

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**ACTIVIDAD CONTRA PROMASTIGOTES DE
Leishmania mexicana DE EXTRACTOS DE SIETE
PLANTAS POPULARMENTE USADAS PARA EL
TRATAMIENTO DE INFECCIONES POR PROTOZOOS
EN GUATEMALA**



Informe de Tesis

Presentado por:

ANNA GABRIELA SOTO PINEDA

Para optar el título de:

QUIMICA BIOLOGA

Guatemala, junio de 1998

c6
T(1880)
c.4

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
SECRETARIO	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
VOCAL I	Dr. Oscar Manuel Cóbar Pinto
VOCAL II	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
VOLCAL III	Lic. Rodrigo Herrera San José
VOCAL IV	Br. Herberth Raúl Arévalo Alvarado
VOCAL V	Br. Manola Anlen Fortuny

ACTO QUE DEDICO

A MIS PADRES

**Carlos Rafael Soto Rosales
Paulina Pineda Aldana de Soto
Con respeto, admiración y cariño.
Gracias por su amor y apoyo incondicional.**

A MIS HERMANOS

**Patty, Luis, Jorge, Peter, Liz,
Juan Pablo y con especial cariño a Juan Luis.**

A MIS SOBRINOS

Luis Roberto, Luis Alfredo, Luis Alejandro y Anna Lucia.

A MI NOVIO

**Luis Armando
Gracias por el amor, amistad y alegría que me das cada día.**

AGRADECIMIENTO

Agradezco sinceramente a todas aquellas personas e instituciones que colaboraron con la realización de esta investigación, en especial a:

Lic. Armando Cáceres Estrada por su valiosa asesoría.

Licda. Sonia Cecilia González Chamalé y Licda. María Beatriz López, por su colaboración.

Laboratorio de Entomología Médica de la Universidad del Valle de Guatemala.

Laboratorio del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, IIQB.

A mis amigos: Karla, Elizabeth, Neida, Francisco, Héctor y en especial a Ceci, Omar y a la promoción 38 de Bachilleres del Liceo Francés, gracias por el cariño y apoyo demostrado a través de los años.

Al personal administrativo de la Escuela de Química Biológica, en especial a Sheny.

INDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	3
3.	Antecedentes	5
	3.1 Ciclo vital	9
	3.2 Formas clínicas	10
	3.2.1 Leishmaniasis cutánea	10
	3.2.2 Leishmaniasis mucocutánea	14
	3.2.3 Leishmaniasis visceral	15
	3.3 Diagnóstico	17
	3.4 Tratamiento	19
	3.5 Estudios etnobotánicos	21
	3.5.1 <i>Acalypha guatemalensis</i> Pax. & Hoffm.	23
	3.5.2 <i>Croton guatemalensis</i> Lotsy.	24
	3.5.3 <i>Jatropha curcas</i> L.	25
	3.5.4 <i>Ocimum micranthum</i> Willd.	26
	3.5.5 <i>Rhizophora mangle</i> L.	27
	3.5.6 <i>Smilax lundellii</i> Killip & Morton.	29
	3.5.7 <i>Solanum nigrescens</i> Mart. & Gal..	29
4.	Justificación	31
5.	Obejtivos	32
6.	Hipótesis	33

7.	Materiales y Métodos	34
	7.1 Universo de trabajo	34
	7.2 Recursos	34
	7.3 Metodología	36
	7.4 Diseño experimental	38
	7.5 Análisis de datos	39
8.	Resultados	40
9.	Discusión de Resultados	43
10.	Conclusiones	45
11.	Recomendaciones	47
12.	Referencias	48
13.	Anexos	57
	13.1 Ciclo vital del género <i>Leishmania</i>	58
	13.2 Factores de riesgo observados en Leishmaniasis cutánea en áreas endémicas en Guatemala	59
	13.3 Curva de crecimiento de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> cepa MNYC/BZ/62/M379	60
	13.4 Plantas a evaluarse actividad antileishmania	61
	13.5 Porcentaje de rendimiento de extracción del material vegetal	62
	13.6 Actividad vegetal contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	63

1. RESUMEN

Las infecciones producidas por protozoos del género *Leishmania* son un problema de salud en las regiones tropicales del mundo, por lo que en 1991 la Organización Mundial de la Salud (OMS) la designó como una de las seis afecciones tropicales más importantes para la salud humana.

Posee un alto índice endémico en los países en desarrollo; en Guatemala se han descrito y diagnosticado las tres formas clínicas básicas en varias regiones, procediendo el 81% de los casos de los departamentos de El Petén, Alta Verapaz, Quiché, Izabal y Huehuetenango.

El uso de las drogas disponibles para el tratamiento de la leishmaniasis, los compuestos antimoniales pentavalentes, se ha tornado inadecuado por la toxicidad de los fármacos, los cursos prolongados y la necesidad frecuente de hospitalización.

Con el objeto de buscar nuevas opciones terapéuticas que proporcionen menor toxicidad y faciliten el acceso y administración de los mismos, se analizaron 21 extractos (etanólico, diclorometánico y acuoso) provenientes de siete plantas (*Acalypha guatemalensis* Pax & Hoffm., *Croton guatemalensis* Lott, *Jatropha curcas* L., *Ocimum micranthum* Willd., *Rhizophora mangle* L., *Smilax lundellii* Killip & Morton y *Solanum nigrescens* Mart. & Gal.).

Estas son usadas popularmente para el tratamiento de infecciones por protozoos en Guatemala y fueron evaluadas por su posible actividad contra promastigotes de *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379 la cual fue proporcionada por el Departamento de Entomología Médica de la Universidad del Valle de Guatemala.

La metodología utilizada fue un bioensayo en microplacas de 96 pozos basado en la inhibición *in vitro* del crecimiento del parásito, a tres diferentes concentraciones del vegetal (1,000 µg/ml, 500 µg/ml y 250 µg/ml).

Se encontró actividad inhibitoria del 100% contra promastigotes de *L. mexicana* a las tres concentraciones ensayadas en el extracto diclorometánico de *Rhizophora mangle* y extracto acuoso de *Solanum nigrescens*, esta última planta mostró actividad inhibitoria del 90% a la mayor concentración y extracto etanólico.

De acuerdo con los resultados obtenidos se observa la necesidad de continuar con estudios *in vivo* de las plantas que presentaron actividad antileishmania *in vitro* en la presente investigación, al igual que determinar la toxicidad de las mismas para posteriormente considerar su uso como terapéuticos para humanos.

2. INTRODUCCION

La leishmaniasis es una infección por especies del género *Leishmania*. Es una zoonosis transmitida por piquetes de moscas papatachi (especies *Phlebotomus*) de reservorios animales silvestres o domésticos al hombre, excepto el kala-azar hindú que se transmite de hombre a hombre. La leishmaniasis tiene dos formas diferentes en su ciclo de vida: en hospederos mamíferos infectados, el parásito se encuentra en su forma amastigote (2 a 3 μm de largo) dentro de fagocitos mononucleares; y en la mosca papatachi vector, el parásito se convierte a promastigote extracelular flagelado, que es el que se transmite.

Sus características y manifestaciones clínicas dependen del tipo de parásito que ocasione la infección, del estado inmunológico del paciente y pueden clasificarse en viscerales, cutáneas y mucocutáneas. Los grados de infección varían de subclínico o patógeno mínimo que se cura espontáneamente y se trata con facilidad, a incapacitante grave, metastatizante, mutilante y mortal.

El diagnóstico definitivo se logra encontrando el parásito en cualquiera de sus dos formas, ya sea el amastigote en biopsias o frotis teñidos o el promastigote móvil en cultivos. Las pruebas serológicas y cutáneas sólo proporcionan signos indirectos de infección.

Las drogas disponibles para el tratamiento de la leishmaniasis fueron desarrolladas antes de 1,960, siendo los antimoniales pentavalentes los de elección, en caso fallar, como segunda línea se utilizan las Pentamidina y la Anfotericina B. Los dos primeros presentan toxicidad renal, cardíaca y neural, el último está restringido su uso a pacientes hospitalizados.

El descubrimiento y administración de nuevas drogas antileishmaniales provenientes de la medicina tradicional no es un fenómeno nuevo; ésto dado por la necesidad de elaborar nuevos agentes, no sólo, por la existencia de tratamientos fallidos, sino también para obtener menor toxicidad y facilitar la administración de los mismos.

3. ANTECEDENTES

El género *Leishmania* fue establecido por Ross, en 1,903, para *Leishmania donovani*, el flagelado causal del kala-azar (1). Las especies que pertenecen a este género presentan una fase de *Leishmania* y de *Leptomonas* en su ciclo biológico y como hospederos vertebrados, dípteros del género *Phlebotomus* (2).

Las especies del género *Leishmania* tienen un núcleo, un cinetoplasto y un axonema que no llega a formar una membrana ondulante. La morfología que presentan en el hombre u otros hospederos vertebrados es la leishmania típica; es decir, un cuerpo ovoideo que contiene un núcleo y un cinetoplasto. En el vector invertebrado, el cuerpo se torna fusiforme y tiene un sólo flagelo, que sale del axonema en el extremo anterior del cuerpo. Se reproducen por fisión binaria (3) en la cual el bleferoplasto y el corpúsculo parabasal se dividen primero, y después el núcleo y el citoplasma dando como resultado dos organismos hijos (4).

En el pasado estos parásitos eran clasificados de acuerdo a sus manifestaciones clínicas, distribución geográfica y características de crecimiento *in vitro* y en animales de laboratorio (3). Recientemente estudios taxonómicos de aislados de leishmania, indican diversidad en género, incluyendo un número de especies nuevas descubiertas particularmente en área selváticas de los Neotrópicos.

Además a causa de las diferencias en virulencia y variadas respuestas a agentes quimioterapéuticos, la identificación correcta del parásito basados en criterios moleculares es esencial para el estudio de la clinicopatología de la leishmaniasis (5).

Se encuentra altamente distribuída en América, en regiones tropicales y subtropicales del Nuevo Mundo (3). Este desórden es básicamente una zoonosis y se ha asociado a habitantes selváticos en donde los animales salvajes usualmente sirven de hospederos del parásito y una variedad de moscas están implicadas como vectores (6).

Muchas infecciones de leishmania se resuelven por sí sólas, en algunos casos asintóticamente. La respuesta a la infección depende de la respuesta inmune del hospedero y virulencia del agente infeccioso (7).

En las clasificaciones más recientes establecidas para las especies de leishmania, fueron consideradas las características clínicas y epidemiológicas como un buen número de criterios moleculares y biológicos. Dentro de las especies de leishmania que causan patología humana en el Nuevo Mundo están (3):

- *Leishmania brasiliensis*

L. b. brasiliensis, *L. (Leishmania) brasiliensis*, *L. (Viannia) brasiliensis*.

- *Leishmania guyanensis*

L. b. guyanensis, L. (V.) guyanensis

• *Leishmania panamensis*

L. b. panamensis, L. (L.) panamensis, L. (V.) panamensis

• *Leishmania lainsoni*

L. (V.) lainsoni

• *Leishmania mexicana*

L. mexicana mexicana, L. (L.) mexicana

• *Leishmania amazonensis*

L. m. amazonensis, L. (L.) amazonensis

• *Leishmania venezuelensis*

L. m. amazonensis, L.(L.) venezuelensis

• *Leishmania chagasi*

L. donovani chagasi, L. (L.) chagasi

A pesar de sus múltiples etiologías, la leishmaniasis en el Nuevo Mundo puede ser convenientemente clasificada en dos grandes categorías: Leishmaniasis Visceral Americana (LVA) y Leishmaniasis Cutánea Americana (LCA) (3, 7). La amplia categoría LCA, incluye un espectro de desórdenes comúnmente referidos por sus características clínicas y hallazgos patológicos (8): Leishmaniasis Cutánea propiamente dicha, Leishmaniasis Mucocutánea (LMC), la forma hiperérgica y Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD), la forma anérgica (3).

La leishmaniasis visceral se asocia con reservorios caninos, mientras que la leishmaniasis cutánea lo hace con reservorios roedores (7). En ocasiones, el reservorio salvaje es reemplazado por el hombre (2). Los resultados de los experimentos en animales son confusos por lo que respecta a la diferenciación de las especies de manera que, además de las diferencias de los cuadros clínicos que producen en el hombre cada una de ellas, se recurre a reacciones serológicas o cultivos para diferenciarlas (9). No obstante, los cuadros clínicos producidos por las tres especies de leishmania tienen muchos caracteres en común y las reacciones inmunológicas son a veces equívocas. Adler y colaboradores (1966) estudiaron los aspectos inmunológicos en cepas sudanesas de leishmania aisladas de casos humanos de kala-azar, cepas de leishmaniasis cutánea de *Phlebotomus* naturalmente infectados y de cinco especies de roedores igualmente infectados, observando el crecimiento de las cepas en medios que contenían sueros inmunes. Mediante este método todas las especies fueron indistinguibles unas de otras y se les consideró pertenecientes a la misma especie (2).

Lemma y Schiller (1964) comunicaron haber cultivado con éxito en cultivos extracelulares las fases intracelulares de tres especies de leishmania humanas (1).

3.1 Ciclo vital

El ciclo vital del protozoo involucra a un invertebrado (vector) y a un mamífero (reservorio). Los vectores son moscas hembras, zoofílicas de la familia *Psychodidae* del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (2). Las hembras de esta familia necesitan ingerir sangre para completar la maduración de sus huevos. Al picar a un reservorio infectado con *Leishmania* spp. la mosca ingiere sangre con células mononucleares infectadas con amastigotes. Estos pasan al tracto digestivo del flebótomo en donde se convierten en promastigotes que se dividen por fisión binaria y van madurando hasta ser infectivos y llegar a la proboscis del flebótomo (3-4,10). Cuando el vector infectado pica a otro mamífero susceptible, le inyecta los promastigotes (15-22µm de largo y 1.5-3.5 µm de diámetro, con núcleo, cinetoplasto, bleferoplasto y flagelo) que de inmediato son fagocitados por las células del mamífero (11). Al perder su flagelo, los promastigotes se transforman en amastigotes (2-3 µm de diámetro, con núcleo y cinetoplasto) (Cuadro No.1). Dentro de la célula fagocítica se reproducen por fisión binaria (3) y después de un tiempo muy variable, pueden producir una úlcera posteriormente conocida como lesión de leishmaniasis cutánea (9). Cuando el parásito que ocasiona la infección tiene preferencia por los tejidos de la región de la mucosa nasofaríngea, produce una úlcera cutánea pero al mismo tiempo migra hacia las mucosas dando origen a

la leishmaniasis mucosa (9,11). En el caso de leishmaniasis visceral, no hay antecedentes de úlceras cutáneas, porque el parásito migra por el torrente sanguíneo hacia las vísceras especialmente al bazo, la médula ósea, los ganglios linfáticos y otros, produciendo dicha entidad (12-14).

El reservorio del protozoo difiere geográficamente, dependiendo de los hábitos alimenticios de las especies de vectores (15).

3.2 Formas clínicas

Las formas cutánea y mucosa de la leishmaniasis se consideran como una zoonosis de lugares boscosos y tropicales húmedos. La forma visceral se encuentra principalmente en lugares secos y calurosos (2). Las manifestaciones clínicas son una consecuencia de la multiplicación de amastigotes dentro de los macrófagos (11).

3.2.1 Leishmaniasis cutánea:

Los agentes causales de leishmaniasis cutánea en el Viejo Mundo son, *L. tropica* (Medio Oriente, India, Afganistán, Grecia), *L. major* (Medio Oriente, Península Arabe, Afganistán), *L. aethiopica* (Tierras altas de Etiopía, Kenia) (3,12,16).

Los agentes causales de leishmaniasis cutánea en el Nuevo Mundo son, *L. mexicana mexicana* (México, Belice, Guatemala), *L. mexicana amazonensis* (Brasil, Venezuela), otros miembros del complejo *L. mexicana mexicana* (Sudamérica) y el complejo *L. brasiliensis* (Centro y Sudamérica). El complejo *L. donovani* causa en ocasiones lesiones cutáneas y manifestaciones viscerales (3,16).

La incidencia de la patología es alta en los países tropicales y subtropicales más importantes de América. El desarrollo de la agricultura, comunicaciones y el incremento de la densidad demográfica han contribuido a aumentar la prevalencia en los pasados 10 años (4).

Las manifestaciones clínicas de LCA son caracterizadas por dos formas polares y una intermediaria de la infección. La Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL), causada por miembros de los complejos *L. mexicana* y *L. brasiliensis*, se caracteriza por una pocas lesiones que curan espontáneamente y están acompañadas de manifestaciones *in vivo* o *in vitro* de inmunidad mediada por células (3,17-18). La Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD) es la otra forma polar de LCA (18), se caracteriza por numerosas lesiones no ulceradas conteniendo gran número de amastigotes dentro de macrófagos no diferenciados, no hay manifestaciones demostradas de inmunidad mediada por células y la respuesta a terapia antimonial no es satisfactoria (3,17,19).

La tumefacción cutánea aparece de dos a varios meses después de los piquetes de moscas papatachi, puede ulcerarse y eliminar pus o permanecer seca (1). La forma de la úlcera es usualmente hemisférica, la superficie es granulosa, sucia y recubierta por costras melisérico-hemáticas, los bordes característicos cubren toda la úlcera y son elevados e indurados con un color eritematovioláceo (4,7). Las lesiones son indoloras a menos que se infecten de manera secundaria. Rara vez hay síntomas generales, pero al inicio es posible que haya febrícula de corta duración. Puede ocurrir cicatrización espontánea en meses a uno o tres años, lo que varía según la especie. La contracción de las cicatrices puede causar deformaciones, en especial si las lesiones se producen en la cara (7).

En el Viejo Mundo, las infecciones por *L. major* se caracterizan por una lesión húmeda que se ulcera con rapidez; la lesión por *L. tropica* produce una lesión seca que se ulcera con lentitud o no del todo. Casi todas las lesiones en el Nuevo Mundo son úlceras, pero también puede haber lesiones vegetativas, verrugosas o nodulares (7-8,20).

L. mexicana mexicana produce lesiones destructivas en el cartilago auricular ("úlceras de los chicleros"). Hasta el 80% de las lesiones cutáneas por *L. b. brasiliensis* progresan a leishmaniasis mucocutánea (6). Además de las lesiones cutáneas, *L. aethiopica* y *L. amazonensis* también pueden causar leishmaniasis cutánea difusa (21), una forma diseminada, crónica que semeja lepra y se acompaña de alergia (10).

La forma más común de leishmaniasis cutánea en Guatemala es la úlcera, observándose mayormente en la región de El Petén y en la parte norte, pero también se han encontrado lesiones verrugosas en pacientes que provenían de la frontera con Honduras cerca de Morales, Izabal (4).

Según registros del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, a través de la Dirección General de Servicios de Salud han sido confirmados 1,072 casos de leishmaniasis cutánea en Guatemala, en el período de 1974 a 1988; de ellos, 867 (81%) procedían del departamento de El Petén, seguido en menor número por los departamentos de Alta Verapaz, Quiché, Izabal y Huehuetenango (4).

En un estudio realizado por Copeland *et al* (1990), se estimó la prevalencia e incidencia de la leishmaniasis cutánea en Guatemala con datos basados en historias obtenidas por entrevistas a los habitantes de las áreas endémicas, los datos obtenidos demostraron que de una muestra de 2,938 habitantes de 540 casas encuestadas, lo que representa el 1.4% de la población de área endémica, 143 (5%) reportaron historia de la enfermedad y 37 (1.3%) manifestaron el comienzo de la misma 12 meses antes a la entrevista (22). En el mismo estudio se determinaron los principales factores que afectan la prevalencia de la leishmaniasis cutánea en Guatemala entre los que se encontraron el sexo, con una proporción tres veces mayor en hombres que en mujeres; otro factor predisponente es la edad, teniendo una relación directamente proporcional con la

enfermedad y por último el tiempo pasado en áreas selváticas, tanto por razones de trabajo como de vivienda (Gráfica No.1) (22).

El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social reportó 64 casos de leishmaniasis cutánea en Guatemala durante el año de 1990, gracias a estudios realizados por la Universidad de Valle de Guatemala, pero debido a que la leishmaniasis no es una entidad de notificación obligatoria no se cuenta con datos recientes de la prevalencia e incidencia de la misma (22).

3.2.2 Leishmaniasis mucocutánea:

L. brasiliensis brasiliensis causa lesiones nasobucuales graves (espundia) en las áreas boscosas de tierras bajas de Centro y Sudamérica (20). La lesión inicial única o múltiple, se encuentra en piel expuesta; al comienzo es papular (pruriginosa o dolorosa), después nodular y por último puede ulcerarse o tornarse tipo verrugosa o papilomatosa (11). A continuación hay curación local con cicatrización en el transcurso de varios meses a un año (7,23). En una pequeña proporción de pacientes hay una afección nasobucal subsecuente por extensión directa o con mayor frecuencia, metastásica a la mucosa. Puede presentarse al mismo tiempo que la lesión inicial, poco después de la curación, o muchos años más tarde. Por lo general, la primer área afectada es la mucosa de la parte anterior del tabique nasal (8). Puede haber destrucción extensa de tejidos blandos y

cartilago de nariz, cavidad bucal y labios y prolongarse a la laringe y la faringe. Es posible que haya destrucción considerable y horrible con gran sufrimiento. Es común que haya infecciones bacterianas graves. Puede haber linfangitis regional, linfadenitis, fiebre, pérdida de peso, queratitis y anemia (4).

3.2.3 Leishmaniasis visceral (Kala-Azar):

Esta afección es causada principalmente por el complejo *L. donovani*: *L. d. donovani* (India, Bangladesh, Sudán, Etiopía, Kenia, focos aislados en Africa Central, Asia Central Soviética y China), *L. d. infantum* (litoral del Mediterráneo, Medio Oriente, Irán, Afganistán, Pakistán) y *L. d. chagasi* (Sudamérica, en especial Brasil) (3,16,24). En cada localidad, la afección tiene sus características clínicas y epidemiológicas peculiares; han habido epidemias en India, China y Africa Oriental (13). Aunque el hombre es el principal reservorio, también son importantes los reservorios animales, como perros y roedores. El período de incubación suele ser de cuatro a seis meses con un límite inferior de 10 días y un superior de 24 meses. (4,7). Un nódulo local no ulcerado en el sitio del piquete puede preceder a las manifestaciones sistémicas, pero por lo general no es aparente. El inicio puede ser agudo o insidioso. La fiebre con frecuencia sube al máximo dos veces al día con escalofrío y sudoración, debilidad, pérdida de peso, tos o diarrea (25).

El bazo se torna progresivamente voluminoso, duro e insensible. El hígado se encuentra un poco crecido y es común que haya linfadenopatía generalizada (1). La hiperpigmentación de la piel, en especial en manos, pies, abdomen y frente, es notable en pacientes de tez clara. En negros puede haber erupciones verrugosas o úlceras cutáneas (2). Es posible que haya petequias, hemorragia de nariz y encías, ictericia y ascitis. En algunas regiones hay manifestaciones bucales y nasofaríngeas o cutáneas, sin afección visceral. El desgaste es progresivo; la muerte que con frecuencia se debe a infecciones interrecurrentes, ocurre en el transcurso de meses a uno o dos años (26). La leishmaniasis dérmica post-kala-azar puede presentarse de una a dos semanas después de la curación aparente (hasta 10 años en India y China). Es posible que simule lepra, aunque se desarrollan múltiples máculas o nódulos hipopigmentados en lesiones preexistentes. Puede haber placas eritematosas en la cara (4,7-8).

En Guatemala han sido reportados once casos de leishmaniasis visceral en el periodo de 1949 a 1992, nueve de los pacientes eran originarios y residentes del departamento del Progreso, en un área colindante con la cuenca del Río Motagua que cruza por el Progreso, Tulumajillo, Poxté, Júcaro y los Izotes en Sanarate, los otros dos pacientes pertenecían a un área diferente (Jacaltenango y Huehuetenango) y nunca habían salido de allí (4).

3.3 Diagnóstico

Se basa en varios exámenes clínicos, de gabinete y datos epidemiológicos, como la demostración directa del parásito, ensayos inmunológicos para la demostración de anticuerpos específicos contra el parásito, examen histopatológico de biopsias de lesión, cultivo en medio difásico e inoculación en animales de laboratorio (26-27).

Los hallazgos de laboratorio pueden ser no específicos pero sugestivos de hiperesplenismo, descenso en el hematocrito y hemoglobina, granulocitopenia y trombocitopenia. Hay un marcado incremento de inmunoglobulina G y sus subclases e invertida la relación albúmina/globulina (1, 27)

Un diagnóstico específico sólo se puede realizar por medio de la identificación de cualquiera de los dos estadios de leishmania en muestras o biopsias (28). El aspirado de médula ósea es probablemente la más conveniente muestra para buscar parásitos, aunque también son útiles muestras de bazo, hígado, nódulos linfáticos, piel y sangre periférica. Estas pueden cultivarse en medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), Schneider, Evans y otros, e incubarse a una temperatura de 24-27°C durante 4 días (29), para producir promastigotes, observándose el flagelo característico y el cinetoplasto, el cual es menos largo y prominente que el de las especies de *T. cruzi* (1,30).

La inoculación de especímenes en hamsters es un examen sensible, pero consume mucho tiempo y se utilizan las tinciones de Wright o Giemsa para observar al parásito (2,31-32).

El examen cutáneo o examen de Montenegro es altamente específico y de mucha ayuda para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea, siendo positivo hasta 1-3 meses después de la infección cuando la reacción granulomatosa empieza a desarrollarse (1,3,27). Es también positivo en el tipo visceral únicamente después del tratamiento (2,27).

Uno de los exámenes serológicos más frecuentemente mencionados es el examen de anticuerpos fluorescentes indirectos, usando promastigotes de especies de leishmania como antígeno (32). Recientemente, muchos estudios han utilizado el Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), para el diagnóstico de leishmania (1,13,19).

Mediante la hibridación de micromuestras de contacto de tejido con sondas de DNA de los cinetoplastos marcados con isótopos radioactivos, se ha logrado el diagnóstico específico de especies de microorganismos causales de leishmaniasis cutánea humana del Nuevo Mundo (33-35).

3.4 Tratamiento

Es inadecuado por la toxicidad de los fármacos, los cursos prolongados utilizados y la necesidad frecuente de hospitalización (7,36).

El fármaco de elección es el Gluconato de Antimonio Sódico (estibogluconato sódico, *Glucantime*®) (37). Otros fármacos alternativos para algunas formas de infección son Anfotericina B y Pentamidina (38).

El tratamiento con antimoniales pentavalentes se inicia con una dosis de 200 mg, seguida de 20 mg/kg/día (máximo 850 mg/día) en solución al 5% intramuscular (de preferencia) o intravenosa por 4 semanas (7). Estas dosis se basan en las nuevas recomendaciones de la OMS que indican que no hay una base farmacológica para un período de descanso entre los cursos y que el antimonio es menos tóxico cuando se dividen en 2 ó 3 dosis iguales espaciadas (3).

Los estudios realizados por Sáenz *et al.* y García *et al* demuestran que los antimoniales pentavalentes en las dosis permitidas son efectivos en un 90% (para leishmaniasis cutánea), presentando reacciones tales como mialgias, artralgias, cefalea y fiebre; con ausencia de toxicidad miocárdica, hepática, hematológica o renal (39-40). Para el tratamiento de leishmaniasis visceral, los compuestos antimoniales han demostrado ser ineficientes (37), siendo útiles para las formas intracelulares del parásito (41).

La Pentamidina (Isotiocianato de Pentamidina) se administra diario o en días alternos (hasta 15 inyecciones) en dosis de 2 a 4 mg/kg por vía intramuscular (preferiblemente) o vía intravenosa (42). La terapia requerida es larga y costosa y no posee un índice terapéutico tan favorable como el de los antimoniales pentavalentes, presenta toxicidad renal, cardíaca y neural, shock y riesgo de diabetes (7,43).

Para la administración de Anfotericina B se disuelven 500 ml de dextrosa al 5% y se inyectan IV lento durante seis horas en días alternos (7-9,41-42). La dosis inicial de 0.2 mg/kg/día se aumenta de manera gradual a 1 mg/kg/día hasta un total de casi 30 mg/kg (3).

Los pacientes deben vigilarse muy de cerca en el hospital, porque los efectos secundarios pueden ser graves (44).

Otros estudios demuestran que la *Rifampicina*® posee un efecto del 59.2% en pacientes con leishmaniasis tegumentaria americana (45-46).

Otros fármacos alternativos son el *Ketoconazol*® (47-48) y el *Alopurinol*® (16,37) el uso del primero está restringido a pacientes hospitalizados (49) y se ha demostrado que no constituye una alternativa adecuada para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea (48), observándose un ligero aumento de la transaminasa glutámico-pirúvica, lo que sugiere una discreta

hepatotoxicidad (47). El Alopurinol es una estructura análoga del Inosin, y es activo contra una variedad de especies de *Leishmania* y *Tripanosoma*. Administrada oralmente ésta droga representa un tratamiento potencial para leishmaniasis cutánea americana, en dosis de 10.7 - 35.8 mg/kg/día por 2 ó 3 semanas (50).

El Sulfato de Paranomocina ha sido empleado en el tratamiento de *L. mexicana*, encontrándose un porcentaje de efectividad del 87 por ciento contra promastigotes de la misma (44).

3.5 Estudios Etnobotánicos

En áreas endémicas, la población no tiene conciencia de la existencia de la enfermedad, esta es una de las causas por la que todavía no existe información en la literatura sobre las plantas medicinales usadas popularmente para el tratamiento de la leishmaniasis (36,51).

La corteza del tallo y raíz de *Pera benensis*, ha sido utilizada por los nativos de Bolivia para el tratamiento de Leishmaniasis Cutánea, causada por *L. brasiliensis*. Estudios realizados por el Instituto Boliviano de Biología de Altura (IIBA) y el Instituto Francés de Investigación Científica para el Desarrollo en Cooperación (ORSTOM) demostraron que los extractos de dichas partes de la

mencionada planta poseen una significativa actividad contra promastigotes de *Leishmania* spp. (20,52).

Estudios realizados por Savornin *et al* utilizando la planta *Hedera helix*, demuestran actividad *in vitro* contra promastigotes y amastigotes de *L. infantum* y *L. tropica* (36).

En Etiopía se ha estudiado el uso de *Vernonia amygdalina*, encontrándose actividad *in vitro* contra amastigotes de *L. aethiopica* (36). En un estudio realizado por Sauvin en ORSTOM, se determinó la actividad contra *L. amazonensis* del extracto de hojas de *Jacaranda copala* (52-53).

Ampelocera edentula, otra planta utilizada por los indios chimanes de Bolivia para el tratamiento de leishmaniasis cutánea causada por *L. brasiliensis* ha sido estudiada, observándose actividad de extractos obtenidos de corteza sobre promastigotes del parásito a una concentración de 50 µg/ml y se determinó que el compuesto que posee la actividad antileishmania es el 4-hidroxi-1-tetralone (54). En un estudio realizado por Fournet en ORSTOM, en el que se investigaron 43 extractos de plantas utilizadas por los nativos de Bolivia, se encontró actividad *in vitro* antileishmania en 2 de ellas, *Bocconia integrifolia* y *B. pearcei*, y actividad *in vivo* contra *L. amazonensis* o *L. venezuelensis* en 10 extractos; siendo éstos de *Ampelocera edentula*, *Galipea longiflora*, *Pera benensis*, *Oxandra espiñana*, *Berberis* spp., *Aniba canellila*,

Cardiopetalum calophyllum, *Abuta rufescens*, *Abuta pahni*, *Munnozia maronii* (50,52).

En la búsqueda del desarrollo de agentes quimioterapéuticos de plantas medicinales de India; Tandon *et al* encontraron actividad antileishmania en *Nyctanthes arbortristis*, siendo su extracto butanólico el de mayor actividad *in vitro* e *in vivo* contra amastigotes de *L. donovani* (44).

Otras plantas reportadas con actividad antileishmania son: *Gongronema latifolia*, *Dorstenia multiradiata*, *Picralima nitida*, *Cola attiensis* y *Desmodium gangeticum* (Nigeria), a concentraciones de 50 µg/ml (28), *Oxandra espihana* (Bolivia) (31), *Ponnona senegalensis* (Senegal) (55).

3.5.1 *Acalypha guatemalensis* Pax. & Hoffm.

Hierba perenne, erecta, simple o ramificada, de 1 m de alto, vellosa cuando joven; numerosas flores en racimos rojo oscuro, hojas ovaladas y alargadas (55). Perteneciente a la familia *Euphorbiaceae* y conocida como Ccul, corrimiento, gusanillo y sajoí (56). Es nativa de Honduras y Guatemala en donde se ha descrito de Baja Verapaz, Chimaltenango Guatemala, Jalapa, Quetzaltenango, Quiché, Santa Rosa, Sacatepéquez y Sololá (57). El cocimiento de la planta se usa como tónico y diurético (68). Por vía oral se usa para tratar afecciones

gastrointestinales, resfrío, dolores de cabeza de menstruación y cáncer; y en lavados para vaginitis, heridas y llagas (69).

Se le atribuye propiedad antiemética, antiséptica, diurética, espasmolítica y abortiva (70).

3.5.2 *Croton guatemalensis* Lotsy.

Pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, es conocido bajo los nombres populares de caché, chul, guanacaste, hoja amarga, perexartz, quina, sasafrás, zicché (56).

Nativo de América Central, especialmente en Costa Rica son a veces plantados como rompevientos en plantaciones de café (57).

Es un árbol o arbusto delgado, hasta de 8 m de alto, hojas firmes, membranosas, en largos o cortos pecíolos. Inflorescencia en racimos axilares, numerosas y más cortas que los sépalos; pétalos lanceolados y ciliados (56-57).

En Guatemala se ha descrito en las regiones de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Quetzaltenango, Quiché, Retalhuleu, Sacatepéquez, Santa Rosa y Suchitepéquez (58).

La decocción de hojas se usa como desinflamante; la de corteza es amarga y se usa para tratar fiebres intermitentes, inflamación (56), anemia, escalofríos, malaria, resfrío (59), reumatismo, enfermedades gástricas, renales y

respiratorias (56). De la corteza se prepara un elixir para tratar malaria y tuberculosis (60).

3.5.3 *Jatropha curcas* L.

Pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, conocida como coquito, pinocillo, sukilté, tempate y yupur (56). Arbusto o árbol pequeño de 2-5 m de alto. Las hojas son subcorazonadas, redondas, angulosas de 7-16 cm de diámetro (57). Las inflorescencias son cimas pequeñas con flores blanquecinas, unisexuales; el fruto es una cápsula ovalada, ligeramente carnosa de 3-4 cm de largo, que se abren en 2 ó 3 valvas (56). Las semillas miden aproximadamente 2 cm de largo (56-57). Es nativa de México, siendo de las más comunes en el país y en Centro América; naturalizada en Sur América, el Caribe y el Viejo Mundo (57).

En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (60).

La decocción de hojas se usa tópicamente para baños en casos de fiebres y catarrros; por vía oral es útil para tratar afecciones gastrointestinales (67). El látex del tallo y hojas es ligeramente antiséptico, se usa para tratar gingivitis,

heridas, fracturas, hemorroides, hemorragias, herpes, llagas, picaduras de insectos, quemaduras, úlceras, verrugas y lepra (57,67).

Estudios realizados por Khafagy MS *et al.* demuestran que las semillas se usan comúnmente en la medicina tradicional en Africa y América para tratar artritis (66). La semilla contiene un purgante muy fuerte (68).

Hirota M *et al.* y Horiuchi H *et al.* identificaron el principio tóxico del látex como DHPB (4' [12', 14'-butanodienil] -6'- [16', 18', 20'-nonatrienyl]-bicyclo [3.1.0] hexano-2'-[ácido carboxílico] -3'- [8'-ácido butanólico 10'] diester de 12-deoxi-16-hidroxiforbol), caracterizándolo por sus propiedades carcinógenas (68).

3.5.4 *Ocimum micranthum* Willd.

Perteneciente a la familia *Lamiaceae/Labiatae*, hierba anual de 50 cm de alto, erecta, ramificada, hojas delgadas, ampliamente ovaladas (55). Conocida como albahaca, cimarrona, basen, cacaltum (56). Nativa de América Tropical; en Guatemala se cultiva en jardines y huertos a casi todas las alturas. El cocimiento e infusión de la jierva se usa oralmente para tratar afecciones gastrointestinales, respiratorias y nerviosas. Tópicamente se usa en baños y cataplasmas para tratar afecciones dérmicas (llagas, pólipos, úlceras y verrugas) (74).

Se le atribuye propiedades antisépticas, aromáticas, astringentes, calmantes, diuréticas, espasmolítica y vermífuga.

Las partes de la planta utilizadas son la raíz y la hojas, para tratamiento de problemas de retención urinaria, reumatismo y enfermedades venéreas (76).

3.5.5 *Rhizophora mangle* L.

Conocido como mangle, mangle colorado, mangle rojo, candelón, tabché (58). Arbol de 20 a 30 m de alto, perteneciente a la familia *Rhizophoraceae*; posee raíces aéreas fuertes presentes en tronco y ramas (69). Hojas opuestas ovaladas a elípticas, agrupadas en los extremos de ramas de 5 a 15 cm de largo. Flores campanuladas de color amarillo. Fruto en forma de cono con semillas vivíparas que germinan sobre el árbol (58).

Crece en esteros en asociación con otros árboles, formando un ecosistema especial denominado manglar, en ambas costas del país (67). Nativo de ambas costas de América, desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Chile y Argentina (69).

Las partes utilizadas para la medicina tradicional son la corteza y el fruto; para el tratamiento de heridas, diarrea, disentería (58), dolor de garganta, lepra y sífilis (69).

El medicamento es perfectamente inofensivo, no ocasiona molestias desagradables, ni estreñimiento, diarrea, jaquecas o descomposición de estómago (70).

3.5.6 *Smilax lundellii* Killip & Morton.

Perteneciente a la familia *Smilacaceae*, conocida como cuculmeca, chichikarque, zarzaparilla, bejuco de vida, xocceg y zarza (58). Nativa de bosque húmedos, describiéndose en Guatemala en los departamentos de Alta Verapaz, Izabal, Petén, San Marcos y Santa Rosa (56).

Liana de aspecto carnoso, manojos de raíces y rizomas de 60-70 cm de largo. Con arrugas longitudinales, color rojo-café o naranja-café; la superficie transversa muestra una corteza blanco-café, un xilema amarillo lignificado y una zona parenquimatosa central pálida, no posee olor y su sabor es amargo (71).

En México se usa como diurética, diaforética, antidisentérica, antisifilítica y para aliviar dolores de articulaciones (58). En Centro América se usa para tratar anemia, afecciones digestivas (diarrea, dolor de estómago, inapetencia) (71), hinchazón, malaria, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y venéreas, hepatitis, reumatismo (56) y diversas afecciones dermatomucosas (71).

La maceración hidroalcohólica de *S. lundellii* es activa contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tify*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Streptococcus pyogenes* (72).

Un estudio realizado por Urizar, en 50 pacientes con candidiasis vaginal, demostró que los óvulos a base de tintura de raíz de *S. lundellii* se comportan en forma similar al fármaco de referencia, clotrimazol, comercialmente conocido como *Gyne-Lotrimin*® (73).

En dosis inusualmente grandes puede causar daño, aunque está probado su uso como alimento por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) (56).

3.5.7 *Solanum nigrescens* Mart & Gal.

Pertenece a la familia *Solanaceae*, conocido como macuy y hierba mora. Hierba de 0.5 a 2 m de alto, tallo piloso, hojas en pares o solas, lanceoladas, corda blanca o lila (55). Nativo de México a Costa Rica, crece en matorrales y bosques mixtos (71). En Guatemala se ha descrito en Chiquimulilla, El Progreso, Escuintla, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepéquez, Sololá y San Marcos.

El cocimiento de hojas y semillas es utilizado para tratar afecciones gastrointestinales y respiratorias (57). La decocción de hojas se usa tópicamente

para el tratamiento de afecciones dermatomucosas (72). Se le atribuye propiedad aperitiva, calmante, depurativa, diurética, desinflante, emoliente, febrífuga, mineralizante, reconstituyente y sedante (73).

4. JUSTIFICACION

La Leishmaniasis es una causa significativa de morbilidad y mortalidad en muchos países. Fue designada en 1991 como una de las seis afecciones tropicales más importantes para la salud humana por la Organización Mundial de la Salud. En Guatemala han sido descritas y diagnosticadas las tres formas clínicas básicas (cutánea, mucocutánea y visceral) en diferentes regiones del país.

La principal forma de terapia son los compuestos antimoniales pentavalentes como el Gluconato de Sodio y como una segunda línea, la Anfotericina B y Pentamidina. En algunos casos aún éstos agentes no logran erradicar al parásito y/o pueden tener efectos tóxicos y reacciones adversas, sin descartar que el acceso a ellos es difícil para la mayoría de personas afectadas tanto por el costo elevado como por la falta de disponibilidad de los mismos.

Por éstas razones es importante la búsqueda de nuevos agentes antileishmaniales, por lo que el propósito de la presente investigación fue evaluar la actividad contra el parásito de 21 extractos de plantas popularmente usadas para el tratamiento de infecciones por protozoos.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

- 5.1.1 Demostrar la actividad contra protozoarios de 21 extractos de siete plantas popularmente usadas para el tratamiento de infecciones por protozoos.

5.2 Específicos:

- 5.2.1 Establecer y mantener una cepa de *L. mexicana* en condiciones de cultivo *in vitro*, en el laboratorio del Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 5.2.2 Establecer una base de datos sobre plantas para el tratamiento de úlceras sugestivas de Leishmaniasis.
- 5.2.3 Estandarizar un bioensayo que permita determinar la actividad antileishmania.
- 5.2.4 Determinar la actividad antileishmania de 21 extractos vegetales.

6. HIPOTESIS

Al menos uno de los extractos de las plantas analizadas posee actividad contra promastigotes de *Leishmania mexicana*.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de Trabajo

15 plantas a las que se les atribuye actividad antileishmania, de las cuales se tomó una muestra de siete plantas (*A. guatemalensis*, *C. guatemalensis*, *J. curcas*, *R. mangle*, *S. lundellii*, *S. nigrescens*, *O. micranthum*) obteniéndose tres extractos de cada una para bioensayo de 21 extractos vegetales.

7.2. Recursos

7.2.1. Humanos:

7.2.1.1. Investigadora

Br. Anna Gabriella Soto Pineda

7.2.1.2 Asesor

Lic. Armando Cáceres Estrada

7.2.2. Institucionales:

7.2.2.1. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias

Químicas y Farmacia

- Departamento de Citohistología.

- Departamento de Microbiología, Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR).

7.2.2.2. Universidad Del Valle de Guatemala

- Departamento de Entomología Médica.

7.2.3. Físicos:**7.2.3.1. Equipo:**

- Autoclave
- Incubadora a 27°C
- Microscopio
- Campana de flujo laminar

7.2.3.2. Instrumentos:

- Cámara de Neubauer
- Contadores

7.2.3.3. Material de vidrio:

- Pipetas
- Tubos para cultivo
- Erlenmeyers
- Beakers

7.2.3.4. Reactivos

- Medio Evans-LIT
- Suero bovino fetal

- Penicilina procaína
- Amikacina
- Ketoconazol
- Extractos etanólicos, acuosos y diclorometánicos de las plantas
- Cepa de *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379.

7.3 Metodología

7.3.1 Análisis botánico y químico

7.3.1.1 Se seleccionó el material vegetal (Tabla No.1), recolectándolo preferentemente de campos orgánicamente cultivados en su forma silvestre y se secaron a la sombra.

7.3.1.2 Se tomó una muestra para clasificación botánica en la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se herborizó secándola en un cuarto a temperatura ambiente durante un mes y se guardó en bolsas plásticas en el herbario del Laboratorio Fitofarmacéutico FARMAYA.

7.3.1.3 Se prepararon dos extractos de cada planta en un percolador mediano adaptado, se extrajeron 100 g del material pulverizado seco, primero con 10 vols de diclorometano y luego con 10 vols de etanol por percolación a temperatura ambiente durante 24 horas, cada disolvente.

7.3.1.4 Se repitió el proceso.

7.3.1.5 Se filtraron los extractos obtenidos en papel, se concentraron en rotavapor a temperatura controlada, menor de 45°C y a presión reducida, y finalmente se llevaron a sequedad en una desecadora conteniendo sílica gel.

7.3.1.6 Se extrajeron 25 g de material seco vegetal con 250 ml de agua hirviendo por aproximadamente 24 horas, se filtraron los extractos obtenidos con papel y se congelaron a -40°C.

7.3.1.7 Se pesaron los extractos ya desecados y liofilizados para calcular posteriormente el porcentaje de rendimiento.

7.3.2 Cultivo *in vitro* de *L. mexicana*.

7.3.2.1 Se prepararon tubos de vidrio de 4 ml con 2 ml de medio difásico Evans-LIT.

7.3.2.2 Se preparó una suspensión de 1×10^6 promastigotes/ml, por conteo en cámara de Neubauer y dilución hasta la concentración deseada en medio LIT, de la cepa de *L. mexicana* MNYC/BZ/62/M379 proporcionada por el Departamento de Entomología Médica de la Universidad del Valle de Guatemala.

7.3.2.3 Se inoculó el medio con promastigotes de *L. mexicana* a una concentración de 1×10^6 parásitos/ml.

7.3.2.4 Se incubó a 26°C.

7.3.2.3 Se realizaron resiembras de tubos, cada séptimo día.

7.3.3 Se enfrentaron los extractos seis veces, a tres diferentes dosis (1 mg/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml) a promastigotes de *L. mexicana* en fase estacionaria de 1×10^6 parásitos/ml, en microplacas de 96 pozos.

7.3.4 Se incubaron las microplacas a 26°C por 48 hrs.

7.3.5 Se determinó la actividad vegetal antileishmania, por conteo de promastigotes viables en cámara de Neubauer.

7.4 Diseño Experimental

Diseño totalmente al azar, para las dosis 1, 2 y 3 de cada uno de los extractos, y para los controles positivo y negativo.

Los conteos de promastigotes se tabularon de la siguiente forma:

PLANTA 1	C (-)	C (+)	E1D1	E1D2	E1D3
PLANTA 2	C (-)	C (+)	E1D1	E1D2	E1D3
PLANTA 3	C (-)	C (+)	E1D1	E1D2	E1D3
PLANTA 4	C (-)	C (+)	E1D1	E1D2	E1D3
PLANTA 5	C (-)	C (+)	E1D1	E1D2	E1D3
PLANTA 6	C (-)	C (+)	E1D1	E1D2	E1D3
PLANTA 7	C (-)	C (+)	E1D1	E1D2	E1D3

Igualmente para los extractos 2 y 3. Se realizaron tres cuadros para la lectura a 48 horas. Cada ensayo se repitió seis veces. En donde C (-) fue el control negativo, C (+) fue el control positivo, E1, E2, E3 fueron los extractos 1 (hexánico o diclorometánico), 2 (metanólico o etanólico) y 3 (acuoso) respectivamente; D1, D2, D3 son las dosis 1 (1,000 µg/ml), 500 µg/ml) y 3 (250 µg/ml).

7.5 Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva utilizando porcentajes, tablas y gráficas.

8. RESULTADOS

El estudio fue llevado a cabo en el transcurso de un año, período durante el cual se estableció una base de datos sobre plantas con actividad antiprotozo en Guatemala, determinándose un universo de 33 plantas para tomar una muestra final de siete plantas utilizadas en la terapia tradicional de lesiones cutáneas (58) (*A. guatemalensis*, *C. guatemalensis*, *J. curcas*, *R. mangle*, *S. lundellii*, *S. nigrescens* y *O. micranthum*) para evaluar posible actividad contra promastigotes de *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379 cepa proporcionada por el Departamento de Entomología Médica de la Universidad del Valle de Guatemala (Tabla No. 1).

De cada planta se prepararon tres extractos (diclorometánico, etanólico y acuoso) determinándose que el disolvente que proporcionó mayor porcentaje de rendimiento de extracción fue el etanol (Tabla No. 2)

El protozoo fue cultivado en medio difásico Evans-LIT conteniendo 0.5% de glucosa, 10% de suero bovino fetal, 0.1 mg/ml de penicilina procaína, 0.2 mg/ml de amikacina y algunos 20% de sangre desfibrinada de caballo y otros con 20% de sangre de conejo, para establecer la viabilidad del parásito en ambos reactivos; demostrándose que el último resulta ser un sustituto óptimo para la elaboración del medio.

El ensayo se realizó durante 48 horas ya que se determinó que los extractos vegetales no presentaron mayor actividad durante las primeras 24 horas de incubación

El parásito fue incubado a 26°C y se realizaron resiembras cada 8 días. Observando la curva de crecimiento se determinó que la fase estacionaria utilizando cualquier inóculo inicial se obtiene al quinto día de incubación con una concentración de 1×10^6 promastigotes/ml la que permite realizar el bioensayo (Gráfica No.2)

El control positivo utilizado fue *Ketoconazol*® el que mostró total inhibición del crecimiento del parásito a las 48 horas de incubación y a una concentración de 400 µg/ml, la que fue determinada después de haber realizado varios ensayos con diferentes dosis del control (47). Como control negativo se utilizó parásitos a una concentración de 1×10^6 promastigotes/ml en medio de cultivo y el vehículo solvente (dimetilsulfóxico) DMSO-LIT, a una concentración de 0.5 mg/ml proporcionando resultados óptimos al no interferir en el crecimiento del protozoo durante las 48 horas del estudio.

La actividad vegetal fue evaluada por un bioensayo en microplacas de 96 pozos enfrentando los promastigotes de *L. mexicana* a la concentración mencionada con tres diferentes dosis del vegetal (1,000 µg/ml, 500 µg/ml y 250 µg/ml), en duplicado se incubó a 26°C y se determinó la actividad antileishmania

a las 48 horas de incubación por conteo de los promastigotes viables en cámara de Neubauer. Solamente los extractos de dos plantas presentaron actividad del 100% a las tres concentraciones ensayadas contra el parásito siendo estos el diclorometánico de *Rhizophora mangle* y acuoso de *Solanum nigrescens*, determinándose un IC₉₀ de 13.5 µg/ml y 132 µg/ml respectivamente, esta última planta mostró actividad del 90% contra el protozoo con su extracto etanólico y a una concentración de 1,000 µg/ml (Tabla No. 3).

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Durante la realización de éste estudio se evaluaron 21 extractos de siete plantas popularmente usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones por protozoos, por su posible actividad contra promastigotes de *L. mexicana* y con el objeto de determinar si por lo menos una de ellas presentaba una actividad contra el protozoo. Para ello se utilizaron promastigotes de *L. mexicana* cepa MNYC/BZ/62/M379 proporcionada por el Departamento de Entomología Médica de la Universidad del Valle de Guatemala.

Realizando cultivos del parásito se determinó la sobrevivencia del mismo en tubos de vidrio con medio de cultivo EVANS preparados algunos con sangre de caballo y otros con sangre de conejo, se observó resultados óptimos en ambos casos por lo que se considera adecuado el uso de sangre de caballo como sustituto de la sangre de conejo reportada en la literatura como reactivo para la preparación del medio.

Se realizaron conteos diarios del parásito en cámara de Neubauer durante dos meses para determinar la fase estacionaria del crecimiento del mismo la que se obtiene al quinto día de incubación presentando una concentración de 1×10^6 promastigotes/ml y permaneciendo durante 48 horas aproximadamente.

Se prepararon tres extractos de cada planta (diclorometánico, etanólico y acuoso). Al realizarse la extracción vegetal se determinó que el disolvente que

proporcionó mayor porcentaje de rendimiento fue el etanol probablemente debido a su polaridad afin a la de las fracciones de los vegetales utilizados.

Observando datos en la literatura se menciona que el control positivo a utilizar *Ketoconazol*®, presenta solubilidad en metanol para estudios *in vitro* antileishmania a una concentración de 200 µg/ml (47), realizando bioensayos controles se determinó que éste alcohol presenta toxicidad para el parásito por lo que hubo que encontrar otro disolvente estableciendo que el dimetilsulfóxido es óptimo para el estudio, por lo que el control positivo, fue disuelto en DMSO determinándose su solubilidad luego de varios ensayos, a una concentración de 400 µg/ml.

Se encontró actividad contra promastigotes de *L. mexicana* en dos plantas, *R. mangle* y *S. nigrescens*, obteniéndose la mayor actividad antileishmania en la primera planta, resultados que correlacionan con los obtenidos en otros estudios en los que se utilizan extractos de éstas plantas para el tratamiento tópico de afecciones dermatomucosas (58,69,72-73).

Esta investigación proporciona resultados primarios de actividad antileishmania vegetal, por lo que es importante determinar la actividad de *R. mangle* y *S. nigrescens* contra amastigotes de *L. mexicana* en modelos *in vitro* e *in vivo* para considerar la posibilidad de utilizarlas como terapia tradicional en humanos.

10. CONCLUSIONES

10.1 La concentración óptima de promastigotes de *L. mexicana* para realizar bioensayos *in vitro* de actividad contra el protozoo, se obtiene en el quinto día de cultivo del parásito, manteniéndose su crecimiento en fase estacionaria durante las 48 horas necesarias para el estudio.

10.2 El solvente que proporcionó mayor porcentaje de rendimiento de extracción del material vegetal fue el etanol.

10.3 La concentración óptima del control positivo utilizado en el estudio Ketoconazol® para estudios *in vitro* antileishmania es de 400 µg/ml, obteniéndose 100% de inhibición del crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* durante las 48 horas del bioensayo.

10.4 La concentración utilizada del control negativo DMSO-LIT (0.5%), mostró resultados óptimos permitiendo el mantenimiento de promastigotes de *L. mexicana* en fase estacionaria durante las 48 horas del estudio.

10.5 El extracto diclorometánico de *R. mangle* mostró la mayor actividad inhibitoria antileishmania *in vitro* de los 21 extractos analizados, siendo esta del 100% a las tres concentraciones ensayadas, presentando un IC₉₀ de 13.5 µg/ml.

10.6 El extracto acuoso de *S. nigrescens* mostró actividad antileishmania del 100% a las tres concentraciones ensayadas, determinándose un IC₉₀ de 132 µg/ml.

10.7 Se determinó actividad del 90% de inhibición del crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* a la mayor concentración del extracto etanólico de *S. nigrescens*.

10.8 Observando los resultados obtenidos se concluye que la hipótesis planteada fue comprobada.

11. RECOMENDACIONES

11.1 Determinar el órgano de la planta con mayor actividad antileishmania.

11.2 Investigar actividad antileishmania *in vitro* contra amastigotes de *L. mexicana* de los extractos que presentaron actividad en el ensayo contra promastigotes.

11.3 Continuar el tamizaje de la actividad antileishmania de las plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de infecciones por protozoos en Guatemala.

11.4 Evaluar actividad antileishmania *in vivo* de las plantas que presentaron actividad en el ensayo *in vitro*.

12. REFERENCIAS

1. Cruickson R, Standard K and Russell H. Epidemiology and community health in warm climate countries, Hong Kong: Medicine in the Tropics, 1976. 492p.
2. Sun T. Pathology and clinical features of parasitic diseases, USA: Masson Publishing 1982:5:342p.
3. Jacinto P *et al.* Immunotherapy of Localized Intermediate, and Diffuse forms of American Cutaneous Leishmaniasis. J Inf Dis 1989;160(1):104-115.
4. Arana F *et al.* Guía de apoyo para el diagnóstico de la Leishmaniasis en los servicios de salud, en Guatemala. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala, Organización Mundial de la Salud, Doc.Tec, 1993. 23p.
5. Zielberstein D *et al.* Growth at acidic pH induces an amastigote stage-specific protein in *Leishmania* promastigotes. Mol Bio Par 1991;45:175-178.
6. Sacks D. Metacyclogenesis in *Leishmania* Promastigotes. Exp Par 1989;69:100-103.
7. Bondy P *et al.* El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica. 8ed. España: Doyma, 1989. XXXII+2294p. (p.226-228).
8. Henry JB. Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. 8 ed. México: Salvat. Vols. 2, vol 2, 1992. XLVIII+1774 p. (p. 1507-1508).

9. Perrin C *et al.* Cutaneous spindle-cell pseudotumors due to *Mycobacterium gordonae* and *Leishmania infantum*. An Immunophenotypic study. *Am J Dermatopathol* 1993;15(6):553-558.
10. Sacks D. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 1992;256:1812-1815.
11. Berman J and Wyler D. An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in *Leishmania*. *J Inf Dis* 1980;142(1):83-86.
12. Vernerstrom J *et al.* Berberine derivatives as antileishmania drugs. *Antimic Ag & Chemotherapy* 1990;34:918-921.
13. Spies H and Steenkamp D. Thiols of intracellular pathogens. Identification of ovolthiol A in *Leishmania donovani* and structural analysis of a novel thiol from *Mycobacterium bovis*. *Eur J Biochem* 1994;224(1):203-213.
14. Boyer M and Phil D. Visceral Leishmaniasis in Desert Storm Veterans. *New Eng J Med* 1993;329(2):1503-1054.
15. Bates P, Tson C and Tetley L. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitol* 1992;105:193-202.
16. Marr J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in Leishmaniasis and American Trypanosomiasis. *J Lab Clin Med* 1991;118(2):111-119.
17. Arana F *et al.* Nuevo tratamiento para la Leishmaniasis tegumentaria. *Derma Venez* 1986;24(214):82-84.

18. Convit J *et al.* The clinical and immunological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis. *Trop Med & Hyg* 1993;87:444-448.
19. Gupta S *et al.* Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of kala-azar in Malda district (West Bengal). *Indian J Med Res* 1993;97:242-246.
20. Fournet A *et al.* Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Ethnopharmacol* 1992;37:159-164.
21. Ashford R, Kohestany K and Karinzad M. Cutaneous Leishmaniasis in Kabul: Observations on a "prolonged epidemic". *Annals Trop Med & Par* 1992;86(4):361-371.
22. Copeland H, Arana B, Navin T. Comparison of active and passive case detection of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43(3):257-259.
23. Bates P. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitol* 1994;108:1-9.
24. Pan A *et al.* Developmental Life Cycle of *Leishmania*-cultivation and characterization of culture extracellular amastigotes. *J Euk Mic* 1993;40(2):213-223.
25. Murray H. Blood Monocytes: Differing effector pole in experimental visceral versus cutaneous Leishmaniasis. *Parasitol Today* 1994;10(6):220-223.

26. The UNDP/WORLD BANK/WHO. Se prèmunir de la Leishmanoise grâce à l'éducation por la santé. TDR News 1995;47:2-14.
27. Ellassad A *et al.* The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG aand IgG subclasses in Sudanese Visceral Leishmaniasis patients. Clin Exp Immun 1994;95(2):294-299.
28. Sacks D and Perkins P. Identification of an Infective Stage of Leishmania Promastigotes. Science 1992;94:157-132.
29. Adler S *et al.* Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. Science 1984;223:1417-1419.
30. Hart D, Vickerman K and Coombs G. A quick, simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes in large numbres. Parasitol 1981;82:345-355.
31. Bates P *et al.* *Leishmania mexicana*: Induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. Exp Parasitol 1993;76:412-423.
32. Bates P *et al.* Axenic culture of Leishmania Amastigotes. Parasitol Today 1993;9(4):143-147.
33. Robertson C, Cooms G. Stage-sepecific proteinases of *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes. Science 1992;94:127-132.
34. Barker D. DNA Diagnosis of Human Leishmaniasis. Parasitol Today 1987;3(6):177-184.

35. Bates P *et al.* Characterization of developmentally-regulated nucleases in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Mic Letters* 1993;107:53-58.
36. Savornin BM *et al.* Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their Leishmanicidal activity. *Plant Med* 1991;57:260-262.
37. Hernández A *et al.* Leishmaniasis en el Cantón de Acosta y tratamiento con Glucantime intralesional. *Acta Med* 1982;28(3):162-168.
38. Saenz R *et al.* Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with orally administration Allopurinol Riboside. *J InfDis* 1989;160(1):153-158.
39. Saenz R *et al.* Evaluación de la efectividad y toxicidad del Pentostam y del Glucantime en el tratamiento de la Leishmaniasis Cutánea. *Rev Med Panamá* 1987;12(3):148-157.
40. García R *et al.* Valoración electrocardiográfica de la cardiotoxicidad del antimonio de N-metilglucamina (RGlucantime). *Arch Inst Cardiol* 1982;52(2):155-159.
41. Mallison DJ and Coombs GH. Interaction of *Leishmania* metacyclics with macrophages. *Internat J Parasitol* 1989;15(6):647-656.
42. Hoare C *et al.* Inhibition of *Leishmania donovani* transformation by hamster spleen homogenates and active human lymphocytes. *Nature* 1976;262:689-691.
43. Sauvin M. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activities of natural and synthetic quinoids. *Phytother Res* 1990;7:107-11.

44. Tandon J, Srivastava V and Gum P. Iridoids: A new class of Leishmanicidal agents from *Nyctanthes arbotristis*. *J Nat Prod* 1991;54(4):1102-1104.
45. Katzin A *et al.* Rifampicin against *T. cruzi*. *Mem Inst Mol Biochem Par* 1991;45:175-178.
46. Levi R *et al.* Nuevo Tratamiento para la Leishmaniasis Tegumentaria. *Dermatol Venez* 1986;24(214):82-84.
47. Scroza J *et al.* Efectividad del Nysoral-R (*ketoconazol*) para el tratamiento de las Leishmaniasis Cutánea y Cutaneomucosa en Trujillo, Venezuela. *Bol Direc Malariol* 1988;28(1/2):32-39.
48. Restrepo M and Gómez M. Tratamiento de la Leishmaniasis Cutánea con ketoconazol. *Acta Med Colomb* 1987;12(4):294-297.
49. McCabe R, Araujo F, Remington J. Ketoconazole Protects Against Infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model. *Am J Trop Med & Hyg* 1989;2:960-961.
50. Fournet A *et al.* Activité antiparasitaire D'Alcaloides Bisbenzylisoquinoleiques. I: Activité *in vitro* sur des promastigotes de trois souches de *Leishmania*. *J Ethnopharmacol* 1988;24:327-335.
51. Evans T and Croft S. Antileishmanial Activity of Harmaline and other Tryptamine Derivates. *Phytother Res* 1987;1(1):25-27.
52. Moretti C *et al.* Diversité biologique tropicale et innovation therapeutique les recherches mencees Par L'Orstom. *Ann Soc Belge Méd Trop* 1993;73:169-178.

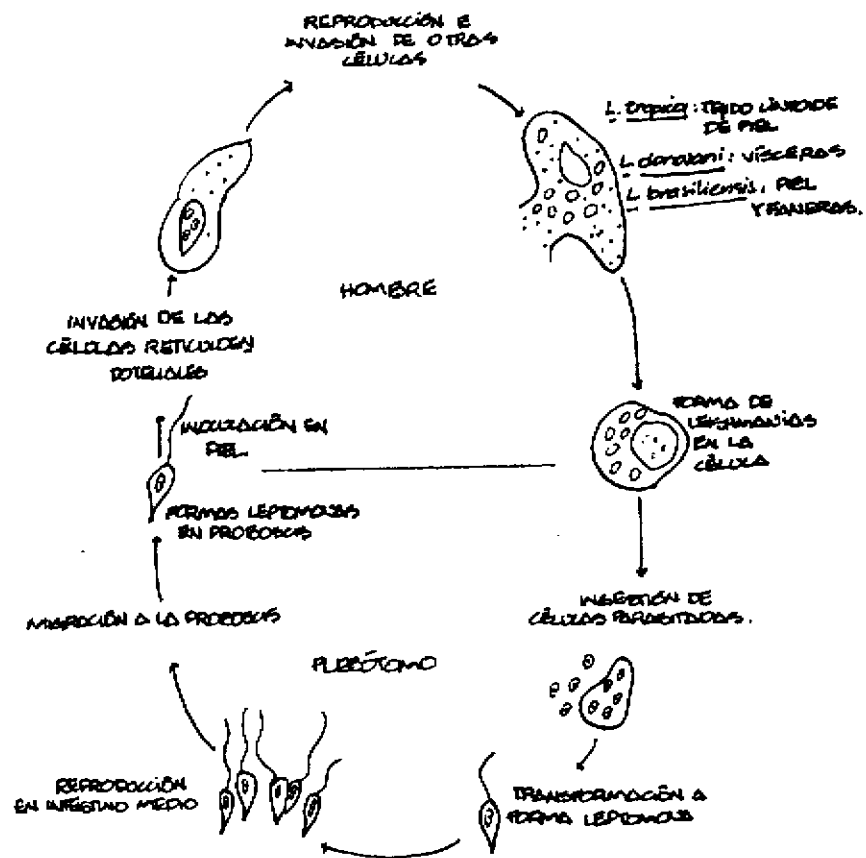
53. Wright C and Phillipson D. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* 1990;4(4):128-139.
54. Fournet A *et al.* Antileishmanial activity of a tetralone isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Planta Med* 1994;60:8-12.
55. Iwu M *et al.* Evaluation of Plant Extracts for Antileishmanial Activity using a Mechanism-Based Radioisotopic Microtechnique (RAM). *Planta Med* 1992;58:436-441.
56. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1992. 402p. (p. 224-310).
57. De Poll E. Plantas comestibles y tóxicas. Guatemala: CECON, 1984. 114p. (p.98-99)
58. Standley PC and Steyermark JA. Flora de Guatemala. Chicago: Fieldiana Botany. Vols. 12, vol. 6,9, 1949. 440p. (p.72-73,111,143).
59. Hirschorn HH. Botanical remedies of South and Central America, and the Caribbean: An archival analysis. *J Ethnopharmacol* 1981;4:129-158.
60. Lundell Cl. The vegetation of Peten. *Carnegie Inst.* 1937;478:66.
61. Germosén-Robineau L. Hacia una Farmacopea Caribeña. Investigación científica y usos populares de plantas medicinales en el Caribe. 7 ed. República Dominicana: Tramil. 1995. 666p. (p.271-272)

62. Kugelman M *et al.* Indicine-N-oxide: the antitumor principle of *Heliotropium indicum*. *Lloydia* 1976;39:125-128.
63. Ounuma T *et al.* Phase I study of indicine-N-oxide in patients with advanced cancer. *Cancer Treat Rep.* 1982;66(7):1509-1515.
64. Morton JF. Atlas of medicinal plants of Middle América. United States: Springfield. 1981. 1420p. (p.155)
65. Martínez M. Las plantas medicinales en México. México: Botas. 6 ed. 1992. 656p. (p.446)
66. Mena MG. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña. el Salvador: Universitaria. 1994. 564p. (p.105-106,435-436)
67. Rescate de la medicina popular. Ministerio de Salud Pública de Nicaragua. Nicaragua, Doc. Tec. 1986. 147p. (p.120-121)
68. Savernein M. Insect-toxicity of Phorbol esters from *Jatropha curcas* seeds oil. *Planta Med* 1993;59:686.
69. Díaz JL. Usos de las plantas medicinales en México. Monografías científicas II. México: IMEPLAM. 1976. XI+329. (p.104)
70. House PR *et al.* Plantas medicinales comunes en Honduras. Tegucigalpa, Honduras: López. 1995. XIII+555p. (p.395)
71. Logan MH. Digestive disorders and plants medicinals in highland of Guatemala. *Anthorpos* 1973;68:537-547.

72. Cáceres A *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Screening of 84 plants against enterobacteria. *J Ethnopharmacol* 1990;30:55-67.
73. Urizar SL. Ensayo clínico sobre la eficiencia de *Smilax lundellii* en el tratamiento de candidiasis vaginal. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, facultad de Ciencias Médicas) 1989. 87p.
74. FAO. Especies forestales productoras de frutas y otros alimentos 3 ejemplos de América Latina. Roma: FAO 1987. 214p. (217-218).
75. Mellin GA. El uso de las plantas medicinales en Guatemala. *Guatemala Indígena* 1974;9:102-118.
76. Nelson CH. Plantas comunes de Honduras. Tegucigalpa, Honduras: Editorial Universitaria. 1986. 922p. (p.305)

13. ANEXOS

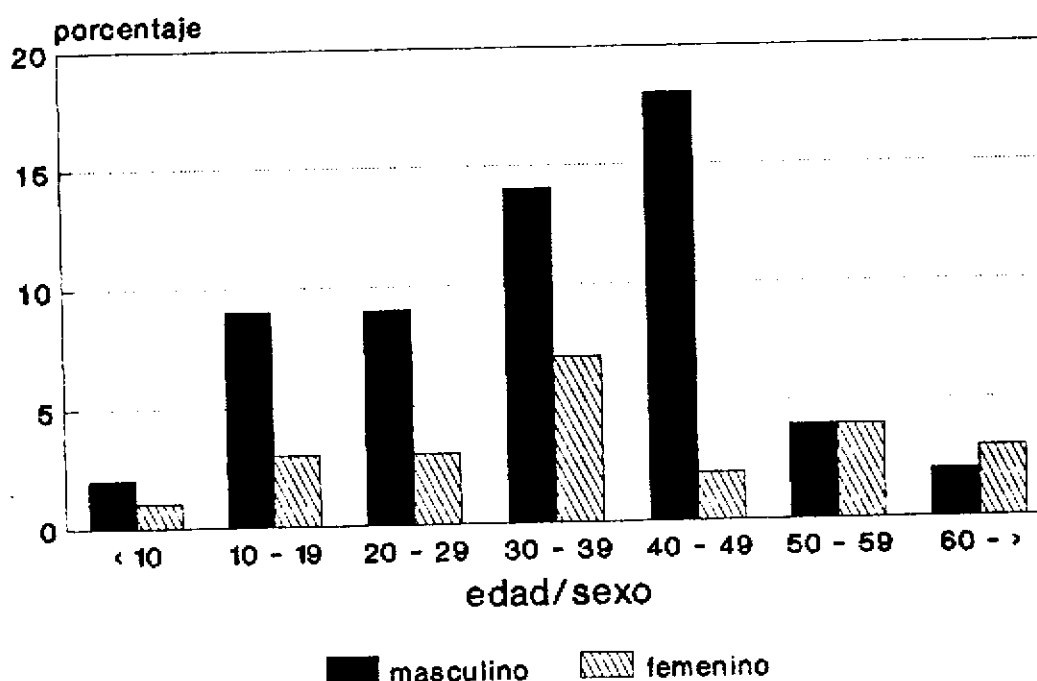
Cuadro No. 1

Ciclo Vital del Género *Leishmania*

Fuente: Arana F *et al.* Guía de apoyo para el diagnóstico de la Leishmaniasis en los servicios de salud, en Guatemala. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala, Organización Mundial de la Salud, Doc.Tec, 1993. 23p.

Gráfica No. 1

**Factores de riesgo observados en Leishmaniasis cutánea
en áreas endémicas de Guatemala**

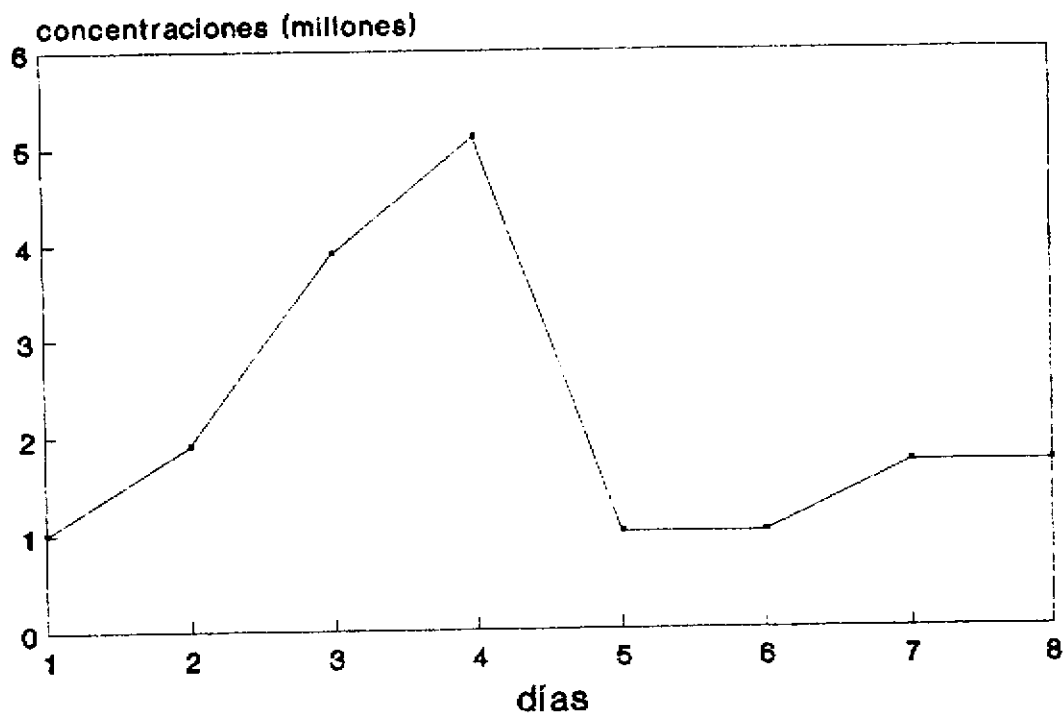


La gráfica indica los reportes de 1988-1990 de leishmaniasis cutánea en Guatemala por edad y sexo, coincidiendo en hombres de 10-19 años con la práctica común de trabajo en fincas desde la edad de 12 años.

Fuente: Copeland H, Arana B, Navin T. Comparison of active and passive case detection of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Am Trop Med Hyg* 1990;43(3):257-259.

Gráfica No. 2

Curva de crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana*
MNYC/BZ/62/M379 en medio de cultivo Evans-LIT



Fuente: Laboratorio del Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica.
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Tabla No. 1

Plantas a evaluarse actividad antileishmania

Familia	Nombre científico	Nombre común	Parte
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Acalypha guatemalensis</i> Pax. & Hoffm.	Hierba del cáncer	Hoja
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Croton guatemalensis</i> Lott.	Guanacaste	Corteza
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Jatropha curcas</i> L.	Pinocillo	Hoja
<i>Rhizophoraceae</i>	<i>Rhizophora mangle</i> L.	mangle	Corteza
<i>Smilacaceae</i>	<i>Smilax hndellii</i> Killip & Morton.	Zarzaparrilla	Rizoma
<i>Solanaceae</i>	<i>Solanum nigrescens</i> Mart. & Gal.	Quilete	Hoja
<i>Lamiaceae/Labiataeae</i>	<i>Ocimum micranthum</i> Willd.	Albahaca	hoja

Tabla No. 2

Porcentajes de rendimiento de extracción del material vegetal

Planta	Muestra botánica	Extracto	% Rendimiento
<i>A. guatemalensis</i>	228	1	2.0
		2	12.7
		3	17.4
<i>C. guatemalensis</i>	366	1	1.8
		2	5.0
		3	4.3
<i>J. curcas</i>	288	1	1.3
		2	7.0
		3	7.5
<i>R. mangle</i>	391	1	0.48
		2	0.28
		3	20.45
<i>S. lundellii</i>	380	1	0.3
		2	17.8
		3	8.4
<i>S. nigrescens</i>	399	1	2.9
		2	6.0
		3	16.6
<i>O. micranthum</i>	503	1	2.61
		2	8.29
		3	9.93

Extracto 1 : diclorometánico

Extracto 2 : etanólico

Extracto 3 : acuoso

COPIADA DE LA UNIVERSIDAD DE
Biblioteca

Tabla No. 3

Actividad contra promastigotes de *Leishmania mexicana*

Planta	E	1,000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml
<i>A. guatemalensis</i>	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
<i>C. guatemalensis</i>	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
<i>J. curcas</i>	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
<i>R. mangle</i>	1	+	+	+
	2	-	-	-
	3	-	-	-
<i>S. lundellii</i>	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
<i>S. nigrescens</i>	1	-	-	-
	2	+	-	-
	3	+	+	+
<i>O. micranthum</i>	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-

E 1 : extracto diclorometánico

E 2 : extracto etanólico


E 3 : extracto etanólico

+ : actividad antileishmania > 90%

- : actividad antileishmania < 90%.



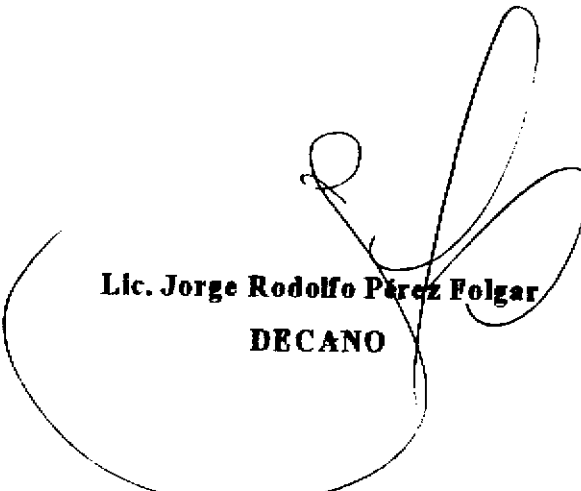
Anna Gabriella Soto Pineda
TESISTA



Lic. Armando Cáceres Estrada
ASESOR



Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
DIRECTOR



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
DECANO