



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

**PAPEL ANTIMICROBIANO DEL ÁCIDO OLEANÓLICO
EN CÉLULAS EPITELIALES INFECTADAS POR
Escherichia coli y *Staphylococcus aureus***

**Para obtener el grado de Licenciatura en Medicina Veterinaria y
Zootecnia**

PRESENTA

Nirvana Vital Olvera

Director (a)

Dra. Nayeli Shantal Castrejón Jiménez

Codirector (a)

Dr. Juan Carlos Hernández González

Comité tutorial

Dr. José Ignacio Olave Leyva

Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

Santiago de Lugo Guerrero., Edo. de Hidalgo. Junio de 2026.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Institute of Agricultural Sciences

Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Academic Area of Veterinary Medicine and Zootecnics

Tulancingo de Bravo, Hidalgo., a 22 de mayo de 2026

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado

Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado al pasante de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, **Nirvana Vital Olvera**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado **"Papel antimicrobiano del ácido oleanólico en células epiteliales infectadas por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*"**, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

DIRECTORA DRA. NAYELI SHANTAL CASTREJÓN JIMÉNEZ

CODIRECTOR DR. JUAN CARLOS HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

ASESOR DR. JOSÉ IGNACIO OLAVE LEYVA

ASESOR DR. VÍCTOR MANUEL MARTÍNEZ JUÁREZ

Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dra. Maricela Ayala Martínez
Coordinadora del PEMVZ



"Amor, Orden y Progreso"



Av. Universidad No. 133, Col. San Miguel Huatengo, Santiago
Tulantepec. C.P. 43775. Hidalgo, Mexico.
Teléfono: 7717172000 Ext. 42105
alfonso_munoz@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

Agradecimientos

Quiero dedicar estas palabras de agradecimiento a Dios principalmente, por su presencia constante y permitirme sentir su apoyo, amor y protección. Por seguirme en cada paso que he dado y darme fortaleza y sabiduría cuando la he necesitado. Todo lo logrado es por Él y para Él.

A la Dra. Nayeli Shantal Castrejón Jiménez y al Dr. Juan Carlos Hernández González, por su atención, apoyo y paciencia, y por compartir sus conocimientos durante el desarrollo de este proyecto, así como por su guía y confianza a lo largo de este proceso.

A los miembros del comité, al Dr. José Ignacio Olave Leyva y al Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez, por su colaboración, tiempo y valiosas aportaciones que contribuyeron a la culminación de este proyecto. Así como a mis compañeros de laboratorio por compartir sus conocimientos, su apoyo y su compañerismo.

A mis padres, por ser mi guía en cada paso que doy, por su amor incondicional, su apoyo constante y por impulsarme siempre a seguir adelante, a alcanzar mis metas y a permitirme llegar hasta aquí. Son mi ejemplo, motivación de vida y mis sueños hechos realidad.

A mi abuelita Flor, a mi abuelita Toña, a mi hermana, a Alan y a todas las personas que me han acompañado en mi trayectoria, por creer en mí y por brindarme fortaleza en los momentos más importantes, que de una u otra manera me han impulsado, inspirado y ayudado a llegar aquí. A todos, gracias por formar parte de este logro tan importante en mi vida.

Josué 1:9 “Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas” (RVR 1960).

Salmos 37:5 “Encomienda a Jehová tu camino, confía en él; y él hará” (RVR 1960).

Contenido

Índice de figuras	5
Índice de abreviaturas.....	7
Resumen.....	9
Abstract	10
1. Introducción	11
1.1 Historia e importancia de los antimicrobianos	11
1.2 Antimicrobiano	14
1.3 Resistencia a los antimicrobianos.....	14
1.3.1 Mecanismos de resistencia bacteriana y su producción	15
1.3.2 Propagación de la resistencia a los fármacos antimicrobianos.	19
1.3.3 Agentes patógenos resistentes a los antibióticos.	19
1.3.4 Prevención de la resistencia antimicrobiana.	20
1.3.5 Resistencia antimicrobiana de <i>E. coli</i>	21
1.3.6 Resistencia antimicrobiana de <i>S. aureus</i>	22
1.4 Sustancias alternativas como antimicrobianos	23
1.5 Ácido oleanólico	26
1.5.1 Fuente del AO.....	29
1.6 Actividad antimicrobiana del AO	29
1.7 <i>Escherichia coli</i>	31
1.7.1 Presentación clínica de <i>E. coli</i> en el pulmón de animales domésticos y del ser humano.	33
1.8 <i>Staphylococcus aureus</i>	34
1.8.1 Presentación clínica de <i>S. aureus</i> en el pulmón de animales domésticos y el ser humano	35
2. Justificación	37
3. Hipótesis.....	38
4. Objetivos	39
4.1 Objetivo general	39
4.2 Objetivos específicos	39

5.	Materiales	40
5.1	Líneas celulares.....	40
5.2	Ácido oleanólico	40
5.3	Cepas bacterianas.....	40
5.3.1	<i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	40
6.	Métodos.....	41
6.2	Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del AO en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	41
6.3	PREPARACIÓN DE MONOCAPAS CELULARES	42
6.4	Determinación del efecto sobre la viabilidad celular del AO sobre las células A549	42
6.4.1	Dilución de AO	42
6.4.2	Técnica de MTT	43
6.4.4	Infección de células epiteliales por <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	44
6.5	Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	45
6.6	Porcentaje de infección celular por conteo en microscopio de campo	46
6.6.1	Tinción de Gram	46
7.	Resultados.....	47
7.1	Actividad antimicrobiana del AO	47
7.2	Efecto citotóxico del DMSO sobre la viabilidad de las células A549	48
7.3	Efecto antibacteriano del AO en las células epiteliales.....	49
7.4	Determinación de la Concentración Inhibitoria Media del AO en células epiteliales.....	50
7.5	Microscopía óptica de células infectadas por <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	51
7.6	Determinación de unidades formadoras de colonias en las células A549 infectadas por <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	53
8.	Discusión	55
9.	Conclusión.....	58
	Bibliografía	59

Índice de figuras

Figuras:

Figura 1: Línea cronológica del descubrimiento de los antibióticos incorporados a la práctica clínica.	12
Figura 2: Número de nuevas clases de antibióticos que han llegado al mercado. Predicciones de nuevas clases necesarias durante los próximos 100 años.	13
Figura 3: Mecanismos intrínsecos de resistencia.	16
Figura 4: Mecanismos de resistencia genética a los antimicrobianos.	17
Figura 5: Patrones de resistencia a los medicamentos en patógenos.	19
Figura 6: Aparición de resistencia a fármacos antimicrobianos en algunos patógenos humanos.	20
Figura 7: Estructura química del AO. Tomada de (Castellano et al., 2022).	26
Figura 8: Micrografía electrónica de barrido de <i>E. coli</i> . Clúster de bacterias de <i>E. coli</i> amplificado a 10.000 x Tomada de (Christopher P., 2005).	32
Figura 9: <i>S. aureus</i> . Con un aumento de 20 000X.	35
Figura 10: Diluciones seriadas de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	45
Figura 11: Representación del crecimiento bacteriano tras el tratamiento con AO a diferentes concentraciones.	47
Figura 12: Micrografías del efecto del DMSO sobre la morfología de las células A549 a 400 x.	48
Figura 13: Efecto citotóxico del DMSO sobre la viabilidad de las células A549.	49
Figura 14: Micrografías del efecto del AO sobre la morfología de las células A549 400 x.	50
Figura 15: Efecto del AO sobre la viabilidad de las células A549.	51
Figura 16: Micrografías de células A549 infectadas por <i>E. coli</i>	52
Figura 17: Micrografías de células A549 infectadas por <i>S. aureus</i>	53
Figura 18: Ensayo de replicación de <i>E. coli</i> en un modelo de infección de células epiteliales tratadas con diferentes concentraciones de AO (0, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL).	54
Figura 19: UFC/mL de <i>S. aureus</i> presentes en células epiteliales tratadas con diferentes concentraciones de AO (0, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL).	54

Tablas:

Tabla 1: Mecanismos de resistencia presentes en algunos antibióticos.....	18
Tabla 2: Directrices para la prevención de la resistencia a los fármacos antimicrobianos	20
Tabla 3: Compuestos producidos por microorganismos (metabolitos primarios y secundarios) y sus aplicaciones convencionales.	24
Tabla 4: Compuestos químicos menos frecuentes aislados de plantas con actividad antimicrobiana.	25
Tabla 5: Actividad antimicrobiana del AO contra bacterias	31
Tabla 6: Concentraciones del AO empleadas para determinar la actividad antibacteriana frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	41
Tabla 7: Concentraciones de AO para determinar la viabilidad celular.	43
Tabla 8: Cantidad de AO según la concentración en la dilución.	44
Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del AO en mg/mL.....	47

Índice de abreviaturas

AO: Ácido Oleanólico.

MRSA: Del inglés “methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”

VISA: Del inglés “*Staphylococcus aureus* vancomycin intermediate”

MDR: Del inglés “Multi-drug-resistant”

MTT: Del inglés “3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide”

AU: Ácido Ursólico

ExPEC: *Escherichia coli* extraintestinal patogénica

ECEI: *Escherichia coli* extraintestinal

IAAS: Infecciones asociadas a la asistencia sanitaria

NAC: Neumonía adquirida en la comunidad

BHI: Del inglés “Brain Heart Infusion”

DMSO: Dimetilsulfóxido

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CMB: Concentración Mínima Bactericida

SDS: Sulfato Docetyl de sodio

PBS: Disolución salina tamponada con fosfato

AK: Amikacina

MF: Medio Fresco

SFB: Suero Fetal Bovino

RAM: Resistencia antimicrobiana

ATCC: Del inglés “American Type Culture Collection”

MOI: Del inglés “Multiplicity of Infection”

LSPPs: Del inglés “Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins”

CATs: Del inglés “Chloramphenicol acetyltransferases”

BLEE: B-lactamasas de espectro extendido

ERV: Enterococos resistentes a vancomicina

SARV: *S. aureus* resistente a la vancomicina

PBML: Células mononucleares periféricas humanas

M/M: Monocitos/macrófagos

VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana

LPS: Lipopolisacáridos

STZ: Estreptozotocina

CC: Complejo clonal

SRB: Sulforhodamina B

IC50: Concentración inhibitoria 50%

Resumen

La resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas de salud pública y animal. En las últimas décadas, los antibióticos han sido fundamentales para el tratamiento de numerosas infecciones bacterianas; sin embargo, el uso indiscriminado e inapropiado de estos compuestos en la medicina clínica y en la producción ganadera ha favorecido la propagación de cepas resistentes. Este proceso limita significativamente las alternativas terapéuticas y aumenta la mortalidad asociada a infecciones antes tratables.

Por lo tanto, existe un gran interés en identificar compuestos naturales con actividad antimicrobiana que puedan utilizarse como tratamiento alternativo para enfermedades infecciosas, reemplazando o complementando los antibióticos convencionales y reduciendo la resistencia a estos.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto antimicrobiano del ácido oleanólico (AO), un triterpeno natural presente en diversas plantas, frutas y hierbas medicinales, conocido por sus propiedades farmacológicas, incluidas las actividades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas. En este estudio, se evaluó el AO frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y se analizó su efecto sobre células epiteliales infectadas por estas bacterias y posteriormente tratadas con AO. Se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima bactericida (CMB) y el efecto sobre la viabilidad celular. Los resultados mostraron que el AO presentó actividad antimicrobiana, con efecto bactericida, contra ambas bacterias. Además, se demostró que, a concentraciones bajas y moderadas, el AO no causó citotoxicidad en las células A549.

En conjunto, los hallazgos confirman que el AO posee un potencial terapéutico como agente antimicrobiano alternativo o adyuvante contra *E. coli* y *S. aureus*, lo que representa una opción prometedora para reducir el uso indiscriminado de antibióticos y contribuir a disminuir la resistencia antimicrobiana mediante compuestos de origen natural.

Palabras Clave:

Ácido oleanólico, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, actividad antimicrobiana, resistencia antimicrobiana.

Abstract

Antimicrobial resistance is one of the main public and animal health problems. In recent decades, antibiotics have been fundamental for the treatment of numerous bacterial infections; however, the indiscriminate and inappropriate use of these compounds in clinical medicine and livestock production has favored the spread of resistant strains. This process significantly limits therapeutic alternatives and increases mortality associated with infections that were previously treatable.

Therefore, there is great interest in identifying natural compounds with antimicrobial activity that can be used as an alternative treatment for infectious diseases, replacing or complementing conventional antibiotics and reducing antibiotic resistance.

The objective of this research was to determine the antimicrobial effect of oleanolic acid (OA), a natural triterpene present in various plants, fruits, and medicinal herbs, which is known for its pharmacological properties, including anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities. In this study, the AO was evaluated against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and its effect on epithelial cells infected by these bacteria and subsequently treated with AO was analyzed. The minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (MBC), and the effect on cell viability were determined. The results showed that AO exhibited antimicrobial activity, including bactericidal effects, against both bacteria. Furthermore, it was demonstrated that, at low and moderate concentrations, AO did not cause severe cytotoxicity in A549 cells.

Taken together, the findings confirm that AO has therapeutic potential as an alternative or adjuvant antimicrobial agent against *E. coli* and *S. aureus*, representing a promising option to reduce the indiscriminate use of antibiotics and contribute to decreasing antimicrobial resistance through compounds of natural origin.

Keywords:

Oleanolic acid, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial activity, antimicrobial resistance.

1. Introducción

1.1 Historia e importancia de los antimicrobianos

Los antimicrobianos son agentes químicos o biológicos capaces de inhibir el crecimiento o eliminar microorganismos patógenos, incluidos bacterias, virus, hongos y parásitos, con el propósito fundamental de prevenir o tratar enfermedades infectocontagiosas (WHO, 2023), lo que les confiere importancia.

Históricamente, la lucha contra las infecciones se remonta a civilizaciones antiguas, como la egipcia, que utilizaban remedios empíricos basados en sustancias como el pan con moho para tratar heridas, sin comprender el mecanismo antimicrobiano que subyace a estas prácticas (Laborda, 2021). Sin embargo, fue hasta el siglo XIX que la ciencia reconoció a estos microorganismos como causantes de enfermedades (Mohr, 2016).

En 1909, Paul Ehrlich desarrolló la arsfenamina (Salvarsan) para tratar la sífilis, aplicando el concepto de “bala mágica”, un compuesto químico capaz de atacar selectivamente al agente patógeno sin dañar al huésped (Aminov, 2017; Mohr, 2016). Posteriormente, en la década de 1930, el descubrimiento de las sulfonamidas marcó el inicio de la primera generación de antimicrobianos sintéticos, que demostraron eficacia clínica en el combate contra diversas infecciones bacterianas (Pérez-Trallero Emilio & Iglesias Luis, 2003).

Sin embargo, uno de los descubrimientos más importantes ocurrió en 1928, cuando Alexander Fleming observó que un moho inhibía el crecimiento de bacterias, lo que dio origen a la penicilina y permitió identificar a este hongo como *Penicillium notatum*, el primer antibiótico natural con un perfil terapéutico eficaz y seguro (Fleming, 1929). Ocurrió que había contaminado una placa de cultivo de bacterias de *Staphylococcus* que accidentalmente había dejado destapada, y el hongo había creado zonas libres de bacterias dondequiera que crecía en la placa, por lo que Fleming aisló y cultivó el moho en cultivo puro y descubrió que una sustancia soluble producida por *P. notatum* resultó extremadamente efectiva incluso en concentraciones muy bajas, previniendo el crecimiento de *Staphylococcus* incluso cuando se diluyó 800 veces (Laborda, 2021). Sin embargo, desde el inicio Fleming fue consciente de los riesgos que conllevaba su uso indiscriminado, por lo que advirtió que “El uso inapropiado de la penicilina podría llevar a la selección de bacterias resistentes”. Existe el peligro de que el ignorante pueda autoadministrarse una

dosis insuficiente y, al exponer a las bacterias a cantidades no letales del antibiótico, hacerlas resistentes” (Fleming, 1945), donde su llamado temprano a la prudencia en el uso de antibióticos es una advertencia importante que dio durante su discurso al recibir el Premio Nobel de Medicina en 1945.

El descubrimiento de la penicilina en 1928 marcó el inicio de la era dorada del descubrimiento de antibióticos de origen natural, que alcanzó su máximo apogeo a mediados de la década de 1950 y desde entonces, el declive gradual en el descubrimiento y desarrollo de antibióticos (Figura 1), junto con la evolución de la resistencia a fármacos en muchos patógenos humanos, ha conducido a la actual crisis de resistencia a los antimicrobianos (Hutchings et al., 2019).

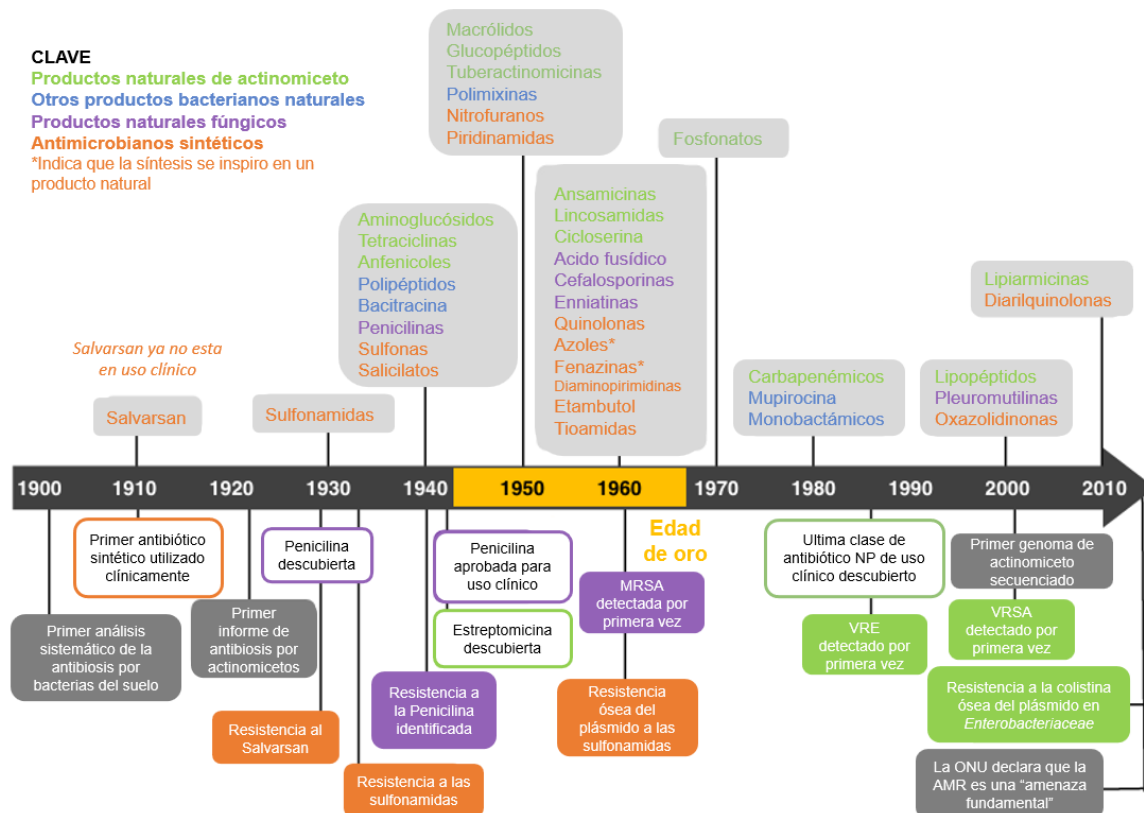


Figura 1: Línea cronológica del descubrimiento de los antibióticos incorporados a la práctica clínica.

Los antibióticos están coloreados según su origen: verde = actinomicetos, azul = otras bacterias, morado = hongos y naranja = sintéticos. En la parte inferior de la cronología se encuentran fechas clave relacionadas con el descubrimiento de antibióticos y la resistencia a los antimicrobianos, incluyendo los primeros informes de cepas resistentes a fármacos, como *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), enterococos resistentes a la vancomicina (ERV), *S. aureus* resistente a la vancomicina (SARV) y la resistencia a la colistina

transmitida por plásmidos en *Enterobacteriaceae*. Tomada y modificada de (Hutchings et al., 2019)

El futuro de la medicina moderna depende de una lucha eficaz contra el uso indiscriminado de los antibióticos, reduciendo al máximo su uso para aplicarlos únicamente cuando sea estrictamente necesario (So et al., 2010). El mundo produjo más de 20 nuevas clases de antibióticos entre 1930 y 1962 (A. Coates et al., 2002), lo que significa que a corto plazo se requieren al menos 10 antibióticos que son activos contra las super bacterias, para llegar al mercado en los próximos 10 años y a largo plazo se necesitarán nuevas clases de antibióticos, sin embargo, la mayoría de las clases de antibióticos tienen ahora un impacto sustancial de problemas de resistencia, al menos para algunas especies de bacterias, una nueva clase, junto con sus análogas, podría seguir siendo útiles durante 50 años, por lo que esto significaría que las 20 clases que entró al mercado entre 1930 y 1960 duró un promedio de 50 años (A. R. Coates et al., 2011).

Nuevas Clases

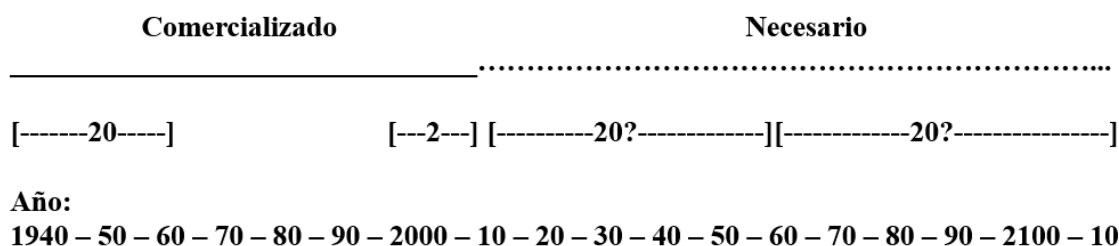


Figura 2: Número de nuevas clases de antibióticos que han llegado al mercado. Predicciones de nuevas clases necesarias durante los próximos 100 años.

La línea muestra el número de nuevas clases que alcanzó el mercado entre los años 1940 y 1960; la línea punteada muestra las dos nuevas clases desde el año 2000; y se proyectan 20 nuevas clases durante los próximos 50 años. Se requieren 20 clases más para apoyar la medicina de 50 a 100 años. Tomada y modificada de (A. R. Coates et al., 2011).

No obstante, debido al uso constante de estos medicamentos, desde la mitad del siglo XX se ha observado un incremento progresivo de la resistencia bacteriana, fenómeno en el que los microorganismos desarrollan mecanismos para evadir su acción antimicrobiana, lo que representa actualmente una amenaza crítica para la salud pública global (Mohr, 2016). Esta problemática ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias para el descubrimiento de

antimicrobianos que sustituyan o coadyuven a los convencionales, con el fin de reducir la resistencia (Giono-Cerezo et al., 2020).

1.2 Antimicrobiano

Los antimicrobianos son sustancias químicas que, a bajas concentraciones, actúan contra los microorganismos, provocando su eliminación, inhibiendo su crecimiento e impidiendo su multiplicación y desarrollo sin perjudicar al hospedador (Madigan et al., 2015), con el propósito de prevenir enfermedades o tratar infecciones en animales, humanos y plantas (OMS, 2021). Son sustancias que se obtienen por síntesis o de forma natural a partir de cultivos de microorganismos, mediante modificaciones de la estructura química de un agente obtenido de manera natural. Es posible producir agentes semisintéticos (Errecalde Jorge O., 2004).

Estos fármacos se clasifican según su estructura molecular, su mecanismo de acción y su espectro de actividad antimicrobiana. Se dividen en dos grandes categorías, antimicrobianos sintéticos y antimicrobianos naturales (antibióticos) (Madigan, et al., 2015).

1.3 Resistencia a los antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son beneficiosos para combatir las infecciones. Su uso frecuente contribuye al aumento y a la aparición de nuevos microbios resistentes en prácticamente todos los nichos ambientales (Brinkac et al., 2017). La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un fenómeno por el cual los microorganismos adquieren la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en presencia de agentes antimicrobianos. Las bacterias pueden desarrollar la RAM ya sea por presión selectiva o por adquirir genes de resistencia. La resistencia a los antibióticos es una de las principales amenazas para la salud (Giono-Cerezo et al., 2020).

La RAM es un problema global que se ha expandido ampliamente, impulsado por la diseminación de cepas endémicas que han migrado rápidamente (Christaki et al., 2020). Aunque esto no es nuevo, el uso exacerbado de antibióticos para tratar infecciones humanas y animales, el uso de promotores de crecimiento en los piensos para animales

con la intención de mejorar su crecimiento y la profilaxis contra infecciones microbianas en el ámbito agrícola han agravado este problema (Wolska et al., 2010). El lema de la Organización Mundial de la Salud (OMS) respecto a la resistencia a los antimicrobianos es “ninguna acción hoy, ninguna cura mañana”, ya que se estima que la resistencia bacteriana ocasionará 10 millones de muertes por año para el 2050 y una reducción de 2 y 5% del producto interno bruto en algunos países (Giono-Cerezo et al., 2020).

Sin embargo, se conoce que la RAM ha existido mucho antes de que los productos antimicrobianos comenzaran a comercializarse. Las bacterias desarrollan resistencia a los antibióticos a través de diversos mecanismos intrínsecos y extrínsecos (Morrison & Zembower, 2020).

Los mecanismos intrínsecos son propios de la especie bacteriana, presentes de forma natural sin exposición previa a un antibiótico (Munita & Arias, 2016) (Figura 3), y los mecanismos extrínsecos o adquiridos surgen por mutaciones genéticas o por la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal, como la conjugación, la transformación o la transducción (Blair et al., 2015) (Figura 4).

La resistencia a los antibióticos, aunque preocupante, es peligrosa y es necesario resolver esta problemática, por lo que actualmente se ha generado interés en el uso de compuestos antimicrobianos alternativos que suplan a los antibióticos para disminuir su uso y, por ende, la resistencia a ellos. Un ejemplo de estos compuestos alternativos son los bacteriófagos, los péptidos antibacterianos producidos por microorganismos y los compuestos naturales derivados de plantas medicinales o alimenticias (Wolska et al., 2010).

1.3.1 Mecanismos de resistencia bacteriana y su producción

La resistencia a los antimicrobianos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos (OMS, 2020), mediante diversos mecanismos intrínsecos y extrínsecos que dependen de factores genéticos y ambientales ; Morrison & Zembower, 2020).

Los mecanismos intrínsecos son propios de la especie bacteriana y se presentan de forma natural, sin exposición previa a un antibiótico (Munita & Arias, 2016) (Figura 3).

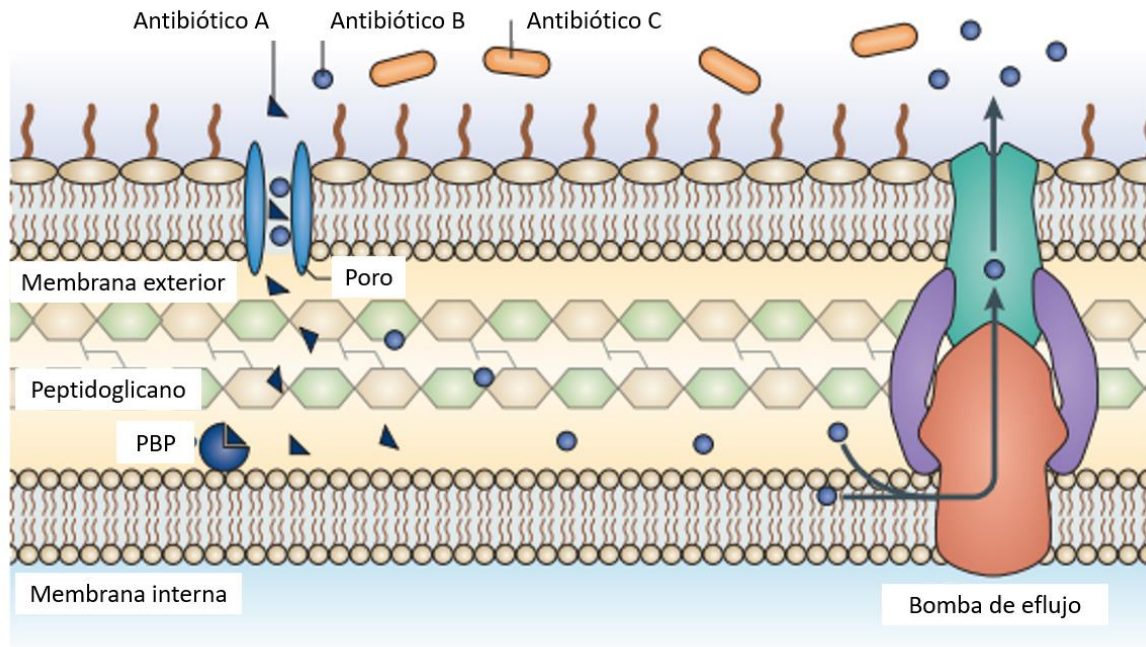


Figura 3: Mecanismos intrínsecos de resistencia.

Mecanismos intrínsecos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Los β -lactámicos que actúan sobre las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs). El antibiótico A puede entrar en la célula a través de una proteína porina que permea la membrana, alcanzar su diana e inhibir la síntesis de peptidoglicano. El antibiótico B también puede entrar en la célula a través de una porina, pero a diferencia del antibiótico A, se elimina eficazmente por eflujo. El antibiótico C no puede atravesar la membrana externa y, por lo tanto, no puede acceder a la PBP diana. Tomada y modificada de Munita & Arias, 2016.

- Impermeabilidad de la membrana
Algunas bacterias poseen estructuras de la membrana que limitan la entrada de antibióticos. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* presenta una membrana externa poco permeable a los β -lactámicos y los aminoglucósidos (Blair et al., 2015).
- Bombas de eflujo
Son proteínas que expulsan activamente el antibiótico fuera de la célula, lo que reduce su concentración intracelular. Un ejemplo es el sistema de bombas AcrAB-TolC de *Escherichia coli* (Reygaert, 2018).
- Ausencia o modificación del blanco natural
Algunas bacterias carecen del sitio de acción del antibiótico o presentan una forma natural modificada de este. Por ejemplo, *Mycoplasma* no posee pared celular, por lo que es resistente a los β -lactámicos (Munita & Arias, 2016).

Los mecanismos extrínsecos o adquiridos surgen por mutaciones genéticas o por la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal, como la conjugación, la transformación o la transducción (Blair et al., 2015) (Figura 4).

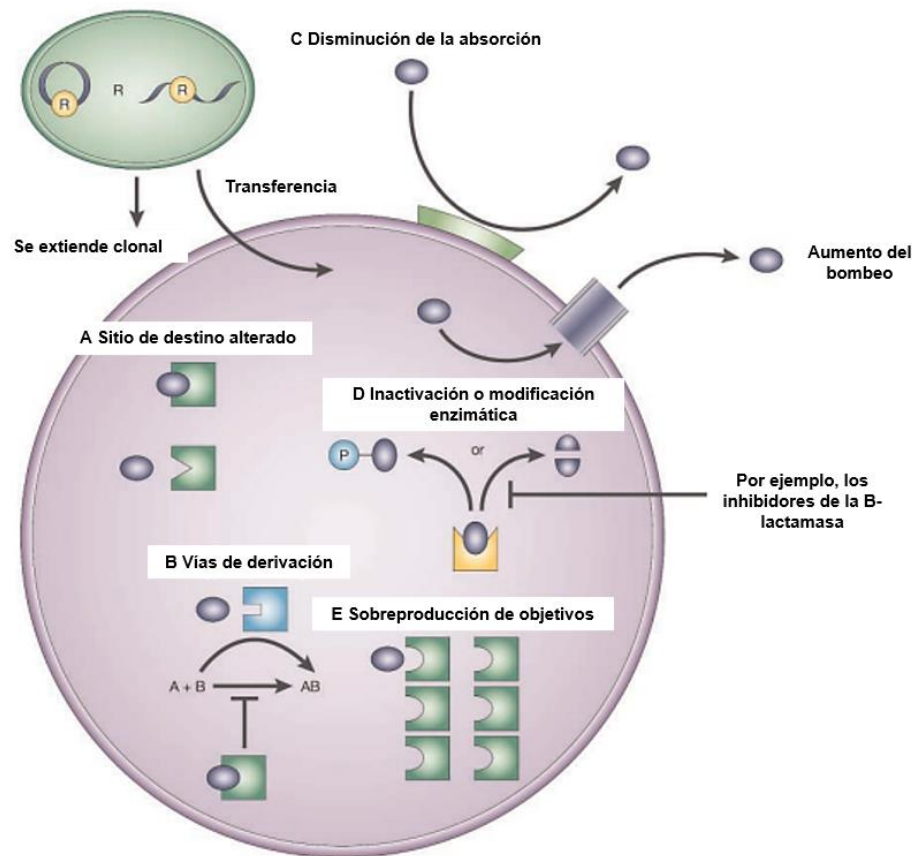


Figura 4: Mecanismos de resistencia genética a los antimicrobianos.

Las bacterias han desarrollado o desarrollarán resistencia genética a todos los antimicrobianos actualmente disponibles en el mercado. Los cinco mecanismos principales que utilizan las bacterias para resistir los fármacos antibacterianos se muestran en la figura. (a) El sitio de acción (la enzima, el ribosoma o el precursor de la pared celular) puede alterarse. Por ejemplo, la adquisición de un plásmido o de un transposón que codifica un dihidrofolato reductasa resistente confiere resistencia al trimetoprim a las bacterias. (b) Los pasos inhibidos pueden eludirse. (c) Las bacterias pueden reducir la concentración intracelular del agente antimicrobiano, ya sea disminuyendo la permeabilidad de la membrana, como lo demuestra *Pseudomonas aeruginosa*, o mediante el eflujo activo del agente. (d) Pueden inactivar el fármaco. Por ejemplo, algunas bacterias producen β-lactamasa, que destruye el anillo β-lactámico de la penicilina. (e) La enzima diana puede ser sobreproducida por las bacterias. Tomada y modificada de (A. Coates et al., 2002).

- **Inactivación enzimática del antibiótico**
Las bacterias producen enzimas que destruyen o modifican el fármaco, como las β -lactamasas, que hidrolizan los β -lactámicos, o las aminoglucósido-fosfotransferasas, que modifican los aminoglucósidos (Reygaert, 2018).
- **Modificación del sitio blanco**
Cambios en la estructura del sitio de unión del antibiótico impiden su acción. Por ejemplo, la alteración de la proteína fijadora de penicilina (PBP2a) en *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Munita & Arias, 2016).
- **Bombas de eflujo adquiridas o sobreexpresadas**
Algunas bacterias adquieren genes adicionales de bombas expulsoras o aumentan su actividad, lo que reduce la eficacia de los fármacos (Blair et al., 2015).
- **Vías metabólicas alternativas**
La bacteria puede utilizar rutas metabólicas que el antibiótico no puede inhibir, como la producción de una dihidrofolato reductasa insensible al trimetoprim (Reygaert, 2018).
- **Protección del sitio blanco**
Producción de proteínas que protegen la diana del antibiótico, como las proteínas Tet(M) que protegen los ribosomas frente a las tetraciclinas (Munita & Arias, 2016).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos, como los que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Mecanismos de resistencia presentes en algunos antibióticos.

Mecanismo de resistencia	Ejemplo de antibiótico	Base genética de la resistencia	Mecanismo presente en:
Permeabilidad reducida	Penicilinas	Cromosómica	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bacterias entéricas
Inactivación del antibiótico. Ejemplos: β -lactamasas; enzimas modificadoras, tales como metilasas, acetilasas y fosfolasas.	Penicilinas	Plásmido y cromosómica	<i>Staphylococcus aureus</i> Bacterias entéricas
	cloranfenicol	Plásmido y cromosómica	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
	Aminoglucósidos	Plásmido	Bacterias entéricas
Alteraciones de la Diana: ARN polimerasa, rifampicina; ribosoma, eritromicina y estreptomina; girasa del ADN, quinolonas.	Eritromicina	Cromosómica	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Rifampicina		Bacterias entéricas
	Estreptomina		Bacterias entéricas
	Norfloxacina		Bacterias entéricas
			<i>Staphylococcus aureus</i>
Desarrollo de vías bioquímicas resistentes al agente	Sulfonamidas	Cromosómicas	Bacterias entéricas <i>Staphylococcus aureus</i>
	Tetraciclinas	Plásmido	Bacterias entéricas
Bombas de expulsión	Cloranfenicol	Cromosómica	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>
	Eritromicina	Cromosómica	<i>Staphylococcus</i>

Tomada de (Madigan, et al., 2015)

1.3.2 Propagación de la resistencia a los fármacos antimicrobianos.

Existen variables y mecanismos de resistencia a los antibióticos, pero el objetivo terapéutico del fármaco también puede excederse, lo que puede generar resistencia al establecer una concentración más alta del fármaco (Tooke et al., 2019). El uso inadecuado de los fármacos antimicrobianos es la principal causa del rápido desarrollo de la resistencia en los microorganismos causantes de enfermedades (Madigan, et al., 2015).

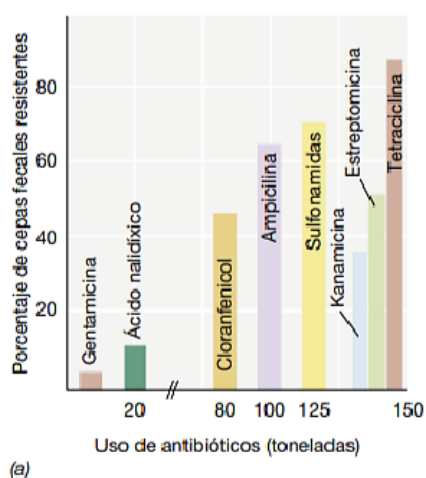


Figura 5: Patrones de resistencia a los medicamentos en patógenos.

Se muestra el porcentaje de cepas fecales resistentes a distintos antibióticos en función de la cantidad utilizada; se observa que las bacterias de origen fecal presentan niveles variables de resistencia, más altos frente a las tetraciclinas, las estreptomicinas y las sulfonamidas. Tomada de (Madigan, et al., 2015)

1.3.3 Agentes patógenos resistentes a los antibióticos.

Desde el comienzo del uso generalizado de los medicamentos antimicrobianos en la década de 1950, y en gran parte como consecuencia de los fallos en su uso adecuado y en el monitoreo de la aparición de resistencias, muchos patógenos han desarrollado resistencia a algunos agentes antimicrobianos a lo largo de los años (Hutchings et al., 2019) (Figura 6).

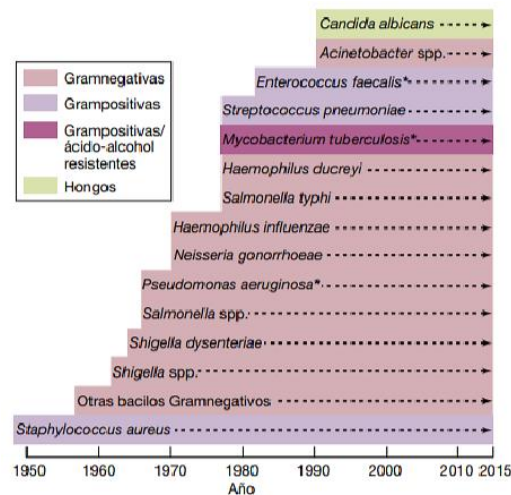


Figura 6: Aparición de resistencia a fármacos antimicrobianos en algunos patógenos humanos.

Los * indican que algunas cepas de estos patógenos ya no pueden tratarse con los fármacos antimicrobianos conocidos. Tomada de Madigan, et al., 2015.

1.3.4 Prevención de la resistencia antimicrobiana.

Para evitar una mayor aparición de cepas resistentes, se exhorta a destacar la importancia de la prevención de la infección, del diagnóstico rápido y concluyente y del tratamiento de infecciones, usando los agentes antimicrobianos con prudencia y evitando la transmisión de los patógenos (Madigan, et al., 2015).

Si se detiene el uso de un antibiótico concreto, la resistencia a ese antibiótico puede revertirse, al menos temporalmente, en el transcurso de varios años; por otra parte, los organismos resistentes a los antibióticos pueden persistir, por ejemplo, en el intestino, durante algún tiempo (Tooke et al., 2019). Esto implica que la eficacia de algunos antibióticos puede restablecerse suspendiendo el uso del antibiótico, pero solo siguiendo un plan prudente y cuidadosamente controlado de reintroducción y uso futuro para prevenir la recurrencia de la resistencia (Kahlmeter, 2014) (Tabla 2).

Tabla 2: Directrices para la prevención de la resistencia a los fármacos antimicrobianos

Directiva	Acción/ ejemplos	Justificación
Vacunar para prevenir enfermedades comunes	Inmunizar con las vacunas necesarias y recomendadas	La inmunización previene enfermedades que pueden requerir tratamiento antimicrobiano.
Evitar procedimientos invasivos innecesarios	Evitar catéteres, biopsias, etc. Si no es absolutamente necesario.	Los procedimientos parenterales aumentan el riesgo de exposición a patógenos.
Identificar y atacar al patógeno	Utilizar el antibiótico que actúe selectivamente sobre el patógeno	La exposición a antibióticos de espectro más amplio es innecesaria y puede dañar la

		microbiota local, lo que puede conducir a infecciones por patógenos oportunistas.
Tratar con el fármaco antimicrobiano eficaz más antiguo	Tratamiento de las anginas causadas por estreptococos con penicilina en lugar de vancomicina.	El uso de los últimos antimicrobianos facilita la selección de resistencias potenciales.
Monitorizar el tratamiento.	Suspender el tratamiento una vez transcurrido el tiempo indicado.	El tratamiento innecesario potencia la selección de resistencias a los antibióticos.
Romper la cadena de contagio	Aislar a los pacientes cuando sea práctico y mantener una buena higiene personal.	Reducir el contacto y mantener una buena higiene limita la contaminación cruzada potencial entre el personal sanitario, los proveedores y los clientes.
Acceso a expertos.	Consultar con los equipos de atención médica para el control de la infección	Los expertos locales pueden informar mejor sobre la elección de la terapia antibiótica.

(Tomada de Madigan, et al., 2015).

1.3.5 Resistencia antimicrobiana de *E. coli*

En medicina veterinaria, *E. coli* es una bacteria muy común que puede causar enfermedades en animales domésticos y de producción, como diarreas, infecciones urinarias o septicemias (Abutarbush, 2010). El problema surge cuando estas bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos, lo que hace que los tratamientos sean menos efectivos o incluso ineficaces.

E. coli presenta diversos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, que pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: inactivación o modificación del antibiótico, modificación del sitio de acción, disminución de la permeabilidad y expulsión activa mediante bombas de flujo.

Los principales mecanismos de resistencia en *E. coli* son:

- Inactivación del antibiótico

La bacteria produce enzimas que destruyen o modifican el antibiótico antes de que actúe. Ejemplo: producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), que inactivan antibióticos como las penicilinas y las cefalosporinas. Esto se ha observado en infecciones urinarias en perros y en infecciones entéricas en aves y porcinos (Carattoli, 2013).

- Cambio en el sitio de acción

La bacteria modifica la parte de su estructura a la que normalmente se une el antibiótico, por lo que este ya no encaja. Ejemplo: mutaciones en genes como *gyrA* o *parC*, que alteran la enzima ADN girasa y hacen que las fluoroquinolonas (como enrofloxacin o ciprofloxacina) no funcionen adecuadamente (Poirel et al., 2018).

- Disminución de la permeabilidad de la membrana

La bacteria puede cerrar o modificar los "canales" (porinas) de su membrana externa, lo que reduce la entrada del medicamento. Esto suele ocurrir junto con otros mecanismos, lo que aumenta el nivel de resistencia (Nikaido, 2003).

- Expulsión activa del antibiótico

Mediante bombas de expulsión (como el sistema AcrAB-TolC), la bacteria expulsa el antibiótico antes de que este actúe. Este mecanismo puede afectar a varios medicamentos a la vez, como las tetraciclinas, el cloranfenicol o algunas quinolonas (Pan et al., 2013).

El uso frecuente de ciertos antibióticos, como tetraciclinas, sulfonamidas y fluoroquinolonas, en animales de producción ha favorecido la aparición de cepas multirresistentes de *E. coli*. En animales de compañía también se han encontrado cepas resistentes a múltiples fármacos, lo que representa un riesgo no solo para el tratamiento de estos animales, sino también para la salud pública, ya que estos genes pueden transmitirse a bacterias que afectan a los humanos (Nielsen et al., 2021).

1.3.6 Resistencia antimicrobiana de *S. aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena importante tanto en animales como en humanos. En la medicina veterinaria, es frecuente en infecciones cutáneas, mastitis en bovinos, infecciones de heridas y otitis en perros y gatos (Wann et al., 2000). El gran problema es que *S. aureus* puede desarrollar resistencia a muchos antibióticos, dando lugar a cepas multirresistentes como MRSA, que representan un riesgo tanto para los animales como para las personas que entran en contacto con ellos.

Desde 2006, la detección de MRSA en ganado, especialmente en cerdos, pero también en terneros, pollos, caballos, pavos y ganado lechero, ha demostrado que el ganado constituye un reservorio de MRSA perteneciente al complejo clonal (CC) 398 (MRSA-LA), que puede transmitirse a los humanos (Graveland et al., 2011).

Los principales mecanismos de resistencia en *S. aureus* son:

- Producción de β -lactamasas

La bacteria produce enzimas que degradan los antibióticos β -lactámicos (como las penicilinas, la ampicilina, entre otros). Ejemplo: producción de la enzima

penicilinas, codificada por el gen *blaZ*, que rompe el anillo β -lactámico del antibiótico e inactiva su acción (Chambers & DeLeo, 2009).

- Proteína PBP2a y resistencia a meticilina (MRSA)

El gen *mecA* (o su variante *mecC*) codifica una proteína llamada PBP2a, que reemplaza la diana de los antibióticos β -lactámicos; esto impide que las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos se unan a su diana y ejerzan su efecto, lo cual es un problema creciente en perros, gatos y caballos, especialmente en infecciones crónicas de piel y heridas (Weese, 2010).

- Modificación del sitio de acción en ribosomas

Mutaciones o la adquisición de genes como *erm(A)* o *erm(C)*, que modifican el ARNr 23S, impiden que los antibióticos como macrólidos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina) y estreptograminas se unan correctamente (Chambers & DeLeo, 2009).

- Bombas de expulsión

Sistemas como NorA expulsan antibióticos fuera de la célula, reduciendo su concentración interna; este mecanismo afecta a fluoroquinolonas, tetraciclinas y colorantes como el bromuro de etidio (Foster, 2017).

- Alteración de la diana de glicopéptidos

En cepas resistentes a la vancomicina (VRSA), la bacteria adquiere genes (como *vanA*) que modifican la estructura del peptidoglicano, reduciendo la afinidad de la vancomicina. Aunque menos común en veterinaria, se ha documentado en aislamientos bacterianos procedentes de cerdos y caballos (Petersen et al., 2013).

1.4 Sustancias alternativas como antimicrobianos

Las sustancias alternativas, como los antimicrobianos, son compuestos que no son antibióticos tradicionales, pero tienen la capacidad de inhibir o eliminar microorganismos como bacterias, virus, parásitos u hongos (Davidson & Zivanovic, 2003). Generalmente, los compuestos alternativos a los antimicrobianos se conocen como compuestos de origen natural.

Los antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen:

- Origen animal: como proteínas, enzimas líticas, tales como la lisozima, hidrolasas, como las lipasas, y proteasas (Doyle et al., 2001) y polisacáridos, como el quitosán (Davidson & Zivanovic, 2003).
- Origen vegetal: Incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, flores, tallos y hojas, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas por las plantas (Doyle et al., 2001).
- Origen microbiano: incluye compuestos producidos por microorganismos (Morrison & Zembower, 2020).

Los microorganismos producen una gran diversidad de compuestos, tanto metabolitos primarios como secundarios (Madigan et al., 2015). Estos microorganismos abarcan desde nutrientes y metabolitos básicos hasta antibióticos, toxinas, vitaminas, enzimas, ácidos, alcoholes y pigmentos, como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3: Compuestos producidos por microorganismos (metabolitos primarios y secundarios) y sus diferentes aplicaciones convencionales.

Tipo de metabolito	Ejemplos	Función / Aplicación	Referencia
Primarios (Esenciales para el crecimiento y la supervivencia del microorganismo)	Aminoácidos (glutamato, lisina, triptófano)	Producción de alimentos y suplementos nutricionales	(Willey et al., 2020), (Madigan et al., 2015) & (Nett et al., 2009), (Keller, 2019).
	Ácidos orgánicos (láctico, cítrico, acético, succínico)	Industria alimentaria, farmacéutica y química.	
	Vitaminas (B12, riboflavina, ácido fólico)	Suplementos en nutrición humana y animal	
	Alcoholes (etanol, butanol, glicerol)	Combustibles, solventes y fármacos	
	Enzimas (amilasas, proteasas, lipasas)	Industria textil, alimentaria y farmacéutica	
Secundarios (Confieren ventajas adaptativas)	Antibióticos (penicilina, estreptomicina, tetraciclina)	Medicina humana y animal para el control de infecciones	
	Toxinas (botulínica, tetánica, micotoxinas)	Investigación biomédica y relevancia clínica	
	Pigmentos (carotenoides, prodigiosina, melaninas)	Colorantes naturales, antioxidantes	
	Estatinas (lovastatina), ciclosporina	Fármacos: hipolipemiantes e inmunosupresores	
	Metabolitos de <i>Streptomyces</i> (cloranfenicol, avermectinas)	Antibióticos y antiparasitarios de amplio uso	

Se estima que en la parte aérea de las plantas, en la filosfera y, especialmente, en las hojas, hay una gran cantidad de microorganismos, principalmente bacterias (Andrews & Harris, 2000). Esta diversidad tan rica resulta de un proceso evolutivo que las plantas poseen frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales.

Estas sustancias pueden dividirse en dos grupos: fitoanticipinas, presentes de forma constitutiva en las plantas, y fitoalexinas, cuya presencia aumenta considerablemente en respuesta a la invasión microbiana (Dixon, 2001).

Como primera línea de defensa, las plantas emplean un mecanismo preventivo mediante moléculas llamadas fitoanticipinas, que se almacenan en la planta sin mediar una amenaza, ya sea en la pared celular, la cutícula o la epidermis, y actúan como barreras químicas y físicas (VanEtten et al., 1994). En una segunda línea defensiva, las plantas usan compuestos que actúan como señales de aviso para inducir una respuesta defensiva: elicitores o fitoalexinas, producidos en respuesta al daño o a la amenaza para la planta, y pueden ser producidos tanto por las plantas como por microorganismos (Chávez A, 2022).

Las fitoalexinas son moléculas de bajo peso molecular sintetizadas de manera endógena (dentro de la planta) con propiedades antimicrobianas frente a un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas; pueden sintetizarse en bajas concentraciones cuando la planta se encuentra sana, pero se acumulan en altas concentraciones cuando la planta está expuesta a patógenos o a daños mecánicos (Intagri, 2017).

Se han aislado alrededor de 12,000 compuestos procedentes de organismos vegetales, de los cuales un porcentaje considerable posee cierta actividad frente a los microorganismos (Richard E. Schultes, 1978).

Se muestran algunos de los compuestos que poseen actividad antimicrobiana de mucha importancia, pero su estudio no ha sido muy común; sin embargo, sus propiedades han sido eficientes ante la presencia de agentes patógenos (Tabla 4)

Tabla 4: Compuestos químicos menos frecuentes aislados de plantas con actividad antimicrobiana.

Clase	Compuesto	Planta / sustancia	Actividad
Aldehído	Hexanal	<i>Olea europaea</i> (olivo)	Amplio espectro
Saponinas		<i>Panax ginseng</i>	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> , hongos
Sulfóxidos	Alicina, otros	<i>Allium sativum</i> (ajo)	<i>H. pylori</i>
Azúcares	Fructosa	<i>Vaccinium sp.</i> (arándanos)	Amplio espectro
Azúcares	Glucosa + fructosa	Miel	<i>S. aureus</i>

Mezcla compleja	Látex	<i>Aloe vera (aloe)</i>	<i>Corynebacterium, Salmonella</i>
Alcanos	Poliacetileno	<i>Bupleurum salicifolium</i>	<i>S. aureus, B. subtilis</i>

Tomada y modificada de (Dixon, 2001).

El uso de compuestos extraídos de plantas se ha convertido en una alternativa de tratamiento muy útil frente a las infecciones. Existe un gran número de sustancias naturales que poseen cierta actividad frente a los microorganismos; sin embargo, un porcentaje pequeño de estos compuestos muestra actividad suficiente como para ser utilizados en clínica (Dixon, 2001).

1.5 Ácido oleanólico

El AO (ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico) es un compuesto triterpenoide pentacíclico omnipresente en el reino vegetal. El AO se ha aislado de más de 1620 especies de plantas, incluidas las medicinales y las alimenticias. Este compuesto se encuentra principalmente en las plantas de la familia *Oleaceae*, una de ellas es el olivo (*Olea europaea*), siendo esta la especie vegetal que le dio nombre al compuesto y se considera como la principal fuente de AO comercial en la actualidad (Pollier, Jacob & Goossens, Alain, 2011) (Figura 7).

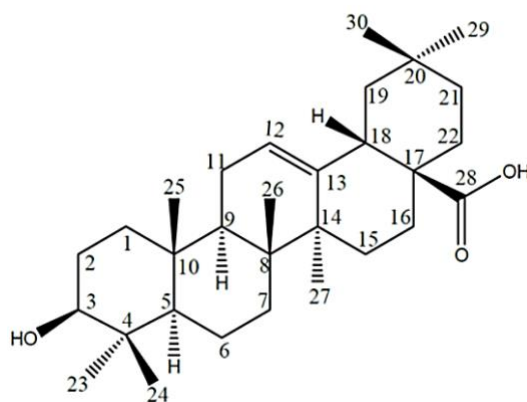


Figura 7: Estructura química del AO. Tomada de (Castellano et al., 2022).

El AO es uno de los representantes de los triterpenoides pentacíclicos junto con el ácido ursólico. Su estructura se basa en el isopreno y contiene 30 átomos de carbono y oxígeno. Poseen fracciones de azúcar unidas al grupo hidroxilo en C-3 de la aglicona. Además, es

importante mencionar que estos compuestos se han estudiado para mejorar su solubilidad en agua y su actividad biológica, así como disminuir su toxicidad (Wolska et al., 2010).

Este compuesto se caracteriza por poseer múltiples actividades farmacológicas, entre ellas, efectos hepatoprotectores y actividades antiinflamatorias, antioxidantes o anticancerígenas. A menudo se utilizan como hierbas medicinales y forman parte integral de la dieta humana. Además, se menciona y se evidencia que el AO puede tener efectos positivos contra la dislipidemia, la diabetes y el síndrome metabólico, además de que se han descrito varias funciones en actividades anti-VIH donde inhiben su desarrollo del virus (Wolska et al., 2010), antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, gastroprotectoras, hipolipidémicas y antiateroscleróticas, así con interferir en varias etapas del desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Castellano et al., 2022), actividades antiparasitarias, antiulcerosas y antivirales, las cuales han generado demasiado interés en la investigación (Wolska et al., 2010).

Se documentó que el OA inhibió la replicación de virus de la inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1) en células H9 con una ic_{50} de 1.7 $\mu\text{g/mL}$ ($\sim 4\text{--}5 \mu\text{M}$), mostrando un índice terapéutico de ~ 12.8 (Kashiwada et al., 1998), también se ha demostrado el efecto del AO en el crecimiento del VIH-1 en cultivos de células mononucleares periféricas humanas (PBMC) y de monocitos/macrófagos (M/M) donde muestran que el AO inhibe la replicación del VIH-1 en diversos sistemas celulares. En cuanto al mecanismo de acción, el AO inhibe *in vitro* la actividad de la proteasa del VIH-1 (Mengoni et al., 2002).

Sin embargo, aún no hay ensayos clínicos en humanos. Sus principales limitaciones son la baja biodisponibilidad y la potencia moderada de la molécula base, aunque los derivados optimizados muestran resultados más prometedores (Kashiwada et al., 1998).

La actividad antiinflamatoria se ha estudiado en células de macrófagos murinos RAW 264.7 estimuladas con lipopolisacárido (LPS) y en modelos animales de inflamación inducida (p. ej., edema de oreja en ratón), mediante la medición de la producción de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 y NO , y de la expresión de COX-2 e iNOS , así como mediante ensayos de ELISA, RT-PCR y Western Blot para cuantificar citoquinas y proteínas (Hwang et al., 2014).

La actividad hepatoprotectora se demostró en modelos de daño hepático en ratas inducidos por CCl_4 , etanol o paracetamol mediante la medición de enzimas hepáticas séricas (ALT, AST, ALP), la evaluación histológica del hígado (necrosis, infiltración inflamatoria) y la

cuantificación de MDA (malondialdehído, indicador de peroxidación lipídica) y de enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, GSH-Px) (Kinjo et al., 1999).

La actividad anticancerígena se ha evaluado en líneas celulares tumorales humanas: HepG2 (hígado), MCF-7 (mama), A549 (pulmón) y HT29 (colon) y, para demostrarlo, se han realizado ensayos de proliferación celular (MTT ("3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide"), SRB (Sulforhodamina B)) y de apoptosis: citometría de flujo, caspasas, TUNEL, así como en ratones mediante la medición del tamaño tumoral y estudios histopatológicos (Shanmugam et al., 2014a).

La actividad antidiabética se ha estudiado en modelos animales con diabetes, como ratas inducidas con estreptozotocina (STZ) o con dieta alta en grasas, y se ha evaluado mediante la medición de glucosa en sangre, la tolerancia a la glucosa (OGTT) y la insulina plasmática, así como la expresión de proteínas en las vías AMPK, PI3K/Akt y PPAR γ (Western blot) (Wang et al., 2013).

La actividad antimicrobiana se ha estudiado en bacterias grampositivas y gramnegativas, con mayor frecuencia en *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Bacillus subtilis*, y en hongos como *Candida albicans*, mediante la determinación de la CMI en cultivos bacterianos y fúngicos, así como mediante estudios de permeabilidad de membrana y de sinergia con antibióticos (Castellano et al., 2022).

El AO ha demostrado una amplia gama de actividades biológicas; no obstante, la mayoría de estas evidencias provienen de estudios *in vitro* y de modelos *in vivo* en animales de experimentación, donde se han observado resultados prometedores (Pollier & Goossens, 2011). Sin embargo, hasta el momento, los ensayos clínicos en humanos y animales son escasos, limitados y, en muchos casos, inexistentes, lo que impide confirmar con certeza su eficacia y seguridad en la práctica médica (Wang et al., 2013). Además, factores como la baja biodisponibilidad oral, la variabilidad en las dosis empleadas y la falta de estudios toxicológicos a largo plazo constituyen limitaciones relevantes para su aplicación terapéutica (Liu, 2005; Ayeleso et al., 2017).

En consecuencia, aunque el AO es un candidato natural prometedor para el desarrollo de nuevos fármacos, aún se requieren ensayos clínicos bien diseñados que permitan trasladar la evidencia preclínica a la práctica clínica.

1.5.1 Fuente del AO

Los triterpenoides pentacíclicos son abundantes en el reino vegetal; suelen presentarse de forma libre, como agliconas de saponinas triterpénicas unidas a una o más fracciones de azúcar (Castellano et al., 2022). En su forma libre, se encuentran principalmente en las ceras cuticulares de las plantas, que previenen la pérdida de agua y constituyen la principal barrera de defensa contra patógenos (Pollier, Jacob & Goossens, Alain, 2011), y participan en la respuesta de las plantas frente a estreses bióticos y abióticos. Siendo estos compuestos componentes naturales de muchos alimentos y de hierbas medicinales que forman parte de la dieta integral humana (Castellano et al., 2022).

El AO es un compuesto duro-hidrofóbico, prácticamente insoluble en agua. Normalmente se extrae de las plantas utilizando disolventes orgánicos como el metanol, el etanol, el 1-butanol, el acetato de etilo, el éter dietílico o la acetona (Castellano et al., 2022).

1.6 Actividad antimicrobiana del AO

Se han realizado estudios a lo largo de tres décadas y muchos datos experimentales han demostrado que los extractos de plantas medicinales y alimenticias como el AO tiene un gran potencial antibacteriano contra múltiples géneros bacterianos, incluidas las cepas bacterianas multirresistentes (Pollier, Jacob & Goossens, Alain, 2011) (Tabla 5), en cambio, otras investigaciones igual han confirmado que la actividad antibacteriana del AO es pobre o insignificante, pero es importante mencionar que muchos de los estudios reportados han utilizado cepas bacterianas y varios compuestos aislados mal definidos (Wolska et al., 2010).

Los valores de CMI por debajo de 10 mg/mL definen una actividad antibacteriana “buena”, mientras que los que oscilan alrededor de 50 mg/mL indican una actividad “moderada”, y los valores de CMI por encima de 100 mg/mL indican que el compuesto no posee actividad (Fontanay et al., 2008).

Se ha demostrado que las especies bacterianas del género *Mycobacterium* son sensibles a los triterpenoides pentacíclicos como el AO y el AU, debido al alto contenido de esteroides en su pared celular. Ante las micobacterias, existe un interés considerable en la aparición

de cepas multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* y en la búsqueda de una nueva alternativa terapéutica contra la tuberculosis (Zumla & Grange, 1998).

Se realizó un experimento en células de ovario de hámster chino (CHO) y se utilizó AO presente en los extractos de *Buddleja saliga* (*Buddlejaceae*) y *Leysera gnaphaloides* (*Asteraceae*) que mostró un efecto antibacteriano significativo, la cual mostró valores de CMI para *M. tuberculosis H37RV*, *M. avium*, *M. serofulaceum* y *M. microti* entre 1,25 mg/mL y 2,5 mg/mL, según el método de bioautografía basado en el ensayo colorimétrico de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Mosmann, 1983).

Rojas y colaboradores (2006) demostraron que el AO presentaba actividad antibacteriana frente a *M. tuberculosis*; sus valores de CMI oscilaron entre 1,6 y 3,12 mg/mL ante el estímulo del compuesto egicarina extraído de la planta peruana *Clavija procera* (*Theophrastaceae*) (Rojas et al., 2006).

Se ha informado que la actividad de AO y AU aislados del extracto de *Salvia officinalis* (*Lamiaceae*) frente a VRE (enterococos resistentes a la vancomicina) es de 8 mg/mL. Este resultado se confirmó para la cepa de referencia, *Enterococcus faecalis* ATCC 28212 (Fontanay et al., 2008).

Los triterpenos del tipo ácido olean-27-carboxílico extraídos de la porción de la raíz de *Aceriphyllum rossi* (*Saxifragaceae*), un alimento básico en Corea, mostraron una potente actividad antibacteriana contra varias cepas de MRSA y de *Staphylococcus aureus* resistente a las quinolonas. Los resultados indicaron que tanto el grupo carboxílico en C-27 como el grupo hidroxilo en C-24 del ácido acerimílico A son críticos para su potente actividad bactericida (Woldemichael et al., 2003).

El AO aislado de la leguminosa argentina *Caesalpinia paraguarensis* (*Fabiaceae*) demostró una buena actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, con una CMI de 8 mg/mL (Woldemichael et al., 2003).

También se ha demostrado que el AO aislado de la Caléndula, *Calendula officinalis* (*Asteraceae*) era activo contra muchas especies bacterianas, especialmente frente a *Staphylococcus epidermidis* (Szakiel et al., 2008).

Tabla 5: Actividad antimicrobiana del AO contra bacterias

COMPONENTE	POTENCIAL DE ACTIVIDAD	CEPA BACTERIANA	GRAM	VALOR CMI µg mL ⁻¹	REFERENCIA
ÁCIDO OLEANÓLICO	BUENA	<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	AR	2.5 µg/mL	(Fontanay et al., 2008; Szakiel et al., 2008; Woldemichael et al., 2003).
		VRE	(+)	8 µg/mL	
		<i>E. faecalis</i> ATCC 28212	(+)	8 µg/mL	
		<i>S. epidermidis</i>	(+)	8 µg/mL	
		<i>B. subtilis</i>	(+)	10 µg/mL	
	MODERADA	<i>L. monocitogenes</i>	(+)	15 µg/mL	
		<i>B. megaterium</i>	(+)	35 µg/mL	
		<i>S. flexnerii</i>	(-)	50 µg/mL	
		<i>S. sonnei</i>	(-)	55 µg/mL	
		<i>Y. enterocolitica</i> O:8	(-)	60 µg/mL	
		<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	AR	30 µg/mL	
		<i>M. tuberculosis H37Rv</i>	AR	50 µg/mL	
		MRSA	(+)	64 µg/mL	
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	(+)	64 µg/mL	
		<i>K. pneumoniae</i>	(-)	100 µg/mL	
	POBRE O NADA	<i>E. coli</i>	(-)	156 µg/mL	
		<i>P. aeruginosa</i>	(-)	>256 µg/mL	
		<i>P. gingivalis</i>	(-)	625 µg/mL	
		<i>A. viscosus</i>	(+)	625 µg/mL	
		<i>A. Intermedia</i>	(-)	1250 µg/mL	
		<i>S. mutans</i>	(+)	1250 µg/mL	

1.7 *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo anaerobio facultativo (Figura 8), oxidasa negativa y catalasa positiva. Presenta fimbrias y, en algunas cepas, motilidad por flagelos peritricos. Perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es una bacteria mesófila, por lo que su temperatura de crecimiento óptima es de alrededor de 37 °C (rango de 35–43 °C). En condiciones óptimas, su tasa de crecimiento es de 20 minutos. La temperatura límite de crecimiento es de alrededor de 7 °C y es sensible a temperaturas superiores a 70 °C (Rovira, 2020).

A esta bacteria se la considera un microorganismo de la microbiota normal de los intestinos del animal y del ser humano. Coloniza los intestinos del hombre en cuestión de pocas horas después del nacimiento. Sin embargo, hay cepas bacterianas de *E. coli* que pueden considerarse patógenas por los cuadros clínicos que desencadenan. Uno de los más

característicos es la diarrea (Rodríguez-Angeles, 2002) (Figura 8). Cada bacteria individual tiene forma oblonga.

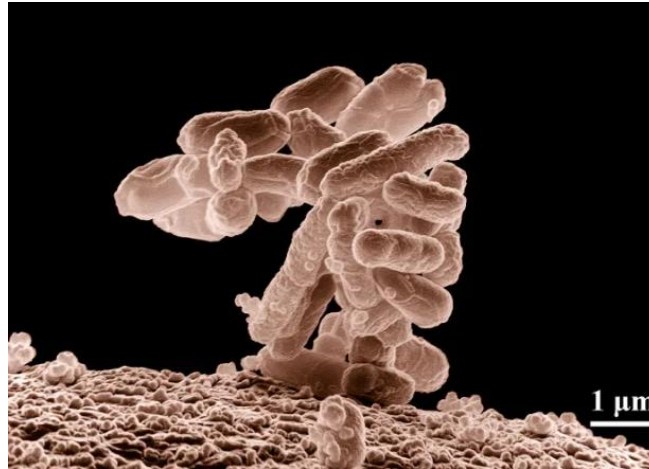


Figura 8: Micrografía electrónica de barrido de *E. coli*. Clúster de bacterias de *E. coli* amplificado a 10.000 x Tomada de (Christopher P., 2005).

Existen cepas de *E. coli* no patogénicas. Sin embargo, también hay cepas patogénicas que causan enfermedades, algunas de gravedad importante (Vidal et al., 2007). La mayoría de estas cepas son patogénicas porque han incorporado, mediante transferencia horizontal de genes, factores de virulencia (Rovira, 2020).

E. coli extraintestinal patogénica (ExPEC) es una de las bacterias más comunes encontradas en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. ExPEC se caracteriza por producir enfermedad en órganos distintos del tracto gastrointestinal. *E. coli* extraintestinal (ECEI) constituye uno de los principales patógenos causantes de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS), con un alto impacto en la salud por su morbilidad y mortalidad, así como por el incremento de los costos sanitarios, lo cual se relaciona principalmente con su multidrogorresistencia (MDR) (Pérez et al., 2020).

El desafío clínico de este patógeno incluye infecciones urinarias, bacteriemias asociadas a catéteres, septicemias, shock séptico, meningitis, infecciones de heridas quirúrgicas, peritonitis, infecciones de piel y partes blandas, entre otras, con fallos terapéuticos frecuentes y escasa disponibilidad de terapias eficaces (Pérez et al., 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ubica a ECEI como prioridad dentro del nuevo programa mundial de vigilancia de la resistencia antimicrobiana, así como entre las primeras bacterias para incentivar la investigación científica y el desarrollo de nuevos antimicrobianos, debido a las escasas o nulas opciones terapéuticas para combatir sus infecciones (OMS, 2017).

1.7.1 Presentación clínica de *E. coli* en el pulmón de animales domésticos y del ser humano.

E. coli es una bacteria gramnegativa que forma parte de la microbiota intestinal normal de los mamíferos. Sin embargo, ciertas cepas patógenas pueden provocar infecciones extraintestinales, incluyendo neumonías en animales domésticos, especialmente en condiciones de inmunosupresión, estrés o coinfecciones con otros agentes respiratorios (Abutarbush, 2010).

En animales domésticos, la neumonía por *E. coli* suele presentarse como parte de un síndrome respiratorio bacteriano secundario. En perros y gatos, esta bacteria puede ingresar al tracto respiratorio por aspiración de contenido gástrico, por diseminación hematógena o por compromiso del sistema inmunológico, lo que permite su colonización y proliferación en el parénquima pulmonar (Fraser et al., 2006). Clínicamente, los signos incluyen disnea, tos húmeda o productiva, fiebre, letargia, anorexia y secreción nasal. En casos graves, puede evolucionar a neumonía necrosante o septicemia (Martínez, 2005).

En cachorros, perros y gatos, *E. coli* puede ser un agente oportunista causante de neumonía neonatal, especialmente cuando falla la transferencia de inmunidad materna a través del calostro. En estos casos, la bacteria puede invadir los pulmones a través del torrente sanguíneo (Tesini, Brenda L., 2022).

En rumiantes jóvenes, como terneros y corderos, la infección respiratoria por *E. coli* puede formar parte del complejo respiratorio bovino, especialmente tras episodios de diarrea o de infección sistémica. En estos animales, la diseminación hematógena desde el intestino puede provocar neumonías supurativas o fibrinosas (Trigo, 1978).

En el ser humano, el carcinoma de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres en todo el mundo. Alrededor del 85% de los casos están relacionados

con el hábito de fumar. Los síntomas pueden incluir tos, malestar o dolor torácico, pérdida de peso y, con menor frecuencia, hemoptisis (Robert L. Keith, 2023).

En aves, la bacteria se presenta como consecuencia de una enfermedad secundaria, originada por un estado de inmunodepresión debida a otras enfermedades víricas o bacterianas, como la bronquitis infecciosa, la enfermedad de Newcastle, la enfermedad de Gumboro, la micoplasmosis, la clostridiosis, entre otras. Se denomina esta enfermedad colibacilosis, según menciona Gilbert (2014).

La neumonía por *E. coli* suele considerarse una infección nosocomial que se produce en pacientes con factores de riesgo, como la aspiración o la ventilación mecánica, tanto en humanos como en animales (Ganipisetti et al., 2023). Por el contrario, la propensión a desarrollar neumonía adquirida en la comunidad (NAC) está poco reconocida. En los últimos años, las bacterias ExPEC han recibido atención ya que pueden causar un espectro de infecciones, incluidas bacteriemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de próstata, neumonía, absceso hepático, meningitis y abscesos cerebrales (Johnson & Russo, 2002).

1.8 *Staphylococcus aureus*

Esta bacteria está clasificada como un coco Gram positivo que se agrupa en racimos (Figura 9), β -hemolítica, catalasa y coagulasa positivas (Jawetz, M. & Adelberg, 2023). Se conoce que este microorganismo forma parte de la microbiota normal de los seres humanos y animales y es un importante patógeno causante de enfermedades y se encuentra principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, en los pliegues inguinales y en las axilas (Wann et al., 2000). Sin embargo, este patógeno se caracteriza por causar infecciones en la piel y en tejidos blandos (músculos, tendones, tejido graso, vasos sanguíneos), por la invasión de dispositivos médicos (Velásquez et al., 2010) y por ser relevante en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Zendejas-Manzo et al., 2014).

El *Staphylococcus aureus* es un agente etiológico de la neumonía grave que comúnmente se aísla de la piel. En un 15-50 % de las personas sanas, la nasofaringe se coloniza. Se transmite con facilidad de persona a persona, a través del contacto directo. Desarrolla fácilmente resistencia a nuevos antibióticos. Aunque es una causa rara de la NAC (<10 %

de todas las neumonías), es el segundo o tercer agente más frecuente entre las NAC que requieren tratamiento en UCI (Armas Merino, R., 2024).

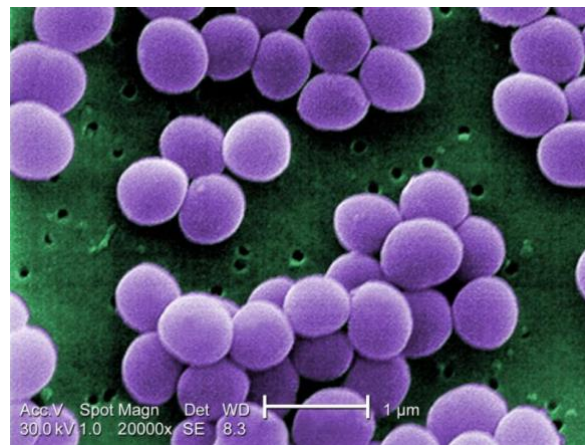


Figura 9: *S. aureus*. Con un aumento de 20 000X.

Micrografía de microscopio electrónico de barrido, coloreada digitalmente, que muestra una cepa de la bacteria *S. aureus* extraída de un cultivo con resistencia intermedia a la vancomicina (VIS). Tomada de (Haney Carr J., 2001).

La infección se produce por microaspiración del contenido de las vías respiratorias altas o a través de la sangre proveniente de otro foco de enfermedad más distante, por ejemplo, el endocardio, los furúnculos y las heridas infectadas por estafilococos. Los factores de riesgo de infección por *S. aureus* incluyen: enfermedades pulmonares concomitantes (EPOC, fibrosis quística, cáncer de pulmón), diabetes mellitus, enfermedad renal crónica, infección previa por el virus de la gripe (las infecciones por *S. pneumoniae* y *S. aureus* son las 2 causas más frecuentes de neumonía “posgripal”) (Armas Merino, R., 2024).

1.8.1 Presentación clínica de *S. aureus* en el pulmón de animales domésticos y el ser humano

S. aureus es un coco Gram positivo oportunista, ampliamente distribuido en el ambiente y en la microbiota de la piel y de las mucosas de los animales domésticos. Aunque generalmente es un comensal, puede convertirse en patógeno bajo condiciones predisponentes, como la inmunosupresión, las coinfecciones virales, las lesiones de las vías respiratorias o los procedimientos invasivos (Grice & Segre, 2011).

En animales domésticos, *S. aureus* puede causar neumonía primaria o secundaria, siendo esta última más frecuente en animales debilitados o como complicación de la septicemia.

En perros y gatos, la neumonía estafilocócica suele presentarse con tos productiva, fiebre, disnea, letargia, anorexia y secreción nasal purulenta. En ocasiones se puede observar dolor torácico y estertores pulmonares a la auscultación (Martínez, 2005)

En cachorros y gatitos, *S. aureus* puede causar una infección respiratoria neonatal, principalmente cuando hay fallas en la inmunidad pasiva o cuando las infecciones umbilicales progresan a bacteriemia. En casos graves, puede provocar neumonía necrosante o abscesos pulmonares (Tesini, Brenda L., 2022). La forma aguda puede evolucionar rápidamente a una condición sistémica grave, especialmente si no se instituye un tratamiento oportuno.

En rumiantes jóvenes, como terneros y corderos, la infección pulmonar por *S. aureus* suele asociarse con procesos sépticos secundarios a infecciones umbilicales o articulares. A través de la diseminación hematógena, la bacteria puede localizarse en los pulmones, provocando neumonías supurativas o embolígenas (Abutarbush, 2010).

En la especie humana, la infección estafilocócica es una causa poco frecuente de neumonía en niños inmunocompetentes; es casi exclusivamente una enfermedad de lactantes y tiende a presentarse de forma aguda y grave, en especial porque muchos antibióticos usados para tratar las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) no proporcionan una cobertura adecuada frente a este agente (Balboa de Paz, F. et al., 2008).

A pesar de su baja frecuencia, estas neumonías precisan ser tratadas con el antibiótico más adecuado, pues este germen puede presentar cepas meticilina-resistentes, lo que obliga al uso de fármacos específicos como la vancomicina o la teicoplanina (Balboa de Paz, F. et al., 2008).

2. Justificación

El uso indiscriminado de antibióticos en la clínica y en la producción animal ha provocado la resistencia a los antimicrobianos. Este fenómeno constituye un problema que pone en riesgo la salud tanto de los animales como la del ser humano. Por ello, existe un gran interés en estudiar compuestos de origen natural con actividad antimicrobiana que nos permitan tratar enfermedades infecciosas, sustituyendo o coadyuvando al uso de los antibióticos y reduciendo la resistencia antimicrobiana. El AO es un triterpeno de origen natural con actividad antimicrobiana, por lo que es importante evaluar si puede eliminar *E. coli* y *S. aureus* en un modelo *in vitro* de células infectadas por ambas bacterias.

3. Hipótesis

El ácido oleanólico podría tener actividad antimicrobiana en un modelo de infección *in vitro* y promover la eliminación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en la línea celular epitelial de pulmón A549.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evidenciar la actividad antimicrobiana del AO y su efecto en células infectadas por bacterias de interés médico.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar si el AO tiene actividad antimicrobiana en bacterias de interés médico mediante la determinación de la CMI y CMB
- Investigar el efecto sobre la viabilidad celular del AO en células epiteliales A549
- Determinar la IC50 del AO en células epiteliales de pulmón A549.
- Demostrar si el AO favorece la eliminación de *E. coli* y *S. aureus* en células epiteliales.

5. Materiales

5.1 Líneas celulares

La línea celular A549 ATCC CCL-185 (American Type Culture Collection, 2024a) es una línea de células epiteliales alveolares humanas y se mantuvo en medio de cultivo Ham's F12 Nutrient Mix (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). El medio se suplementó con 5% de suero fetal bovino (SFB; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y con penicilina al 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Las células se mantenían en incubación a 37 °C y en una atmósfera con 5% de CO₂ en botellas de cultivo celular.

5.2 Ácido oleanólico

El AO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) se diluyó a 10 mg en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una solución a 10 µg/µL.

5.3 Cepas bacterianas

5.3.1 *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection, 2024b). Son cepas de referencia, particularmente en ensayos de sensibilidad a anticuerpos, y fueron aisladas originalmente de una muestra clínica humana recolectada en Seattle, WA (1946).

6. Métodos

6.1 Cultivo de bacterias

6.1.1 *E. coli* y *S. aureus*

Las bacterias fueron sembradas en medio de cultivo BHI (Brain Heart Broth, MCD, LAB, Ciudad de México, México) a 37 °C durante 24 horas previas a cada experimento. Se preparó con agar BHI a 37 g/L. El medio se preparó y homogenizó, se esterilizó durante 15 minutos y se vertió en cajas de Petri; posteriormente, se sembró en ellas. Transcurridas 24 h de incubación, se tomó una colonia, se pasó a tubos con caldo BHI y se incubó durante 24 h para su uso en los experimentos.

6.2 Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del AO en *E. coli* y *S. aureus*

Para el desarrollo de este experimento se utilizó una placa de 96 pozos, en la que se colocaron 5, 10, 25, 50, 100 y 200 µg/mL de AO (Tabla 6). Como controles, se colocaron un pozo sin bacterias y otro con bacterias, pero sin AO. En cada pozo se agregaron 50 µL de BHI, 10 µL de bacterias (*E. coli* y *S. aureus*) ajustadas al 0.5 del nefelómetro de McFarland, las diferentes concentraciones de AO y el volumen restante de PBS, para obtener un volumen final de 200 µL en cada pozo. La placa se dejó incubar durante 24 h a 37 °C. Los ensayos se realizaron en duplicado, con 5 repeticiones, hasta determinar la CMI y la CMB de AO.

Tabla 6: Concentraciones del AO empleadas para determinar la actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus*.

CONCENTRACIÓN DE AO														
[] AO µg/mL	01	02	5	10	25	50	100	200	250	300	350	400	500	600
BHI µL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Bacteria µL	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
AO µL	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
PBS µL	140	140	139	138	135	130	120	100	90	80	70	60	40	20
Total µL	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

6.3 PREPARACIÓN DE MONOCAPAS CELULARES

A partir de los cultivos de células A549 en botellas de cultivo celular (25 cm²), con un 90% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y, posteriormente, se realizó el proceso de separación enzimática de las células previo a su conteo. Para este paso se empleó una solución de verseno-tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) al 5%. Se incubaron durante 3 minutos y las células se desprendieron de la botella. Los 2 mL de verseno-tripsina con las células desprendidas, se transfirieron a un tubo de 15 mL. Para neutralizar la solución de verseno-tripsina, se adicionó medio de cultivo fresco en proporción 1:1 y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. En la base del tubo se formó un botón de células; se desechó la solución de medio de cultivo y verseno-tripsina en la misma dirección del tapón de células. Las células fueron resuspendidas en 4 mL de cultivo. Posteriormente, las células se contaron en una cámara de Neubauer, diluyendo la suspensión celular 1:20 con el colorante azul de tripano al 2%. Una vez contadas las células, se colocaron en cada pozo de la placa y se incubaron a 37 °C durante 24 h. De acuerdo con cada experimento realizado, las monocapas se prepararon en placas de 96 pozos (40,000 células) (efecto del AO sobre las células, MTT), en placas de 24 pozos (200,000 células) (determinación de UFC) y en placas de 6 pozos con cubreobjetos de 22 x 22 mm (400,000 células) (microscopía óptica).

6.4 Determinación del efecto sobre la viabilidad celular del AO sobre las células A549

6.4.1 Dilución de AO

Con los antecedentes del primer experimento, orientado a determinar la actividad antimicrobiana del AO frente a las bacterias, se decidió emplear concentraciones bajas y altas de AO para evaluar la viabilidad de las células en presencia del AO y de las bacterias. Las concentraciones utilizadas fueron de 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 µL, obtenidas mediante dilución de la concentración más alta (Tabla 7). Cada pozo se completó con un volumen final de 200 µL y se incubó durante 24 h a 37 °C.

Tabla 7: Concentraciones de AO para determinar la viabilidad celular.

Pozos	Concentración	AO	MF
1	6.25 μL	0.125 μL	199.875 μL
2	12.5 μL	0.25 μL	199.75 μL
3	25 μL	0.5 μL	199.5 μL
4	50 μL	1 μL	199 μL
5	100 μL	2 μL	198 μL
6	200 μL	4 μL	196 μL
7	400 μL	8 μL	192 μL
8	800 μL	16 μL	184 μL

6.4.2 Técnica de MTT

A partir de los cultivos de células A549 en botellas de cultivo celular de 25 cm², con un 90% de confluencia, se realizaron monocapas celulares en placas de 96 pozos, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ de AO y 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0 $\mu\text{L/mL}$ de DMSO mediante la técnica de dilución seriada. Las monocapas celulares se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂, cubriendo la placa con papel de aluminio, durante 24 h. Como control, se usaron células sin tratamiento. Tras el tiempo de incubación, se desechó el medio de cultivo para eliminar los residuos de AO. Enseguida, se añadieron 50 μL de una solución de MTT (Gold Biotechnology, St. Louis, MON, EE. UU.) para solubilizar el formazán. La solución adquirió un color rosado, lo que indicó la viabilidad de las células, tras incubar durante 3 h. Al finalizar la incubación, se adicionaron 100 μL de DMSO y posteriormente se realizó la lectura de la placa utilizando un lector de ELISA (Espectrofotómetro Multiskan Thermo Fisher Scientific) a una longitud de onda de 540 nm.

6.4.3 Análisis estadístico para la evaluación del efecto citotóxico

Posterior a la obtención de resultados, se utilizó el programa GraphPad Prism versión 8 ((64-bit; GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.), para ingresar los resultados obtenidos experimentalmente en el ensayo de viabilidad celular. Los datos mostraron el efecto del AO y del DMSO sobre la viabilidad de las células A549. El software generó una gráfica de barras a partir de los valores promedio obtenidos en las réplicas experimentales, que muestra la media y la desviación estándar. Los datos se compararon mediante una prueba Anova de una vía. Además, se aplicó el análisis estadístico correspondiente para

determinar si existía una diferencia significativa entre los tratamientos y el control, lo cual se indicó mediante asteriscos.

6.4.4 Infección de células epiteliales por *E. coli* y *S. aureus*

A partir de cultivos de células A549 en botellitas de cultivo celular, con un 90% de confluencia, se realizó una monocapa en placas de 24 pozos y se incubó durante 24 h. A partir de la monocapa se realizó la infección. Para el desarrollo de esta etapa, en 1 tubo de 50 mL se agregaron 11800 μ L de MF SFB al 1% y 80 μ L de bacteria ajustada al nefelómetro 1. Posteriormente, se desecharon 500 μ L de medio de cada pozo de la monocapa y se agregaron 500 μ L de la solución con MF SFB al 1% y la bacteria. Se incubaron durante 2 h a 37 °C y con 5% de CO₂.

Dos horas después de la infección, se agregó antibiótico a la placa. En un tubo de 50 mL se agregaron 21,692 μ L de MF sin suplementar, 220 μ L de SFB al 1% y 88 μ L de amikacina (AK), lo que dio un volumen total de 22 mL. Se retiraron 500 μ L de la solución con MF+SFB al 1% + bacterias de la monocapa, y se lavó 3 veces con 1 mL de Hanks (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) por la pared del pozo. Enseguida, se le agregaron 1000 μ L de la solución con MF+SFB+AK y se incubó durante 2 h a 37 °C, 5 % CO₂.

Al transcurrir 2 h, se agregó AO. En tubos de ensayo de 5 mL se agregaron AO a la concentración deseada, 2 μ L de AK y el resto de MF. Resultando en 2.4 mL en cada tubo (Tabla 8).

Tabla 8: Cantidad de AO según la concentración en la dilución.

Concentración	AO	AK	MF	Volumen
50 μ g	12 μ L	2 μ L	2386 μ L	2400 μ L
25 μ g	6 μ L	2 μ L	2392 μ L	2400 μ L
12.5 μ g	3 μ L	2 μ L	2395 μ L	2400 μ L
6.25 μ g	1.5 μ L	2 μ L	2396.5 μ L	2400 μ L
0 μ g	0 μ L	2 μ L	2398 μ L	2400 μ L

A la monocapa se le retiraron 1000 μ L de la solución con MF+AK+SFB; se lavó la placa 2 veces con Hanks (1 mL) a lo largo de la pared del pozo y se agregaron 500 μ L de AO+AK+MF a la concentración correspondiente en cada pozo. Al terminar, se incubó durante 24 h a 37 °C con 5% de CO₂. A las 24 horas de incubación, se retiró la placa y se desecharon 500 μ L de la solución con AO+AK+MF; se agregaron 500 μ L de SDS y 500 μ L

de albúmina. Los 1000 μL acumulados se homogeneizaron y se transfirieron a un microtubo de 1.5 mL. Finalmente, se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior siembra.

6.5 Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

En una placa de 96 pozos se realizaron las diluciones de cada concentración de AO (0, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$) para cada bacteria, por lo que en un pozo se colocó el concentrado y, a sus laterales, las diluciones (-10^{-1} , -10^{-2} y -10^{-3}). En el pozo del concentrado se colocaron 200 μL y en los laterales donde se realizó la dilución, se agregaron 180 μL de PBS. Posteriormente se tomaron 20 μL del concentrado y fueron transferidos al pozo lateral y se hace la primera dilución (-10^{-1}), de la primera dilución se tomaron otros 20 μL y son transferidos al pozo lateral, hasta realizar 3 diluciones (Figura 10).

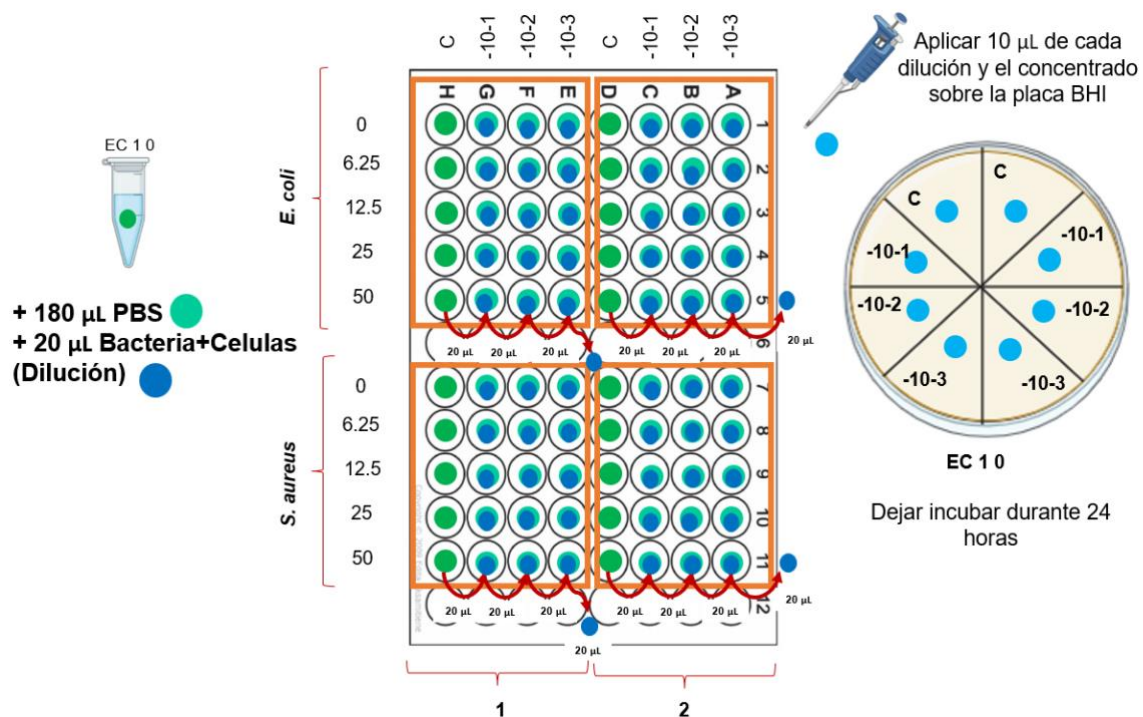


Figura 10: Diluciones seriadas de *E. coli* y *S. aureus*.

De cada pozo se tomaron 10 μL de cada dilución y del concentrado, y se sembraron por duplicado en cajas Petri con BHI. Fueron incubadas durante 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después del periodo de incubación se contaron las colonias en un microscopio estereoscópico (Motic, línea Ecoline, Hong Kong, China). Posteriormente, se calcularon las unidades formadoras de colonia (UFC/mL). Se realizaron 4 réplicas.

6.6 Porcentaje de infección celular por conteo en microscopio de campo

Se realizó una monocapa en placas de 6 pozos, con un cubreobjetos en cada uno, con 200,000 células por pozo durante 24 h. Posteriormente, la monocapa de células epiteliales fue infectada con *MF SFB 1%* + bacteria (*E. coli* y *S. aureus*) durante 2 h, después se dio tratamiento con *MF+SFB+AK* durante 2 h y finalmente se mantuvo en incubación con *AO+AK+MF* durante 24 h.

Transcurridas las 24 horas de incubación, se retiró la solución de *MF*, *AK* y *AO*; finalmente, se agregaron gotas de metanol y se dejaron secar. Los cubreobjetos fueron teñidos con Gram y fijados sobre portaobjetos con resina. Finalmente, las laminillas se observaron al microscopio.

6.6.1 Tinción de Gram

Aplicar sobre el cubreobjetos 1 mL de cristal violeta durante 1 min y enjuagar perfectamente con agua destilada; aplicar 1 mL de Lugol durante 1 min y enjuagar con agua destilada; aplicar gotas de alcohol-acetona y retirar inmediatamente, enjuagar perfectamente con agua destilada; aplicar 1 mL de safranina durante 1 min y enjuagar con agua destilada, finalmente, dejar secar los cubreobjetos.

Una vez secos los cubreobjetos, se coloca una gota de resina y se montan sobre un portaobjetos, se dejan secar y se visualizan al microscopio.

7. Resultados

7.1 Actividad antimicrobiana del AO

Para evaluar la actividad antimicrobiana del AO, se realizaron ensayos de CMI y CMB mediante la medición del crecimiento de las colonias; la ausencia de colonias bacterianas permitió determinar la actividad antimicrobiana adecuada del AO (Figura 11).

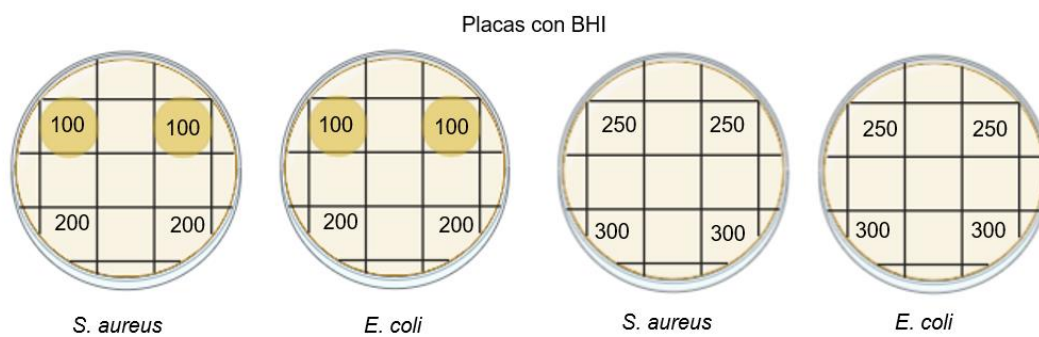


Figura 11: Representación del crecimiento bacteriano tras el tratamiento con AO a diferentes concentraciones.

Se demostró que, a concentraciones inferiores a 200 µg/mL, el AO no presenta actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*. Mientras que a 200 y 250 µg/mL se observó un efecto bacteriostático, a 300 µg/mL se observó un efecto bactericida en ambas bacterias (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del AO en mg/mL.

Compuesto		Microorganismos	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
AO	CMI	200	200
	CMB	300	300

7.2 Efecto citotóxico del DMSO sobre la viabilidad de las células A549

Se evaluó el efecto de las células en presencia de DMSO (vehículo) y sin tratamiento, para comparar los efectos morfológicos que provoca, considerando que el DMSO es citotóxico a altas concentraciones y puede afectar la permeabilidad y la estructura celular.

Se demostró que la viabilidad celular puede mantenerse estable sin cambios morfológicos considerables en concentraciones de 1.25 $\mu\text{L/mL}$ a 40 $\mu\text{L/mL}$ de DMSO. Sin embargo, se observó que la sobrevivencia de las células se vio afectada por la concentración más alta de DMSO (80 $\mu\text{L/mL}$). En las micrografías de contraste de fases se observan cambios morfológicos, entre los que destacan la pérdida de la continuidad de la monocapa y la formación de células aglomeradas, pequeñas y muertas. Asimismo, se perdió la confluencia celular (Figura 12).

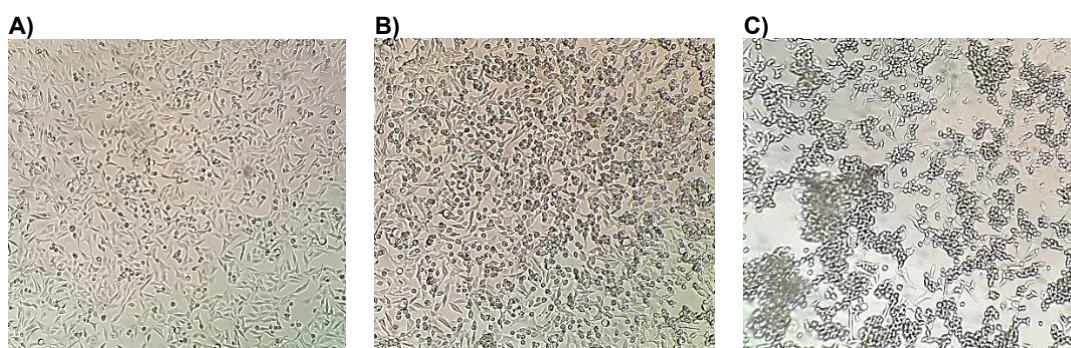


Figura 12: Micrografías del efecto del DMSO sobre la morfología de las células A549 a 400 x.

A) 0 $\mu\text{L/mL}$ de DMSO; B) 10 $\mu\text{L/mL}$ de DMSO; y C) 80 $\mu\text{L/mL}$ de DMSO.

Se cuantificó el efecto del DMSO, vehículo del AO, sobre la viabilidad celular en ausencia de tratamiento con AO. Se demostró que la viabilidad de las células no se ve muy alterada a concentraciones de 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{L/mL}$ de DMSO. Solo en la concentración más alta se observa una reducción considerable de la viabilidad celular, con una sobrevivencia de 6,6% (Figura 13).

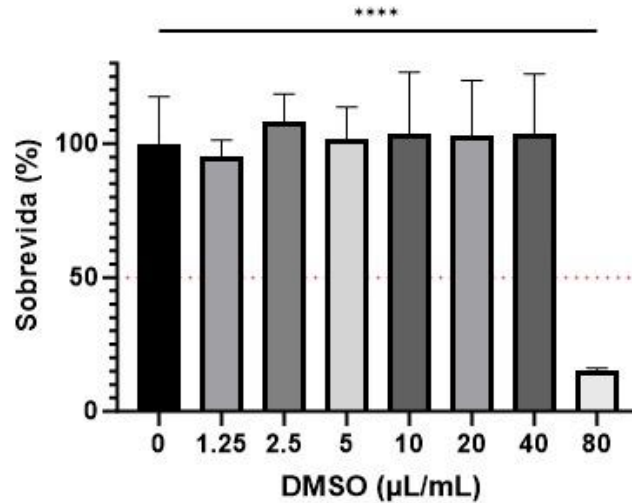


Figura 13: Efecto citotóxico del DMSO sobre la viabilidad de las células A549.

Las células A549 fueron estimuladas con DMSO a concentraciones de 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 µL/mL para determinar el efecto citotóxico sobre la viabilidad celular. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto a las células no tratadas (control) ($p < 0.05$, $p < 0.0001$ ****).

7.3 Efecto antibacteriano del AO en las células epiteliales

Para evidenciar el efecto del tratamiento con AO sobre la morfología celular, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones (entre 6.25 y 400 µg/mL). En las células tratadas a bajas concentraciones (0, 6.25, 12.5 µg/mL de AO), las monocapas celulares se observan confluentes y extendidas, sin cambios en su morfología. En altas concentraciones (200 y 400 µg/mL de AO), el AO ejerce un efecto citotóxico, se observó pérdida de la continuidad de la monocapa, disminución de la confluencia y muerte celular (Figura 14).

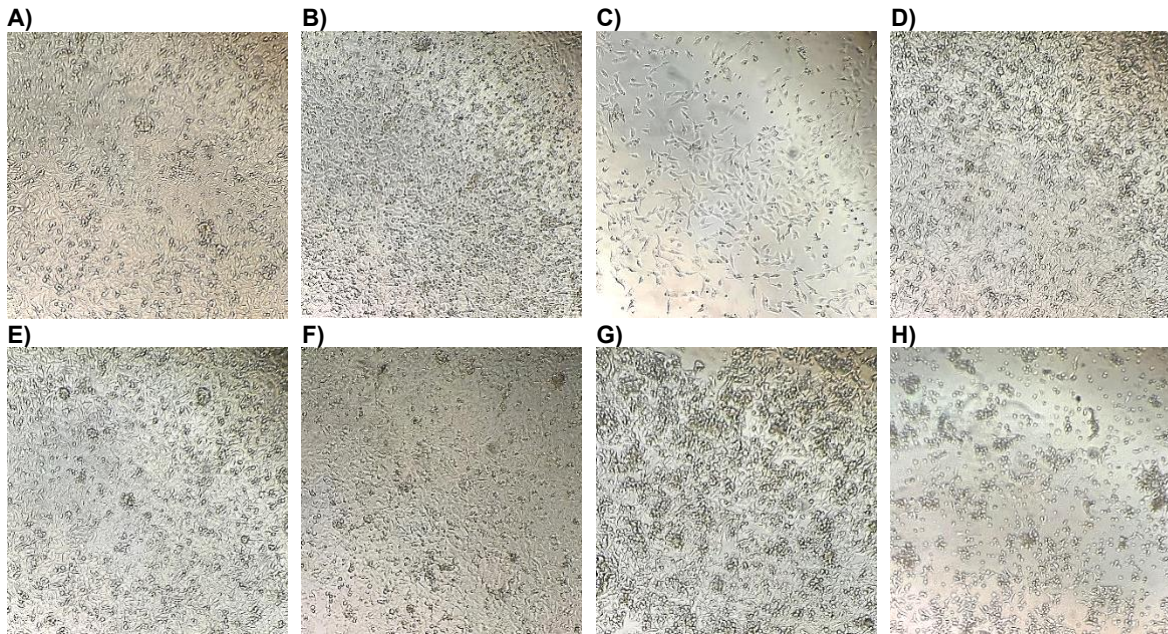


Figura 14: Micrograffías del efecto del AO sobre la morfología de las células A549 400 x.

A) 0 µg/mL de DMSO; B) 6.25 µg/mL de DMSO; C) 12.5 µg/mL de DMSO; D) 25 µg/mL de DMSO; E) 50 µg/mL de DMSO; F) 100 µg/mL de DMSO; G) 200 µg/mL de DMSO y H) 400 µg/mL de DMSO.

7.4 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media del AO en células epiteliales

Se determinó la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) del AO en las células A549. Se observó que para 6.25 µg/mL hay una viabilidad del 94% mientras que, para la última concentración usada, únicamente hubo un 16.49% de sobrevivencia (Figura 15). Asimismo, se evidenció una disminución significativa en la viabilidad celular conforme aumento la concentración del compuesto, alcanzando una IC₅₀ de 105.234 µg/mL.

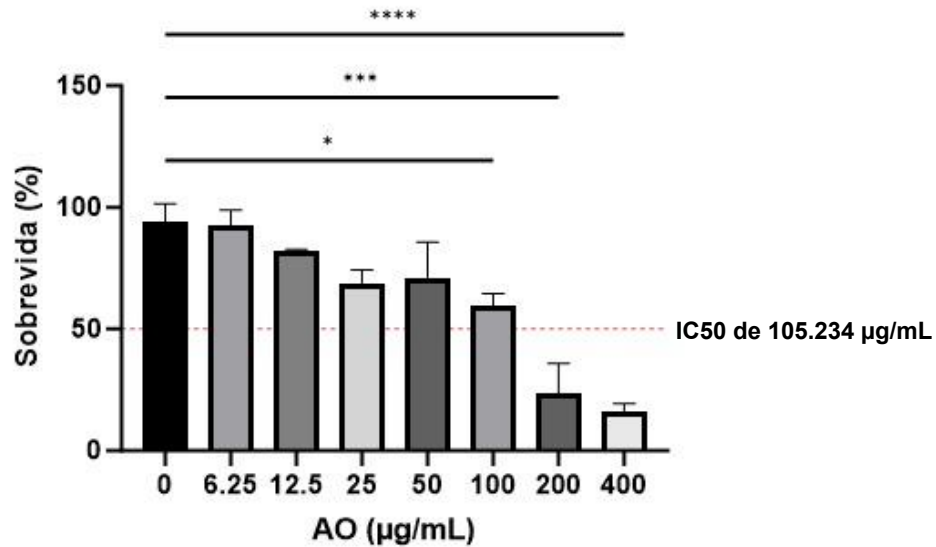


Figura 15: Efecto del AO sobre la viabilidad de las células A549.

Las células A549 fueron estimuladas con AO a 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 400 µg/mL para determinar la viabilidad celular. Los * indican diferencias significativas respecto de las células sin estímulo (control). El gráfico representa tres ensayos independientes, los datos fueron comparados con una prueba Anova de una vía, aceptando un resultado estadísticamente significativo, una $p < 0.05$ ($p < 0.0126^*$; $p < 0.0001^{***}$; $p < 0.0001^{****}$).

7.5 Microscopía óptica de células infectadas por *E. coli* y *S. aureus*

Se evidenció la presencia de bacterias en las células A549 infectadas por *E. coli* y sometidas a tratamiento con diferentes concentraciones de AO, observadas al microscopio óptico. A concentraciones bajas (0, 6.25 y 12.5 µg/mL) se observaron adheridas a la superficie celular, así como aparentemente en su interior, lo que sugiere la capacidad de *E. coli* para infectar las células bajo estas condiciones.

Sin embargo, a las concentraciones más altas de AO (25 y 50 µg/mL), la cantidad de bacterias presentes disminuyó considerablemente y estas se localizaron principalmente en el exterior de las células, mostrando una invasión intracelular muy limitada. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento con AO ejerce un efecto antimicrobiano sobre las células A549 y podría limitar la adhesión y/o la invasión de *E. coli* de manera dependiente de la concentración (Figura 16).

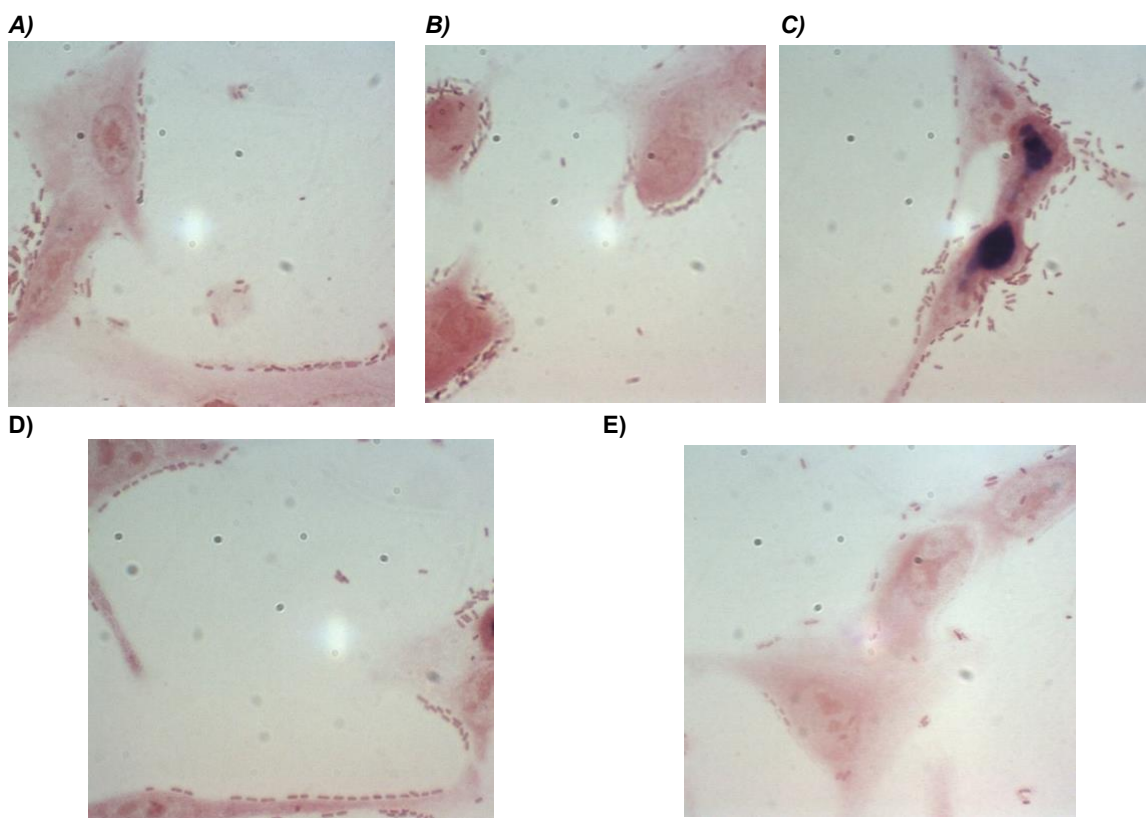


Figura 16: Micrografías de células A549 infectadas por *E. coli*.

A) 0 $\mu\text{g/mL}$ de AO; B) 6.25 $\mu\text{g/mL}$ de AO; C) 12.5 $\mu\text{g/mL}$ de AO; D) 25 $\mu\text{g/mL}$ de AO y E). 50 $\mu\text{g/mL}$ de AO.

En conjunto, se evidenció la presencia de bacterias en las células A549 infectadas por *S. aureus* y sometidas a tratamiento con diferentes concentraciones de AO, observadas al microscopio óptico. Se observó una abundante presencia de *S. aureus* a las concentraciones más bajas de AO (0, 6.25, 12.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$) en las células, tanto en la superficie como en el interior, lo que incluso provocó la muerte celular.

En contraste, a la concentración más alta de AO (50 $\mu\text{g/mL}$), se observó una monocapa más continua y menor daño celular. Asimismo, la cantidad de bacterias presentes disminuyó considerablemente, localizándose principalmente de forma extracelular y con escasa evidencia de invasión intracelular. Estos resultados sugieren que el AO, a concentraciones elevadas, ejerce un efecto resguardante sobre las células A549 y podría reducir la infección por *S. aureus* (Figura 17).

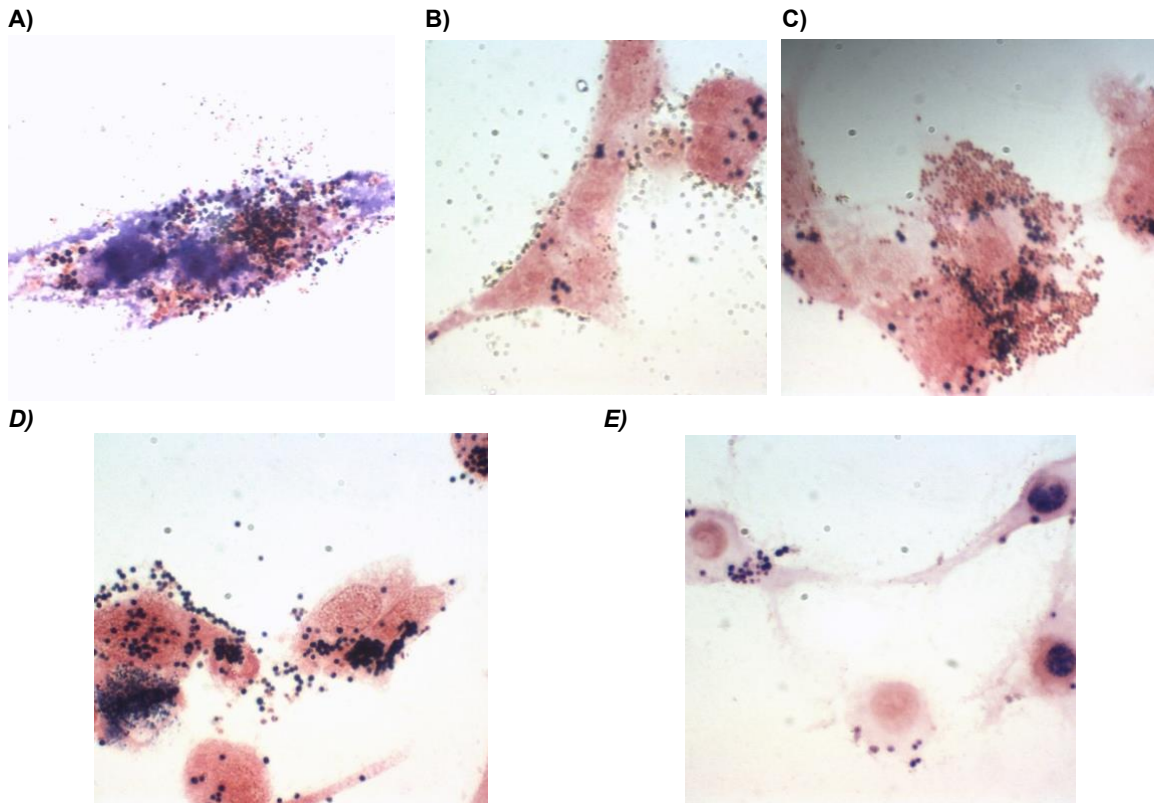


Figura 17: Micrográficas de células A549 infectadas por *S. aureus*.

A) 0 µg/mL de AO; B) 6.25 µg/mL de AO; C) 12.5 µg/mL de AO; D) 25 µg/mL de AO y E). 50 µg/mL de AO.

Ambas bacterias se presentaron de forma intracelular a bajas concentraciones de AO. En particular, *S. aureus* mostró una tendencia a agruparse en la superficie celular, mientras que *E. coli* se encontró uniformemente distribuida en ella. Se resalta que, a concentraciones elevadas de AO, la presencia de las bacterias disminuyó debido al efecto antimicrobiano del AO, lo que demuestra que, a esa concentración, no se alteró la integridad de las células.

7.6 Determinación de unidades formadoras de colonias en las células A549 infectadas por *E. coli* y *S. aureus*

Para evaluar el efecto antimicrobiano de AO en células infectadas por *E. coli*, se realizaron ensayos de replicación y se determinaron las UFC/mL. Los resultados demostraron que el tratamiento con AO a partir de 10 µg/mL disminuye la infección por *E. coli* y la elimina a 50 µg/mL (Figura 18).

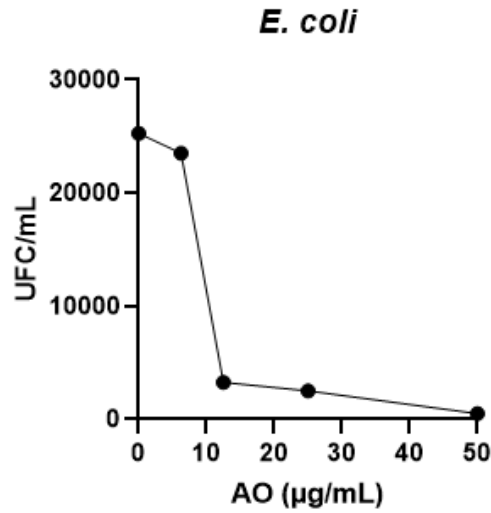


Figura 18: Ensayo de replicación de *E. coli* en un modelo de infección de células epiteliales tratadas con diferentes concentraciones de AO (0, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL).

Se determinó la cantidad de UFC de *S. aureus* presentes en la muestra expuesta sobre placas de BHI a concentraciones de 0, 6.25, 12.5 y 50 µg/mL de AO, donde se observa que, a concentraciones más altas, el porcentaje de UFC es inferior en comparación con la concentración sin tratamiento, lo que demuestra que las UFC son superiores (Figura 19).

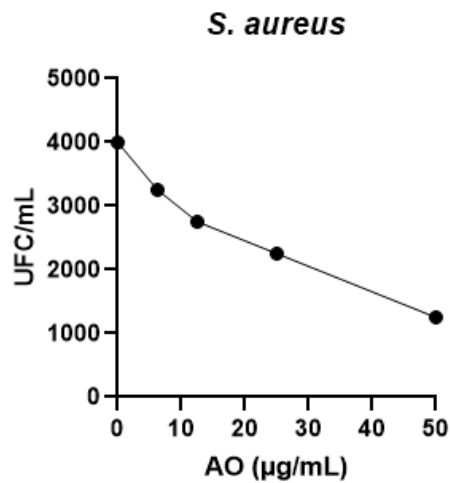


Figura 19: UFC/mL de *S. aureus* presentes en células epiteliales tratadas con diferentes concentraciones de AO (0, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL).

8. Discusión

La resistencia antimicrobiana es una amenaza importante para la salud pública a nivel nacional y mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020) advierte sobre la aceleración de este fenómeno a escala global. El uso indiscriminado de estos contribuye al aumento y a la aparición de nuevas bacterias resistentes (Giono-Cerezo et al., 2020). En este contexto, existe un creciente interés en identificar compuestos antimicrobianos alternativos de origen natural que sustituyan o coadyuven a los antibióticos convencionales para disminuir su uso y, en consecuencia, evitar la aparición de resistencia (Wolska et al., 2010). Entre estos compuestos destaca el ácido oleanólico (AO), un triterpeno pentacíclico ampliamente distribuido en plantas medicinales y alimenticias. El AO ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades farmacológicas y se le han atribuido efectos antimicrobianos, antiinflamatorios y antitumorales (Pollier & Goossens 2011).

En el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana del AO frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en un modelo de infección de células epiteliales A549. La concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida para ambas bacterias fue de 200 µg/mL, mientras que la concentración mínima bactericida (CMB) fue de 300 µg/mL. Los resultados obtenidos demostraron que el compuesto presenta una actividad dependiente de la concentración, ya que las concentraciones más bajas no mostraron efectos antimicrobianos significativos, mientras que las más elevadas produjeron efectos bacteriostáticos y bactericidas frente a ambas especies bacterianas. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Fontanay et al. (2008), quienes observaron actividad antimicrobiana moderada del AO frente a diferentes bacterias de importancia clínica, incluidas *E. coli* y *S. aureus*. Estos autores señalan que la actividad antimicrobiana del AO podría considerarse moderada al emplear concentraciones de 64 µg/mL para *S. aureus* y de 156 µg/mL para *E. coli* (Fontanay et al., 2008). Las diferencias en las concentraciones observadas en este estudio podrían explicarse por múltiples factores, incluyendo la cepa bacteriana empleada, el método experimental, el grado de pureza del compuesto y las condiciones de cultivo. Por otra parte, se ha reportado que el AO presenta un comportamiento antimicrobiano similar al descrito para otros compuestos naturales lipofílicos y aceites esenciales, con actividad dependiente de la concentración, siendo generalmente más sensibles las bacterias Gram positivas, como *S. aureus*, en contraste con las Gram negativas, como *E. coli*. Se sugiere que esto se debe a la naturaleza de la estructura bacteriana, ya que las bacterias Gram

negativas tienen una membrana externa constituida de lipopolisacárido que actúa como barrera física frente a moléculas hidrofóbicas (Fontanay et al., 2008; Oussalah et al., 2007; Prabuseenivasan et al., 2006). Por ello, este triterpeno actúa mejor contra bacterias Gram positivas favoreciendo su muerte. Trombetta y colaboradores (2005) explican que la muerte bacteriana se debe a la alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, lo que provoca la pérdida de iones, desorganiza la estructura celular y desencadena la lisis (Trombetta et al., 2005). Además, se ha descrito que los triterpenos interfieren con procesos fundamentales como la síntesis de proteínas, la respiración celular y la integridad de los ácidos nucleicos, lo que afecta principalmente la viabilidad bacteriana (Burt, 2004; Wolska et al., 2010).

Por otra parte, se sabe que altas concentraciones de AO pueden ser citotóxicas en células de mamíferos, por lo que se realizaron estudios para evaluar la viabilidad celular en presencia del tratamiento con AO. Los resultados de este estudio confirman que el AO ejerce un efecto citotóxico a altas concentraciones sobre las células epiteliales de pulmón A549. Estos resultados coinciden con diversas investigaciones que respaldan su actividad antiproliferativa, proapoptótica y citotóxica (Li et al., 2018). Las observaciones microscópicas de las células A549 y los ensayos de viabilidad celular comprobaron que, a concentraciones altas de AO, se observan alteraciones en la monocapa celular, con pérdida de la integridad celular, morfologías redondas, pequeñas y aglomeradas, y algunas no viables, en contraste con las concentraciones más bajas o sin tratamiento, donde se observan células confluentes, extendidas y sin cambios en su morfología. El AO muestra una reducción de la viabilidad celular dependiente de la concentración tras la exposición al triterpeno, lo que sugiere una acción dosis-dependiente, ya reportada en líneas celulares como HepG2 (hígado), MCF-7 (mama) y A549 (pulmón), entre otros (Pollier, Jacob & Goossens, Alain, 2011). Este trabajo demostró que, a bajas concentraciones de AO, no se compromete la viabilidad de las células, mientras que a concentraciones altas hubo un porcentaje muy bajo de sobrevivencia. Posiblemente esto se deba a la inducción de estrés oxidativo y apoptosis (Hsu et al., 2004). Shanmugam y colaboradores (2014) demostraron que este efecto dosis-dependiente permite considerar al AO como un compuesto bioactivo de origen natural con potencial terapéutico, siempre que exista un rango de seguridad biológica adecuado (Shanmugam et al., 2014b).

En el modelo de infección por *S. aureus* y *E. coli* en células A549, tanto los ensayos de microscopía óptica como la cuantificación de las UFC evidenciaron una reducción

significativa de las UFC por el AO, lo que respalda su efecto antimicrobiano. A medida que aumentó la concentración del compuesto, se observó una disminución progresiva del número de colonias viables, lo que fue un efecto dosis-dependiente. En las observaciones microscópicas, a bajas concentraciones, las células sufren cambios morfológicos importantes debido a la presencia de bacterias intracelulares y extracelulares, que fueron numerosas. Sin embargo, a la concentración más alta de AO (50 µg/mL), las células se muestran más íntegras y la presencia de bacterias es mínima, encontrándose principalmente en forma extracelular. Por otro lado, en las células infectadas con *S. aureus* se detectaron estas bacterias en la superficie celular y en el citosol, así como una mayor pérdida de la integridad celular. Este resultado puede atribuirse a la capacidad de la bacteria para adherirse y formar biopelículas, así como a la producción de factores de virulencia que alteran la membrana celular del huésped (Camussone & Calvino, 2013). Se demostró que, a concentraciones elevadas, se eliminó *S. aureus*, lo que evidenció un efecto bactericida. Esto sugiere que el compuesto no solo ejerce un efecto bactericida directo, sino que también podría inhibir los mecanismos de adhesión, colonización o invasión bacteriana. Por otra parte, en las células infectadas por *E. coli*, se observaron signos de estrés celular, como cambios en la forma celular y la presencia intracelular de la bacteria. Estas observaciones se relacionan con la literatura, en la que se ha documentado que *E. coli* puede inducir apoptosis o necrosis mediante la liberación de toxinas y la activación de vías inflamatorias (Kaper et al., 2004). Estudios han demostrado que los triterpenos pentacíclicos pueden alterar la formación de biopelículas y reducir la expresión de factores de virulencia bacterianos, lo que contribuye indirectamente a disminuir la capacidad infectiva de los patógenos (Castellano et al., 2022).

Es posible que la eliminación de ambas bacterias en el modelo celular se deba a la capacidad del AO de modular respuestas inmunitarias que limiten la infección. Diversos estudios han demostrado que el AO regula vías de señalización como NF-κB, MAPK y Nrf2, lo que podría contribuir a la eliminación de patógenos (Jannus et al., 2024).

Los resultados de este trabajo presentan una alternativa natural con potencial antimicrobiano; aunque son prometedores, futuras investigaciones deberán evaluar cepas multirresistentes para determinar su capacidad para eliminar este tipo de patógenos. Además de evaluar los mecanismos celulares y moleculares responsables de la actividad antimicrobiana en las células A549.

9. Conclusión

El AO mostró actividad bactericida frente a *E. coli* y *S. aureus*, redujo la infección en células epiteliales pulmonares A549 y presentó baja citotoxicidad a concentraciones moderadas. Estos hallazgos posicionan al AO como una alternativa natural prometedora frente a la resistencia antimicrobiana, con potencial de aplicación en la medicina veterinaria, la humana y la agricultura. Resulta necesario continuar con estudios *in vivo* que permitan validar su uso terapéutico.

Bibliografía

- Abutarbush, S. M. (2010). Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats, 10th edition. *The Canadian Veterinary Journal*, 51(5), 541.
- American Type Culture Collection. (2024a). A549 (CCL-185). American Type Culture Collection. <https://www.atcc.org/products/ccl-185>
- American Type Culture Collection. (2024b). *Staphylococcus aureus subsp. Aureus Rosenbach* (25923). American Type Culture Collection. <https://www.atcc.org/products/25923>
- Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*, 133, 4-19. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.001>
- Andrews, J. H., & Harris, R. F. (2000). The Ecology and Biogeography of Microorganisms on Plant Surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 145-180. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.145>
- Aquiles Chávez, H. (2022). ¿Cómo funciona el sistema defensivo de las plantas y qué herramientas existen para fortalecerlo? *Mundoagro*. <https://mundoagro.cl/como-funciona-el-sistema-defensivo-de-las-plantas-y-que-herramientas-existen-para-fortalecerlo/>
- Armas Merino, R. (2024). *Neumonía estafilocócica*. <https://empendium.com/manualmibe/tratado/chapter/B76.II.D.3.6>.
- Ayeleso, T., Matumba, M., & Mukwevho, E. (2017). Oleanolic Acid and Its Derivatives: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. *Molecules*, 22(11), 1915. <https://doi.org/10.3390/molecules22111915>

- Balboa de Paz, F., Ruibal Francisco, J. L., & Blázquez Gamero, D. (2008). *Neumonía estafilocócica*. <https://www.actapediatrica.com/index.php/secciones/revision/563-neumon%C3%ADa-estafiloc%C3%B3ica>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Brinkac, L., Voorhies, A., Gomez, A., & Nelson, K. E. (2017). The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microbial Ecology*, 74(4), 1001-1008. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0985-z>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Camussone, C. M., & Calvino, L. F. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: Relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 119-130. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7)
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology, Special Issue Antibiotic Resistance*, 303(6), 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>
- Castellano, J. M., Ramos-Romero, S., & Perona, J. S. (2022). Oleanolic Acid: Extraction, Characterization and Biological Activity. *Nutrients*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/nu14030623>
- Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629-641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>

- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26-40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- Christopher Pooley & fkrErbe. (2005). *Micrografía electrónica de baja temperatura de un grupo de bacterias E. coli*.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:E_coli_at_10000x,_original.jpg
- Coates, A., Hu, Y., Bax, R., & Page, C. (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1(11), 895-910. <https://doi.org/10.1038/nrd940>
- Coates, A. R., Halls, G., & Hu, Y. (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*, 163(1), 184-194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x>
- Davidson, P. M., & Zivanovic, S. (2003). The use of natural antimicrobials. En P. Zeuthen & L. Bøgh-Sørensen (Eds.), *Food Preservation Techniques* (pp. 5-30). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781855737143.1.5>
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847. <https://doi.org/10.1038/35081178>
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (2001). *Microbiología de los alimentos: Fundamentos y fronteras*. Acribia. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=399745>
- Errecalde Jorge O. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo*. FAO. <https://www.fao.org/4/y5468s/y5468s00.htm#Contents>
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, 10(3), 226-236.

- Fleming, A. (1945). *Penicilina, Conferencia Nobel* [Premios Nobel]. Penicilina, Conferencia Nobel. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1945/fleming/lecture/>
- Fontanay, S., Grare, M., Mayer, J., Finance, C., & Duval, R. E. (2008). Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 272-276. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.001>
- Foster, T. J. (2017). *Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects* [Oxford Academic]. FEMS Microbiology Reviews. <https://academic.oup.com/femsre/article/41/3/430/3608758?login=false>
- Fraser, R. S., Colman, N., Müller, N. L., & Paré, P. D. (2006). Enfermedades infecciosas de los pulmones. *Fundamentos de las enfermedades del tórax*, 222-336. <https://doi.org/10.1016/B978-84-458-1603-5.50006-X>
- Ganipiseti, V. M., Dudiki, N., & Athavale, A. (2023). A Diagnostic Quandary of Escherichia Coli Pneumonia: A Case Report and Literature Review. *Cureus*, 15(5), e39668. <https://doi.org/10.7759/cureus.39668>
- Gilbert, M. (2014). *Colibacilosis en avicultura: Situación actual*. https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/colibacilosis_en_avicultura_-_magdalena_gibert.pdf
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Rayo Morfín-Otero, M. del, Torres-López, F. J., Alcántar-Curiel, M. D., Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Rayo Morfín-Otero, M. del, Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de México*, 156(2), 172-180. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
- Graveland, H., Duim, B., van Duijkeren, E., Heederik, D., & Wagenaar, J. A. (2011). Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals and humans. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 301(8), 630-634. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.004>

- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4), 244-253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
- Haney Carr J. (2001). *Staphylococcus aureus*. Portal INSST. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/staphylococcus-aureus>
- Hsu, Y.-L., Kuo, P.-L., & Lin, C.-C. (2004). Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sciences*, 75(19), 2303-2316. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.04.027>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Hwang, Y.-J., Song, J., Kim, H.-R., & Hwang, K.-A. (2014). Oleanolic acid regulates NF-κB signaling by suppressing MafK expression in RAW 264.7 cells. *BMB Reports*, 47(9), 524-529. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.9.149>
- Intagri. (2017). *Las Fitoalexinas como Mecanismo de Defensa en las Plantas*. Intagri S.C. <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/las-fitoalexinas-como-mecanismo-defensa-en-las-plantas>
- Jawetz, M. & Adelberg. (2023). *Estafilococos. Microbiología médica*. McGraw Hill Medical. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1837§ionid=128957100>
- Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2002). *Escherichia coli* patógena extraintestinal: “La otra *E. coli* mala”. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(3), 155-162. <https://doi.org/10.1067/mlc.2002.121550>
- Kahlmeter, G. (2014). Defining antibiotic resistance-towards international harmonization. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), Article 2. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.901446>

- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kashiwada, Y., Wang, H.-K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda, I., Fujioka, T., Yamagishi, T., Cosentino, L. M., Kozuka, M., Okabe, H., Ikeshiro, Y., Hu, C.-Q., Yeh, E., & Lee, K.-H. (1998). Anti-AIDS Agents. 30. Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid, Pomolic Acid, and Structurally Related Triterpenoids. *Journal of Natural Products*, 61(9), 1090-1095. <https://doi.org/10.1021/np9800710>
- Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: Regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 167-180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>
- Kinjo, J., Okawa, M., Udayama, M., Shono, Y., Hirakawa, T., Shii, Y., & Nohara, T. (1999). Hepatoprotective and Hepatotoxic Actions of Oleanolic Acid-Type Triterpenoidal Glucuronides on Rat Primary Hepatocyte Cultures. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47(2), 290-292. <https://doi.org/10.1248/cpb.47.290>
- Laborda, D. (2021). *Los antiguos egipcios usaban pan mohoso en heridas, pero no conocían la penicilina*. Factual. <https://factual.afp.com/los-antiguos-egipcios-usaban-pan-mohoso-en-heridas-pero-no-conocian-la-penicilina>
- Li, X., Yang, Z., Han, Z., Wen, Y., Ma, Z., & Wang, Y. (2018). Niclosamide acts as a new inhibitor of vasculogenic mimicry in oral cancer through upregulation of miR-124 and downregulation of STAT3. *Oncology Reports*, 39(2), 827-833. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6146>
- Liu, J. (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 92-94. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.024>
- Madigan, Martinko, John M., Bender, Kelly S., Buckley, Daniel H., & Stahl, David A. (2015). *Block. Biología de los microorganismos* (14.^a ed.). Pearson.

- Martínez, C. J. Á. (2005). *Neumonías: Concepto, clasificación y diagnóstico diferencial*. (7a ed.).
- Mengoni, F., Lichtner, M., Battinelli, L., Marzi, M., Mastroianni, C. M., Vullo, V., & Mazzanti, G. (2002). In vitro Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid on Infected Human Mononuclear Cells. *Planta Medica*, 68(2), 111-114. <https://doi.org/10.1055/s-2002-20256>
- Mohr, K. I. (2016). History of Antibiotics Research. En M. Stadler & P. Dersch (Eds.), *How to Overcome the Antibiotic Crisis* (Vol. 398, pp. 237-272). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2016_499
- Morrison, L., & Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 30(4), 619-635. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Nett, M., Ikeda, H., & Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26(11), 1362-1384. <https://doi.org/10.1039/B817069J>
- Nielsen, S. S., Alvarez, J., Bicout, D. J., Calistri, P., Depner, K., Drewe, J. A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J. L., Schmidt, C., Herskin, M., Michel, V., Pasquali, P., Roberts, H. C., Sihvonen, L. H., Spooler, H., Stahl, K., Velarde, A., Winckler, C., Blome, S., ... Miranda Chueca, M. A. (2021). Research priorities to fill knowledge gaps in the

- control of African swine fever: Possible transmission of African swine fever virus by vectors. *EFSA Journal*, 19(6), e06676. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6676>
- Nikaido, H. (2003). *Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited | Microbiology and Molecular Biology Reviews*.
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003>
- OMS. (2020). *Resistencia a los antibióticos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- OMS. (2021). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos: Manual para la primera fase de implementación*. Organización Mundial de la Salud. <https://iris.who.int/handle/10665/253135>
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Efectos inhibitorios de aceites esenciales de plantas seleccionados sobre el crecimiento de cuatro bacterias patógenas: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 414-420.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>
- Pan, A., Gagliotti, C., Resi, D., & Moro, M. L. (2013). Antimicrobial stewardship programmes in Emilia-Romagna, Italy. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 1(3), 175-179.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.05.004>
- Pérez, D. Q., González, Y. B., Cartaya, Y. C., Novales, N. P., Valdivia, S. Á., Aung, M. S., & Kobayashi, N. (2020). *Escherichia coli* extraintestinal causante de infecciones en hospitales cubanos, susceptibilidad antimicrobiana y detección de betalactamasas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 72(3), Article 3.
<https://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/605>

- Pérez-Trallero Emilio & Iglesias Luis. (2003). *Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol* | *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. ELSEVIER.
<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-resumen-tetraciclinas-sulfamidas-metronidazol-13052338>
- Petersen, A., Stegger, M., Heltberg, O., Christensen, J., Zeuthen, A., Knudsen, L. K., Urth, T., Sorum, M., Schouls, L., Larsen, J., Skov, R., & Larsen, A. R. (2013). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel mecC gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(1), E16-E22.
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12036>
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
- Pollier, Jacob & Goossens, Alain. (2011). *Oleanolic Acid*. ScienceDirect.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942212000027?via%3Dihub>
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Richard E. Schultes. (1978). *Medicinal Plants and the Legacy of Richard E. Schultes*. ResearchGate.
https://www.researchgate.net/publication/260289349_Medicinal_Plants_and_the_Legacy_of_Richard_E_Schultes

- Robert L. Keith. (2023). *Carcinoma pulmonar—Trastornos pulmonares*. Manual MSD versión para profesionales.
<https://www.msdmanuals.com/es/professional/trastornos-pulmonares/tumores-de-los-pulmones/carcinoma-pulmonar>
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475.
- Rojas, R., Caviedes, L., Aponte, J. C., Vaisberg, A. J., Lewis, W. H., Lamas, G., Sarasara, C., Gilman, R. H., & Hammond, G. B. (2006). Aegicerin, the first oleanane triterpene with wide-ranging antimycobacterial activity, isolated from *Clavija procera*. *Journal of Natural Products*, 69(5), 845-846. <https://doi.org/10.1021/np050554l>
- Rovira, M. A. (2020). *Escherichia coli*. *Microbiología para humanos*.
<https://microbiologiaparahumanos.wordpress.com/2020/01/15/escherichia-coli/>
- Shanmugam, M. K., Dai, X., Kumar, A. P., Tan, B. K. H., Sethi, G., & Bishayee, A. (2014a). Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical evidence. *Cancer Letters*, 346(2), 206-216.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.016>
- Shanmugam, M. K., Dai, X., Kumar, A. P., Tan, B. K. H., Sethi, G., & Bishayee, A. (2014b). Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical evidence. *Cancer Letters*, 346(2), 206-216.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.016>
- So, A. D., Gupta, N., & Cars, O. (2010). Tackling antibiotic resistance. *BMJ*, 340(may18 2), c2071-c2071. <https://doi.org/10.1136/bmj.c2071>
- Szakiel, A., Ruszkowski, D., Grudniak, A., Kurek, A., Wolska, K. I., Doligalska, M., & Janiszowska, W. (2008). Antibacterial and Antiparasitic Activity of Oleanolic Acid and its Glycosides isolated from Marigold (*Calendula officinalis*). *Planta Medica*, 74, 1709-1715. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088315>

- Tesini, Brenda L. (2022). *Neumonía neonatal—Pediatria*. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es/professional/pediatria/infecciones-en-recién-nacidos/neumonía-neonatal>
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology, The molecular basis of antibiotic action and resistance*, 431(18), 3472-3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Trigo, F. J. (1978). *El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos*.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474-2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>
- VanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., & Farmer, E. E. (1994). Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus «Phytoanticipins». *The Plant Cell*, 6(9), 1191-1192. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.9.1191>
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5), 376-386.
- Wang, X., Liu, R., Zhang, W., Zhang, X., Liao, N., Wang, Z., Li, W., Qin, X., & Hai, C. (2013). Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 376(1-2), 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.014>
- Wann, E. R., Gurusiddappa, S., & Höök, M. (2000). The Fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* Is a Bifunctional Protein That Also Binds to

- Fibrinogen *. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13863-13871.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13863>
- Weese, J. S. (2010). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Animals. *ILAR Journal*, 51(3), 233-244. <https://doi.org/10.1093/ilar.51.3.233>
- WHO. (2023). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Willey, J. M., Sandman, K. M., & Wood, D. H. (2020). *Prescott's Microbiology* (7 edition). McGraw-Hill. <https://www.mheducation.com/unitas/highered/sample-chapters/9781260211887.pdf>
- Woldemichael, G. M., Singh, M. P., Maiese, W. M., & Timmermann, B. N. (2003). Constituents of Antibacterial Extract of *Caesalpinia paraguariensis* Burk. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 58(1-2), 70-75. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-1-213>
- Wolska, K. I., Grudniak, A. M., Fiecek, B., Kraczkiewicz-Dowjat, A., & Kurek, A. (2010). Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Central European Journal of Biology*, 5(5), 543-553. <https://doi.org/10.2478/s11535-010-0045-x>
- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades,. *Staphylococcus aureus*, 25(3).
- Zumla, A., & Grange, J. (1998). Tuberculosis. *BMJ*, 316(7149), 1962-1964. <https://doi.org/10.1136/bmj.316.7149.1962>