

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN  
TOXICOLÓGICA Y ANTIMICOBACTERIANA DE  
ÁCIDO URSÓLICO Y ÁCIDO OLEANÓLICO.**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS**  
**P R E S E N T A**  
**M. en C. JORGE CORNEJO GARRIDO**

**DIRECTORES:**

**DRA: MARÍA ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES**  
**DR: GERMÁN ALBERTO CHAMORRO CEVALLOS**



**MÉXICO D.F**

**2012**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 12:00 horas del día 11 del mes de Enero del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB para examinar la tesis titulada:

“Aislamiento, identificación y evaluación toxicológica y antimicobacteriana de ácido ursólico y ácido oleanólico”

Presentada por el alumno:

Cornejo  
Apellido paterno

Garrido  
Apellido materno

Jorge  
Nombre(s)

Con registro:

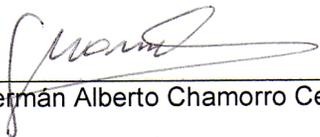
A	0	8	0	2	2	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: Doctorado

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

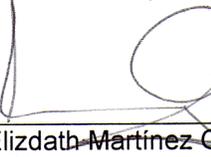
Directores de tesis

  
Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos

  
Dra. María Adalina Jiménez Arellanes

  
Dr. Luis Gerardo Zepeda Vallejo

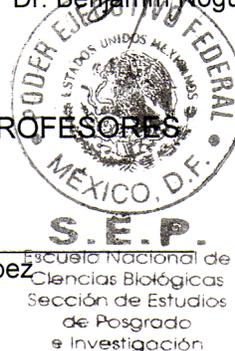
  
Dra. Leticia Garduño Siciliano

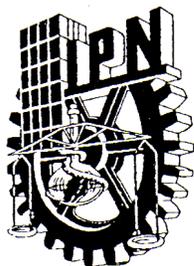
  
Dra. Elizdath Martínez Galero

  
Dr. Benjamín Noguera Torres

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. Manuel Jesús Piñón López





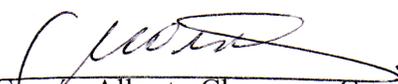
**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F., el día 11 del mes de Enero del año 2012, el (la) que suscribe alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro A080224, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos y la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes, ceden los derechos del trabajo intitulado “Aislamiento, identificación y evaluación toxicológica y antimicobacteriana de ácido ursólico y ácido oleanólico”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección gchamcev@yahoo.com.mx ó adelinajim08@prodigy.net.mx Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
M. en C. Jorge Cornejo Garrido  
Nombre y firma del alumno

  
Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos  
Nombre y firma del (los) director (es)

  
Dra. María Adelina Jiménez Arellanes  
Nombre y firma del (los) director (es)



January 10, 2012

**Dr.**  
German Chamorro  
Laboratorio de Toxicología Preclínica  
Departamento de Farmacia  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Instituto Politécnico Nacional  
México DF  
**México**

With reference of your article received on November 23, 2011, entitled: “**Acute and subacute toxicity (28 days) of a mixture of ursolic acid and oleanolic acid from Bouvardia ternifolia in mice**” (BLACPMA number 426), of authors: **Jorge Cornejo Garrido, German Chamorro Cevallos, Leticia Garduño Siciliano, Rogelio Hernandez Pando, María Jimenéz Arellanes.** Was accepted on date January 5, 2012 with only revision of English language.

Use only communication with BLACPMA e-mail [editor.blacpma@usach.cl](mailto:editor.blacpma@usach.cl)

On behalf of the Editorial Board of BLACPMA yours

Sincerely

José L. Martínez  
Editor in Chief  
BLACPMA  
[www.blacpma.usach.cl](http://www.blacpma.usach.cl)

# Acute and subacute toxicity (28 days) of a mixture of ursolic acid and oleanolic acid obtained from *Bouvardia ternifolia* in mice

[Toxicidad aguda y subaguda (28 días) en ratones, de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico obtenida de *Bouvardia ternifolia*]

Jorge CORNEJO GARRIDO<sup>1</sup>, Germán Alberto CHAMORRO CEVALLOS<sup>2</sup>, Leticia GARDUÑO SICILIANO<sup>2</sup>, Rogelio HERNÁNDEZ PANDO<sup>3</sup>, María Adelina JIMENEZ ARELLANES<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales (UIMFPN), Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720 México, D.F., México

<sup>2</sup>Laboratorio de Toxicología Preclínica, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. Wilfrido Massieu s/n, Col. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, 07738, México, D.F., México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Vasco De Quiroga No. 15, Col. Sección XVI, 14000, México, D.F., México.

## Abstract

Ursolic acid (UA) and oleanolic acid (OA) are triterpenes that are found in a large number of medicinal plants, one of which is the species *Bouvardia ternifolia*. These compounds have been shown to have around 120 types of biological activity, especially the hepatoprotective, anti-inflammatory and antimycobacterial effects. Despite having a high therapeutic potential, not much information concerning their toxicity is available. This article describes the results of acute and subacute (28 days) toxicity evaluations in Balb/c mice (both sexes) treated with the mixture of UA/OA obtained from *B. ternifolia* at doses of 6.5 and 13 mg/kg. The LD<sub>50</sub> was >300 mg/kg. During the subacute application, there was no death of animals and no changes were observed in the growth or weight of the different organs when compared to the control groups. Studies of blood chemistry and blood count showed normal levels in all parameters evaluated. The histopathology of major organs showed no changes or abnormalities. The mixture UA/OA is indeed safe when administered subcutaneously as a single dose of 300 mg/kg or in repeated doses of 13 mg/kg during 28 days.

**Keywords:** Ursolic Acid; Oleanolic Acid; Acute Toxicity; Subacute Toxicity; *Bouvardia ternifolia*.

## Resumen

Los ácidos ursólico (UA) y oleanólico (OA) son triterpenos que se encuentran distribuidos en un gran número de plantas medicinales, una de ellas es la especie *Bouvardia ternifolia*. Estos compuestos han mostrado alrededor de 120 actividades biológicas, destacando los efectos hepatoprotector, antiinflamatorio y antimicobacteriano. A pesar de ser compuestos con un alto potencial terapéutico, no se han documentado muchos datos acerca de su toxicidad. En este artículo se describen los resultados de la evaluación de toxicidad aguda y subaguda (28 días) en ratones Balb/c de ambos sexos, tratados con la mezcla de AU/AO obtenida de *B. ternifolia* a dosis de 6.5 y 13 mg/kg. La DL<sub>50</sub> fue > 300 mg/kg. Durante el esquema de administración subaguda, no hubo muerte de animales, tampoco se observaron alteraciones en su crecimiento ni alteraciones en el peso de los diferentes órganos. Los estudios de biometría hemática y química sanguínea mostraron niveles normales en todos los parámetros evaluados. Los análisis histopatológicos de los principales órganos no presentaron cambios o

## AGRADECIMIENTOS

- Al Fondo de Investigación en Salud (FIS) del IMSS por el financiamiento otorgado a través del proyecto FIS/IMSS/PROT/112 con clave ante la CNIC 2006-785-009.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto 48339-M por el financiamiento otorgado para el desarrollo del presente trabajo.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (número de becario 175792), para realizar los estudios de posgrado.
- A la Coordinación de Investigación en salud del IMSS por la beca otorgada (matrícula 99092361).
- Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por la beca alimentaria otorgada.
- A la Dra. Adelina Jiménez Arellanes por la dirección de este proyecto de tesis, por todo el apoyo, asesoría, observaciones y sugerencias; por toda la confianza que en mí ha depositado, por ser tan paciente conmigo y por ser el pilar más importante en mi formación profesional.
- Al Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos por la dirección, apoyo y sugerencias en el desarrollo de este trabajo.
- Un agradecimiento muy especial al Dr. Rogelio Hernández Pando, jefe de la sección de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por su valioso apoyo y asesoría en la realización de los estudios *in vivo* encaminados a determinar el efecto antituberculoso de los compuestos, sin los cuales el desarrollo de este proyecto hubiera sido imposible.
- A los Doctores: Héctor Orozco, Diana Aguilar, Dulce Mata, Jorge Barrios y Brenda Marquina, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, por toda su ayuda y enseñanzas en el modelo de tuberculosis progresiva.
- A la Dra. Leticia Garduño Siciliano del Laboratorio de Toxicología Preclínica de la ENCB del IPN, por su disposición y colaboración en todo momento.
- A la Dra. Mariana Meckes Fischer por ser siempre un ejemplo de superación y por todos los consejos que me ha dado. Gracias a su idea se tiene este trabajo.

- A los miembros del comité tutorial:

Dra. Elizdath Martínez Galero  
Dra. Leticia Garduño Siciliano  
Dr. Luis Gerardo Zepeda Vallejo  
Dr. Benjamín Nogueta Torres

Por todas las observaciones, sugerencias y comentarios al presente trabajo que permitieron enriquecerlo, así como por su valioso tiempo invertido en la revisión del escrito.

- A todos los compañeros de las diferentes unidades de investigación con los que compartí momentos de trabajo, gracias por brindarme su amistad:  
Rosalba León, Edgar Vergara, Camilo Molina, Benjamín Paiki, Cesar, Lalo, Karen, Zyanya, Mónica, Edgar, Nesty, Yadira, Nayeli, Jovani y Cristina.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Hilda Garrido Hernández y Manuel Cornejo Rubio por su apoyo incondicional y por ser un gran ejemplo de disciplina y superación.

A mis hermanos, Víctor, Verónica, Hilda, Fernando, Manuel y Miguel, por siempre estar a mi lado.

A todos mis amigos por todos los momentos de alegría y por estar presentes siempre que los he necesitado.

A la Dra. Adelina Jiménez Arellanes porque mucho de lo que tengo se lo debo a usted, muchas gracias.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE ESPÉCTROS.....	III
ÍNDICE DE ESTRUCTURAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
<i>1.1 Tuberculosis.....</i>	1
<i>1.2 Patogénesis de la tuberculosis.....</i>	4
<i>1.3 Tratamiento.....</i>	6
<i>1.4 Estrategias para el control de la TB.....</i>	8
<i>1.5 Importancia de la evaluaciones preclínicas es el desarrollo de nuevos fármacos</i>	9
<i>1.6 Desarrollo de fármacos para el tratamiento de la TB.....</i>	11
<i>1.7 Modelo murino de infección con tuberculosis progresiva.....</i>	13
<i>1.8 Ácido ursólico y ácido oleanólico.....</i>	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
<i>4.1 Objetivo general.....</i>	24
<i>4.2 Objetivos específicos.....</i>	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
<i>5.1 Procedimientos generales.....</i>	25
<i>5.2 Material vegetal.....</i>	26
<i>5.3 Extracción y aislamiento.....</i>	26

<b>5.4 Estudios de toxicidad aguda y subaguda en ratones BALB/c.....</b>	<b>27</b>
<b>5.4.1 Toxicidad aguda (Dosis letal media DL<sub>50</sub>).....</b>	<b>27</b>
<b>5.4.2 Toxicidad subaguda (Dosis repetida por 28 días).....</b>	<b>28</b>
<b>5.4.3 Estudio histopatológico.....</b>	<b>28</b>
<b>5.5 Modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c.....</b>	<b>29</b>
<b>5.5.1 Determinación de unidades formadoras de colonias en pulmones infectados.....</b>	<b>31</b>
<b>5.5.2 Estudio histológico-morfométrico.....</b>	<b>31</b>
<b>5.5.3 Análisis de la expresión de INF-<math>\gamma</math>, iNOs, y TNF-<math>\alpha</math> por RT-PCR en tiempo real en pulmones infectados.....</b>	<b>31</b>
<b>5.6 Análisis estadístico.....</b>	<b>34</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>6.1 Extracción y aislamiento.....</b>	<b>35</b>
<b>6.2 Toxicidad aguda (Dosis letal media DL<sub>50</sub>).....</b>	<b>36</b>
<b>6.3 Toxicidad subaguda (Dosis repetida por 28 días).....</b>	<b>37</b>
<b>6.3.1 Estudio histopatológico.....</b>	<b>41</b>
<b>6.4 Modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c.....</b>	<b>45</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>58</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>10. ANEXO.....</b>	<b>67</b>
<b>11. ARTÍCULO.....</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Peso de ratones BALB/c en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla de AU/AO.	37
<b>Tabla 2.</b> Peso de diferentes órganos en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla de AU/AO.	37
<b>Tabla 3.</b> Valores hematológicos de ratones BALB/c en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla de AU/AO.	38
<b>Tabla 4.</b> Cuenta diferencial de células blancas de ratones BALB/c en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla de AU/AO.	39
<b>Tabla 5.</b> Valores de química sanguínea de ratones BALB/c en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla de AU/AO.	41

## ÍNDICE DE ESPECTROS

<b>Espectro 1.</b> Resonancia magnética nuclear protónica (RMN- <sup>1</sup> H) de la mezcla de referencia de AU/AO 1:1 (SIGMA).	66
<b>Espectro 2.</b> Resonancia magnética nuclear protónica (RMN- <sup>1</sup> H) de la mezcla de AU/AO 2:1 obtenidos de <i>B. ternifolia</i> .	66
<b>Espectro 3.</b> Espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE) de la mezcla de referencia AU/AO 1:1 (SIGMA).	67
<b>Espectro 4.</b> Espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE) de la mezcla de AU/AO 2:1 ( <i>B. ternifolia</i> ).	67

## ÍNDICE DE ESTRUCTURAS

(1) Ácido ursólico	35
(2) Ácido oleanólico	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cromatogramas comparativos de la mezcla de AU/AO de marca SIGMA y obtenido a partir de <i>B. ternifolia</i> por CLAR.	35
<b>Figura 2.</b> Cortes histológicos de diferentes tejidos de ratones BALB/c en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla AU/AO.	43
<b>Figura 3.</b> Carga bacilar (UFC) en pulmones de ratones BALB/c infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO en combinación con antibióticos convencionales.	46
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de neumonía en pulmones de ratones BALB/c infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO en combinación con antibióticos convencionales.	47
<b>Figura 5.</b> Carga bacilar (UFC) en pulmones de ratones BALB/c infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO.	48
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de neumonía en pulmones de ratones BALB/c infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO.	49
<b>Figura 7.</b> Carga bacilar (UFC) en pulmones de ratones BALB/c infectados con <i>M. tuberculosis</i> MDR tratados con la mezcla de AU/AO.	50
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de neumonía en pulmones de ratones BALB/c infectados con <i>M. tuberculosis</i> MDR tratados con la mezcla de AU/AO.	50
<b>Figura 9.</b> Expresión de citocinas en pulmones de ratones BALB/c infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO en combinación con antibióticos convencionales.	52
<b>Figura 10.</b> Expresión de citocinas en pulmones de ratones BALB/c infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO.	53
<b>Figura 11.</b> Expresión de citocinas en pulmones de ratones BALB/c infectados con <i>M. tuberculosis</i> MDR tratados con la mezcla de AU/AO.	54

## RESUMEN

La tuberculosis (TB) es un grave problema de salud mundial que provoca alrededor de 3 millones de muertes anualmente. Este panorama es cada vez más dramático debido a la rápida aparición de cepas multifarmacorresistentes (MFR) y con farmacorresistencia extendida (XFR) que dificultan su tratamiento. Estos problemas han motivado la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento antituberculoso. Una estrategia potencial es el aislamiento de fármacos a partir de plantas medicinales. Un nuevo compuesto anti-TB debe reducir o simplificar los tratamientos actuales, debe tener actividad contra cepas MFR y XFR y debe tener un perfil toxicológico aceptable para garantizar que el tratamiento no esté limitado por efectos adversos.

En este proyecto se aisló la mezcla de dos triterpenos, el ácido ursólico (AU) y el ácido oleanólico (AO) a partir de las partes aéreas de *Bouvardia ternifolia*; ambos compuestos han presentado una importante actividad antimicobacteriana *in vitro*, por lo que el objetivo de esta tesis fue evaluar la actividad antituberculosa en un modelo murino de TB progresiva, induciendo la enfermedad con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y con una cepa de *M. tuberculosis* MFR, además de evaluar sus efectos tóxicos en esquemas de administración aguda y subaguda en ratones BALB/c.

La evaluación toxicológica se realizó bajo los protocolos TG 423 (toxicidad aguda) y TG407 (toxicidad subaguda) de la OECD y la evaluación de la actividad antituberculosa se determinó mediante la cuantificación de las unidades formadoras de colonias, la superficie de pulmón afectada por neumonía y la expresión génica de INF- $\gamma$ , iNOs y TNF- $\alpha$ .

La mezcla de AU/AO es prácticamente inocua al ser evaluada por vía s.c. en esquemas de administración aguda ( $DL_{50} > 300$  mg/kg) y en esquemas de administración subaguda (13 mg/kg por 28 días) en ratones de la cepa BALB/c, ya que no alteró ninguno de los parámetros de biometría hemática, ni de química sanguínea, tampoco se observó alteración en los cortes histológicos de hígado, riñón, entre otros.

En el modelo de TB pulmonar induciendo la enfermedad con *M. tuberculosis* H37Rv no se observó una reducción significativa sobre la carga bacilar pero se observa una reducción en la superficie pulmonar afectada por neumonía y además observo que la

mezcla de compuestos indujo una mayor expresión de iNOS, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , por lo que es posible que el tratamiento combinado de antibióticos con la mezcla de AU/AO pueda tener mejor efecto en los casos de TB, ya que los esquemas de tratamiento actuales se basa solo en la administración de antibióticos y la tendencia actual es emplear sustancias que coadyuven al tratamiento y en este caso, los triterpenos no muestran un efecto bactericida significativo pero reducen en forma significativa la neumonía.

En la evaluación de la mezcla de triterpenos en el modelo de TB inducido con una cepa MFR se encontró que también el efecto de estos compuestos es sobre la reducción de la neumonía más que sobre la reducción de la carga bacilar. Cabe aclarar que aunque la reducción de la carga bacilar es mínima en ambos casos debe considerarse como buena ya que solo se está tomando en cuenta el efecto de estos dos compuestos (AU/AO) y en el tratamiento de la TB se emplea la mezcla de 4 fármacos.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a serious worldwide health problem that causes ca. 3 million deaths annually. The panorama has become even more dramatic due to the rapid appearance of multi-drug resistant (MDR) and extensively drug-resistance (XDR) strains, which render its treatment difficult. These problems have motivated the search for novel treatment alternatives. One potential strategy is the isolation of drugs from medicinal plants. A new anti-TB compound should reduce or simplify current treatments, should possess activity against MDR and XDR strains, and should possess an acceptable toxicological profile to guarantee that the treatment is not limited by side effects.

In this project, we isolated the mixture of two triterpenes, ursolic acid and oleanolic acid, from the aerial parts of *Bouvardia ternifolia*; both compounds have presented important antimycobacterial activity *in vitro*. Thus, the objective of this thesis was to evaluate antitubercular activity in a murine model of progressive TB, inducing disease with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and with an MDR strain of *M. tuberculosis*, in addition to evaluating its toxic effects in acute and subacute administration schemes in BALB/c mice. The toxicological evaluation was carried out under the TG 423 (acute toxicity) and TG407 (subacute toxicity) protocols of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Evaluation of antituberculous activity was determined by quantification of Colony forming units (CFU), the lung surface affected by the pneumonia, and the genetic expression of INF- $\gamma$ , iNOS, and TNF- $\alpha$ .

The mixture of UA/OA is practically innocuous on evaluation by subcutaneous (s.c.) route in acute ( $DL_{50} > 300$  mg/kg) and in subacute administration schemes (13 mg/kg for 28 days) in BALB/c-strain mice, because no alteration was observed in blood-test nor in blood-chemistry parameters; we also observed no alteration in the histological slides of liver, kidney, spleen, among others.

In the pulmonary TB disease-inducing model with *M. tuberculosis* H37Rv, no significant reduction was observed in terms of bacillary burden, a reduction was observed of the pneumonia-affected lung surface, in addition to the observation that the mixture of compounds induced greater expression of iNOS, INF- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ ; thus, it is possible that the combined treatment of antibiotics with the UA/OA mixture can exert a greater

effect on cases of TB, since current treatment schemes are based solely on the administration of antibiotics, and the present-day trend is to employ co-adjuvant treatment substances and in this case, the triterpenes do not show a significant bactericidal effect but do reduce the pneumonia in a significant manner.

In the evaluation of the triterpene mixture in the TB model induced with a MDR strain, we also found that the effect of these compounds is exerted on the reduction of the pneumonia more than on the reduction of the bacillary burden. It must be clarified that although bacillary burden reduction is minimal in both cases, it should be considered as good, because it only takes into account the effect of these two compounds (UA/OA) and in the treatment of TB, the mixture of four drugs is employed.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza	IL	Interleucina
AO	Ácido Oleanólico	iNOS	Oxido Nítrico Sintasa Inducible
AU	Ácido Ursólico	kg	Kilogramo
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio	MABA	Micrométodo Colorimétrico de Alamar Azul
CC	Cromatografía en Columna	MeOH	Metanol
CCF	Cromatografía en Capa Fina	MFR	Multifarmacorresistente
CCL <sub>4</sub>	Tetracloruro de Carbono	mg	Miligramos
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo Deuterado	µg	Microgramos
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo	MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad Tipo II
CHCM	Concentración de Hemoglobina Corpuscular	NF-κB	Factor Nuclear Kappa-B
CL <sub>50</sub>	Concentración Letal Media	OMS	Organización Mundial de la Salud
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	p.f.	Punto de Fusión
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono	RCB	Eritrocitos
DE <sub>50</sub>	Dosis Efectiva Media	RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
DGEPI	Dirección General de Epidemiología	RNA	Ácido Ribonucleico
DI <sub>50</sub>	Dosis Inhibitoria Media	RT	Tiempo de Retención
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal Media	SEM	Error Estándar de la Media
DM	Diabetes Mellitus	sGOT	Transaminasa Glutámico Oxalacética
DMBA	Dimetil Banzo Antraceno	sGPT	Transaminasa Glutámico Pirúvica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
ECB	Buró Químico Europeo	TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
EM-IE	Espectrometría de Masas por impacto Electrónico	TB	Tuberculosis
g	gramo	TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
G3PDH	Glucosa 3-Fosfato Deshidrogenasa	TMS	Tetrametil Silano
GHS	Globally Harmonised Classification System	TNF	Factor de Necrosis Tumoral
GN-CSF	Factor Estimulante de Colonias Granulocito-Macrófago	TR	Tiempo de Retención
GPX	Glutación Peroxidasa	UFC's	Unidades Formadoras de Colonias
H&E	Hematoxilina- Eosina	SIDA	Virus de Inmunodeficiencia Humana
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico	VMC	Volumen corpuscular Medio
Hb	Hemoglobina	WBC	Leucocitos
HDL	Colesterol de Alta Densidad	XFR	Farmacorresistencia Extendida
Hex	Hexano		
Hto	Hematocrito		
IFN-γ	Interferón Gamma		

# 1. INTRODUCCIÓN

## *1.1 Tuberculosis*

La TB es una enfermedad infecto contagiosa provocada por el bacilo *M. tuberculosis*. La TB ha estado presente a lo largo de la historia del hombre, actualmente ha recobrado importancia médica debido a la aparición de casos resistentes a los antibióticos de primera y segunda línea por lo que sigue siendo una causa significativa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, además de que suele ser una enfermedad oportunista en pacientes inmunosuprimidos. Esta enfermedad es más frecuente en países en vías de desarrollo en donde diversos factores juegan un papel importante, como la pobreza, el hacinamiento, la migración, la desnutrición, enfermedades que comprometen al sistema inmunológico como la diabetes mellitus (DM), la artritis reumatoide (AR) y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y el poco acceso a sistemas de salud entre muchos otros factores (Orcau *et al.*, 2011).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la TB ocasiona casi 3 millones de defunciones anuales que corresponden al 3% de las muertes prematuras. En otras palabras, ocasiona más muertes que la DM (1.4%), las anomalías congénitas (1.2%), el Alzheimer (0.5%) y la AR (0.01%) juntas. Aunado a esto, se estima que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada, de los cuales un 5 % llegarán a desarrollar la enfermedad por inmunosupresión (WHO, 2011).

De continuar la tendencia actual para el 2020 habrá 1000 millones de personas infectadas, de las cuales 150 millones podrían desarrollar la enfermedad y 36 millones morirán a causa de ésta (WHO, 2011).

En cuanto a casos nuevos de TB en todo el mundo, en 2010 fue de aproximadamente 9 millones (128 casos por cada 100 000 habitantes), entre ellos 5.7 millones de nuevos casos bacilíferos y 2.1 millones de casos TB/SIDA-positivos. La Región de África es la

de mayor tasa de incidencia. Se estima que hubieron 17 millones de casos prevalentes de esta enfermedad, la cifra estimada de casos de TB multifarmarresistente (MFR) fue de 0.6 millones y la cifra estimada de defunciones fue de 1.7 millones, incluidos 0.3 millones de personas infectadas por el VIH (WHO, 2011).

Este panorama es más dramático debido al incremento de la co-infección TB/SIDA y a la presencia de cepas MFR, lo que complica en gran medida los esquemas de tratamiento, su duración e incrementa el costo de los mismos. En los países en vías de desarrollo estos casos prácticamente son incurables debido a que los fármacos no son totalmente efectivos y a que el diagnóstico de la enfermedad se realiza de manera tardía (Zwolska y Augustynowicz-Kopec, 2011). Debido a este panorama, la OMS estima que si no se introducen medidas para reducir la prevalencia de la TB, cerca de 30 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad en los próximos diez años (WHO, 2011).

En México, se reportaron 20 casos por 100,000 habitantes en el año 2010 (WHO, 2011) pero se debe considerar que en muchos de los casos no se realiza un buen diagnóstico de la enfermedad, por lo que estos datos epidemiológicos podrían ser mucho mayores. De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología (DGEPI) se tuvieron 14.1 y 13.8 casos de TB sensible por cada 100,000 habitantes en 2008 y 2009, respectivamente (CENAVECE, 2011). En cuanto a la TB fármacoresistente (FR) se han reportado 11 y 140 casos totales en los años 2009 y 2010, respectivamente (WHO, 2011). En México el 20% de los casos de TB están asociados con la DM siendo personas con edad  $\geq 35$  años y el sobrepeso los factores de riesgo más importantes, las personas con comorbilidad TB-DM tienen un factor de riesgo 2.8 veces superior de desarrollar resistencia a los medicamentos (Pérez-Navarro *et al.*, 2011).

La forma más común de la TB es la pulmonar (80% de los casos); sin embargo, hasta el 25% de los casos son extrapulmonares y afectan a otros órganos como son: ganglios linfáticos, pleura, aparato genitourinario, huesos y articulaciones, meninges y peritoneo (Harper, 2007). La forma pulmonar se transmite por vía aérea,

cuando el paciente al toser emite partículas de saliva que contienen al bacilo; por lo tanto uno de los factores más importantes para la transmisión de los bacilos tuberculosos es el hacinamiento en espacios mal ventilados (Harper, 2007).

Un paciente con TB pulmonar puede contagiar a 20 personas anualmente y el riesgo de desarrollar la enfermedad activa después de infectarse depende de factores endógenos, como la edad, el estado nutricional, la predisposición natural a la enfermedad, la eficacia funcional de la inmunidad celular del individuo, entre otros (Kaufmann y Parida, 2007). A pesar de todos estos factores, se calcula que solo el 10 % de los individuos infectados desarrollarán TB activa en algún momento de su vida. Las razones para el desarrollo de la enfermedad no han sido claramente definidas. Por otro lado, el 90% de los individuos inmunocompetentes con infección latente, no desarrollarán la enfermedad durante toda su vida (Orcau *et al.*, 2011).

El abandono del tratamiento es uno de los factores que influyen en la prevalencia e incidencia de esta enfermedad, esto se debe principalmente a dos causas: el tiempo de tratamiento con antibióticos (seis meses para los casos sensibles y hasta 24 meses para los casos MFR) y los severos efectos secundarios que provocan los antifímicos actuales, los cuales en ocasiones son más severos que el malestar de la enfermedad en los pacientes. Debido al abandono del tratamiento y a otras causas, las micobacterias han desarrollado resistencia a los antibióticos, provocando la aparición de casos MFR y XFR.

Los casos MFR son resistentes a dos de los fármacos básicos a la rifampicina (R) e izoniazida (I) y el tratamiento para estos es prolongado (hasta 24 meses), complejo, más costoso y pobremente tolerado debido a los efectos adversos severos, lo cual conlleva a un escaso apego al tratamiento. Estos pueden ser primaria o adquirida; siendo la primaria cuando el paciente desarrolla TB sin haber recibido tratamiento alguno (caso nuevo) y la enfermedad es causada por una cepa de *M. tuberculosis* MFR. La MFR secundaria o adquirida es aquella en donde el paciente ha sido tratado o multitratado y los bacilos desarrollan resistencia a uno ó más fármacos anti-TB durante el tratamiento.

El desarrollo de resistencia a los diferentes fármacos se debe a múltiples causas como: tratamientos incompletos e inadecuados (acerca de esto se ha observado que las personas que han sido tratadas previamente contra TB pueden desarrollar la enfermedad MFR con mayor facilidad), baja adherencia a tratamientos (se debe principalmente al gran número de efectos secundarios que provoca el tratamiento), escasa disponibilidad de fármacos de primera línea, co-infección con VIH/SIDA (estas personas padecen de mala absorción gastrointestinal, lo que provoca concentraciones plasmáticas sub-óptimas), predisposición genética de la bacteria y además la propia infección induce la sobre-expresión de transportadores no selectivos que provocan concentraciones de I intracelulares no adecuadas (Sharma y Mohan, 2006).

La TB-XFR apareció en el año 2005 en una provincia de Sudáfrica en personas portadoras de VIH/SIDA principalmente, esta variante es causada por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a I y R (al igual que la TB MFR) y además la micobacteria es resistente a las fluoroquinolonas y al menos uno de los siguientes fármacos inyectables: capreomicina, kanamicina o amikacina. De todos los casos encontrados, el 55% nunca fue tratado previamente contra la infección primaria, lo que significa que adquirieron la enfermedad XFR. Todos los pacientes murieron dentro de un periodo de 16 días, lo que convierte a esta variante de la enfermedad en una verdadera alerta sanitaria. En el año 2006 el Centro Para Prevención y Control de Enfermedades junto con la OMS reportaron la presencia de cepas XFR en al menos 17 países, siendo México uno de estos (Raviglione y Smith, 2007; Zager y McNerney, 2008). No se sabe con exactitud cuántos casos XFR existen, sin embargo se estima que por lo menos un 19% de todos los casos MFR lo son (WHO, 2011).

### ***1.2 Patogénesis de la tuberculosis***

La TB es una enfermedad que se transmite por medio de partículas de aerosol exhaladas por un individuo infectado, debido a que el pulmón es el órgano primario

donde se aloja pero puede infectar otros órganos. La constitución genética así como el estado físico y de salud de las personas influye en la predisposición al desarrollo de la TB, es por eso que algunos individuos pueden eliminar la infección de manera espontánea mientras que otros desarrollan la enfermedad debido a alguna deficiencia en su sistema inmune (Kaufmann y Parida, 2007). El cuadro clínico de la TB es el resultado de la interacción entre los factores de virulencia de *M. tuberculosis* y el sistema inmune del hospedero. En un individuo inmunocompetente que no ha tenido contacto previo con el bacilo, la patogénesis se basa en el desarrollo de inmunidad celular específica que confiere resistencia contra el organismo y como resultado se presenta hipersensibilidad del tejido a los antígenos de la micobacteria. Las características patológicas de la TB, como los granulomas, son el resultado de la hipersensibilidad destructiva del tejido que es parte de la respuesta inmune del hospedero. Debido a que ambos procesos son regulados por las mismas células efectoras, la aparición de hipersensibilidad en el tejido, también significa la adquisición de inmunidad del hospedero (Ahmad, 2011). El desarrollo de la TB en el humano, comienza una vez que la micobacteria ha sido fagocitada por los macrófagos, a través de la interacción del receptor de manosa del macrófago y los receptores del complemento que reconocen diversos componentes de la pared de *M. tuberculosis*. En el endosoma, *M. tuberculosis* es capaz de manipular el pH endosomal y arrestar su maduración, impidiendo la formación del fagolisosoma y permitiendo así la proliferación de la micobacteria. Esta fase primaria de la enfermedad se caracteriza por la proliferación bacilar en los macrófagos alveolares y espacios aéreos (Schwander y Dheda, 2011). El desarrollo de la inmunidad celular ocurre 3 semanas después de la exposición. Los antígenos procesados son llevados hacia los ganglios linfáticos y son presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) por las células dendríticas a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Bajo la influencia de los macrófagos productores de IL-12, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> secretan citocinas proinflamatorias Th1, como IFN- $\gamma$  que a su vez facilita la activación de macrófagos. Los macrófagos también secretan citocinas reguladoras como TNF, para reclutar monocitos y formar el granuloma, además los macrófagos expresan la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que es la responsable del

aumento de los niveles de óxido nítrico y otras especies reactivas de oxígeno en el sitio de la infección. En consecuencia, el desarrollo de una respuesta celular tipo Th1 es esencial para la protección del hospedero. Por lo tanto, la infección primaria con *M. tuberculosis* induce hipersensibilidad y resistencia, además de cicatrices que pueden contener bacilos viables por mucho tiempo, incluso durante la vida completa del hospedero (Hernández-Pando *et al.*, 2004; Hernández-Pando *et al.*, 1996b). La mayoría de las personas infectadas por el bacilo tuberculoso (~90%) no desarrollan la enfermedad a través del tiempo; sin embargo, el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta considerablemente cuando la infección con TB coexiste con alguna deficiencia del sistema inmune. En el estado de latencia, la bacteria permanece en los macrófagos dentro de los granulomas, en los órganos del huésped infectado. Se cree que la micobacteria se mantiene en fase estacionaria con un metabolismo bajo, en un estado no replicativo, escondida del sistema inmunológico (Hernández-Pando *et al.*, 2007). Cuando hay un desequilibrio en el sistema inmunológico del huésped, la infección resurge, por ejemplo, en pacientes infectados con el SIDA, bajo tratamiento con corticoesteroides, en personas con edad avanzada o por abuso de alcohol y droga (Orcau *et al.*, 2011). Sólo el 10% de las personas infectadas con TB desarrollan la enfermedad clínica en algún momento de su vida. La reactivación ocurre en sitios del cuerpo con tensión de oxígeno elevada, de ahí que se manifiesta como una neumonía crónica con fiebre, tos, esputo sanguinolento y pérdida de peso (Hernández-Pando *et al.*, 2007).

### ***1.3 Tratamiento***

El tratamiento de la TB pansensible se basa en la mezcla de cuatro fármacos de primera línea (I, R, etambuto, y pirazinamida o estreptomycin) en diversas combinaciones por periodos de al menos 6 meses que se dividen en una etapa intensiva (administración diaria de la mezcla de fármacos, normalmente 2 meses) y una etapa de sostén (administración de los fármacos tres veces por semana, normalmente 4 meses) (Arbex *et al.*, 2010a).

Para el tratamiento de casos MFR, se utilizan los fármacos de segunda línea como las fluoroquinolonas (levofloxacin u ofloxacin), polipéptidos (capreomicina), cicloserina, ácido para-aminosalicílico, etionamida y aminoglucósidos (estreptomicina, amikacina o kanamicina). Estos fármacos son generalmente menos efectivos, más tóxicos y más caros que los de primera línea . Estas características prolongan el tratamiento (hasta 24 meses) e incrementan los costos (hasta 100 veces), así mismo incrementan la posibilidad de padecer efectos adversos. Todo esto provoca una baja adherencia al tratamiento. Cabe mencionar que la mayoría de estos fármacos son hepatotóxicos, nefrotóxicos e inducen fácilmente resistencia como las fluoroquinolonas (Arbex *et al.*, 2010b; Raviglione y Smith, 2007; Ziganshina y Squire, 2008).

Para el tratamiento de la TB-XFR, se usan los mismos fármacos que son utilizados para el tratamiento de cepas MFR, con adición de otros que no tiene datos clínicos bastante sólidos y que por tanto no son muy efectivos, estos compuestos son utilizados en el siguiente orden: clofamizina, amoxicilina con clavulinato, linezolid, tioacetazona y clarotromicina (Caminero *et al.*, 2010).

El tratamiento con dos o tres fármacos antituberculosos con diferentes mecanismos de acción reducen la probabilidad de que se produzca una cepa mutante. Los tratamientos actuales se han reducido, ya que anteriormente eran de 18 a 24 meses con I y etambutol a tratamientos de 9 meses cuando se sustituyen por I y R; y se reducen a seis meses cuando se añade pirazinamida como tercer fármaco. A los pacientes infectados con micobacterias resistentes a uno o más fármacos, o que experimentan co-infección con SIDA, se les trata con fármacos de segunda línea por tiempos más prolongados (Raviglione y Smith, 2007).

La proporción de infecciones por cepas resistentes a los fármacos de primera línea varía de 5-15%, pero va en aumento sobre todo en aquellos pacientes que ya han sido tratados. El fracaso de la quimioterapia está muy relacionada con el abandono a los tratamientos lo que trae como consecuencia la resistencia del bacilo (Raviglione y Smith, 2007).

#### ***1.4 Estrategias para el control de la TB***

En 1998, la OMS junto con otras instituciones de salud internacionales formaron la iniciativa Stop TB (alto a la tuberculosis), un movimiento que buscaba una reestructuración de los esfuerzos mundiales para el control de la TB (WHO, 2001).

Esta iniciativa ha evolucionado hasta convertirse en la alianza global Stop TB Partnership (<http://www.stoptb.org>). Los objetivos actuales del programa Stop TB buscan acelerar el progreso en siete áreas específicas: Expansión del Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES), este tratamiento es la estrategia recomendada internacionalmente para asegurar la curación de por lo menos el 80 % de los casos TB. Se basa en cinco principios clave (Intervención organizada y sostenida, identificación de casos de manera temprana y precisa, quimioterapia eficaz y fácil para el paciente, manejo eficaz de los medicamentos y el monitoreo basado en los resultados). Los otros objetivos del programa Stop TB son tratar los casos de coinfección TB/SIDA y TB-MFR, desarrollo de nuevos fármacos, desarrollo de vacunas y buscar métodos de diagnóstico más rápidos y de menor costo contra la TB y finalmente la promoción, movilización y comunicación social (WHO, 2006).

La Asamblea Mundial de la Salud del año 2000, aprobó la creación de una asociación mundial para detener la TB con las siguientes metas:

- Para el año 2005 el 70% de las personas con TB infecciosa deben ser diagnosticados y el 85% de éstos deben ser curados.
- Para el año 2015 el número total de casos de TB (muertes y prevalencia) deben de haber reducido un 50% respecto a los niveles de 1990.
- Para el año 2050 la incidencia global de TB, se habrá reducido a menos de uno por ciento.

La aparición de cepas MFR y XFR provocaron una modificación en el TAES, creando el TAES-PLUS para su tratamiento. La diferencia es que este nuevo esquema propone la inclusión de cultivos y la determinación de susceptibilidad a antifímicos con

individualización de la terapia de acuerdo con patrones de susceptibilidad y respuesta clínica (Raviglione y Smith, 2007; WHO, 2007).

### ***1.5 Importancia de las evaluaciones preclínicas en el desarrollo de nuevos fármacos***

El desarrollo de nuevas moléculas para el tratamiento, prevención o rehabilitación de enfermedades sigue un camino prolongado y azaroso. Ya que solo una pequeña fracción de las moléculas descubiertas o sintetizadas llega a comercializarse y la inversión en tiempo y dinero es muy elevada (de siete a quince años y hasta unas decenas de millones de dólares). Estas cifras se deben principalmente a que existen una gran cantidad de aspectos científicos, éticos, comerciales, regulatorios y legales que deben de ser cubiertos antes de la comercialización de un fármaco. Además no todos los productos que son lanzados al mercado persisten, ya que algunos son retirados por efectos adversos y otros se vuelven obsoletos con el paso del tiempo (Guengerich, 2011).

Una vez que se ha obtenido una nueva molécula con potencial biológico, sobre todo con resultados *in vitro* prometedores, se inicia con los estudios preclínicos (estudios fisico-químicos, toxicológicos y farmacológicos). Primero se debe producir una cantidad suficiente de compuesto para determinar sus propiedades fisico-químicas como estabilidad, solubilidad, punto de fusión, etc. Después se debe evaluar esta nueva molécula en estudios *in vitro* (efectos sobre enzimas, microorganismos, células humanas o animales (Williams y Hong, 2011).

Una vez que se obtiene un efecto farmacológico *in vitro*, se procede a evaluar la toxicidad aguda del nuevo fármaco ( $DL_{50}$ ). Esto se realiza principalmente en ratones porque su tamaño permite utilizar pequeñas dosis del nuevo fármaco. Existen muchos protocolos para la determinación de la  $DL_{50}$ ; sin embargo, la tendencia en la investigación mundial requiere que se sacrifique la menor cantidad de animales posible, es por eso que los métodos descritos en el anexo V del ECB (OECD, 2008) resultan muy adecuados. El cociente:  $DL_{50}/DE_{50}$  se conoce como índice terapéutico. Un fármaco

se considera más seguro cuando su índice terapéutico es mayor, ya que su dosis farmacológica efectiva se encontrará muy alejada de su dosis letal. Cabe señalar que este cociente es generado en estudios de toxicidad aguda, por lo que no brinda información sobre posibles efectos a largo plazo, de ahí la necesidad de realizar estudios de toxicidad subaguda y crónica de manera adicional, aunado a estudios encaminados a determinar mutagenicidad y genotoxicidad entre otros (OECD, 2008).

Para cumplir los requisitos de las autoridades regulatorias, es necesario realizar estudios de toxicidad aguda en otra especie de roedores (comúnmente ratas) y al menos en una especie no-roedora (comúnmente perros o conejos), con la finalidad de obtener datos suficientes sobre las diferencias que se pueden presentar entre diferentes especies (OECD, 2008).

Una vez conocida la toxicidad aguda, se pasa al estudio de toxicidad a largo plazo (los animales son administrados por semanas, meses o años). Estos estudios implican más esfuerzo de investigación, ya que los animales deberán ser mantenidos por más tiempo, se consumirá más fármaco, se requerirá más trabajo de técnicos y profesionales especializados, entre muchos otros factores. Es por eso que los estudios de toxicidad a largo plazo frecuentemente son limitados; sin embargo, son de importancia crucial para los pacientes ya que se analizan posibles efectos teratogénicos, mutagénicos, carcinogénicos, hepatotóxicos y nefrotóxicos entre muchos otros daños de largo plazo (OECD, 2008).

Una vez que el nuevo fármaco ha pasado por todos los estudios preclínicos estará listo para ser evaluado en humanos (etapas clínicas I a IV). La fase I se realiza en voluntarios sanos y tiene el objetivo de determinar el perfil de seguridad, la farmacocinética y la dosis recomendada del nuevo fármaco. En la fase II el fármaco se prueba por primera vez en pacientes enfermos y tiene la finalidad de hacer una estimación de la actividad clínica del nuevo fármaco. En la fase III se hace una comparación entre la eficacia y seguridad de este nuevo fármaco. Y la fase IV se encarga del seguimiento del nuevo fármaco en el mercado o “farmacovigilancia” (Chaplan *et al.*, 2010).

Por todo esto, los estudios de toxicidad constituyen una parte muy importante dentro del desarrollo de un nuevo fármaco. Con el objetivo de evaluar el riesgo o peligro potencial que puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas.

### ***1.6 Desarrollo de fármacos para el tratamiento de la TB***

Diferentes compuestos derivados de animales, plantas y microorganismos se han utilizado para tratar diversas enfermedades a través del tiempo. La investigación de productos naturales como fuente de nuevos productos terapéuticos alcanzó su máximo éxito en el periodo de 1970-1980, esto ha dado lugar a que se tenga una gran cantidad de compuestos naturales o semi-sintéticos en el mercado (Bueno *et al.*, 2011).

Debido a que los productos naturales son una fuente probada para el desarrollo de nuevos fármacos han recibido una atención considerable como fuente de potenciales fármacos con actividad antimicobacteriana (Copp y Pearce, 2007).

Compuestos naturales puros, así como extractos de plantas, microorganismos y algas han demostrado que contienen compuestos con importante actividad antimicobacteriana (Bueno *et al.*, 2011). En la literatura científica se describe una gran cantidad de compuestos que han demostrado importante actividad antimicobacteriana en ensayos preliminares (*in vitro*) (Cantrell *et al.*, 2001; Copp y Pearce, 2007; Ma *et al.*, 2005; Okunade *et al.*, 2004). Sin embargo, su posible potencial farmacológico sigue siendo desconocido; esto debido a que no existen trabajos donde se describa el efecto antituberculoso empleando modelos *in vivo* que puedan demostrar que estos compuestos pudieran combatir la infección por micobacterias (Guzmán *et al.*, 2010).

Por otro lado, el desarrollo de nuevos fármacos anti-TB debe cubrir diversos requisitos: simplificar los tratamientos actuales o reducir su duración (lo que significa que deben tener actividad bactericida); tener un perfil toxicológico aceptable para evitar que el

tratamiento esté limitado por efectos adversos o evitar que presente sinergismo toxicológico con otros fármacos anti-TB; ser activo contra cepas MFR y XFR y por tanto no presentar resistencia cruzada con los fármacos de primera línea; debe ser útil en pacientes que presenten la co-infección SIDA/TB, por lo que no debe interactuar con fármacos antiretrovirales y, finalmente, deben ser activos contra la TB latente (Van Den Boogaard *et al.*, 2009).

La búsqueda de compuestos antituberculosos se realiza actualmente en los sectores público (universidades e instituciones de salud) y privado (diversas compañías farmacéuticas como AstraZeneca, Novartis, GlaxoSmithKline, Aventis y Bayer (O'Brien y Spigelman, 2005). Algunos de los nuevos compuestos que han demostrado una mayor actividad son derivados de la rifampicina; el rifampin y la rifapentina, estos tienen el mismo mecanismo de acción, son inhibidores de la síntesis de RNA micobacteriano. Otro grupo importante de nuevos compuestos son las fluoroquinolonas, estos fármacos son muy prometedores debido a que se distribuyen en todo el organismo, incluso dentro de las células, lo que explica su eficacia contra las micobacterias intracelulares; los mejores candidatos que podrían acortar el tratamiento anti-TB son la moxifloxacina y la gatifloxacina (actualmente en fase clínica II), el mecanismo de acción de ambos compuestos es por inhibición de la DNA girasa. Otro compuesto con buena actividad es el TMC207 también conocido como R 207910 o compuesto J que se encuentra en fase clínica II, se trata de una diarilquinolona que inhibe la ATP sintasa micobacteriana. El PA-824 y OPC-67683 nitroimidazopiranos derivados del metronidazol, estos compuestos inhiben la síntesis de proteínas y de pared celular. También se han sintetizado más de 60,000 compuestos análogos del etambutol, siendo la diamina más prometedora el compuesto SQ109 que es un inhibidor de la pared celular. Otro grupo de compuestos que se ha estudiado ampliamente son los pirroles, como el LL3858 se encuentra en fase clínica I y su mecanismo de acción es desconocido (Lenaerts *et al.*, 2008; Van Den Boogaard *et al.*, 2009).

### **1.7 Modelo murino de infección con tuberculosis progresiva**

En la actualidad y debido al problema que representa la TB, se han desarrollado distintos modelos animales para evaluar la respuesta inmune en contra de la infección con TB, estos modelos utilizan ratones, ratas, conejos y cobayos (Lenaerts *et al.*, 2008). Sin embargo, el modelo más utilizado es en ratones de la cepa BALB/c, debido principalmente a razones de espacio y costos, ya que el trabajo con micobacterias requiere de instalaciones de bioseguridad nivel III, otras ventajas de trabajar con esta cepa es que presentan baja variabilidad en la respuesta inmune y escasa variación genética. La efectividad de los nuevos compuestos en este modelo es analizada mediante la reducción de las unidades formadoras de colonias (UFC's) o carga bacilar en pulmones, daños o patologías pulmonares mediante la determinación del porcentaje de neumonía y cambios en el sistema inmunológico por cuantificaciones de citocinas. Algunas variantes que se han desarrollado sobre el modelo murino utilizan animales “knockout” para genes específicos. Por ejemplo, los ratones knockout para interferón gamma (INF- $\gamma$ ) pierden completamente su habilidad para generar resistencia contra TB, por lo tanto estos animales son utilizados para hacer un escaneo rápido, ya que presentan cambios en la carga bacteriana en alrededor de 9 días, tiempo considerablemente más bajo respecto a los animales “normales” que requieren de hasta dos meses para desarrollar estos cambios. Otra variante utiliza ratones knockout para el gen GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocito-macrófago), estos animales no pueden contener la infección por micobacterias ni siquiera cuando se tiene una cantidad bastante pequeña, por lo tanto este modelo nos puede indicar rápidamente si el tratamiento con un determinado compuesto logró eliminar toda la carga bacteriana (Lenaerts *et al.*, 2008).

La vía de infección también puede influir en el tipo de respuesta inmune, por lo que la infección intratraqueal asegura que la mayoría de las micobacterias queden depositadas en el pulmón. Por otro lado, para asegurar la infección y el desarrollo de la TB, se emplean dosis altas de micobacterias (entre  $2.5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$ ) esto debido a que el ratón no es un hospedero natural de las micobacterias (Hernández-Pando *et al.*, 1996b).

El modelo de infección experimental con TB en el ratón, se caracteriza por tener dos fases: la primera o fase temprana en la que predomina la respuesta celular tipo Th1 y la segunda o fase tardía en la que la respuesta celular se caracteriza por la presencia de linfocitos Th2 (Hernández-Pando *et al.*, 2004; Hernández-Pando *et al.*, 1996b).

La fase temprana de la infección se caracteriza por la presencia de infiltrado inflamatorio en la zona peribronquial y perivascular de los pulmones. El infiltrado inflamatorio está formado principalmente por macrófagos y linfocitos. El cúmulo de macrófagos y linfocitos T forman una estructura ovoide o circular denominada granuloma, característica de la histopatología de la TB, esta estructura es la encargada de delimitar el crecimiento de la micobacteria en los pulmones. Los granulomas aparecen a partir de la segunda semana de infección y en el día 21 alcanzan su máxima madurez (Hernández-Pando *et al.*, 1996b). Durante la fase temprana de la infección, los linfocitos T secretan citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  e IL-2 características de la respuesta celular tipo Th1. La secreción de IFN- $\gamma$  activa los macrófagos e induce la producción de la enzima iNOS, que es importante para la destrucción de las micobacterias, mientras que la IL-2 induce la proliferación linfocitaria lo que permite el control temporal de la infección. Por otro lado, los macrófagos producen IL-1 y TNF- $\alpha$  que en conjunto estimulan la expresión de IL-2 y su receptor, además de la activación de macrófagos, permitiendo el control temporal de la infección (Hernández-Pando *et al.*, 2004).

La fase avanzada o progresiva de la TB se presenta a partir de la octava semana de infección y se caracteriza por el incremento de micobacterias, así como de las áreas neumónicas, necrosis y fibrosis intersticial. En esta fase de la infección, los linfocitos T secretan citocinas tipo Th2 como las IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. La secreción de IL-4 induce la diferenciación de linfocitos B productores de anticuerpos, que no se consideran protectores, mientras que en conjunto con IL-10 y la IL-13, neutraliza la respuesta inflamatoria Th1. Debido a la aparición de los linfocitos Th2 se considera que el efecto protector de los linfocitos Th1 es disminuido y por lo tanto hay una desviación de la respuesta celular hacia una respuesta humoral, contribuyendo al progreso de la

enfermedad. A su vez, los macrófagos sufren cambios morfológicos que afectan su respuesta debido a la gran cantidad de micobacterias que fagocitan y a la presencia de vacuolas con material bacteriano, principalmente lipoarabinomano, un constituyente de la pared celular de las micobacterias, que es muy eficiente en la inactivación de los macrófagos. Además, los macrófagos vacuolados disminuyen la producción de IL-1, TNF- $\alpha$  y de la iNOS, así mismo incrementan la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- $\beta$ , este último induce la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno, lo que genera fibrosis en el pulmón. La inclinación de la respuesta celular hacia una respuesta Th2 favorece el desarrollo de áreas neumónicas en el pulmón y culmina con la muerte del ratón debido a una insuficiencia respiratoria (Hernández-Pando *et al.*, 2004).

### ***1.8 Ácido ursólico y ácido oleanólico***

El AU y AO son triterpenos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; se encuentran en una gran cantidad de especies vegetales, incluyendo plantas medicinales y se encuentra en diversos productos alimenticios (Ferrer-Hernández *et al.*, 2007; Liu, 2005, 1995; Somova *et al.*, 2003). Estos triterpenos se biosintetizan por ciclación de moléculas de escualeno mediante la enzima 2,3-oxidoescualeno ciclasa (Akashi *et al.*, 1994; Finlay *et al.*, 1997; Seo *et al.*, 1988).

El AU y AO han sido utilizados como agentes emulsificantes en preparaciones farmacéuticas, cosméticos y alimentos (Ferrer-Hernández *et al.*, 2007), posteriormente se realizaron numerosos estudios científicos que demostraron que estos compuestos tienen un gran potencial farmacológico (Liu, 2005, 1995).

Dentro de la gran variedad de actividades farmacológicas que se han encontrado, podemos destacar los efectos antioxidante, antiinflamatorio, hepatoprotector, antitumoral y antimicrobiano (antibacteriano, antifúngico y antiparasitario).

El efecto antioxidante *in vivo* se ha demostrado sobre la molécula de AU, encontrando que presenta un efecto protector sobre la peroxidación de lípidos, estrés oxidativo y evita el daño al DNA inducido por radiación ultravioleta (Ramachandran y Prasad, 2008). También se ha demostrado que el AU posee efecto antioxidante no enzimático, al secuestrar al anión superóxido, al quelar iones metálicos (como consecuencia de esto evita la reacción de Fenton), y al inhibir a la xantina oxidasa (XO) (Yin y Chan, 2007). Se ha demostrado el efecto antioxidante y antiinflamatorio del AU y AO sobre células PC12 al inducir estos efectos con peróxido de hidrógeno y con el ion 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>); estos compuestos provocan la muerte celular por liberación de citosinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  y por disminución de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPX). El tratamiento de las células PC12 con AU y AO disminuye la liberación de IL-6 y TNF- $\alpha$  por lo que podrían ser agentes protectores en desordenes de tipo neurodegenerativos (Tsai y Yin, 2008).

Respecto a la actividad antiinflamatoria del AU, se ha descrito que presenta una mejor actividad que la indometacina (fármaco antiinflamatorio no esteroideo ampliamente utilizado) presentando dosis inhibitorias medias (DI<sub>50</sub>) de 0.12 y 0.26  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ . Esta actividad se determinó en el modelo de edema en oreja de ratón inducida con aceite de ricino (Baricevic *et al.*, 2001; Ismaili *et al.*, 2004). Se obtuvieron resultados similares al inducir la inflamación con 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA). Para este experimento se encontró que la DI<sub>50</sub> del AU es de 0.1 mg/oreja y la DI<sub>50</sub> de la indometacina es de 0.3 mg/oreja (Banno *et al.*, 2004). El AU también muestra importante efecto antiinflamatorio al inducir el proceso con carragenina o ácido acético en el modelo de edema plantar en rata (Kosuge *et al.*, 1985; Liu, 1995). En cuanto al mecanismo de acción antiinflamatorio del AU y AO se ha descrito que estos compuestos inhiben la liberación de histamina, inhiben a la 5-lipooxigenasa, a la ciclooxigenasa-2 (COX2) y a la elastasa (Ismaili *et al.*, 2004; Liu, 1995; Ringbom *et al.*, 1998).

El efecto hepatoprotector del AU y AO se ha determinado en modelos *in vivo e in vitro*. Para la mezcla de AU/AO se encontró que disminuye el daño hepático producido por CCl<sub>4</sub>, disminuyendo los niveles séricos de transaminasa glutámico oxalacética (sGOT) y los niveles de transaminasa glutámico pirúvica (sGTP) y al observar que se regenera la viabilidad de hepatocitos (Liu, 1995; Martín-Aragón *et al.*, 2001). También se encontró que estos triterpenos protegen contra el daño hepático provocado por D-galactosamina y acetaminofén, entre otros (Liu, 1995; Martín-Aragón *et al.*, 2001). El mecanismo de acción hepatoprotector que se ha sugerido indica que la mezcla de triterpenos disminuye la actividad del citocromo P450; esta familia de enzimas es requerida por una gran cantidad de compuestos hepatotóxicos para su activación (Kim *et al.*, 2004; Liu, 1995). En un estudio más reciente se ha encontrado que el AU estimula la proliferación hepática después de una hepatectomía parcial (extirpación de una sección de hígado) con incremento de las proteínas ciclina D1, ciclina E y C/EBP $\beta$ , esta última familia de proteínas son factores de transcripción que promueven la expresión de una gran variedad de genes (Jin *et al.*, 2011).

Otra actividad importante que se ha determinado al AU y AO es su propiedad antitumoral. Sobre la línea celular HT-1080 (fibrosarcoma humano) se demostró actividad antiinvasiva (Cha *et al.*, 1996). Por vía tópica, el AU inhibe de un 45 a 61% la promoción de cáncer en piel de ratones, esto al inducir la formación de tumores con 7,12-dimetilbenzo[ $\alpha$ ]antraceno (DMBA) en combinación con el promotor TPA (Huang *et al.*, 1994). Otro estudio reveló una reducción del 53% en la formación de cáncer de piel en ratones al inducirlo con TPA y tratar los animales con dosis bajas de AU (Tokuda *et al.*, 1986), sin embargo, al tratar animales con cáncer de piel con altas dosis de AU, el efecto fue inconsistente por lo que los autores sugieren estudios adicionales para corroborar el efecto del AU en casos de cáncer de piel (Ikeda *et al.*, 2006). También se ha reportado que el AU inhibe la proliferación celular en cáncer de pulmón A549, bloqueando la progresión del ciclo celular en la fase G1 *in vitro* (Hsu *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2009), el mismo efecto se encontró sobre carcinoma de colon humano HCT15 (Li *et al.*, 2002), cáncer leucémico humano HL60, cáncer de encía Ca9-22 (Chen *et al.*, 2009) y carcinoma epidérmico humano A431,

contra este se observó un efecto citotóxico y citostático (Hollosoy *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002). Otros estudios reportan la actividad citotóxica del AU contra tres líneas celulares; carcinoma cervical (HeLa), cáncer de ovario (SKOV3), y carcinoma gástrico (BGC-823), siendo mas activo contra el primero (Meng *et al.*, 2009). En cuanto al mecanismo de acción antitumoral se ha encontrado que el AU y AO suprimen la activación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que es inducido por diversos agentes carcinógenos, agentes inflamatorios y compuestos promotores de tumor. Estos triterpenos inhiben los sitios p50 y p65 del NF- $\kappa$ B evitando que se una al DNA, además inhiben la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$ , por ésteres del forból, ácido okadáico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y humo de cigarro (Shishodia *et al.*, 2003). Algunos autores reportan que el AU inhibe pasos clave en el proceso de la angiogénesis (proliferación de las células endoteliales, migración y diferenciación) pero estimula otros, como degradación de matriz extracelular por matriz metaloproteinasas-2 (MMP-2) y urocinasa en ensayos *in vitro* (Cárdenas *et al.*, 2004). En estudios mas recientes se ha observado que el AU tiene un efecto supresor dosis-tiempo dependiente sobre los efectos migratorios y de invasividad de células metastásicas MDA-MB-231 a concentraciones no citotóxicas (Yeh *et al.*, 2010). Este mismo triterpeno induce apoptosis, división de la Poli ADP ribosa polimerasa (PARP) y disminución de proteínas Bcl-2 y células MCF-7, apoyando la hipótesis de que induce la apoptosis por la vía mitocondrial intrínseca (Kassi *et al.*, 2009). Además, el AU ha demostrado que se une al receptor de glucocorticoides (GR) y lo transloca al núcleo, lo que sugiere que tiene alto potencial como agente anticancerígeno en cáncer de mama por modulación de GR (Bishayee *et al.*, 2011).

En cuanto al efecto antibacteriano se ha encontrado que el AU tiene actividad contra *Staphylococcus aureus* (CMI= 8  $\mu$ g/mL) y *Enterococcus faecalis* (CMI= 4  $\mu$ g/mL), pero es inactivo contra cepas resistentes a antibióticos como *S. aureus* resistente a metilina y *Enterococcus sp* resistente a vancomicina (Fontay *et al.*, 2008). En otro estudio se encontraron CMI's de 62.5, 47, 259 y 4  $\mu$ g/mL contra *S. Aureus*, *E. faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente (Shai *et al.*, 2008).

Otra actividad relevante que se le ha demostrado al AU, es su efecto contra diversas cepas de *M. tuberculosis*. Contra la cepa H37Ra presentó una CMI de 12.5 µg/mL, al evaluarlo por el micrométodo colorimétrico de azul de alamar (MABA) (Tanachatchairatana *et al.*, 2008). Contra la cepa *M. tuberculosis* H37Rv se reportan diferentes valores, una CMI = 32 µM (50 µg/mL) por ensayo radiorespirométrico BACTEC 460 (Cantrell *et al.*, 2001; Wachter *et al.*, 1999) y de 41.9 y 31 µg/mL por el método MABA (Gu *et al.*, 2004a; Gu *et al.*, 2004b). Recientemente, se ha descrito que para la mezcla de AU/AO presenta una CMI = 62.5 µg/mL *in vitro* al ser evaluada por MABA (Higuchi *et al.*, 2008). En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, se encontró que el AU aislado de *Chamaedora tepejilote* inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* en un 99% cuando se encuentra a una concentración de 100 µg/mL (Jiménez *et al.*, 2005), mientras que el AO aislado de *Lantana hispida* mostró una CMI de 25 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv por el método MABA (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2007). También se encontró que el AU y AO reducen la neumonía y las unidades formadoras de colonias (UFC's) en los animales con TB crónica, al inducir dicha enfermedad con *M. tuberculosis* H37Rv y administrando AU y AO por separado por vía subcutánea durante dos meses (Jiménez-Arellanes *et al.*, 20110). En un estudio mas reciente se encontró que el AO presenta efecto sinérgico cuando se administra en combinación con fármacos de primera línea (I, R o etambutol) estas mezclas fueron evaluadas en diferentes cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y MFR, encontrando actividad sinérgica en todos los casos con CMIs 4 a 16 veces menores que el tratamiento individual con los antibióticos (Ge *et al.*, 2010). Se sabe que la pureza de los compuestos tiene una relación directamente proporcional respecto a su actividad biológica; sin embargo, para el caso de la actividad antimicobacteriana *in vitro* del AU se ha encontrado que cuando tiene gran pureza (98.6%) presenta una CMI superior a la que presenta con pureza de 69.6%, los valores de CMI son >256 µg/mL y 65 µg/mL, respectivamente (Jaki *et al.*, 2008).

Por otra parte, se ha encontrado que el AU presenta actividad antifúngica contra *Sporothrix schenki*, *Microsporum canis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* con valores de CMI's de 32, 12, 24, 63 y 63

$\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Shai *et al.*, 2008); actividad antiparasitaria contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis* con  $\text{CI}_{50}$  de 5 y 11  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. En esta evaluación el AU fue más activo que los fármacos de referencia, contra amastigotes (Torres-Santos *et al.*, 2004). Contra *L. donovani* mostró una  $\text{CI}_{50}$ = 3.7  $\mu\text{g/mL}$ , esta actividad no fue mayor a los controles positivos: pentamidina ( $\text{CI}_{50}$ = 1.9  $\mu\text{g/mL}$ ) y anfotericina B ( $\text{CI}_{50}$ = 0.7  $\mu\text{g/mL}$ ) (Da Silva Filho *et al.*, 2009). Este autor también reportó el efecto del AU contra *Plasmodium falciparum* clon D6 ( $\text{CI}_{50}$ = 1  $\mu\text{g/mL}$ ). Además el AU posee una potente actividad contra *Trypanosoma cruzi*, ya que a la concentración de 40  $\mu\text{g/mL}$  detiene el movimiento de todos los epimastigotes después de 48 h de incubación, falta por determinar su efecto sobre amastigotes y tripomastigotes (Abe *et al.*, 2002).

Algunas actividades aisladas que se han reportado para el AU son actividad hipoglucemiante en ratones diabéticos y normoglucémicos, ejerciendo su máximo efecto a una dosis de 75 mg/Kg y después de 4.5 h de haber sido administrado, el efecto mostrado fue similar al de la tolbutamida bajo las mismas condiciones (Pérez *et al.*, 1998). Un estudio más reciente reporta que el urs-12-en-3 $\beta$ -ol-28-oic ácido 3 $\beta$ -d-glucopiranosill-4'-octadecanoato (glucósido de AU), reduce significativamente los niveles séricos de glucosa, en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (Kazmi *et al.*, 2012).

Efecto antihipertensivo en ratas sensibles al consumo de sal, encontrando como posible mecanismo de acción la actividad antihiperlipidémica, antioxidante y diurética del AU (Somova *et al.*, 2003). En otro estudio se reporta que el AU y el AO actúan como compuestos antidisríticos cuando se induce esta condición con adrenalina y  $\text{CaCl}_2$ , este efecto es comparable al del propanolol ( $\beta$ -bloqueador no selectivo) y propone que estos compuestos pueden ser antagonistas  $\beta$ - adrenérgicos (Somova *et al.*, 2004). En un estudio más reciente se encontró que el AU es un potente inhibidor de la activación de células T y de su proliferación, estos efectos están asociados con la inhibición de la vía de señalización del NF- $\kappa\text{B}$  (Zeng *et al.*, 2011).

A pesar de la gran diversidad de actividades biológicas mostradas por estos triterpenos, a la fecha se desconoce su posible efecto tóxico en esquemas de administración oral y subagudo, por lo que este trabajo describe el aislamiento de la mezcla de AU/AO a partir de la especie vegetal *Bouvardia ternifolia* y su posterior evaluación toxicológica y antituberculosa *in vivo*.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de resistencia a fármacos de 1ª y 2ª línea para el tratamiento de la TB, aunado a los efectos adversos derivados del uso prolongado de los mismos que trae como consecuencia el abandono de los tratamientos y el aumento en la susceptibilidad de los pacientes inmunosuprimidos para desarrollar la enfermedad, han provocado que en la actualidad la TB represente un problema de salud serio a nivel mundial, constituyendo la segunda causa de muerte por un solo agente infeccioso. Esto ha obligado a la comunidad científica a buscar nuevas terapias que acorten el tiempo de tratamiento, que presenten una menor cantidad de efectos secundarios para evitar su abandono, y con mecanismos de acción diferente y efectiva para tratamiento de la TB.

En la fase crónica de la TB pulmonar en el modelo murino a estudiar, coexiste un patrón de citocinas de tipo Th1 y Th2, con un predominio de las citocinas Th2 que llevan a la progresión de la enfermedad y a la muerte causada por neumonía. Es posible que la eficiencia funcional de las citocinas de tipo Th1 se reduzca por los altos niveles de citocinas de tipo Th2 y el TGF- $\beta$  que es una potente citocina inmunosupresora de Th1.

Con base a los antecedentes podemos esperar que la mezcla de AU/AO puedan restablecer el equilibrio de citosinas hacia una respuesta de tipo Th1, que disminuya el infiltrado inflamatorio y que controle el crecimiento de la micobacteria en el modelo murino de infección con TB.

### **3. HIPÓTESIS**

Si la administración de AU y AO, produce una función inmunomoduladora y/o antiinflamatoria que favorece el predominio de las citocinas de tipo Th1 y además presenta mínimos efectos tóxicos en esquemas de administración agudos y subagudos en ratones BALB/c. Entonces la administración de estos triterpenos reducirán la carga bacilar y la neumonía con mínimos efectos adversos, por lo que podrán ser considerados como candidatos para su uso como agentes antituberculosos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 *Objetivo general*

Determinar la actividad antituberculosa de la mezcla de AU y AO en ratones BALB/c con TB y describir el efecto tóxico de estos compuestos al ser evaluados en esquemas de administración aguda y subaguda.

### 4.2 *Objetivos específicos*

- Aislar el AU y AO a partir del extracto metanólico de la especie *B. ternifolia*.
- Determinar la toxicidad aguda (DL<sub>50</sub>) en ratones BALB/c por vía subcutánea.
- Determinar el efecto tóxico en un esquema de administración subagudo (dosis repetida por 28 días) en ratones BALB/c por vía subcutánea.
- Determinar el efecto antituberculoso de la mezcla 2:1 de AU/AO en el modelo murino de TB progresiva (determinando el porcentaje de pulmón afectado por neumonía, carga bacilar y analizando el comportamiento de interleucinas de fase Th1).
  - a) induciendo la TB con *M. tuberculosis* H37Rv
  - b) induciendo la TB con una cepa de *M. tuberculosis* MFR.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 *Procedimientos generales*

La caracterización química de los triterpenos fue determinada por resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H, Bruker-Avance F, 300 MHz) usando tetrametilsilano (TMS) como control interno y CDCl<sub>3</sub> como disolvente. Los espectros de masas por impacto electrónico (EM-IE) fueron obtenidos en un equipo Jeol AX-505 HA mass spectrometer a 70 eV. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Fisher-Johns y son reportados sin corrección. Los datos espectroscópicos y espectrométricos de cada compuesto fueron comparados con datos reportados previamente en la literatura.

Las cromatografías en columna abierta (CC) se realizaron utilizando sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (70-230 mesh, Merck) como fase estacionaria, placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (0.2 mm, Merck) fueron usadas para realizar cromatografía en capa fina (CCF) de tipo analítica y preparativa. Los disolventes n-Hexano (Hex), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y metanol (MeOH) utilizados fueron de la marca Mallinckrodt y J.T. Baker. Las placas de CCF fueron reveladas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acuoso al 10% y calentamiento a 100 °C. La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó con un controlador Waters 600 acoplado a un detector de arreglo de diodos Waters 996 programado para tomar lecturas en el intervalo de longitud de onda entre 220 y 380 nm con una resolución de 2.4 nm. El control del equipo, adquisición, procesamiento y manejo de los datos fue realizado con el software Millennium 32 (Waters). La separación cromatográfica se realizó en una columna Symmetry (3.9 × 150 mm, 5 μm de tamaño de partícula, Waters). La fase móvil utilizada fue isocrática con una mezcla de acetonitrilo:MeOH (80:20) grado HPLC (J.T. Baker). La velocidad de flujo fue 1.8 mL/min. Las muestras fueron solubilizadas en MeOH a 1 mg/mL inyectando un volumen de 100 μL.

## ***5.2 Material Vegetal***

*B. ternifolia* fue colectada en el Pedregal de San Ángel, Tlalpán, Distrito Federal, México, en Septiembre del año 2008. La especie fue botánicamente identificadas por la M. en C. Abigail Aguilar y un ejemplar de la especie fue depositado en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social.

## ***5.3 Extracción y aislamiento***

Las partes aéreas de la planta seca fueron trituradas y sometidas a extracción con metanol. El extracto crudo fue preparado por maceración a temperatura ambiente. Después de una filtración el extracto fue concentrado a presión reducida hasta sequedad a 40° C. 700 gramos de *B. ternifolia* fueron macerados en tres ocasiones en 8 L de metanol. El extracto metanólico de *B. ternifolia* fue fraccionado por CC usando Hex, CHCl<sub>3</sub> y MeOH y mezclas de ellos en grado creciente de polaridad. Las fracciones primarias ricas en la mezcla de AU/AO fueron purificadas. Estos triterpenos fueron detectados utilizando CCF y referencias comerciales (SIGMA).

Las fracciones primarias ricas en AU/AO fueron extraídas por lavados sucesivos de acetonitrilo (3 veces, 20 mL/g) y CHCl<sub>3</sub> (3 veces, 10 mL/g). En cada caso, el sobrenadante fue filtrado en un equipo millipore utilizando microfiltros de 0.45 µm GH Polypro 47mm filter (Pall). El residuo sólido se disolvió en MeOH (20 mL/g) y filtrado en el mismo equipo millipore. Posteriormente, esta solución metanólica fue tratada por agitación con carbón activado (SIGMA, 100 mg/20 mL) durante 10 minutos. Finalmente esta solución fue filtrada en el mismo equipo y concentrada por evaporación bajo presión reducida a 40° C hasta sequedad.

#### ***5.4 Estudios de toxicidad aguda y subaguda en ratones BALB/c.***

Los experimentos fueron realizados en ratones de la cepa BALB/c machos y hembras (19-23 g), siguiendo los métodos descritos en el anexo V del ECB (OECD, 2008). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones ambientales y fueron alimentados con acceso libre a comida y agua con fotoperiodos de 12 horas de luz oscuridad. Los compuestos se disolvieron en aceite de olivo extra virgen ajustando la concentración a un volumen de administración de 0.1 mL por ratón por vía subcutánea (s.c.).

##### ***5.4.1 Toxicidad aguda (Dosis letal media DL<sub>50</sub>).***

Este experimento se realizó de acuerdo al procedimiento TC423 de la OECD, un grupo de 3 animales de cada sexo fue administrado por vía s.c. a dosis única de 300 mg/kg. El estado de salud general de los animales fue observado después de 1, 2, 4 y 6 horas y una vez diariamente por 14 días. Los animales fueron observados después del tratamiento para detectar cualquier signo de toxicidad o incluso la muerte. Al final del periodo de observación los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, los órganos (pulmón, riñones, corazón, bazo e hígado) fueron extraídos y se realizaron observaciones macroscópicas en busca de lesiones patológicas. El valor de DL<sub>50</sub> fue determinado de acuerdo al Globally Harmonised Classification System (GHS) y de acuerdo con el diagrama de flujo utilizado para este estudio (OECD, 2008).

#### ***5.4.2 Toxicidad subaguda (dosis repetida por 28 días).***

De acuerdo con el método OECD TG407, cuatro grupos de 5 animales por sexo fueron divididos al azar. El grupo I fue el control, el grupo II fue el control de vehículo, y los grupos III y IV fueron tratados por vía s.c. con la mezcla de AU/AO a las dosis de 6.5 y 13 mg/kg por 28 días. Estas dosis corresponden a 5 y 10 veces la CMI *in vitro* de la mezcla contra *M. tuberculosis* H37Rv. Los animales se pesaron semanalmente y otros signos de toxicidad fueron observados diariamente. Al final del tratamiento (día 28) los animales se dejaron en ayuno durante 12 hrs con acceso libre de agua. Los ratones fueron anestesiados con xilazina y ketamina y posteriormente se tomaron muestras de sangre heparinizada para determinar cuenta total de células blancas y células rojas. Y se obtuvo suero a partir de sangre no heparinizada colectado para determinar química sanguínea y realizar un análisis de actividad enzimática.

#### ***5.4.3 Estudio histopatológico.***

Todos los animales fueron sometidos a eutanasia y sus órganos vitales fueron removidos, pesados y observados macroscópicamente. Después de estas observaciones se tomaron fragmentos de bazo, estómago, corazón, intestino, piel, pulmón, hígado y riñones y se fijaron en una solución de formaldehído al 10%. Estos tejidos se procesaron en etanol y xileno a diversas concentraciones de manera sucesiva para finalmente embeberlos en bloques de parafina. Finalmente se realizaron micro-cortes de 5 mm a partir de estos bloques empleando un microtomo y se montaron en portaobjetos de vidrio que fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Se tomaron algunas imágenes usando una cámara conectada al microscopio para examinar daño estructural y celular.

### **5.5 Modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c.**

El modelo murino experimental de TB pulmonar progresiva ha sido descrito previamente (Hernández-Pando *et al.*, 1997; Hernández-Pando *et al.*, 1996a). Para la infección de los animales se utilizaron dos cepas de *M. tuberculosis*: una cepa de referencia H37Rv (cepas pansensible a los fármacos de primera línea) y un aislado clínico MFR (CIBIN/UMF 15:99, resistente a los antibióticos de primera línea (I, R, , etambutol, estreptomycin y pirazinamida). Ambas cepas fueron cultivadas por separados en medio Youman modificado de Proskauer y Beck (Laboratorios Difco. Detroit, MI). Después de cuatro semanas de crecimiento las micobacterias fueron cosechadas, se contaron y se determinó su viabilidad por citometría de flujo. Estas micobacterias fueron suspendidas en buffer de fosfatos (PBS) conteniendo 0.05% de tween 80 y mantenidas en agitación con perlas de vidrio por 10 min. La suspensión fue centrifugada por 1 min a 350 rpm, el sedimento fue resuspendido y ajustado a  $2.5 \times 10^5$  micobacterias en 100  $\mu$ L de PBS.

Para el experimento se emplearon ratones BALB/c machos de 6-8 semanas de edad, los cuales fueron anestesiados con sevoflurano e infectados por vía intratraqueal con  $2.5 \times 10^5$  bacterias viables resuspendidas en 100  $\mu$ L de PBS. Los animales infectados fueron mantenidos en observación durante dos meses (tiempo en que desarrollan la enfermedad) en grupos de 10 animales en cajas con microaisladores conectados a presión negativa. Todos los procedimientos se realizaron en una campana de bioseguridad biológica clase III. Este protocolo fue aprobado por el Comité de ética para animales de experimentación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición.

Los ratones que sobrevivieron después de 60 días de inducida la infección con las cepas H37Rv o MFR fueron distribuidos al azar en cuatro grupos. El tratamiento con los compuestos a evaluar inicio al día 60 post-infección y se administraron durante 60 días realizando sacrificios a diferentes tiempos. Posterior a cada periodo de tratamiento, de cada grupo de experimentación se tomaron 5 ratones infectados con la cepa H37Rv o MFR y fueron sacrificados por exanguinación bajo anestesia. Todos los datos

representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $\pm$ DE) de al menos 3 ratones por cada experimento.

Se realizaron tres experimentos independientes, el primer experimento se realizó en ratones infectados con la cepa H37Rv, estos fueron divididos en tres grupos y administrados cada tercer día: el primer grupo fue administrado con la quimioterapia convencional por vía I.G. compuesta de R (10 mg/kg), I (10 mg/kg) y pirazinamida (30 mg/kg). El segundo grupo recibió la mezcla de triterpenos (100  $\mu$ g/ratón) por vía s.c. en combinación con la quimioterapia convencional por vía I.G. El tercer grupo de ratones tuberculosos recibió únicamente el vehículo (100  $\mu$ L de aceite de olivo extravirgen, SIGMA) por vía s.c.. Para este experimento se sacrificaron grupos de 5 animales a los 7, 14, 28 y 60 días de tratamiento.

En el segundo experimento, los ratones infectados con la cepa H37Rv fueron divididos en tres grupos y administrados cada tercer día; el primer grupo fue administrado con la mezcla de AU/AO (100  $\mu$ g/ratón). El segundo grupo recibió el vehículo (100  $\mu$ L de aceite de olivo extravirgen por administración) y el tercero fue un grupo control que no recibió ningún tratamiento. Para este experimento se sacrificaron grupos de 5 animales a los 30 y 60 días de tratamiento. El tercer experimento fue similar al segundo con la única diferencia de que los animales fueron infectados con la cepa MFR CIBIN/UMF 15:99.

El efecto antituberculoso de la mezcla de AU/AO fue determinado por cuantificación de la carga bacteriana en los pulmones (Unidades Formadoras de Colonias, UFC), área del tejido afectado por neumonía por histopatología-morfometría y determinación de los niveles de expresión de INF- $\gamma$ , iNOs y TNF- $\alpha$ , por RT-PCR en tiempo real para cada uno de los tres experimentos.

### ***5.5.1 Determinación de las unidades formadoras de colonias en pulmones infectados.***

Los pulmones derechos de tres ratones por cada tiempo de sacrificio fueron utilizados para esta determinación. Los pulmones fueron homogenizados con un politrón (Kinematica, Luzern, Suiza) en tubos estériles conteniendo 1 mL de PBS- tween 80 al 0.05%. Cuatro o cinco diluciones de cada homogenizado fueron sembrados por duplicado en placas conteniendo agar Middlebrook 7H10 (laboratorios Difco, Detroit MI) enriquecido con ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa (Becton, Dickinson y Compañía, Sparks, MD). El número de colonias fue contado después de 14 días de incubación y se reporta el promedio de dos diluciones que no excedan el crecimiento de 40 colonias.

### ***5.5.2 Estudio histológico-morfométrico.***

Para el estudio histológico, tres pulmones izquierdos fueron intratraquealmente perfundidos con etanol absoluto (J.T. Baker). Las secciones parasagitales de los órganos fueron deshidratadas y embebidas en parafina grado histológica (McCormick Scientific), cortadas y teñidas con hematoxilina y eosina. El porcentaje del pulmón afectado por neumonía fue determinado utilizando un analizador de imágenes (Q Win Leica, Milton Keynes, UK). Las mediciones fueron tomadas a ciego y los datos fueron reportados como la media  $\pm$ DE de 3 ratones diferentes en cada tiempo de los tres diferentes experimentos.

### ***5.5.3 Análisis de la expresión de INF- $\gamma$ , iNOs y TNF- $\alpha$ por RT-PCR en tiempo real en pulmones infectados.***

Tres pulmones derechos o izquierdos restantes de cada grupo (inicialmente se tienen 10 pulmones provenientes de 5 animales) fueron usados para aislar RNA de los diferentes

grupos de ratones en cada tiempo de sacrificio usando el minikit RNeasy (Qiagen, Hilden Alemania). Cada pulmón fue colocado en 2 mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-Invitrogen life Technologies, Carisbad, CA) conteniendo 0.5 mg/mL de colagenasa tipo 2 (Worthington, Lakewood NJ), e incubado por 1 hr a 37°C, después el pulmón fue macerado utilizando un émbolo de jeringa y se hizo pasar a través de un filtro estéril de 70 µm (BD Biosciences, Bedford, MA). Las células obtenidas fueron centrifugadas a 1500 rpm por 1 min a 4° C y lavadas con medio RPMI. Después el sobrenadante fue removido y las células rojas fueron lisadas con 1 mL de buffer de lisis (cloruro de amonio 0.34 M, EDTA 0.12 mM y carbonato de potasio 1 mM), finalmente las células fueron lavadas y centrifugadas bajo las mismas condiciones mencionadas.

A las células obtenidas se les agrego 350 µL del buffer de lisis para células o tejidos (RLT-Qiagen, Hilden Alemania) con β-mercaptoetanol. El RNA se precipitó con etanol al 70% en agua libre de RNAsas, y se hizo pasar a través de una columna por centrifugación a 14000 rpm por 1 min a 4° C (esta columna presenta una propiedad de unión selectiva del RNA a la membrana de silicagel). El RNA unido a la columna se lavó con 700 µL de Buffer RW1 y posteriormente con 500 µL de Buffer RPE incluidos en el mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania), estos buffers permiten aislar moléculas de RNA de más de 200 pares de bases (pb) mediante la absorción a la membrana de silicagel, al mismo tiempo que los contaminantes son lavados y eluidos. Además, se produce un enriquecimiento en el RNA mensajero (RNAm), ya que muchos de los RNAs de menos de 200 nucleótidos (como el RNAr 5.8S, RNAr 5S y RNAt) son excluidos selectivamente. Finalmente, el RNA se recupero eluyendo con 50 µL de agua libre de RNAsas. El RNA fue tratado con una unidad de DNAsa (Invitrogen life technology, Carisbad CA) por cada µg de RNA. La calidad y cantidad del RNA también fueron evaluadas por espectrofotometría en un equipo Nanodrop (260nm/280nm) y geles de agarosa.

El ADN complementarios (cDNA) fue sintetizado a partir de 100 ng del RNA previamente obtenido, utilizando el kit omniscrypt RT (Qiagen, Hilden, Alemania) y oligo dT (Promega corporation Madison WI). La expresión del gliceraldehido-3-

fosfato deshidrogenasa (G3PDH) fue determinada por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) convencional, los cDNAs fueron amplificados con la DNA Polimerasa Hot Start Taq (Qiagen, USA).

La PCR en tiempo real fue desarrollada utilizando el equipo 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, USA). Se utilizaron 100 ng de cDNA, 12.5  $\mu$ L de la mezcla Quantitect SYBR Green PCR (Qiagen,USA). QuantiTect SYBR Green PCR Buffer: (que contiene Tris-Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8.7), la mezcla de dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP), SYBR green I y ROX), 50 pmol del iniciador sentido y 50 pmol del iniciador antisentido.

La formación de sólo un producto de PCR y el tamaño esperado del gen amplificado se confirmó por electroforesis del producto de PCR. Las alícuotas de los productos de PCR fueron usadas para la cuantificación en un gel por la medición y la comparación de las intensidades de los fragmentos teñidos con Sybr Green con un marcador de masa de DNA (Invitrogen). La curva estándar fue generada con una serie de diluciones seriadas de cada una de las citocinas. Las curvas estándar de productos de PCR cuantificados y diluidos, así como controles negativos, se incluyeron en cada corrida de PCR. Los iniciadores específicos fueron diseñados utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems, USA) para los siguientes blancos:

G3PDH: 5'-ggcgctcaccaaaacatca-3', 5'- ccggaatgccattcctgtta -3',

iNOS: 5'-agcgaggagcaggtggaag-3', 5'-catttcgctgtctcccaa-3',

TNF- $\alpha$ : 5'-tgtggcttcgacctctacctc-3', 5'-gccgagaaaggctgcttg-3',

IFN- $\gamma$ : 5'- ggtgacatgaaaatcctgcag-3', 5'-cctcaaactggcaatactcatga-3'.

Las condiciones fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguidas por 40 ciclos a 95°C por 20 seg, 60°C o 58°C por 20 seg, 72°C por 34 seg. La cantidades del RNAm específico en la muestra fueron medidas de acuerdo a lo que corresponde el gen específico estándar. El número de copias RNAm de cada citocina estuvieron relacionadas con un millón de copias de RNAm que codifican para el gen de G3PDH.

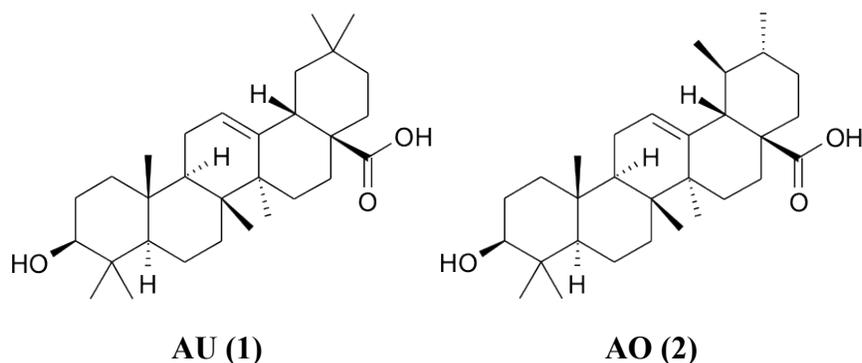
### ***5.6 Análisis estadístico***

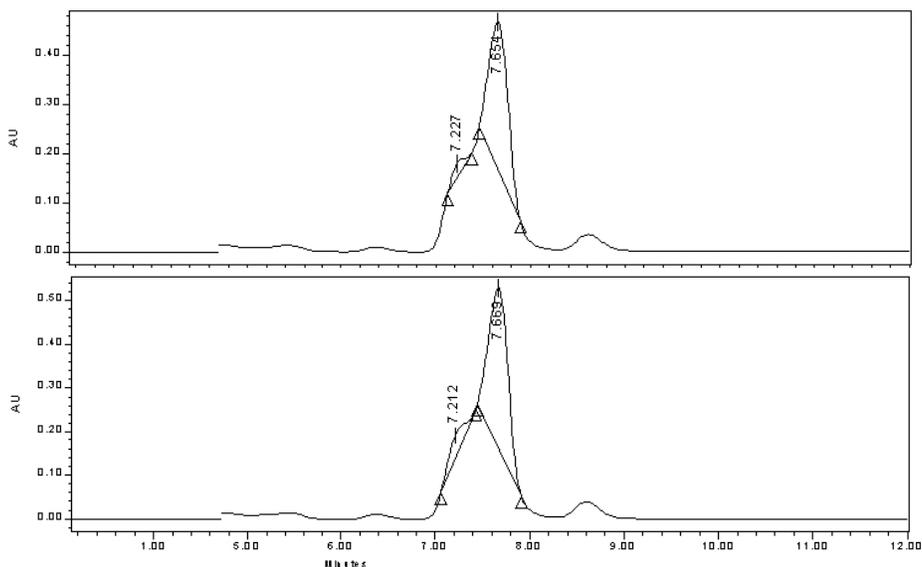
Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). La diferencia significativa fue determinada por análisis de varianza (ANOVA) y una prueba post-hoc (Bonferroni post-test) en caso de encontrar diferencia significativa.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Extracción y aislamiento

Investigaciones previas indican que *B. ternifolia* biosintetiza AU y AO (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 1998). Es por eso que se decidió realizar un estudio químico a partir del extracto MeOH de esta planta. Se obtuvieron 82 gramos de extracto crudo por maceración de las partes aéreas de *B. ternifolia* (700 gramos de material seco) con una eficiencia de 11.7 %. Después de procedimientos cromatográficos sucesivos se obtuvieron 3 gramos de la mezcla de AU (1)/AO (2) concentración 2:1. La mezcla fue caracterizada estructuralmente por datos de RMN-<sup>1</sup>H y EM-IE (Espectros 1 a 4, Anexo) y comparada con datos de la referencia comercial (SIGMA). Esta mezcla de AU/AO fue obtenida como polvo blanco con punto de fusión de 268-270.8°C, similar al valor para la referencia comercial SIGMA p.f. de 276.2-279.5°C. Por análisis de CLAR se encontró que los compuestos obtenidos a partir de su fuente natural tienen tiempos de retención (T<sub>R</sub>) similares. Los cromatogramas muestran dos picos con R<sub>T</sub> de 7.21 y 7.67 para AU/AO obtenido de *B. ternifolia* y picos con R<sub>T</sub> de 7.22 y 7.65 para la referencia comercial (Figura 1).





Arriba: Cromatograma de CLAR de la mezcla de AU/AO 1:1 (SIGMA)  $T_R = 7.22$  y  $7.65$ ;  
 Abajo: Cromatograma de CLAR de la mezcla AU/AO 2:1 (*B. ternifolia*)  $T_R = 7.21$  and  $7.67$ .

**Figura 1.** Cromatogramas comparativos de la mezcla de AU/AO de marca SIGMA y obtenido a partir de *B. ternifolia* por CLAR.

## 6.2 Toxicidad aguda (dosis letal media $DL_{50}$ ).

La  $DL_{50}$  de la mezcla de AU/AO obtenida a partir de *B. ternifolia* fue superior a 300 mg/kg en ratones de la cepa BALB/c de ambos sexos de acuerdo con el método TG423. A esta dosis no se observaron signos de toxicidad o muerte durante los 14 días posteriores al tratamiento cuando los animales son administrados por vía s.c.

No se realizaron evaluaciones a dosis superiores tomando en cuenta que las concentraciones que tienen actividad biológica para este tipo de compuestos son mucho menores; por ejemplo la  $DE_{50}$  como agente anti-inflamatorio es de  $56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para AU y  $132 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para AO. Como agente antimicobacteriano la CMI es  $\leq 50 \mu\text{g}/\text{mL}$  y como agente hepatoprotector  $200 \mu\text{mol}/\text{kg}$  (Cantrell *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2004b; Ismaili *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1994; Wachter *et al.*, 1999; Wachter *et al.*, 2001). En artículos previos se ha descrito que la  $CL_{50}$  para AU y AO es de 0.10 y 0.95 mg/mL, respectivamente en *A. salina*. En el año 2001 se describió la existencia de una

correlación directa entre la  $CL_{50}$  determinada en *A. salina* y la  $DL_{50}$  determinada en ratones (Logarto Parra *et al.*, 2001), de acuerdo con esta correlación podríamos esperar una  $DL_{50}$  superior a los 5000 mg/kg para AU y AO.

### ***6.3 Toxicidad subaguda (Dosis repetida por 28 días).***

En el estudio de toxicidad subaguda no se encontraron signos o síntomas de toxicidad (como piloerección o alteraciones en la actividad motora) o casos de muerte en los grupos tratados cuando fueron comparados con los grupos control para animales de ambos sexos. Los pesos de los ratones no presentan variaciones significativas durante el periodo de tratamiento (Tabla 1). Los pesos de los diferentes órganos no presentan diferencias significativas al ser comparados con el grupo control y el grupo vehículo (Tabla 2). Los órganos internos no muestran ningún tipo de lesión morfológica macroscópica. Los resultados obtenidos indican que la mezcla de AU/AO no afecta el crecimiento de los ratones durante el periodo de tratamiento ni afecta el peso de los diferentes órganos.

**Tabla 1.** Peso de ratones BALB/c en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla de AU/AO.

	Peso (g)						Peso ganado al día 14	
	Día 0		Día 14		Día 28			
<b>Hembras</b>								
Control	20.78	± 0.57	21.43	± 0.71	21.93	± 0.70	1.30	± 0.46
Vehículo	21.02	± 0.43	22.06	± 0.16	22.92	± 0.14	2.18	± 0.13
AU/AO <sup>a</sup>	20.67	± 0.25	21.80	± 0.55	22.62	± 0.69	1.95	± 0.55
AU/AO <sup>b</sup>	21.12	± 0.51	22.11	± 0.34	22.61	± 0.28	1.85	± 0.31
<b>Machos</b>								
Control	20.73	± 0.65	22.30	± 0.79	24.08	± 1.45	2.35	± 0.80
Vehículo	20.23	± 0.64	23.25	± 0.38	25.08	± 0.65	3.02	± 0.52
AU/AO <sup>a</sup>	20.23	± 0.64	23.25	± 0.38	25.08	± 0.65	3.02	± 0.52
AU/AO <sup>b</sup>	20.18	± 0.30	22.57	± 0.53	24.10	± 0.91	2.39	± 0.44

Los valores son expresados como el promedio ± el error estándar de la media (SEM), n= 5; AU = ácido ursólico; AO= ácido oleanólico; AU/AO<sup>a</sup> = grupo administrado con 6.5 mg/kg y AU/AO<sup>b</sup> = grupo administrado con 13 mg/kg.

**Tabla 2.** Peso de diferentes órganos en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla de AU/AO.

	Peso de órganos (g)							
	Control		Vehículo		AU/AO <sup>a</sup>		AU/AO <sup>b</sup>	
<b>Hembras</b>								
Bazo	0.45	± 0.02	0.54	± 0.07	0.54	± 0.02	0.53	± 0.02
Corazón	0.51	± 0.03	0.48	± 0.09	0.53	± 0.08	0.52	± 0.02
Hígado	4.24	± 0.55	4.31	± 0.12	4.34	± 0.30	4.23	± 0.09
Riñón	1.14	± 0.02	1.13	± 0.05	1.12	± 0.08	1.14	± 0.05
Pulmón	0.71	± 0.02	0.66	± 0.09	0.75	± 0.02	0.71	± 0.02
Cerebro	1.77	± 0.03	1.81	± 0.10	1.80	± 0.08	1.79	± 0.05
<b>Machos</b>								
Bazo	0.41	± 0.00	0.41	± 0.04	0.47	± 0.03	0.51	± 0.06
Corazón	0.63	± 0.03	0.61	± 0.06	0.59	± 0.09	0.63	± 0.03
Hígado	4.71	± 0.61	4.86	± 0.36	4.87	± 0.08	4.99	± 0.16
Riñón	1.43	± 0.05	1.40	± 0.05	1.44	± 0.02	1.40	± 0.13
Pulmón	0.72	± 0.05	0.72	± 0.03	0.60	± 0.03	0.75	± 0.05
Cerebro	1.53	± 0.06	1.50	± 0.10	1.51	± 0.04	1.48	± 0.03

Los valores son expresados como el promedio ± el error estándar de la media (SEM), n= 5; AU = ácido ursólico; AO= ácido oleanólico; AU/AO<sup>a</sup> = grupo administrado con 6.5 mg/kg y AU/AO<sup>b</sup> = grupo administrado con 13 mg/kg.

La actividad de la médula ósea y los posibles efectos intravasculares fueron monitoreados mediante un examen de biometría hemática, los resultados son reportados en las Tablas 3 y 4. Los valores de leucocitos (WBC), linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, basófilos, eritrocitos (RBC), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), volumen corpuscular medio (VCM) y promedio de la concentración de hemoglobina corpuscular (CHCM) no mostraron ninguna variación. En consecuencia, la administración de AU/AO a dosis de 6.5 y 13 mg/kg por un periodo de 28 días, no induce ninguna alteración en los parámetros hematológicos.

**Tabla 3.** Valores hematológicos de ratones BALB/c en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla de AU/AO.

	Grupo							
	Control		Vehículo		AU/AO <sup>a</sup>		AU/AO <sup>b</sup>	
<b>Hembras</b>								
RBC × (10 <sup>6</sup> /uL)	9.28	± 0.31	9.64	± 0.26	8.83	± 0.73	8.76	± 1.09
Hb (g/dL)	14.80	± 0.32	14.65	± 1.24	16.03	± 0.95	15.35	± 2.06
Hto (%)	45.20	± 1.79	47.33	± 1.85	42.53	± 3.53	41.68	± 4.85
VCM (fL)	48.70	± 0.75	49.08	± 0.64	48.38	± 0.31	47.63	± 0.36
CHCM (g/dL)	32.73	± 1.07	32.35	± 1.53	36.10	± 2.03	36.37	± 2.16
<b>Machos</b>								
RBC × (10 <sup>6</sup> /uL)	9.65	± 0.71	9.71	± 0.67	9.15	± 0.33	8.32	± 0.96
Hb (g/dL)	15.94	± 0.67	16.04	± 1.09	15.95	± 0.35	14.75	± 1.63
Hto (%)	46.34	± 2.61	46.74	± 2.68	43.70	± 1.13	39.80	± 5.66
VCM (fL)	48.08	± 1.19	48.16	± 0.86	47.80	± 0.57	47.75	± 1.34
CHCM (g/dL)	34.40	± 0.65	34.38	± 1.54	36.60	± 0.00	37.05	± 1.20

Los valores son expresados como el promedio ± el error estándar de la media (SEM), n= 5; RBC = eritrocitos; Hb = Hemoglobina; Hto = Hematocrito; VCM = Volumen corpuscular medio; CHCM = promedio de la concentración de hemoglobina corpuscular. AU/AO<sup>a</sup> = grupo administrado con 6.5 mg/kg y AU/AO<sup>b</sup> = grupo administrado con 13 mg/kg.

**Tabla 4.** Cuenta diferencial de células blancas de ratones BALB/c en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla de AU/AO.

	Grupo							
	Control		Vehículo		AU/AO <sup>a</sup>		AU/AO <sup>b</sup>	
<b>Hembras</b>								
WBC (x× 10 <sup>3</sup> /uL)	3.53	± 1.37	2.73	± 0.89	5.08	± 2.52	2.70	± 1.59
Linfocitos (%)	84.50	± 6.61	82.25	± 12.76	87.50	± 5.26	85.00	± 5.16
Neutrófilos (%)	13.00	± 5.03	16.75	± 11.35	12.50	± 5.26	13.25	± 4.11
Eosinófilos (%)	0.50	± 1.00	1.00	± 2.00	0.50	± 1.00	1.75	± 2.06
Monocitos (%)	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00
Basófilos (%)	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00
<b>Machos</b>								
WBC (x× 10 <sup>3</sup> /uL)	6.52	± 1.47	5.80	± 3.11	5.20	± 1.98	2.80	± 1.41
Linfocitos (%)	78.00	± 2.58	81.10	± 6.23	80.50	± 4.95	78.50	± 3.54
Neutrófilos (%)	20.50	± 5.97	18.25	± 2.36	17.00	± 2.83	19.00	± 9.90
Eosinófilos(%)	0.40	± 0.89	0.80	± 1.10	2.50	± 0.71	2.20	± 0.00
Monocitos (%)	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00
Basófilos (%)	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00

Los valores son expresados como el promedio ± el error estándar de la media (SEM), n= 5; AU = ácido ursólico; AO= ácido oleanólico; WBC= leucocitos; AU/AO<sup>a</sup> = grupo administrado con 6.5 mg/kg y AU/AO<sup>b</sup> = grupo administrado con 13 mg/kg.

Los resultados del estudio de química sanguínea muestran que la administración de la mezcla de AU/AO no causa ninguna alteración en el metabolismo de lípidos, ya que los valores de colesterol total, colesterol de alta densidad (HDL) y triglicéridos no presentan ninguna diferencia significativa entre los grupos tratados respecto al grupo control (Tabla 5).

De manera similar, los valores de glucosa no presentan diferencia significativa entre ambos grupos, lo que indica que la mezcla de estos compuestos no induce ninguna alteración en el metabolismo de carbohidratos (Tabla 5). Los resultados de ácido úrico y creatinina no muestran ninguna diferencia significativa, esto indica que la función renal no resulta alterada. Finalmente se evaluaron dos marcadores de daño hepático: transaminasa glutámica oxalacética (sGOT) y transaminasa glutámico pirúvica (sGPT); los resultados revelan que no existe diferencia entre los grupos tratados y el grupo control.

**Tabla 5.** Valores de química sanguínea de ratones BALB/c en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla de AU/AO.

	Grupo							
	Control		Vehículo		AU/AO <sup>a</sup>		AU/AO <sup>b</sup>	
<b>Hembras</b>								
Ácido úrico (mg/dL)	1.46	± 0.11	1.44	± 0.11	1.50	± 0.12	1.47	± 0.57
Creatinina (mg/dL)	1.78	± 0.09	1.86	± 0.09	1.86	± 0.14	1.81	± 0.11
Triglicéridos (mmol/L)	0.98	± 0.13	0.94	± 0.13	0.96	± 0.15	0.74	± 0.05
Colesterol HDL (mmol/L)	8.12	± 0.23	8.24	± 0.23	8.24	± 0.38	8.28	± 0.18
Colesterol total (mmol/L)	10.60	± 0.45	10.80	± 0.45	10.80	± 0.45	10.40	± 0.55
sGPT (U/L)	32.60	± 2.51	32.40	± 2.51	32.60	± 2.41	35.60	± 1.52
sGOT (U/L)	117.60	± 10.13	120.20	± 10.13	118.60	± 9.29	124.20	± 8.73
Glucosa (mg/dL)	373.60	± 24.39	356.80	± 24.39	374.67	± 26.08	363.67	± 18.01
<b>Machos</b>								
Ácido úrico (mg/dL)	1.18	± 0.16	1.20	± 0.19	1.26	± 0.18	1.16	± 0.21
Creatinina (mg/dL)	1.75	± 0.09	1.76	± 0.05	1.71	± 0.09	1.81	± 0.05
Triglicéridos (mmol/L)	0.68	± 0.08	0.68	± 0.08	0.74	± 0.09	0.72	± 0.08
Colesterol HDL (mmol/L)	10.82	± 0.57	10.24	± 0.47	10.48	± 0.38	10.54	± 0.32
Colesterol total (mmol/L)	13.80	± 0.84	14.40	± 1.52	13.20	± 0.84	13.80	± 0.45
sGPT (U/L)	34.00	± 3.00	36.20	± 2.17	33.60	± 2.19	34.40	± 1.67
sGOT (U/L)	128.80	± 15.99	129.80	± 11.01	123.00	± 14.27	121.80	± 18.51
Glucosa (mg/dL)	423.80	± 12.58	421.80	± 13.48	420.40	± 12.66	425.40	± 16.32

Los valores son expresados como el promedio ± el error estándar de la media (SEM), n= 5; AU = ácido ursólico; AO= ácido oleanólico; sGPT = transaminasa glutámico pirúvica; sGOT = transaminasa glutámica oxalacética.; AU/AO<sup>a</sup> = grupo administrado con 6.5 mg/kg y AU/AO<sup>b</sup> = grupo administrado con 13 mg/kg.

### 6.3.1 Estudio histopatológico

Como parte complementaria del estudio de toxicidad subaguda se realizó un examen histopatológico de bazo, riñón, hígado, corazón, estómago, intestino, piel, y pulmón de los animales tratados con la mezcla de AU/AO a 13 mg/kg. Cortes histológicos de bazo de los animales tratados con la mezcla de AU/AO (Figura 2) muestran una arquitectura normal de este órgano, con folículos linfoides normales; estas observaciones confirman que la mezcla de triterpenos no produce alteraciones a nivel hematológico, ya que los valores de RBC y WBC no resultaron afectados. Secciones de riñón de los animales tratados con la mezcla de triterpenos muestran una corteza renal normal con apariencia normal de glomérulos y túbulos; sin embargo de existir alguna alteración en la función renal los valores de ácido úrico y creatinina estarían alterados en los grupos tratados (Carvalho *et al.*, 2011).

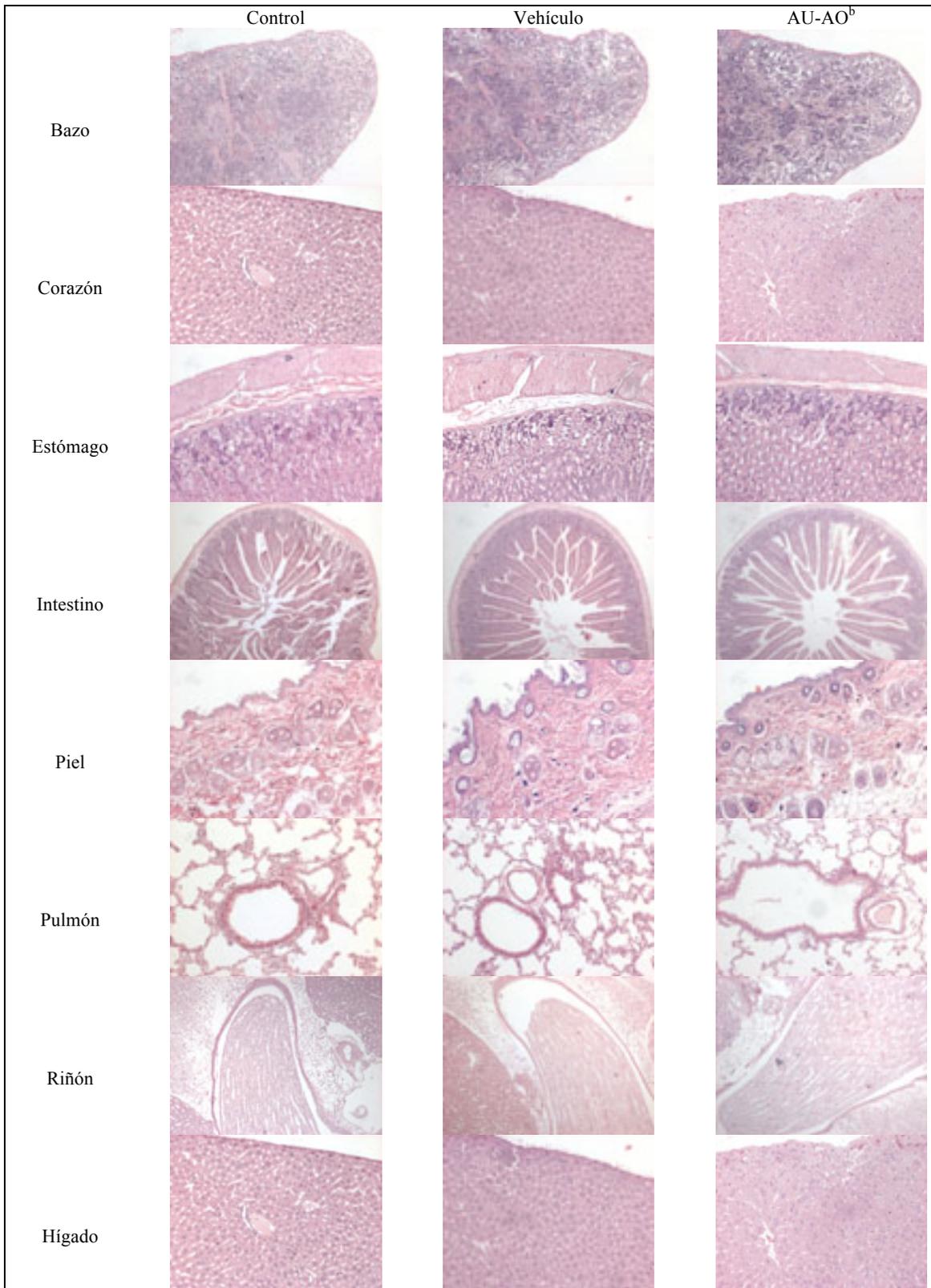
Los cortes hepáticos muestran una arquitectura normal de hepatocitos, triada portal y vena central (Figura 2); estas observaciones empleadas para identificar daño celular, en combinación con los niveles séricos de las transaminasas, son determinaciones esenciales para la búsqueda y reconocimiento de daño inducido por xenobióticos (Carvalho *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011).

Otros órganos analizados histológicamente fue el corazón; en este caso los cortes muestran una estructura normal del miocardio y endocardio, además de una arquitectura muscular normal. Secciones de intestino y estómago muestran que la mucosa, submucosa y los músculos longitudinales no presentan ningún tipo de daño. Muestras de piel mostraron que no existe daño en epidermis, dermis, estrato corneo, folículo piloso y glándulas sebáceas, finalmente cortes de pulmón mostraron una geometría alveolar normal (Figura 2).

Los estudios histológicos y la determinación de parámetros hematológicos y bioquímicos son esenciales para la evaluación del riesgo toxicológico de sustancias con actividad biológica, debido a que cualquier cambio en estos parámetros posee un alto grado de valor predictivo sobre posible daño en humanos cuando estos datos son trasladados a partir de estudios en animales (Olson *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2011).

Las plantas medicinales y sus derivados han sido empleados en muchos países como una alternativa a la medicina alopática. A pesar de su amplio uso, existen pocos estudios que evalúen la seguridad y eficacia de los remedios tradicionales o de compuestos puros obtenidos a partir de plantas medicinales (Silva *et al.*, 2011). En el caso de TB es importante mencionar que dos de las drogas de primera línea (R e I) causan hepatotoxicidad (Saravanan y Pugalendi, 2006; Yogeeta *et al.*, 2007), efecto que ha influido en la adherencia y abandono al tratamiento; por otro lado es importante conocer el efecto tóxico de posibles agentes antituberculosos, antes de determinar su actividad en modelos *in vivo*. En el caso de la mezcla de AU/AO se ha descrito que ambos compuestos presentan efecto hepatoprotector en modelos *in vivo*, cuando el daño hepático es inducido con etanol (Saravanan y Pugalendi, 2006) acetaminofén, CCL<sub>4</sub> y D-galactosamina entre otros (Lezhi y Xintang, 1992; Liu, 1995; Liu *et al.*, 1993).

También se ha descrito que el AO brinda efecto hepatoprotector en pacientes que han sido tratados con drogas antituberculosas (Liu *et al.*, 2008). Por lo anterior, esta mezcla de AU/AO podría ofrecer efectos benéficos adicionales a la actividad antituberculosa en pacientes tratados con fármacos anti-TB.



Bazo- x100, corazón- x100, estómago- x100, intestino- x40, piel- x100, pulmón- x100, riñón- x40 e hígado- x100 obtenidos de ratones tratados durante 28 días, teñidos con hematoxilina y eosina (H&E). AU = ácido ursólico; AO = ácido oleanólico. AU/AO<sup>b</sup> = grupo administrado con 13 mg/kg.

**Figura 2.** Cortes histológicos de diferentes tejidos de ratones BALB/c en el estudio de toxicidad subaguda de la mezcla AU/AO.

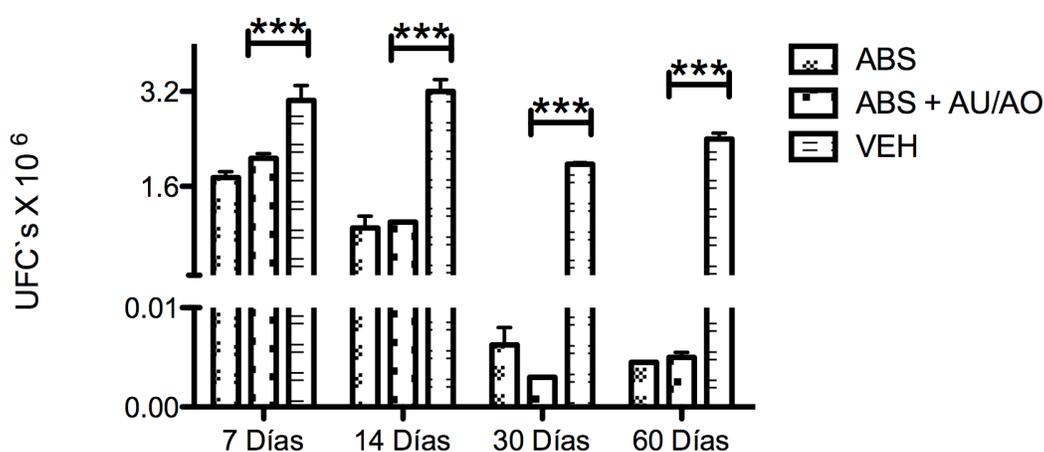
#### **6.4 Modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c**

La búsqueda de compuestos con actividad antituberculosa es necesaria debido al problema de salud mundial que representa la TB. En la literatura científica existen numerosos trabajos que describen la actividad *in vitro* de diversos compuestos de origen natural (terpenos, flavonoides, alcaloides, lignanos, etc) contra *M. tuberculosis* H37Rv, principalmente (Cantrell *et al.*, 2001; Copp y Pearce, 2007). Sin embargo, a la fecha no existe trabajo alguno que describa la actividad antituberculosa de este tipo de compuestos, debido principalmente a la disponibilidad de compuestos para realizar el ensayo *in vivo* (se requiere por lo menos 1 gr de compuesto puro), aunado a que los modelos de ensayo *in vivo* disponibles son escasos, prolongados y de alto costo por el mantenimiento de los animales (Marquina-Castillo *et al.*, 2009).

En un estudio preliminar, nuestro grupo de trabajo demostró que la mezcla de AU/AO redujo la carga bacilar y el porcentaje de neumonía de los animales (ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv) tratados por dos meses con esta mezcla comparado con la evaluación de los compuestos puros (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2010) ya la corregí en las referencias. Por lo que este proyecto se enfocó a evaluar el efecto antituberculoso de la mezcla de triterpenos (AU/AO) en el mismo modelo murino. A continuación se describen los resultados obtenidos de tres experimentos realizados.

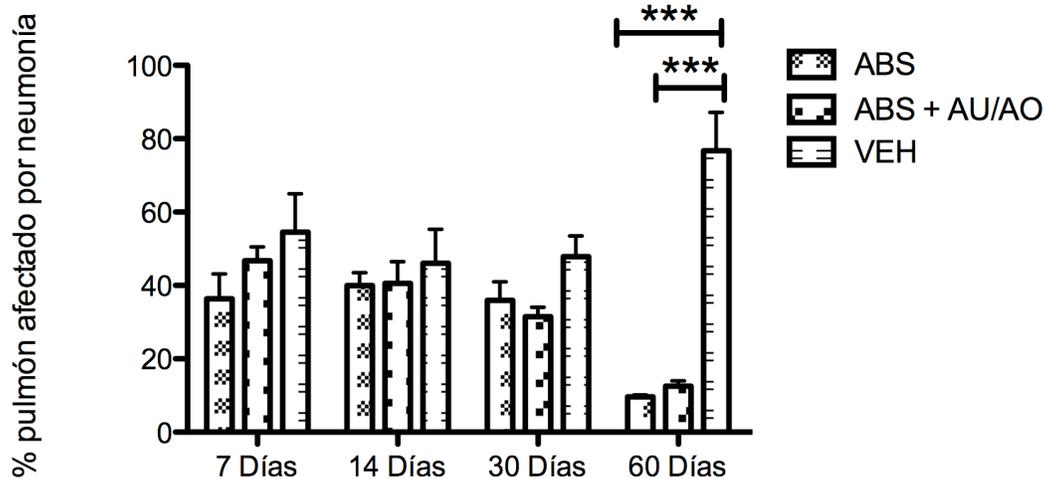
Los resultados obtenidos del primer experimento demostraron que la administración de 100 µg/ratón de la mezcla de AU/AO (2:1) en combinación con la mezcla de antibióticos a los ratones de la cepa BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, reducen significativamente las UFC durante el periodo de tratamiento, en este caso se observó esta reducción desde el día 7 ( $1.7 \times 10^6$  vs  $3.05 \times 10^6$  UFC's) al día 30 ( $3 \times 10^3$  vs  $1.97 \times 10^6$  UFC's) de tratamiento respecto al grupo que recibió el vehículo, este efecto se mantuvo al día 60 de la administración ( $5 \times 10^3$  vs  $2.4 \times 10^6$  UFC's), estos resultados se muestran en la Figura 3. El efecto sobre la reducción de la carga bacilar no presentó diferencia significativa entre el grupo que recibió antibiótico en relación al grupo que recibió antibiótico en combinación con la mezcla de AU/AO.

Respeto a la superficie de pulmón afectada por neumonía que presentaron los animales de este experimento (Figura 4), observamos que no existe una reducción significativa entre los tres grupos durante los primeros 30 días de tratamiento, por el contrario al día 60 se observó una reducción significativa, presentando un 12.5% de neumonía el grupo de antibiótico combinado con AU/AO y el grupo que recibió vehículo presentó un 76% de área neumónica. Sin embargo, no se presentó diferencia estadística entre el grupo que recibió la mezcla de antibióticos (9.6%) en comparación con el grupo tratado con antibióticos más la mezcla de triterpenos (12.5%). Cabe mencionar que este experimento se realizó con el fin de determinar si la mezcla de triterpenos AU/AO presentaba un posible efecto sinérgico cuando se administra en combinación con la quimioterapia convencional. Según los resultados obtenidos se observa que la mezcla de AU/AO no interfiere con el tratamiento de antibióticos y vehículo ya que no afectó estos parámetros.



ABS: mezcla de antibióticos (R, 10 mg/kg; I, 10 mg/kg y pirazinamida, 30 mg/kg) administrados por vía I.G.; AU/AO: mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico (100 µg/ratón/100 µL, administrado por vía s.c.); VEH: vehículo (aceite de olivo extravirgen, SIGMA). n= 3, \*\*\* p < 0.001. Se realizaron sacrificios a los días 7, 14, 30 y 60 de tratamiento.

**Figura 3.** Carga bacilar (UFC) en pulmones de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO en combinación con antibióticos convencionales.



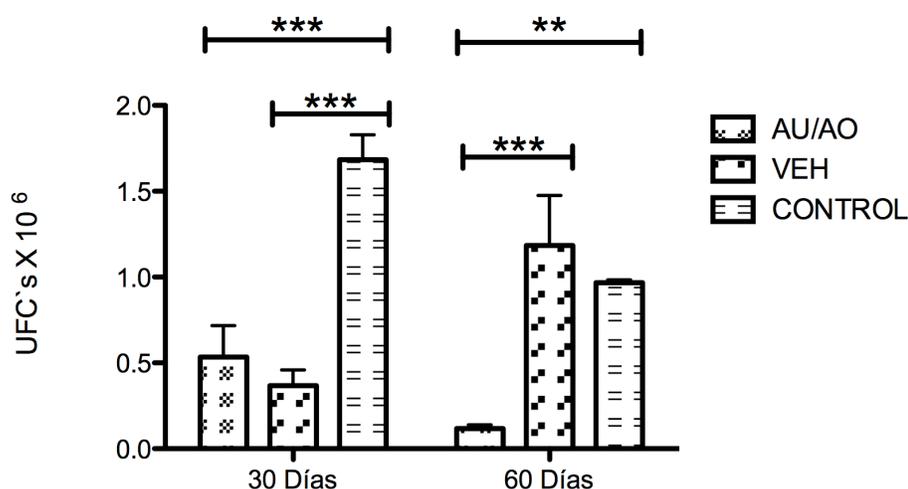
ABS: mezcla de antibióticos (R, 10 mg/kg; I, 10 mg/kg y pirazinamida, 30 mg/kg) administrados por vía I.G.; AU/AO: mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico (100  $\mu$ g/ratón/100  $\mu$ L, administrado por vía s.c.); VEH: vehículo (aceite de olivo extravirgen, SIGMA). n= 3, \*\*\* p < 0.001 Se realizaron sacrificios a los días 7, 14, 30 y 60 de tratamiento.

**Figura 4.** Porcentaje de neumonía en pulmones de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO en combinación con antibióticos convencionales.

El segundo experimento se realizó en la misma cepa de ratones, los cuales fueron infectados con *M. tuberculosis* H37Rv y se formaron tres grupos (I: tratado con la mezcla de AU/AO, 100  $\mu$ g/ratón; II: vehículo y III: control -sin tratamiento). En este caso los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 5 y 6. Respecto a la carga bacilar (Figura 5), se encontró que al día 30 de tratamiento la mezcla de triterpenos muestra una reducción significativa de las UFC's respecto al control ( $0.5 \times 10^6$  vs  $1.6 \times 10^6$ ); sin embargo, la reducción que muestra el vehículo sobre la carga bacilar ( $0.36 \times 10^6$ ) fue similar al del grupo tratado con la mezcla de AU/AO ( $0.5 \times 10^6$ ). Por el contrario, al día 60 de tratamiento la reducción de la carga bacilar fue significativa entre el grupo tratado con la mezcla de AU/AO ( $0.11 \times 10^6$ ) respecto a los grupos control ( $0.96 \times 10^6$ ) y vehículo ( $1.1 \times 10^6$ ). Estos resultados confirman que la mezcla de triterpenos presenta efecto bactericida, efecto que se había demostrado en ensayos *in vitro*; sin embargo este es el primer estudio que reporta su efecto *in vivo* en un

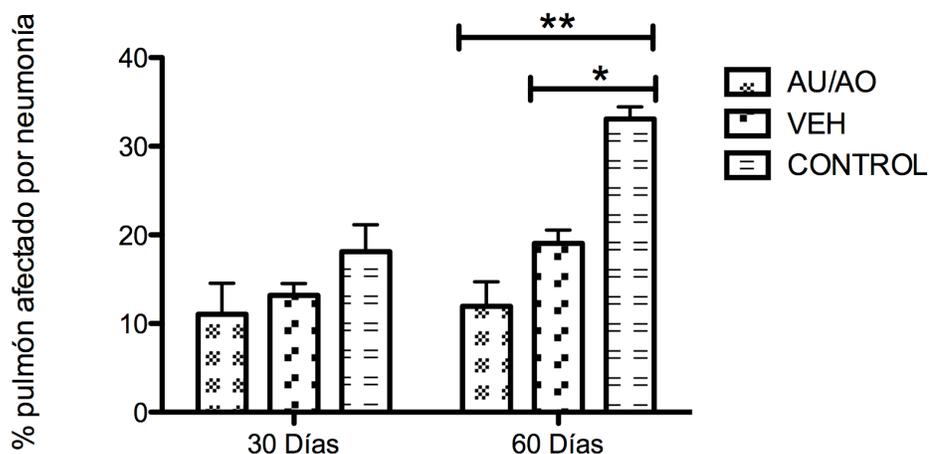
modelo murino (Cantrell *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2005; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2007; Pauli *et al.*, 2005).

El porcentaje de neumonía en estos grupos se muestra en la Figura 6, aquí se observó una reducción significativa, efecto que es más evidente en el grupo tratado con la mezcla de AU/AO al día 60 de tratamiento respecto al control, se observa una reducción del 50 % de neumonía en el grupo de animales tratados con la mezcla de AU/AO. Cabe mencionar que la reducción de la neumonía en el caso de los animales con TB está relacionada con el efecto antiinflamatorio de los triterpenos previamente demostrada, se ha descrito que estos compuestos inhiben la actividad de la 5-lipooxigenasa y la ciclooxigenasa-2 (COX2) (Ismaili *et al.*, 2004; Liu, 1995; Ringbom *et al.*, 1998). En el caso de la TB, el proceso inflamatorio es muy elevado, por lo que el efecto antiinflamatorio de los triterpenos contribuye a disminuir en forma significativa el porcentaje de neumonía. Cabe mencionar que en el tratamiento de la TB solo se emplean la mezcla de 4 antibióticos (R, I, estreptomycin y pirazinamida o ethambutol); sin embargo, la tendencia actual es cambiar el esquema de tratamiento y se recomienda administrar sustancias que coadyuven al tratamiento mediante el empleo de agentes antiinflamatorias o inmunomoduladores (Hernández-Pando *et al.*, 2005).



AU/AO: mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico (100 µg/ratón/100 µL, administrado por vía s.c.); VEH: vehículo (aceite de olivo extravirgen, SIGMA); CONTROL: animales no administrados. n= 3, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001. Se realizaron sacrificios a los días 30 y 60 de tratamiento.

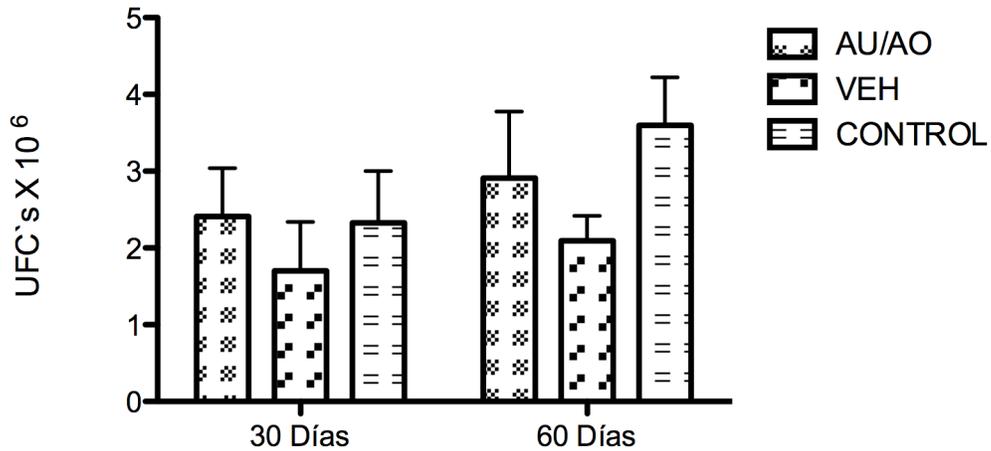
**Figura 5.** Carga bacilar (UFC) en pulmones de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO.



AU/AO: mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico (100 µg/ratón/100 µL, administrado por vía s.c.); VEH: vehículo (aceite de olivo extravirgen, SIGMA); CONTROL: animales no administrados. n= 3, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01. Se realizaron sacrificios a los días 30 y 60 de tratamiento.

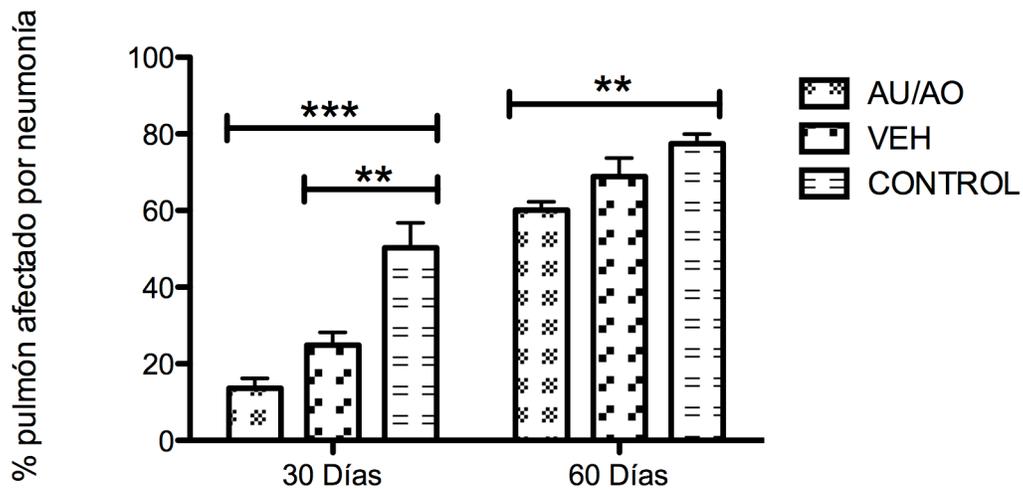
**Figura 6.** Porcentaje de neumonía en pulmones de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO.

El tercer experimento consistió en determinar el efecto antituberculoso de la mezcla de triterpenos (AU/AO) en ratones infectados con una cepa de *M. tuberculosis* MFR (CIBIN/UMF15:99, cepa resistente a los fármacos de primera línea). En este caso, los animales fueron tratados con la misma dosis y por la misma vía de administración durante 60 días y los animales fueron sacrificados al día 30 y 60 de tratamiento. Los resultados de la carga bacilar se muestran en la Figura 7, aquí se observa que las UFC's no se reducen al día 30 de tratamiento y solo se observa una ligera reducción al día 60, es importante señalar que en este caso el grupo que recibió el vehículo es el presenta menor carga bacilar que el tratado con AU/AO y control; sin embargo, estas diferencias no son significativas. Respecto al porcentaje de neumonía (Figura 8), se observa que disminuye el área afectada al día 30 de tratamiento respecto al control, mientras que al día 60 sólo se observa una ligera disminución significativa respecto al control y vehículo.



AU/AO: mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico (100 µg/ratón/100 µL, administrado por vía s.c.); VEH: vehículo (aceite de olivo extravirgen, SIGMA); CONTROL: animales no administrados. n= 3. Se realizaron sacrificios a los días 30 y 60 de tratamiento.

**Figura 7.** Carga bacilar (UFC) en pulmones de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* MDR tratados con la mezcla de AU/AO.



AU/AO: mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico (100 µg/ratón/100 µL, administrado por vía s.c.); VEH: vehículo (aceite de olivo extravirgen, SIGMA); CONTROL: animales no administrados. n= 3, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001. Se realizaron sacrificios a los días 30 y 60 de tratamiento.

**Figura 8.** Porcentaje de neumonía en pulmones de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* MDR tratados con la mezcla de AU/AO.

Es importante resaltar que este experimento se realizó con el fin de conocer el efecto de la mezcla de AU/AO en el caso de TB provocada por una cepa *M. tuberculosis* MFR, como se observó en el experimento anterior esta mezcla de triterpenos reduce la carga bacilar y el porcentaje de neumonía en el caso de los animales infectados las cepas *M. tuberculosis* H37Rv. Por otro lado, día a día aumentan los casos de TB provocados por cepas MFR, por lo que es necesario contar con alternativas de tratamiento y los compuestos de origen natural pueden constituir una alternativa de gran importancia. A la fecha son escasos los trabajos de investigación que exploran el potencial de compuestos sintéticos y/o naturales en modelos de TB-MFR (Figueiredo *et al.*, 2009; van Soolingen *et al.*, 2010), por lo que este trabajo contribuye de manera importante a explorar el potencial de los compuestos de origen natural.

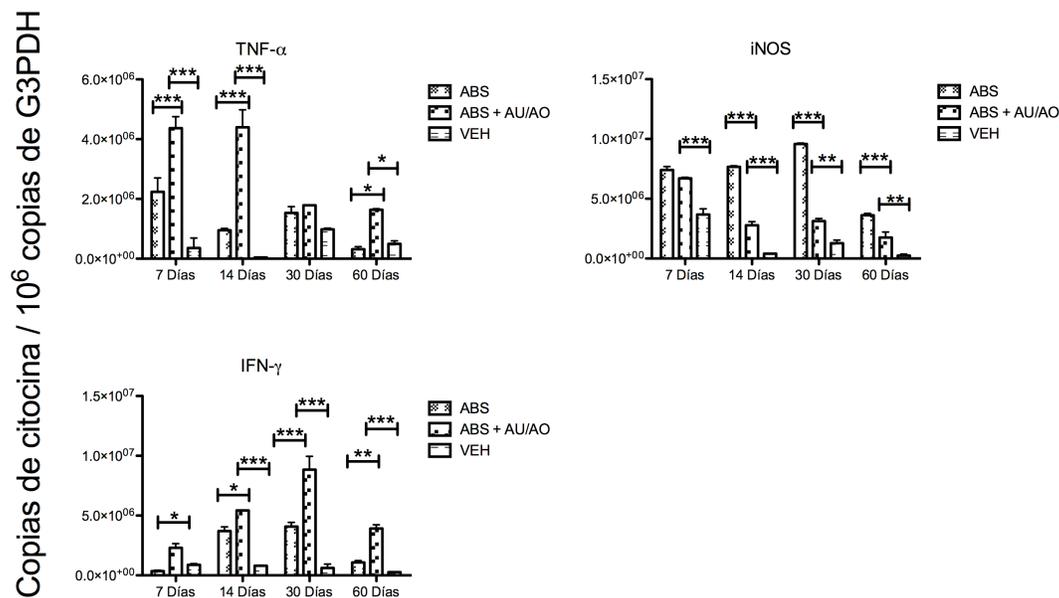
Los resultados encontrados en esta evaluación muestran que la mezcla de AU/AO reduce ligeramente la carga bacilar y reduce de manera significativa el porcentaje de neumonía respecto al control; sin embargo, es importante mencionar que esta actividad la presenta por sí sola la mezcla de triterpenos, falta evaluar el efecto de esta mezcla en combinación con la mezcla de antibióticos. La mayoría de sustancias que se someten a evaluación antituberculosa reducen la carga bacilar pero no reducen la neumonía y es la causa principal por la que los animales mueren debido a que se reduce el área pulmonar para intercambio gaseoso (Figueiredo *et al.*, 2009; Hernández-Pando *et al.*, 2005; van Soolingen *et al.*, 2010).

De manera adicional a la cuantificación de la carga bacilar y del porcentaje de neumonía de cada experimento. Se realizó la cuantificación de las citocinas (INF- $\gamma$ , iNOs y TNF- $\alpha$ ) en muestras de pulmones de los ratones BALB/c de cada grupo y de cada experimento. Estas citocinas juegan un papel importante en el desarrollo de la TB ya que pueden evitar la progresión de la enfermedad (Hernández-Pando *et al.*, 2008).

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos para el primer experimento, el comportamiento general de expresión de citocinas en el grupo tratado con la mezcla de triterpenos en combinación con los antibióticos convencionales es el siguiente: TNF- $\alpha$  se encuentra sobre-expresado a los días 7 y 14 de tratamiento, y posteriormente estos

valores caen en un 60 % al día 30 y 60, iNOS esta sobre expresado al día 7 de tratamiento, pero decae desde el día 14 hasta el día 60. INF- $\gamma$  aumenta gradualmente durante los primeros 30 días de tratamiento para después disminuir en un 50 % al día 60.

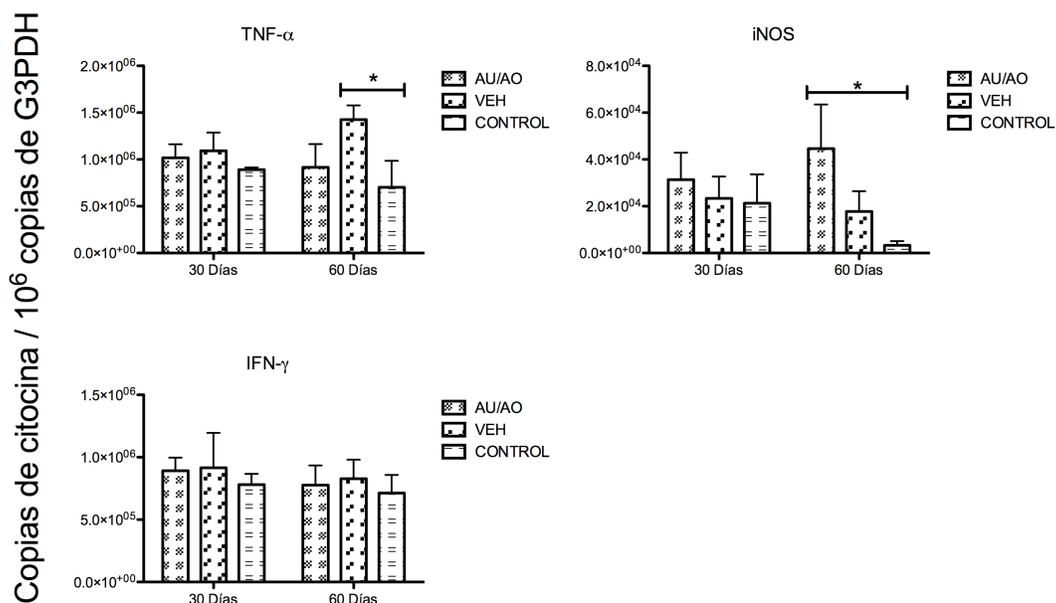
Las diferencias encontradas entre cada tratamiento son las siguientes: existe una mayor expresión de TNF- $\alpha$  en los animales administrados con la mezcla de triterpenos en combinación con la mezcla de antibióticos convencionales, durante todo el tratamiento, siendo significativo este aumento a los días 7, 14 y 60. La expresión de iNOS se ve disminuida por la administración de la mezcla de AU/AO ya que el grupo que recibió únicamente los antibióticos convencionales aumento significativamente a los 14, 30 y 60 días de tratamiento. En cuanto a la expresión de INF- $\gamma$  existe un aumento significativo durante todo el periodo de administración.



ABS: mezcla de antibióticos (R, 10 mg/kg; I, 10 mg/kg y pirazinamida, 30 mg/kg) administrados por vía I.G.; AU/AO: mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico (100  $\mu$ g/ratón/100  $\mu$ L, administrado por vía s.c.); VEH: vehículo (aceite de olivo extravirgen, SIGMA). TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible IFN- $\gamma$ : interferon gamma. n= 3, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001. Se realizaron sacrificios a los días 7, 14, 30 y 60 de tratamiento.

**Figura 9.** Expresión de citocinas en pulmones de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO en combinación con antibióticos convencionales.

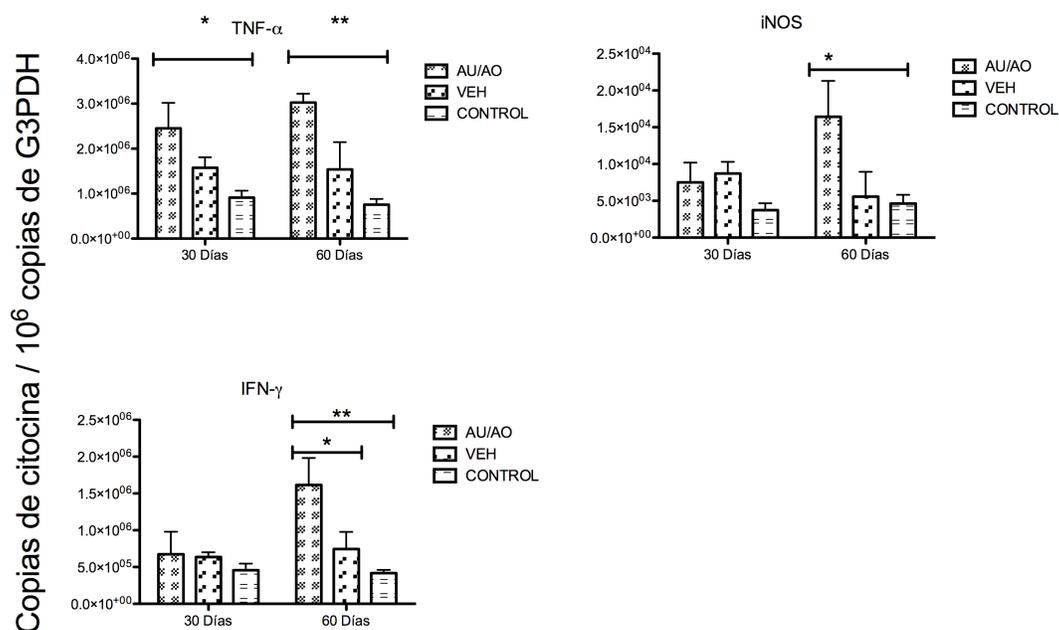
Los resultados de expresión de las interleucinas para el segundo experimento se muestran en la Figura 10. Se encontró que la expresión de TNF- $\alpha$  al día 30 no presenta diferencia estadística entre los tres grupos, este comportamiento es similar al observado al día 30 en el primer experimento (Figura 9). Al día 60 de tratamiento, se puede observar un incremento significativo en el caso del grupo administrado con el vehículo mientras que los otros dos grupos mantienen valores similares al día 30. En cuanto a la expresión de iNOS para este experimento, observamos que al día 30 de tratamiento existe un pequeño incremento no significativo en el grupo tratado con la mezcla de AU/AO, este comportamiento se mejora al día 60 de tratamiento siendo significativa esta diferencia. En cuanto a la expresión de IFN- $\gamma$ , esta citocina prácticamente no sufre cambios en ninguno de los tratamientos después de 30 y 60 días de administración ya que no se observó diferencia significativa.



AU/AO: mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico (100  $\mu$ g/ratón/100  $\mu$ L, administrado por vía s.c.); VEH: vehículo (aceite de olivo extravirgen, SIGMA). CONTROL: animales no administrados. TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible IFN- $\gamma$ : interferon gamma. n= 3, \* p < 0.05. Se realizaron sacrificios a los días 30 y 60 de tratamiento.

**Figura 10.** Expresión de citocinas en pulmones de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO.

Cuando se hace la cuantificación de TNF- $\alpha$ , iNOS e IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c infectados con una cepa de *M. tuberculosis* MFR (Figura 11) se encontró que al día 30 y 60 de tratamiento, la mezcla de triterpenos (AU/AO) incrementa la expresión de TNF- $\alpha$ , respecto al control, cabe señalar que en el grupo vehículo también se observa sobre-expresión de esta citocina pero no es un incremento significativo. También la mezcla de triterpenos incrementa la expresión de iNOS e IFN- $\gamma$  el día 60 de tratamiento.



AU/AO: mezcla de ácido ursólico/ácido oleanólico (100  $\mu$ g/ratón/100  $\mu$ L, administrado por vía s.c.); VEH: vehículo (aceite de olivo extravirgen, SIGMA). CONTROL: animales no administrados. TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible IFN- $\gamma$ : interferon gamma. n= 3, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01. Se realizaron sacrificios a los días 30 y 60 de tratamiento.

**Figura 11.** Expresión de citocinas en pulmones de ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* MDR tratados con la mezcla de AU/AO.

Uno de los principales problemas en el control de la TB es la falta de apego al tratamiento, esto se debe entre muchas otras causas a que los periodos de administración de fármaco son extremadamente largos (hasta 24 meses en casos de TB MFR), pues requieren de la administración de al menos 4 antibióticos diferentes durante un periodo no menor a los 6 meses (Arbex *et al.*, 2010a). Por esta razón, se evaluó el efecto de la mezcla de AU/AO en combinación con los antibióticos convencionales, ya que se podría acortar el largo régimen requerido para curar la TB pulmonar. En nuestro resultado no se observó una reducción significativa en la carga bacilar ni en la superficie pulmonar afectada por neumonía respecto al grupo que recibió antibióticos; sin embargo, sí se observa una mayor expresión de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por lo que es posible que el tratamiento combinado (antibiótico mas mezcla de AU/AO) pudiera proveer de apoyo inmunológico necesario para limitar la reactivación de la infección (Hernández-Pando *et al.*, 2004). Por otro lado, existen numerosos estudios en donde se ha encontrado que el tratamiento con INF- $\gamma$  incrementa la respuesta inmune local mejorando la respuesta al tratamiento convencional (Koh *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2011), debido a que la administración de la mezcla de AU/AO favorece la producción de INF- $\gamma$ , podríamos esperar un comportamiento similar.

La evaluación de la actividad antituberculosa de la mezcla de triterpenos en los animales infectados con *M. tuberculosis* H37Rv mostro que esta mezcla reduce la carga bacilar y el porcentaje de aérea neumónica durante todo el periodo de tratamiento. Además, induce la sobreexpresión de iNOS principalmente, enzima que contribuye a la eliminación de la micobacteria por liberación de especies reactivas de oxígeno.

Otro problema importante en el control de la TB es la aparición de las cepas MFR. En el año 2010 surgieron 600, 000 casos nuevos de esta variante y cifra que aumenta cada año, esta enfermedad ha sido catalogada como un problema de salud urgente a nivel mundial (WHO, 2011). El tratamiento de la TB producida por cepas MDR requiere de la combinación de fármacos de segunda línea que son más caros, más tóxicos y menos efectivos que los fármacos utilizados en la terapia convencional. Nuestros resultados muestran que la administración de la mezcla de AU/AO en animales infectados con una cepa MDR, reducen el porcentaje de pulmón afectado por neumonía y producen una mayor expresión de iNOS, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . IFN- $\gamma$  es una citocina pro-inflamatoria

involucrada en la potenciación de la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno, al igual que la enzima iNOS; estos dos intermediarios son factores bactericidas esenciales para eliminar la carga bacteriana (Young *et al.*, 2002), todo esto en conjunto indica una mayor actividad de macrófagos y un mejor control de la actividad inflamatoria, por lo que la administración de la mezcla de triterpenos puede ser un tratamiento nuevo y eficiente para el control de la TB MDR. Cabe señalar que este efecto (reducción de carga bacilar y porcentaje de neumonía) se observó con la sola administración de la mezcla de AU/AO, por lo que resultaría muy interesante evaluar el efecto de esta mezcla en combinación con fármacos de segunda línea. Como mencionamos anteriormente, este es uno de los primeros trabajos que describen el efecto antituberculoso *in vivo* de productos de origen natural y se contribuye a explorar el potencial de los triterpenos para coadyuvar en el tratamiento de la TB.

Estos resultados concuerdan con lo encontrado por el Dr. Rogelio Hernández Pando, quien ha caracterizado la TB pulmonar que produce la cepa H37Rv en ratones BALB/c y recientemente está desarrollando este modelo induciendo la enfermedad con cepas MFR de *M. tuberculosis* (Hernández-Pando *et al.*, 1996a). Este modelo de TB murino se caracteriza por una fase aguda con baja carga celular y alta expresión de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , estas interleucinas mantienen controlada la infección. Después de tres semanas inicia una fase progresiva, en ella existe una disminución de estas citocinas y un incremento en la expresión de IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ , lo que en conjunto desactiva la respuesta inmune celular protectora provocando un incremento en la carga bacilar y un aumento en el tejido pulmonar lesionado que provoca la muerte de los ratones (Hernández-Pando *et al.*, 1996a).

Es bien conocido que en el modelo murino de TB y en condiciones normales de la enfermedad, la producción de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e iNOS disminuye conforme progresa la infección, por lo que hay un incremento de neumonía y fibrosis (Hernández-Pando *et al.*, 2005).

## 7. CONCLUSIONES

- La mezcla de AU/AO es prácticamente inocua al ser evaluada por vía s.c. en esquemas de administración aguda ( $DL_{50} > 300$  mg/kg) y en esquemas de administración subaguda (13 mg/kg por 28 días) en ratones de la cepa BALB/c.
- La administración de la mezcla de AU/AO en combinación con antibióticos reduce significativamente las UFC's durante el periodo de tratamiento y solo se observa reducción del porcentaje de neumonía al día 60 de tratamiento cuando los animales son infectados con *M. tuberculosis* H37Rv.
- La administración de AU/AO en los animales infectados con *M. tuberculosis* H37Rv muestra una reducción significativa de las UFC's y de las aéreas neumónicas.
- La administración de AU/AO en los animales infectados con *M. tuberculosis* MFR muestra una reducción no significativa sobre la carga bacilar, pero se observa una reducción significativa del porcentaje de neumonía al durante los dos meses de tratamiento.
- La expresión de citocinas en los animales infectados con *M. tuberculosis* H37Rv tratados con la mezcla de AU/AO en combinación con los antibióticos induce la expresión de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .
- La administración de la mezcla de AU/AO en los animales infectados con *M. tuberculosis* H37Rv induce la expresión de iNOS.
- En el caso de los animales infectados con *M. tuberculosis* MFR, se observa la sobre expresión de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e iNOS, principalmente al día 60 de tratamiento.
- El efecto sobre la carga bacteriana, porcentaje de neumonía y expresión de citocinas sugiere que la administración de la mezcla de AU/AO puede contribuir en el tratamiento de la TB.

## 8. PERSPECTIVAS

- Cuantificar TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 en los pulmones de animales infectados con *M. tuberculosis* H37Rv y tratados con la mezcla de antibióticos combinados con la mezcla de AU/AO.
- Evaluar el efecto antituberculoso de la mezcla de AU/AO combinado con antibióticos de segunda línea induciendo la enfermedad con *M. tuberculosis* MFR.
- Determinar la toxicidad crónica, mutagenicidad, teratogenicidad y genotoxicidad de la mezcla de triterpenos para brindar un soporte más sólido acerca de la seguridad en la administración de estos compuestos.
- Determinar parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de estos compuestos.

## 9. REFERENCIAS

- Abe, F; Yamauchi, T; Nagao, T; Kinjo, J; Okabe, H; Higo, H; Akahane, H. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. *Biol Pharm Bull* **2002**; 25, 1485-1487.
- Ahmad, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol* **2011**; 2011, 814943.
- Akashi, T; Furuno, T; Takahashi, T; Ayabe, S. Biosynthesis of triterpenoids in cultures cells, and regenerated and wild plant organs of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry*. **1994**; 36, 303-308.
- Arbex, MA; Varella Mde, C; Siqueira, HR; Mello, FA. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: first-line drugs. *J Bras Pneumol* **2010a**; 36, 626-640.
- Arbex, MA; Varella Mde, C; Siqueira, HR; Mello, FA. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. *J Bras Pneumol* **2010b**; 36, 641-656.
- Banno, N; Akihisa, T; Tokuda, H; Yasukawa, K; Higashihara, H; Ukiya, M; Watanabe, K; Kimura, Y; Hasegawa, J; Nishino, H. Triterpene acid from leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci Biotechnol Biochem* **2004**; 68, 85-90.
- Baricevic, D; Sosa, S; Della Loggia, R; Tubaro, A; Simonovska, B; Krasna, A; Zupancic, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol* **2001**; 75, 125-132.
- Bishayee, A; Ahmed, S; Brankov, N; Perloff, M. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Front Biosci* **2011**; 16, 980-996.
- Bueno, J; Coy, ED; Stashenko, E. Antimycobacterial natural products - an opportunity for the Colombian biodiversity. *Rev Esp Quimioter* **2011**; 24, 175-183.
- Caminero, JA; Sotgiu, G; Zumla, A; Migliori, GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis* **2010**; 10, 621-629.
- Cantrell, CL; Franzblau, SG; Fischer, NH. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med* **2001**; 67, 685-694.
- Cárdenas, C; Quesada, AR; Medina, MA. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**; 320, 402-408.
- Carvalho, AL; Annoni, R; Silva, PR; Borelli, P; Fock, RA; Trevisan, MT; Mauad, T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. *J Ethnopharmacol* **2011**; 135, 730-736.
- CENAVECE Información Epidemiológica.  
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html> (Noviembre de 2011).
- Cha, HJ; Bae, SK; Lee, HY; Lee, OH; Sato, H; Seiki, M; Park, BC; Kim, KW. Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Res* **1996**; 56, 2281-2284.
- Chaplan, SR; Eckert, IW; Carruthers, NI. Drug Discovery and Development for Pain. **2010**. In: [Kruger L](#), [Light AR](#), editors. Translational Pain Research: From Mouse to Man. Boca Raton, FL: CRC Press; 2010. Chapter 18. *Frontiers in Neuroscience*.

- Chen, IH; Lu, MC; Du, YC; Yen, MH; Wu, CC; Chen, YH; Hung, CS; Chen, SL; Chang, FR; Wu, YC. Cytotoxic triterpenoids from the stems of *Microtropis japonica*. *J Nat Prod* **2009**; 72, 1231-1236.
- Copp, BR; Pearce, AN. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Prod Rep* **2007**; 24, 278-297.
- Da Silva Filho, AA; Resende, DO; Fukui, MJ; Santos, FF; Pauletti, PM; Cunha, WR; Silva, ML; Gregorio, LE; Bastos, JK; Nanayakkara, NP. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Fitoterapia* **2009**; 80, 478-482.
- Ferrer-Hernández, AE; Hernández-Escalona, M; Pérez-Martínez, C; Basterrechea-Rey, M; Fuentes-Fiallo, V; Torres-Ferrer, M. Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Cestrum laurifolium* L'Herit. *Revista CENIC ciencias químicas* **2007**; 38, 243-247.
- Figueiredo, R; Moiteiro, C; Medeiros, MA; da Silva, PA; Ramos, D; Spies, F; Ribeiro, MO; Lourenco, MC; Junior, IN; Gaspar, MM; Cruz, ME; Curto, MJ; Franzblau, SG; Orozco, H; Aguilar, D; Hernandez-Pando, R; Costa, MC. Synthesis and evaluation of rifabutin analogs against *Mycobacterium avium* and H37Rv, MDR and NRP *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem* **2009**; 17, 503-511.
- Finlay, H; Honda, T; Gribble, G; Danielpour, D; Benoit, N; Suh, N; Williams, C; Sporn, M. Novel A-ring cleaved analogs of oleanolic and ursolic acid which affect growth regulation in NRP.152 prostate cells. *Bioorg Med Chem Letters* **1997**; 7, 1769-1772.
- Fontay, S; Grare, M; Mayer, J; Finance, C; Duval, R. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectives indexes. *J Ethnopharmacol* **2008**; 2008, 272-276.
- Ge, F; Zeng, F; Liu, S; Guo, N; Ye, H; Song, Y; Fan, J; Wu, X; Wang, X; Deng, X; Jin, Q; Yu, L. *In vitro* synergistic interactions of oleanolic acid in combination with isoniazid, rifampicin or ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* **2010**; 59, 567-572.
- Gu, JQ; Wang, Y; Franzblau, SG; Montenegro, G; Timmermann, BN. Constituents of *Senecio chionophilus* with potential antitubercular activity. *J Nat Prod* **2004a**; 67, 1483-1487.
- Gu, JQ; Wang, Y; Franzblau, SG; Montenegro, G; Yang, D; Timmermann, BN. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med* **2004b**; 70, 509-514.
- Guengerich, FP. Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. *Drug Metab Pharmacokinet* **2011**; 26, 3-14.
- Guzmán, JD; Gupta, A; Evangelopoulos, D; Basavannacharya, C; Pabon, LC; Plazas, EA; Muñoz, DR; Delgado, WA; Cuca, LE; Ribon, W; Gibbons, S; Bhakta, S. Anti-tubercular screening of natural products from Colombian plants: 3-methoxynordomesticine, an inhibitor of MurE ligase of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* **2010**; 65, 2101-2107.
- Harper, C. Tuberculosis, a neglected opportunity? *Nat Med* **2007**; 13, 309-312.
- Hernández-Pando, R; Aguilar, D; Orozco, H; Cortez, Y; Brunet, LR; Rook, GA. Orally administered *Mycobacterium vaccae* modulates expression of immunoregulatory

- molecules in BALB/c mice with pulmonary tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* **2008**; 15, 1730-1736.
- Hernández-Pando, R; Aguilar-León, D; Orozco, H; Serrano, A; Ahlem, C; Trauger, R; Schramm, B; Reading, C; Frincke, J; Rook, GA. 16alpha-Bromoepiandrosterone restores T helper cell type 1 activity and accelerates chemotherapy-induced bacterial clearance in a model of progressive pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* **2005**; 191, 299-306.
- Hernández-Pando, R; Orozco, E; Aguilar-León, D; López-Casillas, F; Rook, G *Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental*; **2004**; pp 129-153.
- Hernández-Pando, R; Orozco, H; Arriaga, K; Sampieri, A; Larriva-Sahd, J; Madrid-Marina, V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* **1997**; 90, 607-617.
- Hernández-Pando, R; Orozco, H; Sampieri, A; Pavon, L; Velasquillo, C; Larriva-Sahd, J; Alcocer, JM; Madrid, MV. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* **1996a**; 89, 26-33.
- Hernández-Pando, R; Orozco, H; Sampieri, A; Pavon, L; Velasquillo, C; Larriva-Sahd, J; Alcocer, JM; Madrid, MV. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* **1996b**; 89, 26-33.
- Hernández-Pando, R; Schön, T; Orozco, E; Serafin, J; Estrada-García, I, *Tuberculosis 2007*. Chapter 5: Immunology, Pathogenesis, Virulence. Tuberculosis. From Basic Science to Patient Care. **2007**; [www.TuberculosisTextbook.com](http://www.TuberculosisTextbook.com).
- Higuchi, CT; Sannomiya, M; Pavan, FR; Leite, SR; Sato, DN; Franzblau, SG; Sacramento, LV; Vilegas, W; Leite, CQ. *Byrsonima fagifolia* Nienzenz Apolar Compounds with Antitubercular Activity. *Evid Based Complement Alternat Med* **2008**; 2011, 128349, 5 pages.
- Hollosy, F; Meszaros, G; Bokonyi, G; Idei, M; Seprodi, A; Szende, B; Keri, G. Cytostatic, cytotoxic and protein tyrosine kinase inhibitory activity of ursolic acid in A431 human tumor cells. *Anticancer Res* **2000**; 20, 4563-4570.
- Hsu, YL; Kuo, PL; Lin, CC. Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sci* **2004**; 75, 2303-2316.
- Huang, MT; Ho, CT; Wang, ZY; Ferraro, T; Lou, YR; Stauber, K; Ma, W; Georgiadis, C; Laskin, JD; Conney, AH. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res* **1994**; 54, 701-708.
- Ikeda, Y; Murakami, A; Nishizawa, T; Ohigashi, H. Ursolic acid enhances cyclooxygenases and tumor necrosis factor-alpha expression in mouse skin. *Biosci Biotechnol Biochem* **2006**; 70, 1033-1037.
- Ismaili, H; Milella, L; Fkih-Tetouani, S; Ilidrissi, A; Camporese, A; Sosa, S; Altinier, G; Della Loggia, R; Aquino, R. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J Ethnopharmacol* **2004**; 91, 31-36.
- Jaki, BU; Franzblau, SG; Chadwick, LR; Lankin, DC; Zhang, F; Wang, Y; Pauli, GF. Purity-activity relationships of natural products: the case of anti-TB active ursolic acid. *J Nat Prod* **2008**; 71, 1742-1748.

- Jiménez, A; Meckes, M; Álvarez, V; Torres, J; Parra, R. Secondary metabolites from *Chamaedora tepejilote* (Palmae) are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytother Res* **2005**; 19, 320-322.
- Jiménez-Arellanes, A; Meckes, M; Torres, J; Luna-Herrera, J. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). *J Ethnopharmacol* **2007**; 111, 202-205.
- Jiménez-Arellanes, A; Meckes-Fischer, M; Luna-Herrera, J; Torres, J; Hernández-Pando, R Patente No 273483: Composición farmacéutica que comprende ácido ursólico y ácido oleanólico útil para el tratamiento de tuberculosis. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, 2010.
- Jiménez-Ferrer, JE; Pérez-Teran, YY; Román-Ramos, R; Tortoriello, J. Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning. *Phytomedicine* **2005**; 12, 116-122.
- Jin, YR; Jin, JL; Li, CH; Piao, XX; Jin, NG. Ursolic acid enhances mouse liver regeneration after partial hepatectomy. *Pharm Biol* **2011**.(artículo por imprimir).
- Kassi, E; Sourlingas, TG; Spiliotaki, M; Papoutsis, Z; Pratsinis, H; Aligiannis, N; Moutsatsou, P. Ursolic acid triggers apoptosis and Bcl-2 downregulation in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Invest* **2009**; 27, 723-733.
- Kaufmann, SH; Parida, SK. Changing funding patterns in tuberculosis. *Nat Med* **2007**; 13, 299-303.
- Kazmi, I; Rahman, M; Afzal, M; Gupta, G; Saleem, S; Afzal, O; Shaharyar, MA; Nautiyal, U; Ahmed, S; Anwar, F. Anti-diabetic potential of ursolic acid stearyl glucoside: A new triterpenic glycosidic ester from *Lantana camara*. *Fitoterapia* **2012**; 83, 142-146.
- Kim, KA; Lee, JS; Park, HJ; Kim, JW; Kim, CJ; Shim, IS; Kim, NJ; Han, SM; Lim, S. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. *Life Sci* **2004**; 74, 2769-2779.
- Koh, WJ; Kwon, OJ; Suh, GY; Chung, MP; Kim, H; Lee, NY; Kim, TS; Lee, KS. Six-month therapy with aerosolized interferon-gamma for refractory multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *J Korean Med Sci* **2004**; 19, 167-171.
- Kosuge, T; Yokota, M; Sugiyama, K; Mure, T; Yamazawa, H; Yamamoto, T. Studies on bioactive substances in crude drugs used for arthritic diseases in traditional Chinese medicine. III. Isolation and identification of anti-inflammatory and analgesic principles from the whole herb of *Pyrola rotundifolia* L. *Chem Pharm Bull* **1985**; 33, 5355-5357.
- Lee, JY; Yim, JJ; Yoon, BW. Adjuvant interferon-gamma treatment in two cases of refractory tuberculosis of the brain. *Clin Neurol Neurosurg* **2011**.
- Lenaerts, AJ; Degroote, MA; Orme, IM. Preclinical testing of new drugs for tuberculosis: current challenges. *Trends Microbiol* **2008**; 16, 48-54.
- Lezhi, Z; Xintang, L. Study on the mechanism of oleanolic acid against experimental liver injury in rats *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica* **1992**; 2.
- Li, J; Guo, WJ; Yang, QY. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J Gastroenterol* **2002**; 8, 493-495.
- Liu, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J Ethnopharmacol* **2005**; 100, 92-94.

- Liu, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* **1995**; 49, 57-68.
- Liu, J; Liu, Y; Madhu, C; Klaassen, CD. Protective effects of oleanolic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **1993**; 266, 1607-1613.
- Liu, J; Liu, Y; Mao, Q; Klaassen, CD. The effects of 10 triterpenoid compounds on experimental liver injury in mice. *Fundam Appl Toxicol* **1994**; 22, 34-40.
- Liu, J; Wu, Q; Lu, YF; Pi, J. New insights into generalized hepatoprotective effects of oleanolic acid: key roles of metallothionein and Nrf2 induction. *Biochem Pharmacol* **2008**; 76, 922-928.
- Logarto Parra, A; Silva Yhebra, R; Guerra Sardinias, I; Iglesias Buela, L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* **2001**; 8, 395-400.
- Ma, C; Case, RJ; Wang, Y; Zhang, HJ; Tan, GT; Van Hung, N; Cuong, NM; Franzblau, SG; Soejarto, DD; Fong, HH; Pauli, GF. Anti-tuberculosis constituents from the stem bark of *Micromelum hirsutum*. *Planta Med* **2005**; 71, 261-267.
- Marquina-Castillo, B; Garcia-Garcia, L; Ponce-de-Leon, A; Jimenez-Corona, ME; Bobadilla-Del Valle, M; Cano-Arellano, B; Canizales-Quintero, S; Martinez-Gamboa, A; Kato-Maeda, M; Robertson, B; Young, D; Small, P; Schoolnik, G; Sifuentes-Osornio, J; Hernandez-Pando, R. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology* **2009**; 128, 123-133.
- Martín-Aragón, S; De las Heras, B; Sanchez-Reus, M; Benedi, J. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic acid on tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Toxic Pathol* **2001**; 53, 199-206.
- Meng, YQ; Liu, D; Cai, LL; Chen, H; Cao, B; Wang, YZ. The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action. *Bioorg Med Chem* **2009**; 17, 848-854.
- O'Brien, RJ; Spigelman, M. New drugs for tuberculosis: current status and future prospects. *Clin Chest Med* **2005**; 26, 327-340, vii.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects. <http://www.oecd-ilibrary.org> (October 2011).
- Okunade, AL; Elvin-Lewis, MP; Lewis, WH. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry* **2004**; 65, 1017-1032.
- Olson, H; Betton, G; Robinson, D; Thomas, K; Monro, A; Kolaja, G; Lilly, P; Sanders, J; Sipes, G; Bracken, W; Dorato, M; Van Deun, K; Smith, P; Berger, B; Heller, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* **2000**; 32, 56-67.
- Orcau, A; Cayla, JA; Martinez, JA. Present epidemiology of tuberculosis. Prevention and control programs. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2011**; 29 Suppl 1, 2-7.
- Pauli, GF; Case, RJ; Inui, T; Wang, Y; Cho, S; Fischer, NH; Franzblau, SG. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sci* **2005**; 78, 485-494.

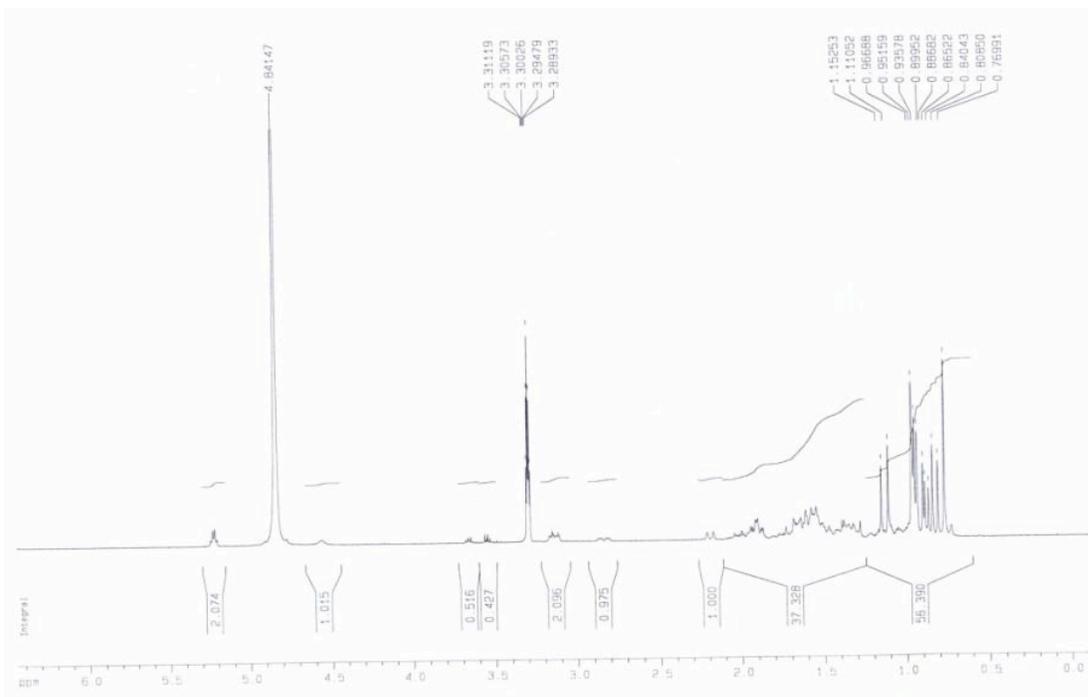
- Pérez, GRM; Pérez, GC; Pérez, GS; Zavala, S. Effect of triterpenoids of *Bouvardia ternifolia* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine* **1998**; 5, 475-478.
- Pérez-Navarro, LM; Fuentes-Domínguez, F; Morales-Romero, J; Zenteno-Cuevas, R. Factors associated to pulmonary tuberculosis in patients with diabetes mellitus from Veracruz, Mexico. *Gac Med Mex* **2011**; 147, 219-225.
- Ramachandran, S; Prasad, NR. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chem Biol Interact* **2008**; 176, 99-107.
- Raviglione, MC; Smith, IM. XDR tuberculosis--implications for global public health. *N Engl J Med* **2007**; 356, 656-659.
- Ringbom, T; Segura, L; Noreen, Y; Perera, P; Bohlin, L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J Nat Prod* **1998**; 61, 1212-1215.
- Saravanan, R; Pugalendi, V. Impact of ursolic acid on chronic ethanol-induced oxidative stress in the rat heart. *Pharmacol Rep* **2006**; 58, 41-47.
- Schwander, S; Dheda, K. Human lung immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: insights into pathogenesis and protection. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**; 183, 696-707.
- Seo, S; Yoshimura, Y; Uomori, A; Takeda, K; Sero, H; Ebizuka, Y; Sankawa, U. Biosynthesis of triterpenes, ursolic acid, and oleanolic acid in tissue cultures of *Rabdosia japonica* Hara Fed [5-13C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>] mevalonolactone and [2-13C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>] acetate. *J Am Chem Soc* **1988**; 110, 238-244.
- Shai, LJ; McGaw, LJ; Aderogba, MA; Mdee, LK; Eloff, JN. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *J Ethnopharmacol* **2008**; 119, 238-244.
- Sharma, SK; Mohan, A. Multidrug-resistant tuberculosis: a menace that threatens to destabilize tuberculosis control. *Chest* **2006**; 130, 261-272.
- Shishodia, S; Majumdar, S; Banerjee, S; Aggarwal, BB. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I $\kappa$ B kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res* **2003**; 63, 4375-4383.
- Silva, MG; Aragao, TP; Vasconcelos, CF; Ferreira, PA; Andrade, BA; Costa, IM; Costa-Silva, JH; Wanderley, AG; Lafayette, SS. Acute and subacute toxicity of *Cassia occidentalis* L. stem and leaf in Wistar rats. *J Ethnopharmacol* **2011**; 136, 341-346.
- Somova, LI; Shode, FO; Mipando, M. Cardiotoxic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine* **2004**; 11, 121-129.
- Somova, LO; Nadar, A; Rammanan, P; Shode, FO. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine* **2003**; 10, 115-121.
- StopTB partnership, <http://www.stoptb.org/>, (November 2011).

- Tanachatchairatana, T; Bremner, JB; Chokchaisiri, R; Suksamrarn, A. Antimycobacterial activity of cinnamate-based esters of the triterpenes betulinic, oleanolic and ursolic acids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2008**; 56, 194-198.
- Tokuda, H; Ohigashi, H; Koshimizu, K; Ito, Y. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Lett* **1986**; 33, 279-285.
- Torres-Santos, EC; Lopes, D; Oliveira, RR; Carauta, JP; Falcao, CA; Kaplan, MA; Rossi-Bergmann, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine* **2004**; 11, 114-120.
- Tsai, SJ; Yin, MC. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. *J Food Sci* **2008**; 73, 174-178.
- Van Den Boogaard, J; Kibiki, GS; Kisanga, ER; Boeree, MJ; Aarnoutse, RE. New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53, 849-862.
- Van Soolingen, D; Hernandez-Pando, R; Orozco, H; Aguilar, D; Magis-Escurra, C; Amaral, L; van Ingen, J; Boeree, MJ. The antipsychotic thioridazine shows promising therapeutic activity in a mouse model of multidrug-resistant tuberculosis. *PLoS One* **2010**; 5, e12640.
- Wachter, GA; Valcic, S; Flagg, ML; Franzblau, SG; Montenegro, G; Suarez, E; Timmermann, BN. Antitubercular activity of pentacyclic triterpenoids from plants of Argentina and Chile. *Phytomedicine* **1999**; 6, 341-345.
- Wachter, GA; Valcic, S; Franzblau, SG; Suarez, E; Timmermann, BN. Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippia turbinata*. *J Nat Prod* **2001**; 64, 37-41.
- WHO *Global DOTS Expansion Plan*; [WHO/CDS/STB/2001.10a]; 2001.
- WHO *The Global MDR-TB & XDR-TB Response Plan 2007-2008*; 2007.
- WHO *The Global Plan To Stop TB, 2006-2015*; 2006.
- WHO *Global tuberculosis control 2011*; WHO: 2011; p 258.
- Williams, CH; Hong, CC. Multi-step usage of *in vivo* models during rational drug design and discovery. *Int J Mol Sci* **2011**; 12, 2262-2274.
- Yeh, CT; Wu, CH; Yen, GC. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells by modulating c-Jun N-terminal kinase, Akt and mammalian target of rapamycin signaling. *Mol Nutr Food Res* **2010**; 54, 1285-1295.
- Yin, MC; Chan, KC. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. *J Agric Food Chem* **2007**; 55, 7177-7181.
- Yogeeta, S; Ragavender, HRB; Devaki, T. Antihepatotoxic effect of *Punica granatum* acetone extract against isoniazid- and rifampicin-induced hepatotoxicity. *Pharmaceutical Biology* **2007**; 45, 631-637.
- Young, V; Ho, M; Vosper, H; Belch, JJ; Palmer, CN. Elevated expression of the genes encoding TNF-alpha and thromboxane synthase in leucocytes from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* **2002**; 41, 869-875.
- Zager, EM; McNerney, R. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis* **2008**; 8, 10.
- Zeng, G; Chen, J; Liang, QH; You, WH; Wu, HJ; Xiong, XG. Ursolic acid inhibits T-cell activation through modulating nuclear factor-kappa B signaling. *Chin J Integr Med* **2011**; 18, 34-39.

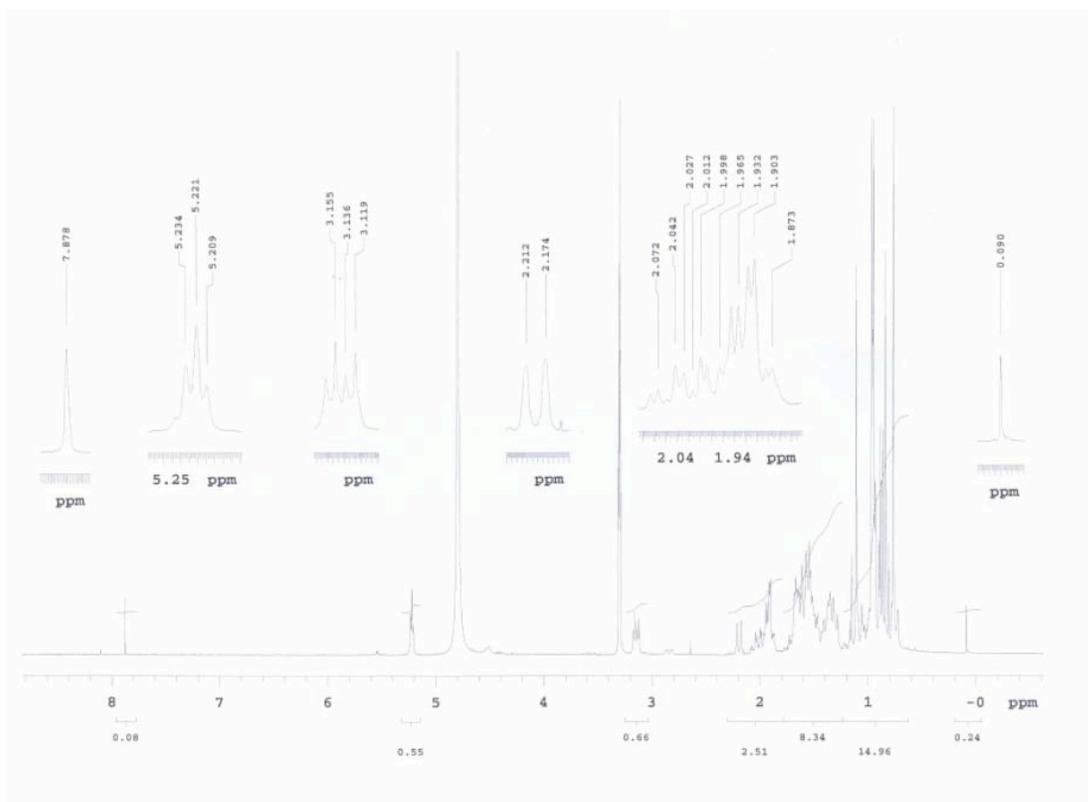
Ziganshina, LE; Squire, SB. Fluoroquinolones for treating tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev* **2008**, CD004795.

Zwolska, Z; Augustynowicz-Kopec, E. Drug resistant tuberculosis. *Pol Merkur Lekarski* **2011**; 30, 362-366.

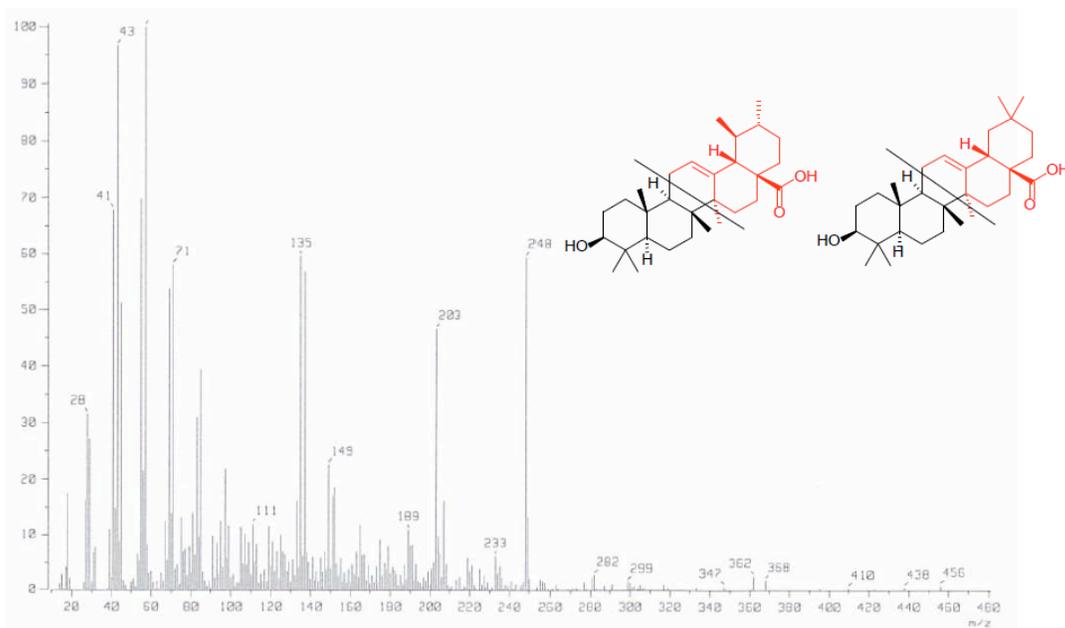
## 10. ANEXO



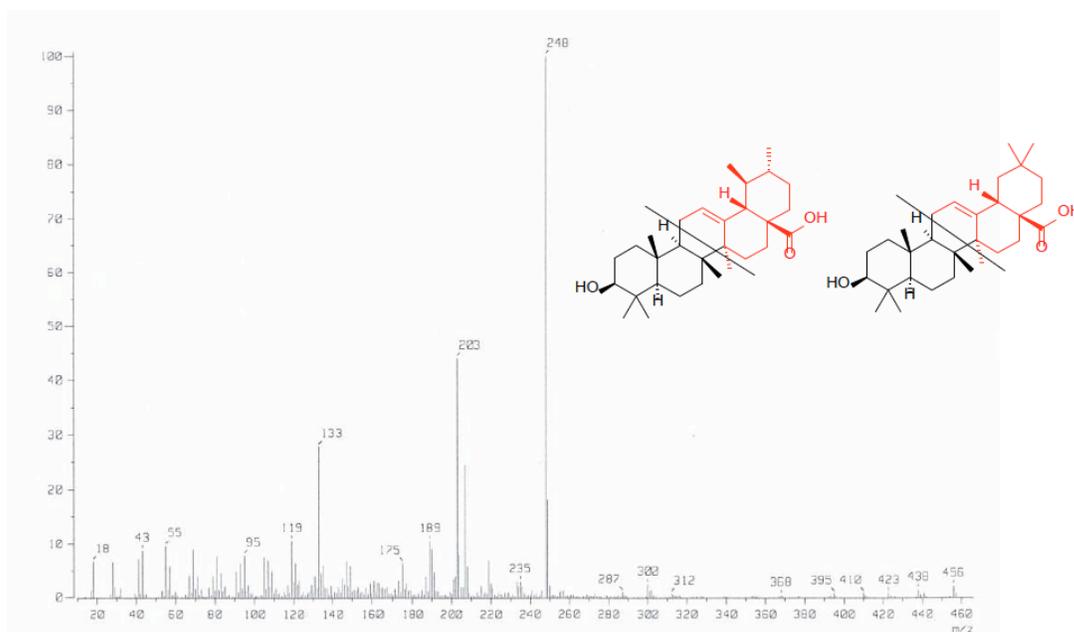
**Espectro 1.** Resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H) de la mezcla de referencia AU/AO 1:1 (SIGMA).



**Espectro 2.** Resonancia magnética nuclear protónica (RMN-<sup>1</sup>H) de la mezcla de AU/AO 2:1 (*B. ternifolia*).



**Espectro 3.** Espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE) de la mezcla de referencia AU/AO 1:1 (SIGMA).



**Espectro 4.** Espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE) de la mezcla de AU/AO 2:1 (*B. ternifolia*).

# Acute and subacute toxicity (28 days) of a mixture of ursolic acid and oleanolic acid obtained from *Bouvardia ternifolia* in mice

[Toxicidad aguda y subaguda (28 días) en ratones, de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico obtenida de *Bouvardia ternifolia*]

Jorge CORNEJO GARRIDO<sup>1</sup>, Germán Alberto CHAMORRO CEVALLOS<sup>2</sup>, Leticia GARDUÑO SICILIANO<sup>2</sup>, Rogelio HERNÁNDEZ PANDO<sup>3</sup>, María Adelina JIMENEZ ARELLANES<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales (UIMFPN), Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720 México, D.F., México

<sup>2</sup>Laboratorio de Toxicología Preclínica, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. Wilfrido Massieu s/n, Col. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, 07738, México, D.F., México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Vasco De Quiroga No. 15, Col. Sección XVI, 14000, México, D.F., México.

## Abstract

Ursolic acid (UA) and oleanolic acid (OA) are triterpenes that are distributed in a large number of medicinal plants, one of which is the species *Bouvardia ternifolia*. These compounds have been shown to have around 120 biological activities, especially the hepatoprotective, anti-inflammatory and antimycobacterial effects. Despite being made of a high therapeutic potential, not much information concerning their toxicity is available. This article describes the results of the evaluation of acute and subacute (28 days) toxicity in Balb/c mice of both sexes treated with the mixture of UA/OA obtained from *B. ternifolia* at doses of 6.5 and 13 mg/kg. The LD<sub>50</sub> was >300 mg/kg. During the subacute application, there was no death of animals and no changes were observed in the growth or weight of the different organs. Studies of blood chemistry and blood count showed normal levels in all parameters evaluated. The histopathology of major organs showed no changes or abnormalities. The mixture UA/OA is indeed practically safe when administered subcutaneously as a single dose of 300 mg/kg or 13 mg/kg in repeated doses (28 days).

**Keywords:** Ursolic Acid; Oleanolic Acid; Acute Toxicity; Subacute Toxicity; *Bouvardia ternifolia*.

## Resumen

Los ácidos ursólico (UA) y oleanólico (OA) son triterpenos que se encuentran distribuidos en un gran número de plantas medicinales, una de ellas es la especie *Bouvardia ternifolia*. Estos compuestos han mostrado alrededor de 120 actividades biológicas, destacando los efectos hepatoprotector, antiinflamatorio y antimicobacteriano. A pesar de ser compuestos con un alto potencial terapéutico, no se han documentado muchos datos acerca de su toxicidad. En este artículo se describen los resultados de la evaluación de toxicidad aguda y subaguda (28 días) en ratones Balb/c de ambos sexos, tratados con la mezcla de UA/OA obtenida de *B. ternifolia* a dosis de 6.5 y 13 mg/kg. La DL<sub>50</sub> fue > 300 mg/kg. Durante el esquema de administración subaguda, no hubo muerte de animales, tampoco se observaron alteraciones en su crecimiento ni alteraciones en el peso de los diferentes órganos. Los estudios de biometría hemática y química sanguínea mostraron niveles normales en todos los parámetros evaluados. Los análisis histopatológicos de los principales órganos no presentaron cambios o anomalías. La mezcla UA/OA es prácticamente inocua cuando se administra subcutáneamente en dosis única de 300 mg/kg y 13 mg/kg en dosis repetida (28 días).

**Palabras Clave:** Acido Ursólico; Acido Oleanólico; Toxicidad Aguda; Toxicidad Subaguda; *Bouvardia ternifolia*.

**Short title:** Acute and subacute toxicity of ursolic and oleanolic acid.

**List of abbreviations:** UA - Ursolic Acid; OA - Oleanolic Acid; NAPRALERT - Natural Products Alert; COX - Cyclooxygenase; MIC – Minimum Inhibitory Concentration; MABA - Microplate Alamar Blue Assay; TB - Tuberculosis; MDR - Multidrug-resistant; XDR - Extensively Drug-Resistant; LC<sub>50</sub> – Lethal Concentration 50; LD<sub>50</sub> – Lethal Dose 50; <sup>1</sup>H-NMR - Nuclear Magnetic Resonance; TMS - Tetramethylsilane; EI-MS - Electron Impact-Mass Spectra; CC - Column Chromatography; TLC - Thin Layer Chromatography; HEX - n-Hexane; CH<sub>3</sub>CN – acetonitrile; CHCl<sub>3</sub> – Chloroform; MeOH – Methanol; HPLC - High Performance Liquid Chromatography; OECD - Organization for Economic Cooperation and Development; GHS - Globally Harmonised Classification System; SEM - Standard Error of Mean; ANOVA - Analysis of Variance; WBC - White Blood Cells; RBC - Red Blood Cells; HGB – Hemoglobin; HCT - Hematocrit, MCV - Mean Corpuscular Volume; MCHC - Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; SGOT - Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase; SGPT - Serum Glutamic Pyruvic Transaminase.

## INTRODUCTION

The triterpenes such as Ursolic acid (UA) and Oleanolic acid (OA) are secondary metabolites present in different plant species (Ovesná *et al.*, 2004; Somova *et al.*, 2003). These triterpenes have exhibited around 120 biological activities according to data recorded in the Natural Products Alert Database (NAPRALERT, 2011). Anti-HIV, antiplasmodial, cytotoxic, antibacterial, anti-inflammatory (lipoxygenase and Cyclooxygenase [COX] inhibitor), antitumoral, hepatoprotective (*in vivo*), and antidiabetogenic activities comprise only some of these activities (Jaki *et al.*, 2008; Liu, 1995, 2005). Previous investigations have shown that both triterpenes also exhibit moderate to high *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Cantrell *et al.*, 2001; Copp and Pearce, 2007; Gu *et al.*, 2004; Okunade *et al.*, 2004; Wächter *et al.*, 1999; 2001). It is interesting to note that the *in vitro* antimycobacterial activity of UA and OA obtained from different plant species has already been reported, with minimum inhibitory concentration (MIC) of 15 µg/mL or 32 µM for UA and 30 µg/mL or 64 µM for OA when it was tested by the BACTEC 460 radiospirometric method, and 41.9 and 28.7 µg/mL respectively, when evaluated by the Microplate Alamar Blue Assay (MABA) test

(Cantrell *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2004; Wächter *et al.*, 1999, 2001). Recently, it has been reported that OA exerts a synergistic effect when was combined with isoniazid, (I) rifampicin (R) or ethambutol (first line antitubercular drugs) (Ge *et al.*, 2010). Moreover, it was reported that the antimycobacterial effect depends on the purity of each compound; for example, high-purity UA (98.6%) has an MIC value >256 µg/mL and UA with 69.6% purity has an MIC = 65 µg/mL (Jaki *et al.*, 2008).

On the other hand, it is important to note that the search for compounds with antitubercular activity is urgent because of health problems in which tuberculosis (TB) is associated with the presence and appearance of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) TB strains, which are resistant to R and I, the principal (basic) drugs in the treatment of TB. It is known that first- and second-line anti-TB drugs produce severe toxic effects from prolonged use, causing low adherence to treatment or the abandonment of treatment. Thus, for example, I and R cause hepatotoxicity (Yogeeta *et al.*, 2007), because they generate the production of oxygen-free radicals, initiate lipid peroxidation and produce oxidative stress. Other types of damage caused by TB drugs comprise peripheral neuropathy, fever,

convulsions, hyperuricemia, photosensitivity, renal toxicity and renal failure, among other side effects.

Despite diverse biological activities described for UA and OA, data have not been documented up to now on acute and subacute toxicity for these compounds: only the median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) has been described in *Artemia salina* (Brine shrimp test) with values of 0.10 and 0.95 mg/mL for UA and OA, respectively (Somova *et al.*, 2003).

In this paper, we describe the  $LD_{50}$  and the effects caused in subacute toxicity during a period of 28 days in healthy Balb/c mice by the administration of the mixture of UA/OA obtained from *Bouvardia ternifolia*. This mixture affected neither the body weight and organ weight, nor hematological and biochemical parameters and histological analyses.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **General experimental procedures**

The chemical characterization of the isolated triterpenoids was determined by nuclear magnetic resonance ( $^1H$ -NMR, Bruker-Avance F, 300 MHz) using Tetramethylsilane (TMS) as an internal standard in  $CDCl_3$ . Electron impact-mass spectra (EI-MS) were obtained on a Jeol AX-505 HA mass spectrometer at 70 eV. Melting points (m.p.) were

determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. All spectroscopic and spectrometric data of each compound were compared with those previously reported in the literature.

Open-column chromatography (CC) was carried out utilizing silica gel 60 GF<sub>254</sub> (70-230 mesh, Merck) as a stationary phase, and silica gel 60 F<sub>254</sub> recoated aluminum plates (0.2 mm, Merck) were employed for analytical and preparative thin layer chromatography (TLC) analysis. n-Hexane (HEX), acetonitrile ( $CH_3CN$ ), chloroform ( $CHCl_3$ ) and methanol (MeOH) were obtained from Mallinckrodt and J.T. Baker. Spots were visualized by spraying with a 10% aqueous solution of  $H_2SO_4$  followed by heating at 100°C.

High performance liquid chromatography (HPLC) was carried out with a Waters 600 system controller connected to a photodiode array detector 996, which was programmed to take data from 220 to 380 nm at 2.4-nm resolutions. Control of equipment, data acquisition, processing, and handling of chromatographic information were carried out by the Millennium 32 software program (Waters). Analyses were undertaken on a Symmetry column (3.9 × 150 mm, 5- $\mu$ m particle sizes, Waters). The mobile phase comprised an isocratic  $CH_3CN:MeOH$  (80:20)

system (HPLC grade, J.T. Baker). The flow rate was maintained constant at 1.8 mL/min for 15 min. Samples were solubilized in MeOH at 1 mg/mL, and a volume of 100  $\mu$ L was injected.

### **Plant material**

*B. ternifolia* was collected in Miahuatlán, Oaxaca State, Mexico, in November 2008. The species was botanically identified by Abigail Aguilar, M.Sc., and a voucher specimen was deposited at the Instituto Mexicano del Seguro Social of Mexico (IMSSM) Herbarium.

### **Extraction and isolation of mixture of UA/OA**

Powdered, air-dried aerial parts were extracted with MeOH. The crude extract was obtained by maceration from plant material. After filtration, the extract was concentrated under low pressure to dryness at 40° C. *B. ternifolia* (0.7 kg) was macerated three times with 18, 12, and 8 L of MeOH, respectively.

The MeOH extract of *B. ternifolia* was fractionated on CC using HEX, CHCl<sub>3</sub>, MeOH, and a mixture of these with a degree of increasing polarity. The primary fraction eluted with CHCl<sub>3</sub>:MeOH (80:20) was fractionated by CC under the same

conditions. Thirteen secondary fractions were grouped on the basis of TLC patterns. Afterward, the UA/OA mixture was purified from secondary fractions rich in this mixture. These triterpenoids were detected utilizing TLC and were compared with the commercial references (Sigma).

UA/OA-rich primary or secondary fractions were successively extracted with CH<sub>3</sub>CN (three times, 20 mL/g) and CHCl<sub>3</sub> (three times, 10 mL/g). In each case, the supernatant was filtered through a 0.45  $\mu$ m GH Polypro 47-mm filter (Pall) into millipore equipment. Solid residuum was dissolved in MeOH (20 mL/g) and filtered in the same millipore equipment. The MeOH solution was then treated with activated charcoal (Sigma, 5 mg/mL) in an Erlenmeyer flask and shaken for 10 min. Subsequently, this solution was filtered with the millipore equipment and concentrated by evaporation under reduced pressure to dryness at 40°C.

### **Study animals**

The experiment was performed on male and female Balb/c mice (body weight range, 19-23 g) according to Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Test Guidelines (OECD, 2007). All experiments were performed following the

Mexican Official Norm for Animal Care Handling (NOM-062-ZOO-1999). The mice were housed under standard environmental conditions and were allowed free access to food and water, at 12-h light/dark photoperiods. The compounds were dissolved in extra virgin olive oil (Sigma). The concentrations were adjusted to subcutaneous (s.c.) administration at 0.1 mL/mouse.

#### **Acute toxicity (median lethal dose–LD<sub>50</sub>)**

According to OECD TC423, a group of 3 mice of both sexes was administered s.c. at single doses of 300 mg/kg. The general behavior of the mice was observed after administration at the 1st, 2nd, 4th, and 6th h, and once daily for 14 days. The animals were further observed for 14 days after the treatment to detect any signs of toxicity or death. At the end of the experiments, the animals were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber. Subsequently, their organs (lung, kidney, heart, spleen, and liver) were extracted and gross pathological observations were performed. The LD<sub>50</sub> value was determined according to the Globally Harmonised Classification System (GHS) and to the flow chart for this study (OECD, 2007).

#### **Subacute toxicity (repeated-dose, 28-day toxicity)**

According to OECD TG407 (OECD, 2007), mice were randomly divided into four groups of 5 animals per sex. Group I was the control, group II was vehicle control, and groups III and IV were s.c. treated with the mixture of UA/OA at 6.5 and 13 mg/kg for 28 days. These doses corresponded to 5 and 10 times the MIC of the mixture against *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*. Toxic manifestations such as signs mortality and body weight changes were monitored daily. At the end of treatment (day 28), the animals were not fed overnight, but with water *ad libitum*; the mice were anesthetized with xylazine and ketamine. Heparinized blood samples were drawn to determine complete blood count and red blood cell count. Serum from non-heparinized blood was carefully collected for blood chemistry and enzyme analysis.

#### **Histological analyses**

All animals were euthanized and their main vital organs were removed and macroscopically analyzed. After macroscopic analysis, representative fragments of spleen, heart, stomach, intestine, skin, lung, kidney, and liver were subsequently fixed in a 10% solution of formalin and enclosed in paraffin. Paraffin blocks were prepared after completing tissue

processing in different grades of alcohol and xylenes. Sections (5- $\mu\text{m}$ ) were prepared from blocks employing microtome and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Images were taken using a camera connected to the microscope to examine cellular damage.

### Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  Standard error of mean (SEM). Statistical significance was determined by one-way Analysis of variance (ANOVA) and post-hoc least-significant-difference (Bonferroni post-test).

## RESULTS AND DISCUSSION

Previous research has indicated that *B. ternifolia* biosynthesized UA and OA (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 1998); thus it was decided to perform a chemical study from the MeOH extract of this plant. The crude extract (82 g) was obtained by the maceration process from the aerial parts of *B. ternifolia* (700 g of dry material) with an efficiency of 11.7%. After successive chromatographic procedures, 3 g of the mixture of UA (**1**) and OA (**2**) (rate, 2:1) were obtained. This mixture was characterized structurally by  $^1\text{H-NMR}$  and EI-MS data and

compared with the commercial references (Sigma). These UA/OA mixtures were obtained as white powder with an m.p. 268-270.8°C; this m.p. is similar to those of commercial references (e.g., Sigma, m.p., 276.2-279.5°C). High performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that natural compounds have similar Retention times ( $R_T$ ) to commercial references, with the chromatogram having two peaks with  $R_T$  of 7.21 and 7.67 by *B. ternifolia* and of 7.22 and 7.65 for commercial references (Figure 1).

The  $\text{LD}_{50}$  of the UA/OA mixture obtained from *B. ternifolia* in both sexes of Balb/c mice was  $>300$  mg/kg according to the TG423 method. At this dose, no deaths or hazardous signs of toxicity were recorded in these animals during the 14 day period of observation after acute treatment by the s.c. route. Evaluations at higher doses were not performed since the biological activity concentrations for these compounds is much lower; for example,  $\text{ID}_{50}$  as anti-inflammatory agent is 56  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  by UA and 132  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  by OA. As an antimycobacterial agent the MIC value is  $\leq 50$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  and as a hepatoprotective agent 200  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  (Cantrell *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2004; Ismaili *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1994; Wachter *et al.* 1999; 2001). A previous report described that  $\text{LC}_{50}$

in *A. salina* is 0.10 and 0.95 mg/mL for UA and OA; considering that Logarto-Parra et al. (2001) described the existence of a direct correlation between the LC<sub>50</sub> determined in *A. salina* and the LD<sub>50</sub> determined in mice, we would expect LD<sub>50</sub> >5000 mg/kg.

In subacute analysis, no signs of toxicity (such as piloerection and alteration in locomotor activity) or mortality were observed in the treated groups when was compared with the control groups for both sexes. Body weights are depicted in Table 1 and no significant variations in this parameter were detected during the treatment period. The organ weights showed no significant difference between the control and the vehicle group (Table 2). The internal organs did not exhibit any gross morphological lesions. The results obtained indicate that the UA/OA mixture does not affect the growth of mice during the treatment period nor does it affect the weight of their principal organs.

The status of bone marrow activity and intravascular effects was monitored by hematological examination and the results are reported in Tables 3 and 4. Values of white blood cells (WBC), lymphocytes, neutrophils, eosinophils, monocytes, basophils, red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV)

and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) exhibited no variation. Consequently, the administration of the UA/OA mixture at doses of 6.5 and 13 mg/kg over a period of 28 days, did not induce any alteration in hematological and biochemical parameters.

The results of blood chemistry parameters show that the UA/OA mixture does not cause any alteration in lipid metabolism, because the values of total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and triglycerides do not present any significant difference between the treated group and the control (Table 5). Similarly, the glucose levels present no significant difference between both groups, which indicates that the mixture of compounds does not induce any alteration in the carbohydrate metabolism (Table 5). The results of uric acid and creatinine showed no significant difference, which indicates that the kidney function was not altered. Finally, liver-damage markers were evaluated: serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) and serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT); the results revealed no significant difference between the treated group and the control.

To complete the subacute toxicity study, a histological examination of spleen, kidney, liver,

heart, stomach, intestine, skin, and lung from UA/OA-treated mice with 13-mg/kg doses was carried out.

Spleen slides of mice treated with the UA/OA mixture (Figure 2) demonstrated normal splenic architecture with normal lymphoid follicles and sinuses; these observations corroborate that the mixture of triterpenes did not produce alterations at the hematological level, because the RBC and WBC values were not affected.

Kidney sections from animals treated with the triterpenoids mixture (Figure 2) showed a normal renal cortex with the normal appearance of glomerulus, tubules, and normal renal papilla; if, however there existed some alteration in the renal function, the values of the uric acid and creatinine markers would be altered among the study groups (Carvalho *et al.*, 2011). Liver sections showed normal hepatic architecture, hepatocytes, portal triad, and central vein (Figure 2); these observations, combined with the serum levels of the transaminases evaluated, are employed to identify hepatocellular damage. These are essential determinations for researching and recognizing liver damage induced by xenobiotics (Carvalho *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011).

Other organs that were analyzed histologically included the heart; in this case, the

slides showed normal endocardium and myocardium in addition to normal cardiac muscle architecture. Stomach and intestine sections showed normal mucosa, submucosa, and circular and longitudinal muscles layer. Skin sections exhibited normal epidermis, dermis, stratum corneum, hair follicles, and sebaceous glands, while the lung section demonstrated normal alveolar geometry and normal appearing alveolar septum (Figure 2).

The histological analysis and the hematological and biochemical parameters are essential for an evaluation of the toxicological risk of substances with biological activity, because any changes in one of these parameters can possess a high predictive value of possible damage in humans when these data are translated from animal studies (Olson *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2011).

Medicinal plants and their derivatives have been employed as an alternative to allopathic medicine in many countries. Despite their widespread use, few scientific studies have been undertaken to ascertain the safety and efficacy of traditional remedies or pure compounds (Silva *et al.*, 2011). In the case of TB, it is well known that two of the main antituberculosis drug (R and I) cause hepatotoxicity (Saravanan and Pugalendi, 2006; Yogeeta *et al.*, 2007), an effect that

has an influence on treatment adherence; therefore, it is recommended to understand the toxic effect of the possible antituberculosis candidates prior to carrying out evaluations *in vivo*. In the case of UA/OA mixture, it has been described that both compounds exert a hepatoprotector effect on models *in vivo*, when hepatic damage is induced with ethanol (Saravanan and Pugalendi, 2006), acetaminophen, CCl<sub>4</sub>, and D-galactosamine, among others (Liu, 1993; 1995; Lezhi and Xintang, 1992). Likewise, it has been described that OA offers a hepatoprotector effect in patients with tuberculosis who are treated with antituberculosis drugs (Liu, 2008); thus, this UA/OA mixture can offer a beneficial effect in patients with TB with the addition of an antimycobacterial effect.

## CONCLUSIONS

The mixture of UA/OA is practically innocuous when its toxicity is evaluated by the s.c. route in acute (LD<sub>50</sub> >300 mg/kg) and subacute (13 mg/kg repeated-dose, 28-day toxicity) administration in Balb/c mice. Chronic toxicity, genotoxicity, and mutagenesis studies are required for extra support concerning the safe use of these compounds.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Instituto Mexicano del Seguro Social, projects FOFOI 2005/1/I/102 and FIS 2006/1A/I/053.

## Conflict of Interests

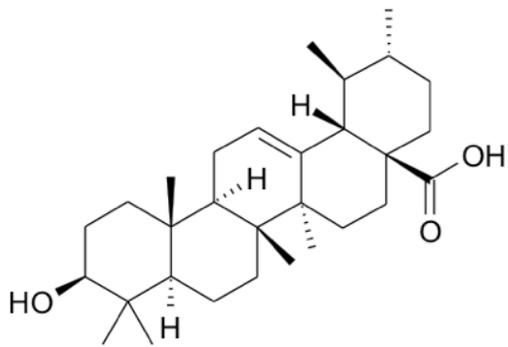
The authors declare that they have no competing interest. All authors read and approved the final manuscript.

## REFERENCES

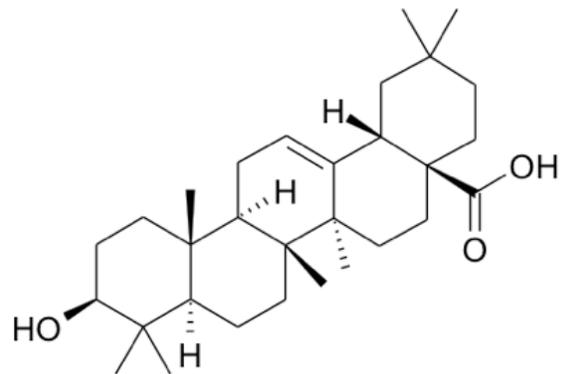
- Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. 2001. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med.* 67: 685-694.
- Carvalho AL, Annoni R, Silva PR, Borelli P, Fock RA, Trevisan MT, Mauad T. 2011. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. *J. Ethnopharmacol.* 135: 730-736.
- Copp BR and Pearce AN. 2007. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Prod. Rep.* 24: 278-297.
- Ge F, Zeng F, Liu S, Guo N, Ye H, Song Y, Fan J, Wu X, Wang X, Deng X, Jin Q, Yu L. 2010. *In vitro* synergistic interactions of oleanolic acid in combination with isoniazid, rifampicin or ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.* 59: 567-572.
- Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG, Montenegro G, Yang D, Timmermann BN. 2004. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med.* 70: 509-514.
- Ismaili H, Milella L, Fkih-Tetouani S, Ilidrissi A, Camporese A, Sosa S, Altinier G, Della Loggia R, Aquino R. 2004. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 91: 31-36.
- Jaki BU, Franzblau SG, Chadwick LR, Lankin DC, Zhang F, Wang Y, Pauli GF. 2008. Purity-activity relationships of natural products: the case of anti-TB active ursolic acid. *J. Nat. Prod.* 71:1742-1748.
- Jiménez-Ferrer E, Pérez-Terán Y, Román-Ramos R, Tortoriello J. 2005. Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning. *Phytomedicine.* 12: 116-122.

- Lezhi Z and Xintang L. 1992. Study on the mechanism of oleanolic acid against experimental liver injury in rats. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*. 2
- Liu J, Wu Q, Lu YF, Pi J. 2008. New insights into generalized hepatoprotective effects of oleanolic acid: key roles of metallothionein and Nrf2 induction. *Biochem. Pharmacol.* 76: 922-928.
- Liu J. 2005. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J. Ethnopharmacol.* 100: 92-94.
- Liu J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 49: 57-68.
- Liu J, Liu Y, Mao Q, Klaassen CD. 1994. The effects of 10 triterpenoid compounds on experimental liver injury in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 22: 34-40.
- Logarto-Parra A, Silva Y R, Guerra SI, Iglesias BL. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine.* 8: 395-400.
- Natural Products Alert (NAPRALERT). 2011. Biological activities of ursolic and oleanolic acid. <http://www.napralert.org> [Consulted October, 2011].
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2007. Draft updated test guidelines 407 and 423: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents and Acute Toxic Class Method respectively.
- Okunade AL, Elvin-Lewis MP, Lewis WH. 2004. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry.* 65: 1017-1032.
- Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, Van Deun K, Smith P, Berger B, Heller A. 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32: 56-67.
- Ovesná Z, Kozićs K, Slamenová D. 2006. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutat. Res.* 600: 131-137.
- Pérez R, Pérez C, Pérez S, Zavala A. 1998. Effect of triterpenoids of *Bouvardia ternifolia* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine.* 5: 475-478.
- Saravanan R and Pugalendi V. 2006. Impact of ursolic acid in chronic ethanol-induced oxidative stress in the rat heart. *Pharmacol Rep.* 58: 41-47.
- Silva MG, Aragão TP, Vasconcelos CF, Ferreira PA, Andrade BA, Costa IM, Costa-Silva JH, Wanderley AG, Lafayette SS. 2011. Acute and subacute toxicity of *Cassia occidentalis* L. stem and leaf in Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.* 136: 341-346.
- Somova LO, Nadar A, Rammanan P, Shode FO. 2003. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine.* 10: 115-121.
- Wächter GA, Valcic S, Flagg ML, Franzblau SG, Montenegro G, Suarez E, Timmermann BN. 1999. Antitubercular activity of pentacyclic triterpenoids from plants of Argentina and Chile. *Phytomedicine.* 6: 341-345.
- Wächter GA, Valcic S, Franzblau SG, Suarez E, Timmermann BN. 2001. Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippia turbinata*. *J. Nat. Prod.* 64: 37-41.
- Yogeeta S, Ragavender HRB, Devaki T. 2007. Antihepatotoxic Effect of *Punica granatum* Acetone Extract against Isoniazid- and Rifampicin-Induced Hepatotoxicity. *Pharm. Biol.* 45: 631-637.

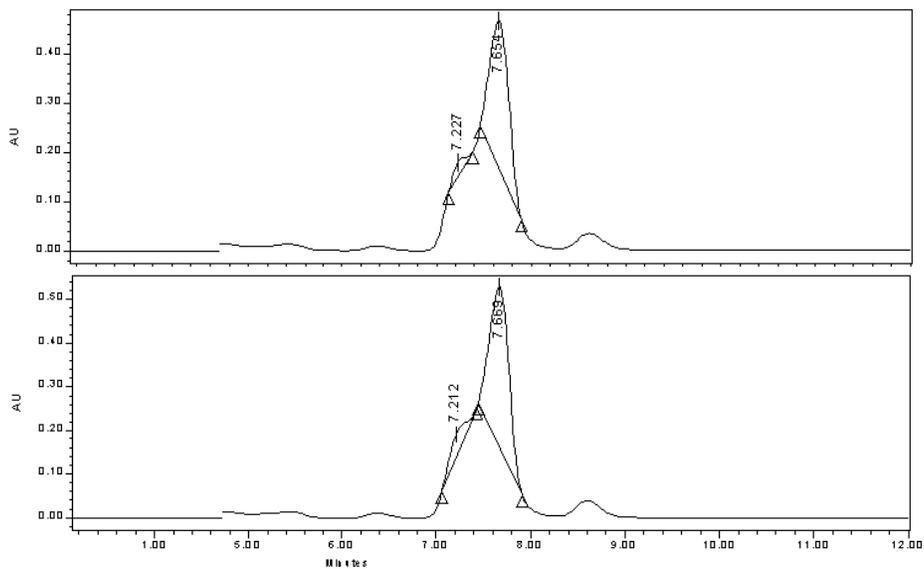




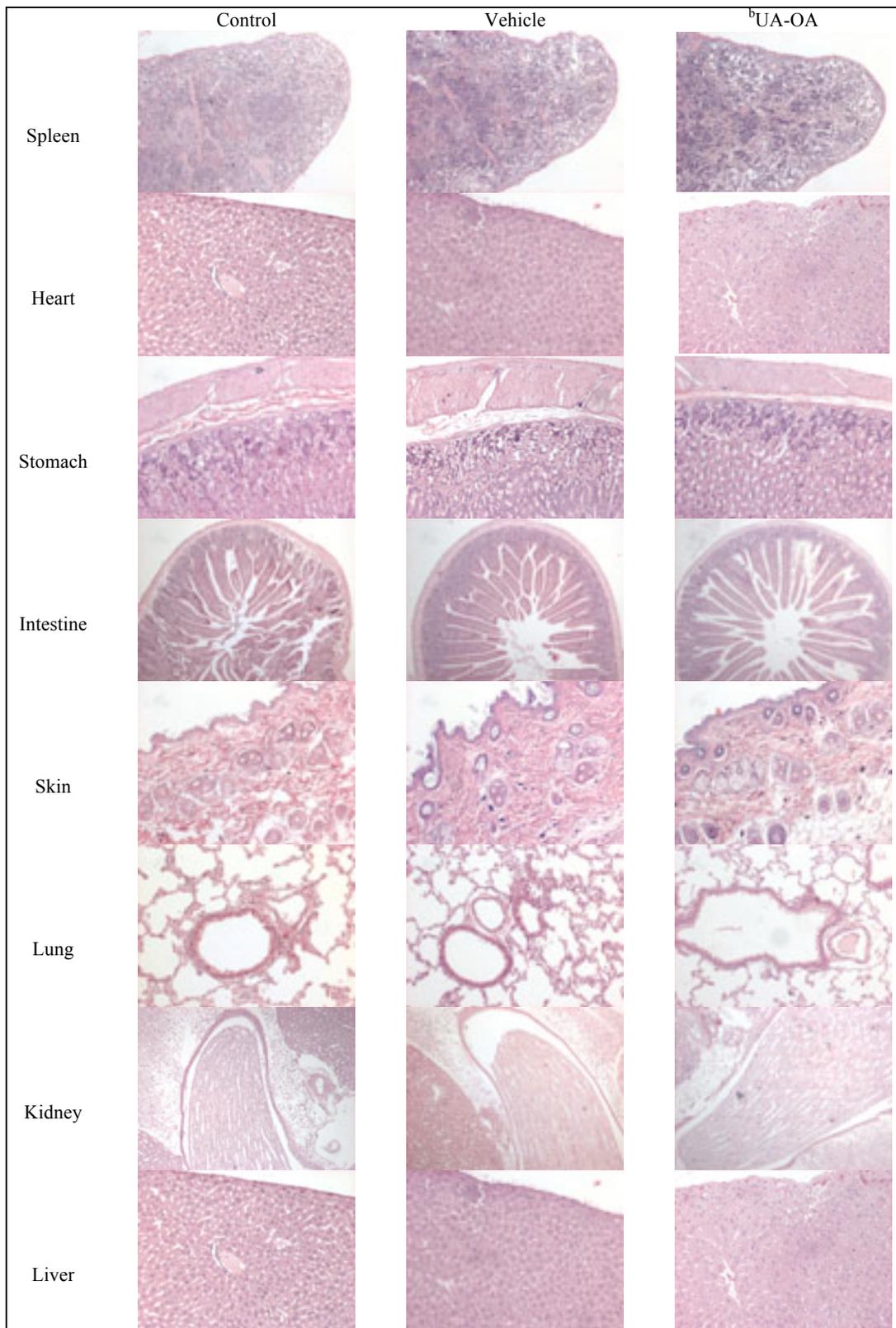
**UA (1)**



**OA (2)**



**Figure 1.** Upper: representative high performance liquid chromatography (HPLC) chromatogram of the mixture ursolic acid/oleanolic acid (UA/OA) 1:1 (Sigma)  $R_T = 7.22$  and  $7.65$ ; Lower: representative HPLC chromatogram of the mixture ursolic acid/oleanolic acid (UA/OA) 2:1 (*Bouvardia ternifolia*)  $R_T = 7.21$  and  $7.67$



**Figure 2.** Histologic specimens of mouse tissues (spleen- x100, heart- x100, stomach- x100, intestine- x40, skin- x100, lung- x100, kidney- x40 and liver- x100) collected from mice euthanized on day 28, stained with H&E. UA = Ursolic acid; OA = Oleanolic acid. <sup>b</sup>A group was given UA-OA 13 mg/kg.

**Table 1.** Body weights of mice in subacute toxicity of UA/OA

	Body weight (g)			
	Day 0	Day 14	Day 28	Weight gain on day 14
<b>Females</b>				
Control	20.78 ± 0.57	21.43 ± 0.71	21.93 ± 0.70	1.30 ± 0.46
Vehicle	21.02 ± 0.43	22.06 ± 0.16	22.92 ± 0.14	2.18 ± 0.13
UA-OA <sup>a</sup>	20.67 ± 0.25	21.80 ± 0.55	22.62 ± 0.69	1.95 ± 0.55
UA-OA <sup>b</sup>	21.12 ± 0.51	22.11 ± 0.34	22.61 ± 0.28	1.85 ± 0.31
<b>Males</b>				
Control	20.73 ± 0.65	22.30 ± 0.79	24.08 ± 1.45	2.35 ± 0.80
Vehicle	20.23 ± 0.64	23.25 ± 0.38	25.08 ± 0.65	3.02 ± 0.52
UA-OA <sup>a</sup>	20.23 ± 0.64	23.25 ± 0.38	25.08 ± 0.65	3.02 ± 0.52
UA-OA <sup>b</sup>	20.18 ± 0.30	22.57 ± 0.53	24.10 ± 0.91	2.39 ± 0.44

Values are expressed as mean ± Standard error of mean (SEM), *n* = 5; UA = ursolic acid; OA = oleanolic acid. <sup>a</sup>A group was given UA/OA 6.5 mg/kg; <sup>b</sup>A group was given UA/OA 13 mg/kg.

**Table 2.** Organ weights of mice in subacute toxicity of UA/OA

	Organ weights (g)			
	Control	Vehicle	UA/OA <sup>a</sup>	UA/OA <sup>b</sup>
<b>Females</b>				
Spleen	0.45 ± 0.02	0.54 ± 0.07	0.54 ± 0.02	0.53 ± 0.02
Heart	0.51 ± 0.03	0.48 ± 0.09	0.53 ± 0.08	0.52 ± 0.02
Liver	4.24 ± 0.55	4.31 ± 0.12	4.34 ± 0.30	4.23 ± 0.09
Kidney	1.14 ± 0.02	1.13 ± 0.05	1.12 ± 0.08	1.14 ± 0.05
Lung	0.71 ± 0.02	0.66 ± 0.09	0.75 ± 0.02	0.71 ± 0.02
Brain	1.77 ± 0.03	1.81 ± 0.10	1.80 ± 0.08	1.79 ± 0.05
<b>Males</b>				
Spleen	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.04	0.47 ± 0.03	0.51 ± 0.06
Heart	0.63 ± 0.03	0.61 ± 0.06	0.59 ± 0.09	0.63 ± 0.03
Liver	4.71 ± 0.61	4.86 ± 0.36	4.87 ± 0.08	4.99 ± 0.16
Kidney	1.43 ± 0.05	1.40 ± 0.05	1.44 ± 0.02	1.40 ± 0.13
Lung	0.72 ± 0.05	0.72 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.75 ± 0.05
Brain	1.53 ± 0.06	1.50 ± 0.10	1.51 ± 0.04	1.48 ± 0.03

Values are expressed as mean ± Standard error of mean (SEM), *n* = 5; UA = ursolic acid; OA = oleanolic acid; <sup>a</sup>A group was given UA/OA 6.5 mg/kg; <sup>b</sup>A group was given UA/OA 13 mg/kg.

**Table 3.** Hematological values of mice in subacute toxicity of UA/OA

	Group			
	Control	Vehicle	UA/OA <sup>a</sup>	UA/OA <sup>b</sup>
Females				
RBC × (10 <sup>6</sup> /uL)	9.28 ± 0.31	9.64 ± 0.26	8.83 ± 0.73	8.76 ± 1.09
HGB (g/dL)	14.80 ± 0.32	14.65 ± 1.24	16.03 ± 0.95	15.35 ± 2.06
HCT (%)	45.20 ± 1.79	47.33 ± 1.85	42.53 ± 3.53	41.68 ± 4.85
MCV (fL)	48.70 ± 0.75	49.08 ± 0.64	48.38 ± 0.31	47.63 ± 0.36
MCHC (g/dL)	32.73 ± 1.07	32.35 ± 1.53	36.10 ± 2.03	36.37 ± 2.16
Males				
RBC × (10 <sup>6</sup> /uL)	9.65 ± 0.71	9.71 ± 0.67	9.15 ± 0.33	8.32 ± 0.96
HGB (g/dL)	15.94 ± 0.67	16.04 ± 1.09	15.95 ± 0.35	14.75 ± 1.63
HCT (%)	46.34 ± 2.61	46.74 ± 2.68	43.70 ± 1.13	39.80 ± 5.66
MCV (fL)	48.08 ± 1.19	48.16 ± 0.86	47.80 ± 0.57	47.75 ± 1.34
MCHC (g/dL)	34.40 ± 0.65	34.38 ± 1.54	36.60 ± 0.00	37.05 ± 1.20

Values are expressed as mean ± Standard error of mean (SEM), *n* = 5; RBC = Red blood cells; HGB = Hemoglobin; HCT = Hematocrit; MVC = Mean corpuscular volume; MCHC = Mean corpuscular hemoglobin concentration. <sup>a</sup>A group was given UA/OA 6.5 mg/kg; <sup>b</sup>A group was given UA/OA 13 mg/kg.

**Table 4.** Differential white blood cell count of mice in subacute toxicity of UA/OA

	Group			
	Control	Vehicle	UA/OA <sup>a</sup>	UA/OA <sup>b</sup>
Females				
WBC (x × 10 <sup>3</sup> /uL)	3.53 ± 1.37	2.73 ± 0.89	5.08 ± 2.52	2.70 ± 1.59
Lymphocytes (%)	84.50 ± 6.61	82.25 ± 12.76	87.50 ± 5.26	85.00 ± 5.16
Neutrophils (%)	13.00 ± 5.03	16.75 ± 11.35	12.50 ± 5.26	13.25 ± 4.11
Eosinophils (%)	0.50 ± 1.00	1.00 ± 2.00	0.50 ± 1.00	1.75 ± 2.06
Monocytes (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Basophils (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Males				
WBC (x × 10 <sup>3</sup> /uL)	6.52 ± 1.47	5.80 ± 3.11	5.20 ± 1.98	2.80 ± 1.41
Lymphocytes (%)	78.00 ± 2.58	81.10 ± 6.23	80.50 ± 4.95	78.50 ± 3.54
Neutrophils (%)	20.50 ± 5.97	18.25 ± 2.36	17.00 ± 2.83	19.00 ± 9.90
Eosinophils (%)	0.40 ± 0.89	0.80 ± 1.10	2.50 ± 0.71	2.20 ± 0.00
Monocytes (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Basophils (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Values are expressed as mean ± Standard error of mean (SEM), *n* = 5; UA = Ursolic acid; OA = Oleanolic acid; WBC = White blood cells; <sup>a</sup>A group was given UA/OA 6.5 mg/kg; <sup>b</sup>A group was given UA/OA 13 mg/kg.

**Table 5.** Blood chemistry values of mice in subacute toxicity of UA/OA

	Group
--	-------

	Control	Vehicle	UA/OA <sup>a</sup>	UA/OA <sup>b</sup>
<b>Females</b>				
Uric acid (mg/dL)	1.46 ± 0.11	1.44 ± 0.11	1.50 ± 0.12	1.47 ± 0.57
Creatinine (mg/dL)	1.78 ± 0.09	1.86 ± 0.09	1.86 ± 0.14	1.81 ± 0.11
Triglycerides (mmol/L)	0.98 ± 0.13	0.94 ± 0.13	0.96 ± 0.15	0.74 ± 0.05
HDL cholesterol (mmol/L)	8.12 ± 0.23	8.24 ± 0.23	8.24 ± 0.38	8.28 ± 0.18
Total cholesterol (mmol/L)	10.60 ± 0.45	10.80 ± 0.45	10.80 ± 0.45	10.40 ± 0.55
SGPT (U/L)	32.60 ± 2.51	32.40 ± 2.51	32.60 ± 2.41	35.60 ± 1.52
SGOT (U/L)	117.60 ± 10.13	120.20 ± 10.13	118.60 ± 9.29	124.20 ± 8.73
Glucose (mg/dL)	373.60 ± 24.39	356.80 ± 24.39	374.67 ± 26.08	363.67 ± 18.01
<b>Males</b>				
Uric acid (mg/dL)	1.18 ± 0.16	1.20 ± 0.19	1.26 ± 0.18	1.16 ± 0.21
Creatinine (mg/dL)	1.75 ± 0.09	1.76 ± 0.05	1.71 ± 0.09	1.81 ± 0.05
Triglycerides (mmol/L)	0.68 ± 0.08	0.68 ± 0.08	0.74 ± 0.09	0.72 ± 0.08
HDL cholesterol (mmol/L)	10.82 ± 0.57	10.24 ± 0.47	10.48 ± 0.38	10.54 ± 0.32
Total cholesterol (mmol/L)	13.80 ± 0.84	14.40 ± 1.52	13.20 ± 0.84	13.80 ± 0.45
SGPT (U/L)	34.00 ± 3.00	36.20 ± 2.17	33.60 ± 2.19	34.40 ± 1.67
SGOT (U/L)	128.80 ± 15.99	129.80 ± 11.01	123.00 ± 14.27	121.80 ± 18.51
Glucose (mg/dL)	423.80 ± 12.58	421.80 ± 13.48	420.40 ± 12.66	425.40 ± 16.32

Values are expressed as mean ± Standard error of mean (SEM), *n* = 5; UA = Ursolic acid; OA = Oleanolic acid SGPT = Serum glutamic pyruvic transaminase; SGOT = Serum glutamic oxaloacetic transaminase. <sup>a</sup>A group was given UA/OA 6.5 mg/kg; <sup>b</sup>A group was given UA/OA 13 mg/kg.