



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efecto leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de extractos derivados de *Ocotea macrophylla* y *Zanthoxylum monophyllum*

Norberto Andrey Chávez Enciso

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Farmacia

Maestría en Ciencias Farmacología

Bogotá D.C.

2013

Efecto leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de extractos derivados de *Ocotea macrophylla* y *Zanthoxylum monophyllum*

Norberto Andrey Chávez Enciso

Tesis presentada como requisito parcial para optar por el título de: Magister en Ciencias Farmacología.

Directora:

Gabriela Delgado Murcia, Dr Sc Farmacéuticas

Línea de investigación

Farmacología

Grupo de investigación:

Grupo de Investigación en Inmunotoxicología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Farmacia

Maestría en Ciencias Farmacología

Bogotá D.C.

2013

A mi familia, papa, mama y hermanos quienes con diferentes aportes
hicieron posible finalizar este trabajo.

Agradecimientos

Cuando llegamos al punto final de un trabajo y miramos hacia atrás nos damos cuenta que nunca estuvimos solos, (aunque así lo sintiéramos por pequeños pasajes) siempre hubo alguien que nos ayudó a desatascar el desarrollo de nuestro proyecto en los puntos cruciales. No necesariamente fue siempre la misma persona pero siempre estuvieron ahí por nosotros, y no hay mejor momento para agradecerlo y me permito mencionarlos a continuación:

- En primera instancia a nuestro Grupo de Investigación en Inmunotoxicología y todos sus integrantes, pero de forma especial a nuestra directora la profesora Gabriela Delgado, por su apoyo incondicional y orientación en todo momento; al mismo tiempo agradecer de forma especial a Jeysson Sánchez, Ángela Gómez, Erika Torres y Julián Pérez, quienes con su constante apoyo laboral y personal aportaron una ayuda invaluable en el desarrollo de este proyecto.
- Al Grupo de Investigación en Productos Naturales Vegetales.
- Al Bioterio del Departamento de Farmacia y en especial al profesor Luis Fernando Ospina.

Resumen

El parásito protozooario conocido como *Leishmania Spp.* es el causante de una enfermedad infecciosa definida como leishmaniosis. Este parásito es transmitido por vectores hematófagos del género *Lutzomia* y *Phlebotomus* (de alta incidencia en los países en desarrollo como Colombia); manifestándose en mayor proporción en las zonas rurales y en la población más vulnerable, lo cual dificulta en ocasiones, el acceso tanto al diagnóstico a tiempo y consecuentemente limita el inicio del tratamiento. Esta enfermedad tiene diferentes tipos de manifestaciones clínicas identificadas como leishmaniosis cutánea, leishmaniosis mucocutánea y leishmaniosis visceral, destacándose en Colombia la presentación cutánea, a la cual pertenecen más del 95 % de los reportes anuales. Sumado a la alta prevalencia y las condiciones particulares ya mencionadas para esta patología, los tratamientos disponibles poseen diversos problemas dentro de los cuales cabe destacar, la resistencia, los efectos adversos, los elevados costos y la no adherencia, lo cual hace imperativa la búsqueda de nuevas fuentes terapéuticas de diversa procedencia (entre otros de origen natural vegetal colombiano) para el control de la enfermedad. Por lo anterior, en este proyecto se abordó la evaluación de la actividad leishmanicida tanto *in vitro* como *in vivo* de extractos naturales de plantas colombianas de la familia Lauraceae y Rutaceae, en el modelo de leishmaniosis cutánea en el hámster sirio dorado. Como resultados sobresalientes de este trabajo encontramos actividad leishmanicida *in vitro* en ambas familias de plantas, actividad que pudo ser correlacionada con los ensayos *in vivo* para la fracción alcaloide derivada del extracto etanólico de *Zanthoxylum monophyllum* (FAEEZM) sobre la infección experimental inducida con *Leishmania major* sobre el hámster Sirio Dorado.

Palabras clave. Leishmaniosis cutánea, *Mesocricetus auratus*, Rutaceae Lauraceae antileishmanial.

Abstract

The protozoan parasite called *Leishmania spp* is the cause of an infectious disease defined as leishmaniosis. This parasite is transmitted by blood-sucking vectors of the genus *Phlebotomus* and *Lutzomia* (with high incidence in developing countries like Colombia); manifesting in higher proportion in rural areas and vulnerable populations, making it difficult at times, access to the diagnosis on time and consequently limits the initiation of treatment. This disease has different clinical types identified as cutaneous leishmaniosis, mucocutaneous leishmaniosis and visceral leishmaniosis. Within which in Colombia stands cutaneous presentation to which they belong more than 95% of the annual reports. In addition to the high prevalence and the specific conditions mentioned above for this condition available treatments have several problems among which stands out, resistance, side effects, high costs and non adherence, which makes it imperative to search for new therapeutic sources of diverse origin(including natural Colombian plant) to the diseases control. Therefore in this project assessment was raised leishmanicidal activity both *in vitro* and *in vivo* of natural plant extracts Colombian family Rutaceae and Lauraceae, focused on the model of cutaneous leishmaniosis in the Syrian golden hamster. As results of this study we found leishmanicidal promising activity *in vitro* in both families of plants having good correlation with the *in vivo* activity assays for the alkaloid fraction derived of the ethanolic extract from *Zanthoxylum monophyllum* (FAEEZM) on the experimental infection with *Leishmania major* on the Golden Syrian hamster.

Keywords. Cutaneous leishmaniosis, *Mesocricetus auratus*, Rutaceae, Lauraceae, antileishmanial.

Contenido

	Pág.
Lista de imágenes	IX
Lista de figuras	X
Lista de tablas	XII
Lista de símbolos y abreviaturas	XIII
Introducción	1
Objetivos	4
1. Estado del arte	5
1.1. Aspectos epidemiológicos	5
1.2. Ciclo de vida y características generales de la <i>Leishmania</i>	5
1.3. <i>Leishmania</i> y su interacción con el huésped	7
1.4. El hámster (<i>Mesocricetus auratus</i>) como modelo animal para el estudio de la respuesta inmune a la leishmaniosis	9
1.5. Opciones terapéuticas y sus limitantes	11
1.6. Productos naturales vegetales con actividad leishmanicida	13
2. Desarrollo general de la tesis	16
2.1. Objetivo específico número 1	16
2.1.1. Metodología	16
2.1.2. Resultados y discusión	20
2.2. Objetivo específico número 2	22
2.2.1. Metodología	22
2.2.2. Resultados y discusión	23
2.3. Objetivo específico número 3	27
2.3.1. Metodología	27
2.3.2. Resultados y discusión	28
2.4. Objetivo específico número 4	31

2.4.1. Ensayo <i>in vivo</i> para el control experimental en infecciones con <i>L. panamensis</i> .	31
2.4.1.1. Metodología	31
2.4.1.2. Resultados y discusión	32
• Índices de evolución de la lesión	32
• Porcentajes de reducción de la lesión	36
• Seguimiento del peso corporal	37
2.4.2. Ensayo <i>in vivo</i> para el control experimental de infecciones con <i>L. major</i>	38
2.4.2.1. Metodología	38
2.4.2.2. Resultados y discusión	40
• Índices de evolución de la lesión	43
• Porcentajes de reducción de la lesión	46
• Seguimiento del peso corporal	48
3. Conclusiones y perspectivas	50
4. Referencias	51

Lista de imágenes.

Imagen 1. Abordaje abdominal y colección de macrófagos	17
Imagen 2. Macrófagos peritoneales de hámster sirio dorado derivados del exudado y sembrados	18
Imagen 3. Macrófagos peritoneales adheridos	18
Imagen 4. Evolución de las lesiones de los hámsteres infectados con <i>Leishmania panamensis</i> grupo tratado EEZM	33
Imagen 5. Evolución de las lesiones de los hámsteres infectados con <i>Leishmania major</i> grupo tratado control del vehículo	41
Imagen 6. Evolución de las lesiones de los hámsteres infectados con <i>Leishmania major</i> grupo tratado con antimonio de meglumina (Albiventriz®)	42
Imagen 7. Evolución de las lesiones de los hámsteres infectados con <i>Leishmania major</i> grupo tratado con FAEEZM	43

Lista de figuras

Figura 1. Efecto citotóxico de los extractos derivados de las familias Rutaceae y Lauraceae sobre macrófagos peritoneales de hámster sirio dorado	20
Figura 2. Efecto Leishmanicida de los extractos derivados de las familias Rutaceae y Lauraceae, sobre <i>Leishmania panamensis</i> y <i>Leishmania major</i>	23
Figura 3. Seguimiento general del índice de evolución de la lesión de los hámsteres infectados con <i>Leishmania panamensis</i> en los diferentes grupos por individuos (Vehículo, antimonio de meglumina (Glucantime®) y EEZM)	34
Figura 4. Comparación del efecto de los diferentes tratamientos sobre los hámster infectados con <i>Leishmania panamensis</i>	35
Figura 5. Porcentajes de reducción de la lesión de cada individuo de los diferentes grupos de tratamiento sobre los hámster infectados con <i>Leishmania panamensis</i>	37
Figura 6. Índice de modificación en el peso corporal de los hámsteres infectados con <i>Leishmania panamensis</i> en los diferentes grupos de tratamientos (Control, antimonio de meglumina (Glucantime®) y EEZM) a lo largo de todo el experimento	38
Figura 7. Seguimiento general del índice de evolución de la lesión de los hámsteres infectados con <i>Leishmania major</i> en los diferentes grupos por individuos (Vehículo, antimonio de meglumina (Albiventriz®) y FAEEZM)	44

Figura 8. Comparación del efecto de los diferentes tratamientos sobre los hámster infectados con *Leishmania major* 45

Figura 9. Porcentajes de reducción de la lesión de cada individuo de los diferentes grupos de tratamiento sobre los hámster infectados con *Leishmania major* 46

Figura 10. Índice de modificación en el peso corporal de los hámsteres infectados con *Leishmania major* en los diferentes grupos de tratamientos (Control, antimonio de meglumina (Albiventriz®) y EEZM) a lo largo de todo el experimento 49

Lista de tablas

Tabla 1. Citotoxicidad y actividad leishmanicida (promastigotes) de los extractos de plantas Lauraceae y Rutaceae	25
Tabla 2. Citotoxicidad y actividad leishmanicida (amastigotes) de los extractos de plantas Lauraceae y Rutaceae	28
Tabla 3. Conformación de los grupos de los animales infectados con <i>Leishmania major</i>	39

Lista de símbolos y abreviaturas

ANOVA	Análisis de varianza.
BALB/c	Cepa de ratones susceptibles a la infección por <i>Leishmania spp</i>
C57BL/6	Cepa de ratones resistentes a la infección por <i>Leishmania spp</i>
CD4+	Linfocitos T ayudadores.
CE ₅₀	Concentración efectiva 50.
CL ₅₀	Concentración letal 50.
CPA	Células presentadores de antígenos.
CRPMI	RPMI suplementado al 5% con suero fetal bovino.
DC	Células dendríticas.
EEZM	Extracto etanólico de <i>Zanthoxylum monophyllum</i> .
FAEEZM	Fracción alcaloide derivada del extracto etanólico de <i>Zanthoxylum monophyllum</i> .
FBS	Suero fetal bovino.
Foxp3	Gen marcador exclusivo de células Treg.
I/S	Índice de selectividad.
IEL	Índice de evolución de la lesión.
IL	Interleuquina.
IM	Intramuscular.
INF γ	Interferon gamma.
Kg	Kilogramo.
mg	Miligramo.
mL	Mililitro.
NaCl0.9%	Cloruro de sodio al 0,9 %.
NK	Células asesinas naturales.
ON	Oxido nítrico.
PRL	Porcentaje de reducción de la lesión.

- T reg Linfocito T regulador.
- Th1 Linfocito T ayudador tipo 1.
- Th2 Linfocito T ayudador tipo 2.
- Th17 Linfocito T ayudador tipo17.

Introducción

La leishmaniosis es un importante problema de salud pública que afecta millones de personas en todo el mundo, reportando cerca de dos millones de casos nuevos cada año. Un protozoo del género *Leishmania* es el causante de esta enfermedad parasítica que se transmite a los humanos por la picadura de un vector hematófago. Actualmente la leishmaniosis ocurre en 4 continentes y es considerada endémica en 88 países, 72 de los cuales son países en desarrollo [1]. En el año 2002 en Colombia, se reportaron 5.620 casos de leishmaniosis, para el año 2003 se reportaron 9.533 lo que se traduce en un aumento total de casos del orden del 60% [2]. Hasta la semana epidemiológica 52 del año 2008 se notificaron un total de 9.549 casos de leishmaniosis de los cuales un 98.8 % (9.436 casos) fueron de la forma de presentación cutánea; 0.8% (83 casos) forma de presentación mucosa y 0.4% (33 casos) de la forma visceral [3].

De la misma manera para el año 2009 se reportaron 15.477 casos donde la forma de presentación cutánea fue la predominante con el 98.9 % (15.312 casos), seguida de la forma de presentación mucosa 0.69 % (108 casos) y por último, la forma de presentación con menos incidencia, la leishmaniosis visceral 0.41% (57 casos). En el mismo año solamente en las Fuerzas Armadas de Colombia se reportaron 4.047 casos de leishmaniosis cutánea y 17 casos de leishmaniosis visceral, lo que representa el 83.1 % del total de las enfermedades transmitidas por vectores [4].

Estos reportes permiten evidenciar un aumento en el número de casos de cerca de un 40% entre el año 2008 – 2009. En el año 2010 se reportaron 14.851 casos y en 2011 para la semana epidemiológica número 52 el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) notificó, 9.241 casos de los cuales 9.063 casos fueron de la forma cutánea y corresponden a un 98.07%. Para el año 2012 en el mismo SIVIGILA se notificaron 9.353 casos de leishmaniosis cutánea, 179 casos de leishmaniosis mucosa y 14 casos de leishmaniosis visceral.

Actualmente en lo que va corrido del año 2013 (hasta la semana 17) se han notificado 2196 casos de leishmaniosis cutánea, 30 casos de leishmaniosis mucosa y apenas 13 casos de leishmaniosis visceral según registra el Instituto Nacional de Salud (INS) en su página de internet [5].

A pesar del descenso en los casos totales reportados, en Colombia se encuentra que la terapéutica empleada actualmente para el control de la leishmaniosis, presenta diversos problemas, siendo los más importantes la no adherencia, la resistencia, los efectos adversos y los altos costos de los medicamentos. Algunas de las moléculas utilizadas para el tratamiento de esta patología son los antimonioatos pentavalentes y la amfotericina B, sin embargo el uso de estos medicamentos induce una gran cantidad de efectos secundarios indeseados, además de los casos reportados de resistencia por parte del patógeno [6]. Por lo cual se hace imperativa la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas partiendo de la etnobotánica y proyectándose al campo de la investigación en la etnofarmacognosia con la finalidad de llevar un extracto natural a un producto farmacéutico que pueda ser usado en la práctica clínica moderna [7].

Los productos naturales de las plantas medicinales como compuestos puros o como extractos estandarizados, proveen oportunidades ilimitadas para nuevos medicamentos debido a la disponibilidad incomparable de la diversidad química. Existe un incremento en la demanda de diversidad química en programas de tamizaje y búsqueda de medicamentos desde los productos naturales, con especial interés en plantas comestibles que crecen alrededor del mundo [8]

Debido a lo anterior, en este proyecto se planteó trabajar con extractos crudos para determinar su posible actividad leishmanicida sobre el modelo experimental basado en la investigación para leishmaniosis cutánea, con la finalidad de buscar no sólo describir compuestos puros bien identificados, sino también encontrar actividades antileishmaniales propias de un extracto que pudiera ser estandarizado para su uso clínico.

Es importante mencionar que todos los objetivos propuestos se culminaron exitosamente y que adicional a los dos extractos etanólicos uno derivado de *Ocotea macrophylla* y otro derivado de *Zanthoxylum monophyllum* propuestos en el marco de la tesis, también determinamos la actividad leishmanicida de una fracción alcaloide derivada del extracto etanólico de *Zanthoxylum monophyllum*. En nuestros experimentos *in vitro* determinamos índices de selectividad superiores a 10, lo cual sugería su actividad leishmanicida promisoría, la cual posteriormente en los

experimentos *in vivo* pudimos confirmar (una actividad equiparable entre la fracción alcaloide del extracto etanólico de *Zanthoxylum monophyllum* y el antimonioato de meglumina (Albiventriz®)) para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea en hámster infectados con *Leishmania major*.

Objetivos

General

Determinar el efecto leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de los extractos derivados de *Ocotea macrophylla* y *Zanthoxylum monophyllum*.

Específicos

1. Establecer la actividad citotóxica de extractos derivados de *Ocotea macrophylla* y *Zanthoxylum monophyllum* sobre macrófagos peritoneales de hámster [Obtención de la concentración letal 50 (CL₅₀)].
2. Determinar la actividad leishmanicida de los extractos derivados de *Ocotea macrophylla* y *Zanthoxylum monophyllum* sobre promastigotes de *Leishmania panamensis* y *Leishmania major*, usada esta última, como modelo de infección para Leishmanias con tropismo cutáneo.
3. Determinar la actividad leishmanicida de los extractos derivados de *Ocotea macrophylla* y *Zanthoxylum monophyllum* sobre amastigotes intracelulares (macrófagos peritoneales) de *Leishmania panamensis* y *Leishmania major*, estableciendo de este modo la concentración efectiva 50 (CE₅₀) y los índices de selectividad (IS= CL₅₀/ CE₅₀).
4. Establecer la efectividad (regresión de las úlceras) del extracto con el mejor IS, en el modelo *in vivo* de infección de hámsteres con *Leishmania panamensis* y *Leishmania major*.

1. Estado del arte.

1.1. Aspectos epidemiológicos

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria generada por diferentes especies del género *Leishmania*, la cual es transmitida por la picadura de un insecto del orden díptero también conocido como la mosca de la arena; ubicados dentro de la subfamilia Phlebotominae. En esta subfamilia, sólo dos géneros se reconocen con importancia médica; en el nuevo mundo *Lutzomia spp* y en el viejo mundo *Phlebotomus spp* [9].

La leishmaniosis comprende cuatro tipos de presentación clínica bien definidas: leishmaniosis cutánea es el tipo de manifestación clínica más común y menos complicada, leishmaniosis cutánea difusa, leishmaniosis mucocutánea caracterizada por la ulceración de la piel e hiperplasia de las membranas mucosas y la leishmaniosis visceral siendo esta última, la forma letal de la enfermedad, si no se proporciona un tratamiento a tiempo [10].

Esta es una enfermedad de importancia mundial debido a su amplia distribución y alta prevalencia, que alcanza aproximadamente 12'000.000 de casos y 350 millones de personas están en riesgo de contraerla en 88 países [11].

Se contempla además un elevado subregistro de la enfermedad, debido a que se estima, que gran parte de la población infectada, resuelve espontáneamente [12]ó mediante tratamientos caseros las lesiones.

1.2. Ciclo de vida y características generales de la Leishmania

Este agente patógeno tiene un ciclo de vida complejo, inicialmente es digenético con dos etapas básicas: una intracelular que se da dentro del hospedador vertebrado identificado como la forma

de amastigote, y otra extracelular dentro del vector invertebrado, estadio conocido como promastigote. El promastigote a su vez tiene diferentes formas dentro del vector; promastigote procíclico, promastigote nectomonad, promastigote leptomonad, promastigote haptomonad y promastigote metacíclico, siendo esta última la forma infectiva [9].

El promastigote metacíclico presente en la probóscide del díptero hembra parasitado, entra al hospedador como consecuencia de la picadura cuando toma sangre del vertebrado. Esta forma libre, es rápidamente internalizada por los macrófagos dentro de los cuales hacen su morfogénesis a la forma intracelular, amastigote. Luego, dentro de la vacuola parasitófora, se reproducen por fisión binaria alcanzando un gran número de parásitos dentro de una misma célula (si ésta se lo permite), hasta lograr la lisis de la misma por incremento de la densidad parasitaria, permitiendo de este modo la salida de los amastigotes para internalizarse en otras células fagocíticas y así continuar su ciclo de vida, en individuos susceptibles a la infección [13].

El género *Leishmania* está dividido en tres subgéneros, *Leishmania Leishmania*, *Leishmania Viannia* y *Leishmania Sauroleishmania*. Una de las características definitivas de diferenciación del subgénero *Viannia* es su ubicación en la región pilórica del intestino posterior del vector [9]. Todas las especies del subgénero *Viannia* han sido aisladas en el nuevo mundo [13].

La leishmaniosis es muy común en amplias regiones del continente Americano. En la región de los Andes y la Amazonia (Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia) la mayoría de infecciones humanas son causadas por *Leishmanias* del subgénero *Viannia* [14]. Las infecciones con el subgénero *Viannia* generalmente, causan lesiones cutáneas donde una pequeña parte progresa a leishmaniosis mucocutánea. La leishmaniosis visceral y leishmaniosis cutánea difusa también han sido reportadas en la región de América, aunque en menor proporción [15].

La leishmaniosis cutánea es la forma clínica más común, la cual está caracterizada por una o más pápulas, nódulos o úlceras. Estas lesiones son típicamente descritas como “en forma de volcán” con un borde levantado y un “cráter” central. Además son usualmente indoloras, pero pueden comenzar a ser dolorosas, si se contaminan de forma secundaria. La mayoría de las lesiones se desarrollan en pocas semanas después de la picadura del vector infectivo, pero puede aparecer muchos meses después [15]. En Latinoamérica los principales agentes causantes son: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*,

Leishmania (Viannia) panamensis, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) peruana*[16].

Todas las especies del subgénero *Viannia* antes mencionadas, tienen una gran tendencia a su diseminación sistémica, provocando lesiones en las membranas mucosas llegando incluso a lesiones desfigurantes.

1.3. *Leishmania* y su interacción con el huésped

La patología conocida como leishmaniosis se genera a partir del inóculo de promastigotes metacíclicos en la piel de diferentes animales de sangre caliente. La piel es un órgano con importantes funciones inmunológicas, para las cuales posee una cantidad cercana al doble de células T respecto a las que se podrían encontrar en la circulación, lo que podría jugar un papel importante en la respuesta inmune local [17].

Para tener éxito en la infección, la *Leishmania* debe ser capaz de resistir la respuesta inmune generada por el hospedador en la cual son de particular importancia las células T, los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas y el sistema de complemento.

Es importante mencionar que las células polimorfonucleares neutrófilos que responden inicialmente ante una agresión patógena, se encaminan rápidamente en la circulación con dirección al sitio de lesión, con la misión de fagocitar y destruir dichos patógenos agresores.

Sin embargo se ha logrado establecer que es justamente esta población, la responsable de la latencia y diseminación de la infección en hospederos susceptibles, razón por la cual se les ha denominado los “Caballos de Troya” de la infección por *Leishmania* [18], específicamente estudios *in vitro*, muestran que neutrófilos apoptóticos infectados con *Leishmania* pueden ser internalizados por otros macrófagos, lo que permitiría a los parásitos crecer sin disparar la activación de los mismos.

En otras palabras, la labor de células como los neutrófilos se dificulta, dado que se suscita la internalización de la *Leishmania* pero no su destrucción [17], siendo este uno de los mecanismos por el cual, el parásito evade y se protege de la respuesta inmune.

De otro lado, cuando los neutrófilos logran la activación apropiada, tienen la capacidad de eliminar patógenos intracelulares como *Leishmania*, encontrando estudios que sugieren que los neutrófilos juegan un papel importante en el control temprano de la enfermedad [19].

Para generar la activación de los macrófagos en la respuesta inmune frente a la leishmaniosis, es necesario que se genere un fenotipo T ayudador ó “helper” 1 (Th1) el cual, se conoce como responsable de la respuesta protectora que termina por resolver la infección. Sin embargo se ha identificado una respuesta tolerante, que permite la progresión de la enfermedad cuando el fenotipo predominante es Th2.

Actualmente, se conoce que las respuestas protectora o permisiva del hospedero, no solo están relacionadas con la polarización hacia los fenotipos Th1 y Th2, se sabe, que 2 subgrupos de linfocitos T tienen importantes funciones en la inducción y control de la respuesta inflamatoria, son estos los denominados Th17 y T reguladores (T reg) [17].

La diferenciación de los linfocitos T CD4+ “naive” depende la secreción de interleuquinas (IL) por parte de las diferentes células presentadoras de antígeno (CPA).

La respuesta inmune protectora contra la *Leishmania* está ligada al desarrollo de una respuesta Th1 y a la producción de interferón gama (INF γ), para lo cual la células dendríticas (DC) son estimuladas para la producción de IL-12, la cual se ha identificado como la principal señal para la secreción de INF γ por parte de las células Th1 y las células natural killer (NK), el cual es un factor clave para la activar los macrófagos y su subsecuente producción de óxido nítrico (ON) [17].

Por otro lado, el fenotipo Th2 está relacionado con la susceptibilidad, en donde las células CD4 Th2 median para inhabilitar la generación de un tipo de respuesta Th1 lo suficientemente potente, en este fenotipo susceptible la producción de citoquinas como IL-4, IL-13, IL-10, previenen y/o bajo regulan el INF γ responsable de la activación de los macrófagos[20].

El subgrupo de células Th17 son células T “helper” proinflamatorias, reconocidas por su capacidad de secreción de IL-17, la cual está involucrada en el reclutamiento, migración, y activación de neutrófilos. Las células T reguladoras (Treg) pueden en general ser divididas en dos categorías Treg natural Foxp3 + (CD4+CD25^{high}) (nTreg) que se originan en el timo y las células Treg inducibles generadas en la periferia. Estas últimas pueden ser a la vez, Foxp3+ (iTreg) y

adaptativas Foxp3-, células T reguladoras tipo 1 (Tr1). Todas las células Treg actúan en forma contraria a una respuesta inflamatoria para limitar el daño a los tejidos [17, 21-22].

La presentación de la enfermedad está relacionada además, con la conformación genética del huésped, de la cual dependerá en parte su respuesta inmune ante el patógeno, este último, estrechamente relacionado con factores como la especie infectante (genética parasitaria) y la carga parasitaria [23].

1.4. El hámster (*Mesocricetus auratus*) como modelo animal para el estudio de la respuesta inmune a la leishmaniosis.

Los estudios de leishmaniosis en modelos murinos, han sido claves en el conocimiento que se tiene en la actualidad, en relación con la respuesta del hospedero a la infección. Es de resaltar, que muchos de los problemas que complican los estudios en genética humana, pueden ser elucidados usando el modelo animal. En el caso de las enfermedades infecciosas, las señales dentro de las complejas interacciones entre el parásito y el hospedador, pueden ser obtenidas por el mapeo genético en el ratón, el cual puede revelar genes del hospedador que controlan la presentación de la enfermedad y su influencia en los distintos niveles de la respuesta inmune [24].

Aunque los estudios experimentales sobre leishmaniosis se han llevado a cabo en muchas especies, los animales de laboratorio que se emplean más frecuentemente son el ratón como modelo animal para el estudio de la leishmaniosis cutánea y el hámster y el ratón como modelo experimental para leishmaniosis visceral[25].

En el área de la investigación, el modelo *in vivo* es ampliamente utilizado para la evaluación y descripción de la infección por *Leishmania spp*, y sus posibles tratamientos. Especialmente la leishmaniosis experimental murina, ha sido utilizada para demostrar la relevancia de la dicotomía Th1 y Th2, en los patrones de resistencia, susceptibilidad, respectivamente [26].

Los ratones C57BL/6 y los ratones BALB/c, generan respuestas totalmente opuestas, los primeros una respuesta Th1 con la subsecuente resolución de la infección y los segundos, generan una respuesta tipo Th2, que favorece la progresión de la enfermedad [26].

La inoculación de ratones susceptibles BALB/c con *Leishmania major*, permitió el desarrollo de grandes lesiones necróticas, con numerosos parásitos en el hígado, mientras los ratones C57BL/6 no desarrollaron lesiones cutáneas, ni manifestaciones sistémicas [24].

Leishmania major causa la patología cutánea en humanos, pero es capaz de inducir diseminación sistémica en ratones, lo cual en muchos aspectos se asemeja a la enfermedad causada en humanos por *Leishmania donovani*. Estudios en ratones infectados con *Leishmania major*, han revelado múltiples genes de hospederos susceptibles con efectos heterogéneos [24].

Muchas de estas respuestas son totalmente polarizadas y no corresponden fielmente a la presentación de la enfermedad en humanos.

La LV puede ser estudiada tanto en el hámster como en el ratón cada uno de los cuales tiene ventajas y desventajas. Ambos modelos animales se deben infectar por la vía sistémica, dado que las vías de administración que involucran la ruptura de una barrera mediante una aguja, permiten que la sustancia inoculada vaya hasta los capilares donde alcanza más fácilmente la circulación sistémica. El hámster sirio dorado proporciona un modelo de enfermedad visceral progresiva que imita de forma cercana la leishmaniosis visceral humana activa, pero la desventaja es que se tienen pocos reactivos disponibles para estudios moleculares e inmunológicos [25].

Con el fin de alcanzar infecciones reproducibles en estos modelos animales, el principal parámetro crítico para ser considerado, es la manera en la cual el inóculo del parásito es estandarizado en lo relacionado con las dosis y momento de la infección experimental [25].

Adicional a estos aspectos, se debe tener en cuenta el lugar de la inoculación, aunque rutinariamente se hacía en la región del hocico o la almohadilla plantar [27] en estos sitios no siempre se genera una úlcera, la medida del tamaño de la lesión se dificulta y los animales podrían presentar dificultad para comer, respirar y moverse debido a la lesión. Para superar estos inconvenientes se demostró que el inóculo en la piel de la región dorsal de la grupa, resulta en lesiones crónicas pero controladas, y de evolución clínica con signos similares a los observados en humanos. Esta técnica favorece la inoculación y permite hacer las mediciones de manera más sencilla, al igual que facilita la aplicación del tratamiento [28].

El hámster es el modelo apropiado para el estudio de la leishmaniosis cutánea causada por parásitos del subgénero *Viannia*. Los hámster infectados con *Leishmania (Viannia) spp* desarrollan una lesión crónica cutánea [27] similar a la desarrollada por humanos susceptibles, de forma

mucho más cercana que la reproducida por ratones o ratas, para un número de patógenos humanos incluida la *Leishmania (Viannia) spp*[29].

1.5. Opciones terapéuticas y sus limitantes

Actualmente no existe vacuna para el control de la leishmaniosis, y los medicamentos disponibles son demasiado tóxicos, costosos y difíciles de administrar. Sumado a esto hay que tener en cuenta, la aparición de resistencia por parte de los parásitos a los medicamentos comúnmente usados [15]. Los objetivos principales del tratamiento son la erradicación de los amastigotes y la reducción del tamaño de las lesiones, con mínima toxicidad y apropiada cicatrización.

Los antimoniatos pentavalentes (estibogluconato de sodio y antimonio de meglumina) son el tratamiento de elección para el control de la enfermedad, aunque presenta ciertos inconvenientes como una alta toxicidad, la prolongada duración del tratamiento y la eventual aparición de recaídas. El esquema posológico efectivo actual para el tratamiento de leishmaniosis cutánea, es 20 mg / kg / día, vía parenteral durante 3 a 4 semanas. Con excepción de la leishmaniosis cutánea causada por la *Leishmania guyanensis* en las Guayanas Francesas, donde la pentamidina es el medicamento de elección. [15]

En etapa de estudio se encuentra la opción de tratamientos menos agresivos con dosis más bajas a las recomendadas, o, tratamientos más cortos respecto al esquema convencional, con la finalidad de disminuir los efectos tóxicos de los antimonios pentavalentes, pero a riesgo de abrir una ventana que logre inducir el desarrollo de resistencia del parásito [8].

La pentamidina, es parte de la primera línea de tratamiento y es el medicamento usado cuando los pacientes no toleran el tratamiento con antimoniales, o en casos de resistencia. El régimen terapéutico comprende 3 mg/ kg /día vía intramuscular (IM) día de por medio hasta completar 4 inyecciones, los efectos adversos asociados a su uso comprenden hiperglucemia, lesiones pancreáticas, hipotensión, taquicardia y cambios electrocardiográficos [15].

Otros compuestos como los imidazoles y los triazoles, han sido estudiados para el tratamiento de LC del nuevo mundo y comparten el espectro antimicótico y su mecanismo de acción, aunque los triazoles son metabolizados de manera más lenta e interfieren menos con la síntesis de esteroides en humanos, siendo además menos tóxicos que los imidazoles. La gran ventaja de estos

compuestos, es que se pueden administrar vía oral, lo cual los hace considerablemente menos tóxicos que los antimonios. En los estudios donde se emplea ketoconazol vía oral para el tratamiento de la LC, se enfatiza en la importancia de la definición de la especie a tratar, porque la eficacia del tratamiento ha presentado variaciones limitadas por la especie [15].

También se utilizan antibióticos de amplio espectro como los aminoglicósidos, la paramomicina en presentación tópica, la cual es ampliamente usada para tratar LC del viejo mundo. Sin embargo, el uso de este medicamento para tratar LC del nuevo mundo es riesgoso, debido entre otros, a que varias especies con potencial para desarrollar lesiones en mucosa (principalmente *Leishmania braziliensis* y *Leishmania panamensis*) no logran ser apropiadamente controladas por la vía tópica. Debido a lo anterior, esta vía de administración, solo se recomienda cuando la infección es debida a *Leishmania mexicana*, donde el riesgo de progresión hacia las mucosas es bajo [15].

La amfotericina B no está recomendada para el control de leishmaniosis cutánea y sólo se recomienda en casos en que no hay respuesta a los antimonios. Generalmente este medicamento, se emplea para el tratamiento de leishmaniosis mucocutánea y leishmaniosis visceral, aunque también es tóxica y puede generar lesiones renales. Para este medicamento, existe una presentación liposomal, que es menos tóxica pero a su vez es mucho más costosa [15].

La miltefosina, un análogo de la fosforilcolina, diseñada como antineoplásico, ha mostrado efecto leishmanicida *in vitro* e *in vivo*, su uso ha sido promisorio para el tratamiento de la leishmaniosis visceral en la India y leishmaniosis cutánea en Pakistán. En Sur América, se ha utilizado para tratar leishmaniosis cutánea con diversos resultados especie-dependientes [15].

Además de los efectos adversos particulares de cada medicamento, también se experimentan problemáticas debido a la no adherencia al tratamiento, la cual se debe a la necesidad de terapéuticas prolongadas y de aplicaciones dolorosas (formulaciones oleosas) en la mayoría de los casos vía intramuscular.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que los costos de tratamiento son generalmente elevados, no necesariamente para el paciente, pero sí para los sistemas de salud, de países, generalmente, en vías de desarrollo.

Además de lo citado anteriormente, el avance de la resistencia parasitaria, se suma a los factores que hacen difícil el control de las distintas formas de leishmaniosis. Desde los inicios de los años 80's, cuando se reportó el primer indicio de resistencia en North Bihar (donde cerca de 30 % de pacientes no respondieron al régimen de tratamiento con estibogluconato de sodio), han sido muchos los casos reportados asociados a cepas resistentes [8].

La búsqueda de nuevas fuentes terapéuticas, está fuertemente justificada y es necesaria para brindar esperanzas de formulaciones, que puedan ofrecer ventajas para los pacientes frente a las opciones terapéuticas actualmente utilizadas, las cuales como se mencionó, tienen serios inconvenientes.

1.6. Productos naturales vegetales con actividad leishmanicida

En el mundo, indígenas y ciertas comunidades locales practican medicina herbal para resolver una variedad de enfermedades [30].

El consumo, manejo y validación de las plantas silvestres, son un aspecto central en el conocimiento tradicional en diversas poblaciones humanas. Estas plantas, la difusión y conservación del conocimiento dentro de la comunidad, son prácticas tradicionales que han contribuido en la subsistencia de varias culturas [30].

El uso popular de plantas ha sido ampliamente practicado para el control de algunas parasitosis incluyendo leishmaniosis [31]. Aunque diversos compuestos aislados de las plantas ya se han identificado como agentes leishmanicidas, gran parte de ellos no han sido suficientemente investigados, lo cual justifica la validación del uso popular del recurso etnobotánico, con herramientas proporcionadas por el método científico, para la descripción de nuevos principios activos contra parasitosis como la leishmaniosis [32-33].

En el proceso de tamizaje para compuestos con actividad leishmanicida en plantas paraguayas, se ha encontrado que el extracto crudo alcaloide de *Ocotea lancifolia* mostró actividad *in vitro* a una concentración de 100 µg/mL, contra formas de promastigotes de tres cepas de *Leishmania spp.* (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani* [34]). En Colombia, también se ha documentado una actividad biológica promisorio de diferentes neoglicanos derivados de la *Ocotea macrophylla* con capacidad inhibitoria de COX2, COX1 e inhibidores de la agregación plaquetaria [35].

En un estudio reciente, se identificó actividad contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, en ensayos realizados con el neolignano burchellin, que fue aislado de la planta *Ocotea cymbarum Kunt* demostró inhibición parcial *in vitro*[36].

Los productos obtenidos de la planta *Ocotea duckei*, presentaron actividad antileishmanial contra la forma promastigote de *Leishmania chagasi* y *Leishmania amazonensis*. La inhibición del crecimiento de promastigotes causada por el extracto etanólico crudo, la fracción lignoide y el yangambin purificado (lignano derivado *Ocotea duckei*), fue significativamente superior a la causada por el Glucantime[®] [37].

En Sudáfrica también se han realizado investigaciones farmacológicas reportando actividad analgésica de productos contenidos en la planta *Ocotea Bullata* [38], mientras que en Brasil, estudios etnobotánicos sugieren el uso de la *Ocotea odorifera* en dermatosis, dolor articular, sífilis y gota. También se ha reportado información, acerca de su uso para el control de la malaria, razón por la cual, los indígenas guaranis la postulan como una de las plantas ideales por para el tratamiento de la fiebre y el paludismo [39].

Esta misma planta es procesada en las “Farmácias Caseiras Comunitárias” y ampliamente empleada en la comunidad del sur de Brasil, para el control de heridas infectadas con bacterias, lo que ha motivado nuevos estudios para identificar posibles efectos antimicrobianos[40].

La reticulina aislada de la fracción alcaloide total de las hojas de *Ocotea duckei Vattimo*, fue analizada para la identificación de su posible actividad depresora central, presentando una importante actividad antipsicótica en los modelos de ratones y ratas [41]. Incluso un derivado de la planta *Ocotea rodiei*, el rupuninine, es utilizado en medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades cardiacas y neurológicas, y para el control de tumores, actualmente está patentada por Conrad Gorinsky[42].

En relación con la familia Rutaceae, se encuentran reportes de diferentes potenciales usos para productos derivados de estas plantas. Por ejemplo, el aceite esencial derivado de *Citrus paradisi*, demostró una actividad larvicida sobre dos vectores transmisores de la fiebre de Denge, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, actividad que fue superior a otros aceites esenciales [43].

El género *Citrus* es uno de los más estudiados de la familia Rutaceae y contiene uno de los más importantes compuestos presentes en los vegetales, los flavonoides. Estos compuestos parecen

tener un impacto en las células del endotelio microvascular y células sanguíneas, en consecuencia las dos principales áreas de estudio de actividad biológica han sido inflamación y cáncer [44].

En Ghana y en Nigeria, es ampliamente usado el extracto acuoso crudo de corteza de raíz de *Zanthoxylum xanthoxyloides*, para el tratamiento de varias condiciones inflamatorias. Como agente antiinflamatorio, se ha encontrado que el extracto reduce la respuesta vascular en inflamación. Adicionalmente, se halló que éste compuesto inhibió la migración de células inflamatorias al sitio de la lesión [45].

Estudios posteriores, demostraron además, que el extracto de *Zanthoxylum xanthoxyloides* tuvo un efecto sobre la producción de prostaglandina E₂ (reduciendo su producción, por medio de la inhibición no selectiva de la ciclooxigenasa 1 y 2). El efecto demostrado, permitió sugerir que su mecanismo de acción, estaría asociado con aquel demostrado para los antiinflamatorios no esteroideos, sumado a que tampoco se ha evidenciado por medio de análisis químicos, la presencia de componentes tipo esteroide [46]. También se identificó, una actividad analgésica para el extracto de *Zanthoxylum xanthoxyloides* [47].

En resumen la familia de Rutacea, agrupa géneros de plantas a las cuales se les ha identificado actividad biológica en diferentes campos de la investigación, dentro de los cuales encontramos actividad larvicida, analgésica y antiinflamatoria. Como se describirá más adelante (sección 6.3), el Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, ha encontrado actividad antileishmanial promisorio, para dos extractos derivados de *Zanthoxylum monophyllum*, razón por la cual planteamos explorar estudios confirmatorios, en un modelo más cercano al humano (el hámster dorado).

2. Desarrollo general de la tesis.

“Es importante mencionar, que adicional a los extractos etanólicos de cada una de las especies de plantas mencionadas para cada objetivo; se incluyó la evaluación de una fracción alcaloide derivada del extracto etanólico de *Zanthoxylum monophyllum* por encontrarle actividad en ensayos posteriores a la presentación del proyecto”

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de los extractos derivados. De *Ocotea macrophylla* (Lauraceae) y *Zanthoxylum monophyllum* (Rutaceae).

2.1. Objetivo específico número 1.

Establecer la actividad citotóxica de extractos derivados de *Ocotea macrophylla* (Lauraceae) y *Zanthoxylum monophyllum* sobre macrófagos peritoneales de hámster. [Obtención de la concentración letal cincuenta (CL₅₀)].

2.1.1. Metodología.

Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados sobre células mononucleares del sistema inmune denominados macrófagos, los cuales fueron extraídos desde la cavidad peritoneal del hámster sirio dorado mediante el siguiente procedimiento:

- Inyección intraperitoneal de 3 mL de tioglicolato estéril al 0.4% estéril (Sigma Chemical CO, St Louis, USA.), con el cual se estimuló una peritonitis aséptica.

- Tres días después se practicó la eutanasia, por inyección intracardiaca de 0.1 mL de pentobarbital sódico (Euthanex INVET, laboratorios) con previo procedimiento anestésico con xilacina (Rompun, Bayer) y clorhidrato de ketamina (Ketamina 50, holliday-scott S.A.) vía intramuscular.
- En seguida a cada animal, se le realizó un lavado peritoneal con 15 mL de RPMI 1640 (Gibco BRL-Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) (RPMI) luego de un suave masaje abdominal y mediante disección y observación directa del abdomen y su contenido; se recuperó el RPMI que contenía los macrófagos[ver Imagen 1 (A y B)].

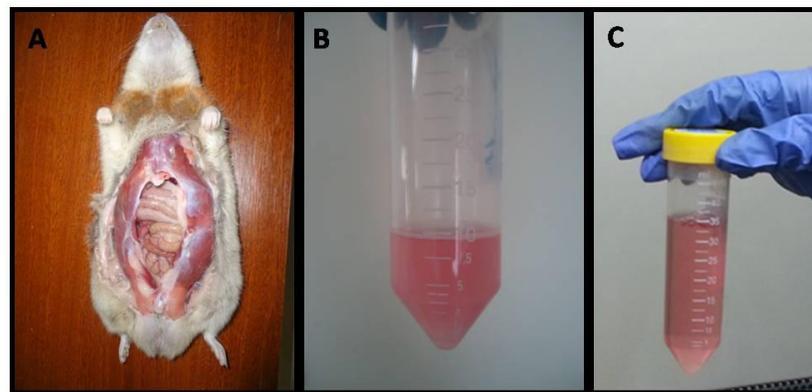


Imagen 1. Abordaje abdominal y colección de macrófagos (A). Disección de la cavidad abdominal y extracción del líquido de lavado peritoneal. (B) RPMI obtenido de la cavidad peritoneal posterior al masaje abdominal el cual contiene los macrófagos. (C) RPMI previo a su uso para lavado peritoneal, nótese la diferencia en la turbidez panel B con contenido celular y panel C sin contenido celular.

- Todo el contenido líquido extraído de la cavidad peritoneal fue sembrado en cajas de petri de poliestireno (BD Bioscience, Falcon). El infiltrado rico en células fue mantenido con RPMI 1640 (Gibco BRL-Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) suplementado con suero fetal bovino FBS (Microgen Ltda. Bogotá Colombia), inactivado (CRPMI) (ver Imagen 2)

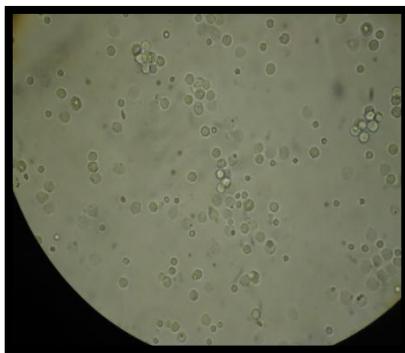


Imagen 2. Macrófagos peritoneales de hámster sirio dorado derivados del exudado y sembrados. Esta imagen realizada 30 minutos después de la extracción, permite observar el contenido moderado de otros tipos de células entre ellos eritrocitos. Imagen microscópica 10x. Chavez 2012.

- Después de 24 horas (las cuales promovieron la adherencia de los macrófagos) las cajas fueron lavadas con NaCl 0.9 % (baxter), para de esta manera eliminar células no viables o no adheridas e incluso células tipo eritrocitos y plaquetas que pudieran estar contenidas en la muestra (ver Imagen 3).

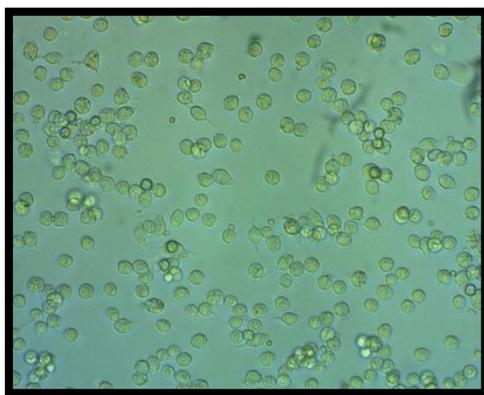


Imagen 3. Macrófagos peritoneales adheridos. Luego del lavado, los macrófagos están menos contaminados con otros tipos de células y posteriormente son removidos para iniciar los ensayos de citotoxicidad. Imagen microscópica 40x, Chavez 2012.

- Los macrófagos peritoneales adheridos en la caja de Petri, se removieron con ayuda de un *cell scraper* (Techno Plastic Products AG, Suiza) y luego se sembraron en cajas de 96 pozos (Techno Plastic Products AG, Suiza) a una confluencia de 2×10^4 células/pozo contenidas en 100 μ l de medio CRPMI, durante 24 horas en incubadora a 37°C en 5% CO₂.

- Posteriormente, se adicionaron los tratamientos con los 2 extractos y la fracción alcaloide en 6 diferentes concentraciones así: 450 µg/mL, 400 µg/mL, 350 µg/mL, 300 µg/mL, 250 µg/mL y 200 µg/mL en el caso de la fracción alcaloide del extracto etanólico de *Zanthoxylum monophyllum* (FAEEZM), 150 µg/mL, 125 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL y 25 µg/mL para el extracto etanólico de *Ocotea macrophylla* (EEOM) y 150 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL y 12.5 µg/mL en el caso de extracto etanólico de *Zanthoxylum monophyllum* (EEZM).
- Como controles positivos se emplearon isotianato de pentamidina medicamento [Pentamidine Isothionate (Pentacarinat[®], Sanofi-Aventis, Francia)] en 6 diferentes concentraciones comenzando con 50 µg/mL y obtenidas por una dilución seriada 1:3. y Estibogluconato de Sodio (Laboratorios Ryan, Colombia), en 8 diferentes concentraciones partiendo de 2000 µg/mL y obtenidas por una dilución seriada 1:2. Estos controles fueron utilizados según la forma parasitaria a evaluar (Pentamidina como control antiparasitario de promastigotes y Estibogluconato de Sodio, como control de amastigotes intracelulares).
- 72 horas después y con el fin de definir la viabilidad celular, se adicionaron 100 µL de medio de cultivo con resazurina (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, USA) a 132 µM, para un volumen final de 150 µL a 44 µM de resazurina [48][47][46][45].
- Cuatro horas después, se evaluó la reducción de resazurina a resorufina (compuesto fluorescente), en un *Tecan GENios Microplate Reader* (Tecan, Austria), con excitación a 535 nm y emisión a 590 nm, por medio del software *Magellan4* (Tecan, Austria).
- Con esta lectura espectrofluorométrica, se obtuvieron las correspondientes absorbancias (unidades arbitrarias de fluorescencia, UAF) para cada una de las concentraciones evaluadas de los extractos. El porcentaje de viabilidad se obtuvo mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{UAF macrófagos expuestos a los extractos o control positivo} / \text{UAF macrófagos control}) \times 100}{=} = \% \text{ viabilidad}$$

El % de mortalidad se calculó así:

$$100 - \% \text{ viabilidad} = \% \text{ mortalidad}$$

- GraphPad Prism[®] 5.00 fue el programa utilizado para la determinación de la concentración letal 50% (CL₅₀). Todos los ensayos fueron hechos por triplicado y los resultados presentados corresponden a la media de dos ensayos realizados de forma independiente.

2.1.2. Resultados y discusión.

Este ensayo fue orientado a identificar la toxicidad de los extractos sobre los macrófagos peritoneales. La concentración letal 50 (CL₅₀) fue hallada: **100.46 µg +/- 13.24, 71.41 +/- 2.33,** y de **316.45 +/- 5.95** para EEOM, EEZM FAEEZM, respectivamente (Figura 1).

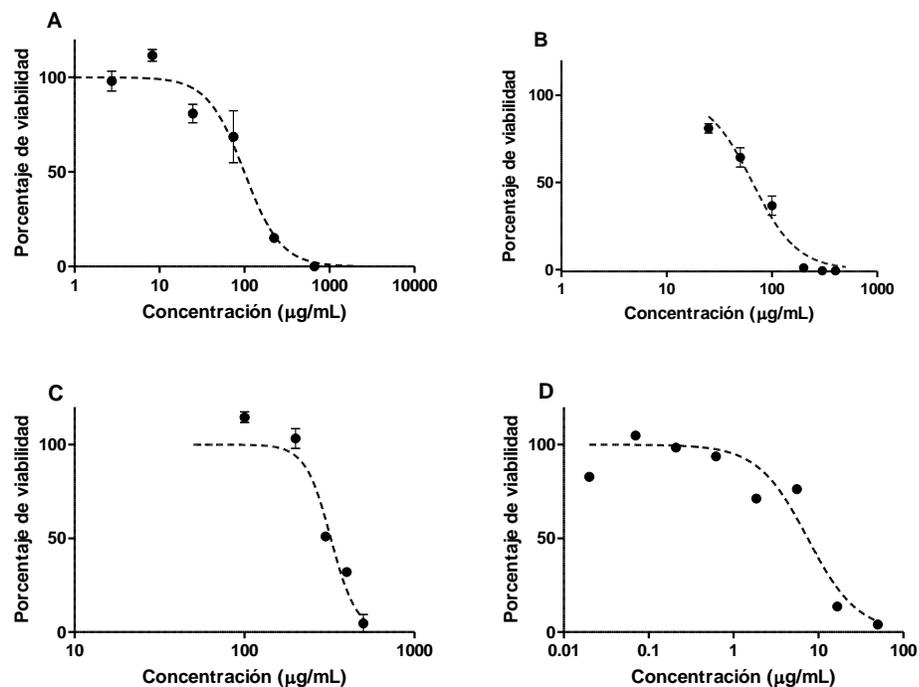


Figura 1. Efecto citotóxico de los extractos derivados de las familias Rutaceae y Lauraceae sobre macrófagos peritoneales de hámster sirio dorado. Se presentan las curvas concentración-respuesta de: **A)** EEOM, **B)** EEZM, **C)** FAEEZM y **D)** Pentamidina (Como medicamento control de actividad leishmanicida) sobre macrófagos peritoneales extraídos de hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*). Todos los extractos fueron obtenidos por el método de maceración con etanol al 96%. FAEEZM es el producto del aislamiento de la fracción alcaloide a partir de EEZM. Las curvas concentración-respuesta representan la media y las desviaciones estándar de un ensayo representativo por triplicado para los diferentes extractos. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado a partir de la normalización de todos los datos frente al control de pozos de las células no tratadas.

Todos los extractos evaluados mostraron una actividad citotóxica inferior a la Pentamidina. Dentro de los extractos evaluados pertenecientes a la familia Rutaceae, aquel que evidenció menos toxicidad fue la FAEEZM (CL_{50} 316,45 \pm 5,95 μ g/ml) en comparación con EEZM (CL_{50} 71,41 \pm 2,33 μ g/ml), resultado consecuente con la obtención química de los dos extractos debido a que FAEEZM es una fracción obtenida a partir EEZM, lo cual sugeriría que los probables componentes tóxicos y/o antagónicos fueron removidos en el fraccionamiento. La familia Rutaceae se caracteriza por su contenido de flavonoides, estructuras con propiedades farmacológicas relacionadas con su capacidad de inhibir enzimas involucradas en la activación celular [44].

La actividad citotóxica del EEOM sobre los macrófagos peritoneales de hámster fue también inferior a la molécula control (CL_{50} 100,46 \pm 13,24 μ g/ml), estos resultados confirman la actividad demostrada previamente (Sánchez et al. 2011) macrófagos J774 [49], con lo cual podemos sugerir que la actividad del extracto de la familia Lauraceae, se relaciona con mecanismos compartidos entre diferentes líneas de macrófagos, independiente de la especie de donde provengan.

El género *Ocotea* (Lauraceae) es conocido principalmente como una fuente de metabolitos tipo furofurán, lignanos, neolignanos y alcaloides [50]. Estos hallazgos de actividad del EEOM se suman a múltiples descripciones de diferentes especies de este género como *Ocotea lancifolia* con actividad antiparasitaria, [34]*Ocotea quixos* con propiedades anti-diarréicas y desinfectantes [51] y *Ocotea macrophylla* con actividad leishmanicida [52].

2.2. Objetivo específico número 2

Determinar la actividad leishmanicida de los extractos derivados de *Ocotea macrophylla* y *Zanthoxylum monophyllum* sobre promastigotes de *Leishmania panamensis* y *Leishmania major*, usada esta última, como modelo de infección para Leishmanias con tropismo cutáneo.

2.2.1. Metodología.

- Para evaluar la efectividad de estos extractos se tomaron promastigotes de *Leishmania panamensis* (MHOM/CO/87/UA140, gentilmente proporcionados por la Doctora Sara Robledo de la Universidad de Antioquia, Colombia) y *Leishmania major* (cepa Friedlin V1, donada amablemente por la Doctora Jimena Cortés de la Universidad Autónoma de Madrid, España). Ambas cepas con reportado tropismo cutáneo.
- Los parásitos fueron cultivados en 5 a 6 mL de medio RPMI 1640 (Gibco BRL-Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% de SFB (Microgen Ltda. Bogotá, Colombia) 1% L-glutamina a 27°C en condiciones de humedad y gasificación ambientales. Cada 7 días los parásitos se centrifugaron en tubos de 15 mL a 1500 rpm y se suspendieron nuevamente en medio fresco.
- Para realizar los ensayos de actividad leishmanicida, posterior al proceso de centrifugado y previo a resuspenderlos en medio fresco, se tomó una alícuota de 50 µL ya la cual se les adicionaron 50 µL de solución salina con 2% de Giemsa y 2% de formol; lo cual permitió inmovilizar a los parásitos y poder realizar el conteo de los mismos previo a su empleo en los diferentes ensayos.
- Para los ensayos de determinación de actividad leishmanicida sobre promastigotes, se sembraron 2×10^5 parásitos de *Leishmania panamensis* y *Leishmania major* en 100 µL por pozo en cajas de 96 pozos de fondo plano (TRP, Trasadingen, Suiza), a las cuales previamente se les había adicionado las diferentes concentraciones del extracto a evaluar por triplicado o medio RPMI 1640 (Gibco BRL-Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA), el volumen final fue de 200µL en cada pozo.

- Bajo las mismas condiciones mencionadas arriba, fueron incubados los ensayos por 72 horas, para luego agregar 50 μL de RPMI con resazurina a 220 μM a cada pozo, para un volumen final de 250 μL con resazurina a 44 μM .
- Mediante el uso de un Tecan GENios Microplate Reader (Tecan Trading AG, Suiza) y el programa Magellan4, 36 horas después se evaluó la reducción de resazurina a resofurina. La medición de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) se calculó bajo el mismo principio estadístico del ensayo de citotoxicidad sobre macrófagos, descritos en el punto anterior.

2.2.2. Resultados y discusión.

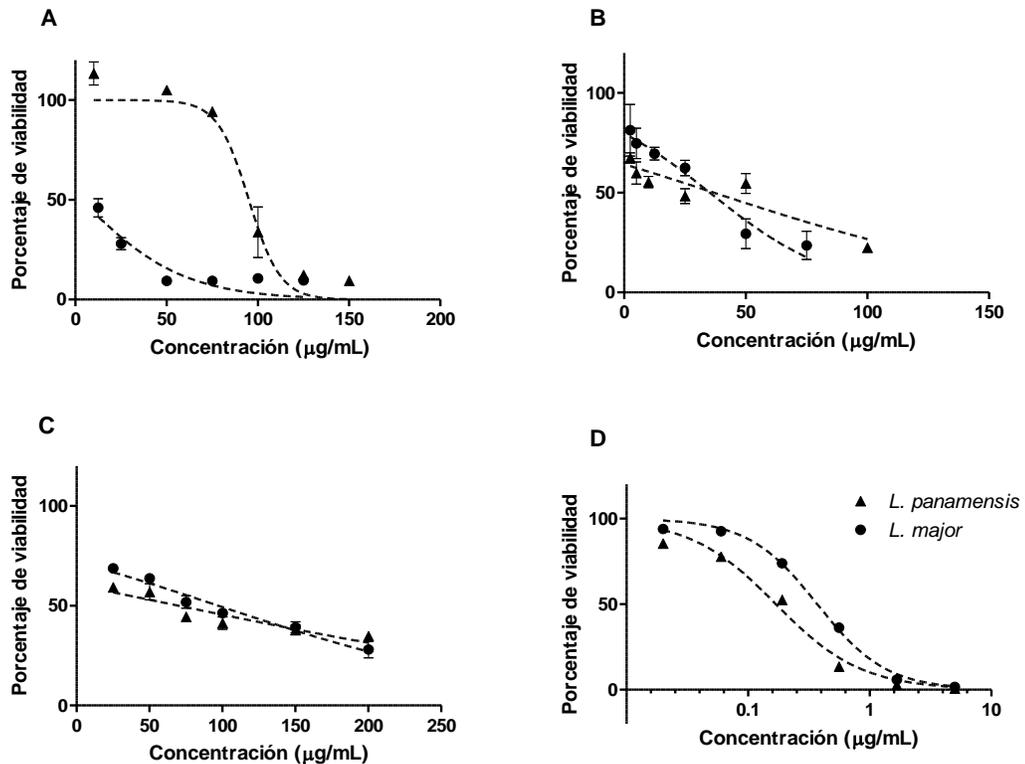


Figura 2. Efecto Leishmanicida de los extractos derivados de las familias Rutaceae y Lauraceae, sobre promastigotes de *Leishmania panamensis* y *Leishmania major*. Se presentan las curvas concentración-respuesta para A) EEOM, B) EEZM, C) FAEEZM y D) Pentamidina sobre promastigotes de las cepas *Leishmania panamensis* y *Leishmania major*. Las curvas concentración-respuesta representan la media y las desviaciones estándar de un ensayo representativo por triplicado para los diferentes extractos. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado a partir de la normalización de todos los datos frente al control de pozos de las células no tratadas. Como control positivo de actividad leishmanicida fue utilizado el isetionato de pentamidina.

Las curvas concentración-respuesta para los extractos EEOM, EEZM y FAEEZM sobre los promastigotes de *Leishmania* se presentan en la Figura 2. La actividad biológica de los extractos derivados de la familia Rutaceae (FAEEZM y EEZM) fue similar.

La CE₅₀ encontrada para el FAEEZM sobre los promastigotes de *Leishmania panamensis* y *Leishmania major* fue **61.43 ± 3.05 y 77.04 ± 3.72 µg/mL**, respectivamente; la CE₅₀ encontrada para el EEZM sobre los promastigotes de *Leishmania panamensis* y *Leishmania major* fue **17.06 ± 1.49 y 25.82 ± 3.15 µg/mL**, respectivamente.

La CE₅₀ hallada en los ensayos de efectividad utilizando el EEOM derivado del material vegetal de la familia Lauraceae, mostró una actividad con diferencias significativas (P=<0,001) entre las dos especies (*Leishmania panamensis*: **100.64 ± 2.96** y *Leishmania major*: **9.66 ± 1 µg/mL**).

En un reporte anterior, en el cual se evaluó la actividad de EEOM sobre promastigotes de *Leishmania panamensis* y *Leishmania braziliensis*, se pudo observar que entre estas dos especies que pertenecen al mismo subgénero, no existía una diferencia importante entre sus CE₅₀ (98.03 ± 19.87 y 85.7 ± 22.88 µg/ml para *Leishmania panamensis* y *Leishmania braziliensis*, respectivamente [49]). En este trabajo se pudo observar que *Leishmania major* se mostró interesantemente más susceptible a la exposición frente a EEOM, con una CE₅₀ igual a 9.7 ± 1 µg/mL (ver Tabla 1). Analizando los resultados de actividad leishmanicida sobre promastigotes de *Leishmania major*, comparados con los observados en las especies del subgénero *Viannia*, se puede sugerir que las características propias del subgénero *Leishmania* condicionan la evidente mayor susceptibilidad, no obstante, sería necesario evaluar la actividad de EEOM sobre otras especies de dicho subgénero para ratificar este postulado.

El empleo de *Leishmania major* en este estudio, radica en que esta especie es responsable de la presentación de leishmaniosis cutánea en el viejo mundo [9]; en este ensayo esta especie mostró una susceptibilidad casi diez veces mayor que *Leishmania panamensis*, por lo que su probable uso como leishmanicida, llegaría a ser efectivo para cualquier caso de leishmaniosis cutánea, principalmente para casos del viejo mundo.

La actividad leishmanicida de los dos extractos derivados la familia Lauraceae sobre las formas libre de *Leishmania* (promastigotes), tuvo un comportamiento similar al registrado en el ensayo sobre los macrófagos; en el sentido que la mayor actividad fue mostrada por el EEZM, que como se mencionó anteriormente es el extracto inicial del cual se derivó FAEEZM que es su fracción alcaloide.

El comportamiento de FAEEZM fue similar frente a los promastigotes de las dos especies de *Leishmania* aquí analizadas, evidenciando en ambos casos I/S similares con CE_{50} de $61,425 \pm 3,05$ $\mu\text{g/mL}$ y $77,04 \pm 3,72$ sobre *Leishmania panamensis* y *Leishmania major*, respectivamente (ver Tabla 1), lo que deja en evidencia que la actividad de FAEEZM es inferior tanto en su actividad sobre macrófagos, como sobre promastigotes, en comparación con EEZM.

TRATAMIENTO	MACROFAGOS PERITONEALES	<i>Leishmania panamensis</i> PROMASTIGOTES		<i>Leishmania major</i> PROMASTIGOTES	
	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	I/S	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	I/S
EEOM	100,46 \pm 13,24	100,64 \pm 2,96	1	9,7 \pm 1	10
EEZM	71,41 \pm 2,33	17,055 \pm 1,495	4	28,99 \pm 3,17	2
FAEEZM	316,45 \pm 5,95	61,425 \pm 3,05	5	77,04 \pm 3,72	4
PTM	6,133 \pm 1,343	0,172 \pm 0,003	35	0,31 \pm 0,061	20

Tabla 1. Citotoxicidad y actividad leishmanicida (promastigotes) de los extractos de plantas Lauraceae y Rutaceae. Resumen de las CL_{50} , CE_{50} , halladas para cada uno de los extractos frente a los macrófagos peritoneales y las diferentes especies de *Leishmania* en su forma libre. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados presentados son la media con la desviación estándar. **PTM** Pentamidina.

Con relación a la actividad sobre los promastigotes, el EEZM mostró una reducción en las CE_{50} , de la misma manera que sucedió con este mismo extracto en los ensayos de citotoxicidad sobre los macrófagos, lo que hasta este momento permite sugerir que la actividad de FAEEZM, se ve reducida de manera no selectiva sobre los macrófagos y los parásitos, actividad aparentemente dependiente de aquellos compuestos que están presentes en el EEZM y que debido al proceso de fraccionamiento pudieron haber sido eliminados del FAEEZM.

2.3. Objetivo específico número 3

Determinar la actividad leishmanicida de los extractos derivados de *Ocotea macrophylla* y *Zanthoxylum monophyllum* sobre amastigotes intracelulares (macrófagos peritoneales) de *Leishmania panamensis* y *Leishmania major*, estableciendo de este modo la CE_{50} y los índices de selectividad ($IS = CL_{50} / CE_{50}$).

2.3.1. Metodología

- Partiendo de la obtención de los macrófagos peritoneales (descritos arriba para el primer objetivo y el mantenimiento de las dos cepas de *Leishmania*, como se describió también anteriormente para el segundo objetivo), se iniciaron los ensayos para determinar la actividad leishmanicida de los extractos EEOM (Lauraceae), FAEEZM y EEZM (Rutaceae) sobre las formas internalizadas amastigotes.
- Los macrófagos una vez sembrados a una densidad de 2×10^4 células/pozo, contenidos en 400 μ L de medio CRPMI en cajas de 24 pozos, fueron expuestos a promastigotes en fase estacionaria (6 días de cultivo, estadio más virulento del parásito[53]) en una proporción de 1:40 (células:parásitos) y se incubaron a 37°C por 24 horas, para alcanzar la infección.
- Los parásitos no internalizados, fueron retirados mediante un lavado suave con el propio medio de cada pozo y realizando posteriormente un cambio de este medio que permitiera retirar los promastigotes aún libres, ajustando posteriormente el volumen final a 100 μ L/pozo y llevados a incubación nuevamente por 24 horas a 37°C, para permitir la estabilidad de la infección.
- Posteriormente, los pozos fueron tratados con las 4 concentraciones de los extractos calculadas dentro del rango de actividad hallado en los ensayos de citotoxicidad (CL_{50}) y efectividad (CE_{50}), partiendo en casi todos los casos de 80 μ g/mL y en dilución seriada 1:2; para el ensayo con EEZM frente a *Leishmania major* se partió de 40 μ g/mL, pero se mantuvo la dilución seriada 1:2, llevando a incubación por 48 horas más.
- La eficacia del extracto fue analizada, respecto al estibogluconato de sodio (STB) [54], fármaco de primera línea usada en tratamientos contra leishmaniosis cutánea [54]. Para la determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}), se hizo un conteo de 100 células por pozo, para así estimar el porcentaje de infección.

- Para evaluar las infecciones y los tratamientos se utilizó la tinción SYBR[®] Safe [55]. La forma rutinaria de evaluación reconocida como la prueba “gold standard” tinción de Giemsa; fue reemplazada debido a que las imágenes obtenidas por la técnica SYBR[®] Safe resultan mejor definidas, lo cual reduce los sesgos a nivel del observador.
- Una vez calculadas las CL₅₀ y las CE₅₀, se procedió a establecer los correspondientes índices de selectividad (IS), resultado del cociente de la CL₅₀ sobre la CE₅₀, como lo describe la ecuación: $IS = CL_{50} / CE_{50}$.

2.3.2. Resultados y discusión.

TRATAMIENTO	MACROFAGOS PERITONEALES	<i>Leishmania panamensis</i> AMASTIGOTES		<i>Leishmania major</i> AMASTIGOTES	
	CL ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)	I/S	CE ₅₀ (µg/mL)	I/S
EEOM	100,46 ± 13,24	12,67 ± 0,11	8	29,16 ± 2,08	3
EEZM	71,41 ± 2,33	6,155 ± 0,115	12	24,95 ± 3,15	3
FAEEZM	316,45 ± 5,95	46,23 ± 1,05	7	30,135 ± 0,685	11
STB	2562 ± 202	704,7 ± 361,6	4	932,8 ± 289,63	3

Tabla 2. Citotoxicidad y actividad leishmanicida (amastigotes) de los extractos de plantas Lauraceae y Rutaceae. Efectividad de extractos frente a amastigotes intracelulares de *Leishmania*. Resumen de las CE₅₀, halladas para cada uno de los extractos frente a las diferentes especies de *Leishmania* en su forma intracelular. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado en dos puntos tiempo diferentes. Los resultados presentados son la media con su desviación estándar. **STB** estibogluconato.

Posterior al tratamiento de los macrófagos infectados con las diferentes especies de *Leishmania*, se logró establecer una CE_{50} de $6,155 \pm 0,115 \mu\text{g}/\text{mL}$ sobre los amastigotes de *Leishmania panamensis* para el extracto EEZM y una CE_{50} de $30,135 \pm 0,685 \mu\text{g}/\text{mL}$ sobre los amastigotes de *Leishmania major* para el extracto FAEEZM, con índice de selectividad de 12 y 11, respectivamente (Ver Tabla 2). Analizando estos índices de selectividad (superiores a 10), encontramos que todos los extractos muestran selectividad preferente frente al género *Leishmania*, sin embargo los derivados de *Zanthoxylum monophyllum*, exhiben una mayor actividad, aunque selectividad dependiente de la especie, siendo EEZM, más selectivo frente a *Leishmania panamensis*, mientras que FAEEZM resultó francamente más selectivo sobre *Leishmania major*.

La actividad leishmanicida de EEOM sobre los amastigotes internalizados de la especie *Leishmania panamensis* fue mayor en comparación con su actividad frente a los promastigotes, alcanzando un I/S de 8 (ver Tabla 2). Sin embargo cuando fue utilizado frente a los amastigotes de *Leishmania major* demostró una actividad inferior a la que se observó frente a los promastigotes, justificando una vez más, la necesidad de evaluar el potencial leishmanicida de extractos, fracciones o compuestos, en el modelo de amastigotes intracelulares, en una aproximación más cercana a lo generado durante una infección natural, donde es justo el amastigote el responsable de la patología y el principal blanco en el diseño de nuevas terapias frente a leishmaniosis.

Basados en los resultados de los extractos más promisorios como fueron el FAEEZM frente a *Leishmania major* (I/S=11), EEZM frente a *Leishmania panamensis* (I/S=12) podemos seguir avanzando en la investigación de estos extractos en diferentes modelos que incluyan cepas de diferentes especies, incluso pasando a un modelo *in vivo*. La familia Rutaceae mostró la mejor actividad antileishmanial; esta familia se caracteriza por su alto contenido de diversos alcaloides, particularmente alcaloides cuaternarios, en especial berberinas y piranoquinolinas zantofilinas [56]. A muchos de los alcaloides presentes en este género se les han atribuido propiedades antibióticas[57]. También se ha demostrado actividad antifúngica frente a *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum* y *Candida albicans* [57].

Como se mencionó anteriormente se ha reportado la presencia de la berberina, compuesto que demostró ser efectivo en un estudio clínico en 1991 (Croft & Yardley, 2002). Vennerstrom et al. (1990), utilizando hámsters como modelo de infección. Dicha actividad antiparasitaria para la berberina fue demostrada sobre *Leishmania donovani* y *Leishmania panamensis*, la cual promovió

la reducción de la infección en un 56% luego de la aplicación de un tratamiento a base de 200 mg/kg/día de este compuesto [58].

2.4. Objetivo específico número 4

Establecer la efectividad (regresión de las úlceras) del extracto con el mejor IS, en el modelo *in vivo* de infección de hámsteres con *Leishmania panamensis* y *Leishmania major*.

2.4.1. Ensayo *in vivo* para el control experimental en infecciones con *Leishmania panamensis*.

2.4.1.1. Metodología

- El modelo de leishmaniosis cutánea localizada basado en la infección generada por *Leishmania panamensis* se estableció sobre hámster *Mesocricetus auratus* de 6 semanas de edad. Los animales fueron mantenidos en las condiciones ideales de temperatura (24 – 28 °C), humedad (70 – 80 %), aire filtrado, alimentación con rodentina, agua estéril (*ad libitum*) cambio de cama una vez a la semana y agrupados por género, según protocolo estandarizado en la tesis de maestría de Ángela María Gómez y su artículo aceptado para publicación en la revista “Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo” titulado “Body weight as a determinant of clinical evolution in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*” [28].
- Se utilizaron 3 grupos experimentales (n=6 cada uno), un grupo tratado con antimonio de meglumina (Glucantime®) (100 µl, 120mg/kg IM por 10 días), un grupo tratado con control de vehículo durante 15 días y el grupo tratado con EEZM(6.60 %) en una formulación tópica.
- Para infectar los animales se realizó previamente un procedimiento anestésico intramuscular con xilacina al 2% (40 mg/kg) y clorhidrato de ketamina al 5% (5mg/kg) lo cual nos permitió realizar la identificación del animal, el pesaje, la tricotomía del área de la infección y aplicar el inculo.
- Los animales fueron infectados en la piel dorsal con inoculación de promastigotes de *Leishmania panamensis* en fase estacionaria suspendidos en solución salina tamponada de fosfato (PBS)[28].

- La concentración de parásitos en el inoculo fue de 10^7 promastigotes.
- El tratamiento fue iniciado inmediatamente después del desarrollo de las lesiones típicas. (5-6 semanas post-infección)
- La efectividad de cada tratamiento fue hecha comparando el tamaño de la lesión antes y después del tratamiento usando el siguiente sistema de puntuación: Cura (recuperación del 100% del área y completa desaparición de la lesión); mejora clínica (reducción del tamaño de la lesión >50% del área); fallo clínico (aumento en el tamaño de la lesión); recaída (reactivación de la lesión después de la cura inicial).
- Análisis estadístico, todos los análisis estadísticos fueron realizados usando SAS v 9.0 (SAS Institute Inc; C; NC,USA. 2002) usando $p < 0.05$ como el nivel de significancia para todas las pruebas. La eficacia *in vivo* fue expresada en términos de porcentajes de cura, mejoría o fallo clínico y comparado con la eficacia observada en el grupo de animales tratados con antimonio de meglumina (Glucantime®). Las pruebas paramétricas y no paramétricas fueron hechas en orden para comparar porcentajes y frecuencias. La variación fue expresada como error estándar y la significancia estadística fue determinada usando el análisis de varianza (ANOVA) cuando se compararon entre grupos.

2.4.1.2. Resultados y discusión.

A todos los animales se les realizó el seguimiento cada 15 días a partir del día de manifestación de la lesión cutánea e inicio del tratamiento hasta 30 días después del final de tratamiento.

En cada control se tomaron medidas de las lesiones, peso de los animales y registro fotográfico de cada animal en el área de la lesión. En la Imagen 4 se agrupan las imágenes tomadas de las lesiones de cada uno de los individuos en los diferentes momentos de monitoreo dentro del grupo tratado con EEZM.

- Índices de evolución de la lesión.

A todos los animales del estudio se les tomaron medidas de las lesiones y posteriormente se calcularon los índices de evolución de la lesión (IEL) tanto como individualmente como por grupo de tratamiento.

El Índice de evolución de la lesión (IEL) se calculó así:

$$\frac{(\text{diametro transversal} + \text{diametro sagital})}{2} = (x)^2 \cdot \pi$$
$$= x \div (x \text{ calculado para el dato inicial de cada individuo})$$

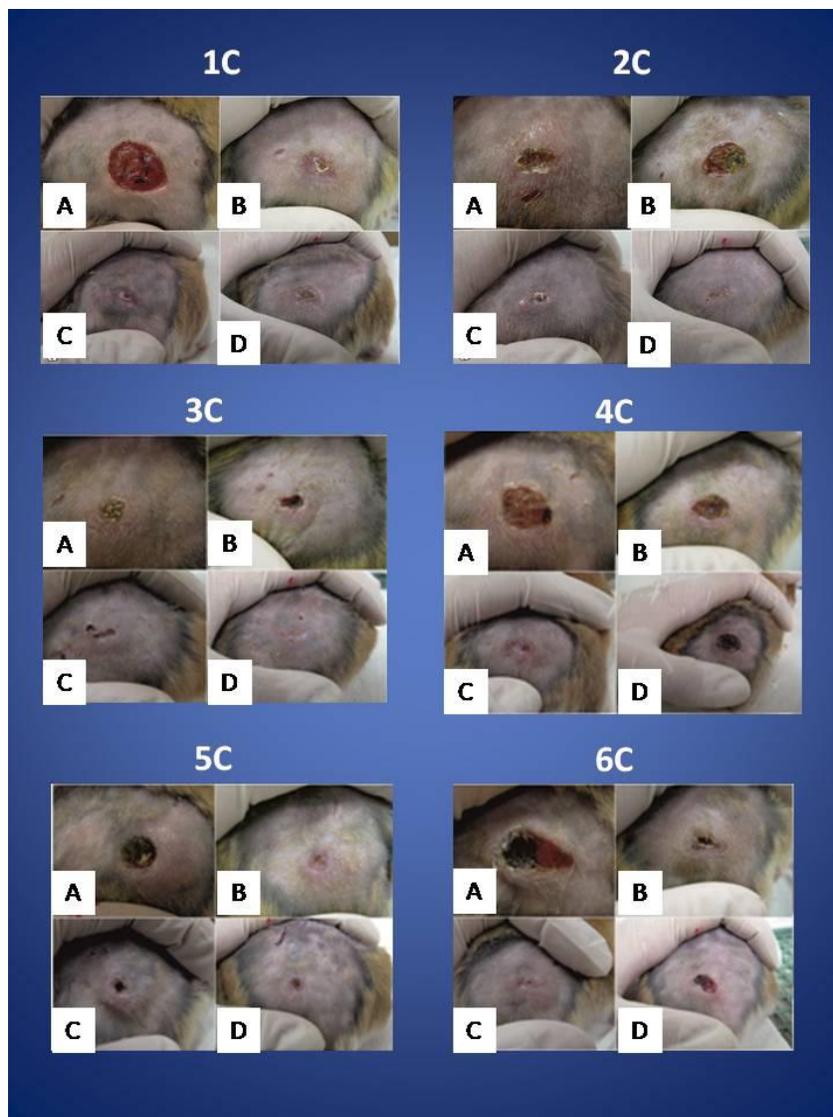


Imagen 4. Evolución de las lesiones de los hámsteres infectados con *Leishmania panamensis* grupo tratado EEZM. Imágenes secuenciales de la evolución de la lesión de todos los individuos tratados (A. Inicio del tratamiento, B. 15 días de tratamiento, C. 15 días post tratamiento, D. 30 días post tratamiento).

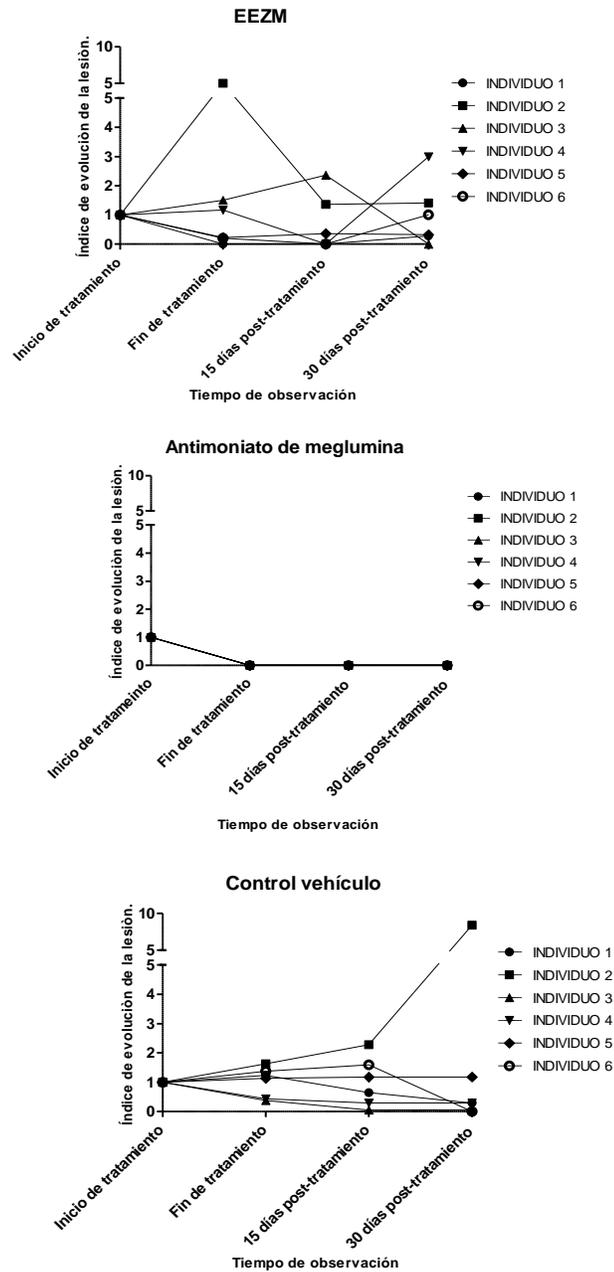


Figura 3. Seguimiento general del índice de evolución de la lesión de los hámsteres infectados con *Leishmania panamensis* en los diferentes grupos por individuos (Vehículo, antimoniato de meglumina (Glucantime®) y EEZM). En la gráfica perteneciente a los individuos tratados con Glucantime® pudimos observar la efectividad y uniformidad en la respuesta al tratamiento a lo largo de todo el ensayo llevando a todos los sujetos a una cura; características que no se pudieron observar en los individuos de los grupos Control y tratados con EEZM.

De forma individual dentro de cada grupo el cálculo del IEL nos permitió observar y hacer el seguimiento del comportamiento de la lesión de cada animal a través del tiempo dentro de su grupo, en comparación con los demás.

En el grupo de tratamiento con el EEZM solo el hámster 3C alcanzó la cura definitiva, dos de los individuos mostraron mejoría: el 1C y 5C (ambos desde el fin del tratamiento mostraron reducción de la lesión aunque el 1C en la medición del día 30 post-tratamiento aumentó de tamaño muy levemente, sin llegar a alcanzar la medición inicial); el hámster 2C presentó falla clínica y los individuos 4C y 6C presentaron recaída, con mayor gravedad en el sujeto 4C. El antimonio de meglumina (Glucantime®) permitió evidenciar la curación en los 6 animales del grupo una vez finalizado el tratamiento y la cura se mantuvo hasta el final del estudio en el 100% de los individuos.

En los animales utilizados como grupo control negativo solo se observó curación en uno de los hámsteres (6V) y mostraron mejoría mayor del 50% en tres individuos 1V, 3V y 4V. En los demás animales (2V y 5V)hubo aumento del tamaño de la lesión o reducción del tamaño de la lesión menor del 50%.

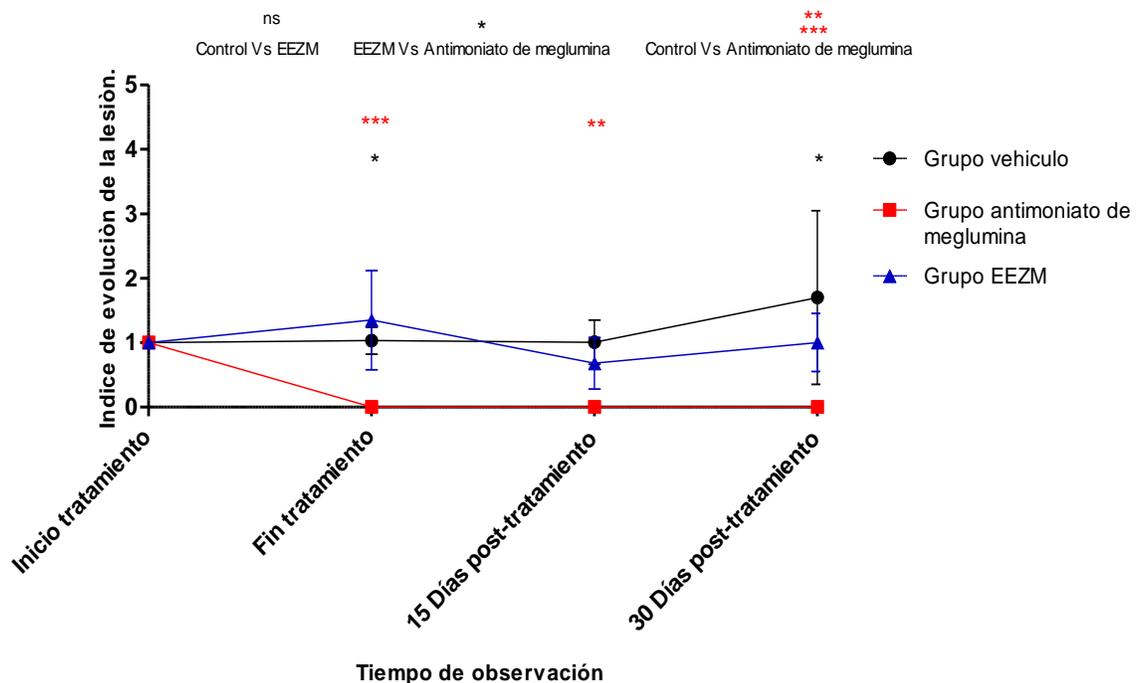


Figura 4. Comparación del efecto de los diferentes tratamientos sobre los hámster infectados con *Leishmania panamensis*. Seguimiento del tamaño de la lesión en cada grupo por individuo y se muestra en la figura unificado como índice de evolución (IEL) (* = P< 0,05; ** = P< 0,01; *** = P<0,001)

Para cada uno de los grupos se calcularon los índices de evolución de la lesión, pudiendo de este modo determinar el comportamiento de cada grupo de individuos respecto al tratamiento administrado. El análisis de los datos nos permitió observar que no hubo diferencia significativa entre los grupos control y el grupo tratado con el EEZM en ningún punto tiempo de nuestro experimento. La única diferencia estadísticamente significativa fue lograda entre el grupo control negativo y el grupo tratado con antimonio de meglumina (Glucantime®).

- Porcentajes de reducción de la lesión

La efectividad de cada tratamiento sobre todos los individuos en los diferentes grupos fue clasificada de acuerdo al sistema de puntuación mencionado anteriormente, donde según su porcentaje de reducción de la lesión se clasificaron dentro de un parámetro clínico (ver Figura 5).

Cuando se comparan los resultados entre individuos del grupo control negativo y el grupo tratado con EEZM se evidencia que el tratamiento con el extracto no mostró una diferencia importante ya que solo curó a un individuo igual que sucedió en el grupo control negativo, promovió a mejoría clínica a 2 hamsteres, incluso menos individuos que en el grupo control donde 3 sujetos presentaron mejoría clínica; por otro lado en el grupo tratado con antimonio de meglumina (Glucantime®) se generó cura en los seis individuos.

Con las observaciones anteriores podemos concluir que el EEZM en formulación para uso tópico a una concentración de 6,60 % y aplicado una vez al día por 15 días sobre el área de la lesión es inefectiva para el tratamiento de lesiones ulcerativas causadas por la infección con *Leishmania panamensis* en el modelo animal (hámster *Mesocricetus auratus*).

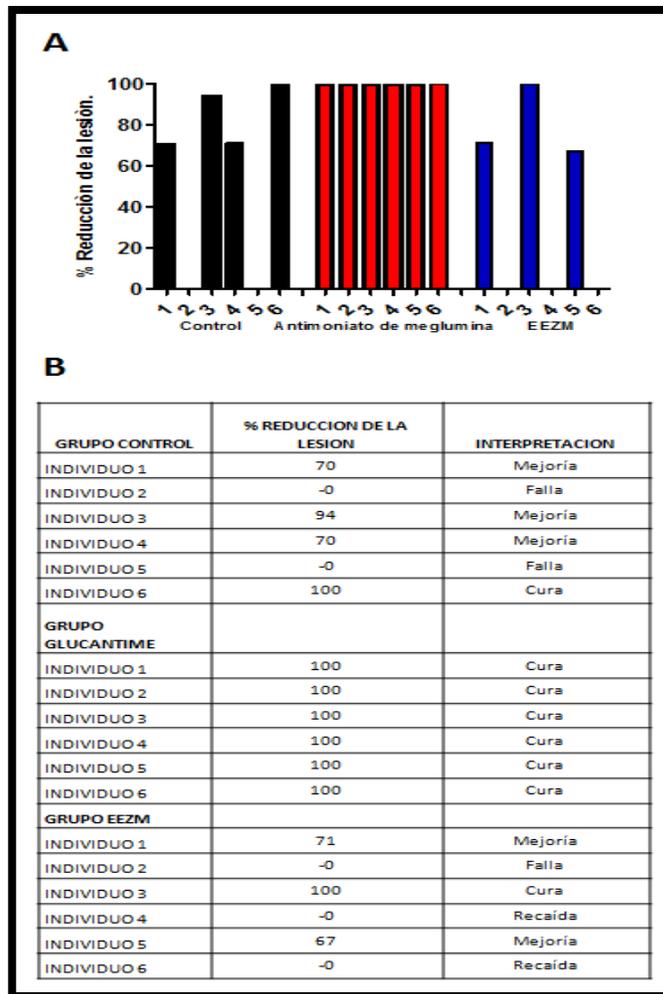


Figura 5. Porcentajes de reducción de la lesión de cada individuo de los diferentes grupos de tratamiento sobre los hámster infectados con *Leishmania panamensis*. (A) Grafica representativa del porcentaje de reducción de la lesión de cada individuo de todo el estudio. (B) Tabla resumen donde según su porcentaje de reducción de la lesión se clasifica dentro de una interpretación clínica.

- Seguimiento de peso corporal.

En términos generales, no se observó una pérdida de peso estadísticamente significativa en ninguno de los animales tratados y monitoreados en diversos puntos tiempo del estudio.

El peso corporal de los animales tratados con el extracto tampoco evidenció cambios significativos durante los 30 días posteriores al tratamiento ($p > 0.05$, ANOVA). Ver Figura 6.

El análisis de los pesos se hizo mediante el cálculo del índice de modificación del peso corporal.

El Índice de modificación del peso corporal se calculó así:

$$\text{Peso corporal} = (x)^2 \cdot \pi = x \div (x \text{ calculado para el dato inicial de cada individuo})$$

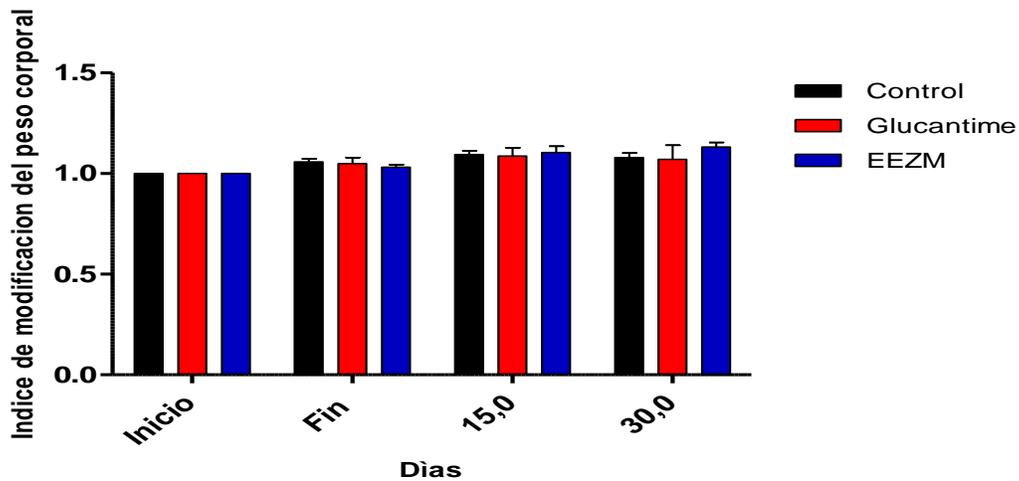


Figura 6. Índice de modificación del peso corporal de los hámsteres infectados con *Leishmania panamensis* en los diferentes grupos de tratamientos (Control negativo, antimonio de meglumina (Glucantime®) y EEZM) a lo largo de todo el experimento.

2.4.2. Ensayo *in vivo* para el control experimental de infecciones con *Leishmania major*.

2.4.2.1. Metodología

- Si bien el modelo de leishmaniosis cutánea ha sido explorado para especies del parásito del Nuevo Mundo, en este trabajo incluimos la principal especie responsable de la enfermedad cutánea en el Viejo Mundo sobre el modelo del hámster *Mesocricetus auratus*.

- El modelo de leishmaniosis cutánea localizada basado en la infección generada por *L. major*, se estableció sobre 15 hámsteres *Mesocricetus auratus* (9 hembras y 6 machos) con una edad aproximada de 10 semanas a los cuales se les inocularon en la región del dorsal, 200 μ L de NaCl al 0.9% conteniendo 5×10^6 promastigotes en fase estacionaria [59].
- Para infectar los animales, previamente se anestesiaron mediante un procedimiento anestésico intramuscular con xilacina al 2% (40 mg/kg) y clorhidrato de ketamina al 5% (5mg/kg); lo cual nos permitió realizar la identificación del animal, el pesaje, la tricotomía del área de la infección y aplicar el inóculo.
- Los animales fueron mantenidos en un microaislador Sistema One Cage AllerZone™ Micro-Isolator™, con ayuda del cual se mantuvieron las condiciones ideales de temperatura (24 – 28 °C), humedad (70 – 80 %), aire filtrado, alimentación con Rodentina®, agua estéril (*ad libitum*) cambio de cama una vez a la semana y agrupados por género.
- Dos veces por semana se evaluó el área del inóculo de todos los animales en busca de lesiones de aproximadamente 5 a 8 mm de diámetro.
- 8 semanas después de la infección, todos los animales desarrollaron induraciones y/o úlceras de diferentes tamaños, las cuales alcanzaron el tamaño deseado en la 9 semana.
- Una vez generadas las lesiones, los animales fueron distribuidos de manera aleatoria en tres diferentes grupos (Ver tabla 3).

GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3	
NUMERO DE ANIMALES	IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES	NUMERO DE ANIMALES	IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES	NUMERO DE ANIMALES	IDENTIFICACION DE LOS ANIMALES
5	7-8-9-14-15	5	4-5-6-12-13	5	1-2-3-10-11

Tabla 3. Conformación de los grupos de los animales infectados con *L. major*. Todos los grupos estuvieron conformados por 3 hembras y 2 machos. El grupo numero 1 fue tratado con cinco inyecciones de FAEEZM (Rutaceae) a una dosis de 50 mg/kg vehiculizado en 2.5% de DMSO (DimetilSulfóxido) por vía intralesional cada 4 días. El grupo numero 2 fue tratado con 5 inyecciones de antimonioato de meglumina (Albiventriz®) a una dosis de 120 mg/kg IL. El grupo numero 3 fue tratado con NaCl 0.9% con 2.5% de DMSO como control de vehículo.

- El cálculo para preparar el tratamiento del grupo 1 (FAEEZM) se realizó sobre 5 inyecciones de 50 mg/kg en 200 μ L de NaCl 0.9% y al 2.5% de DMSO para cada animal; a pesar de ser 15 dosis en total se preparó extracto para 18 tratamientos en caso de tener algún desperdicio o pérdida de alguna dosis.
- El grupo número 2 fue tratado con el medicamento antimoniato de meglumina (Albiventriz®) 120 mg/kg Arbofarma® [60]
- Para el tratamiento del grupo número 3 se prepararon 200 μ L de NaCl 0.9% al 2.5% de DMSO por inyección para cada animal, en total 5 mL. De la misma forma que para la preparación del extracto en este caso preparamos 3 mL adicionales por prevención.
- El monitoreo de los individuos se realizó cada 15 días.
- Bajo anestesia se realizaron todos los tratamientos por vía intralesional dividiendo la dosis total para aplicación en cuatro puntos diferentes en la misma lesión.
- El protocolo de tratamiento utilizado para todos los grupos fue: 5 inyecciones vía intralesional cada 4 días.
- Finalizados todos los tratamientos, se realizaron controles 2 y 4 semanas después para establecer la evolución de los animales y la regresión de las lesiones.

2.4.2.2. Resultados y discusión

En cada uno de los días de tratamiento y durante el monitoreo, se obtuvieron las medidas de las lesiones, los pesos y las imágenes fotográficas de cada lesión de cada individuo.

Las fotografías del periodo de tratamiento se resumen en las Imágenes 5, 6 y 7. En estas imágenes se observa la evolución secuencial de cada individuo de cada grupo de tratamiento. En la Imagen 5, se observa el efecto sobre las lesiones de todos los individuos tratados con el control del vehículo.

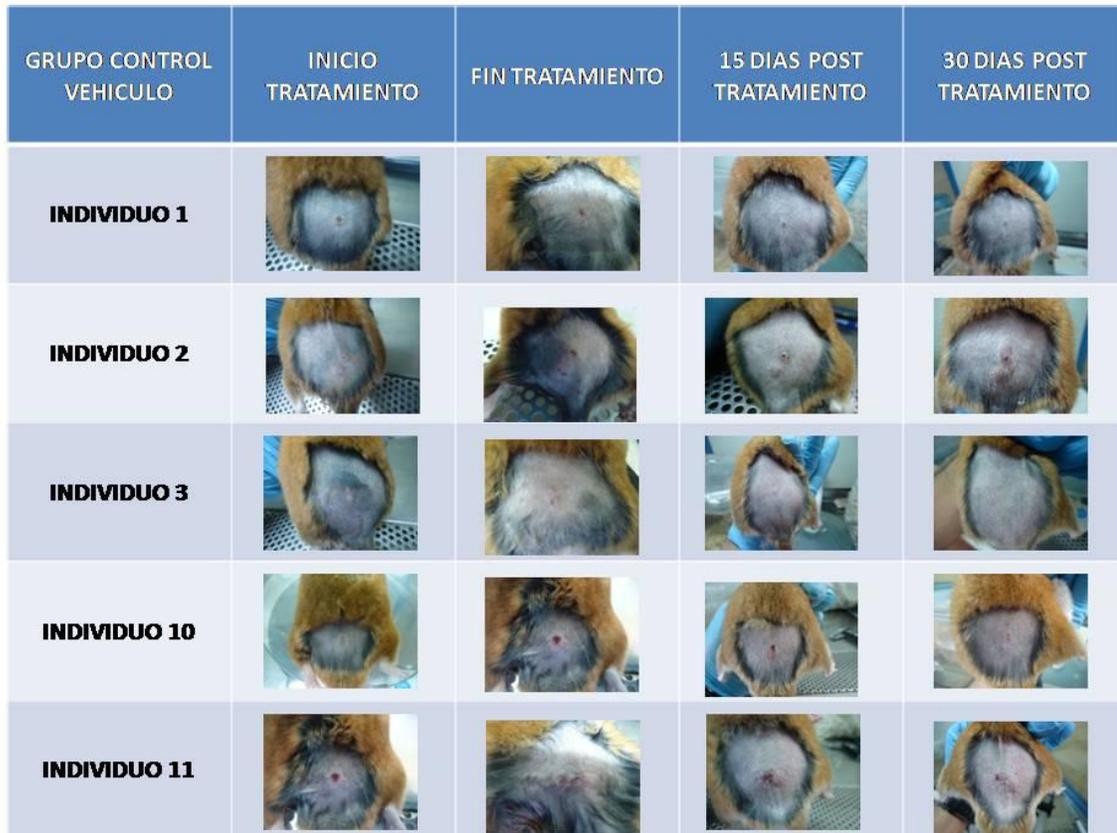


Imagen 5. Evolución de las lesiones de los hámsteres infectados con *Leishmania major* grupo tratado con la solución de vehículo como control. Imágenes secuenciales de la evolución de la lesión de todos los individuos tratados.(5 inyecciones cada 4 días de 200 μ l de NaCl 0.9% al 2.5% DMSO vía intralesional) (A. Inicio del tratamiento, B. 15 días de tratamiento, C. 15 post tratamiento, D. 30 días post tratamiento).

En la Imagen 5 se observa que a pesar de algunas variaciones en el tamaño de las lesiones, durante el tratamiento no se presentó en ninguno de los casos curación de la úlcera o induración. Al comparar la imagen de la lesión inicial con el aspecto de la lesión final, no se percibe una diferencia importante, lo cual se correlaciona con el escaso porcentaje de reducción de la lesión (PRL) en el comportamiento de este grupo control en general; todo lo anterior durante el tratamiento pero en las evaluaciones posteriores 15 y 30 días después, dos de los individuos presentaron cura, otro tuvo mejoría y los dos restantes presentaron falla.

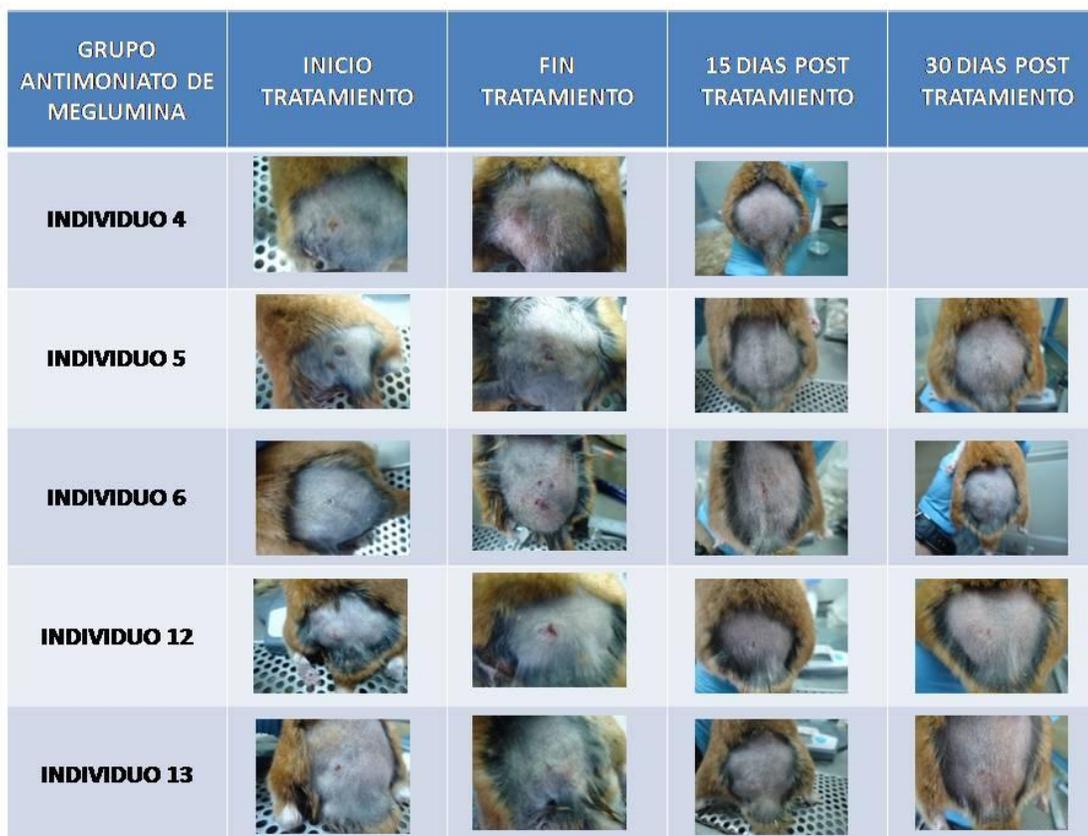


Imagen 6. Evolución de las lesiones de los hámsteres infectados con *Leishmania major* grupo tratado con Antimoniato de Meglumina (Albiventriz®) Imágenes secuenciales de la evolución de la lesión de todos los individuos tratados.(5 inyecciones cada 4 días 120mg/kg de antimoniato de meglumina, vía intralesional)(A. Inicio del tratamiento, B. 15 días de tratamiento, C. 15 post tratamiento, D. 30 días post tratamiento).

En el grupo tratado con antimoniato de meglumina (Albiventriz®) se observa una evolución favorable en la mayoría de los individuos, evidenciando el efecto terapéutico de este medicamento contra la leishmaniosis cutánea, el cual es concordante con el resultado de las mediciones y el cálculo de porcentaje de reducción de la lesión, que reveló una evolución positiva a lo largo de todo el experimento (Ver Figura 6).

En la Imagen7, se evidencia el efecto positivo del tratamiento con la FAEEZM sobre los hámster infectados con *Leishmania major*; en el cual destacamos que al final del periodo de tratamiento dos (2) individuos presentaron cura y los tres restantes presentaron mejoría clínica. En las evaluaciones posteriores a los 15 y 30 días, todo el grupo progresó a cura en todas las lesiones.

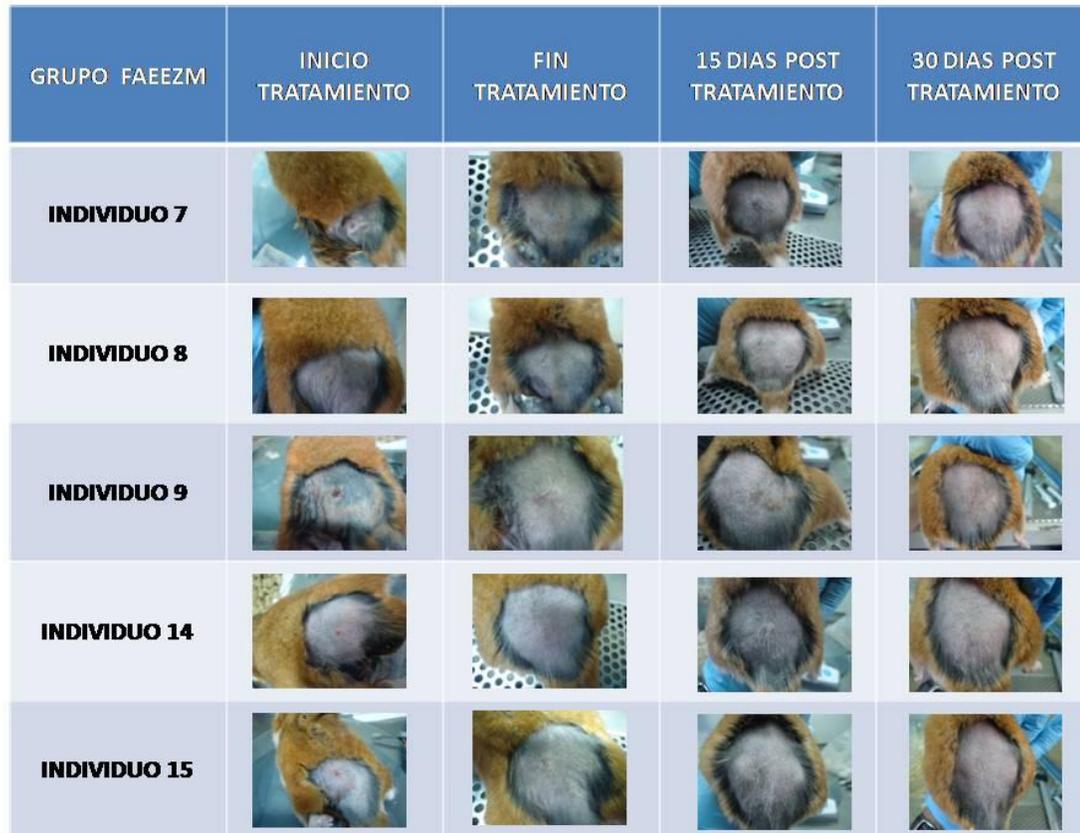


Imagen 7. Evolución de las lesiones de los hámsteres infectados con *Leishmania major*, grupo tratado con FAEZM. Imágenes secuenciales de la evolución de la lesión de todos los individuos tratados.(5 inyecciones cada 4 días 50 mg/kg de FAEZM, vía intralesional)(A. Inicio del tratamiento, B. 15 días de tratamiento, C. 15 post tratamiento, D. 30 días post tratamiento).

- Índices de evolución de la lesión.

Una vez obtenidas, las medidas fueron llevadas a un índice que permitiera observar las variaciones de manera más clara.

El Índice de evolución de la lesión (IEL) se calculó así:

$$\frac{(\text{diámetro transversal} + \text{diámetro sagital})}{2} = (x)^2 \cdot \pi$$

$$= x \div (x \text{ calculado para el dato inicial de cada individuo})$$

En la Figura 7 observamos la variación individual del IEL de todos los grupos y durante todo el tiempo del ensayo.

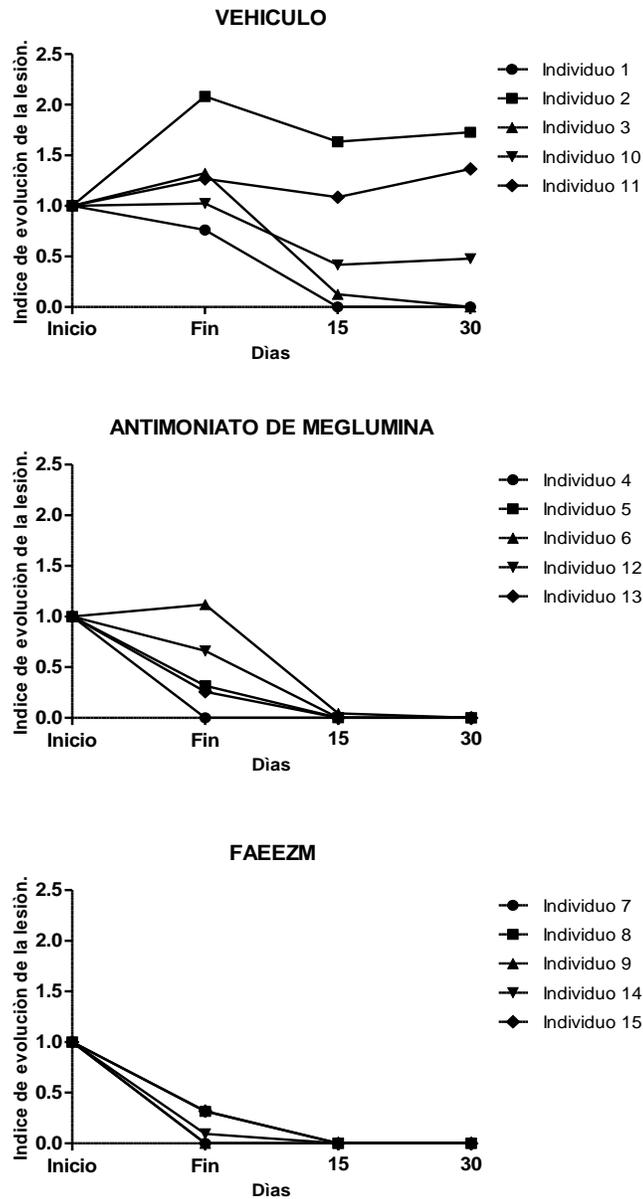


Figura7. Seguimiento general del índice de evolución de la lesión de los hámsteres infectados con *L. majoren* los diferentes grupos por individuos (Vehículo, antimoniato de meglumina (Albiventris®) y FAEEZM). En la gráfica perteneciente a los individuos tratados con antimoniato de meglumina y FAEEZM pudimos observar una respuesta similar a lo largo de todo el ensayo llevando a todos los sujetos a una cura; diferente a la evolución en los individuos del grupo control vehículo.

A fin de establecer las diferencias entre grupos de tratamiento a lo largo del ensayo, se realizó un ANOVA de 2 vías y se aplicó un test de Bonferroni. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre el grupo control del vehículo y el grupo tratado con antimonio de meglumina (Albiventriz®) lo cual es un resultado esperado ya que está bien documentado el éxito terapéutico con el protocolo instaurado para los hámsteres. Por otro lado, también encontramos diferencias significativas en los IEL entre el grupo control del vehículo y el grupo tratado con la FAEEZM, resultado también esperado soportado en los reportes que describen la utilidad del DMSO como vehículo sin actividad farmacológica o tóxica a la concentración empleada en nuestro protocolo [61]. El resultado más sobresaliente fue que no se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento con antimonio de meglumina (Albiventriz®) y FAEEZ, lo cual sugiere el potencial antileishmanial de esta fracción (ver Figura 8).

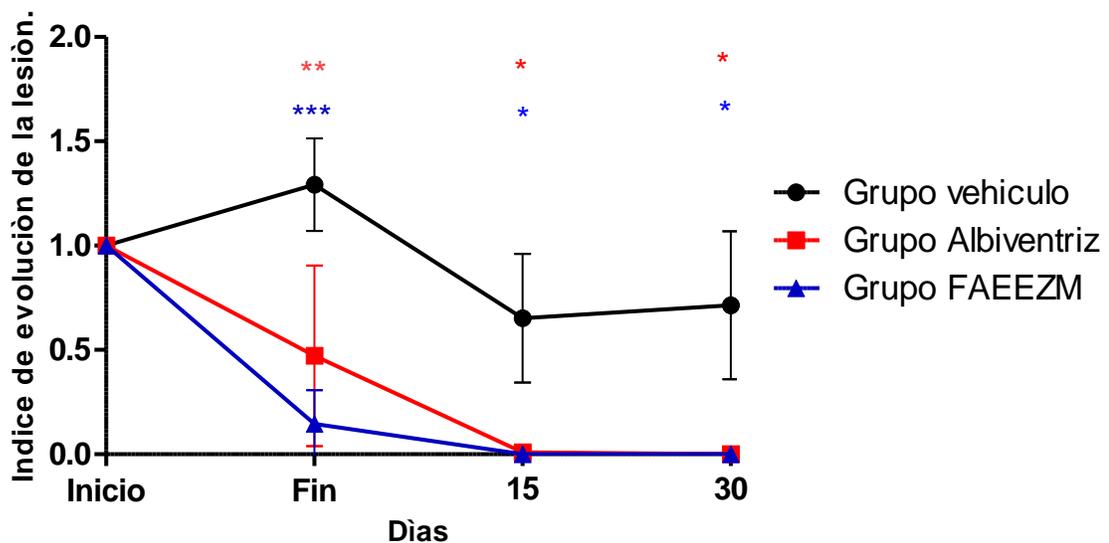


Figura 8. Comparación del efecto de los diferentes tratamientos sobre los hámster infectados con *Leishmania major*. Seguimiento del tamaño de la lesión en cada grupo por individuo y se muestra en la figura unificado como índice de evolución (IEL) (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$)

- Porcentajes de evolución de la lesión

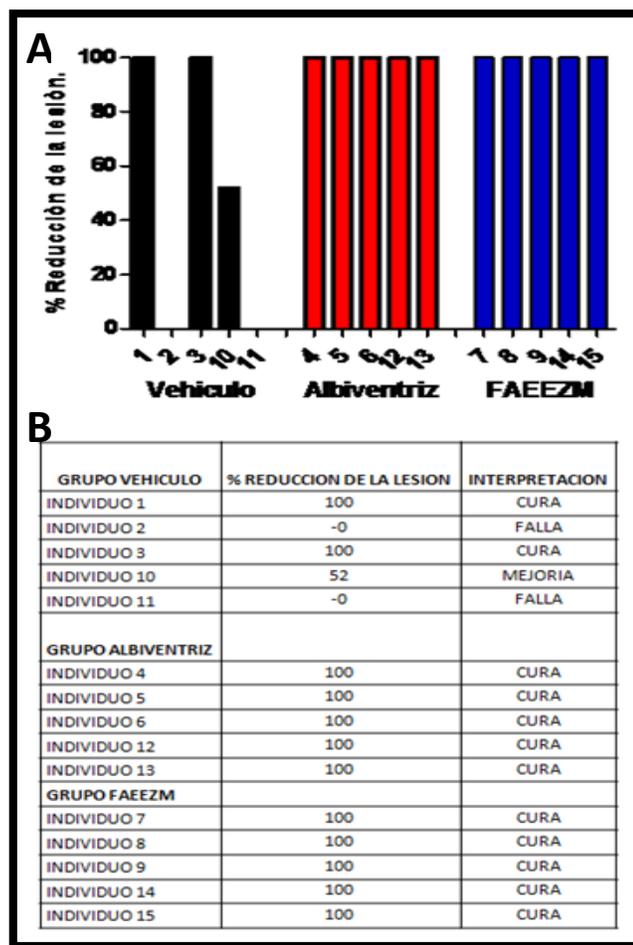


Figura 9. Porcentajes de reducción de la lesión de cada individuo de los diferentes grupos de tratamiento sobre los hámster infectados con *L. major*. (A) Gráfica representativa del porcentaje de reducción de la lesión de cada individuo de todo el estudio. (B) Tabla resumen donde según su porcentaje de reducción de la lesión se clasifica dentro de una interpretación clínica.

Una vez calculados los porcentajes de reducción de la lesión, se observó que no hubo evolución favorable en el grupo control del vehículo (DMSO 2,5 % + Na Cl 0.9%), la mayoría de las lesiones de los individuos en este grupo mostraron un aumento de tamaño y solo en un individuo se vió una leve recuperación durante el tiempo del tratamiento. En las evaluaciones post-tratamiento se observó que dos sujetos alcanzaron cura, uno mejoría clínica y otros dos presentaron falla clínica.

En el grupo tratado con el medicamento de referencia antimonio de meglumina (Albiventriz®) observamos una evolución favorable en cuatro individuos. Todos mostraron una tendencia de evolución esperada durante el tiempo del tratamiento, incluyendo las observaciones post-tratamiento donde todos los sujetos presentaron cura. El grupo tratado con FAEEZM interesantemente mostró una evolución favorable en la totalidad del grupo llevando incluso a la desaparición total de la lesión (cura) en todos los casos post-tratamiento (ver Figura 9).

Este es el primer reporte de actividad antileishmanial de la fracción alcaloide de *Zanthoxylum monophyllum* en ensayos *in vivo*; aunque dentro de la familia Rutaceae ya se ha descrito la actividad leishmanicida *in vitro*, como se ha reportado en diferentes artículos publicados por nuestro grupo de investigación. También existen reportes como el de Ferreira Et. al, 2002, donde se demostró la inhibición del crecimiento de cepas de *Leishmania spp* tratadas con 100 µg/mL del extracto alcaloide crudo de *Zanthoxylum chiloperone*, del que posteriormente se aislaría un compuesto con actividad *in vivo* utilizado por vía intralesional.

Como parte de este extracto alcaloide ya ha sido demostrada la presencia de diferentes alcaloides berberínicos (Patiño, et al 2010) y también se ha reportado de manera extensa su actividad antileishmanial frente a diversas especies del parásito (cutaneotrópicas o viscerotrópicas). Para mencionar algunos ejemplos están los siguientes estudios donde demostraron la actividad de la berberina, dihidroberberina, oxyberberina, tetrahydroberberina, tetrahydro: N-oxydeberberina frente a *Leishmania donovani* (Vennerstrom et al, 1990) y berberina frente a *Leishmania mexicana* (Edward et al 1995). Se resalta que si bien la berberina está en el extracto correspondiente, es del único compuesto con el cual se cuentan reportes con la actividad antiparasitaria de interés [32]. Es importante considerar que en el presente estudio, la berberina hace parte de un extracto alcaloide conformado por otros compuestos de esta naturaleza, para los cuales no encontramos en la literatura reportes de actividad; es decir parece que ninguno de los demás alcaloides que hacen parte de este extracto logra un efecto antagónico que limite la actividad de la berberina. Otra posibilidad que podemos sugerir, es que la berberina a la concentración contenida en el extracto, logra un efecto sinérgico antileishmanial favorable (específico y quizá más seguro) con otro u otros de los alcaloides contenidos en el extracto y que quizá, esta combinación es la responsable de la actividad observada en la resolución de las lesiones experimentales. En cualquiera de los dos casos, se hace necesario un estudio debidamente detallado que permita confirmar o descartar estos postulados.

Recientemente, en estudios *in vivo* se confirmó una reducción del 47 % de la parasitosis en hígado en ratones con leishmaniosis visceral, tratados con un compuesto berberínico (5,6-didehydro-8,8-diethyl-13-oxodihydroberberine chloride) a una dosis de 1 mg/kg vía intraperitoneal, resultados que sugieren la utilidad terapéutica de este tipo de compuestos para el control de formas complejas de la enfermedad (Bahar M et al (2011).

- Seguimiento del peso corporal.

Los pesos de todos los sujetos fueron medidos en el mismo momento de la medición de las lesiones.

Durante el desarrollo de este experimento observamos cambios estadísticamente significativos en los pesos evaluados por medio del cálculo índice de modificación del peso corporal que se calculó de la misma manera que se menciona anteriormente.

La primera evaluación en la que observamos cambios fue el día del final del tratamiento entre los grupos tratados con FAEEZM y el grupo Control, estas diferencias se mantuvieron en las evaluaciones 15 y 30 días después del final del tratamiento.

El grupo tratado con antimonio de meglumina (Albiventriz®) no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros dos grupos de tratamiento.

Es importante resaltar que no hubo cambios estadísticamente significativos entre el grupo tratado con FAEEZM y el control positivo (Alviventriz®). Lo que nos permite sugerir que la modificación en los pesos corporales fue dependiente de los tratamientos, aparentemente estos impidieron una pequeña ganancia de peso de los animales de la misma forma que si se dio en el grupo control negativo.

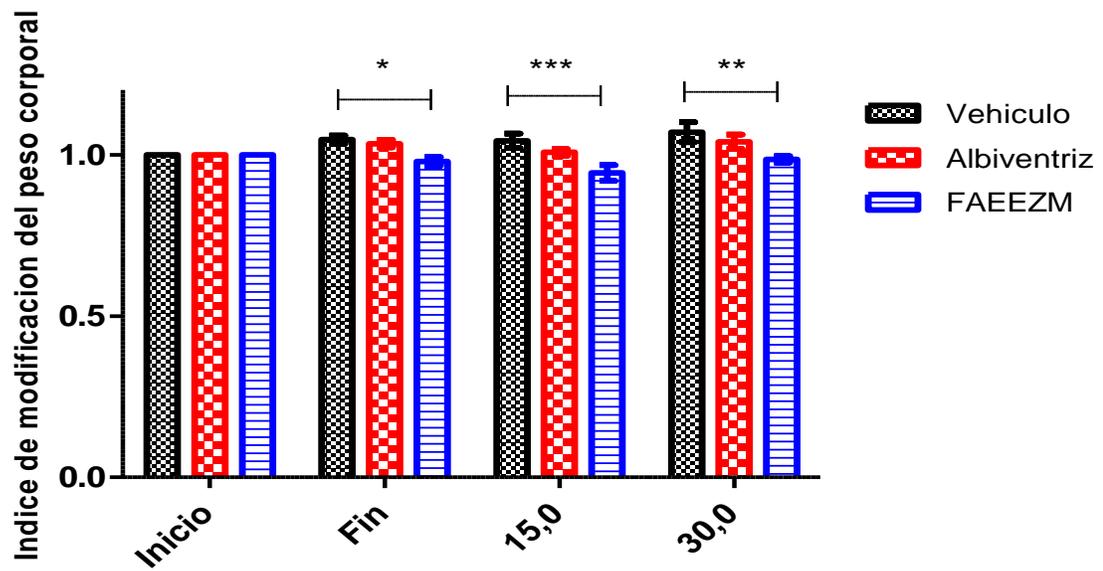


Figura 10. Índice de modificación del peso corporal de los hámsteres infectados con *Leishmania major* en los diferentes grupos de tratamientos (Control, antimonio de meglumina (Albiventriz®) y EEZM) a lo largo de todo el experimento (* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0.001$)

3. Conclusiones y perspectivas.

- La FAEEZM mostró actividad antileishmanial *in vitro* frente a las especies *L. panamensis* y *L. major* actividad que se mantuvo en el experimento *in vivo* frente a *L. major*; estos resultados se suman a los diversos reportes de actividad antileishmanial por parte de diferentes alcaloides dentro de los cuales destaca la presencia de compuestos berberinicos (Berberina que fue reportada como componente mayoritario de nuestra FAEEZM).
- La actividad leishmanicida *in vivo* mostrada por FAEEZM solo nos demuestra un punto final clínico que sugiere un efecto antileishmanial pero como punto final no es suficiente, para lo cual haría falta realizar experimentos que nos permitieran confirmar una disminución de la carga parasitaria en la región afectada; pero, podría ser un aporte inicial para la generación de productos Fitoterapéuticos para lo cual se requieren futuros estudios y caracterización y estandarización de la fracción.
- La FAEEZM mostró actividad antileishmanial *in vivo* frente a *L. major* llevando a resultados promisorios, los cuales deberíamos investigar sobre otras especies de *Leishmania spp.* Complementando los resultados del punto final clínico con ensayos que nos permitan corroborar la carga parasitaria en el tejido.
- Estandarización y caracterización de la FAEEZM con miras a generar un producto fitoterapéutico con actividad antileishmanial que se pueda empezar a evaluar en otras formas de administración diferentes a la vía inyectada.

4. Referencias.

1. WHO, *Leishmaniasis* in <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. 2011.
2. OMS, C.O., *Boletín Epidemiológico in Semanal*. 2004, www.col.ops-oms.org/sivigila/2004/BOLE08_04.
3. Social, M.d.P., *Informe Epidemiológico Mensual*, in <http://www.minproteccionsocial.gov.co/vbecontent/library/documents/DocNewsNo16892/DocumentNo10020.PDF>. 2009.
4. DGSM, *Boletín Epidemiológico in semestral*. 2009, www.sanidadfuerzasmilitares.mil.co. p. 12.
5. www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Estadisticas%20SIVIGILA/2013%20semana%2010.pdf.
6. Murray, H.W., et al., *Advances in leishmaniasis*. Lancet, 2005. **366**(9496): p. 1561-77.
7. Sasidharan, S., et al., *Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts*. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2011. **8**(1): p. 1-10.
8. Chakravarty, J. and S. Sundar, *Drug resistance in leishmaniasis*. J Glob Infect Dis. **2**(2): p. 167-76.
9. Bates, P.A., *Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10): p. 1097-106.
10. Desjeux, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2004. **27**(5): p. 305-18.
11. OMS., http://www.who.int/topics/tropical_diseases/qa/faq/es/index6.html. 2005.
12. David, C.V. and N. Craft, *Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis*. Dermatol Ther, 2009. **22**(6): p. 491-502.
13. Anne Laure Banuls, M.H., Franck Prugnolle., *Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans*. Advances In Parasitology, 2007. **64**: p. 113.
14. Davies CR, R.R., Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. , *The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries*. Cad Saude Publica, 2000. **16**: p. 925-950.
15. Mitropoulos, P., P. Konidas, and M. Durkin-Konidas, *New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment*. J Am Acad Dermatol. **63**(2): p. 309-22.
16. Tuon, F.F., et al., *Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis*. Int J Dermatol, 2008. **47**(2): p. 109-24.
17. Nylen, S. and S. Gautam, *Immunological perspectives of leishmaniasis*. J Glob Infect Dis. **2**(2): p. 135-46.
18. Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach, *Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?* Trends Microbiol, 2003. **11**(5): p. 210-4.
19. Pearson, R.D. and R.T. Steigbigel, *Phagocytosis and killing of the protozoan Leishmania donovani by human polymorphonuclear leukocytes*. J Immunol, 1981. **127**(4): p. 1438-43.
20. Antoine, J.C., et al., *Leishmania spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts*. Adv Parasitol, 2004. **58**: p. 1-68.

-
21. Stumhofer, J.S., J. Silver, and C.A. Hunter, *Negative regulation of Th17 responses*. Semin Immunol, 2007. **19**(6): p. 394-9.
 22. Nakae, S., et al., *Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(5): p. 1258-68.
 23. Schriefer, A., M.E. Wilson, and E.M. Carvalho, *Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis*. Curr Opin Infect Dis, 2008. **21**(5): p. 483-8.
 24. Lipoldova, M. and P. Demant, *Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(4): p. 294-305.
 25. Donovan, P.B.a.J., *Current Protocols in immunology*. 1995: p. 4476.
 26. Ehrchen, J.M., et al., *Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis*. PLoS Pathog. **6**(4): p. e1000871.
 27. Osorio, Y., et al., *The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with Leishmania panamensis*. Parasite Immunol, 2003. **25**(3): p. 139-48.
 28. Robledo, S.M., et al., *Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: a useful model for the screening of antileishmanial drugs*. J Vis Exp, 2012(62).
 29. Espitia, C.M., et al., *Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis*. BMC Immunol. **11**: p. 31.
 30. Manju Panghal, V.A., Sanjay Yadav, Sunil Kumar, and Jaya Parkash Yadav, *Indigenous knowledge of medicinal plants used by Saperas community of Khetawas, Jhajjar District, Haryana, India*. J Ethnobiol Ethnomed., 2010. **6**(4).
 31. Franca, F., E.L. Lago, and P.D. Marsden, *Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to Leishmania (Viannia) braziliensis in an endemic area of Bahia, Brazil*. Rev Soc Bras Med Trop, 1996. **29**(3): p. 229-32.
 32. Rocha, L.G., et al., *A review of natural products with antileishmanial activity*. Phytomedicine, 2005. **12**(6-7): p. 514-35.
 33. Monte, R.L., et al., *Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from Ocotea duckei (Lauraceae) show antileishmanial activity*. Z Naturforsch C, 2007. **62**(5-6): p. 348-52.
 34. Fournet, A., et al., *Phytochemical and antiprotozoal activity of Ocotea lancifolia*. Fitoterapia, 2007. **78**(5): p. 382-4.
 35. Coy, E.D., L.E. Cuca, and M. Sefkow, *COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of Lauraceae neolignans*. Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19**(24): p. 6922-5.
 36. Cabral, M.M., et al., *Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol. **124**(3): p. 319-24.
 37. Monte Neto, R.L., et al., *Morphological and physiological changes in Leishmania promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from Ocotea duckei*. Exp Parasitol, 2011. **127**(1): p. 215-21.
 38. Mohagheghzadeh, A., et al., *Medicinal smokes*. J Ethnopharmacol, 2006. **108**(2): p. 161-84.
 39. Botsaris, A.S., *Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal*. J Ethnobiol Ethnomed, 2007. **3**: p. 18.
 40. G. Coelho de Souza a, A.P.S.H.b., G.L. von Poser c, E.E.S. Schapoval c, E. Elisabetsky b, *, *Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil*. Journal of Ethnopharmacology 2004. **90**: p. 135-143.
 41. Morais, L.C., J.M. Barbosa-Filho, and R.N. Almeida, *Central depressant effects of reticuline extracted from Ocotea duckei in rats and mice*. J Ethnopharmacol, 1998. **62**(1): p. 57-61.

-
42. <http://www.foei.org/en/resources/link/privatization/52.html>.
43. Jorge Morales-Saldaña 1 , N.G., José Rovira 2 , Manuel Abrahams 3, *Larvicidal activity of the grapefruit Citrus paradise (Rutaceae) on two vectors of dengue*. Revista Peruana de Biología, 2007. **14**(2).
44. Benavente-Garcia, O. and J. Castillo, *Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(15): p. 6185-205.
45. Prempeh, A. and J. Mensah-Attipoe, *Crude aqueous extract of the root bark of zanthoxylum xanthoxyloides inhibits white blood cells migration in acute inflammation*. Ghana Med J, 2008. **42**(3): p. 117-9.
46. Prempeh, A. and J. Mensah-Attipoe, *In vivo inhibition of prostaglandin e(2) production by crude aqueous extract of the root bark of zanthoxylum xanthoxyloides*. Ghana Med J, 2008. **42**(2): p. 85-8.
47. Prempeh, A. and J. Mensah-Attipoe, *Analgesic activity of crude aqueous extract of the root bark of zanthoxylum xanthoxyloides*. Ghana Med J, 2008. **42**(2): p. 79-84.
48. Anoopkumar-Dukie, S., et al., *Resazurin assay of radiation response in cultured cells*. Br J Radiol, 2005. **78**(934): p. 945-7.
49. Sanchez-Suarez, J., et al., *Leishmanicidal and cytotoxic activities of extracts and naturally-occurring compounds from two Lauraceae species*. Nat Prod Commun. **6**(2): p. 231-4.
50. Cuca, L.C.P.y.L.E., *APORPHINE ALKALOIDS FROM Ocotea macrophylla (LAURACEAE)*. Quim. Nova, 2010. **33**(4): p. 4.
51. Ballabeni, V., et al., *Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild Ocotea quixos (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador*. Pharmacol Res, 2007. **55**(1): p. 23-30.
52. Sanchez-Suarez, J., et al., *Leishmanicidal and cytotoxic activities of extracts and naturally-occurring compounds from two Lauraceae species*. Nat Prod Commun, 2011. **6**(2): p. 231-4.
53. Travi, B.L., et al., *Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with Leishmania spp*. Infect Immun, 2002. **70**(5): p. 2288-96.
54. Rojas, R., et al., *Resistance to antimony and treatment failure in human Leishmania (Viannia) infection*. J Infect Dis, 2006. **193**(10): p. 1375-83.
55. Pérez cordero JJ, e.a., *Use of fluorescent stain for evaluating in vitro infection with Leishmania panamensis*. Experimenta parasitology, 2011. **129**(1): p. 31-5.
56. De Garcia LA, C.J., Reguero MT, Joseph-Nathan P, *Phytochemical study of Zanthoxylum monophyllum*. Fitoterapia, 1989. **60**: p. 447- 450.
57. Yrma Gomez, K.G., Elba Gonzalez, Luz Marina Farias, *Actividad Antifingica de extractos organicos de arblo Fagara Monophylla (Rutaceae) en Venezuela*. Rev. Biol. Trop, 2007. **55**(3-4): p. 767-775.
58. Serrano-Martin, X., *Quimioterapia contra leishmaniasis: estado del arte, retos y nuevas propuestas desde Venezuela*. Revista de Estudios Transdisciplinarios., 2010. **2**(1): p. 69-75.
59. Soliman, M.F., *The persistence, dissemination, and visceralization tendency of Leishmania major in Syrian hamsters*. Acta Trop, 2006. **97**(2): p. 146-50.
60. Henao, H.H., et al., *[Efficacy and toxicity of pentavalent antimonials (Glucantime and Pentostam) in an American cutaneous leishmaniasis animal model: luminometry application]*. Biomedica, 2004. **24**(4): p. 393-402.
61. Lamidi, M., et al., *In vitro cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants*. J Ethnopharmacol, 2005. **102**(2): p. 185-90.