



---

---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

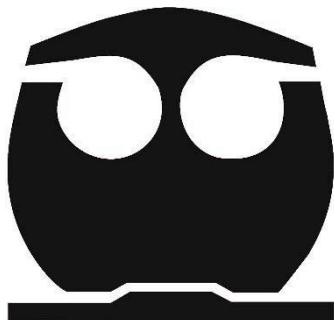
TESIS

ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE LOS ÁCIDOS OLEANÓLICO Y  
MASLÍNICO AISLADOS A PARTIR DE LOS FRUTOS DE  
*Arctostaphylos pungens* Kunth (Pingüica)

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARCO ANTONIO BONILLA NAVA



CDMX

2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**            **MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS**

**VOCAL:**                   **JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ**

**SECRETARIO:**       **MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO**

**1er. SUPLENTE:**       **MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR**

**2° SUPLENTE:**         **ABRAHAM MADARIAGA MAZON**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO;

LABORATORIO DE INMUNOPARASITOLOGÍA DE LA UNIDAD DE  
INVESTIGACIÓN EN MEDICINA EXPERIMENTAL (UIME) DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA (UNAM)

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ**

**SUSTENTANTE:**

---

**MARCO ANTONIO BONILLA NAVA**



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por permitirme tener un mejor futuro en el ámbito profesional, y ayudarme a crecer como ser humano.

A la Dra. Ingeborg Becker y a los Dres. José Fausto Rivero Cruz y José Sotero Delgado Domínguez por su asesoría y apoyo en la realización de este proyecto de investigación.

Al PAIP 5000-9138 por el apoyo financiero otorgado al Dr. José Fausto Rivero Cruz.

A los miembros del jurado por las valiosas observaciones realizadas al trabajo escrito.

A la M. en C. Q. Ronna Delgado Altamirano por su apoyo y asesoría técnica en los ensayos biológicos de este proyecto.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia por las facilidades otorgadas para la disposición de los cultivos.

## INDICE GENERAL

Lista de abreviaturas y acrónimos.....	I
Lista de cuadros.....	V
Lista de figuras.....	V
Lista de tablas.....	VII
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. Leishmaniasis.....	4
3.1.1. Incidencia y prevalencia.....	4
3.1.2. Aspectos epidemiológicos.....	7
3.1.3. Ciclo biológico.....	12
3.1.4. Tratamiento para la leishmaniasis.....	14
3.2. Triterpenos pentacíclicos.....	18
3.2.1. Generalidades.....	18
3.2.2. Propiedades biológicas del ácido oleanólico.....	20
3.2.3. Propiedades biológicas del ácido maslínico.....	21
3.2.4. Potencial anti-leishmaniasis del ácido oleanólico y el ácido maslínico.....	23
3.3. Situación actual y problemática en México.....	25

3.4.	Generalidades sobre <i>Arctostaphylos pungens</i> Kunth .....	28
3.4.1.	Nombres comunes.....	28
3.4.2.	Botánica y ecología.....	28
3.4.3.	Etnobotánica.....	29
3.4.4.	Química y Farmacología.....	29
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
5.	HIPÓTESIS .....	32
5.1.	OBJETIVOS.....	33
5.1.1.	Objetivos generales.....	33
5.1.2.	Objetivos particulares.....	33
6.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	34
6.1.	Obtención del extracto etanólico y los compuestos puros AM y AO.....	34
6.2.	Ensayos biológicos.....	35
6.2.1.	Obtención de la cepa de <i>Leishmania mexicana</i> .....	35
6.2.2.	Parásitos.....	36
6.2.3.	Actividad leishmanicida <i>in vitro</i> .....	36
6.2.4.	Actividad leishmanicida in vivo.....	38
6.3.	Prueba estadística.....	39
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
7.1.	Proceso cromatográfico y caracterización química de los compuestos puros AM y AO.....	41

7.1.1.	Caracterización estructural de metabolitos aislados.....	45
7.1.2.	Caracterización estructural del ácido oleanólico (PINC001) .....	45
7.1.3.	Caracterización estructural del ácido maslínico (PINC002) .....	48
7.2.	Evaluación de la actividad biológica del extracto etanólico y las fracciones cromatográficas (AM y AO) obtenidas de los frutos de <i>A. pungens</i> K .....	50
7.2.1.	Efecto del AM y el AO sobre el crecimiento y viabilidad en promastigotes de <i>L mexicana</i> .....	50
7.2.2.	Efecto del extracto etanólico sobre crecimiento y viabilidad en promastigotes de <i>L mexicana</i> .....	56
7.2.3.	Efecto leishmanicida <i>in vivo</i> sobre <i>L. mexicana</i> .....	59
8.	CONCLUSIONES .....	61
9.	PERSPECTIVAS .....	62
10.	REFERENCIAS .....	63
11.	ANEXOS.....	74
11.1.	Anexo 1.....	74
11.2.	Anexo 2.....	75

**Lista de abreviaturas y acrónimos**

<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>AM</b>	Ácido maslínico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AO</b>	Ácido oleanólico
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>AVAD</b>	Años de vida ajustados por discapacidad
<b><i>A. pungens</i> K</b>	<i>Arctostaphylos pungens</i> Kunth
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b>cm</b>	Centímetro
<b>COSY</b>	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b><i>C. serrata</i></b>	<i>Cleoserrata serrata</i>
<b><i>d</i></b>	Doblete
<b><i>dd</i></b>	Doble de dobles
<b><i>ddd</i></b>	Doble de doble de dobles
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDT</b>	Enfermedades desatendidas tropicales



## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



<b>ET</b>	Enfermedades transmisibles
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>Ex. EtOH</b>	Extracto etanólico
<b>g</b>	Gramo
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>HMBC</b>	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear a varios enlaces ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>HSQC</b>	Espectroscopía bidimensional de correlación única heteronuclear a un enlace ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IL</b>	Interleucina
<b>im</b>	Intramuscular
<b>iv</b>	Intravenosa
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamiento
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>LAC</b>	Cepa Lacandona
<b><i>L. amazoenis</i></b>	<i>Leishmania amazoenis</i>
<b>LC</b>	Leishmaniasis cutánea
<b>LCD</b>	Leishmaniasis cutánea difusa
<b>LCL</b>	Leishmaniasis cutánea localizada
<b><i>L. donovani</i></b>	<i>Leishmania donovani</i>



<b>LD</b>	Leishmaniasis cutánea diseminada
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b><i>L. infantum</i></b>	<i>Leishmania infantum</i>
<b>LMC</b>	Leishmaniasis mucocutánea
<b><i>L. mexicana</i></b>	<i>Leishmania mexicana</i>
<b>LV</b>	Leishmaniasis visceral
<b>M199</b>	Medio de cultivo líquido 199
<b>M</b>	Molaridad
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NM</b>	Nuevo mundo
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>OPS</b>	Organización panamericana de la salud
<b>PBS</b>	Amortiguador de fosfatos
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de protón

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Singulete
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>sin</b>	Sinónimo
<b>t</b>	Triplete
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>UIME</b>	Unidad de Investigación en Medicina Experimental
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humano
<b>VM</b>	Viejo mundo
<b>VLC</b>	Cromatografía líquida a vacío
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b><math>\delta</math></b>	Desplazamiento químico
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar

### Lista de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Principales formas clínicas de leishmaniasis y especies de <i>Leishmania</i> asociadas.....	9
<b>Cuadro 2.</b> Medicamentos empleados en el tratamiento de los cuadros clínicos de leishmaniasis.....	15
<b>Cuadro 3.</b> Datos espectroscópicos del ácido oleanólico ( $\delta$ en ppm). ....	47
<b>Cuadro 4.</b> Datos espectroscópicos del ácido maslínico ( $\delta$ en ppm). ....	49

### Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Zonas con entidades federativas afectadas por leishmaniasis en México.....	6
<b>Figura 2.</b> Taxonomía de <i>Leishmania</i> . ....	8
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	13
<b>Figura 4.</b> Tipos de estructuras en los triterpenos pentacíclicos.....	18
<b>Figura 5.</b> Estructura molecular del ácido oleanólico (AO, C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub> ) y el ácido maslínico (AM, C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub> ). ....	19
<b>Figura 6.</b> Planta de <i>Arctostaphylos pungens</i> K.....	28
<b>Figura 7.</b> Cromatograma en capa fina de los principales constituyentes químicos derivados de la fracción no soluble en el extracto etanólico de <i>A. pungens</i> K.....	44
<b>Figura 8.</b> Curva de crecimiento de promastigotes <i>L. mexicana</i> incubados con diferentes concentraciones del AM por 72 horas.....	51
<b>Figura 9.</b> Efecto del AO sobre el crecimiento de parásitos.....	53
<b>Figura 10.</b> Efecto del AM sobre el crecimiento de parásitos.....	54
<b>Figura 11.</b> Determinación de la CI <sub>50</sub> en los ensayos <i>in vitro</i> sobre la cepa de <i>L. mexicana</i> . ....	55
<b>Figura 12.</b> Viabilidad de promastigotes co-incubados con extracto etanólico durante 72 horas. ....	56



<b>Figura 13.</b> Determinación de la $CI_{50}$ en los ensayos <i>in vitro</i> sobre la cepa de <i>L. mexicana</i> .....	57
<b>Figura 14.</b> Evolución de la lesión causada por la cepa de <i>L. mexicana</i> en ratones C57BL/6 con y sin tratamiento. ....	60
<b>Figura 15.</b> Espectro RMN- $^1H$ del ácido oleanólico (PINC001), piridina- $d_5$ , 400 MHz. ....	75
<b>Figura 16.</b> Espectro RMN- $^{13}C$ del ácido oleanólico (PINC001), piridina- $d_5$ , 100 MHz. ....	76
<b>Figura 17.</b> Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento $^1H$ - $^1H$ -COSY del ácido oleanólico (PINC001), piridina- $d_5$ , 400 MHz. ....	77
<b>Figura 18.</b> Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento HSQC del ácido oleanólico (PINC001), piridina- $d_5$ , 400 MHz. ....	78
<b>Figura 19.</b> Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento HMBC del ácido oleanólico (PINC001), piridina- $d_5$ , 400 MHz. ....	79
<b>Figura 20.</b> Espectro RMN- $^1H$ del ácido maslínico (PINC002), piridina- $d_5$ , 400 MHz. ....	80
<b>Figura 21.</b> Espectro RMN- $^{13}C$ del ácido maslínico (PINC002), piridina- $d_5$ , 100 MHz. ....	81
<b>Figura 22.</b> Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento $^1H$ - $^1H$ -COSY del ácido maslínico (PINC002), piridina- $d_5$ , 400 MHz. ....	82
<b>Figura 23.</b> Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento HSQC del ácido maslínico (PINC002), piridina- $d_5$ , 400 MHz. ....	83
<b>Figura 24.</b> Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento HMBC del ácido maslínico (PINC002), piridina- $d_5$ , 400 MHz. ....	84

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Condiciones para los promastigotes de la cepa <i>L. mexicana</i> tratados con los compuestos (AO y AM) y el extracto etanólico (Ex. EtOH). .....	37
<b>Tabla 2.</b> Solubilidad del extracto total de <i>A. pungens</i> K con distintos disolventes. ....	41
<b>Tabla 3.</b> Determinación de compuestos fenólicos para el extracto total de <i>A. pungens</i> K. ....	42
<b>Tabla 4.</b> Proceso cromatográfico en VLC para la fracción no soluble derivada del extracto etanólico de frutos de <i>A. pungens</i> K. ....	43
<b>Tabla 5.</b> Constituyentes químicos aislados y purificados del extracto etanólico de los frutos de <i>A. pungens</i> K. ....	44
<b>Tabla 6.</b> Valores calculados para la concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) de todos los compuestos en promastigotes de <i>L. mexicana</i> . ....	58
<b>Tabla 7.</b> Formulación de la crema empleada como vehículo en el ensayo <i>in vivo</i> sobre la cepa de <i>L. mexicana</i> . ....	74

## 1. RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad que se caracteriza por un gran polimorfismo clínico que puede llegar a comprometer la piel, las mucosas y las vísceras. Son causadas por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*.

A pesar de ser un problema de salud en todo el mundo, continúan siendo afecciones altamente desatendidas que carecen de un tratamiento eficaz y poco tóxico. La investigación actual de nuevos agentes leishmanicidas, más potentes y selectivos, demuestra el papel crucial de los productos naturales en el desarrollo de una nueva generación de fármacos antiparasitarios.

Como resultado del estudio químico del fruto de *Arctostaphylos pungens* K (pingüica) se consiguió el aislamiento e identificación por primera vez de dos compuestos: ácido maslínico (ácido (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ )-2,3-dihidroiolean-12-en-28-oico) y ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidroiolean-12-en-28-oico).

Así mismo, los resultados derivados de los ensayos biológicos mostraron que, tanto el ácido maslínico como el ácido oleanólico poseen un potente efecto leishmanicida sobre promastigotes de la cepa *Leishmania mexicana* (CI<sub>50</sub>=26.50  $\pm$  2.80  $\mu$ M, y CI<sub>50</sub>=71.93  $\pm$  1.10  $\mu$ M, respectivamente). Si bien, no hay reportes etnomédicos sobre su uso contra leishmaniasis, el extracto orgánico preparado a partir de los frutos de la pingüica también reveló una notable actividad leishmanicida sobre la cepa *L. mexicana*, con una CI<sub>50</sub> de 82.51  $\pm$  1.44  $\mu$ g/mL.



## 2. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis describe un grupo de enfermedades tropicales desatendidas causadas por protozoarios del género *Leishmania*, estos son transmitidos por la picadura/mordedura del flebótomo hembra de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*.<sup>1</sup> En el humano infectado causan un conjunto de síndromes clínicos que pueden comprometer la piel, las mucosas y las vísceras.<sup>2</sup> Simultáneamente, los fármacos empleados para tratar la enfermedad suelen ser tóxicos y costosos, más aún, está aumentando la resistencia de los parásitos a estos medicamentos.

Es necesario recalcar que, las actividades turísticas y de recreación en áreas endémicas, fenómenos de migración forzada y el cambio climático, han contribuido al incremento de casos reportados en países o regiones no endémicas. Excluyéndose así el paradigma sobre leishmaniasis como una enfermedad exclusiva de los pobres.

Como en otros países, México es afectado por esta enfermedad. De hecho, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) prevalece como el principal cuadro clínico sobre la población mexicana. A su vez, la problemática se agrava debido a que no se cuenta con información veraz respecto a la tasa de curación y recaídas, así como de casos nuevos notificados, o bien, sobre los efectos adversos del medicamento antimonial empleado.

Por otro lado, los ácidos maslínico y oleanólico comprenden un tipo de triterpenos pentacíclicos con un amplio espectro farmacológico. Brevemente, se han descrito efectos sobre bacterias, protozoarios, virus (VIH), y células cancerígenas; de igual modo se indica su acción como antioxidantes, hipoglucemiantes, antiinflamatorios, cardio, gastro y hepatoprotectores.





Recientemente, avances en el conocimiento de los productos naturales han conducido a evaluar diversos compuestos con capacidad antileishmaniasis, lo cual promete revolucionar el tratamiento dirigido a los pacientes. Entre algunos de estos agentes leishmanicidas se encuentran los triterpenos pentacíclicos. En particular, el ácido maslínico y el ácido oleanólico, se han ensayado tanto *in vitro* como *in vivo* sobre aquellas especies de *Leishmania* asociadas a los principales cuadros clínicos: Cutáneo, mucocutáneo y visceral. Los resultados obtenidos sugieren una notable aplicación terapéutica para estas moléculas.

En este marco de referencia, el presente trabajo de investigación caracterizó químicamente dos compuestos aislados a partir del fruto de *Arctostaphylos pungens* K (pingüica): ácido maslínico y ácido oleanólico. Así mismo, se analizó el efecto derivado por dichos ácidos sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes de la cepa *Leishmania mexicana*. De igual modo, el extracto total de los frutos de pingüica fue evaluado sobre esta especie de *Leishmania*.



### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Leishmaniasis**

##### **3.1.1. Incidencia y prevalencia**

De acuerdo con datos recopilados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2018, a nivel mundial, el 9.7% de las muertes son causadas por enfermedades transmisibles (ET), formando parte de éstas, las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) que generalmente son causa de ceguera, desfiguración, mutilación y debilidad para cientos de millones de personas. Dentro de los tipos principales de ETD se encuentran: dengue, equinococosis, rabia, esquistosomiasis, lepra, teniasis, neurocisticercosis, y leishmaniasis, entre otras.<sup>3,4</sup> Juntas causan aproximadamente 220 mil defunciones cada año. Por si misma, la leishmaniasis provoca cerca de cuarenta mil muertes al año, lo que la convierte en un importante problema de salud pública en todo el mundo, con un estimado de 350 millones de personas en riesgo de infección. La prevalencia general es 12 millones de casos por esta enfermedad y la incidencia anual es 2 a 2.5 millones de casos.<sup>5-8</sup>

Las leishmaniasis son parasitosis que afectan a la población más vulnerable de zonas endémicas, principalmente en áreas rurales y áreas urbanas desatendidas. Además del impacto psicológico y emocional que conlleva el padecimiento por leishmaniasis, las consecuencias socioeconómicas que acompañan el tratamiento de la enfermedad son de gran repercusión monetaria para la comunidad, especialmente para aquellas menos favorecidas, donde el acceso a los recursos médicos es limitado.<sup>9</sup>



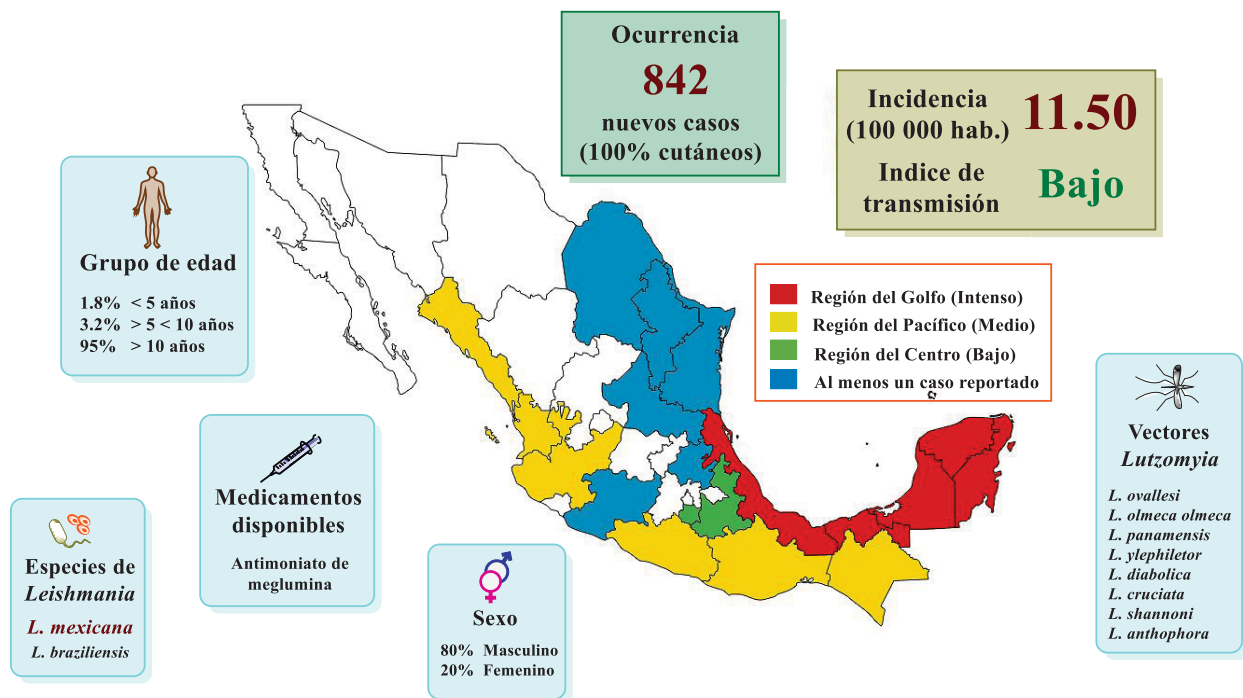
De todas las enfermedades parasitarias, la mortalidad de leishmaniasis es superada solo por la malaria, y en términos de AVAD (Años de Vida Ajustados por Discapacidad) la tercera causa más común de morbilidad después de la malaria y la esquistosomiasis.<sup>10</sup> Los tipos de leishmaniasis comunes en infantes y adultos presentan síntomas que varían desde lesiones cutáneas ulcerativas hasta lesiones deformantes de la mucosa (leishmaniasis cutánea, LC) o hipertrofia hepática y del bazo (leishmaniasis visceral, LV).<sup>11-13</sup> Se sabe que la prevalencia global actual es 0.2 a 0.4 millones de casos por LV y 0.7 a 1.2 millones de casos por LC.<sup>5,14</sup> Adicionalmente, se ha reportado un aumento en casos de leishmaniasis importada en países no endémicos e industrializados, en asociación con el incremento de los viajes internacionales, actividades militares, migración, urbanización, deforestación y agricultura cerca de los sitios de reproducción de los flebotomíneos, así como el cambio climático,<sup>1,8,15</sup> haciendo de esta parasitosis una importante enfermedad tanto para habitantes locales como para viajeros.

Estudios recientes revelan que alrededor del 75% de los casos por LC se concentran en 10 países, cuatro de los cuales están en la región de América (Brasil, Colombia, Perú y Nicaragua).<sup>5,16,17</sup> Con respecto a LV, siete países (Brasil, Etiopía, India, Kenia, Somalia, Sudán del sur y Sudán) reportaron más del 90% de los casos a nivel mundial;<sup>11</sup> siendo una enfermedad endémica en 12 países de América. Cerca del 96% de los casos en esta región, están concentrados en Brasil.<sup>17</sup>

Conviene subrayar que, en América, durante el periodo de 2001 al 2017 se registraron 940.4 casos por LC con un promedio anual de 55.3 casos. En cuanto a LV se registraron 59.8 casos con un promedio anual de 3.5 casos.<sup>2</sup> Incluso, cinco países presentaron un aumento significativo en la tasa de incidencia en comparación al 2016: El Salvador (9.63/100,000 habitantes), Argentina (10.27/100,000 habitantes),

México (11.5/100,000 habitantes), Ecuador (22.6/100,000 habitantes) y Costa Rica (51.7/100,000 habitantes).<sup>17</sup>

En relación con México, la población en riesgo se estima en nueve millones de habitantes, el agente etiológico ha sido reportado en 22 estados y la leishmaniasis es considerada endémica en 18 entidades federativas (Figura 1), siendo los estados del sureste los más afectados. Popularmente la enfermedad es llamada "úlceras de los chicleros" y es muy frecuente en la península de Yucatán.<sup>2,18-21</sup> Una de las áreas endémicas por leishmaniasis en México es La Chontalpa, localizada en el estado de Tabasco. Este estado tiene el número más alto de pacientes en el país (37.4%) y 90% de estos residen en dicho lugar, una región asociada con plantaciones de cacao y plátano.<sup>22</sup>



**Figura 1.** Zonas con entidades federativas afectadas por leishmaniasis en México. Resumen de la situación actual en el país de acuerdo con la información disponible. Modificado de la Secretaría de Salud, 2015 y OPS/OMS, 2019.



### 3.1.2. Aspectos epidemiológicos

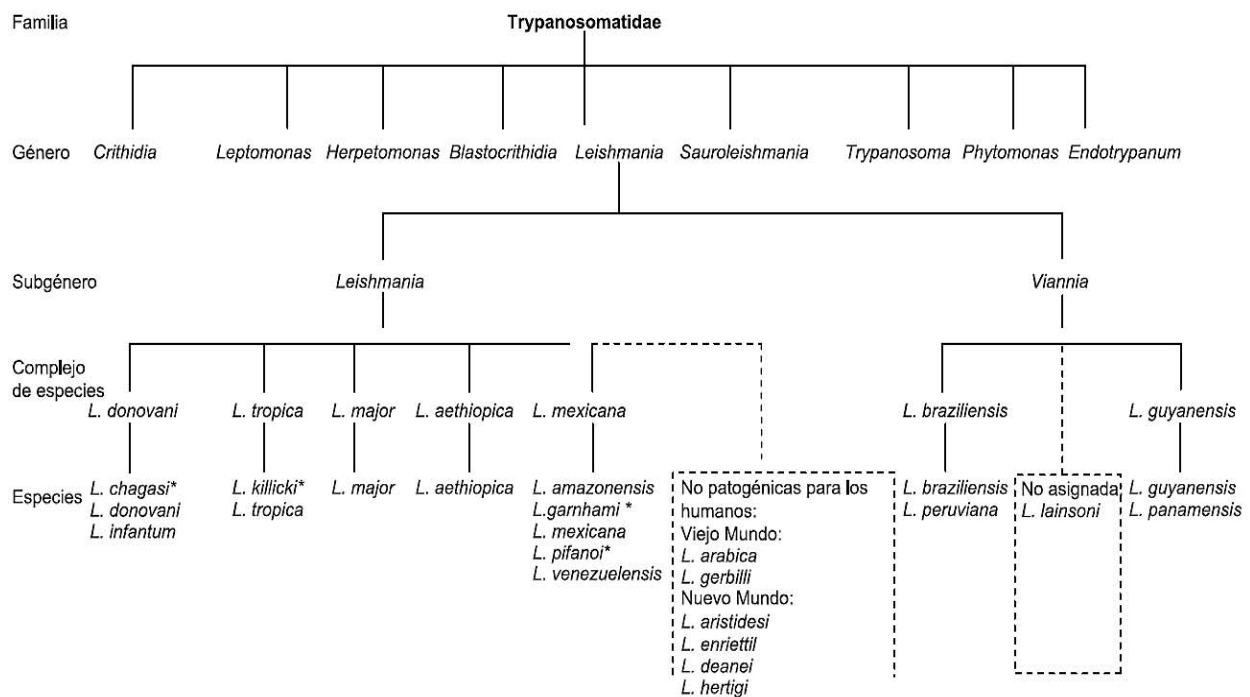
Se define como leishmaniasis a un conjunto de enfermedades transmitidas por vector causadas por parásitos protistas obligados del género *Leishmania* (subgénero *Leishmania* o *Vannia*)<sup>23</sup> (Figura 2). Las manifestaciones clínicas son variables y reflejan una compleja interacción entre la (s) especie (s) de *Leishmania*, el estatus inmunológico y nutricional del paciente, y la composición bioquímica de la saliva del flebótomo hembra infectada.<sup>1,24</sup>

En general, distintos cuadros clínicos se asocian con la LC, puede causar lesiones primarias localizadas en la piel (leishmaniasis cutánea localizada, LCL) que pueden sanar por sí mismas, pero dependiendo del parásito puede diseminarse hacia la mucosa nasofaríngea y causar lesiones secundarias típicas de leishmaniasis mucocutánea (LMC) o diseminarse hacia todo el cuerpo en forma de lesiones nodulares en la leishmaniasis cutánea difusa (LCD);<sup>25</sup> poco frecuente pero con alta prevalencia en algunas regiones es la leishmaniasis cutánea diseminada (LD) que se caracteriza por un alto número de lesiones pleomórficas.<sup>2,13</sup> Otras especies de *Leishmania* se diseminan hacia órganos internos tales como el hígado, bazo y médula ósea para causar LV,<sup>26</sup> generalmente ocasiona crecimiento abdominal y falla orgánica por lo cual resulta fatal si no se trata oportunamente.<sup>1</sup> Además, LV, y menos frecuente LCL o LMC, pueden ser infecciones oportunistas en individuos inmunocomprometidos por causa del virus de inmunodeficiencia humano (VIH/SIDA) u otras razones relacionadas con inmunodeficiencia.<sup>24,27</sup> En el Cuadro 1 se describen los signos y síntomas característicos de cada patología.

En particular, el síndrome más común es la LCL, quien principalmente es causada por *Leishmania major* y *Leishmania tropica* en el viejo mundo (Mediterráneo, Medio oriente y África), y por *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, y especies relacionadas en el nuevo

mundo (México, Centroamérica y Sudamérica).<sup>28</sup> En concreto, de acuerdo a la especie de parásito, alrededor del 10% de casos por LCL progresan a manifestaciones más graves, es decir, LMC, LCD y LD.<sup>11</sup>

Se debe agregar que, actualmente, todos los esfuerzos están dirigidos a garantizar el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado y oportuno de la enfermedad, para evitar así tanto las muertes ocasionadas por LV, como las desfiguraciones o mutilaciones provocadas por LMC y la elevada morbilidad y estigmatización social causadas por LCL.<sup>2,29,30</sup>



**Figura 2.** Taxonomía de *Leishmania*. El símbolo \* representa estatus de especie en debate. Modificado de OPS, 2019.



**Cuadro 1.** Principales formas clínicas de leishmaniasis y especies de *Leishmania* asociadas.

Síndrome Clínico	Especie causal *	Viejo/Nuevo mundo	Manifestación clínica	Referencia
Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)	<i>L. (L.) major</i>	VM	Pápula eritematosa que progresa a un nódulo y luego se ulcera; número de lesiones único o limitado. Las úlceras presentan bordes elevados endurecidos con erosión central que puede estar cubierto por una costra. Las lesiones dolorosas son raras, principalmente relacionadas con infección bacteriana o superposición en articulación. Hay resolución espontánea.	[2] [14] [27] [33]
	<i>L. (L.) mexicana</i>	NM		
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	NM		
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	NM		
	<i>L. (L.) tropica</i>	VM		
	<i>L. (L.) aethiopica</i>	VM		
	<i>L. (V.) panamanensis</i>	NM		
	<i>L. (L.) infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i> )	NM, VM		
Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)	<i>L. (L.) amazonensis</i>	NM	Lesiones nodulares eritematosas y placas lisas o verrugosas de color marrón rojizo; la cara y progresivamente las extremidades son afectadas, ocasionalmente la región oronasal; raramente ulceran y no se cura espontáneamente. Es una forma grave y anérgica de la enfermedad.	[2] [11] [14] [15] [20]
	<i>L. (L.) mexicana</i>	NM		
	<i>L. (V.) pifanoi</i>	NM		
	<i>L. (L.) aethiopica</i>	VM		
	<i>L. (L.) major</i>	VM		

\* (L.), (V.) Denota el subgénero *Leishmania* y *Vannia*, respectivamente. NM Nuevo Mundo; VM Viejo Mundo.



**Cuadro 1.** Principales formas clínicas de leishmaniasis y especies de *Leishmania* asociadas (continuación).

Síndrome Clínico	Especie causal *	Viejo/Nuevo mundo	Manifestación clínica	Referencia
Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LD)	<i>L. (L.) amazonensis</i>	NM	Mezcla de múltiples lesiones papulares con apariencia de acné, nodulares y ulceradas que afectan diferentes segmentos del cuerpo. Comúnmente, una o más lesiones con características clásicas de las úlceras granulomatosas de bordes elevados inician la enfermedad. El número de contusiones puede llegar a cientos.	[2] [13] [14]
	<i>L. (L.) mexicana</i>	NM		
	<i>L. (V.) guyanensis</i>	NM		
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	NM		
	<i>L. (V.) panamensis</i>	NM		
Leishmaniasis Mucocutánea o espundia (LMC)	<i>L. (V.) braziliensis</i>	NM	Lesiones destructivas del tabique nasal, los labios o mejillas y el paladar. Otras áreas afectadas son faringe, laringe y, rara vez, la tráquea o los genitales. No sana por sí misma; hay congestión nasal y hemorragia recurrentes.	[2] [11] [13] [14] [15] [33]
	<i>L. (V.) panamanensis</i>	NM		
	<i>L. (V.) guyanensis</i>	NM		
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	NM		

\* (L.), (V.) Denota el subgénero *Leishmania* y *Vannia*, respectivamente. NM Nuevo Mundo; VM Viejo Mundo.





**Cuadro 1.** Principales formas clínicas de leishmaniasis y especies de *Leishmania* asociadas (continuación).

Síndrome Clínico	Especie causal *	Viejo/Nuevo mundo	Manifestación clínica	Referencia
Leishmaniasis Visceral o Kala-azar (LV)	<i>L. (L.) donovani</i>  <i>L. (L.) infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i> )	VM  NM, VM	Fiebre irregular, pérdida de peso, esplenomegalia y hepatomegalia, distensión abdominal, linfadenopatía, leucopenia, anorexia, pigmentación cutánea y palidez de membranas mucosas. Diarrea crónica y retraso en el crecimiento (niños).	[2] [14] [15] [20] [26] [27] [33]

\* (L.), (V.) Denota el subgénero *Leishmania* y *Vannia*, respectivamente. NM Nuevo Mundo; VM Viejo Mundo.



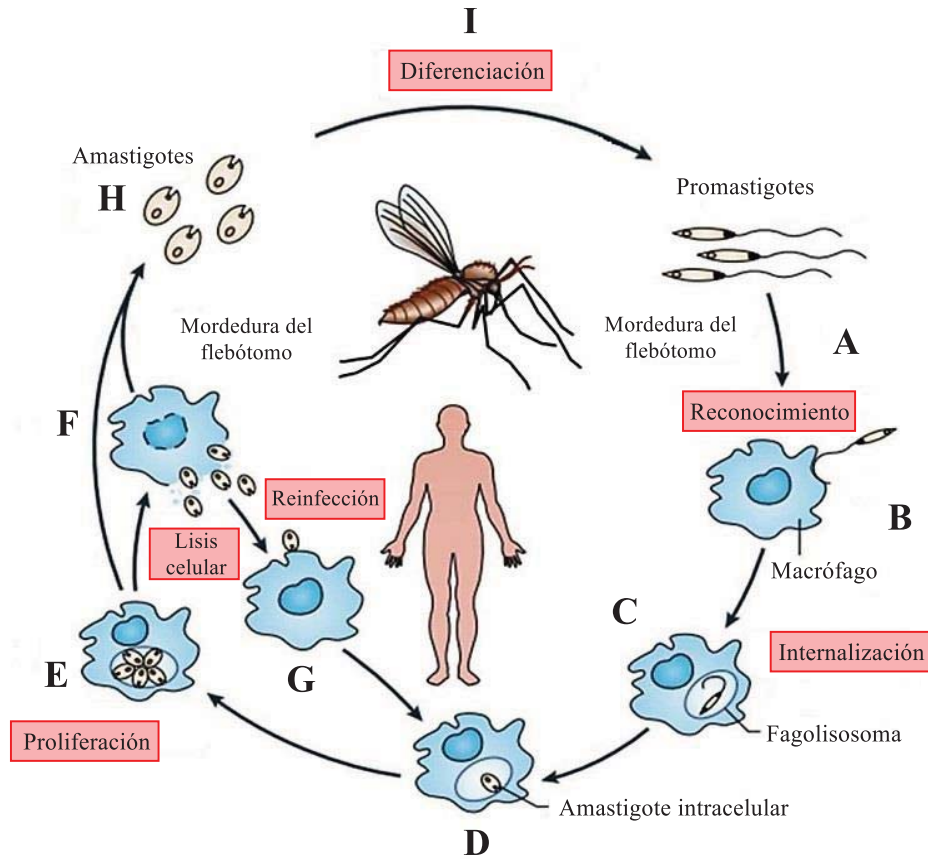
### 3.1.3. Ciclo biológico

Los protozoos del género *Leishmania* se alternan entre dos estadios durante su ciclo de vida: amastigote y promastigote, éstos se ubican en los reservorios (huéspedes vertebrados) y los vectores flebotomíneos (huéspedes invertebrados), respectivamente. La forma intracelular obligada (amastigote) es esférica u ovalada, no móvil y mide alrededor de 5.0  $\mu\text{m}$  de diámetro. La forma extracelular (promastigote) es móvil, flagelada y con alrededor de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de largo.<sup>10,31</sup>

De manera general, el ciclo de vida de *Leishmania* inicia en el flebótomo cuando éste ingiere sangre de un huésped infectado, los parásitos adquiridos (amastigotes) se desarrollan exclusivamente en el tracto digestivo del insecto hacia su forma extracelular. Durante su desarrollo como promastigote, denominado metaciclogénesis, los parásitos cambian su morfología de una forma no infectiva (procíclica) a una infectiva (metacíclica). Cuando el flebótomo vuelve a alimentarse, regurgita los promastigotes metacíclicos en el sitio de mordedura/piquete, introduciéndolos dentro de la circulación de un nuevo reservorio. Una vez dentro del huésped vertebrado, los promastigotes son internalizados por macrófagos y, dentro de la vacuola fagocítica, se transforman hacia amastigotes, éstos se multiplican intensamente hasta la lisis de la célula parasitada. Los amastigotes resultantes infectan nuevas células del linaje monocito-macrófago, continuando el ciclo de infección.<sup>31,32</sup>

El ciclo es completado cuando otro vector se alimenta adquiriendo los amastigotes, éstos se transforman de nuevo a promastigotes y migran hacia la proboscis del vector, listos para repetir el ciclo con la subsecuente mordida/piquete (Figura 3).<sup>33</sup>

Por otra parte, se han reportado vías de transmisión no vectoriales esporádicas, tales como transfusión, trasplante de órganos, congénita o accidentes de laboratorio.<sup>8,11,29,34</sup>



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Leishmania*. **A)** El flebótomo inocula promastigotes metacíclicos en la dermis de la piel al momento de alimentarse de la sangre del huésped vertebrado. **B)** Reconocimiento del parásito por células fagocíticas mononucleares, incluidos los macrófagos. **C)** Internalización del promastigote en una vacuola parasitófora. **D)** Dentro de las células hospederas, los promastigotes se diferencian en amastigotes. **E)** Proliferación masiva del amastigote por fisión binaria dentro de la vacuola parasitófora. **F)** Lisis del macrófago y liberación de amastigotes. **G)** Los amastigotes libres son fagocitados por células sanas del linaje monocito–macrófago. **H)** Amastigotes libres en circulación que pueden ser adquiridos por un flebótomo sano al ingerir sangre. **I)** Metaciclologénesis de los parásitos adquiridos dentro del vector. Modificado de Kaye y Scott, 2011.



### 3.1.4. Tratamiento para la leishmaniasis

En la actualidad no se cuenta con una vacuna para la leishmaniasis, lo único efectivo para todos los cuadros clínicos continúa siendo la quimioterapia, que se basa en antimoniales pentavalentes; en el mercado existen dos presentaciones, el antimoniato de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®).<sup>30</sup> Sin embargo, su empleo se ha limitado y vinculado con efectos secundarios peligrosos, un alto precio, resultados variables bajo el mismo régimen de dosis y una emergente resistencia de los parásitos a dichos medicamentos. Además, el tratamiento es largo (por más de 30 días, dependiendo de la evolución clínica), la administración es por vía parenteral, en ocasiones el paciente no tiene acceso a los sistemas de salud y no pueden utilizarse en pacientes que padecen insuficiencia renal, hepática o cardíaca; ni en aquellas con tuberculosis.<sup>21</sup>

Alternativamente, miltefosina, pentamidina, anfotericina B y paromomicina pueden ser empleados. En México esta última opción no se utiliza ampliamente puesto que incluso cuando se administran en combinación, la eficacia de estos medicamentos es inferior al efecto óptimo. A su vez, la toxicidad de miltefosina, anfotericina B y paromomicina también se ha descrito.<sup>10,18,29</sup> El Cuadro 2 resume las principales opciones terapéuticas para las diferentes formas clínicas de leishmaniasis.

En resumen, el escenario de quimioterapia actual insta a tratamientos antileishmaniasis más eficientes y seguros, alentando la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos como los de origen natural.<sup>35</sup> De hecho, en algunas regiones del mundo la medicina herbolaria constituye la primera, y algunas veces, la única opción para el tratamiento de leishmaniasis.<sup>22</sup>



**Cuadro 2.** Medicamentos empleados en el tratamiento de los cuadros clínicos de leishmaniasis.

Medicamento	Modo de acción en parásitos de <i>Leishmania</i>	Ruta e indicación principal	Efectos adversos	Referencia
Antimoniales pentavalentes: ► Antimoniato de meglumina (Glucantime®) ► Estibogluconato de sodio (Pentostam®)	Inhibición de glucólisis y oxidación de ácidos grasos. Inhibición dosis dependiente ATP y formación de GTP.	iv/im: LCL, LMC, LV intralesional: LCL	Sistémico: Pancreatitis, leucopenia, trombocitopenia, arritmia cardiaca, enzimas hepáticas alteradas. Otros: Fatiga, dolor muscular y síntomas gastrointestinales (anorexia y nausea).	[10] [15]
Anfotericina B	Inhibición de síntesis en membrana celular por unión a ergosterol. Formación de poros en membrana celular.	iv: LCL, LMC, LV	Fiebre, escalofríos, resfriado, dolor de huesos, nefrotoxicidad, hipopotasemia, miocarditis.	[10] [32]
Isetionato de Pentamidina	Inhibición de la síntesis de poliamina y dificulta la replicación y transcripción del genoma mitocondrial.	im: LCL, LMC intralesional: LCL	Dolor en el sitio de inyección, hipoglucemia, hipotensión, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, dolor de cabeza y rara vez diabetes	[10] [32] [20]

LCL: leishmaniasis cutánea localizada; LMC: leishmaniasis mucocutánea; LV: leishmaniasis visceral; im: intramuscular; iv: intravenosa



**Cuadro 2.** Medicamentos empleados para tratar los diferentes cuadros clínicos de leishmaniasis (continuación).

Medicamento	Modo de acción en parásitos de <i>Leishmania</i>	Ruta e indicación principal	Efectos adversos	Referencia
Análogo de alquilfosfocolina: ▶ Miltefosina (hexadecilfosfocolina)	Apoptosis celular por modulación en receptores de superficie celular, metabolismo del inositol, activación de fosfolipasa, proteína quinasa C y otras vías mitogénicas	Oral: LCL, LV	▶ Trastornos gastrointestinales: Nauseas vómito y diarrea, hepato y nefrotoxicidad (tratables y/o reversibles) ▶ Teratogénico: contraindicado en el embarazo	[10] [15] [32]
Paromomicina	Posible interferencia con síntesis de ARN y permeabilidad de la membrana	im: LV Tópico: LCL	▶ Tópico: Dolor, abrasivo, prurito local y eritema ▶ Sistémico: Hepatotoxicidad y ototoxicidad	[10] [29]
Alopurinol	Interferencia con síntesis de proteínas	Oral: LCL, LV	Erupciones/salpullido	[10]
Derivados de azoles: ▶ Fluconazol ▶ Ketoconazol ▶ Itraconazol	Inhibición de la desmetilasa 14- $\alpha$ -lanosterol requerida en biosíntesis del ergosterol	Oral: LCL	Hepatotoxicidad	[10]

LCL: leishmaniasis cutánea localizada; LMC: leishmaniasis mucocutánea; LV: leishmaniasis visceral; im: intramuscular; iv: intravenosa



### **3.1.4.1. Productos naturales como prometedores agentes leishmanicidas**

Los productos naturales son una fuente potencial de agentes nuevos y selectivos para el tratamiento de las EDT, especialmente parásitos protozoos. Los metabolitos secundarios de las plantas son bastante beneficiosos contra diversos grupos de patógenos como virus, bacterias y hongos. También proporcionan protección frente a herbívoros como artrópodos y vertebrados. Varios metabolitos secundarios de plantas como quinonas, alcaloides, terpenos, saponinas fenoles y sus derivados han sido muy benéficos para el ser humano debido a sus propiedades antiparasitarias y modo de acción altamente selectivo. Además de la aplicación directa de los metabolitos secundarios como la morfina, quinina, etc., los esqueletos de muchos metabolitos se han utilizado con éxito para diseñar compuestos farmacológicamente más activos. Actualmente, muchos compuestos de origen vegetal han mostrado un contundente potencial de actividad antileishmanial, sin embargo, debido a la falta de interés serio (la leishmaniasis es una enfermedad desatendida) ninguno de ellos ha sido evaluado clínicamente.<sup>36</sup>

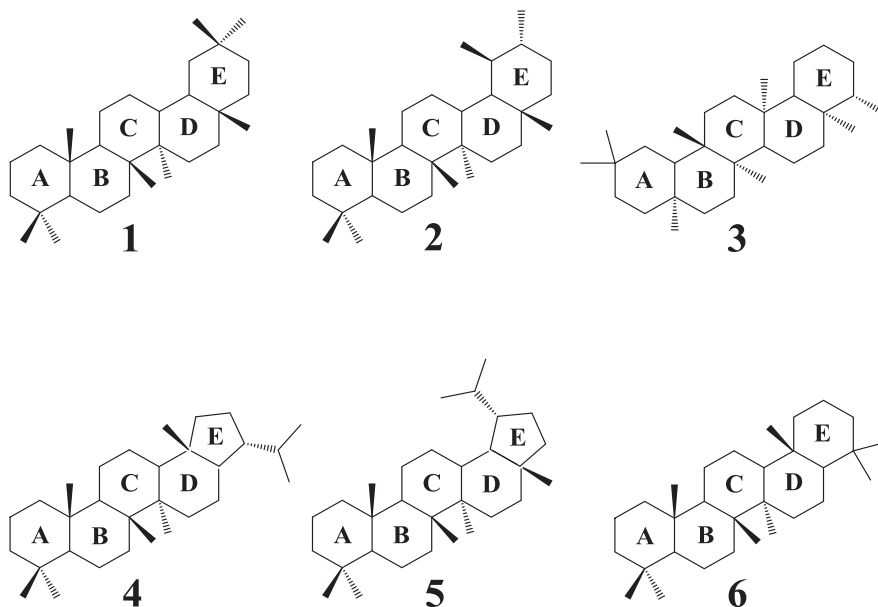
En particular, plantas pertenecientes de las familias Apocynaceae, Araceae, Cycadaceae, Fabaceae, Piperaceae, Sapindaceae y Solanaceae son comúnmente utilizadas en América Latina para el tratamiento tópico de LCL.<sup>37</sup>

A su vez, entre los ejemplos de componentes aislados de plantas con actividad leishmanicida destacan los de tipo alcaloide, seguida por los de tipo tritepénico, sequiterpénico, lactonas misceláneas, quinonas, flavonoides, diterpenos, esteroides, iridoides, compuestos fenólicos, lignanos, cumarinas, compuestos azufrados y monoterpenos.<sup>30</sup>

## 3.2. Triterpenos pentacíclicos

### 3.2.1. Generalidades

Dentro del grupo de terpenos se encuentran los triterpenos pentacíclicos, ampliamente distribuidos en el reino vegetal; lupano, oleanano y ursano son las principales clases. Estos metabolitos secundarios de alto peso molecular son biosintetizados en plantas por ciclación directa del escualeno y representan moléculas constituidas por 30 carbonos agrupados en anillos (A, B, C, D y E), a su vez, los anillos están integrados por cinco o seis miembros y con diferentes sustituyentes (Figura 4).<sup>38,39</sup> Exhiben un amplio espectro de efectos biológicos y farmacéuticos, tales como anti-inflamatorio, anti-cancerígeno, cardioprotector, anti-hiperlipidémico, anti-diabético, gastroprotector, anti-oxidativo, anti-microbiano, hepatoprotector y efectos curativos de heridas. Además, estos fitoquímicos tienen propiedades anti-virales y anti-parasitarias.<sup>40-42</sup>

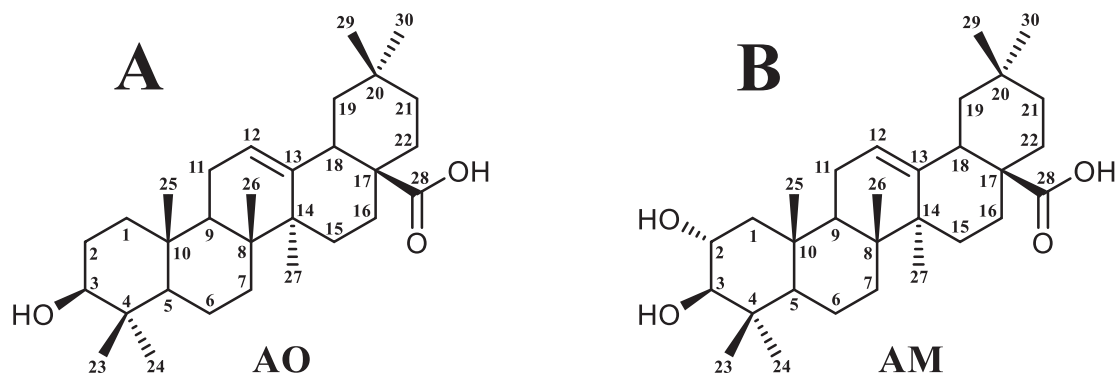


**Figura 4.** Tipos de estructuras en los triterpenos pentacíclicos. (1) Oleanano, (2) ursano, (3) friedelano, (4) hopano, (5) lupano, y (6) gamacerano.



El ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oico, AO), un triterpeno pentacíclico de tipo oleanano, se caracteriza por presentar un grupo carboxilo en el carbono 28, un grupo hidroxilo en el carbono 3 y un doble enlace sobre los carbonos 12 y 13 (Figura 5.A).<sup>43</sup> Ha sido aislado en más de 1 600 especies de plantas entre las que destacan *Lantana camara*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Ligustrum lucidum*, *Gentiana lutea*, *Olea europaea*, etc. En ellas se encuentra en forma libre o bien como un precursor de aglicona para las saponinas triterpenoides.<sup>39,40,42,44</sup>

El ácido maslínico (AM), también llamado ácido cratególico o ácido (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ )-2,3-dihidroxiolean-12-en-28-oico, es otro triterpeno pentacíclico que posee dos sustituyentes hidroxilo en los carbonos 2 y 3, así como un grupo carboxilo en el carbono 28 y un doble enlace entre los carbonos 12 y 13 (Figura 5.B).<sup>43</sup> De forma menos extendida, el AM se encuentra distribuido en la naturaleza como tal, y formando ésteres metílicos o glicósidos; está presente en plantas como: *Eriobotrya japonica*, *Campsis grandiflora*, *Crataegus oxyacantha* L, *Geum japonicum*, *Agastache rugosa*, etc. Recientemente, este compuesto se ha cuantificado en vegetales comestibles (aceitunas de mesa, espinacas y berenjenas), hierbas aromáticas (mostaza y albahaca), y legumbres (garbanzos y lentejas), y en menor medida en algunas frutas como la mandarina y la granada.<sup>45,46</sup>



**Figura 5.** Estructura molecular del ácido oleanólico (AO, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>) y el ácido maslínico (AM, C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>).



### 3.2.2. Propiedades biológicas del ácido oleanólico

El AO presenta múltiples actividades farmacológicas, entre las más importantes destacan las específicas de órgano: cardio, gastro y hepatoprotector.<sup>42</sup> Se ha demostrado la eficacia del AO en proteger de una lesión hepática aguda inducida químicamente, así como de fibrosis y cirrosis causadas por enfermedades crónicas del hígado.<sup>47</sup> Actualmente, se han observado efectos antidiabéticos en varios modelos *in vitro* e *in vivo*, teniendo la capacidad de reducir la presión sanguínea, los niveles de glucosa en sangre, el colesterol total y aumentar la insulina plasmática.<sup>48,49</sup> Las propiedades antibacterianas también se han reportado frente a distintas bacterias como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listenia monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, entre otras.<sup>44,50</sup>

En años recientes el AO ha sido evaluado frente a distintos tipos de cáncer, encontrándose efectos antiproliferativos y/o apoptóticos en varias líneas celulares tumorales, entre las que destacan el cáncer de mama (MCF7 y MDA-MB-231),<sup>40,42,51</sup> leucemia (K562),<sup>43</sup> cáncer de pulmón (A549 y H460),<sup>42,52</sup> cáncer de páncreas (Panc-28),<sup>42,53</sup> y cáncer de piel (B16-2F2).<sup>42</sup>

Para terminar, y no menos importante, se ha reportado que el AO presenta actividad anti-VIH por inhibición de la proteasa VIH-1, cuya función está relacionada con fragmentar los precursores poliproteínicos virales y en consecuencia dar lugar a proteínas maduras para formar los nuevos viriones.<sup>41</sup> En otras palabras, la inhibición de esta enzima produce viriones y moléculas inmaduras y no infecciosas, lo que bloquea el ciclo de vida del VIH; mejorando en última instancia la calidad de vida del paciente.<sup>50</sup>



### 3.2.3. Propiedades biológicas del ácido maslínico

Acerca de la actividad biológica del AM, conviene enfatizar la evaluación de su efecto antioxidante en ensayos *in vivo*, donde se demostró que animales diabéticos tratados con este ácido consiguieron mejorar el proceso de estrés oxidativo en los tejidos hepático, cardíaco y renal. En concreto, el AM causó un significativo incremento en la actividad antioxidante con una correspondiente disminución en la concentración de malondialdehído (MDA, un marcador de la peroxidación lipídica) y un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa).<sup>54</sup> Por consiguiente, la mejora del estrés oxidativo sugiere que este triterpeno pentacíclico alivia o mejora un metabolismo perturbado por la diabetes. De hecho, la acción antidiabética del AM parece ser complementada por su efecto hipoglucemiante al reducir la resistencia a la insulina en la diabetes tipo II.<sup>55</sup>

La actividad antiinflamatoria también ha sido estudiada *in vitro* e *in vivo*, poniendo de manifiesto que el AM actúa sobre la expresión de las enzimas proinflamatorias y citocinas como COX-2, TNF- $\alpha$  e IL-6, dando lugar a una disminución de la inflamación.<sup>46</sup> Otros estudios indican efectos antipalúdicos para este triterpeno, quien actúa sobre las enzimas metaloproteasas, inhibiendo la etapa esquizonte en el ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*.<sup>45,56</sup>

A su vez, Sánchez-Quesada y cols.<sup>55</sup> mencionan actividades cardioprotectoras en más de una vía para el AM; por ejemplo, en ratas Wistar albinas con infarto de miocardio inducidas por isoproterenol, el AM redujo los efectos de dicho fármaco sobre el peso corporal, el peso del corazón, los lípidos, las lipoproteínas, la peroxidación de lípidos, las enzimas marcadoras cardíacas y la paraoxonasa. Así mismo describen al AM como un fuerte inhibidor en la oxidación de LDL *in vitro*. Sin embargo,



dependiendo de la concentración empleada los efectos del AM mostraron cambiar hacia eventos pro o antitrombóticos. En consecuencia, el AM puede actuar tanto al principio como en la última etapa de la aterosclerosis.

Adicionalmente, el AM ha sido estudiado frente a diferentes líneas celulares tumorales para evaluar su efecto antiproliferativo y/o proapoptótico en distintos tipos de cáncer, como resultado se distinguen: A549 (carcinoma de pulmón), SK-OV-3 (cáncer de ovario), SK-MEL-2 (melanoma humano), XF-498 (cáncer del sistema nervioso central), HCT-15, HT-29 y Caco-2 (cáncer de colon), HSC-2 (carcinoma escamoso oral humano), y HSG (cáncer de las glándulas salivales).<sup>43,45</sup>



### 3.2.4. Potencial anti-leishmaniasis del ácido oleanólico y el ácido maslínico

En las últimas décadas, varios estudios han reportado a los ácidos maslínico y oleanólico como interesantes agentes leishmanicidas sobre diversas especies de *Leishmania*. Por ejemplo, ensayos sobre el efecto del AO en promastigotes de *L. donovani* y *L. major* reportaron valores de concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de 8.2 y 53.0 μM, respectivamente. En cuanto a la CI<sub>50</sub> del AM, este alcanzó un valor de 19.7 μM sobre promastigotes de *L. infantum* y otro de 26.4 μM contra promastigotes de *L. amazonensis*.<sup>57</sup>

Por su parte, Sifaoui y cols.<sup>58</sup> encontraron que el AO exhibió una buena actividad leishmanicida con valores de CI<sub>50</sub> de 17.250 ± 0.651 y 20.620 ± 0.750 μg/mL sobre promastigotes de *L. infantum* y *L. amazonensis*, respectivamente. Por su parte, el AM presentó una mejor actividad que el AO sobre idénticas especies de *Leishmania*, con una CI<sub>50</sub> de 9.320 ± 1.654 μg/mL para *L. infantum* y 12.460 ± 1.25 μg/mL para *L. amazonensis*. En cuanto a los amastigotes intracelulares en estas especies de *Leishmania*, fue reportado que el AM presentó mayor actividad sobre *L. amazonensis* (CI<sub>50</sub> de 1.417 ± 0.401 μg/mL), mientras que el AO exhibió una mejor actividad biológica sobre *L. infantum* (CI<sub>50</sub> de 0.999 ± 0.089 μg/mL).<sup>59</sup>

De forma semejante, una investigación sobre la actividad del AO contra tres especies diferentes de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis*) ha sugerido que promastigotes de *L. braziliensis* son la especie más susceptible mientras que *L. infantum* la más resistente. Los valores de CI<sub>50</sub> calculados fueron: CI<sub>50</sub>= 30.47 ± 6.35 μg/mL (*L. braziliensis*); CI<sub>50</sub>= 40.46 ± 14.21 μg/mL (*L. amazonensis*); CI<sub>50</sub>= 65.93 ± 15.12 μg/mL (*L. infantum*). Sin embargo, diferentes resultados fueron



observados en la actividad anti-amastigote para el triterpeno pentacíclico, siendo *L. amazonensis* la especie más susceptible en cuanto que la más resistente fue *L. braziliensis*; los valores reportados de  $CI_{50}$  fueron:  $CI_{50} = 38.45 \pm 12.05 \mu\text{g/mL}$  (*L. amazonensis*);  $CI_{50} = 68.75 \pm 16.55 \mu\text{g/mL}$  (*L. braziliensis*);  $CI_{50} = 64.08 \pm 23.52 \mu\text{g/mL}$  (*L. infantum*).<sup>60</sup>

Adicionalmente, el efecto leishmanicida se ha evaluado en algunos extractos de plantas. Tal es el caso de Sifaoui y cols.,<sup>61</sup> donde extractos de hoja provenientes de diferentes variedades del árbol de olivo (*Olea europaea*), fueron ensayados sobre diferentes especies de *Leishmania*. Para simplificar, en este estudio se observó que *L. amazonensis* fue la especie más sensible a los extractos de hoja de olivo con una  $CI_{50}$  menor a  $17.926 \pm 1.876 \mu\text{g/mL}$ . En cuanto a *L. donovani*, la  $CI_{50}$  varió de  $2.130 \pm 0.023 \mu\text{g/mL}$  para el extracto metanólico de la variedad *Limouni* hasta  $71.570 \pm 4.324 \mu\text{g/mL}$  en el extracto metanólico de la variedad *Zarrazi*. Por su parte, la  $CI_{50}$  de la variedad *Limouni* sobre *L. tropica* y *L. major* fueron, respectivamente,  $17.622$  y  $14.660 \mu\text{g/mL}$ . Es importante mencionar que el material vegetal cuenta con la peculiaridad de poseer un importante contenido de AO y AM.



### 3.3. Situación actual y problemática en México

Las leishmaniasis, como en otros países, son enfermedades endémicas de México. Las especies más importantes de *Leishmania* en el país pertenecen a los complejos *L. donovani*, *L. mexicana* y *L. braziliensis*.<sup>22</sup> De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS), en México la tasa de incidencia de la enfermedad al 2017 se reportó en 11.5 casos por cada 100 000 habitantes; presentándose un aumento significativo en comparación al 2016 (5.97 casos por cada 100 000 habitantes). De hecho, prevalece como forma clínica principal la LCL, quien especialmente, es ocasionada por *L. mexicana*.<sup>62</sup>

En México, algunos tratamientos no convencionales son comúnmente empleados para el tratamiento de leishmaniasis. Por ejemplo, la cauterización con sulfato de cobre, y la termoterapia; en este último caso, aceite de automóvil caliente, monedas o utensilios de metal al rojo vivo, huesos de animales calientes o un foco caliente son directamente aplicados sobre la ulcera. También se utiliza la crioterapia, y en algunas ocasiones polvo de penicilina o cremas antifúngicas son empleadas sobre la lesión. Pacientes mexicanos han usado ácido acético, ácido bórico, ácido sulfúrico, alcohol, formalina, peróxido de hidrógeno, y otros remedios. Si bien estos métodos solo deforman, y agudizan la inflamación, los pacientes continúan empleando este enfoque sin saber que se trata de una parasitosis que requiere atención médica profesional.<sup>18,21</sup>

Por otra parte, algunas plantas son empleadas en México para tratar lesiones en la piel causadas por *Leishmania*. Hasta la fecha, hay escasos estudios que exploren su actividad leishmanicida *in vitro* y/o *in vivo*.<sup>18</sup> Delgado-Altamirano y cols.<sup>22</sup> describieron la evaluación de diferentes extractos orgánicos: diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), diclorometano/metanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ) (1:1), y agua, de diez plantas medicinales colectadas en



diferentes comunidades de Querétaro y Guanajuato, comúnmente usadas como antiparasitarios. Cuatro de los treinta extractos evaluados fueron activos y selectivos sobre promastigotes de *L. amazonensis*: *L. camara* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), *S. molle* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) y *P. laevigata* (acuoso); estos extractos alcanzaron valores de CI<sub>50</sub> menores a 30 µg/mL. Además, los extractos de diclorometano/metanol (CI<sub>50</sub>=21.8 ± 4.5 µg/mL) y diclorometano (CI<sub>50</sub>=25.9 ± 4.9 µg/mL) de *S. molle*, el extracto de diclorometano (CI<sub>50</sub>=21.8 ± 2.4 µg/mL) de *L. camara* y el extracto acuoso de *P. laevigata* (CI<sub>50</sub>=35.2 ± 4.7 µg/mL) mostraron valores de CI<sub>50</sub> sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* menores a 50 µg/mL, indicando su potencial para combatir a *Leishmania spp.*

De igual modo, Alamilla-Fonseca y cols.<sup>62</sup> describieron el efecto *in vitro* del extracto de *Cleoserrata serrata* en el crecimiento y viabilidad de amastigotes y promastigotes de *L. mexicana*. Encontraron que el extracto de *C. serrata* causó una inhibición dosis dependiente en el crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana*. La DL<sub>50</sub> para la forma extracelular fue de 23.2 µg/mL. Mientras que los amastigotes de *L. mexicana* mostraron ser más susceptibles al extracto de la planta, puesto que, desde concentraciones de 5 y 10 µg/mL del extracto se observó una reducción significativa en el crecimiento de amastigotes. La DL<sub>50</sub> para la forma intracelular fue de 6.11 µg/mL.

Por otro lado, en la evaluación de una fracción hexánica obtenida del extracto metanólico de las raíces de *P. andrieuxii* en un modelo *in vivo* para LCL en ratones C57BL/6 infectados con promastigotes de *L. mexicana*, se observó que la aplicación tópica de 10 µg de la fracción hexánica por 6 semanas redujo significativamente el tamaño de la lesión con respecto al vehículo. Esta fracción también inhibió el crecimiento *in vitro* de *L. mexicana*, mostrando una CI<sub>50</sub>=43.04 µg/mL, mientras que en macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, exhibió una





$CI_{50}=4.10 \mu\text{g/mL}$ , y en células dendríticas infectadas con amastigotes de *L. mexicana* el valor de  $CI_{50}$  fue de  $11.06 \mu\text{g/mL}$ .<sup>18</sup>

Por último, en México no se dispone de datos confiables respecto a la tasa de curación y recaídas, así como la notificación de nuevos casos en el país. Tampoco se da un seguimiento sistemático a la evolución clínica del paciente (inicio de tratamiento hasta su conclusión) por parte de las áreas de atención médica, tal que no se cuenta con información local actualizada, por ejemplo, a efectos adversos del medicamento antimonial empleado.<sup>19</sup> A su vez, pese a que México es reconocido mundialmente por su rica y extensiva biodiversidad, menos del 2% de la flora mexicana ha sido examinada desde una perspectiva farmacológica o fitoquímica. Se sabe que uno de los usos más frecuentes de plantas medicinales en México es contra parásitos. Sin embargo, no hay reportes específicos de plantas usadas en el tratamiento de leishmaniasis; solo unas pocas plantas de la Península de Yucatán han sido estudiadas.<sup>18,22</sup>



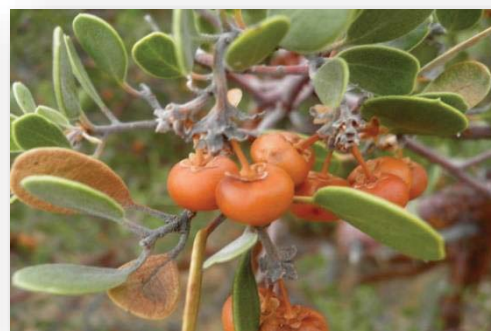
### 3.4. Generalidades sobre *Arctostaphylos pungens* Kunth

#### 3.4.1. Nombres comunes

Pingüica, madreSelva, manzanilla, manzanita, tepesquite. Estado de México: *tepeisquilitl* (náhuatl), *pendicua*, *pendiqua*. Hidalgo: *tengüeta*, *tengüita*. Chihuahua: *uitzara* (rarámuri). Sonora: *i'yoli* (pima).<sup>63,64</sup>

#### 3.4.2. Botánica y ecología

*Arctostaphylos pungens* K (Ericaceae) es un arbusto perennifolio de 1 a 3.5 m de altura, con amplia distribución en la República Mexicana y en el sureste de los Estados Unidos. Es una especie ramificada y con la corteza lisa de color café rojizo.<sup>65</sup> Las hojas tienen un soporte corto, con la punta redonda, son rígidas y de color verde pálido. Las flores están colocadas en racimos densos, son blancas o rosadas. Los frutos regularmente no se abren, son carnosos, globosos y amarillento rojizos, tienen una pulpa seca y dulce con más o menos 10 nuececillas (Figura 6). Individualmente, cada semilla tiene forma de gajo y mide en promedio 3.2 mm de largo y 2.6 mm de ancho. Al final de la primavera, después de la floración, la producción de frutos es abundante.<sup>63</sup>



**Figura 6.** Planta de *Arctostaphylos pungens* K. Flor urceolada, de color blanco a rosa mexicano y agrupada en racimos de cinco a ocho flores; el fruto es una drupa globosa deprimida, lisa, de aproximadamente 5 a 8 mm, carnosa y comestible.



### 3.4.3. Etnobotánica

Diversas aplicaciones se han otorgado para *A. pungens* K, a las hojas y frutos se les atribuyen propiedades astringentes y diuréticas. Se reporta como remedio para problemas renales (dolor de riñón, mal de orín, cerrada de orines, mal de piedra), hidropesía, infecciones pulmonares (bronquitis), inflamación, enfermedades venéreas (gonorrea), como antidiabético y antipirético. También se menciona su uso en el tratamiento de la diarrea, dolor de estómago, empacho, tos, leucorrea, reumatismo e infecciones del tracto urinario.<sup>63-66</sup>

En la medicina tradicional mexicana, es común emplear las hojas, la raíz, los frutos o toda la planta. Suele utilizarse, sola o con otras especies de plantas que tienen usos afines a los de *A. pungens* K; se emplea ingiriendo la infusión de la planta o se dan baños.<sup>63</sup>

Adicionalmente, se menciona el uso de las hojas para aliviar la picazón y el dolor causados por el roble venenoso y la hiedra venenosa.<sup>65</sup>

### 3.4.4. Química y Farmacología

A pesar de la importancia ecológica y económica de *A. pungens* K, existen pocos estudios sobre esta especie, tal que la información experimental que permita correlacionarse con sus aplicaciones terapéuticas tradicionales continúa siendo insuficiente.<sup>63,67</sup>

De acuerdo con observaciones hechas en el Instituto Médico Nacional, los frutos incrementan la orina y disminuyen la albúmina cuando se ingieren 10 g en dos tomas. En algunos estudios científicos sobre el fruto se han detectado sustancias tales como la pirocatequina, una resina y taninos.<sup>63</sup>



Por otra parte, una investigación del extracto etanólico de las partes aéreas (brotes, hojas y corteza del tallo) de *A. pungens* K indicó actividades anti-lipasa y antioxidante; así mismo, cualitativamente se determinó la presencia de flavonoides, taninos, fenoles, terpenos, un alcohol y glucósidos.<sup>64,68</sup> Estudios similares, indicaron la presencia de flavonoides en *A. pungens* K y de igual forma se reportaron propiedades antibacterianas y antiinflamatorias.<sup>69,70</sup>



#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las leishmaniasis son un grave problema de salud mundial que continúan cobrando miles de vidas al año y que además disminuyen la calidad de vida de los pacientes. Puesto que no se dispone de una vacuna, los tratamientos actuales siguen basándose en antimoniales pentavalentes. Sin embargo, dichos antimoniales conllevan serios efectos secundarios como pancreatitis, leucopenia, arritmia cardiaca, anorexia, náuseas, dolores de cabeza, muscular y abdominal, resultando en un tratamiento tóxico, costoso e ineficaz. Asimismo, la resistencia del parásito a los fármacos empleados se suma a la problemática actual de leishmaniasis. En consecuencia, es necesario aportar información acerca del comportamiento de las leishmaniasis para promover la investigación de nuevos agentes leishmanicidas y desarrollar terapias efectivas. Es decir, buscar nuevos tratamientos que sean más efectivos, menos tóxicos, más baratos y que su administración no sea tan invasiva.

Dentro de los agentes leishmanicidas destacan con gran solidez los triterpenos pentacíclicos que son encontrados en el reino vegetal. Estudios previos han demostrado la capacidad anti-leishmaniasis del AO y el AM sobre diferentes especies de *Leishmania*, sin embargo, no existen reportes de su capacidad antiparasitaria sobre *L. mexicana*. Por lo tanto, uno de los objetivos del presente trabajo consistió en determinar la capacidad leishmanicida de los ácidos maslínico y oleanólico sobre *L. mexicana*.

Por otra parte, se ha determinado la presencia del AM y el AO en distintas especies de plantas. Así, la búsqueda de nuevas fuentes naturales se ha incrementado notablemente en los últimos años. Bajo este contexto se planteó el estudio de los frutos de *Arctostaphylos pungens* K (pingüica) como una fuente potencial de compuestos triterpénicos.

## 5. HIPÓTESIS

Los ácidos oleanólico y maslínico son potentes agentes leishmanicidas sobre aquellas especies de *Leishmania* asociadas a los principales cuadros clínicos: Cutáneo, mucocutáneo y visceral. Por lo tanto, estos ácidos promoverán la inhibición en la sobrevivencia de *Leishmania mexicana*, principal agente etiológico para el cuadro clínico de LCL en México.

## 5.1. OBJETIVOS

### 5.1.1. Objetivos generales

1. Determinar el potencial leishmanicida de los ácidos oleanólico y maslínico, así como del extracto total, obtenidos a partir del extracto etanólico total de frutos de *Arctostaphylos pungens* K sobre el crecimiento y viabilidad de *Leishmania mexicana*.
2. Identificar los constituyentes químicos mayoritarios presentes en el extracto etanólico preparado a partir de los frutos de *Arctostaphylos pungens* K.

### 5.1.2. Objetivos particulares

- ❖ Preparar el extracto orgánico de los frutos de *Arctostaphylos pungens* K (pingüica) mediante maceración.
- ❖ Realizar el estudio químico que conlleve al aislamiento y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en los frutos de pingüica.
- ❖ Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas.
- ❖ Evaluar la actividad tanto *in vitro* como *in vivo* de los ácidos oleanólico y maslínico derivados de los frutos de *Arctostaphylos pungens* K (pingüica) sobre el crecimiento y viabilidad de *Leishmania mexicana*.
- ❖ Evaluar la actividad *in vitro* e *in vivo* del extracto etanólico derivado de los frutos de *Arctostaphylos pungens* K (pingüica) sobre el crecimiento y viabilidad de *Leishmania mexicana*.



## **6. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **6.1. Obtención del extracto etanólico y los compuestos puros AM y AO**

Los frutos de la pingüica (2 Kg) se pulverizaron en un molino de cuchillas. Posteriormente, se realizó la extracción utilizando un proceso de maceración por una semana a temperatura ambiente con 10 L de EtOH. El material vegetal se separó del extracto soluble mediante filtración al vacío y se evaporó el disolvente para obtener el extracto total. A continuación, se realizaron pruebas de solubilidad y determinación de compuestos fenólicos al extracto total. El extracto total se resuspendió en MeOH y se separó una fracción no soluble de color blanco.

Como paso siguiente, para separar los componentes presentes en el precipitado se realizó una columna al vacío (VLC). La fase estacionaria utilizada fue gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexano:AcOEt y AcOEt:MeOH. Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando como mezcla de elución AcOEt:hexano (7:3). La detección de los componentes de cada fracción se realizó utilizando luz UV y posteriormente, se revelaron con anisaldehído sulfúrico. Finalmente, los compuestos PINC001 y PINC002 se purificaron por recristalización de MeOH y se enviaron a resonancia magnética nuclear (RMN) para su análisis.





## 6.2. Ensayos biológicos

Para la realización de los estudios descritos a continuación se usaron ratones singénicos de 12 a 14 semanas de edad, cepas C57BL/6 y BALB/c, proporcionados por el bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental (UIME) de la Facultad de Medicina UNAM, del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga". El manejo, cuidado y el método de eutanasia se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. La cepa de *Leishmania mexicana* utilizada fue Lacandona (LAC).

### 6.2.1. Obtención de la cepa de *Leishmania mexicana*

La cepa LAC fue aislada de un paciente con LCL. El aislado se inoculó vía subcutánea en el cojinete plantar de ratones BALB/c. Después del desarrollo de la lesión sin ulcerar se sacrificaron los ratones y se aislaron los parásitos mediante aspirados con jeringas de insulina con la finalidad de lisis por acción mecánica las células infectadas y de esta forma liberar los amastigotes intracelulares. El aspirado de las lesiones se cultivó en medio líquido 199 (M199, Sigma USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Biowest México) a 26 °C para su diferenciación a promastigotes, y con estos, se estableció un cultivo del aislado.

Por otra parte, la virulencia de la cepa LAC se mantuvo inoculando constantemente  $1 \times 10^6$  de promastigotes en fase estacionaria en el cojinete plantar de ratones susceptibles BALB/c. A continuación, nuevos cultivos del aislado fueron establecidos por la técnica anteriormente descrita.



### 6.2.2. Parásitos

El cultivo de promastigotes se inició a partir de los amastigotes aislados de los ratones previamente infectados. El medio de cultivo para los parásitos de *L. mexicana* consistió de M199 (Sigma, USA) suplementado con 10% de SFB (Biowest, México). Los cultivos se iniciaron con  $1 \times 10^6$  de promastigotes por mililitro en botellas de 25 cm<sup>2</sup> para un volumen final de 10 mL de medio y se incubaron a temperatura ambiente. Para mantener el cultivo de promastigotes, se transfirió el mismo número de parásitos a botellas con medio de cultivo fresco cada 3 a 4 días durante la fase logarítmica del parásito, con un máximo de cinco pases por aislado; las cuentas de los parásitos se realizaron en cámara de Neubauer. Finalmente, los promastigotes utilizados en los experimentos fueron cosechados en el día 4 de crecimiento (fase estacionaria).

### 6.2.3. Actividad leishmanicida *in vitro*

Para evaluar el potencial leishmanicida de los compuestos puros (AO y AM) y el extracto etanólico sobre la cepa de *L. mexicana* se utilizaron promastigotes del día cuatro de cultivo, los cuales fueron cosechados (1 mL) en tubos Eppendorf de 2.5 mL y centrifugados a 4 000 rpm durante 10 minutos. El botón celular fue lavado y centrifugado tres veces con amortiguador de fosfatos (PBS) estéril a pH = 7; el lavado se realizó resuspendiendo con el mismo volumen de PBS en cada caso. Finalmente, el botón celular se resuspendió con 800  $\mu$ L de M199 (Sigma, USA) suplementado con 10% de SFB (Biowest, México). A continuación, se ajustó el número de parásitos mediante su conteo en cámara de Neubauer, tal que 10  $\mu$ L de M199 contuvieran  $2 \times 10^6$  de parásitos.

Para los tratamientos, los compuestos puros y el extracto etanólico fueron disueltos en DMSO (0.1%) y M199 (Sigma, USA) suplementado



con 10% de SFB (Biowest, México). La concentración de stock inicial para los compuestos (AO y AM) y el extracto etanólico fueron respectivamente, 0.05 M y 0.02 g/mL, y a partir de éstos se obtuvieron las concentraciones descritas en la Tabla 1, empleando tubos estériles de 5 mL para cultivo celular (NEST, Lote: 012718k01). Sobre estos tubos se adicionaron alícuotas conteniendo  $2 \times 10^6$  de parásitos para un volumen final de 2 mL en cada tubo.

**Tabla 1.** Condiciones para los promastigotes de la cepa *L. mexicana* tratados con los compuestos (AO y AM) y el extracto etanólico (Ex. EtOH).

AO	AM	Ex. EtOH
1 $\mu$ M	2 $\mu$ M	6.25 $\mu$ g/mL
10 $\mu$ M	4 $\mu$ M	12.5 $\mu$ g/mL
50 $\mu$ M	11 $\mu$ M	25 $\mu$ g/mL
100 $\mu$ M	21 $\mu$ M	50 $\mu$ g/mL
200 $\mu$ M	106 $\mu$ M	100 $\mu$ g/mL
300 $\mu$ M		200 $\mu$ g/mL
500 $\mu$ M		300 $\mu$ g/mL

Control positivo: Glucantime®.

Control negativo: Medio de cultivo y parásitos.

Vehículo: DMSO.

La concentración de DMSO para la condición de vehículo fue de 0.1% en el medio de cultivo. Por control positivo se empleó Glucantime® y un cultivo sin tratamiento como control negativo. Finalmente, los ensayos se incubaron por 72 horas a 26 °C y se contó el número de parásitos en cámara de Neubauer. Adicionalmente se calculó la  $CI_{50}$  de cada compuesto y del extracto etanólico utilizando el programa *Prism GraphPad* versión 6 para Windows.



#### **6.2.4. Actividad leishmanicida in vivo**

##### **6.2.4.1. Infección de ratones C57BL/6 con *L. mexicana***

La infección se realizó con promastigotes de la cepa LAC de *L. mexicana* en fase estacionaria crecidos en M199 (Sigma, USA) suplementado con 10% de SFB (Biowest México). Para determinar la actividad de los compuestos puros (AM y AO) y el extracto etanólico se infectaron 15 ratones C57BL/6 vía subcutánea con 500 000 parásitos en 5  $\mu$ L de solución salina en la dermis del cojinete plantar. Se formaron los siguientes grupos de ratones con tres individuos:

- A) grupo 1 o grupo control, que consistió de ratones que no recibieron tratamiento;
- B) grupo 2 o vehículo, con ratones tratados solamente con la crema utilizada como vehículo;
- C) grupo 3, con ratones infectados tratados con el compuesto AM incorporado en el vehículo;
- D) grupo 4, que fue tratado con el compuesto AO integrado en el vehículo; y el
- E) grupo 5, con ratones infectados que recibieron tratamiento con el extracto etanólico disuelto en el vehículo.

##### **6.2.4.2. Tratamiento y evolución de la enfermedad**

A las tres semanas post-infección, el tratamiento fue aplicado tópicamente sobre la lesión durante cinco días de la semana por un periodo de siete semanas. Este tratamiento consistió de 3 mg del compuesto puro (o extracto) mezclado con 20  $\mu$ L de la crema utilizada como vehículo (Anexo 1).



Para monitorear el tamaño de las lesiones en la infección causada por la cepa de *L. mexicana*, se cuantificó el grosor del cojinete plantar utilizando un vernier digital (Truper®) una vez por semana hasta la semana 7 de iniciado el tratamiento.

#### **6.2.4.3. Cuantificación de la carga parasitaria (amastigotes) por dilución limitante**

La carga parasitaria fue determinada usando el ensayo de dilución limitante (Titus y cols.<sup>71</sup>). Al finalizar el tratamiento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Brevemente, los cojinetes plantares fueron removidos de manera aséptica de los ratones infectados. Posteriormente, los tejidos fueron pesados en una balanza analítica y homogeneizados por maceración en una malla de 10 micras llevándose a un volumen final de 6 mL con PBS. Finalmente, la carga parasitaria (amastigotes) se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer.

### **6.3. Prueba estadística**

El análisis estadístico se realizó en el programa *GraphPad Prism* versión 6 para Windows. Los resultados fueron expresados como la media de los valores obtenidos y desviación estándar (SD). Se utilizaron las pruebas ANOVA de una vía y U de Mann–Whitney para la comparación entre grupos.

Los valores de  $p \leq 0.05$  respecto al control fueron considerados estadísticamente significativos.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las leishmaniasis representan un grave problema de salud mundial, principalmente debido a su mortalidad y morbilidad. Incluso, los medicamentos de primera línea usados en el tratamiento carecen de eficiencia y baja toxicidad; así mismo, *Leishmania* ha desarrollado resistencia a este tipo de fármacos. Estos hechos han incitado la investigación de nuevos compuestos para el tratamiento de esta enfermedad,<sup>22</sup> incluidos los triterpenos pentacíclicos.

Los triterpenos pentacíclicos son un grupo de compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, estas moléculas se forman a partir de la ciclación del escualeno, un precursor común en los sistemas de biosíntesis tanto para esteroides como en triterpenoides.<sup>60</sup> Estas moléculas tienen una gran variedad de actividades farmacológicas. El AM y el AO destacan entre las moléculas más estudiadas de este grupo y las plantas que los contienen han sido usadas en la medicina tradicional para tratar la inflamación y tumores, infecciones bacterianas, micóticas y protozoarias, efectos anti-hiperlipidémicos, antioxidantes e hipoglucémicos.<sup>42,44,50,54-56</sup>

Por su parte, aquellos estudios orientados a evaluar el efecto leishmanicida de los triterpenos pentacíclicos suelen utilizar extractos crudos, fracciones (mezclas de los principales compuestos), o bien, compuestos químicamente definidos derivados de plantas.<sup>60,72</sup>

Con base a lo anterior, en el presente trabajo de investigación se realizó el estudio químico y biológico de los ácidos maslínico y oleanólico aislados a partir de los frutos de *Arctostaphylos pungens* K. (pingüica) sobre el crecimiento y viabilidad en parásitos de *Leishmania mexicana* cepa Lacandona. Del mismo modo, el extracto etanólico de los frutos de pingüica se evaluó sobre *L. mexicana* para determinar si esta especie de *Leishmania* fue susceptible a dicho extracto.



### 7.1. Proceso cromatográfico y caracterización química de los compuestos puros AM y AO

Respecto al aislamiento y purificación de los constituyentes mayoritarios presentes en los frutos de pingüica, se realizó una maceración con EtOH para obtener el extracto total y se evaluó la solubilidad y determinación de compuestos fenólicos a dicho extracto. La Tabla 2 indica la solubilidad del extracto total de *A. pungens* K.

**Tabla 2.** Solubilidad del extracto total de *A. pungens* K con distintos disolventes.

Disolvente	Solubilidad
<b>EtOH</b>	Negativo
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Negativo
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt</b>	Positivo

Por su parte, el contenido total de fenoles para el extracto total de *A. pungens* K se muestra en la Tabla 3 y se expresa en términos cualitativos respecto a la capacidad antioxidante. Con base en estos resultados se pudo indicar la presencia de compuestos fenólicos, ya que el molibdato y tungstato sódico del reactivo de Folin-Ciocalteu reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico de color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.<sup>73</sup> Así, la capacidad antioxidante del extracto total de *A. pungens* K, se atribuyó a la acción directa de los polifenoles, puesto que éstos son poderosos agentes reductores.



**Tabla 3.** Determinación de compuestos fenólicos para el extracto total de *A. pungens* K.

Muestra	Reactivo	Resultado
<b>Testigo (flavonoides)</b>	Folin – Ciocalteau	Positivo
<b>Fracción no soluble derivada del extracto etanólico</b>	Folin – Ciocalteau	Positivo
	FeCl <sub>3</sub> (5%)	Positivo

Posteriormente, el extracto total se resuspendió en MeOH y se consiguió una fracción no soluble; como paso siguiente, una columna al vacío (VLC) se realizó para separar los componentes presentes en el precipitado.

Con base en el análisis cromatográfico (CCF) bajo la luz UV y posterior revelando con anisaldehído sulfúrico, fueron detectados los componentes de cada fracción y se agruparon aquellas fracciones con similitud cromatográfica (Tabla 4). Como paso siguiente y luego de recrystalizar en MeOH se obtuvieron los compuestos PINC001 y PINC002. En la Tabla 5 se indica la cantidad de compuesto aislado para cada caso, siendo PINC001 el constituyente químico mayoritario presente en los frutos de *A. pungens* K.

En lo referente al análisis cromatográfico de los compuestos PINC001 y PINC002, la Figura 7 muestra el cromatograma realizado y por observación bajo la luz UV se concluyó que éstos carecen de propiedades cromóforas, por tanto, estos resultados sugirieron la presencia de terpenoides.





**Tabla 4.** Proceso cromatográfico en VLC para la fracción no soluble derivada del extracto etanólico de frutos de *A. pungens* K.

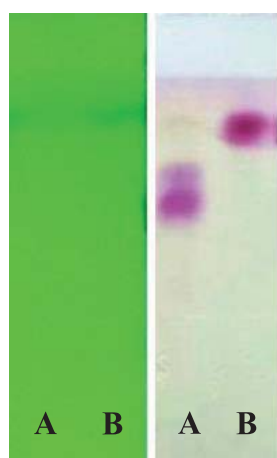
Fracción	Condiciones		Fracción Principal
	Disolvente (s)	Proporción	
1	Hexano	100	F <sub>1</sub>
2	Hexano:AcOEt	98:2	
3	Hexano:AcOEt	96:4	
4	Hexano:AcOEt	94:6	
5	Hexano:AcOEt	92:8	
6	Hexano:AcOEt	90:10	
7	Hexano:AcOEt	85:15	
8	Hexano:AcOEt	80:20	F <sub>2</sub>
9	Hexano:AcOEt	75:25	F <sub>3</sub>
10	Hexano:AcOEt	65:35	F <sub>4</sub>
11	Hexano:AcOEt	60:40	F <sub>5</sub>
12	Hexano:AcOEt	55:45	

Fracción	Condiciones		Fracción principal
	Disolvente (s)	Proporción	
13	Hexano:AcOEt	50:50	F <sub>6</sub>
14	Hexano:AcOEt	50:50	
15	Hexano:AcOEt	50:50	F <sub>7</sub>
16	Hexano:AcOEt	30:70	F <sub>8</sub>
17	AcOEt	100	F <sub>9</sub>
18	AcOEt:MeOH	90:10	F <sub>10</sub>
19	AcOEt:MeOH	5:1	
20	AcOEt:MeOH	3:1	F <sub>11</sub>
21	AcOEt:MeOH	1:1	
22	AcOEt:MeOH	30:70	
23	MeOH	100	
24	Acetona	100	



**Tabla 5.** Constituyentes químicos aislados y purificados del extracto etanólico de los frutos de *A. pungens* K.

Compuesto	Peso seco (mg)
<b>PINC001</b>	6 823.6
<b>PINC002</b>	2 036.3



Soporte: gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck.

Fase móvil: AcOEt:hexano (7:3).

Revelador: Anisaldehído sulfúrico.

**Figura 7.** Cromatograma en capa fina de los principales constituyentes químicos derivados de la fracción no soluble en el extracto etanólico de *A. pungens* K. La imagen de la izquierda representa el cromatograma visto bajo la luz UV, mientras que a la derecha se muestra el cromatograma revelado con anisaldehído sulfúrico; **A)** PINC001 y **B)** PINC002.



### **7.1.1. Caracterización estructural de metabolitos aislados**

El estudio químico del fruto de *A. pungens* K derivó en el aislamiento de los triterpenoides ácido oleanólico (PINC001) y ácido maslínico (PINC002) como compuestos mayoritarios en el extracto etanólico. Conviene recalcar que estos compuestos no se han reportado en la literatura de la pingüica, razón por la cual el presente proyecto de investigación consiguió por vez primera demostrar su relación con el fruto de *A. pungens* K.

En resumen, para la identificación y determinación estructural de los triterpenoides aislados se analizaron los datos de RMN. A continuación, se describirá la caracterización química de estos compuestos.

### **7.1.2. Caracterización estructural del ácido oleanólico (PINC001)**

El compuesto PINC001 se aisló como un polvo de color blanco soluble en metanol. Brevemente, serán descritas las señales más relevantes identificadas en los espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de RMN. En el Anexo 2 se muestran los espectros relacionados con el compuesto PINC001.

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Figura 15) se observó una señal ancha en  $\delta_{\text{H}}$  5.53 asignable al protón olefínico C-12. Esta señal mostró correlación en el espectro HSQC con la señal en  $\delta_{\text{C}}$  122.9 (Figura 18). De acuerdo con el espectro HMBC, los C-11 y C-18 están acoplados con el H-12 (Figura 19).

En segunda instancia, a  $\delta_{\text{H}}$  3.48 se localizó un doble de dobles ( $J=10.0$  y  $4.0$  Hz), que integró para un protón y se atribuyó a un metino oxigenado. Esta señal mostró correlación en el espectro de HSQC con la



señal a  $\delta_c$  78.4 y se asignó al C-3 (Figura 18). Respecto al espectro HMBC se observó el acoplamiento de C-3 con los protones en  $\delta_H$  1.27 y 1.05 correspondientes a los metilos de C-23 y C-24, respectivamente. Además, C-1 y C-2 están acoplados con H-3 (Figura 19).

Así mismo, en  $\delta_H$  3.33 se observó un doble de dobles ( $J= 14.0$  y  $4.6$  Hz) que integró para un protón. Esta señal se atribuyó al protón alílico de C-18 por su correlación con la señal a  $\delta_c$  42.3 (C-18) en el espectro de HSQC y por su acoplamiento con los protones de C-19, C-16 y C-12, acorde al espectro de HMBC (Figuras 18 y 19).

Por último, se observaron siete señales simples en  $\delta_H$  1.32 (H-27), 1.27 (H-23), 1.05 (H-24), 1.05 (H-30), 1.04 (H-26), 0.98 (H-29), y 0.92 (H-25) asignables a los metilos cuaternarios (Figura 15).

En cuanto al espectro de RMN- $^{13}C$  (Figura 16), se observó la presencia de 30 señales que son consistentes con la naturaleza triterpénica de PINC001. Las señales más relevantes corresponden a un grupo carbonilo de ácido en  $\delta_c$  180.6 (C-28), un carbono cuaternario olefínico a  $\delta_c$  145.1 (C-13), un metino olefínico en  $\delta_c$  122.9 (C-12), un metino oxigenado a  $\delta_c$  78.4 (C-3), y siete metilos ( $\delta_c$  33.6, 29.1, 26.5, 24.1, 17.7, 16.9 y 15.8, asignados a los carbonos C-29, C-23, C-27, C-30, C-26, C-24 y C-25, respectivamente).

Acorde con la evidencia descrita anteriormente, se concluyó que el compuesto PINC001 es un triterpeno pentacíclico de tipo oleanano y se identificó como ácido  $3\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oico a partir de la determinación de su estructura por comparación de sus constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura (Seebacher y cols.; Woo y cols.),<sup>74,75</sup> además del estudio de los espectros COSY, HMBC y HMQC (Figuras 14, 15 y 16). El Cuadro 3 muestra la estructura química y las constantes espectroscópicas del AO (PINC001).

**Cuadro 3.** Datos espectroscópicos del ácido oleanólico ( $\delta$  en ppm).

Ácido oleanólico (PINCO01)	
Fórmula	$C_{30}H_{48}O_3$
Estructura	
$^1H$ RMN	(400 MHz, piridina- $d_5$ ) $\delta_H$ 5.53 (1H, s, H-12), 3.48 (1H, dd, $J= 4.0, 10.0$ Hz, H-3), 3.33 (1H, dd, $J= 4.6, 14.0$ Hz, H-18), 1.32 (3H, s, H-27), 1.27 (3H, s, H-23), 1.05 (3H, s, H-24), 1.05 (3H, s, H-30), 1.04 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-29), 0.92 (3H, s, H-25).
$^{13}C$ RMN	(100 MHz, piridina- $d_5$ ) $\delta_C$ 180.6 (C-28), 145.1 (C-13), 122.9 (C-12), 78.4 (C-3), 56.1 (C-5), 49.9 (C-9), 48.4 (C-17), 47.0 (C-19), 42.4 (C-14), 42.3 (C-18), 40.0 (C-8), 39.7 (C-4), 39.2 (C-1), 37.7 (C-10), 34.5 (C-21), 33.6 (C-7), 33.6 (C-29), 33.5 (C-22), 31.3 (C-20), 29.1 (C-23), 28.6 (C-15), 28.3 (C-2), 26.5 (C-27), 24.1 (C-11), 24.1 (C-16), 24.1 (C-30), 19.1 (C-6), 17.7 (C-26), 16.9 (C-24), 15.8 (C-25).



### 7.1.3. Caracterización estructural del ácido maslínico (PINC002)

El compuesto PINC002 se aisló como un sólido blanco soluble en metanol. La estructura se determinó por comparación de sus constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura y su fórmula molecular se estableció como  $C_{30}H_{48}O_3$ .<sup>76,77</sup> A continuación, se describen las señales más relevantes de sus espectros RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C. Los espectros relacionados a este compuesto se muestran en el Anexo 2.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H de PINC002 presenta similitudes con las del AO. En  $\delta_H$  5.49 se observó una señal ancha correspondiente al protón olefínico en C-12; en  $\delta_H$  3.42 se localizó un doblete que integró para un protón y se asignó al metino oxigenado en C-3; en  $\delta_H$  3.32 se situó otro doble de dobles, integró para un protón y se atribuyó al protón alílico de C-18; así mismo, se observaron siete singuletes asignables a los metilos cuaternarios (H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-29 y H-30). Sin embargo, la principal diferencia encontrada fue la presencia de una señal adicional en  $\delta_H$  4.11 (H-2) correspondiente a un doble de doble de dobles ( $J= 4.0, 8.0, 12.0$  Hz), que integró para un protón (Figura 20). Esta señal mostró correlación en el espectro de HSQC con la señal en  $\delta_C$  68.8 y se asignó al C-2. En el espectro HMBC se observó acoplamiento con el protón de C-3 ( $\delta_H$  3.42).

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C fue muy similar al del AO, excepto por ausencia del metileno C-2 ( $\delta_C$  28.2) y presencia de la señal correspondiente a un metino base de oxígeno en  $\delta_C$  68.8 y que se asignó al C-2 (Figura 21). Finalmente, la estructura del ácido (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ )-2,3-dihidroiolean-12-en-28-oico para el AM (PINC002) quedó completamente confirmada mediante el estudio de los espectros COSY, HMBC y HMQC (Figuras 22, 23 y 24) y por comparación de estos datos



con los reportados en la literatura. El Cuadro 4 muestra la estructura química y las constantes espectroscópicas del AM (PINC002).

**Cuadro 4.** Datos espectroscópicos del ácido maslínico ( $\delta$  en ppm).

Ácido maslínico (PINC002)	
Fórmula	$C_{30}H_{48}O_4$
Estructura	
$^1H$ RMN	(400 MHz, piridina- $d_5$ ) $\delta_H$ 5.49 (1H, <i>t</i> , $J = 3.4$ Hz, H-12), 4.11 (1H, <i>ddd</i> , $J = 4.0, 8.0, 12.0$ Hz, H-2), 3.42 (1H, <i>d</i> , $J = 8.0$ , Hz, H-3), 3.32 (1H, <i>dd</i> , $J = 4.0, 14.0$ Hz, H-18), 1.29 (3H, <i>s</i> , H-23), 1.29 (3H, <i>s</i> , H-27), 1.10 (3H, <i>s</i> , H-24), 1.04 (3H, <i>s</i> , H-30), 1.02 (3H, <i>s</i> , H-25), 1.01 (3H, <i>s</i> , H-26), 0.97 (3H, <i>s</i> , H-29).
$^{13}C$ RMN	(100 MHz, piridina- $d_5$ ) $\delta_C$ 180.4 (C-28), 145.1 (C-13), 122.7 (C-12), 84.0 (C-3), 68.8 (C-2), 56.1 (C-5), 48.4 (C-9), 48.0 (C-1), 46.9 (C-17), 46.6 (C-19), 42.4 (C-14), 42.2 (C-18), 40.0 (C-4), 38.7 (C-10), 34.4 (C-21), 33.5 (C-22, C-29), 33.4 (C-7), 31.2 (C-20), 29.6 (C-23), 28.5 (C-15), 26.4 (C-27), 24.1 (C-11), 24.0 (C-30), 23.9 (C-16), 19.1 (C-6), 17.9 (C-26), 17.7 (C-25), 17.1 (C-24).



## **7.2. Evaluación de la actividad biológica del extracto etanólico y las fracciones cromatográficas (AM y AO) obtenidas de los frutos de *A. pungens* K**

### **7.2.1. Efecto del AM y el AO sobre el crecimiento y viabilidad en promastigotes de *L mexicana***

En el presente estudio, la prueba de actividad leishmanicida se inició con la evaluación *in vitro* del efecto anti-promastigote. Aunque esta forma del parásito solo se encuentra en el vector, la facilidad para mantener el cultivo y las pruebas de rendimiento, lo convierten en una herramienta particularmente útil para la evaluación de medicamentos.<sup>60</sup> De acuerdo a lo mencionado en la *Sección 6.2.3*, los parásitos de *L. mexicana* ( $1 \times 10^6$ /mL) se cultivaron por 72 horas con diferentes concentraciones de los ácidos oleanólico (1 a 500  $\mu$ M) y maslínico (2.1 a 105.8  $\mu$ M). Posteriormente, la viabilidad/sobrevida fue establecida por conteo de los promastigotes en cámara de Neubauer.

Inicialmente, se trabajó con las concentraciones de 10, 50, 100, 200 y 500  $\mu$ g/mL (21.1, 105.8, 211.5, 423.1 y 1057.7  $\mu$ M) para el AM. Sin embargo, los resultados observados sugirieron ajustar el intervalo de concentraciones para apreciar mejor el efecto leishmanicida causado por el AM. La Figura 8 describe los resultados alcanzados bajo este esquema de tratamiento. En resumen, se observó un contundente efecto leishmanicida transcurridas las primeras 24 horas de 44.8%, 85.0% y 74.1% con las concentraciones de 10, 50, 100  $\mu$ g/mL, respectivamente; el efecto en la supervivencia de los parásitos fue total con las concentraciones más altas, 200 y 500  $\mu$ g/mL. Para el día dos, el efecto alcanzado fue de 51.0% con la concentración de 10  $\mu$ g/mL y de 96.0% para la concentración de 50  $\mu$ g/mL; mientras que, en las concentraciones de 100, 200 y 500  $\mu$ g/mL la actividad antiparasitaria fue total. Semejantes

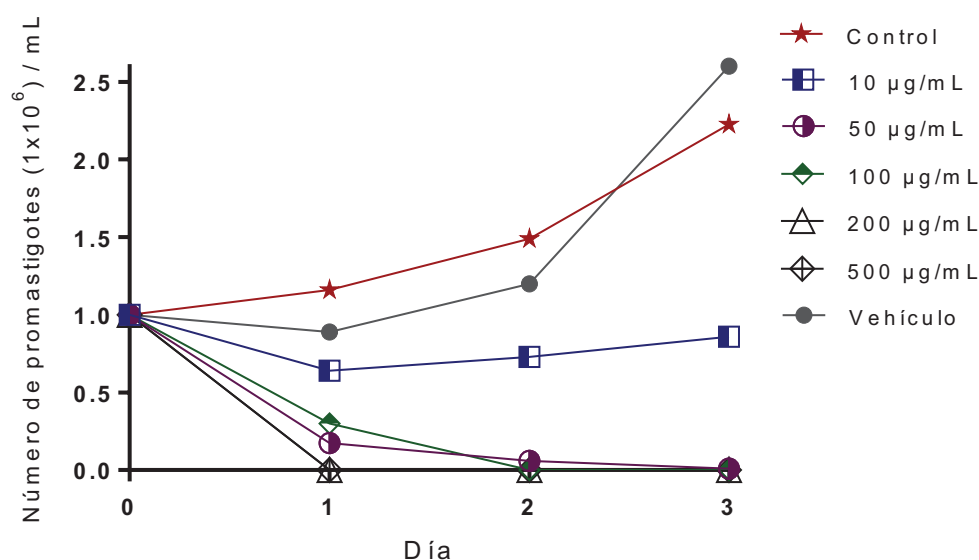




resultados fueron observados transcurridas 72 horas de tratamiento con este compuesto, una inhibición de 61.4% y 99.6% para las concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente; el efecto antiparasitario fue total en 100, 200 y 500  $\mu\text{g/mL}$ .

Tomando en cuenta estos resultados, se ajustó el intervalo de concentraciones a evaluar para el AM, siendo los nuevos valores 2.1, 4.2, 10.6, 21.2 y 105.8  $\mu\text{M}$  (1, 2, 5, 10 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Asimismo, se optó por un nuevo intervalo de concentraciones para el AO, considerando el parecido estructural de ambas moléculas.

Como se puede ver en la Figura 9.A, el AO comenzó a inhibir el crecimiento de *L. mexicana* en las primeras 24 horas, tal que a partir de las concentraciones de 100 y 200  $\mu\text{M}$  la actividad leishmanicida fue de 36.1% y 60.4%, respectivamente; el efecto fue total con las concentraciones más altas, 300 y 500  $\mu\text{M}$ . Para el segundo día, con estas

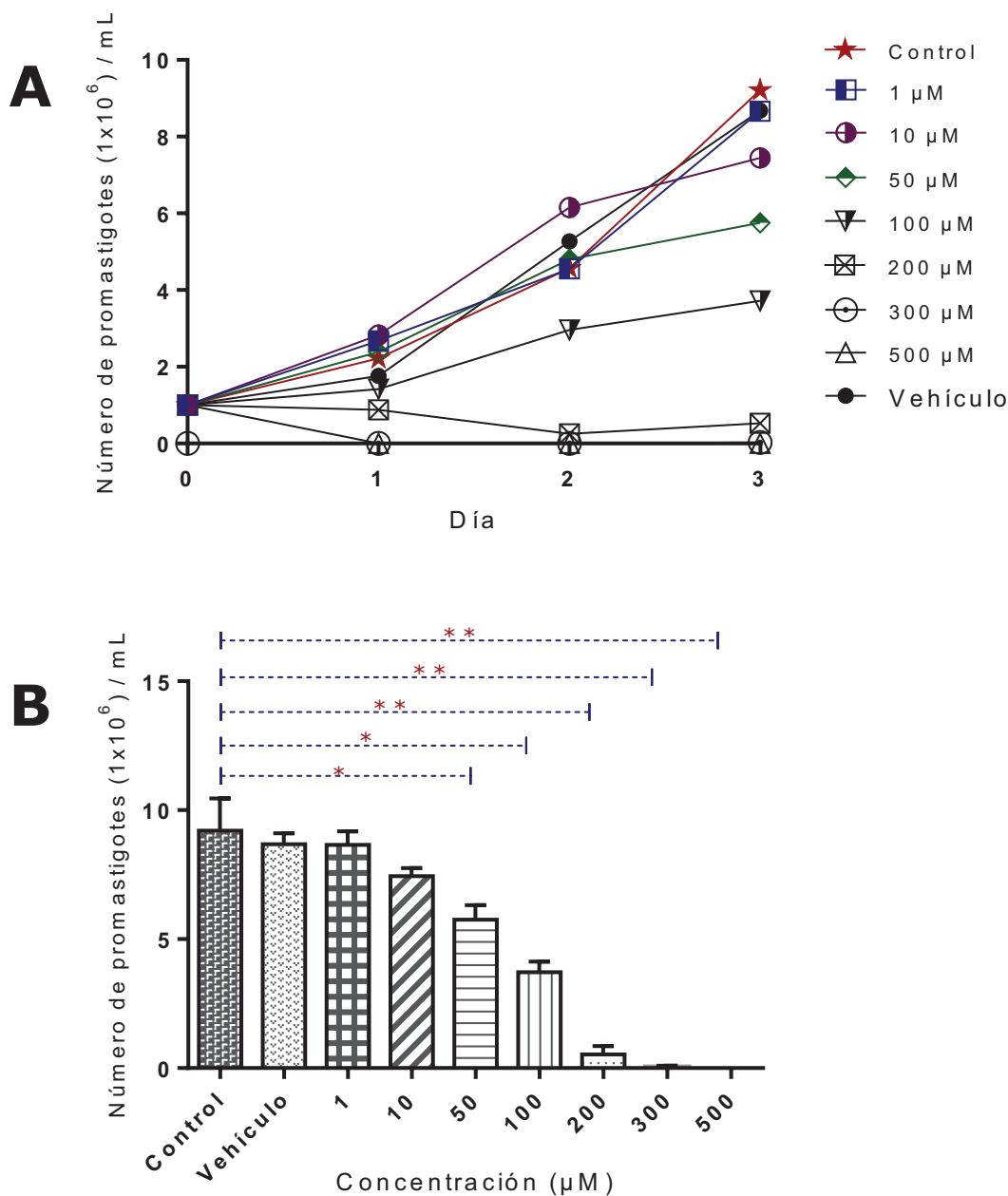


**Figura 8.** Curva de crecimiento de promastigotes *L. mexicana* incubados con diferentes concentraciones del AM por 72 horas.

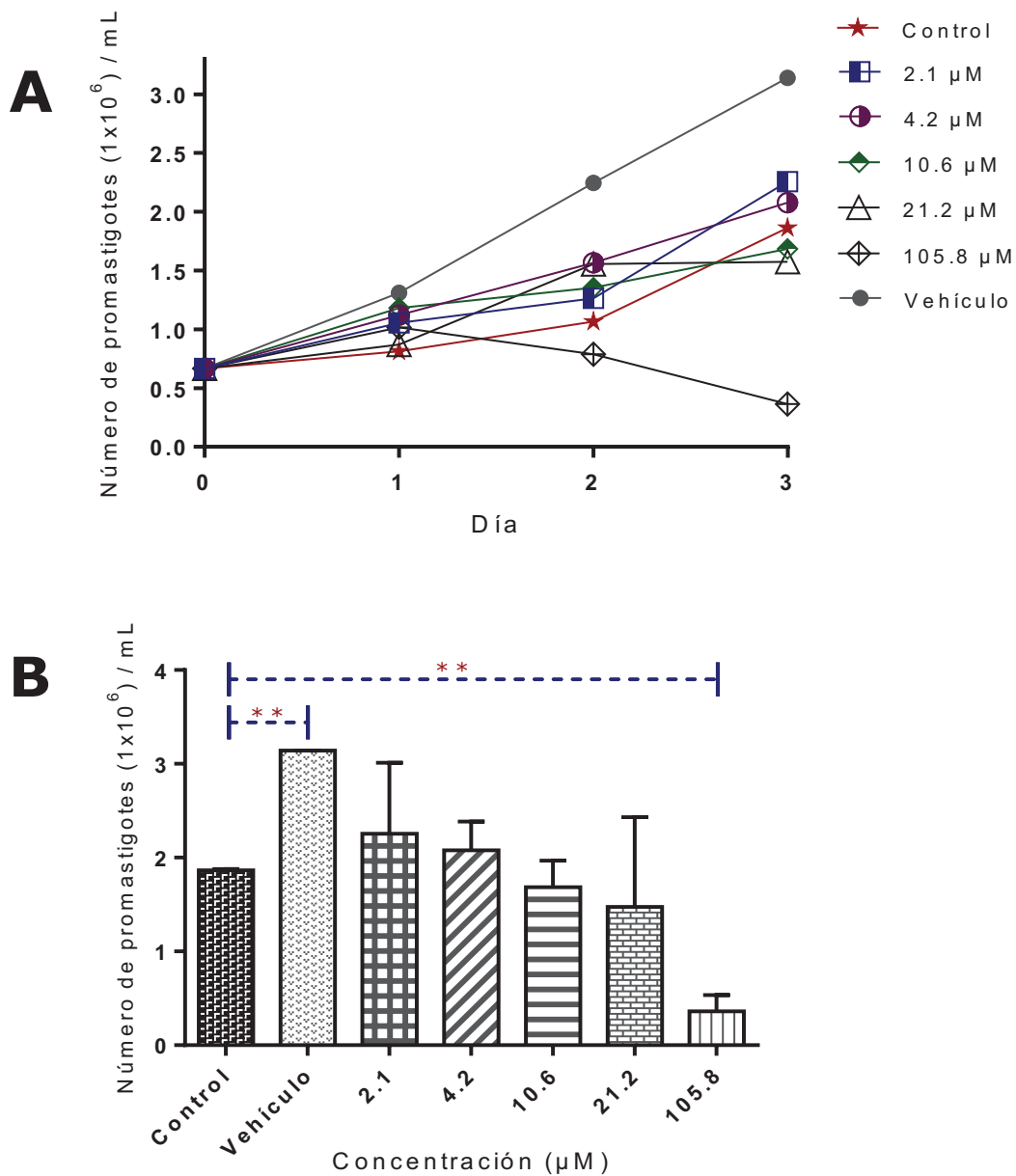


mismas concentraciones, la reducción fue de 35.2% con 100  $\mu\text{M}$  y de 94.5% con 200  $\mu\text{M}$ ; nuevamente el efecto fue total con las concentraciones de 300 y 500  $\mu\text{M}$ . En el día tres, la inhibición correspondiente a las concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  fueron 5.9%, 19.1%, 37.6%, 59.6% y 94.2%, respectivamente. De forma semejante, los ensayos realizados con el AM demostraron una marcada inhibición de los parásitos en concentraciones incluso menores a las evaluadas con el AO. La Figura 10.A muestra una disminución en la carga parasitaria de 6.9% con la concentración de 21.2  $\mu\text{M}$  en las primeras 24 horas; para el segundo día se consiguió una inhibición de 26.0% con la concentración de 105.8  $\mu\text{M}$ . Los resultados alcanzados al tercer día de monitorear la actividad del AM fueron de 9.6%, 15.5% y 80.5% a concentraciones de 10.6, 21.2 y 105.8  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Con base en estas observaciones, se estableció el criterio para determinar la carga parasitaria concluidas las 72 horas en cada ensayo con estos triterpenos pentacíclicos.

Bajo este contexto, los resultados derivados del presente estudio demostraron que tanto el AO como el AM causaron inhibición dosis dependiente en el crecimiento de promastigotes de la cepa *L. mexicana*. Se obtuvo, para ambos experimentos, una reducción significativa con las concentraciones más altas ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con los controles sin tratamiento al tercer día de evaluación. En particular, se alcanzó una inhibición de 59.6% y 94.2% con 100 y 200  $\mu\text{M}$  (45.67 y 91.34  $\mu\text{g/mL}$ ) del AO, respectivamente; y a partir de la concentración 300  $\mu\text{M}$  el efecto leishmanicida del AO fue total (Figura 9.B). Mientras que con el AM se consiguió una inhibición de 14.7% y 79.1% a concentraciones de 21.2 y 105.8  $\mu\text{M}$  (10 y 50  $\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente (Figura 10.B). En ambos casos el vehículo no mostró efecto en el crecimiento de promastigotes.



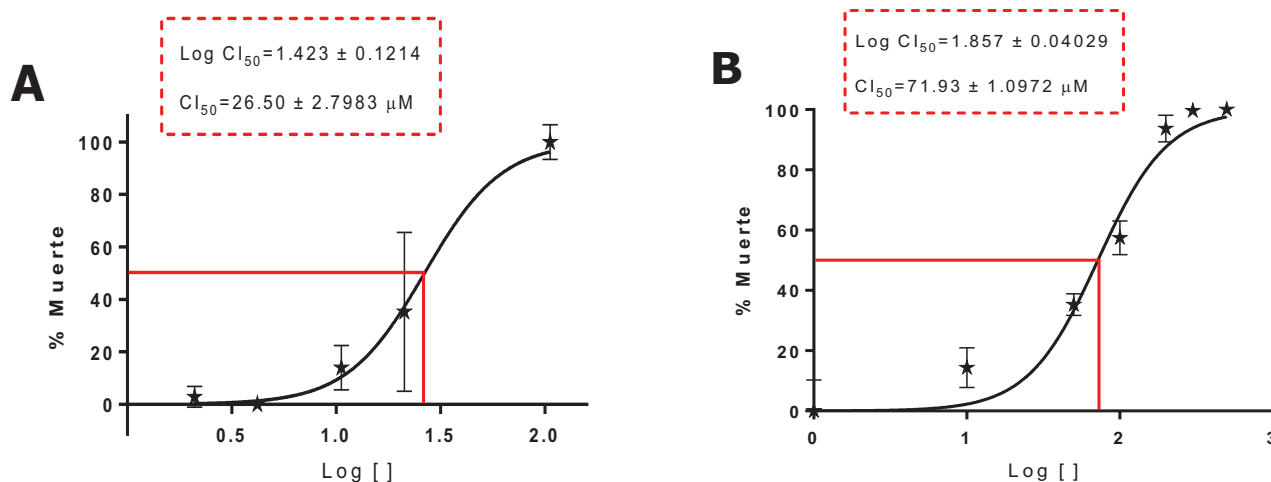
**Figura 9.** Efecto del AO sobre el crecimiento de parásitos. **(A)** Curva de crecimiento de promastigotes *L. mexicana* incubados con diferentes concentraciones del AO por 3 días. **(B)** Viabilidad de parásitos *L. mexicana* co-incubados con AO después de 72 horas de tratamiento. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes. El símbolo \* representa que los datos presentan una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al control negativo sin tratamiento.



**Figura 10.** Efecto del AM sobre el crecimiento de parásitos. **(A)** Curva de crecimiento de promastigotes *L. mexicana* incubados con diferentes concentraciones del AM por 3 días. **(B)** Viabilidad de promastigotes *L. mexicana* co-incubados con AM por 72 horas. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes. El símbolo \* representa que los datos presentan una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al control negativo sin tratamiento.



En lo referente a la determinación de la  $CI_{50}$  de los ácidos maslínico y oleanólico, los valores calculados para cada ácido fueron  $26.50 \pm 2.80 \mu\text{M}$  ( $12.50 \pm 1.32 \mu\text{g/mL}$ ) para el AM (Figura 11.A) y  $71.93 \pm 1.10 \mu\text{M}$  ( $32.85 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$ ) para el AO (Figura 11.B). Estos resultados indicaron una susceptibilidad mayor por parte de *L. mexicana* hacia el primer triterpeno pentacíclico en relación al tratamiento con el segundo compuesto durante un periodo de 72 horas. De acuerdo a estas observaciones el AM resultó ser tres veces más eficiente que el AO como agente leishmanicida. Por otra parte, en comparación a los promastigotes tratados con el control positivo Glucantime<sup>®</sup>, los parásitos de *L. mexicana* denotaron ser más sensibles al tratamiento con cualquiera de los compuestos de tipo oleanano. De modo que las  $CI_{50}$  calculadas para el AO y el AM (Tabla 6) alcanzaron valores notablemente sobresalientes respecto al valor de Glucantime<sup>®</sup>,  $11000 \pm 2.15 \mu\text{M}$  ( $4\ 025.78 \mu\text{g/mL}$ ).

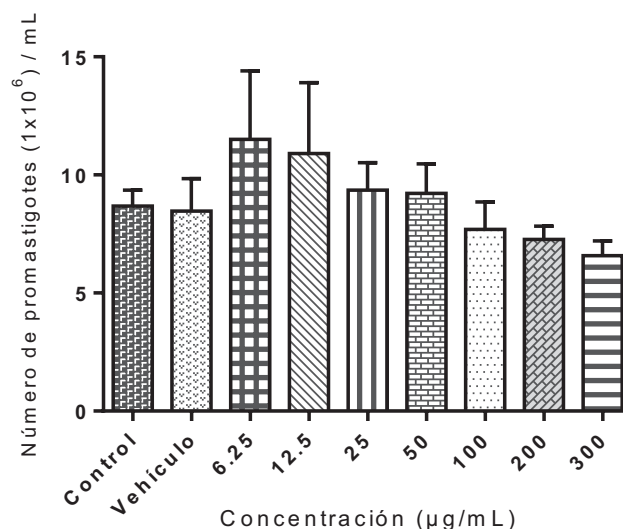


**Figura 11.** Determinación de la  $CI_{50}$  en los ensayos *in vitro* sobre la cepa de *L. mexicana*. Las curvas representan el porcentaje de muerte en promastigotes contra el logaritmo de la concentración del AM (A) y AO (B).



### 7.2.2. Efecto del extracto etanólico sobre crecimiento y viabilidad en promastigotes de *L mexicana*

Acerca de la actividad biológica del extracto etanólico de los frutos de *A. pungens* K. recolectados en el estado de México sobre la cepa de *L. mexicana*, el presente estudio determinó que esta cepa de *Leishmania* fue susceptible al efecto de este extracto. En concreto, los resultados mostraron un efecto tóxico dependiente de la concentración para promastigotes de *L. mexicana* tratados con el extracto etanólico por 72 horas. Estos resultados indicaron que a mayores concentraciones se alcanzó una reducción significativa ( $p \leq 0.05$ ), en comparación a los controles sin tratamiento al tercer día de iniciado el tratamiento. El vehículo no tuvo efecto sobre la viabilidad de los parásitos (Figura 12).

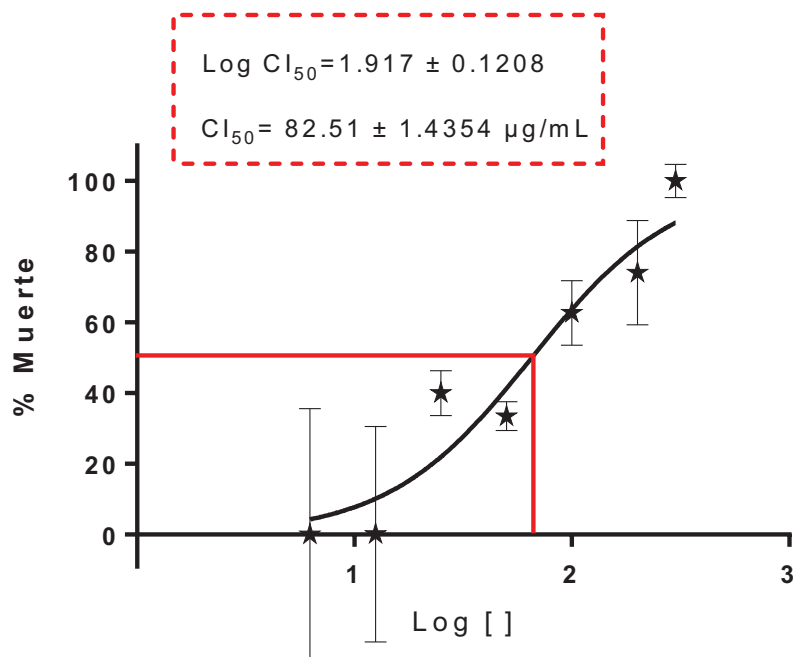


**Figura 12.** Viabilidad de promastigotes co-incubados con extracto etanólico durante 72 horas. La grafica representa el efecto del extracto etanólico sobre el número de parásitos. Los datos representan el promedio  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes. El símbolo \* representa que los datos poseen una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al control negativo sin tratamiento.



Comparativamente, el valor calculado de  $CI_{50}$  del extracto etanólico (Figura 13) con respecto al valor determinado para el control positivo Glucantime® (Tabla 6), exhibió que *L. mexicana* es una especie particularmente sensible a este extracto. Esta última observación sugirió una posible actividad sinérgica entre los componentes del extracto, sabiendo que éste contiene los compuestos puros AM y AO.

En contraste con lo observado en la evaluación *in vitro* de los ácidos maslínico y oleanólico, el efecto anti-promastigote a diferentes concentraciones resultó menor para el extracto etanólico puesto que incluso con una concentración de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la inhibición máxima alcanzada fue tan solo de 35% para esta cepa de *Leishmania*.



**Figura 13.** Determinación de la  $CI_{50}$  en los ensayos *in vitro* sobre la cepa de *L. mexicana*. La curva representa el porcentaje de muerte en promastigotes contra el logaritmo de la concentración del Ex. EtOH.



**Tabla 6.** Valores calculados para la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) de todos los compuestos en promastigotes de *L. mexicana*.

Compuesto	$CI_{50} \pm SD$	
	$\mu M$	$\mu g/mL$
<b>AM</b>	$26.50 \pm 2.80$	$12.50 \pm 1.32$
<b>AO</b>	$71.93 \pm 1.10$	$32.85 \pm 0.50$
<b>Ex. EtOH</b>	----	$82.51 \pm 1.44$
<b>Glucantime<sup>®</sup></b>	$11\ 000 \pm 2.15$	$4\ 025.78$





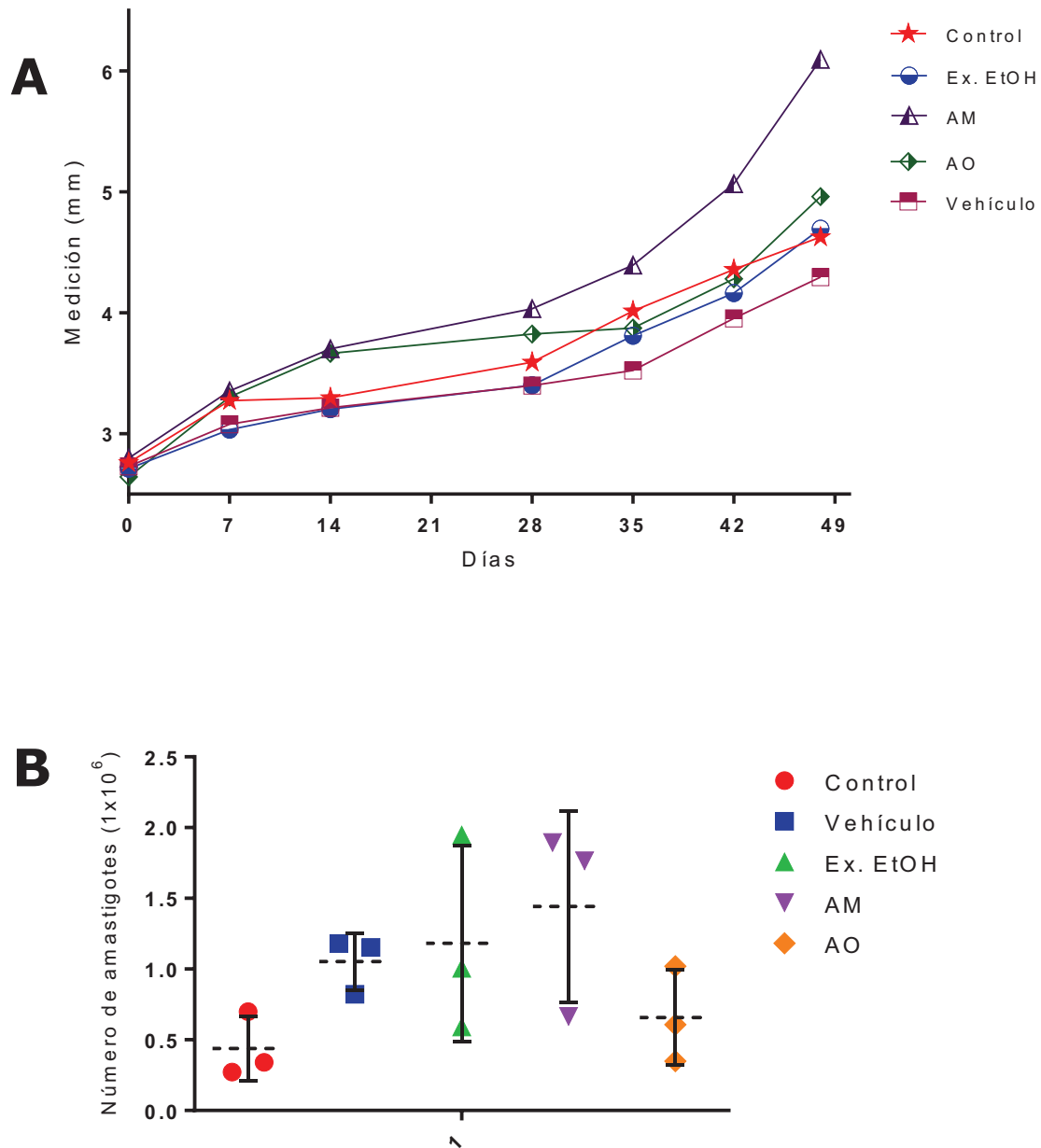
### **7.2.3. Efecto leishmanicida *in vivo* sobre *L. mexicana***

Para determinar si los ácidos maslínico y oleanólico así como el extracto etanólico modificaron la virulencia en la cepa de *L. mexicana*, se infectaron ratones C57BL/6 en el cojinete plantar con  $5 \times 10^5$  promastigotes en fase estacionaria. En adición al tratamiento aplicado con cada compuesto, se midió semanalmente el cojinete plantar de los ratones con y sin tratamiento durante siete semanas para observar la evolución de la enfermedad ocasionada por *L. mexicana*.

Como puede verse en la Figura 14.A, los resultados obtenidos al monitorear las lesiones en los diferentes grupos de ratones no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que recibieron tratamiento con respecto a los grupos administrados con el vehículo o con los controles sin tratamiento.

Incluso la carga parasitaria mostró estar relacionada con los resultados antes mencionados puesto que tampoco se observaron cambios significativos al comparar la carga parasitaria de amastigotes en los grupos que recibieron tratamiento con los ratones control que no recibieron o con aquellos que fueron tratados únicamente con el vehículo (Figura 14.B).

En contraste con los resultados alcanzados en los ensayos *in vitro* se confirmó que, bajo el esquema de tratamiento aplicado, los efectos leishmanicidas de los compuestos evaluados (AM, AO y Ex. EtOH) carecieron de acción alguna para frenar el progreso de la enfermedad cuando se los analizó *in vivo*. No obstante, es probable que la crema empleada como vehículo no permitiera que tanto los ácidos como el extracto logaran alcanzar su respectivo blanco (amastigotes), o bien, la cantidad de compuesto fue insuficiente. En consecuencia, el avance de la enfermedad prevaleció por sobre el tratamiento.



**Figura 14.** Evolución de la lesión causada por la cepa de *L. mexicana* en ratones C57BL/6 con y sin tratamiento. Los ratones se infectaron en el cojinete plantar con  $5 \times 10^5$  de promastigotes en fase estacionaria. **A)** Expresa el promedio de las medidas en los cojinetes en milímetros durante siete semanas por grupo de ratones. **B)** Muestra el promedio de número de parásitos por milímetro cuadrado de tejido en el cojinete plantar.



## 8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados observados se puede concluir que los ácidos maslínico y oleanólico poseen excelente actividad leishmanicida sobre promastigotes de *L. mexicana*. A su vez, el extracto etanólico preparado de los frutos de *A. pungens* K (pingüica) mostró efecto semejante a los triterpenos pentacíclicos. Por lo cual, con la determinación de la  $CI_{50}$ , se encontró que tanto el ácido maslínico como el ácido oleanólico inhiben el crecimiento de promastigotes a concentraciones bajas; por su parte, el extracto etanólico es activo frente a esta especie de *Leishmania* a concentración alta. De hecho, la  $CI_{50}$  para cada caso, mostró superar al valor obtenido por Glucantime® ( $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ ).

Si bien la proliferación parasitaria se logró cesar durante los ensayos *in vitro*, quedó demostrado mediante los ensayos con ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana*, la importancia de encontrar un vehículo adecuado para la aplicación tópica, lo cual podría influir al efecto antileishmaniasis sobre la forma intracelular de *L. mexicana*. Por tal motivo, bajo el esquema utilizado se determinó que, tanto los ácidos maslínico y oleanólico como el extracto etanólico no tuvieron efecto inhibitorio sobre la evolución de la enfermedad.

Finalmente, en este estudio se mostró por primera vez la presencia de dos compuestos no reportados previamente en la literatura del fruto de la pingüica, el ácido maslínico (ácido (2 $\alpha$ ,3 $\beta$ )-2,3-dihidroxiolean-12-en-28-oico) y el ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oico). En consecuencia, estos resultados permiten proponer al extracto etanólico derivado del fruto de la pingüica, no solo como una opción terapéutica para la leishmaniasis sino también como una fuente alternativa de compuestos con importante actividad sobre el crecimiento y viabilidad en parásitos de *L. mexicana*.



## 9. PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto *in vitro* que ejercen los ácidos maslínico y oleanólico sobre la viabilidad de macrófagos de la línea celular RAW 264.7, a través del cálculo de su CI<sub>50</sub>.
- Evaluar la sobrevida de amastigotes intracelulares de *Leishmania mexicana* en macrófagos incubados con los ácidos maslínico y oleanólico.
- Determinar una formulación adecuada para el vehículo que permita una eficaz absorción de los ácidos maslínico y oleanólico por vía cutánea, y en consecuencia desarrollar una terapia novedosa que convine las propiedades farmacológicas de estos compuestos.
- Elucidar los mecanismos de acción mediante los cuales estos compuestos, ácido maslínico y ácido oleanólico, ejercen su efecto sobre la viabilidad y crecimiento de *Leishmania mexicana*.
- Continuar con la caracterización química de los compuestos minoritarios presentes en los frutos de *Arctostaphylos pungens* K (pingüica).



## 10. REFERENCIAS

1. Delgado-Altamirano R, López-Palma R, Monzote L, et al. Chemical Constituents with Leishmanicidal Activity from a Pink-Yellow Cultivar of *Lantana camara* var. *aculeata* (L.) Collected in Central Mexico. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4):872. doi:10.3390/ijms20040872
2. Organización Panamericana de la Salud. *Manual de Procedimientos Para Vigilancia y Control de Las Leishmaniasis En Las Américas.* Washington, D.C.: OPS; 2019. <http://iris.paho.org>.
3. Organización Mundial de la Salud-OMS. La OMS informa de los avances sin precedentes en la lucha contra las enfermedades tropicales desatendidas. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/detail/19-04-2017-unprecedented-progress-against-neglected-tropical-diseases-who-reports>. Publicado en 2017.
4. World Health Organization - WHO. Health statistics and information systems|Disease burden and mortality estimates. World Health Organization. [https://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/](https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/). Publicado en 2018.
5. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. Bañuls A-L, ed. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10 (3): e0004349. doi:10.1371/journal.pntd.0004349
6. de Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol.* 2015; 16 (2): 99-109. doi:10.1007/s40257-015-0114-z



7. Lezama-Dávila CM, McChesney JD, Bastos JK, et al. A New Antileishmanial Preparation of Combined Solamargine and Solasonine Heals Cutaneous Leishmaniasis through Different Immunochemical Pathways. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60 (5): 2732-2738. doi:10.1128/AAC.02804-15
8. Pavli A, Maltezou HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis.* 2010; 14 (12): e1032-e1039. doi:10.1016/j.ijid.2010.06.019
9. Okwor I, Uzonna J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 94 (3): 489-493. doi:10.4269/ajtmh.15-0408
10. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect.* 2014; 69: S10-S18. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.016
11. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet.* 2018; 392 (10151): 951-970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2
12. Telleria EL, Martins-Da-Silva A, Tempone AJ, Traub-Cseko YM. Leishmania, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology.* 2018; 145 (10): 1336-1353. doi:10.1017/S0031182018001014
13. Scorza B, Carvalho E, Wilson M. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (6): 1296. doi:10.3390/ijms18061296
14. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2017; 10 (1): 82. doi:10.1186/s13071-017-2028-5
15. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Cascio A. Leishmaniasis in travelers: A literature review. *Travel Med Infect Dis.* 2014; 12 (6): 563-581. doi:10.1016/j.tmaid.2014.09.007
16. Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. Kirk M, ed. *PLoS One.* 2012; 7 (5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671



17. Organización Panamericana de la Salud. *Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de Las Americas*. Organización Panamericana de la Salud; 2019. [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis). Publicado en 2019.
18. Gutiérrez-Rebolledo GA, Drier-Jonas S, Jiménez-Arellanes MA. Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. *Asian Pac J Trop Med*. 2017; 10 (12): 1105-1110. doi:10.1016/j.apjtm.2017.10.016
19. Secretaría de Salud. *Programa De Acción Específico. Prevención y Control de Las Leishmaniasis 2013-2018.*; 2015. <https://www.gob.mx/salud/documentos/programa-de-accion-especifico-prevencion-y-control-de-las-leishmaniasis-2013-2018>.
20. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 2017; 6 (May): 750. doi:10.12688/f1000research.11120.1
21. Jiménez-Arellanes MA, Alamilla-Fonseca L, Gutiérrez-Rebolledo GA. Las plantas medicinales de México como fuente de compuestos activos contra la leishmaniasis. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2014; 45 (2): 19-30. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57932294003>.
22. Delgado-Altamirano R, Monzote L, Piñón-Tápanes A, et al. In vitro antileishmanial activity of Mexican medicinal plants. *Heliyon*. 2017; 3 (9): e00394. doi:10.1016/j.heliyon.2017.e00394
23. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*. 2017; 57: 1-29. doi:10.1016/j.mam.2016.11.012



24. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis*. 2016; 63 (12): e202-e264. doi:10.1093/cid/ciw670
25. Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzmán-Bracho C, Jaffe CL. ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of Leishmania in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the Mexican Southeast. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2014; 2014: 1-6. doi:10.1155/2014/607287
26. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9 (8): 604-615. doi:10.1038/nrmicro2608
27. Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis y Organización Mundial de la Salud. Control de las leishmaniasis: Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/iris/handle/10665/82766>. Publicado en 2012.
28. Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura C V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis*. 2011; 15 (8): e525-e532. doi:10.1016/j.ijid.2011.03.021
29. Iqbal H, Ishfaq M, Wahab A, et al. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2016; 6 (1): 1-5. doi:10.1016/S2222-1808(15)60975-6
30. Martín-Quintal Z, Peraza-Sánchez S. Productos naturales con actividad leishmanicida. In: Delgado G, Romo de Vivar A, eds. *Temas Selectos de Química de Productos Naturales*. 1ra ed. México: UNAM; 2015: 267-288.





31. Anversa L, Tiburcio MGS, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Rev Assoc Med Bras.* 2018; 64 (3): 281-289. doi:10.1590/1806-9282.64.03.281
32. Mans DR, Kent AD, VPF Hu R, Schallig HD. Epidemiological, Biological and Clinical Aspects of Leishmaniasis with Special Emphasis on Busi Yasi in Suriname. *J Clin Exp Dermatol Res.* 2017; 08 (02). doi:10.4172/2155-9554.1000388
33. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World Leishmania Infections. *Dermatol Clin.* 2015; 33 (3): 579-593. doi:10.1016/j.det.2015.03.018
34. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 2013; 27 (2): 123-147. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x
35. Rodrigues IA, Mazotto AM, Cardoso V, et al. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 1-12. doi:10.1155/2015/835910
36. Singh N, Mishra BB, Bajpai S, Singh RK, Tiwari VK. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem.* 2014; 22 (1): 18-45. doi:10.1016/j.bmc.2013.11.048
37. Lezama-Dávila CM, Pan L, Isaac-Márquez AP, et al. Pentalinon andrieuxii Root Extract is Effective in the Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania mexicana*. *Phyther Res.* 2014; 28 (6): 909-916. doi:10.1002/ptr.5079
38. Ghosh S. Biosynthesis of Structurally Diverse Triterpenes in Plants: the Role of Oxidosqualene Cyclases. *Proc Indian Natl Sci Acad.* 2016; 82 (4): 1189-1210. doi:10.16943/ptinsa/2016/48578



39. Khwaza V, Oyedeji O, Aderibigbe B. Antiviral Activities of Oleanolic Acid and Its Analogues. *Molecules*. 2018; 23 (9): 2300. doi:10.3390/molecules23092300
40. Parikh NR, Mandal A, Bhatia D, Siveen KS, Sethi G, Bishayee A. Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. *Phytochem Rev*. 2014; 13 (4): 793-810. doi:10.1007/s11101-014-9337-5
41. Patel R, Park S. Journey Describing the Discoveries of Anti-HIV Triterpene Acid Families Targeting HIV-Entry/Fusion, Protease Functioning and Maturation Stages. *Curr Top Med Chem*. 2014; 14 (17): 1940-1966. doi:10.2174/1568026614666140929115202
42. Shanmugam MK, Dai X, Kumar AP, Tan BKH, Sethi G, Bishayee A. Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical evidence. *Cancer Lett*. 2014; 346 (2): 206-216. doi:10.1016/j.canlet.2014.01.016
43. Rufino-Palomares EE, Perez-Jimenez A, J. Reyes-Zurita F, et al. Anti-cancer and Anti-angiogenic Properties of Various Natural Pentacyclic Tri-terpenoids and Some of their Chemical Derivatives. *Curr Org Chem*. 2015; 19 (10): 919-947. doi:10.2174/1385272819666150119225952
44. Ayeleso T, Matumba M. Oleanolic Acid and Its Derivatives: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. *Molecules*. 2017; 22 (11): 1-16. doi:10.3390/molecules22111915
45. Lozano-Mena G, Sánchez-González M, Juan ME, Planas JM. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives - A promising nutraceutical? *Molecules*. 2014; 19 (8): 11538-11559. doi:10.3390/molecules190811538
46. Yap WH, Lim YM. Mechanistic Perspectives of Maslinic Acid in Targeting Inflammation. *Biochem Res Int*. 2015; 2015: 1-9. doi:10.1155/2015/279356



47. Pollier J, Goossens A. Oleanolic acid. *Phytochemistry*. 2012; 77: 10-15. doi:10.1016/j.phytochem.2011.12.022
48. Zhang Z, Jiang M, Xie X, et al. Oleanolic acid ameliorates high glucose-induced endothelial dysfunction via PPAR $\delta$  activation. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 40237. doi:10.1038/srep40237
49. Castellano JM, Guinda A, Delgado T, Rada M, Cayuela JA. Biochemical Basis of the Antidiabetic Activity of Oleanolic Acid and Related Pentacyclic Triterpenes. *Diabetes*. 2013; 62 (6): 1791-1799. doi:10.2337/db12-1215
50. Jesus JA, Lago JHG, Laurenti MD, Yamamoto ES, Passero LFD. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015; 2015 (Figure 1): 620472. doi:10.1155/2015/620472
51. Sánchez-Quesada C, López-Biedma A, Gaforio J. Oleanolic Acid, a Compound Present in Grapes and Olives, Protects against Genotoxicity in Human Mammary Epithelial Cells. *Molecules*. 2015; 20 (8): 13670-13688. doi:10.3390/molecules200813670
52. Wang J, Yu M, Xiao L, Xu S, Yi Q, Jin W. Radiosensitizing effect of oleanolic acid on tumor cells through the inhibition of GSH synthesis in vitro. *Oncol Rep*. 2013; 30 (2): 917-924. doi:10.3892/or.2013.2510
53. Wei J, Liu M, Liu H, et al. Oleanolic acid arrests cell cycle and induces apoptosis via ROS-mediated mitochondrial depolarization and lysosomal membrane permeabilization in human pancreatic cancer cells. *J Appl Toxicol*. 2013; 33 (8): 756-765. doi:10.1002/jat.2725
54. Mkhwanazi BN, Serumula MR, Myburg RB, Van Heerden FR, Musabayane CT. Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on kidney function. *Ren Fail*. 2014; 36 (3): 419-431. doi:10.3109/0886022X.2013.867799



55. Sánchez-Quesada C, López-Biedma A, Warleta F, Campos M, Beltrán G, Gaforio JJ. Bioactive Properties of the Main Triterpenes Found in Olives, Virgin Olive Oil, and Leaves of *Olea europaea*. *J Agric Food Chem*. 2013; 61 (50): 12173-12182. doi:10.1021/jf403154e
56. Moneriz C, Mestres J, Bautista JM, Diez A, Puyet A. Multi-targeted activity of maslinic acid as an antimalarial natural compound. *FEBS J*. 2011; 278 (16): 2951-2961. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08220.x
57. Duarte N, Ramalhete C, Lourenço L. Plant Terpenoids as Lead Compounds Against Malaria and Leishmaniasis. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol 62. ; 2019: 243-306. doi:10.1016/B978-0-444-64185-4.00007-1
58. Sifaoui I, López-Arencibia A, Martín-Navarro CM, et al. In vitro effects of triterpenic acids from olive leaf extracts on the mitochondrial membrane potential of promastigote stage of *Leishmania* spp. *Phytomedicine*. 2014; 21 (12): 1689-1694. doi:10.1016/j.phymed.2014.08.004
59. Sifaoui I, López-Arencibia A, Martín-Navarro CM, et al. Selective activity of Oleanolic and Maslinic Acids on the Amastigote form of *Leishmania* Spp. *Iran J Pharm Res IJPR*. 2017; 16 (3): 1190-1193. [http://ijpr.sbmu.ac.ir/article\\_2070\\_8e05bf174970c23d09eb8567869daaff.pdf](http://ijpr.sbmu.ac.ir/article_2070_8e05bf174970c23d09eb8567869daaff.pdf) %0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emexa&NEWS=N&AN=617659603.
60. Melo TS, Gattass CR, Soares DC, et al. Oleanolic acid (OA) as an antileishmanial agent: Biological evaluation and in silico mechanistic insights. *Parasitol Int*. 2016; 65 (3): 227-237. doi:10.1016/j.parint.2016.01.001
61. Sifaoui I, López-Arencibia A, Martín-Navarro CM, et al. Activity of olive leaf extracts against the promastigote stage of *Leishmania* species and their correlation with the antioxidant activity. *Exp Parasitol*. 2014; 141 (1): 106-111. doi:10.1016/j.exppara.2014.03.002



62. Alamilla-Fonseca LN, Delgado-Domínguez J, Zamora-Chimal J, et al. Leishmania mexicana cell death achieved by Cleoserrata serrata (Jacq.) Ittis: Learning from Maya healers. *J Ethnopharmacol.* 2018; 211 (October 2018): 180-187. doi:10.1016/j.jep.2017.09.037
63. Argueta A, Gallardo MC, Jiménez R, et al. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Pinngüica&id=7917>.
64. González-Elizondo M, López-Enriquez IL, González-Elizondo MS, Tena-Flores J. *Plantas Medicinales Del Estado de Durango y Zonas Aledañas.* (Instituto Politécnico Nacional, ed.). Ciudad de México; 2004.
65. Moreno-Rico O, Groenewald JZ, Crous PW. Follicolous fungi from *Arctostaphylos pungens* in Mexico. *IMA Fungus.* 2014; 5 (1): 7-15. doi:10.5598/imafungus.2014.05.01.02
66. Alonso-Castro AJ, Domínguez F, Zapata-Morales JR, Carranza-Álvarez C. Plants used in the traditional medicine of Mesoamerica (Mexico and Central America) and the Caribbean for the treatment of obesity. *J Ethnopharmacol.* 2015; 175 (September): 335-345. doi:10.1016/j.jep.2015.09.029
67. Márquez-Linares MA, Jurado E, González, Elizondo S. Algunos aspectos de la biología de la manzanita (*Arctostaphylos pungens* HBK) y su papel en el desplazamiento de bosques templados por chaparrales. *Cienc UANL.* 2006; 9: 57-64.
68. Villa-Ruano N, Zurita-Vásquez GG, Pacheco-Hernández Y, Betancourt-Jiménez MG, Cruz-Durán R, Duque-Bautista H. Anti-lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca, México. *Biol Res.* 2013; 46 (2): 153-160. doi:10.4067/S0716-97602013000200006



69. de la Iglesia R, Milagro FI, Campión J, Boqué N, Martínez JA. Healthy properties of proanthocyanidins. *BioFactors*. 2010; 36 (3): 159-168. doi:10.1002/biof.79
70. Liao S-G, Zhang L-J, Sun F, et al. Antibacterial and anti-inflammatory effects of extracts and fractions from *Polygonum capitatum*. *J Ethnopharmacol*. 2011; 134 (3): 1006-1009. doi:10.1016/j.jep.2011.01.050
71. Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol*. 1985; 7 (5):5 45-555. doi:10.1111/j.1365-3024.1985.tb00098.x
72. Iqbal H, Ishfaq M, Wahab A, et al. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2016; 6 (1): 1-5. doi:10.1016/S2222-1808(15)60975-6
73. Marina D, Avella G, Alberto C, García O, Cisneros AM. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simp Metrol*. 2008: 1-5. [http://cenam.mx/simposio2008/sm\\_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf](http://cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf).
74. Seebacher W, Simic N, Weis R, Saf R, Kunert O. Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR resonances of oleanolic acid, 18 $\alpha$ -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn Reson Chem*. 2003; 41 (8): 636-638. doi:10.1002/mrc.1214
75. Woo KW, Han JY, Choi SU, Kim KH, Lee KR. Triterpenes from *perilla frutescens* var. *acuta* and their cytotoxic activity. *Nat Prod Sci*. 2014; 20 (2): 71-75. doi:http://dx.doi.org/
76. Taniguchi S, Imayoshi Y, Kobayashi E, et al. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry*. 2002; 59 (3): 315-323. doi:10.1016/S0031-9422(01)00455-1



77. Zucaro Z. YL, Compagnone RS, Hess SC, Monache FD. 6beta-hydroxymaslinic acid, a triterpene from *Vochysia ferruginea*. *J Braz Chem Soc.* 2000; 11 (3): 241-244. doi:10.1590/S0103-50532000000300007

## 11. ANEXOS

### 11.1. Anexo 1.

**Tabla 7.** Formulación de la crema empleada como vehículo en el ensayo *in vivo* sobre la cepa de *L. mexicana*.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Aceite mineral ligero	<b>35 g</b>
Cera de abeja	<b>12 g</b>
Miristato de isopropilo	<b>10 g</b>
Parafina	<b>5 g</b>
Lanolina	<b>1 g</b>
Propilparabeno	<b>0.2 g</b>
Agua destilada	<b>35.7 g</b>
Bórax	<b>1 g</b>
Metilparabeno	<b>0.2 g</b>
Vitamina E	<b>0.2 g</b>



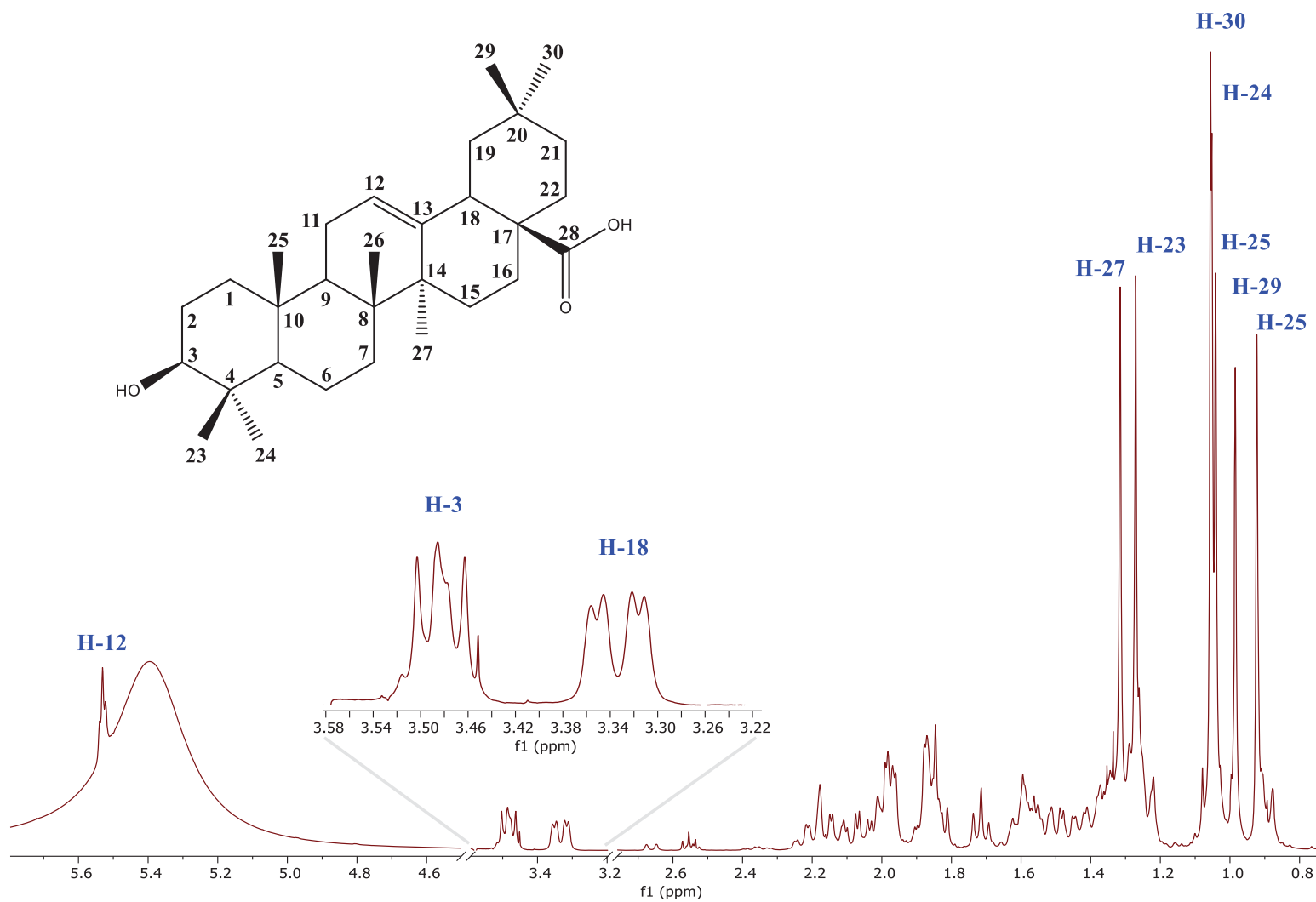
**11.2. Anexo 2.**

Figura 15. Espectro RMN- $^1\text{H}$  del ácido oleanólico (PINCO01), piridina- $d_5$ , 400 MHz.

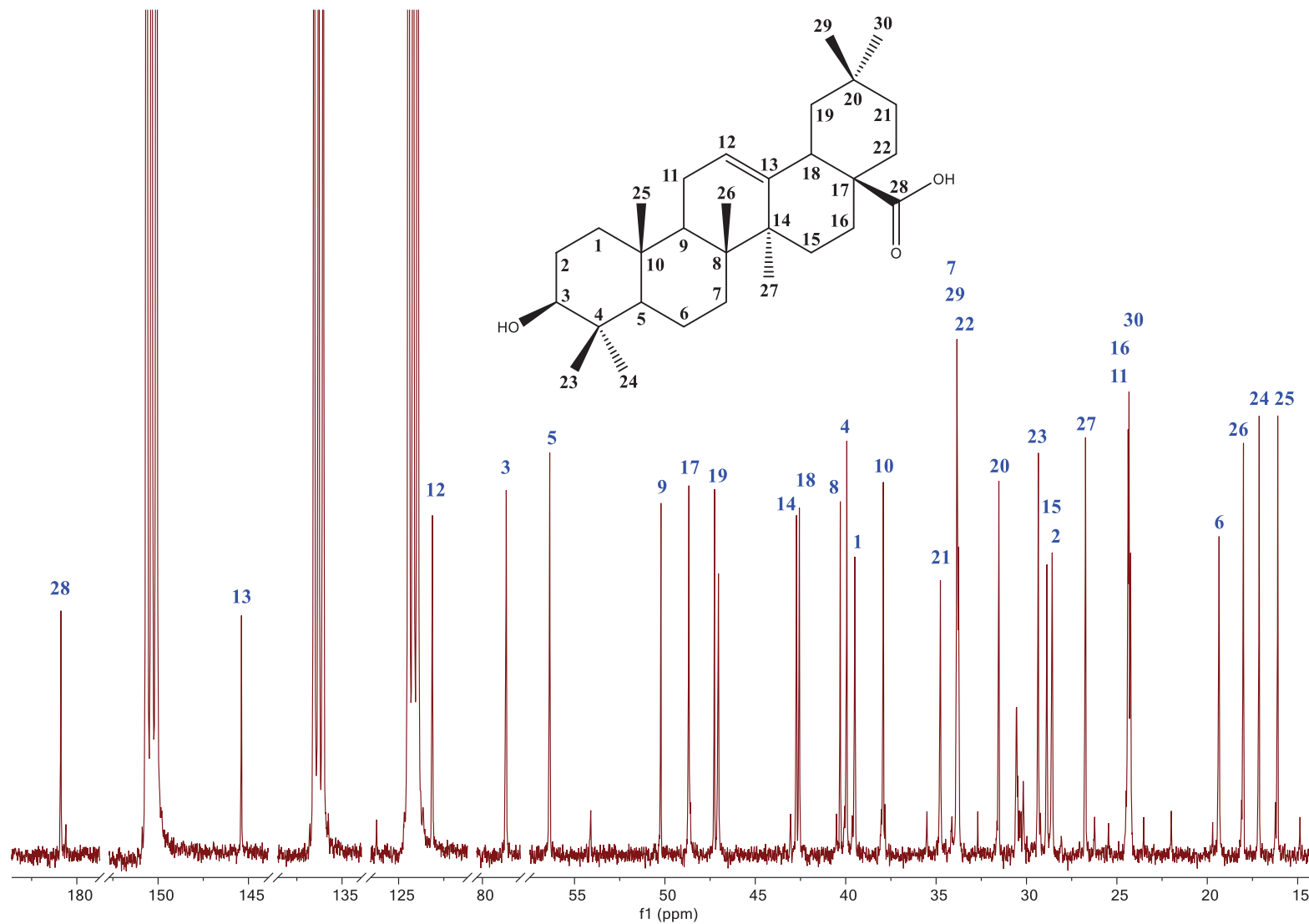
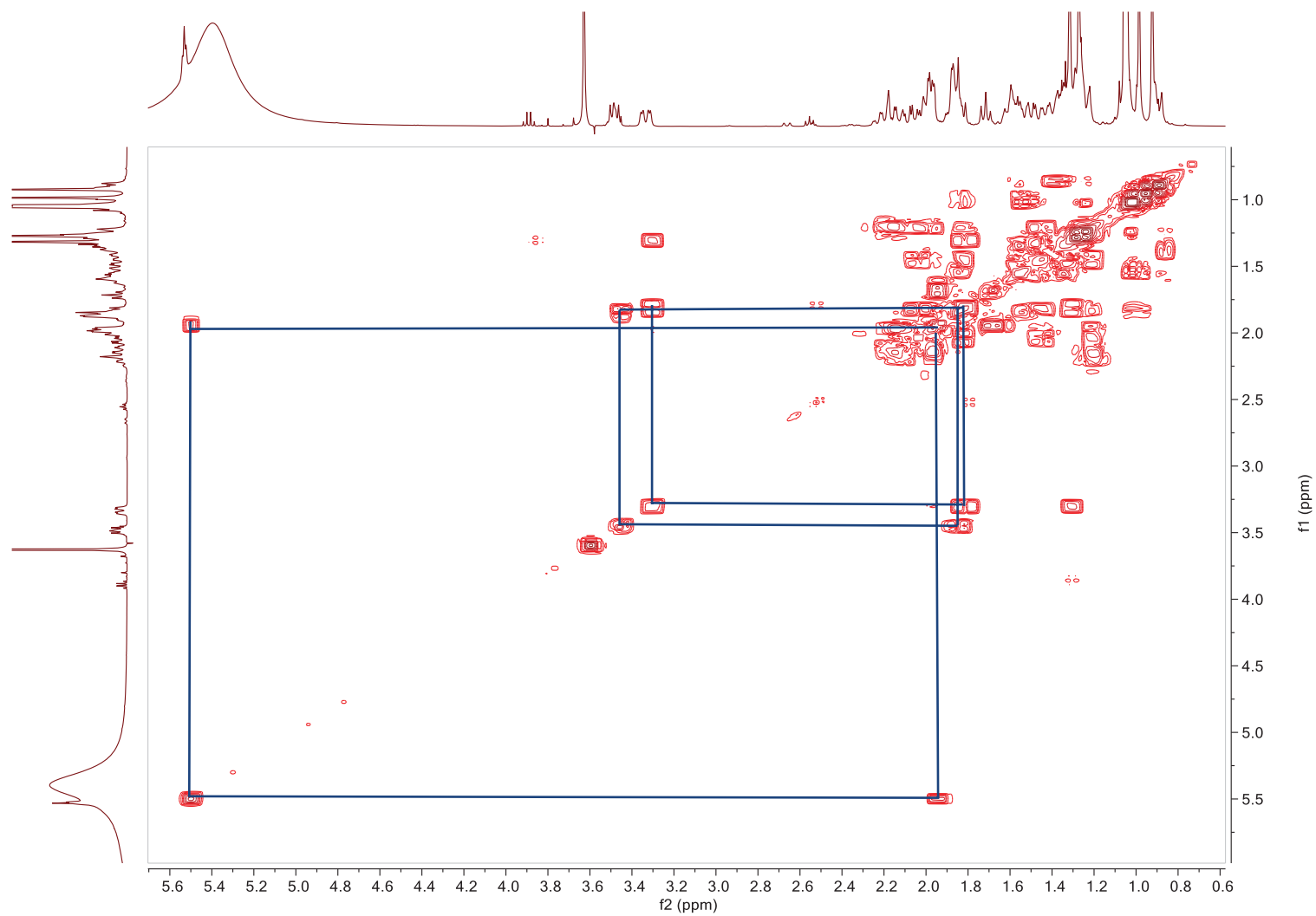
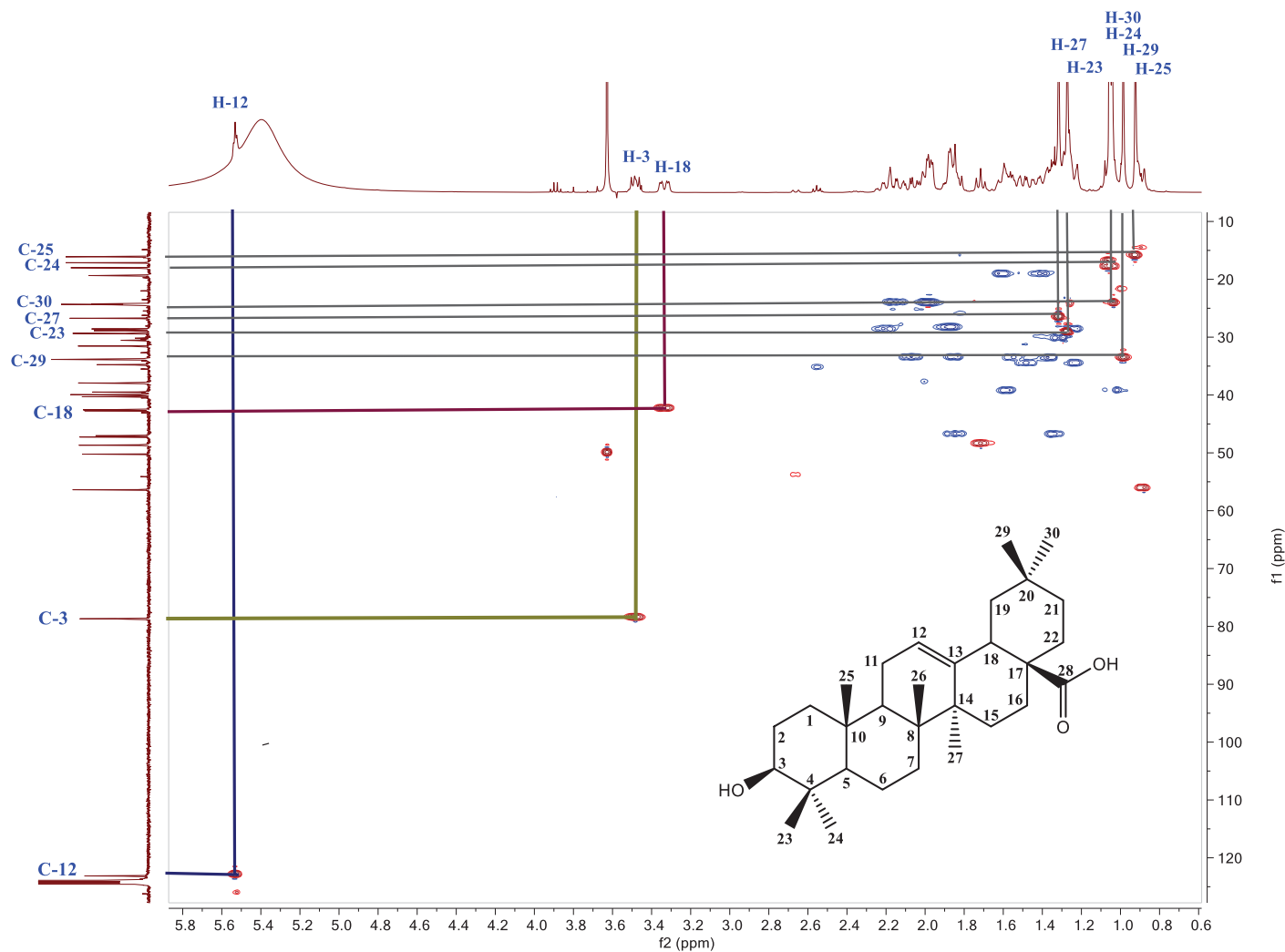


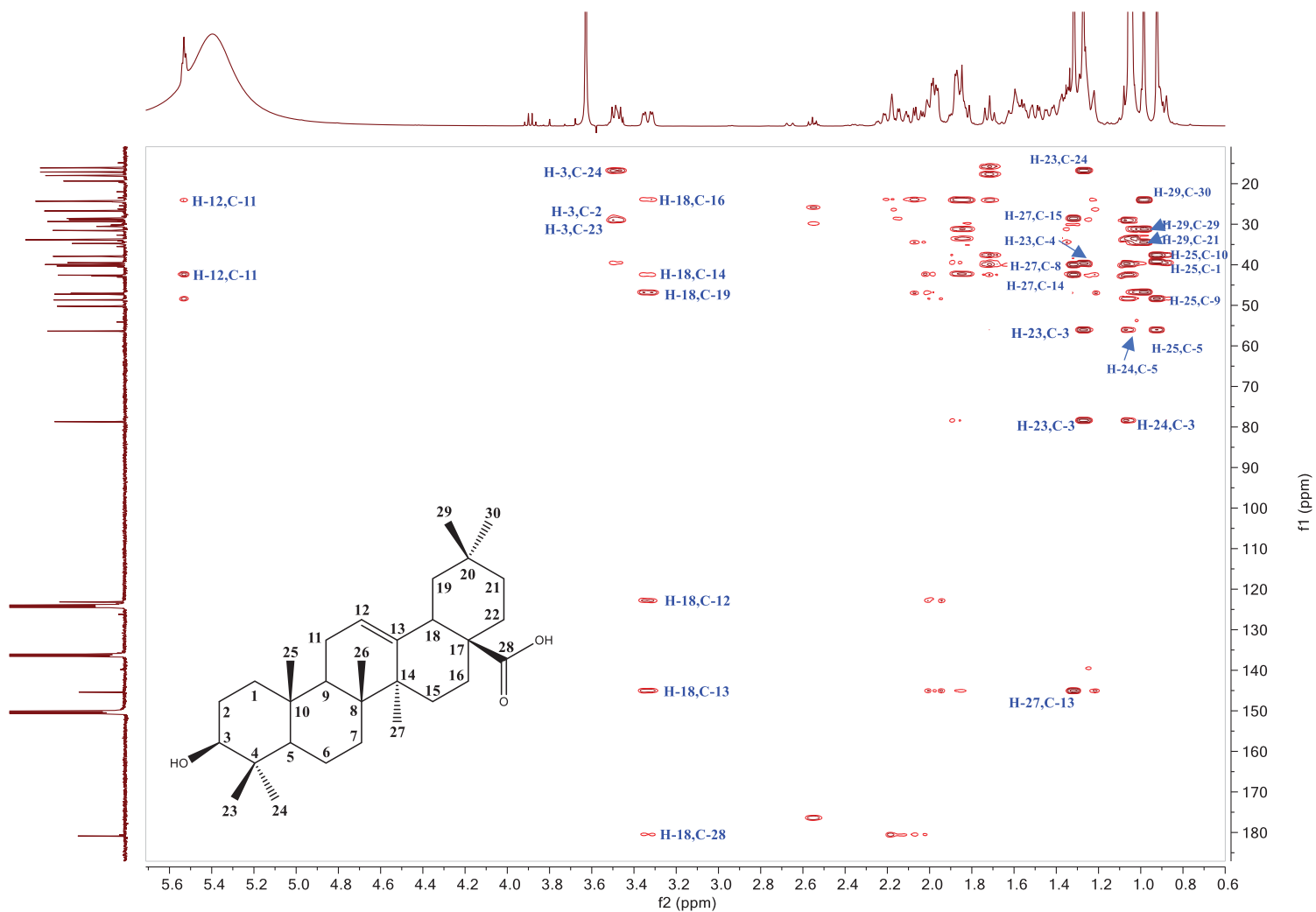
Figura 16. Espectro RMN-<sup>13</sup>C del ácido oleanólico (PINC001), piridina-d<sub>5</sub>, 100 MHz.



**Figura 17.** Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY del ácido oleanólico (PINCO01), piridina- $d_5$ , 400 MHz.



**Figura 18.** Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento HSQC del ácido oleanólico (PINCO01), piridina-*d*<sub>5</sub>, 400 MHz.



**Figura 19.** Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento HMBC del ácido oleanólico (PINCO01), piridina-*d*<sub>5</sub>, 400 MHz.

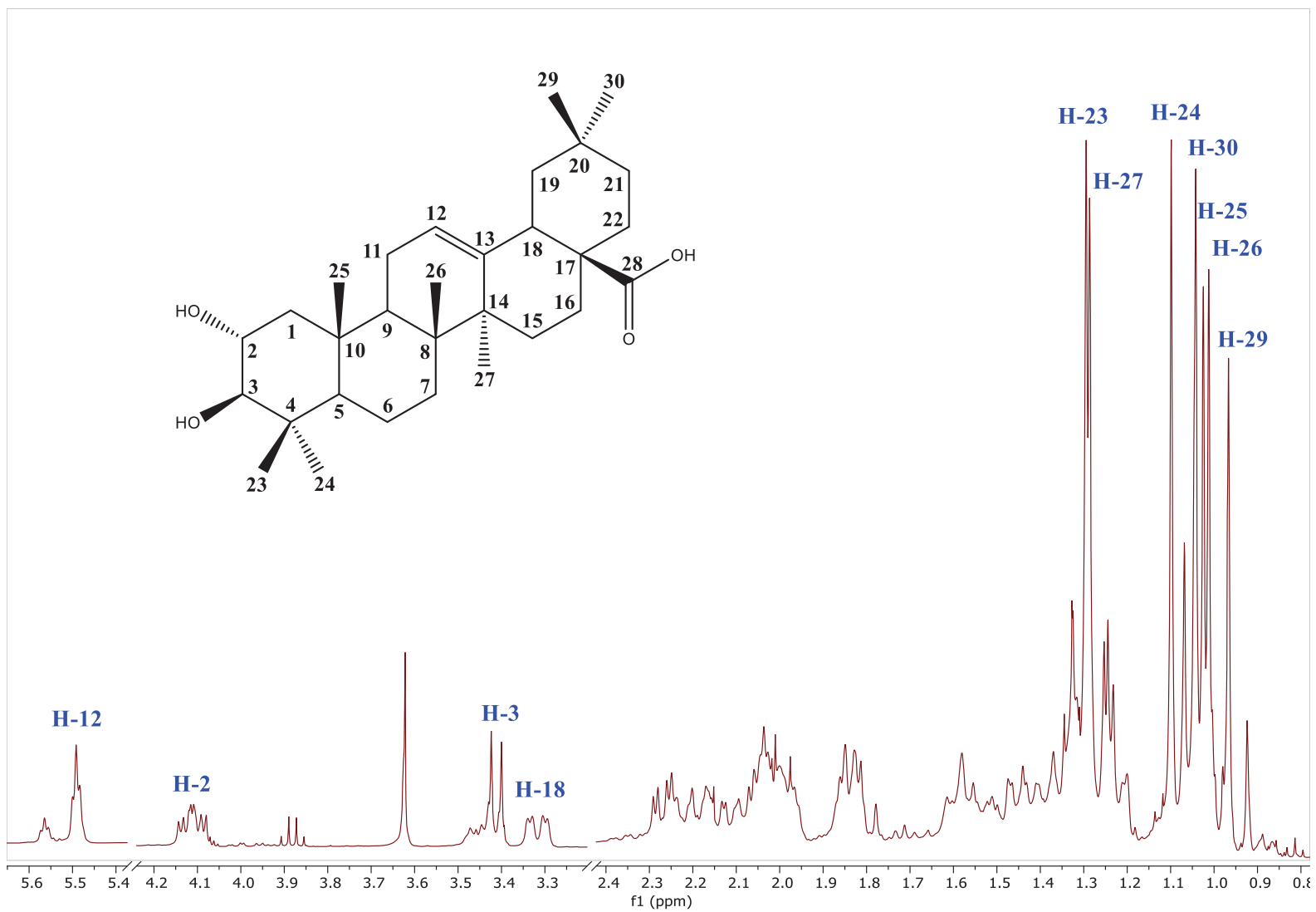


Figura 20. Espectro RMN- $^1\text{H}$  del ácido maslínico (PINC002), piridina- $d_5$ , 400 MHz.

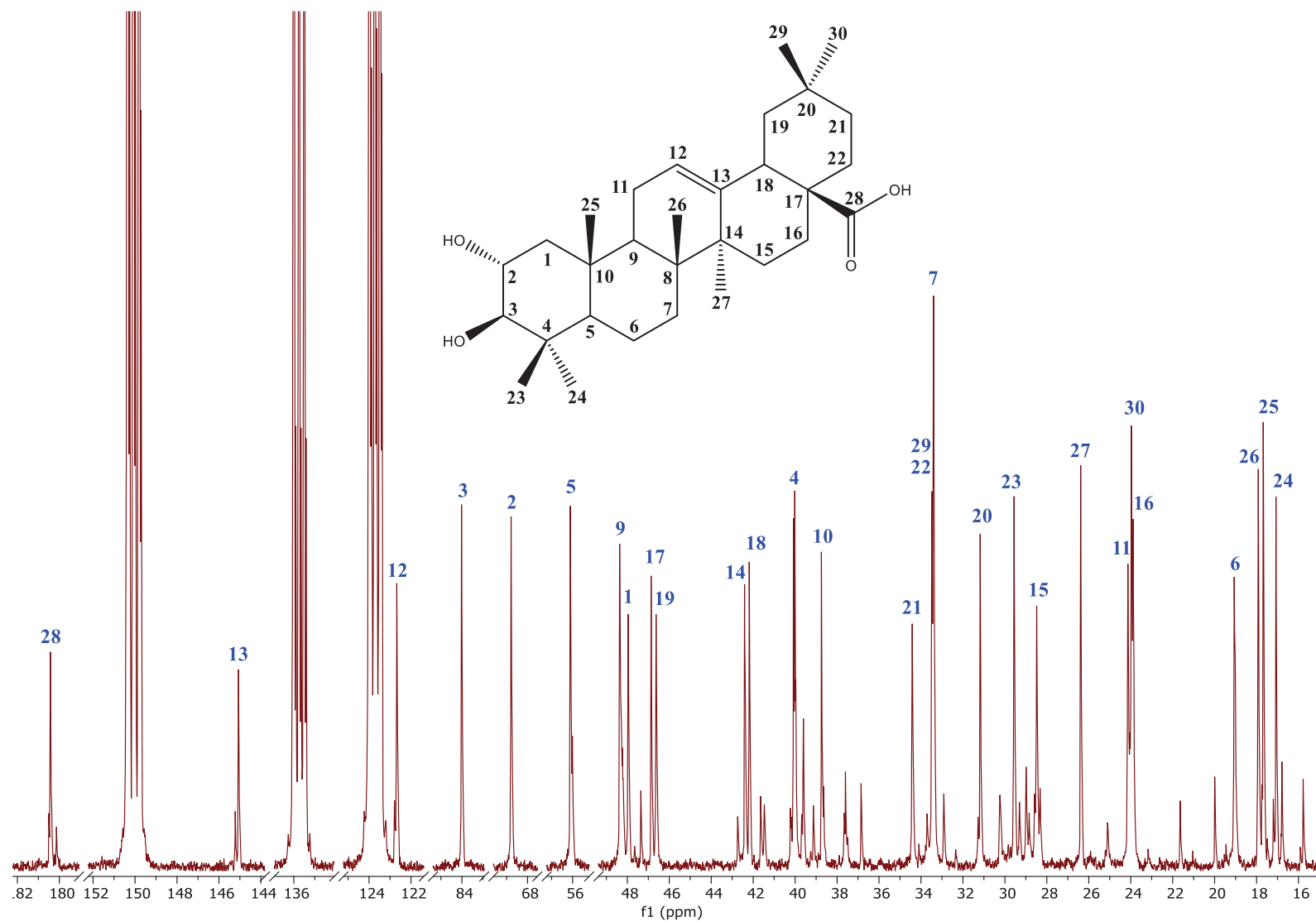
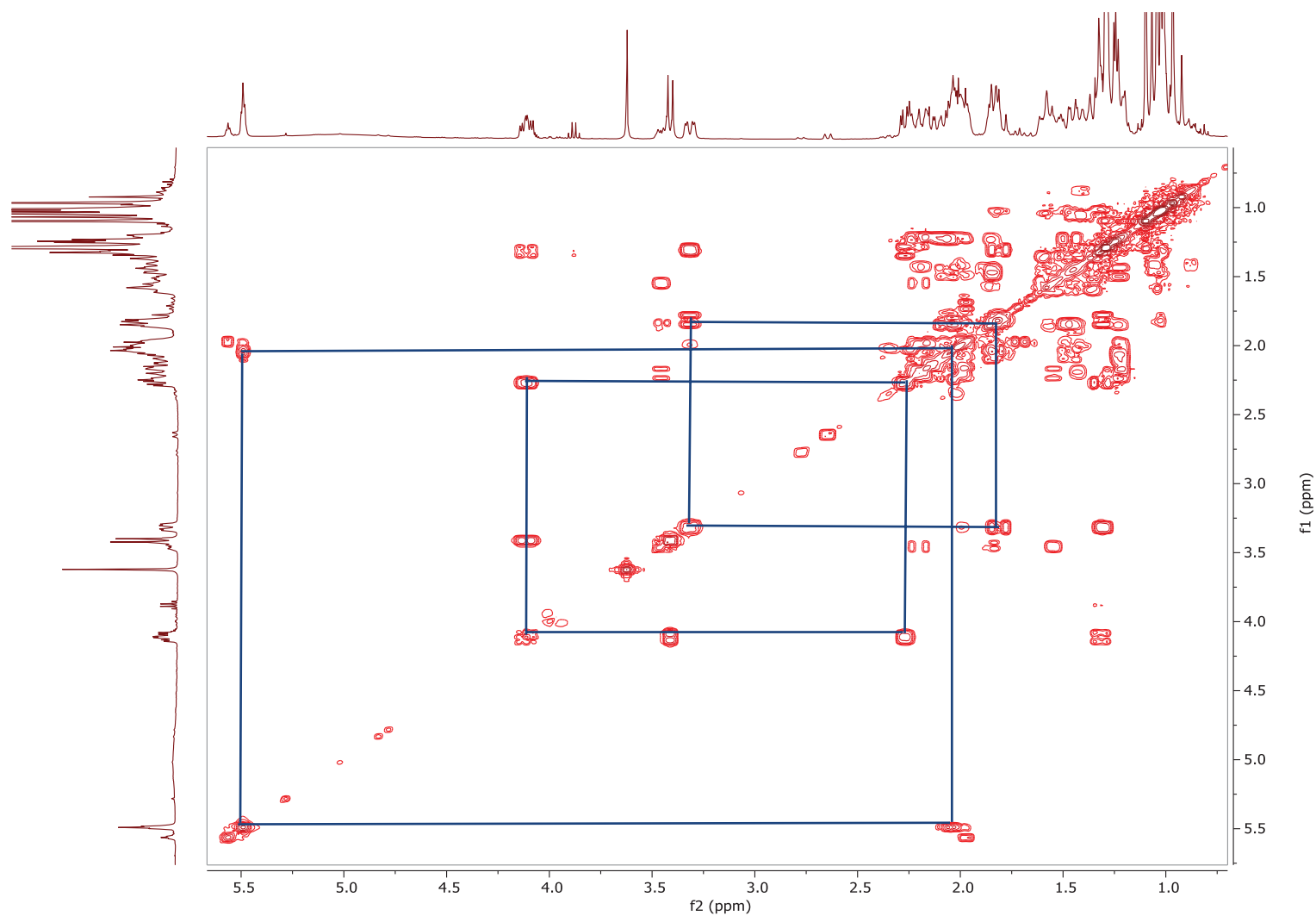
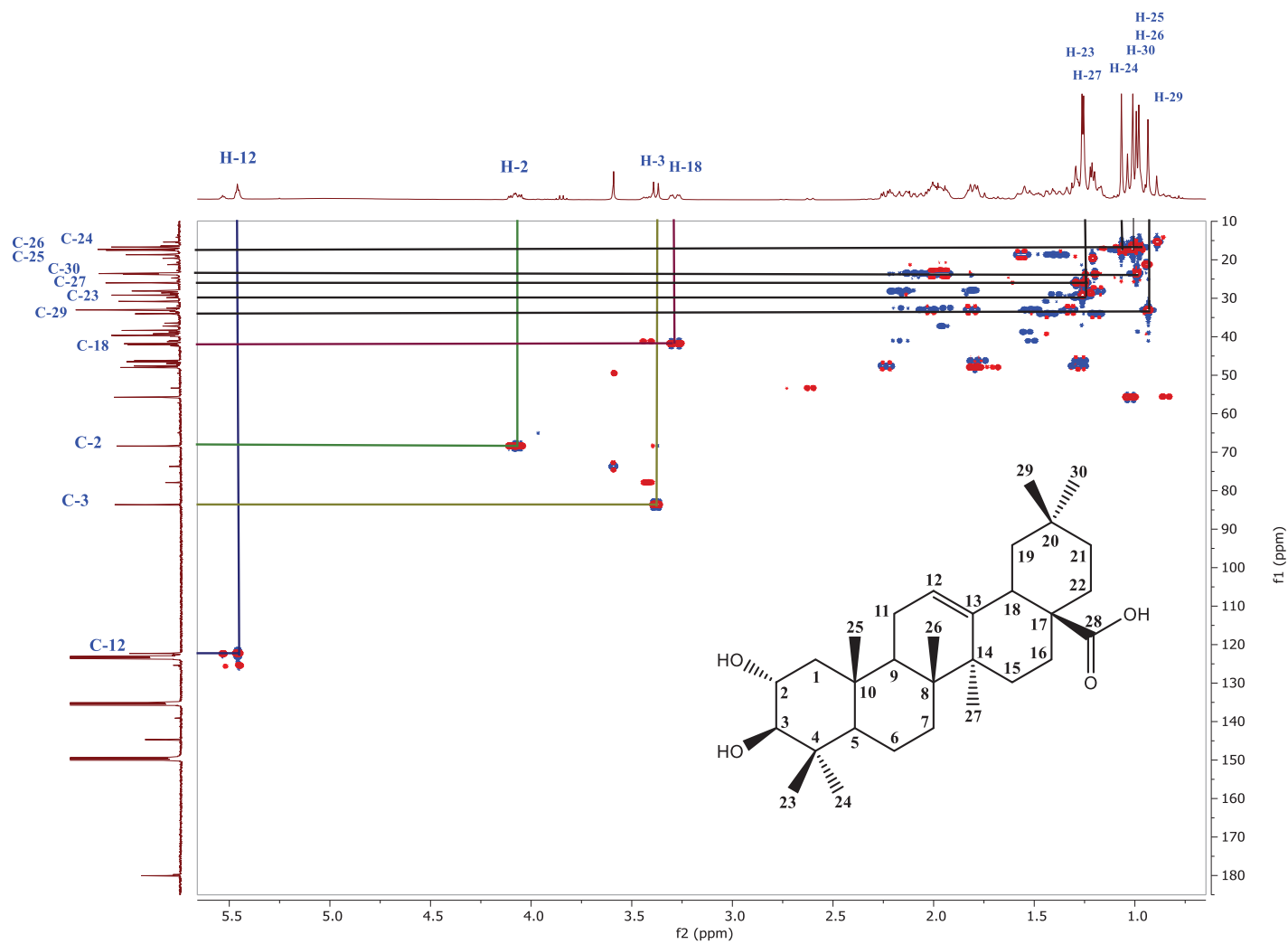


Figura 21. Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  del ácido maslínico (PINCO02), piridina- $d_5$ , 100 MHz.

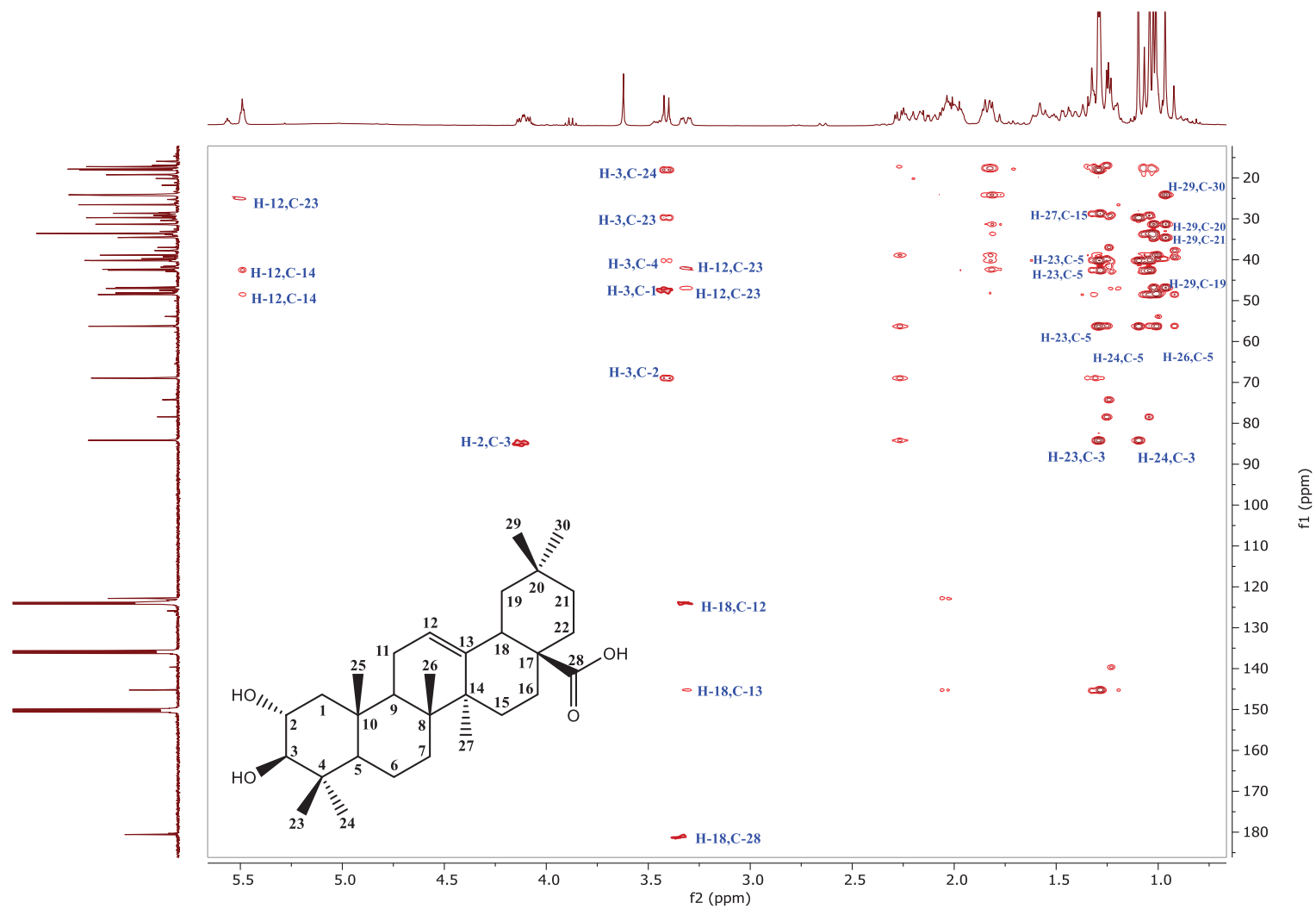


**Figura 22.** Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY del ácido maslínico (PINCO02), piridina- $d_5$ , 400 MHz.





**Figura 23.** Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento HSQC del ácido maslínico (PINC002), piridina- $d_5$ , 400 MHz.



**Figura 24.** Espectro y correlaciones más relevantes en el experimento HMBC del ácido maslínico (PINC002), piridina- $d_5$ , 400 MHz