tratamiento.



Figura 2.12 Evolución de úlceras de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y tratados con el 2% de la fracción hexánica de *T. procumbens*. A) Reducción del tamaño de úlcera. B) Aumentó del tamaño de úlcera.

Por otra parte, en uno de los ratones tratados (20%) con la formulación de *T. procumbens* al 5% la úlcera cerró por completo en la semana 5 posterior al inicio del tratamiento (Figura 2.13).



Figura 2.13 Evolución de úlcera de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana* y tratado con el 5% de la fracción hexánica de *T. procumbens*.

En otro ratón (20%) se observó una reducción de 26.36% en la semana 5 posterior al inicio del tratamiento. En tanto que en tres ratones (60%) se observó una tendencia de aumento en el tamaño de la úlcera desde 15.61% hasta 53.04% (Figura 2.14).

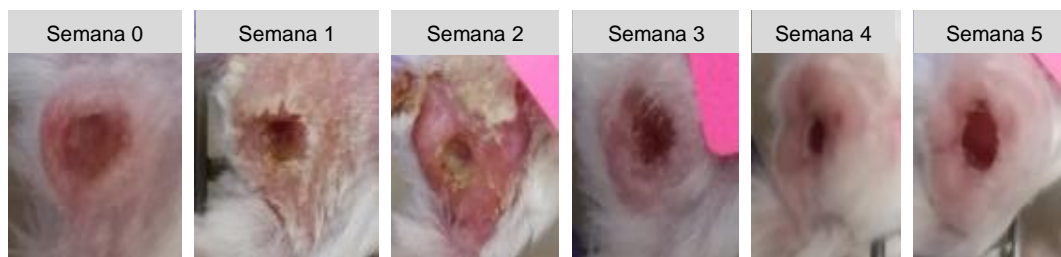


Figura 2.14 Evolución a partir de la semana 0 de tratamiento y hasta la semana 5 de seguimiento de una lesión de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana*, tratado con el 5% de la fracción hexánica de *T. procumbens*.

2.3.3 Efecto del tratamiento tópico con el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina)

En la evaluación visual, el 100% de los ratones tratados con la formulación de oxilipina al 1% (grupo 8) mostraron una evolución desfavorable al observarse lesiones que en lugar de reducir el tamaño aumentaron entre 11 y 32% desde la primera semana de tratamiento y hasta la última de seguimiento (Figuras 2.15).



Figura 2.15 Evolución de la lesión desde la semana 0 de tratamiento y hasta la semana 5 de seguimiento de una úlcera de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana*, tratado con el 1% de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina).

El análisis estadístico arrojó que el grupo tratado con oxilipina al 1% presentó una diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de las lesiones en la semana 5 de seguimiento comparado con el grupo control. En la Figura 2.16 se observa que no hay una exacerbación en el tamaño de las lesiones entre la semana 0 y 5 de seguimiento a comparación de los grupos 1 y 9 (tratamiento con excipiente y Glucantime, respectivamente).

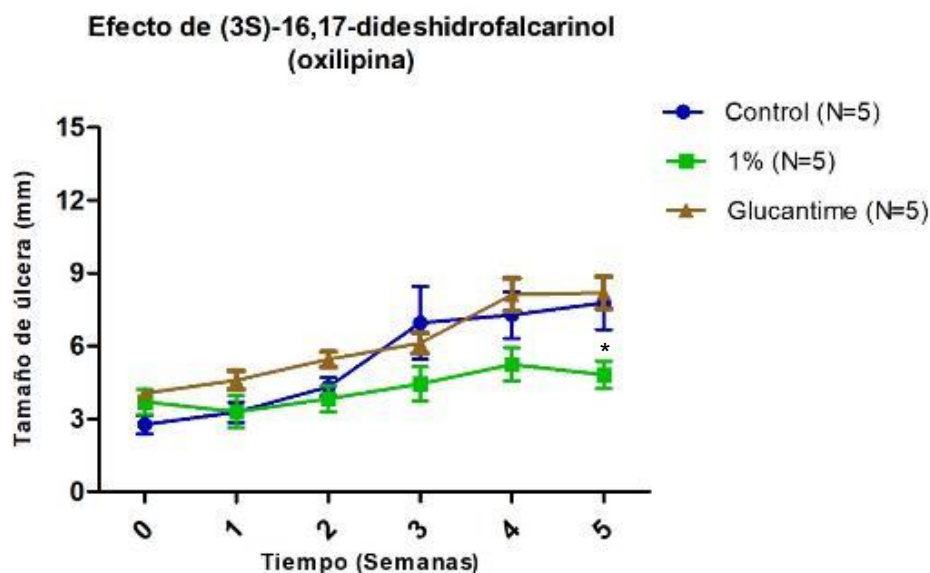


Figura 2.16 Evolución de las úlceras de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*, tratados con el compuesto puro (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol.

2.4 DISCUSIÓN

Las lesiones empezaron a aparecer paulatinamente en los ratones a partir de la semana 4 posterior a la inoculación, alcanzando un tamaño de úlcera de 4 mm para dar inicio al tratamiento a partir de la semana 6 posterior a la inoculación. Sin embargo, no todas las lesiones aparecieron al mismo tiempo, algunas tomaron alrededor de 11 a 12 semanas para que alcanzara un diámetro aproximado de 4 mm, similar a lo reportado por Schwartz *et al.* (2014). En el trabajo de

investigación de Schwartz *et al.* (2014), de todos los roedores infectados con *Leishmania*, algunos habían desarrollado un tamaño de lesión medible entre la sexta y octava semanas, mientras que en otros las lesiones tardaron entre 9 y 12 semanas en alcanzar un diámetro medio de 5 mm, iniciando los tratamientos en tiempos diferentes, al igual que sucedió en el presente trabajo. Estas diferencias en el tiempo podrían deberse a que, a pesar de ser una cepa singénica, cada uno de los individuos reacciona de manera diferente, es decir, su sistema inmune responde de manera distinta.

Se observó que los tratamientos con el extracto acuoso de *A. sativum* al 1 y 10% en el presente estudio resultaron efectivos al obtener una reducción estadísticamente significativa en comparación con el grupo control ($p < 0.01$). Estos datos equivalen a lo reportado previamente por Gamboa-León *et al.* (2007), donde se demostró la reducción de las lesiones en el cojinete plantar de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y tratados con el extracto de *A. sativum* por vía intraperitoneal a una dosis de 20 mg/Kg de peso. En otro estudio realizado también por Gamboa-León *et al.* (2014), ratones CD-1 fueron infectados con *L. mexicana* y tratados con el extracto acuoso de *A. sativum* por vía intraperitoneal y se observó una tendencia a reducir el desarrollo de las lesiones sin diferencia estadísticamente significativa. De manera diferente, en el presente estudio, se observó una reducción significativa del tamaño de la úlcera con la administración tópica de *A. sativum* al 1 y 10%, lográndose la cura clínica en el 60 y 40% de los animales, respectivamente.

Las diferencias en el efecto de *A. sativum* sobre la resolución de las lesiones cutáneas causadas por *L. mexicana* podrían deberse a las diferencias en el sitio de inoculación, cantidad de parásitos y la cepa de ratón que se empleó en cada uno de los experimentos, así como a la vía de administración. En este trabajo se usó la vía de administración directamente sobre la lesión cutánea, debido a que las formulaciones tópicas son las preferidas para la curación de heridas dérmicas, puesto que se absorben bien localmente para producir una acción farmacodinámica eficaz (Yaduvanshi *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos con la formulación al 1% de *A. sativum* se consideran positivos, considerando que el tamaño de las úlceras tenía un tamaño de 4 mm de diámetro antes de los tratamientos y se logró la cicatrización y reepitelización en el 60% de los roedores tratados.

Como se observó en los experimentos de este estudio, al aplicar el extracto acuoso de *A. sativum* por vía tópica se obtienen resultados positivos relacionados con la cura clínica de los tejidos dañados. No obstante, en la actualidad, la mayoría de los estudios reportados en la literatura que evalúan este extracto para tratamientos de leishmaniosis son por vía parenteral y evaluados sobre la hinchazón del cojinete plantar (Gamboa-León *et al.*, 2014; Ghazanfari *et al.*, 2006). En cambio, en el presente estudio se evaluó su efecto sobre las úlceras cutáneas, que fueron muy semejantes a las que se observan en los pacientes y la vía de administración fue tópica, factores a los cuales pudiera atribuirse la diferencia encontrada entre los resultados positivos de este estudio comparados con los anteriores.

Por su parte, *T. procumbens* logró una reducción significativa en el tamaño de las úlceras con los tratamientos al 2 y 5% respecto al grupo control ($p < 0.05$), mientras que el tratamiento con el 1% se observó una tendencia de aumentó en su tamaño. La actividad leishmanicida del extracto de *T. procumbens* se ha demostrado previamente tanto *in vitro* como *in vivo*. Martín-Quintal *et al.* (2009) reportan que el extracto metanólico tiene una actividad leishmanicida *in vitro* contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, puesto que los valores de concentración inhibitoria mínima (IC₅₀), fue de 3.0 µg/mL. Teniendo en cuenta lo antes mencionado, se realizó un estudio *in vivo* en ratones CD-1, inoculados con 1×10^6 parásitos de *L. mexicana* en el cojinete plantar y fueron tratados vía intraperitoneal con 20 mg/Kg al día del extracto de *T. procumbens*, donde se observó una tendencia de reducción en el desarrollo de las lesiones cutáneas, pero sin diferencia estadísticamente significativa (Gamboa-León *et al.*, 2014), a diferencia del presente estudio en el que la reducción significativa del tamaño de úlcera se observó con los tratamientos de *T. procumbens* al 2 y 5%, y con este último al menos un roedor logró resolver la úlcera.

La diferencia del efecto de *T. procumbens* sobre las lesiones cutáneas causadas por *L. mexicana* se puede atribuir a la vía de administración y el tipo de lesión. En el estudio previo realizado por Gamboa-León *et al.* (2014), el efecto de dicho extracto fue sobre la hinchazón del cojinete plantar

vía intraperitoneal, mientras que en el presente estudio se evaluó su efecto vía tópica sobre las úlceras cutáneas similares a las que se producen en los humanos. La reducción del tamaño de las úlceras y la cicatrización en un roedor pudieran estar relacionadas con lo reportado por Yaduvanshi *et al.* (2011), donde se evaluó vía tópica el jugo de hojas de *T. procumbens* sobre heridas dérmicas de ratones albinos suizos y se observó la estimulación de síntesis de colágeno, proliferación de fibroblastos, neovascularización y reepitelización de la zona dañada, procesos que son necesarios para la curación de una herida. Al aplicar vía tópica el extracto de *T. procumbens* se observan resultados positivos en cuanto a la reducción y cicatrización de lesiones dérmicas. Hasta el momento, este es el primer estudio que evalúa el efecto de la administración tópica del extracto de *T. procumbens* en lesiones causadas por *L. mexicana* y como lo demuestra nuestro estudio tiene cierta eficacia al aplicarlo mediante esta vía. Además, en los estudios realizados por Martín-Quintal *et al.* (2010) se demostró que la fracción hexánica de *T. procumbens* proveniente del extracto metanólico no presenta citotoxicidad para las células de mamíferos, por lo que podría ser una buena alternativa de tratamiento tópico para la LCL.

La actividad biológica de *T. procumbens* es causada principalmente por una oxilipina, especialmente abundante en la fracción hexánica, llamada (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol. Al evaluar esta molécula a una concentración de 1% en la formulación, se pudo observar que no se logró una reducción de las lesiones en ninguno de los roedores, pero tampoco se observó una exacerbación en el tamaño de las úlceras y los bordes, si se compara con el grupo control. Este efecto podría deberse a que el compuesto ha presentado una buena actividad leishmanicida *in vitro*, como lo demuestra el estudio realizado por Martín-Quintal *et al.* (2010), donde se reporta que no presenta actividad citotóxica contra células normales y su IC₅₀ es de 0.478 µg/mL, siendo dos veces más efectivo que la anfotericina B que presenta un IC₅₀ de 1.0 µg/mL. Por otra parte, en un estudio *in vivo* donde se evaluó el compuesto vía oral, no se observó reducción significativa en el tamaño de las lesiones, pero al administrarlo a una dosis de 40 mg/Kg se observó que en uno de los roedores logró resolver la úlcera, lo que sugiere que podría tener un efecto farmacológico sobre la LCL (Ferrer-Lino, 2021). Con base en lo anterior, es necesario realizar más estudios que evalúen el compuesto en concentraciones diferentes para confirmar su actividad leishmanicida.

El antimonio de meglumina (Glucantime®) fue usado como control positivo (grupo 9), pues se trata del fármaco recomendado como tratamiento de primera línea para cualquier tipo de leishmaniosis (OMS, 2019). Sin embargo, en el modelo murino no mostró diferencias estadísticamente significativas en la reducción del tamaño de las lesiones en comparación con el grupo 1 (control negativo), esto mismo ha sido reportado por Cos *et al.* (2018). En un estudio previo se utilizó como control positivo un tratamiento tópico con miltefosina, que resultó efectivo en los ratones tratados logrando la cura clínica (Vera *et al.*, 2018). Por lo anterior, se debe considerar en futuros experimentos utilizar un tratamiento efectivo en roedores, ya que se ha reportado que el Glucantime® no es un tratamiento eficaz en modelos murinos infectados con *Leishmania* spp. (Nilforoushzadeh *et al.*, 2008). No obstante, la respuesta farmacológica en humanos tiene una efectividad del 100% logrando la cura clínica en todos los pacientes tratados (Vargas-González *et al.*, 1999).

Los fármacos que se utilizan actualmente para el tratamiento de la LCL son tóxicos, requieren administración parenteral, lo que muchas veces conduce a un cumplimiento deficiente del paciente (OMS, 2019). Los tratamientos aplicados en el presente estudio son a base de productos naturales aislados de plantas y de aplicación tópica, de más fácil administración y no es necesaria la intervención de un profesional para la aplicación, presentando una gran ventaja sobre los tratamientos actuales.

Los productos naturales han arrojado resultados más favorecedores, por lo que, pueden ser una alternativa de tratamiento en las infecciones causadas por *Leishmania*, a diferencia de los tratamientos tópicos con ketoconazol, paramomicina, pentamidina, anfotericina y miltefosina, que no han sido efectivos, ya que en lugar de reducir las lesiones éstas aumentan con la aplicación del tratamiento, o bien, logran alguna disminución, pero tienen importantes efectos secundarios (Vera *et al.*, 2018).

Con los hallazgos del presente estudio se demuestra que el extracto acuoso de *A. sativum* al 1% y la fracción hexánica de *T. procumbens* al 2%, así como el compuesto aislado de *T. procumbens* (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina) al 1%, aplicados por vía tópica, pueden ser una alternativa para el tratamiento de la LCL ocasionada por *L. mexicana*.

CAPITULO III

ANÁLISIS DE LA CARGA PARASITARIA ASOCIADA A LA ADMINISTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS POR VÍA TÓPICA

3.1 INTRODUCCIÓN

La carga parasitaria es de gran importancia para la cuantificación de patógenos. Es determinada a través de métodos cuantitativos como la q-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real). La técnica de PCR es utilizada para amplificar segmentos del ADN del cinetoplasto (kNDA) de *Leishmania*, siendo altamente específica. El empleo de la q-PCR en los estudios parasitológicos ha permitido un análisis cuantitativo más sensible que las técnicas parasitológicas convencionales como la cuantificación del parásito en cultivo o por histopatología, así como con las pruebas serológicas (Molina *et al.*, 2013).

La cuantificación de la carga parasitaria es una herramienta que permite conocer la respuesta al tratamiento, optimizarlo y además ensayar nuevas alternativas terapéuticas (Méndez-Bejarano, 2014). Esta técnica se ha aplicado con éxito en estudios experimentales en ratones para detectar ADN del cinetoplasto de *Leishmania* con una alta sensibilidad (100%) y rapidez (Nicolas, 2002).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Extracción de ADN

Después del seguimiento clínico y la evaluación del desarrollo de las lesiones, se practicó la eutanasia a los ratones mediante una sobredosis de isoflurano. Se realizó una biopsia excisional de la lesión, la cual fue dividida en tres partes iguales que incluían tanto borde como úlcera, una de ellas se utilizó para realizar la extracción de ADN por el método fenol-cloroformo (Anexo 2).

Se cuantificó el ADN en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) aplicando un microlitro de muestra para obtener la concentración y pureza. Las muestras se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para cuantificar la carga parasitaria.

3.2.2 Determinación de la carga parasitaria

Para la cuantificación de la carga parasitaria, el ADN (20 ng) fue amplificado usando SYBR Select Master Mix (# Cat 4472897, Applied Biosystems) e iniciadores específicos que amplifican una región de 120 pb del ADN del cinetoplasto del género *Leishmania* (Cuadro 3.1). La cuantificación se llevó a cabo mediante la generación de una curva estándar realizada a partir de ADN extraído de un cultivo de parásitos de la cepa de referencia Hd18 (MHET/MX/97/Hd18) de *L. mexicana*. Los parásitos se cultivaron en medio M199 suplementado con suero fetal bovino al 10% durante un período aproximado de 7-15 días a 23 °C. Después de este tiempo, los promastigotes en fase estacionaria fueron obtenidos mediante centrifugación, lavados con medio RPMI y ajustados a una concentración de 5×10^7 parásitos/mL. El ADN obtenido se diluyó con TE hasta obtener la cantidad de ADN correspondiente a 1×10^6 parásitos para la realización de la curva estándar. A partir de ésta, se realizaron diluciones seriadas (1:10) en TE hasta obtener la cantidad de ADN correspondiente a 0.1 parásitos por reacción.

Cuadro 3.1 Secuencias de iniciadores utilizados para determinación de la carga parasitaria.

Primer	Secuencia	Tamaño del fragmento
JW11	5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3'	120 pb
JW12	5'-GGGTAGGGGGCGTTCTGCGAA-3'	

Las condiciones de PCR se optimizaron a una concentración final de los iniciadores de 10 μ M y la amplificación se llevó a cabo por triplicado en un volumen final de 10 μ L (Cuadro 3.2), bajo las siguientes condiciones de reacción: 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 67 °C por 1 min. Para descartar la presencia de amplificaciones inespecíficas, se incluyó una curva de disociación hecha 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.

Para determinar la carga parasitaria, se graficó el logaritmo de la cantidad de parásitos correspondiente contra el valor de Ct (Cycle Treshold por sus siglas en inglés) obtenido de la amplificación por PCR en tiempo real de cada dilución de la curva. Se llevó a cabo un análisis de regresión lineal y 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 expresaron en equivalente de número de parásitos por mg de tejido.

Cuadro 3.2 Cantidad de reactivos utilizados para la q-PCR en la determinación de la carga parasitaria.

Reactivo	Cantidad (μL)
Agua grado biología molecular	2
SYBER Green	5
Primer F JW11	1
Primer R JW12	1
ADN de la muestra	1
Volumen final	10

3.2.3 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados son representados con las medias \pm el error estándar (SEM). El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5.0. Por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov se determinó si los datos se ajustaban a una distribución normal. La significación estadística se calculó mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett, un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efecto de la administración tópica del extracto de *Allium sativum* sobre la carga parasitaria

Se observó una reducción estadísticamente significativa de la carga parasitaria en los grupos tratados con la formulación de *A. sativum* al 1% y el tratamiento convencional con Glucantime® respecto al grupo control ($p < 0.01$).

Asimismo, se observó una tendencia hacia la reducción en la carga parasitaria en los grupos tratados con la formulación del extracto acuoso de *A. sativum* al 5 y 10% con respecto al grupo control, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$) (Figura 3.1).

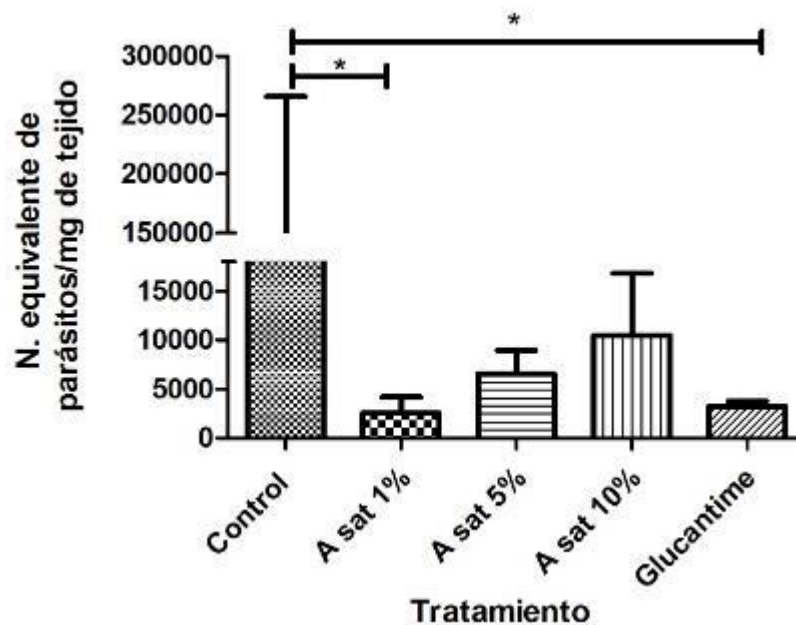


Figura 3.1 Carga parasitaria en los grupos evaluados con la formulación de *A. sativum*. *Denota valores estadísticamente significativos ($p < 0.01$).

3.3.2 Efecto de la administración tópica de la fracción hexánica de *Tridax procumbens* en la carga parasitaria

Al aplicar la dosis correspondiente de la fracción hexánica de *T. procumbens*, se observó una tendencia a la reducción de la carga parasitaria en los grupos de ratones tratados, sin embargo, no fue significativa cuando se comparó con el grupo control. La mayor reducción se observó en el grupo de roedores tratados con la formulación de *T. procumbens* al 2% (Figura 3.2).

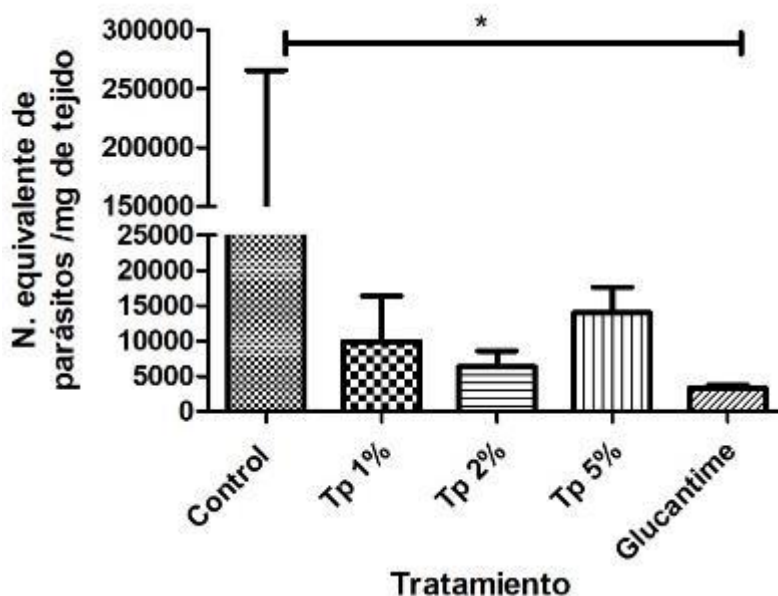


Figura 3.2 Carga de parásitos en los diferentes grupos evaluados con la formulación que contiene la fracción hexánica de *T. procumbens* a diferentes porcentajes.

3.3.3 Efecto de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol en la carga parasitaria

En el grupo tratado con (3S)- 16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina) al 1% no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, además, el tratamiento con Glucantime® resultó más efectivo que la oxilipina al reducir de manera significativa la carga de parásitos en comparación con el grupo tratado con la oxilipina al 1% (Figura 3.3).

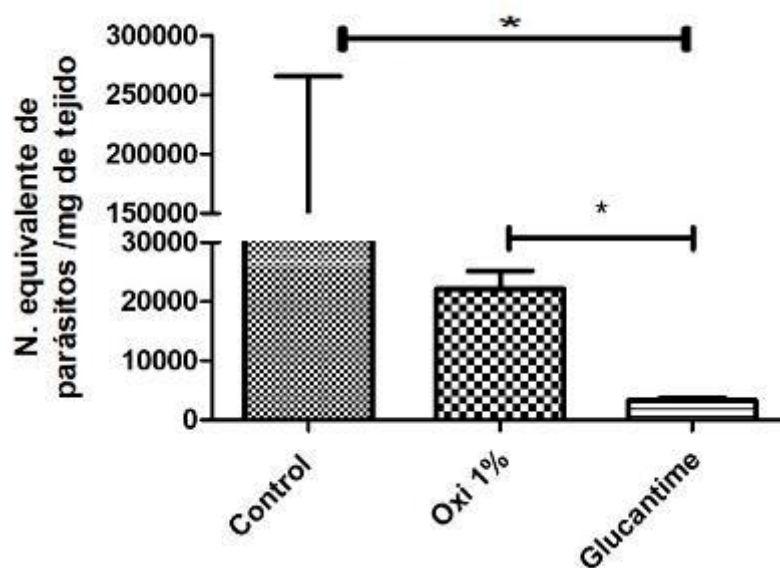


Figura 3.3 Carga parasitaria en el grupo evaluado con (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol al 1%.

3.4 DISCUSIÓN

En el presente estudio, el extracto acuoso de *A. sativum* al 1% fue el más eficaz en reducir de manera significativa la carga parasitaria al igual que el grupo tratado con Glucantime®. Al comparar estos resultados con los tamaños de lesión obtenidos, los resultados con *A. sativum* guardan estrecha relación entre el tamaño de lesión, lo que difiere con el grupo de Glucantime®. A pesar de que la carga de los parásitos en los animales tratados con *A. sativum* al 1% fue similar a la de los animales tratados con Glucantime®, *A. sativum* logró la cura clínica en 60% del grupo evaluado, mientras que el grupo tratado con Glucantime® no presenta una relación directa en el tamaño de lesión y la reducción de la carga parasitaria. Los resultados obtenidos con la formulación tópica de *A. sativum* al 1% concuerdan con lo reportado previamente por Gamboa-León *et al.* (2007), donde se menciona que un extracto de ajo seco administrado a una dosis de 20 mg/Kg por vía intraperitoneal redujo significativamente la carga parasitaria. Cabe recalcar que el tratamiento aplicado en nuestro experimento es por vía tópica ofreciendo una posibilidad de aplicación más factible que la aplicación intraperitoneal.

Los demás grupos evaluados con la formulación de *A. sativum* al 5 y 10% tendieron a presentar una menor carga parasitaria respecto al grupo control, pero no fue estadísticamente significativa. El grupo tratado con la formulación tópica de *A. sativum* al 10% logró resolver la úlcera en el 40% de los roedores, pero no se observó relación directa con la carga parasitaria. Esto coincide con Andrade-Narváez *et al.* (2005), quienes observaron que la mayoría de los amastigotes se ubican en el borde de la lesión, concordando con lo reportado en el capítulo anterior en relación con el grupo tratado con *A. sativum* al 10% en el que se observó resolución de las úlceras, pero los bordes fueron en aumento, sugiriendo que este tratamiento pudo haber logrado la cura clínica pero no parasitológica. Esto se explica porque hay estudios que plantean que las diferentes dosis de extractos de *A. sativum* pueden tener efectos opuestos, como lo reportado por Ledezma *et al.* (2002), donde altas concentraciones de extracto inhibieron la proliferación de linfocitos inducidos por concanavalina A, mientras que concentraciones bajas la estimularon. En el presente estudio la dosis más baja (1%) fue la que logró la resolución de lesiones en un 60% del grupo evaluado.

Estos datos indican que el tratamiento con *A. sativum* al 1% por vía tópica fue suficiente para controlar la infección por *L. mexicana* en ratones BALB/c.

Los tratamientos tópicos con la formulación de *T. procumbens* al 2 y 5% mostraron una tendencia a reducir la carga parasitaria en comparación con el grupo tratado con el excipiente, pero esto no alcanzó una diferencia estadísticamente significativa. Este resultado contrasta con lo reportado por Martín-Quintal *et al.* (2010), quienes demostraron que el extracto de *T. procumbens* actúa directamente sobre el parásito, mostrando una buena actividad leishmanicida *in vitro* contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* con IC₅₀ de 0.55 μM y 0.48 μM, respectivamente. De acuerdo con Cos *et al.* (2018), un efecto *in vitro* prometedor no siempre puede correlacionarse con un buen efecto *in vivo*, principalmente por las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción de un compuesto, razón probable por la cual los resultados *in vivo* de este estudio no fueron los esperados comparado con los resultados obtenidos por Gamboa-León *et al.* (2014) donde se probó *T. procumbens* a una dosis de 20 mg/Kg vía intraperitoneal y se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de lesión de los animales infectados.

Por otra parte, el grupo evaluado con la formulación de *T. procumbens* al 5% fue el que presentó una mayor cantidad de parásitos comparada con las otras formulaciones evaluadas (1 y 2%). No obstante, fue en el grupo de *T. procumbens* al 5% en el que al menos un roedor logró resolver la úlcera. En el caso anterior, se observó la cura clínica en el sitio de la lesión, lo cual podría estar más relacionado con las propiedades cicatrizantes de *T. procumbens* al aplicarlo por vía tópica y no a la reducción de los parásitos que ocasionan la lesión (Yaduvanshi *et al.*, 2011). En estudios anteriores se ha demostrado que la lesión causada por *L. mexicana* en los ratones, el tamaño de la úlcera es inversamente proporcional a la cantidad de parásitos presentes, pero también mencionan que esta función no se cumple en el borde indurado, ya que la mayor cantidad de parásitos se concentra en los bordes y no en la zona ulcerada que corresponde a tejido necrótico muerto (Pearson, 2019; Yaduvanshi *et al.*, 2011; Andrade-Narváez *et al.*, 2005).

Respecto al grupo tratado con el compuesto activo (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina) al 1%, se observó menor cantidad de parásitos con respecto al grupo tratado con el excipiente, sin

embargo, esta reducción no fue estadísticamente significativa. Para este compuesto, se esperaba una mejor respuesta de la encontrada, ya que se ha reportado un efecto *in vitro* incluso mejor que el obtenido con la anfotericina B cuyo IC₅₀ es de 1.0 µg/mL y la oxilipina evaluada en el presente estudio se reporta con un IC₅₀ de 0.480 µg/mL (Martín-Quintal *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Corpas *et al.* (2016), se evaluó el α-bisabolol, un compuesto derivado de ácidos grasos con las características fisicoquímicas similares a la oxilipina evaluada en el presente estudio. El α-bisabolol fue evaluado en formulaciones por vía tópica a diferentes porcentajes (1, 2.5 y 5%) contra la especie *L. tropica*, donde se observó una reducción significativa de la carga parasitaria en el tratamiento al 2.5 y 5%. Teniendo en cuenta lo antes mencionado, se sugiere evaluar el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol a mayor concentración dado que tiene una naturaleza similar a la del α-bisabolol. Sin embargo, también es recomendable probar concentraciones más bajas considerando que es un compuesto puro y tiene una actividad leishmanicida *in vitro* con un bajo IC₅₀ (0.480 µg/mL); por otra parte, se debe comprobar que la oxilipina no se degrada al interactuar con los componentes del excipiente utilizado como vehículo de administración.

CAPÍTULO IV

EVAUACIÓN DE LOS CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS ASOCIADOS A LA ADMINISTRACIÓN TÓPICA DE *A. sativum*, *T. procumbens* Y (3S)-16,17-DIDESHIDROFALCARINOL EN RATONES BALB/c INFECTADOS CON *L. mexicana*

4.1 INTRODUCCIÓN

La piel desempeña innumerables funciones esenciales como protección, termorregulación, síntesis bioquímica, detección sensorial, comunicación social y sexual, así como reactividad inmunitaria (Fox *et al.*, 2007). Es el órgano más grande en los animales que hace de barrera bimodal que evita tanto la absorción de agua y electrolitos como su pérdida. Las diferentes capas que componen la piel son la epidermis, que es la primera y más superficial, seguida de la dermis y posteriormente se encuentra el tejido subcutáneo o también conocido como zona panicular, al final de estas capas empieza el tejido muscular (Megías *et al.*, 2019; Fox *et al.*, 2007) (Figura 4.1).

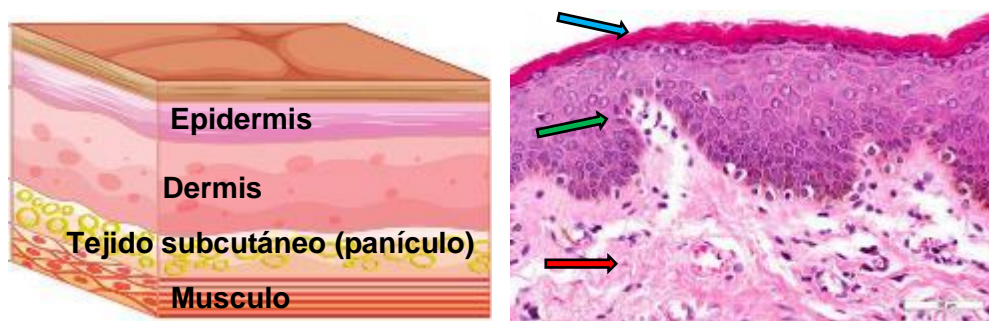


Figura 4.1 A) Capas de la piel; B) Muestra histológica de tejido de piel sano, Epidermis (flecha azul), dermis (flecha verde) y panículo (flecha roja) (Megías *et al.*, 2019)

La epidermis es la parte más superficial de la piel y está constituida por los queratinocitos y células dendríticas. Los queratinocitos se organizan en 5 capas o estratos (córneo, lúcido,

granuloso, espinoso y basal) que van de la parte más superficial a la más interna. Las células dendríticas se clasifican en melanocitos, células de Langerhans y células indeterminadas (Navarrete-Franco, 2003).

La dermis se encuentra situada por debajo de la epidermis, separadas por la unión dermoepidérmica. Se encuentra constituida por tejido conectivo denso e irregular, conformado por las fibras elásticas, de colágeno y reticulares. Predominan células como los fibroцитos, macrófagos y mastocitos. En este estrato también se encuentran las glándulas sebáceas, sudoríparas y los folículos pilosos. Por último, se encuentra la hipodermis o tejido subcutáneo, que es la capa más profunda y está constituida por tejido adiposo (Megías *et al.*, 2019; Navarrete-Franco, 2003).

Para la observación microscópica de la piel, son necesarias diversas técnicas de toma de muestras, fijación y tinción. Una de las ramas más usadas para diagnóstico de enfermedades a través del estudio de los tejidos es la histopatología, en la cual se utilizan como tinción base la hematoxilina y eosina (HE), la primera con afinidad a estructuras nucleares, que se tiñen de color azul oscuro o violeta, mientras que la segunda tiene afinidad con estructuras citoplasmáticas tiñéndolas de color rosado (Criber, 2021; Medina *et al.*, 2015).

En la leishmaniosis, la histopatología es una herramienta básica que brinda información sobre la evolución de la patología, provee información sobre el agente causal por morfología y posibilita información sobre mecanismos de acción de moléculas y fármacos (Criber, 2021).

En lesiones ocasionadas por *L. mexicana*, en la epidermis se puede encontrar hiperqueratosis, que es un engrosamiento del estrato córneo y aumento de queratina, a su vez esta se divide en ortoqueratosis y paraqueratosis, que se describen como ausencia o presencia de núcleos en las células de estrato córneo. También se observa acantosis, un engrosamiento de la epidermis debido a un aumento de células del estrato espinoso y hay presencia de espongirosis, úlceras, necrosis y bacterias. En la dermis se pueden observar granulomas, que son la acumulación de células inflamatorias, infiltrado inflamatorio y la presencia de macrófagos, los principales reservorios y a su vez los responsables de la eliminación del parásito, además se encuentran los

eosinófilos y neutrófilos, que son las primeras células que se infectan después de la entrada del parásito y atraen a un gran número de macrófagos que ingieren los neutrófilos infectados, de igual forma se puede observar necrosis, úlceras y bacterias (Neira *et al.*, 2019; Medina *et al.*, 2015; Kaye y Scot, 2011).

Por otra parte, en las lesiones que empiezan a curar suelen observarse cambios histológicos desde disminución del infiltrado inflamatorio hasta fibrosis y cicatrización, así como ausencia de parásitos y compactación del tejido conjuntivo (Reyes-Flores, 1993).

En el presente estudio se realizó el análisis histopatológico de las muestras de ratones infectados con *L. mexicana* para determinar los cambios histopatológicos asociados a la administración de los diferentes tratamientos tópicos con *A. sativum*, *T. procumbens* y (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Obtención de muestras para cortes histológicos

A la semana 5 de seguimiento clínico se practicó la eutanasia de los animales implicados como se describe en el capítulo III y se tomó una parte de la biopsia excisional que incluía borde y úlcera para realizar el análisis histopatológico.

Las muestras se mantuvieron en formol al 10% hasta su procesamiento. Las muestras fueron enviadas con un experto en histología, donde se deshidratan para su inclusión en parafina y posterior corte con un microtomo. Las laminillas se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y el análisis de los cortes histológicos se realizó a través de un microscopio Nikon Y-FL con objetivos de 4x hasta 100x para verificar las células involucradas, los daños en los tejidos, presencia de amastigotes y patrones histopatológicos característicos de LCL.

Los resultados obtenidos en el análisis se expresaron de acuerdo con Lago *et al.* (2019), 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).

4.3 RESULTADOS

Se observó que la mayoría de las muestras de histopatología, incluyendo las del grupo control positivo (tratados con Glucantime®), en la dermis presentaron leve acantosis, espongiosis, para y ortoqueratosis, úlceras y necrosis, con una distribución variable, de focal a difusa (Cuadro 4.1; Figura 4.2).

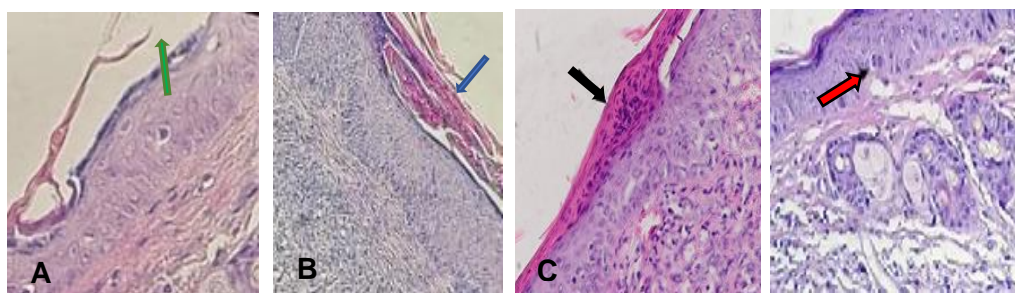


Figura 4.2 Imagen de cambios histopatológicos visualizados en epidermis de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana*. A) acantosis (flecha verde); B) ortoqueratosis (flecha azul); C) paraqueratosis (flecha negra); D) Espongiosis (flecha roja). Observados bajo microscopio óptico con objetivo 40x.

En la dermis se observó infiltrado inflamatorio severo difuso con eosinófilos, amastigotes extracelulares y macrófagos vacuolados, así como necrosis masiva asociada a la infección con *L. mexicana* (Cuadro 4.2). Sin embargo, las muestras de los ratones tratados con *A. sativum* al 1% mostraron reepitelización de los tejidos dañados por el parásito, pudiéndose observar un daño leve focal en la zona de la lesión en el 100% de las muestras observadas, lo que coincide con la reducción en el tamaño de la lesión reportado en los ratones tratados con esta dosis en el capítulo anterior, en donde se observó resolución de las úlceras en el 60% de los individuos.

Cuadro 4.1 Patrones histopatológicos encontrados en la epidermis de roedores BALB/c infectados con *L. mexicana*. Se representa la intensidad de las apariciones ausentes (-), leve (+), moderada (++) y grave (+++), por grupos.

Patrón histopatológico	Control	<i>A. sativum</i>			<i>T. procumbens</i>			Oxilipina	Glucantime®
	negativo	1%	5%	10%	1%	2%	5%	1%	20 mg/Kg
Acantosis	+	+	+	+	++	+	+	+	+
Espongiosis	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Paraqueratosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ortoqueratosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacterias	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Úlceras	++	-	+	+	++	+	+	+	++

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

Patrón Histopatológico	Control	<i>A. sativum</i>			<i>T. procumbens</i>			Oxilipina	Glucantime®
	negativo	1%	5%	10%	1%	2%	5%	1%	20 mg/Kg
Linfocitos	++	+	+	+	++	+	+	++	++
Neutrófilos	++	-	-	-	+	+	+	+	++
Eosinófilos	++	+	+	+	+	+	+	+	+
Macrófagos infectados	+++	+	++	++	+++	++	++	++	++
Amastigotes extracelulares	+++	+	++	++	+++	++	++	+++	++
Úlceras	+++	+	++	+	+++	++	++	++	+++ +
Necrosis	+++	-	+	++	++	+	+	+	+++
Bacterias	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.3.1 Histopatología del grupo control (excipiente y Glucantime®)

En el análisis histológico del grupo tratado con el excipiente se pudo observar que los parásitos causaron graves daños en la zona infectada, afectando desde la unión dermoepidérmica hasta el músculo esquelético, lo que indica la gravedad de las lesiones. En el 100% de las muestras se observó un infiltrado inflamatorio que se caracterizó por la presencia de abundantes células mononucleares, encontrando con mayor frecuencia macrófagos vacuolados multiparasitados en las zonas afectadas. También se pudo observar una gran presencia de amastigotes extracelulares. En la Figura 4.3A se observa la zona de ulceración, región en la que no se

observan las primeras capas de la piel (epidermis y dermis) y el daño inicia desde la zona del panículo hasta llegar a la zona del músculo, mientras que en la Figura 4.3B se muestra el infiltrado inflamatorio que comienza desde la unión dermoepidérmica y en la Figura 4.3C se pueden observar los macrófagos y los amastigotes.

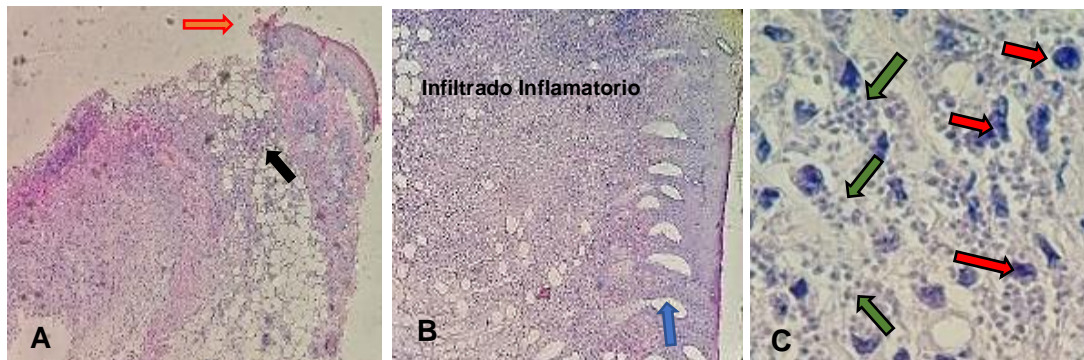


Figura 4.3 Imagen histopatológica de ratones BALB/c hembra, infectados con *L. mexicana* y tratados con el excipiente en crema. A) Ulceración (flecha roja) e infiltrado inflamatorio a partir del panículo (flecha negra) (4x). B) Muestra que indica afección desde la unión dermoepidérmica (flecha azul) (4x). C) Macrófagos (flechas rojas) y amastigotes (flechas verdes) (100x).

En el 80% (4/5) de las muestras del grupo tratado con Glucantime® se observó un infiltrado inflamatorio a partir de la dermis, región en la cual pudieron observarse macrófagos multiparasitados y amastigotes extracelulares, así como una necrosis extensiva, lo que indica que el tratamiento no fue eficiente para controlar la infección. Sólo el 20% (1/5) presentó un infiltrado inflamatorio en la zona del músculo, con daños menores en las demás capas de la piel (Figura 4.4).

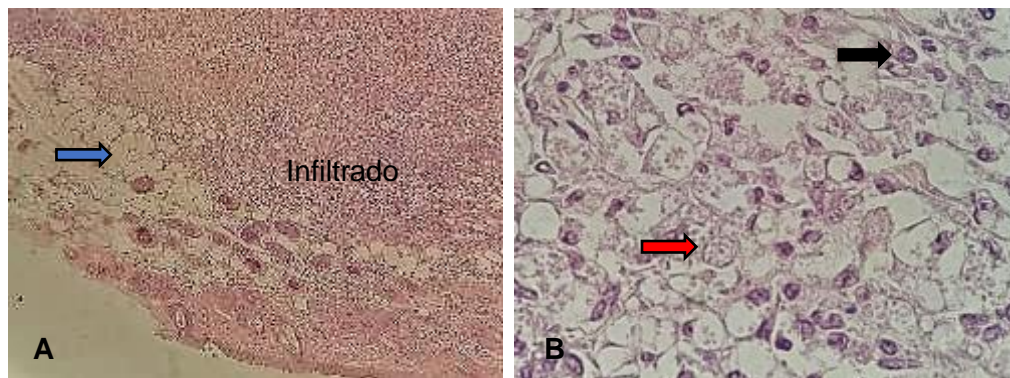


Figura 4.4 Muestra histopatológica de ratones BALB/c hembras, infectados con *L. mexicana* y tratados con Glucantime®. A) Indica ulceración e infiltrado inflamatorio a partir del panículo (flecha azul) (10x); B) Macrófagos infectados (flecha negra) y amastigotes vacuolados (flecha roja) (100x).

4.3.2 Análisis histopatológico de los grupos tratados con *Allium sativum*

El análisis de histopatología reveló que el tratamiento con *A. sativum* al 1% fue favorable en la resolución del daño ocasionado por la infección con *L. mexicana*, puesto que se observó una notable mejora de la zona dañada, así como un proceso de reparación de la piel en el 100% de las muestras. Esto apoya lo reportado en el capítulo II, en el que se mencionó que el tratamiento con *A. sativum* al 1% logró la cura clínica en el 60% de los animales.

Por otra parte, a pesar de que en el 40% de los animales a los que se les aplicó este tratamiento no logró una disminución o cierre de úlcera, el análisis de histopatología reveló que solamente había daño focal en el panículo o en el tejido muscular, y se observó fibrosis, lo que propone la posibilidad de que con este tratamiento los animales podrían lograr la cura clínica ampliando el tiempo del tratamiento.

En la Figura 4.5 se muestra la lesión de un ratón tratado con *A. sativum* al 1%, en donde se observa reepitelización del tejido, presencia de pocas células inflamatorias y escasos

amastigotes de manera focal en la zona del pániculo, compatible con el proceso de resolución de las lesiones.

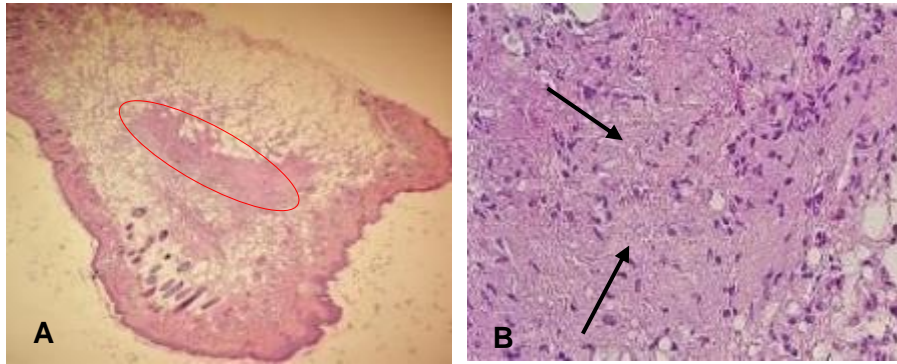


Figura 4.5 Tejido de piel teñido con HE de ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con la formulación de *A. sativum* al 1%. A) Daño focal en la zona panicular (marcado en rojo) (4x). (B) Fibrosis flecha negra, indica reparación de tejido dañado (40x).

Respecto al tratamiento con *A sativum* al 5% en ninguna de las histopatologías se observó el proceso de reparación, sin embargo, en la mayoría de las muestras (60%) se observó un daño severo difuso y la presencia de amastigotes desde el pániculo hacía abajo, con daños a nivel de la dermis y la epidermis (Figuras 4.6A y B).

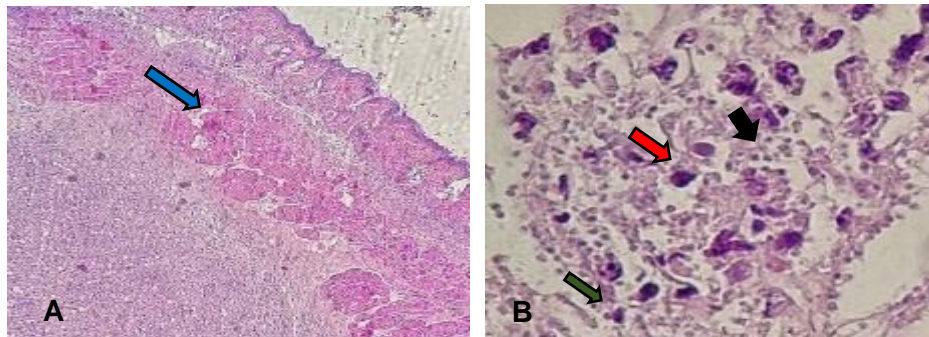


Figura 4.6 Muestra histopatológica de un ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con la formulación de *A. sativum* al 5%. A) Vista general del corte histopatológico con presencia de necrosis (flecha azul) (10x). B) Macrófagos (flecha roja), amastigotes (flecha negra), linfocito (flecha verde) observados en tejido muscular (100x).

En el tratamiento con *A. sativum* al 10% se observaron daños masivos en la zona de infección. En la Figura 4.7A se muestra el daño del músculo esquelético hacia las capas inferiores del tejido, lo que indica la presencia de una lesión profunda. En dicha muestra se resalta una miositis con inflamación severa difusa, en la cual se pudieron observar abundantes macrófagos y amastigotes (Figura 4.7B). A pesar de ello, la región de la epidermis, dermis y panículo se encontraron en buen estado en el 40% de las muestras (Figura 4.7C).

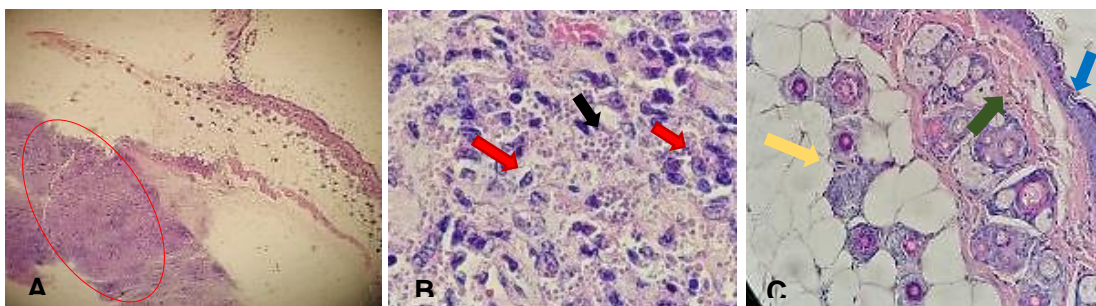


Figura 4.7 Histopatología de ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con una formulación de *A. sativum* al 10%. A) Infiltrado inflamatorio marcado en rojo, (4x). B) Macrófagos (flechas rojas) y amastigotes (flecha negra) de *L. mexicana* (100x). C) Zona del tejido que no se encuentra dañado, epidermis (flecha azul, dermis (flecha verde), panículo (flecha amarilla) (40x).

4.3.3 Análisis histopatológico de los grupos tratados con *Tridax procumbens*

En el tratamiento con *T. procumbens* al 1% se observó que el 60% de las muestras presentó daños graves desde la dermis superficial hasta el tejido muscular, en el cual se observaron abundantes amastigotes. En una de las cinco muestras (20%) se observó fibrosis en la dermis superficial y células multinucleadas, lo cual sugiere la activación de los mecanismos efectores de los macrófagos (Figura 4.8).

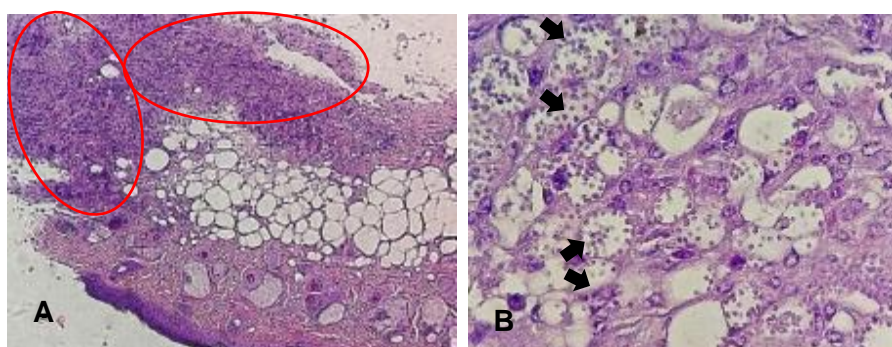


Figura 4.8 Histopatología de un ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con *T. procumbens* al 1%. A) Infiltrado inflamatorio que abarca desde la dermis hasta la región del panículo marcada en rojo (10x). B) Amastigotes vacuolados (flecha negra) (100x).

El 60% de las muestras de los ratones tratados con la formulación de *T. procumbens* al 2 y 5% presentaron daño desde la unión dermoepidérmica, mientras que en el 40% se observó daño a partir del panículo. El 100% de las muestras presentaron inflamación severa difusa y presencia de amastigotes, sin embargo, la cantidad fue menor que la observada en el grupo de ratones tratado con el excipiente (Figura 4.9).

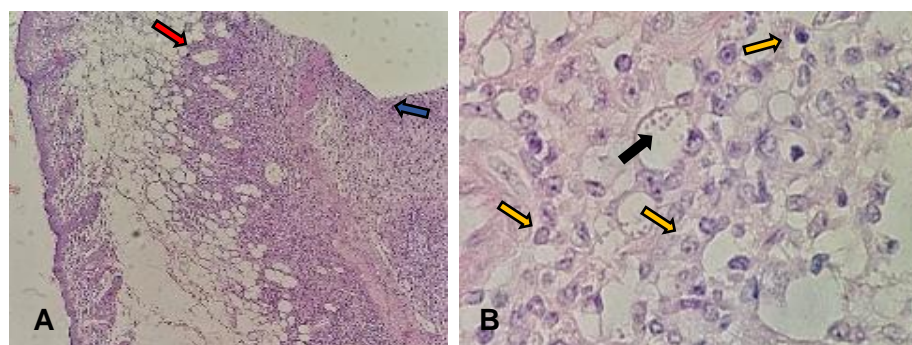


Figura 4.9 Imagen de corte histopatológico teñido con HE observada al microscopio de un ratón BALB/c hembra infectado con *L. mexicana* y tratado con *T. procumbens* al 2%. A) Infiltrado inflamatorio observado a partir de la zona del panículo (flecha roja) hasta la zona del músculo (flecha azul) (10×). B) Macrófagos (flecha amarilla) y amastigotes vacuolados en tejido muscular (flecha negra) (100×).

4.3.4 Análisis histopatológico del grupo tratado con (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol al 1%

El 60% de las muestras analizadas presentaron daño a partir de la dermis, 20% a partir del panículo y el otro 20% en el músculo esquelético. Todas con un infiltrado inflamatorio severo difuso asociado a la infección con *L. mexicana*.

Se observó gran presencia de células inflamatorias y la cantidad de amastigotes observados fue menor que en el grupo tratado con el excipiente (Figura 4.10).

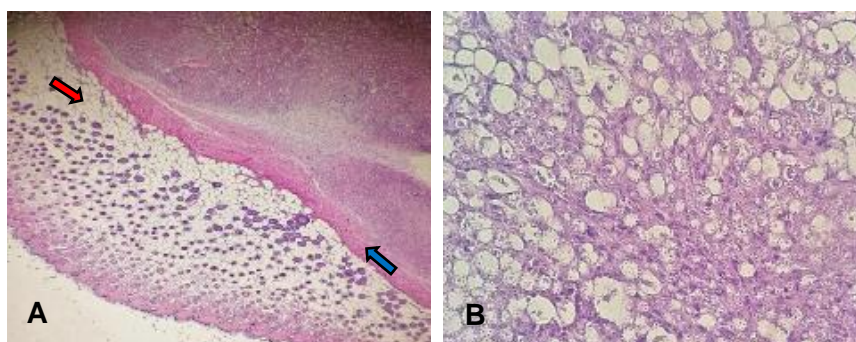


Figura 4.10 Imagen de corte histopatológico teñido con HE observada al microscopio a 40× de ratón hembra BALB/c infectado con *L. mexicana*, tratado con la formulación de (3S)-16,17 dideshidrofalcarinol (oxilipina) al 1%. A) Zona de daño a partir del panículo (flecha roja), necrosis (flecha azul) (10×). B) Macrófagos y amastigotes (100×).

4.4 DISCUSIÓN

Durante el análisis de las muestras de tejido de ratones infectados con *L. mexicana* y tratados vía tópica con formulaciones que contenían diferentes porcentajes de extractos de plantas y un metabolito aislado de una de ellas, se observaron diferencias y similitudes entre los diferentes tratamientos y el grupo control, tratado únicamente con el excipiente en crema, así como con el grupo tratado con Glucantime®. En el grupo tratado con *A. sativum* al 1%, se observó un cambio positivo en la zona tisular, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control (tratado con el excipiente), el grupo al cual se le aplicó Glucantime® y los tratados con el 5 y 10% de *A. sativum*, la fracción hexánica de *T. procumbens* y el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina).

En las muestras de tejido de los ratones del grupo control negativo, así como con los tratamientos de *A. sativum* al 5% y *T. procumbens* al 1% se observó una gran cantidad de amastigotes e histiocitos. De acuerdo con García-Amagro (2004), encontrar una gran cantidad de amastigotes e histiocitos sin la presencia de otras células inflamatorias indica que hay una mala respuesta

por parte del sistema inmune, lo que en el caso del presente estudio se vio reflejado en el tamaño de las lesiones de los animales. Por el contrario, en las muestras de los ratones tratados con *A. sativum* al 1%, se observó una cantidad moderada o escasa de amastigotes asociada con necrosis y formación de granulomas, lo que indica una inmunidad favorable y adecuada para combatir la infección por *Leishmania*, como en el caso de lo observado en los individuos cuyas lesiones curaron clínicamente.

Así pues, la resolución de las lesiones cutáneas ocasionadas por la leishmaniosis se asocia con cambios histopatológicos que comienzan con la disminución progresiva de la extensión del infiltrado, hasta la fibrosis y cicatrización, observándose la ausencia de parásitos, inflamación y compactación del tejido conjuntivo con proliferación fibroblástica variable (Reyes-Flores, 1993). Estos hallazgos coinciden con los encontrados en el grupo de ratones tratados con *A. sativum* al 1%, en donde se observó la cura clínica del tejido dañado en el 60% de los roedores. En el 40% restante, se observó una reducción del infiltrado inflamatorio además de presencia de fibrosis y escasos amastigotes. La mayoría de las muestras de tejido observadas en el tratamiento con *A. sativum* al 1% presentó un daño focal leve, a diferencia del tratamiento con *A. sativum* al 10%. En este último grupo, se observó la presencia de una gran cantidad de amastigotes y un infiltrado inflamatorio severo difuso, lo que sugiere que con el paso del tiempo las lesiones podrían reactivarse, al igual que lo ocurrido con pacientes que curan clínicamente, pero después de un tiempo la lesión aparece de nuevo (Del Rosal *et al.*, 2010).

De acuerdo con González-Cuellar (2019), al aplicar o ingerir una mayor cantidad de extracto se induce a la activación de isoenzimas del citocromo P450, que actúan en la metabolización de los fármacos inhibiendo algunas proteasas y cuando se encuentra un exceso provoca un fallo terapéutico, lo que probablemente ocurrió al aplicar el tratamiento a una mayor concentración impidiendo así que se diera el efecto deseado.

La zona de la epidermis, en la mayoría de las muestras de histopatología, presentó hiperqueratosis y acantosis. La hiperqueratosis y la acantosis a menudo van de la mano con la hiperplasia y paraqueratosis que son engrosamientos de la piel debido a las lesiones causadas por el parásito. Además, algunas muestras presentaron espongirosis, donde se observa que las

células están más separadas de lo normal y se forman pequeñas vesículas por acumulación de líquido, un patrón similar a lo reportado en diferentes estudios (Andrade-Narváez *et al.*, 2005; Neira *et al.*, 2019). En el presente trabajo se observó ulceración en la epidermis en la mayoría de los grupos evaluados, además de la presencia de necrosis. Estos patrones son muy frecuentes durante la infección causada por *Leishmania* (García-Almagro, 2005).

Por otra parte, de acuerdo con Reyes-Flores (1993), en las lesiones de LCL se observan cambios epiteliales variables, como en el caso de la epidermis que puede estar aplanada, perdiéndose la línea del límite dermo-epidérmico, tal como ocurrió con la mayoría de las muestras de los ratones tratados con *A. sativum* al 5% y *T. procumbens* al 1%, en las que se observó un infiltrado inflamatorio severo difuso desde la unión dermoepidérmica.

En el caso de la dermis se observó la presencia de infiltrado inflamatorio, lo que coincide con la invasión del tejido por leucocitos. También se observaron macrófagos, linfocitos y eosinófilos, así como la presencia prominente de amastigotes. Los hallazgos coinciden con los patrones reportados en la investigación de Neira *et al.* (2019) en ratones BALB/c infectados en el dorso con *Leishmania* spp., cuyas lesiones presentan nódulos y úlceras al igual que las del presente estudio. En nuestros grupos experimentales, no se observó la presencia de bacterias, pero sí se observaron muchos macrófagos vacuolados con parásitos, al igual que lo reportado por Ramos-Martínez *et al.* (2013) en un estudio que realizaron con roedores BALB/c infectados con *L. mexicana* en el cojinete plantar y tratados con 11,25(OH)2D3 (vitamina D3). Estas características confirman lo reportado para ratones BALB/c, ampliamente utilizados en el estudio de la LCL causada por *L. mexicana* por ser una cepa de roedor altamente susceptible a la enfermedad. Además, este modelo murino es capaz de reflejar los rasgos clínicos e histopatológicos semejantes a los que se producen en humanos infectados con *L. mexicana* (Falú *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que este patrón histopatológico es el correspondiente a cepas de roedores altamente susceptibles a esta enfermedad (Andrade-Narváez *et al.*, 2005).

En el presente estudio se observaron escasos o nulos neutrófilos. En la leishmaniosis cutánea, los neutrófilos son importantes porque son las primeras células que se infectan después de la entrada del parásito y atraen a un gran número de macrófagos que ingieren los neutrófilos

infectados; de esta manera los parásitos de *Leishmania* usan neutrófilos para ingresar a su célula primaria. En consecuencia, los neutrófilos desempeñan el papel de caballo de Troya, portan parásitos y propagan la infección. Por lo tanto, una menor cantidad de neutrófilos que se encuentran en los animales tratados es un indicador de control en la infección por *L. mexicana* (Kaye y Scot, 2011). Esto se reflejó en el tratamiento con *A. sativum* al 1%.

Otra de las células importantes ante la infección por *Leishmania* son los macrófagos. La presencia de abundantes macrófagos infectados que se observó en la mayoría de los grupos evaluados ha sido reportada en cepas de animales susceptibles a especies de *Leishmania* spp., causantes de leishmaniosis cutánea, ya que los macrófagos son los principales reservorios y a su vez los responsables de la eliminación del parásito mediante mecanismos que involucran la producción de ON mediante la enzima iNOS (Ramos-Martínez *et al.*, 2013). En este trabajo se observó la presencia de macrófagos infectados en la mayoría de los grupos evaluados exceptuando el grupo de *A. sativum* al 1%, lo que sugiere que la administración del extracto acuoso de *A. sativum* al 5 y 10% y la fracción hexánica de *T. procumbens*, así como el compuesto puro oxilipina no afectan la supervivencia del parásito (Giudice *et al.*, 2012).

CAPITULO V

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE INF- γ E IL-10 PARA EVALUAR LA RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A LA ADMINISTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS POR VÍA TÓPICA

5.1 INTRODUCCIÓN

Conocer la respuesta inmune sobre la patogénesis en leishmaniosis es de suma importancia para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, como la inmunoterapia y el desarrollo de vacunas que buscan prevenirla (Vidal-Cagigas, 2003). El modelo murino se ha usado ampliamente en las investigaciones relacionadas con *Leishmania* spp. Y se han determinado dos tipos de respuesta. Una inflamatoria y otra antiinflamatoria que corresponden a la resistencia y la susceptibilidad en infecciones por *Leishmania* respectivamente (Rosas *et al.*, 2005).

La resistencia ha sido bien caracterizada en los ratones de la cepa C57BL/6, que ante una infección por *L. major* o *L. mexicana* producen una lesión que cura espontáneamente en 20 o 30 semanas (Vidal-Cagigas, 2003). En este modelo de infección, la resistencia está fuertemente relacionada con el desarrollo de la respuesta Th1 (inflamatoria), que requiere la producción de interleucina 12 (IL-12) que media la producción de interferón gamma (INF- γ), el cual induce la producción de óxido nítrico (ON) mediante la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) en macrófagos, lo que conduce a la destrucción de los parásitos intracelulares (Loría-Cervera *et al.*, 2014; Díaz *et al.*, 2003).

Por su parte, la susceptibilidad a la respuesta Th2 se ha caracterizado en ratones de la cepa BALB/c, permitiendo la diseminación de la infección y produciendo lesiones nodulares que no cicatrizan. La no curación en este modelo murino está asociada con la producción de citocinas antiinflamatorias como las interleucinas 4 y 10 (IL-4, IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) que favorecen la proliferación de los parásitos de *Leishmania* dentro de los macrófagos (Loría-Cervera *et al.*, 2014; Vidal-Cagigas, 2003; Aguilar-Torrentera y Carlier, 2001).

En la cepa susceptible de ratón BALB/c se ha reportado que emplear sustancias inmunomoduladoras como el extracto de *A. sativum* puede inducir un cambio de respuesta de Th2 a Th1 a través del aumento de los niveles de INF- γ y la producción de ON para el control efectivo de la enfermedad (Gamboa-León *et al.*, 2014).

Las citocinas son la clave para conocer la respuesta inmune predominante durante la infección. Por ello, en el presente trabajo, se evaluó la expresión de dos citocinas involucradas en la respuesta Th1 (INF- γ) y Th2 (IL-10) mediante q-PCR para conocer el efecto del tratamiento aplicado a cada grupo de estudio.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Después del seguimiento clínico y la evaluación del desarrollo de las lesiones, se practicó la eutanasia a los ratones mediante una sobredosis de isoflurano. Se realizó una biopsia excisional de la lesión, la cual fue dividida en tres partes iguales que incluían tanto borde como úlcera. Se tomó una de las tres partes para realizar la extracción de ARN por medio del kit comercial Allprep DNA/RNA Mini kit (Qiagen, # Cat. 80204) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 3).

5.2.1 Extracción de ARN

Para evaluar la respuesta inmune asociada a los tratamientos, se realizó la extracción de ARN por medio del kit comercial Allprep DNA/RNA Mini kit (Qiagen, # Cat. 80204) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 3). Posteriormente se realizó la verificación del ARN mediante geles de agarosa al 2%, para la observación de las bandas 28S y 18S del ARN ribosomal. Las muestras se cuantificaron en un nanodrop, luego se trataron con DNAsa para realizar la rt-PCR y se mantuvo a -20°C para posteriormente realizar el análisis de expresión de citocinas mediante q-PCR.

5.2.2 Análisis de expresión de citocinas

Para evaluar la respuesta inmune asociada a la administración de las diferentes formulaciones se llevó a cabo un análisis de expresión de citocinas Th1 (INF- γ) y Th2 (IL-10) por rt-PCR en tiempo real, para ello, el ARN (100 ng) fue transcrito a ADNc usando el kit Improm-II Reverse Trascrption System (Promega, # Cat. A3800).

Posteriormente, se realizó su amplificación por q-PCR usando iTaq Universal SYBR Green Supermix e iniciadores específicos para cada gen. El análisis de expresión se llevó a cabo usando el método Delta-Delta-Ct (cuantificación relativa). Para el análisis de expresión del gen INF- γ se emplearon los iniciadores Fw (5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3') y Rv (3'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-5'), y para la expresión de IL-10 Fw (5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3') y Rv (3'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-5') (Días *et al.*, 2011).

La amplificación se llevó a cabo por triplicado utilizando el equipo StepOne (Applied Biosystem) en un volumen final de 10 μ L (Cuadro 5.1), con las siguientes condiciones de reacción: 90 °C en 30 s seguido de 40 ciclos de 95 °C en 15 s y después 63 °C por 1 min. Para la curva de disociación fueron 95 °C 15 s, 60 °C 1 min y 95 °C 15 s con incrementos de la temperatura de 0.3 °C.

La normalización se llevó a cabo usando el gen endógeno 18S utilizando los iniciadores Fw (5'-ACCGCAGCTAGGAATAATGGA-3') y Rv (3'-GCCTCAGTTCCGAAAACCA-5'), y se obtuvieron los valores de Δ Ct, los que fueron utilizados para realizar el análisis estadístico y comparar la expresión relativa de los genes en cada uno de los grupos de estudio.

Cuadro 5.1 Cantidad de reactivos utilizados para la q-PCR en el análisis de expresión de citocinas.

Reactivo	Cantidad (μL)
Agua grado biología molecular	2
SYBER Green	5
Primer F	1
Primer R	1
ADN de la muestra	1
Volumen final	10

5.2.3 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados son representados con las medias \pm el error estándar (SEM). El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5.0. Por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov se determinó si los datos se ajustaban a una distribución normal. La significancia estadística se calculó mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett, un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Efecto de la administración tópica del extracto de *Allium sativum* sobre la expresión de INF- γ e IL-10

No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de INF- γ entre los grupos tratados con las diferentes formulaciones de *A. sativum* y el grupo control. En la expresión de IL-10, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos tratados con la formulación de *A. sativum* al 5 y 10% respecto al grupo control ($p < 0.05$). En el grupo tratado con la formulación al 10%, se observó la tendencia a una mayor expresión de IL-10 (Figura 5.1).

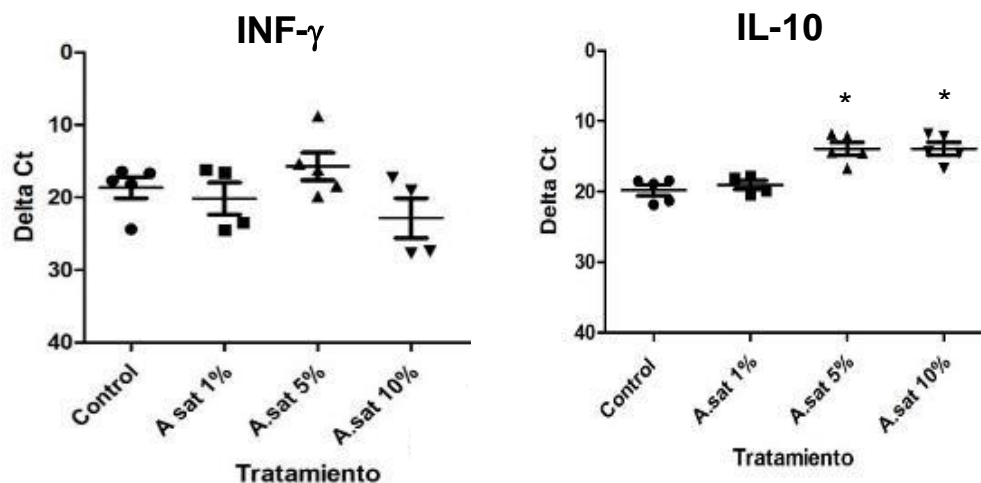


Figura 5.1 Expresión de INF- γ e IL-10 en los grupos evaluados con *A. sativum*.

5.3.2 Efecto de la administración tópica de la fracción hexánica de *Tridax procumbens* sobre la expresión de INF- γ e IL-10

En el grupo tratado con *T. procumbens* al 1% se observó la tendencia de una mayor expresión de INF- γ y una menor expresión de IL-10, mientras que en los grupos tratados con la formulación al 2 y 5% se observó la tendencia de una menor expresión de INF- γ . En tanto que en estos mismos grupos se observó la tendencia a una mayor expresión de IL-10 (Figura 5.2).

En el grupo tratado con *T. procumbens* al 5%, se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de INF- γ respecto al grupo control ($p < 0.05$) y no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de IL-10 entre los grupos tratados con las diferentes formulaciones de *T. procumbens* y el grupo control (Figura 5.2).

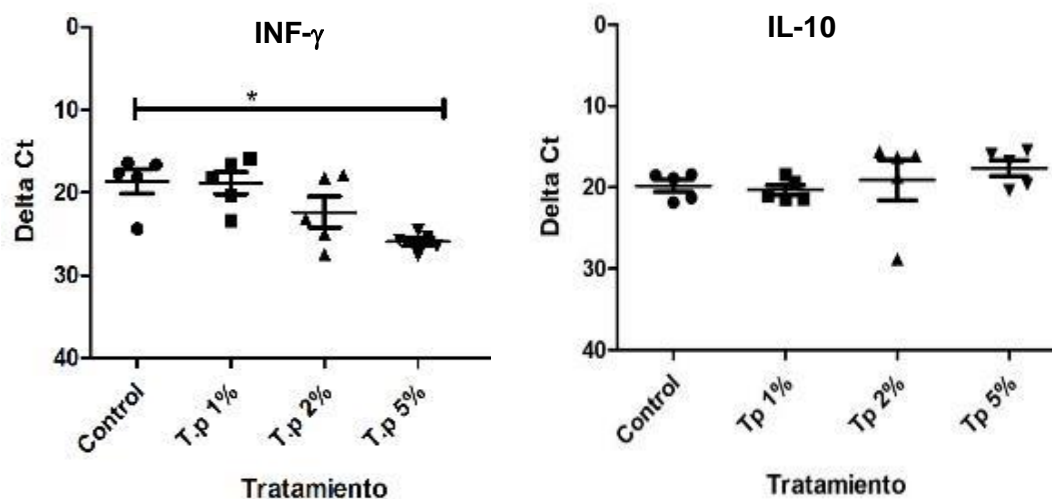


Figura 5.2 Expresión de INF- γ e IL-10 en los grupos evaluados con *T. procumbens*.

5.3.3 Efecto de la administración tópica del compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol sobre la expresión de INF- γ e IL-10

No se observó diferencia significativa en los niveles de expresión de INF- γ e IL-10 entre el grupo tratado con (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol al 1% y el grupo control. Sin embargo, se observó la tendencia a una menor expresión de INF- γ y una mayor expresión de IL-10 (Figura 5.3).

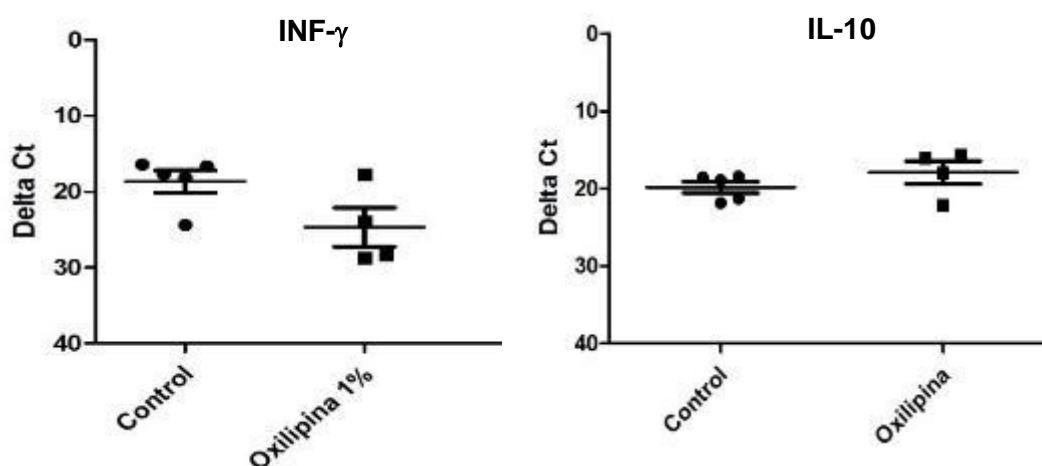


Figura 5.3 Expresión de INF- γ e IL-10 en el grupo evaluado con (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol al 1%.

5.4 DISCUSIÓN

Se sabe que la cepa de ratones BALB/c es susceptible a infecciones por *L. mexicana*, donde las lesiones que se desarrollan son crónicas y progresivas, que no curan espontáneamente y, por lo tanto, la respuesta que se reporta es de tipo Th2, que provoca la secreción de citocinas como IL-14, IL10 y TGF- β (García-Trevijano, 2017). No obstante, existen estudios que reportan que *A. sativum* posee propiedades inmunomoduladoras, como el aumento de las células asesinas naturales (NK) y la modulación significativa de linfocitos T, así también puede inducir un cambio marcado de una respuesta inmune tipo Th2 a Th1 en ratones infectados con *Leishmania*, lo que conduce al control de la infección (Colic *et al.*, 2002; Kyo *et al.*, 2001; Gazhafari *et al.*, 2000; Gamboa-León *et al.*, 2007).

En este estudio se evaluó una citocina involucrada en la respuesta Th1 (INF- γ) y otra involucrada en la respuesta Th2 (IL-10) para determinar si algún tratamiento fue efectivo al controlar la infección por *L. mexicana* mediante la producción de citocinas proinflamatorias como el INF- γ , una de las moléculas clave para la activación de macrófagos, que propician la producción de ON

mediante la expresión de la enzima iNOS y por ende la eliminación de los parásitos (Loría-Cervera *et al.*, 2014).

En general, los tratamientos no causaron un efecto significativo sobre la expresión de INF- γ e IL-10 en comparación con el grupo control. En el grupo de ratones tratado con *A. sativum* se esperaba una mayor expresión de INF- γ , citocina que ayuda a la activación de macrófagos para mediar la respuesta inmune tipo Th1 favoreciendo la resolución de las lesiones ocasionadas por *Leishmania*. Estos resultados difieren de lo reportado por Gamboa-León *et al.* (2007), quienes evaluaron el efecto del extracto acuoso de *A. sativum* en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y la infección se controló al estimular directa o indirectamente el reclutamiento de células T y la producción de INF- γ , lo que condujo a la producción de ON, logrando la eliminación de los parásitos. En otro estudio se demostró que el extracto de *A. sativum* también es capaz de promover la producción de IgG2a/IgG1 relacionada con la respuesta inmune tipo Th1 (Gamboa-León *et al.*, 2014). La diferencia entre el presente estudio y los reportados previamente pudieran estar relacionados con diversos factores que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmunitaria del hospedero, como el número de parásitos y la vía de inoculación, ya que se ha señalado que los ratones BALB/c tienden hacia una respuesta Th1 y resuelven sus lesiones después de la infección con *Leishmania* en la almohadilla plantar, pero ante una respuesta Th2, desarrollan lesiones que no cicatrizan cuando éstas son causadas en la rabadilla (Rosas *et al.*, 2005).

En el presente estudio, los ratones fueron inoculados con 2.5×10^6 parásitos de *Leishmania* en la parte superior y lateral del miembro posterior derecho, entre la articulación coxofemoral y la articulación de la rodilla, el tratamiento fue aplicado por vía tópica y la expresión de citocinas fue a partir de una biopsia excisional del sitio de lesión, mientras que, en ambos estudios previos, los ratones fueron inoculados en la almohadilla plantar con 1×10^6 parásitos. El tratamiento fue mediante inyecciones peritoneales y los niveles de citocinas e IgG relacionados con la respuesta tipo Th1 fueron determinados a partir de linfocitos CD3 de bazo y muestra de sangre, respectivamente.

De acuerdo con Mata-Espinosa *et al.* (2008), la expresión de INF- γ puede ser inhibida por glucocorticoides, TGF- β e IL-10. En este estudio la baja producción de esta citocina en los grupos experimentales pudiera atribuirse a la presencia de IL-10, citocina que normalmente se expresa en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*. Por lo tanto, el control de la infección dada por la cicatrización y reepitelización del tejido dañado, así como la mejora a nivel tisular y la reducción de la carga parasitaria en el grupo de ratones tratados con *A. sativum* al 1%, sugieren que el tratamiento fue efectivo y la infección fue controlada, pero los niveles de expresión de INF- γ no fueron los esperados, esto no quiere decir que no se haya dado un perfil de respuesta inmune tipo Th1, ya que existen otras citocinas involucradas en el control de la infección que no se incluyeron en los análisis. En el presente estudio se reportó un nivel similar tanto de INF- γ como de IL-10, y de acuerdo con Cabrera-González *et al.* (2010) la respuesta tipo Th1 debe darse de forma moderada, ya que un exceso podría ocasionar daños tisulares.

De acuerdo con lo esperado, no se observó una expresión significativa de INF- γ en los grupos de ratones tratados con las diferentes formulaciones de *T. procumbens* y la oxilipina. Martín-Quintal *et al.* (2010) reportaron que la actividad leishmanicida *in vitro* de estos compuestos es independiente de la producción de ON por parte de los macrófagos, la cual esta mediada por la producción de INF- γ , y por lo tanto tienen un efecto directo contra el parásito. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de acción de la fracción hexánica de *T. procumbens*, ni de la oxilipina, por lo cual, es necesario realizar estudios para tener conocimiento sobre el efecto que tienen sobre los parásitos de *L. mexicana*.

Gamboa-León *et al.* (2014) reportaron que la aplicación simultánea por vía intraperitoneal del extracto mixto de *T. procumbens* y *A. sativum* redirige la respuesta inmune causada por la infección de *Leishmania* a un tipo Th1 lo que sugiere que *T. procumbens* podría tener un efecto sinérgico con *A. sativum* en la modulación de la respuesta inmune, por lo que la aplicación simultánea de ambos extractos tendría un efecto terapéutico más eficaz que cada extracto por sí solo. Teniendo en cuenta lo antes mencionado, es recomendable realizar más estudios que evalúen de manera tópica la mezcla de estos extractos (*A. sativum* al 1% con *T. procumbens* al

2%), ya que de acuerdo con Yaduvanshi *et al.* (2011) los tratamientos por vía tópica se absorben bien localmente para producir una mejor acción terapéutica.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSIONES

Los tratamientos evaluados no eliminaron por completo la infección causada por *L. mexicana*. No obstante, la aplicación tópica del extracto acuoso de *A. sativum* al 1% controló la infección. Además, los tratamientos tópicos con la fracción hexánica de *T. procumbens* al 2 y 5% reducen significativamente el tamaño de las lesiones, pero no disminuyen la carga de parásitos. El compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol al 1% no cura clínicamente las lesiones, pero no exacerba su tamaño en comparación con el grupo control.

1. Se establecieron las dosis terapéuticas para cada uno de los tratamientos evaluados de acuerdo con los resultados favorables. Para el extracto acuoso de *A. sativum* la dosis fue del 1%. Para la fracción hexánica de *T. procumbens* fue del 2% y para el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina) sólo se probó el tratamiento al 1%, el cual no tuvo efecto en la resolución de las úlceras. Por lo tanto, es necesario evaluar otras concentraciones para conocer su efectividad *in vivo* en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.
2. De los tres tratamientos evaluados con el extracto acuoso de *A. sativum* (1, 5 y 10%) el tratamiento al 1% resultó efectivo al curar clínicamente al 60% de los roedores infectados con *L. mexicana* y disminuir significativamente la carga parasitaria. Con la fracción hexánica de *T. procumbens* (1, 2 y 5%) el tratamiento con el 2% y 5% reduce significativamente el tamaño de las lesiones, pero no disminuye significativamente la carga parasitaria. El compuesto oxilipina al 1% no cura clínicamente las úlceras, pero no exacerba el tamaño de las lesiones y no disminuye la carga parasitaria.
3. El tratamiento con el extracto acuoso de *A. sativum* al 1% presentó cambios histopatológicos favorables en el tejido dañado por *L. mexicana*. El patrón histopatológico en este grupo se caracteriza por la cicatrización y reepitelización en la zona donde se encontraba la lesión. Los tratamientos tópicos con la fracción hexánica de *T. procumbens* (1, 2 y 5%) y el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol al 1% no presentan cambios histopatológicos positivos. El patrón histopatológico en estos grupos está caracterizado por la presencia de espongiosis,

acantosis, úlceras e hiperqueratosis en la zona epidérmica. La dermis presentó infiltrado inflamatorio difuso compuesto por eosinófilos y macrófagos vacuolados infectados con amastigotes.

4. Los niveles de INF- γ e IL-10 en todos los grupos evaluados con *A. sativum*, *T. procumbens* y el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol indicaron una respuesta inmune tipo Th2.

Es necesario probar una combinación de las formulaciones evaluadas, ya que el ajo ayuda a la eliminación de la carga parasitaria, así como a la cicatrización y *T. procumbens* actúa directamente contra el parásito además de tener propiedades cicatrizantes.

6.2 PERSPECTIVAS

1. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere realizar más bioensayos *in vivo* con el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol en formulaciones con concentraciones diferentes para confirmar su actividad leishmanicida.
2. Ampliar al análisis de expresión de citocinas, incluyendo todas las citocinas involucradas en las respuestas Th1 y Th2.
3. Realizar una formulación en combinación del extracto acuoso de *A. sativum* al 1% y *T. procumbens* al 2%, así como la combinación de *A. sativum* y la oxilipina al 1%, puesto que *A. sativum* es reportado como inmunomodulador y *T. procumbens* y la oxilipina actúan directamente contra el parásito y presentan propiedades cicatrizantes.
4. Evaluar el mecanismo de acción del metabolito y los extractos probados en este estudio para conocer el efecto que tienen sobre el parásito de *L. mexicana*.
5. Utilizar como tratamiento para el grupo control positivo un medicamento que sea efectivo en el modelo murino.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Torrentera, F., Carlier, F. (2001). Factores inmunológicos que gobiernan la resistencia y susceptibilidad del ratón a la infección por *Leishmania major*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43, 135-143.
- Alvar J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Canto, J., Jannin, J., Der Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*, 7, 1-12.
- Andrade-Narváez, F.J., Vargas-González, A., Canto-Lara S.B., Damián-Centeno, A.G. (2001). Clinical picture of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 163-167.
- Andrade-Narváez, F.J., Medina-Peralta, S., Vargas-Gonzales, A., Canto-Lara, S., Estrada-Parra, S. (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.
- Andrade-Narváez, F.J., Van Wynsberghe, N.R., Sosa-Bibiano E.I., Loría-Cervera, E.N. (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. (2013). Manual de Farmacología Básica y Clínica. McGraw Hill, México, pp. 25-28.
- Arboleda, M., Barrantes, S., Úsuga, L., Robledo, S. (2018). Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional meglumine antimoniate: A case series. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 52, 1-4.
- Awasti, A., Mathur, R., Saha, B. (2004). Immune response to *leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*, 119, 238-258.

-
- Bañuls, A., Hide, M., Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances, in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64, 455-458.
- Beck, S., Mathison, H., Todorov, T., Calderón-Juárez, E.A., Kopp, O.R. (2018). A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Tridax procumbens* (L.). *Journal of Plant Studies*, 7, 19-35.
- Benavides, F., Guenet, J. (2000). Modelos murinos en enfermedades humanas. *Medicina* (Buenos Aires) 61, 215-231. <http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol61-01/2/modelosmurinos.htm> [Acceso, 19 de diciembre 2019).
- Besteiro, S., Williams, R., Coombs, G., Mottram, J. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 37, 63-75.
- Cabrera-González, M., Terán-Ángel, G., Rodríguez, O., Puccio, F., Zerpa, O., Convit, J. (2010). Citocinas reguladoras (IL-10 y TGF- β) en pacientes con leishmaniasis cutánea americana. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 50, 243-250.
- Cabrerizo-Medina, E., Villanueva, H. Salguero, M. (2015). Estudio histopatológico de la evolución temporal de las lesiones. *Cuadernos de Medicina Forense*, 21, 127-134.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I., Maki, J., (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 195-202.
- Castro, G., Zerpa R., Rondón, L. (2003). Leishmaniasis en la infancia. *Medicina Cutánea Ibero-Latinoamericana*, 31, 351-361.
- Conde, J. (2012). Análisis bioquímico y funcional de oxilipinas involucradas en defensa frente a patógenos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid, España. pp. 197.

-
- Colic, M., Vucevic, D., Kilibarda, V., Radicevic, N., Svic, M., (2002). Modulatory effects of garlic extracts on proliferation of T-lymphocytes *in vitro* stimulated with concanavalin A. *Phytomedicine*, 9, 117-124.
- Corpas, V. (2015). Nuevas perspectivas en el tratamiento de la leishmaniosis: evaluación de derivados hidroxámicos y (-)- α -bisabolol. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada, España. pp. 319.
- Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., López-Viota, M., Gijón-Robles, P. Morillas-Mancilla, M., López-Viota, J., Díaz-Sáez, V., Morillas-Márquez, F., Navarro-Moll, M., Martín-Sánchez, J. (2016). Topical treatment of *Leishmania tropica* infection using (-)- α -bisabolol ointment in a hamster model: effectiveness and safety assessment. *Journal of Natural Products*, 79, 2403-2407.
- Cos, P., Janssens, J., Piñon, A., Cuesta-Rubio, O., Yglesias-Rivera, A., Díaz-García, A., Vilegas, W., Monzote, L. (2018). Efficacy of four *Solanum* spp. Extracts in animal model of cutaneous leishmaniasis. *Medicines*, 5, 1-11.
- Del Rosal, T., Baquero-Artigao, F., García, M. (2010). Leishmaniasis cutánea. *Revista Pediatría de Atención Primaria*, 12, 463-471.
- Días, V.E., Neder, L., Saggiaro, F., Oliveira, R.F. (2011). An experimental model of meningoencephalomyelitis by rocio flavivirus in BALB/c mice: inflammatory response, cytokine production, and histopathology. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85, 363-373.
- Díaz, N.L., Fernández, M., Figueira, E., Ramírez, R., Monsalve, I.B., Tapia, F.J. (2003). Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 28, 288-293.
- Ezatpour, B., Saedi-Dezaki, E., Mahmoudvand, H., Azadpour, M., Ezzatkhah, F. (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, 707-712.

Falú, M., García, M., Parodi, R., Molina, E., Marino, R., Cimino, R., Gil, J., Vavari, J., Basombrio, M. (2009). Susceptibilidad de distintas cepas de ratones a la infección por *Leishmania amazonensis*. *Revista de Dermatología*, 15, 334-339.

Ferrer-Lino, L. (2021). 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 de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. pp. 94.

Gamboa-León, M.R., Aranda-González, I., Mut-Martín, M., García-Miss, M.R., Dumonteil, E. (2007). *In vivo* and *in vitro* control of *Leishmania mexicana* due to garlic-induced NO production. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66, 508-514.

Gamboa-León, R., Vera-Ku, M., Peraza-Sánchez, S., Ku-Chulim, C., Horta-Baas, A., Rosado-Vallado, M. (2014). Antileishmanial activity of a mixture of *Tridax procumbens* and *Allium sativum* in mice. *Parasite*, 21, 1-7.

García-Almagro, D. (2004). Leishmaniasis cutánea: estudio en el área sanitaria de Toledo. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid, España. pp. 207.

García-Almagro, D. (2005). Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermo-Sifilográficas*, 96, 1-24

García-González, M., Morón, F., Costaguta, M., Delens, M., Gómez, H., Olmedo, D., Méndez, M., Boulogne, I., (2014). *Allium sativum*, en: Farmacopea Vegetal Caribeña, Germosén-Robineau, L., (Ed.). TRAMIL, Mérida, Yucatán. pp. 23-29.

García-Trevijano, C. (2017). Inmunoparasitología de *Leishmania*. Trabajo de fin de grado. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España. pp. 20.

-
- Ghazanfari, T., Hassan, Z., Ebtekar, M., Ahmadiani, U., Naderi, G., Azar, A. (2000). Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, 52, 491-495.
- Ghazanfari, T., Hassan, Z.M., Khamesipour, A. (2006). Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium sativum*) treatment. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 333-337.
- Gillespie, P.M., Beaumier, C.M., Strych, U., Hayward, T., Hotez, P.J., Bottazzi, M.E. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*, 34, 2992-2995.
- Giudice, A., Vendrame, C., Bezerra, C., Carvalho, L., Delavechia, T., Carvalho, E., Bacellar, O. (2012). Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *Infectious Disease*, 12, 1-9.
- González-Cuéllar, M.P. (2019). Interés farmacológico y terapéutico del extracto de ajo envejecido (AGE). Trabajo de fin de grado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, España. pp. 21.
- Gray, P., Goeddel, D. (1983). Cloning and expression of murine immune interferón cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 5842-5846.
- Gupta G, Oghumu S, Satoskar R. (2013). Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Advances in Applied Microbiology*, 82, 155-184.
- Gutiérrez-Rebolledo, G.A., Drier-Jonas, S., Jiménez-Arellanes, M.A. (2017). Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: an update. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10, 1105-1110.
- Hernández-Ruiz, J. y Becker, I. (2006). CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. *Salud Pública de México*, 48, 430-439.

-
- Hide, M., Bucheton, B., Kamhawi, R., Bras-Gonçalves, R., Sundar, S., Lemesre, J., Banuls, A. (2007). Understanding human leishmaniasis: the need for an integrated approach, en: Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies. Tibayrenc, M (Ed). John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, pp. 87-123.
- Honda, P., Ferreira, I., Cortéz, D., Amado, C., Silveira, T., Breznan, M., Lonardoní, M. (2010). Efficacy of components from leaves of *Calophyllum brasiliense* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Phytomedicine*, 17, 333-338.
- Jheman, J.L. (2008). Leishmaniasis cutánea en el estado de Quintana Roo, México. *Dermatología Revista Mexicana*, 52, 3-9.
- Jiménez-Arellanes, M., Alamilla-Fonseca, L., Gutiérrez-Rebolledo, G., (2014). Las plantas medicinales de México como fuente de compuestos activos contra la leishmaniasis. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45, 19-30.
- Jiménez-Camacho, D. (2015). Leishmaniasis. Parasitosis. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 614, 129 - 133.
- Jiménez, P. K. (2016). Leishmaniasis cutánea. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 618, 17-21.
- Kamhawi, S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infection. *Microbes and Infections*, 2, 1765-1763.
- Kaye, P., Scott, P. (2011). Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 604 - 615.
- Kyo, E., Uda, N., Kasuga, S., Itakura Y. (2001). Immunomodulatory effects of aged garlic extract. *The Journal of Nutrition*, 131, 1075S-1079S.
- Lago, J., Silva, J., Borja, L., Fraga, D., Schriefer, A., Arruda, S., Lago, E., Carvalho, E., Bacellar, O. (2019). Clinical and histopathologic features of canine tegumentary leishmaniasis and

the molecular characterization of *Leishmania braziliensis* in dogs. *PLOS Neglected Tropical Disease*, 13, 1-14.

Ledezma, E., Jorquera, A., Bendezu, H., Vivas, J., Pérez, G. (2002). Antiproliferative and leishmanicidal effect of ajoene on various *Leishmania* species: ultrastructural study. *Parasitology Research*, 88, 748-753.

Lezama-Davila, C.M, Pan, L., Isaac-Márquez, A.P, Terrazas, C., Oghumu, S., Issac-Márquez, R., Pech-Dzib, M.Y, Barbi, J., Calomeni, E., Parinandi, N., Kinghorn, A., Satoskar, A. R. (2014). *Pentalinon andrieuxii* root extract is effective in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. *Phytotherapy Research*, 28, 909-916.

Lopes de Almeida. (2000). Formulación farmacéutica de productos fitoterapéuticos, en: Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos, Pinzón, S.R. (Ed). CAB, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia, pp. 246

López-García, B., Ortonobes, S., García-Rebollar, C. (2015). Ungüentos, pomadas, cremas, geles y pastas: ¿es todo lo mismo? Pequeñeces y rarezas. *Revista de Pediatría de Atención Primaria*, 8, 183-187.

Loría-Cervera, E.N., Sosa-Bibiano, E.I., Villanueva-Lizama, L.E., Van Wynsberghe, N., Schountz, T., Andrade-Narváez, F.J. (2014). Cloning and sequence analysis of *Peromyscus yucatanicus* (Rodentia) Th1 (IL-12p35, IFN- γ and TNF- α) and Th2 (IL-4, IL-10 and TGF- β) cytokines. *Cytokine*, 65, 48-55.

Marovac, J. (2001). Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Revista Médica de Chile*, 129, 99-106.

Manzaba-Jiménez, C. (2019). Estandarización de una técnica molecular de PCR para la identificación de especies de *Leishmania*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Loja, Ecuador. pp. 96.

-
- Martín-Quintal, Z., Moo-Puc, R., González-Salazar, F., Chan-Bacab, M.J., Torres-Tapia, L.W., Peraza-Sánchez, S.R. (2009). *In vitro* activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 463- 467.
- Martín-Quintal, Z., García-Miss, M.R., Mut-Martín, M., Matus-Moo, A., Torres-Tapia, L.W. Peraza-Sánchez, S.R. (2010). The leishmanicidal effect of (3S)-16,17- didehydrofalcarinol, an oxylinolipin isolated from *Tridax procumbens*, is independent of NO production. *Phytotherapy Research*, 24, 1004-1008.
- Mata-Espinosa, D., Hernández-Pardo, R. (2008). Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Revista de Investigación Clínica*, 60, 421-431.
- McGwire, B.S., Satoskar A. R. (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Quarterly Journal of Medicine: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 107, 7-14.
- Mendez-Bejarano, C. (2014). Cuantificación de la carga parasitaria en leishmaniasis cutánea por medio de PCR en tiempo real. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. pp. 126.
- Megías, M., Molist, P., Pombal, M.A. (2019). Atlas de histología vegetal y animal. Tejidos animales. http://mmegias.webs.uvigo.es/a-imagenes-grandes/epitelio_estrat_plano.php [Acceso 08 junio 2021].
- Molina, I., Fisa, R., Riera, C., Falcó, V., Elizalde, A., Salvador, F., Crespo, M., Curran, A., López-Chejade, P., Tebar, S., Pérez-Hoyos, S., Ribera, E., Pahissa, A. (2013). Ultrasensitive real time PCR for the clinical management of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89, 105-110.
- Moreno-Frigols, J.L., (2012). Innovaciones farmacéuticas para la administración de medicamentos. Real Academia de la Comunidad Valenciana. Discurso de presentación del Académico numerario. Valencia. pp 161.

-
- Mussi, S.V., Fernandes, A.P., Miranda-Ferreira, L.A. (2007). Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology Research*, 100, 1221-1226.
- Navarrete-Franco, G. (2003). Histología de la piel. *Revista de la Facultad de Medicina (UNAM)*, 46, 130-133.
- Neira, L.F, Peña, D.P., Vera, A.M., Mantilla, J.C., Escobar, P. (2019). Leishmaniasis cutánea inducida por especies de *Leishmania viannia* en ratones BALB/c y eficacia de un tratamiento tópico. *Revista de la Universidad de Santander*, 51, 33-42.
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G. (2002). Real-time PCR for detection and quantitation of *leishmania* in mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1666-1669.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud) (2013). Leishmaniasis en las Américas, Recomendaciones para el tratamiento. Enfermedades transmisibles y análisis de salud, Washington, DC.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2019). Enfermedades transmitidas por vector. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>, [Acceso 1 mayo 2019].
- Pearson, R. (2017). Leishmaniasis, University of Virginia School of Medicine. Manual MSD. <https://www.msdmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/infecciones-parasitarias-protozoos-extraintestinales/leishmaniasis-leishmaniosis> [Acceso 1 mayo 2019].
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M.R., Mut-Martín, M. (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.

-
- Pérez, F. (2016). Actualidad y perspectivas en el tratamiento tópico y local de la leishmaniasis cutánea. Trabajo de fin de grado. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España. pp. 27.
- Ramos-Martínez, E., Villaseñor-Cardoso, M.I., López-Vancell, M.R., García-Vázquez, F.J., Pérez-Torres, A., Salaiza-Suazo, N., Pérez-Tamayo, R. (2013). Effect of 1,25(OH)₂D₃ on BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. *Experimental Parasitology*, 134, 413–421.
- Rodríguez, E. (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioethica*, 13, 25-40.
- Reyes Flores, O. (1993). Histopatología de la leishmaniasis. *Dermatología Venezolana*, 31, 22-23.
- Ríos, J.M., Sousa, O. (2010). Inmunología en la infección por *leishmania*: Conceptos actuales. *Revista Médico Científica*, 23, 19-31.
- Rosas, L.E., Keiser, T., Barbi, J., Satoskar, A.A., Septer, A., Kaczmarek, J., Lezama-Davila, C.M., Satoskar, A.R. (2005). Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *International Immunology*, 17, 1347-1357.
- Salah, A.B, Messaoud, N., Guedri, E., Zaatour, A., Alaya, N., Bettaieb, J., Gharbi, A., Hamida, N., Boukthir, A., Chlif, S. (2013). Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*, 6, 524-532.
- Sharapin, N. (2000). Materias primas vegetales para la industria de productos fitoterapéuticos, en: Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos, Pinzón, S.R (Ed). CAB, Bogotá, Colombia, pp. 247.
- SINAVE (Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica). Sistema Único de Información. Secretaría de Salud, 2019. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y->

programas/direccion-general- de-epidemiologia-boletin-epidemiologico. [Acceso junio 2021].

Torres-Guerrero, E. Arenas, R. (2018). Leishmaniasis. Alternativas terapéuticas actuales. *Dermatología Revista Mexicana*, 5, 400-409.

Vallenas, G., Alvarado, J., Barrón, E., Perales, R., Gavidia, C. (2013). Modelo de infección experimental para la obtención de *E. granulosus* adultos y quistes hidatídicos secundarios en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24, 233-239.

Vera, A.M., Casadiego, O.A., Mantilla, J.C, Escobar, P. (2018). Evaluación de formulaciones de ketoconazol para uso tópico en leishmaniasis cutánea por *Leishmania (Viannia)*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35, 476-482.

Vidal-Cagigas, A. (2003). Inmunología de la leishmaniasis cutánea americana. *Revista Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 11, 211-224.

Yaduvanshi, B., Mathur, R., Mathur, S.R., Velpandian, T. (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.

Zambrano, P. (2014). Leishmaniasis. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud, Colombia, pp. 17.

Zubia-Mendoza, E., de los Reyes Jiménez, C., Ortega-Agüera, M., Motilva-Sánchez, V., Ávila-Román, J., García-Mauriño, S., de la Jara Valido, A., Mendoza-Guzmán, H. (2013). Uso de oxilipinas y sus derivados como agentes antiinflamatorios. *Patentados.com.*, pp. 27.

ANEXOS

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES

Los componentes del excipiente se agregaron a los porcentajes de acuerdo con lo indicado por la Dra. Rubí Gamboa León, quién tomó un curso con el Ing. Tomás Ornelas Salas en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Componentes:

- Alcohol estearílico
- Alcohol cetosteárico
- Vaselina líquida
- Aceite mineral
- Aceite de oliva
- Cera de abeja

El primer paso es pesar los componentes.

Una vez pesados, se agregan todos los componentes en un vaso de precipitado y se coloca a baño maría a una temperatura de 70 °C junto con el magneto para homogeneizar la mezcla. Mientras se van mezclando los componentes, se le va agregando el agua purificada (previamente calentada a 80 °C) y se agita constantemente hasta alcanzar la consistencia deseada. Posteriormente, la mezcla se pesa en una balanza para obtener el rendimiento.

Una vez lista la crema, los componentes activos se añaden de acuerdo con los porcentajes deseados y de acuerdo con los microlitros y días de administración.

Siendo la preparación para 10 ratones por cada concentración, se realizó la siguiente operación.

$20 \text{ mg (cantidad de tratamiento)} \times 14 \text{ (días de tratamiento)} \times 10 \text{ (ratones)} = 2,800 \text{ mg.}$

Para tener un número entero y cerrado, se preparan 3 g (3,000 mg) de formulación. Se agrega la cantidad de crema y de extracto como se muestra en los siguientes cuadros.

Para la formulación que contiene el extracto acuoso de *A. sativum* se preparó un stock a una concentración de 1 g/mL.

Cuadro A1.1. Cantidades para la preparación de las formulaciones con extracto de *A. sativum*.

Porcentaje (%)	Cantidad de excipiente (g)	Extracto de <i>A. sativum</i> (g)
1	2.97 g	0.03
5	2.85 g	0.15
10	2.70 g	0.30

Tanto la fracción hexánica de *T. procumbens* como el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina) se agregaron directamente al excipiente en crema.

Cuadro A1.2. Cantidades para la preparación de las formulaciones con la fracción hexánica de *T. procumbens*.

Porcentaje (%)	Cantidad de excipiente (g)	Cantidad de <i>T. procumbens</i> (g)
1	2.97	0.03
2	2.94	0.06
5	2.85	0.15

Cuadro A1.3. Cantidades para la preparación de las formulaciones con el compuesto activo (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (oxilipina).

Porcentaje (%)	Cantidad de excipiente (g)	Cantidad de oxilipina (g)
1	2.97	0.03
2	2.94	0.06
5	2.85	0.15

ANEXO 2. EXTRACCIÓN DE ADN POR EL MÉTODO DE FENOL-CLOROFORMO

Extracción de ADN de tejido animal

1. Para cada muestra a procesar, adicionar 600 μL de disolución de lisis a un tubo de microcentrífuga.
2. Tomar un fragmento pequeño de tejido (aprox. 1 cm o 100 mg) y colocar inmediatamente en hielo (a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ si no se trabajan las muestras inmediatamente) para evitar al máximo la degradación del material. Transferir el tejido a un mortero y cortarlo en fragmentos pequeños.
3. Macerar cuidadosamente el tejido adicionando poco a poco la disolución de lisis (previamente separada) hasta observar que el tejido se ha degradado por completo.
4. Tomar el macerado con una micropipeta, colocarlo en un tubo de microcentrífuga y adicionar 20 μL de proteinasa k (20 mg/mL). Poner en un vórtex la muestra e incubar toda la noche a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Retirar la muestra del baño y dejar enfriar. Adicionar 3 μL de RNasa, mezclar por inversión e incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Permitir que la muestra se enfríe antes de seguir con el procedimiento.
6. En un tubo de microcentrífuga preparar una mezcla en igual volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (1:1:1). 300 μL cada uno. Mezclar por inversión.
7. Adicionar a la muestra el fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (1:1:1) y mezclar por inversión durante 15-30 min.
8. Separar la fase orgánica y la fase acuosa por centrifugación. Centrifugar la muestra en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 5 min a temperatura ambiente. Transferir la fase acuosa superior a un tubo nuevo de microcentrífuga, evitando tocar la interfase. Si es necesario, repetir el paso 8 hasta observar cristalina la fase acuosa.
9. Precipitar el ADN adicionando un volumen igual de isopropanol. Agregar 600 μL de isopropanol a la muestra y mezclar suavemente por inversión hasta observar las hebras de ADN.
10. Colectar el ADN precipitado mediante centrifugación a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

11. Remover cuidadosamente el isopropanol evitando desprender el botón de ADN del fondo del tubo. Resuspender. Adicionar 500 μL de etanol al 70%, mezclar por inversión para permitir que el ADN se lave con el alcohol. Centrifugar a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 2-5 min. a temperatura ambiente.
12. Remover el etanol evitando desprender el botón de ADN del fondo del tubo. Permitir que el etanol se evapore y la pastilla de ADN se seque durante 15-20 min a temperatura ambiente.
13. Adicionar 100-500 μL de TE (pH 8) y resuspender el ADN. Mantener a 4 °C hasta su uso.

ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE ARN MEDIANTE EL KIT COMERCIAL ALLPREP DNA/RNA MINI KIT (QIAGEN)**Consideraciones a tener en cuenta antes de la extracción**

1. Si se va a purificar ARN de líneas celulares o tejidos ricos en RNasas, es necesario añadir 10 μ L de β -mercaptoetanol (β -ME) o 20 μ L de ditioneitol 2 M (DTT) a 1 mL de buffer RLT Plus antes de usarse. El buffer RLT Plus con β -ME o DTT puede ser almacenado a temperatura ambiente durante 1 mes.
2. Añadir 4 volúmenes de etanol (96-100%) al buffer RPE como disolución de trabajo final.
3. Las burbujas pueden ser reducidas añadiendo el reactivo DX de Qiagen (cat. No. 19088) a una concentración final de 0.5% (v/v) antes de la disrupción y homogeneización.

Extracción de ARN de tejido animal

1. No emplee más de 40 mg de tejido.
2. Realice la disrupción del tejido cortándolo en pequeños pedazos con una tijera y homogeneice el lisado (con mortero) en el volumen apropiado de buffer RLT Plus (Cuadro A3.1).
3. Posteriormente, transfiera todo el volumen del lisado a un vial de 1.5 mL y centrifúguelo durante 3 min a máxima velocidad.
4. Tome el sobrenadante cuidadosamente mediante pipeteo.
5. Transferir el lisado homogeneizado (sobrenadante) a una columna AllPrep DNA spin (color violeta) depositada en un tubo de colección de 2 mL.
6. Cierre la tapa cuidadosamente y centrifugue durante 30 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm).

Cuadro A3.1. Volúmenes de buffer RLT Plus para la disrupción y homogeneización.

Tipo de muestra	Tamaño	Disco (cm)	Buffer RLT Plus (µL)	Disrupción y homogeneización
Células/mL	$<5 \times 10^6$	<6	350	Añadir buffer RLT, vórtex; o QIAshredder, TissueRuptor o aguja y jeringa.
	$\leq 1 \times 10^7$	6-10	600	
Tejidos (mg)	<20	-	350	Añadir buffer RLT, mortero y pistilo, QIAshredder, TissueRuptor o aguja y jeringa.
	≤ 30	-	600	

Para continuar con la extracción de ARN total, conserve el filtrado en el tubo de colección (paso 2) y realice los pasos siguientes.

NOTA: no almacene las columnas empleadas a temperatura ambiente (15-25 °C) ni a 4 °C durante largos períodos. Tampoco congele las mismas.

Purificación de ARN total

1. Añadir 1 mL de etanol al 70% al filtrado contenido en el tubo de colección (paso 2 de la sección anterior **Extracción de ARN de tejido animal**). Mezcle bien mediante pipeteo. No centrifugue. Continúe inmediatamente con el próximo paso.
2. Transferir 700 µL de la muestra, incluyendo cualquier precipitado, a una columna RNeasy spin (color rosado), colocado en un tubo colector de 2 mL. Centrifugue durante 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Una vez finalizada la centrifugación, descarte el filtrado. Nota: Reutilice este tubo de colección en los pasos 3, 4 y 5.
3. Añada 700 µL de buffer RW1 a la columna RNeasy spin. Cierre la tapa y centrifugue durante 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Una vez finalizada la centrifugación, descarte el filtrado.

4. Añada 500 μ L de buffer RPE a la columna RNeasy spin. Cierre la tapa y centrifugue durante 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Una vez finalizada la centrifugación, descarte el filtrado.
5. Añada 500 μ L de buffer RPE a la columna RNeasy spin. Cierre la tapa y centrifugue durante 2 min a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Descarte el tubo de colección.
6. Coloque un tubo de 1.5 mL a la columna RNeasy spin y añada 20 μ L de agua libre de RNasa directamente a la membrana de la columna. Cierre la tapa y centrifugue durante 1 min a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) para eluir el RNA.

Nota: conserve las muestras extraídas a -20 °C hasta su posterior utilización.