

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Farmacia



**ESTUDIO SOBRE LOS
ACEITES ESENCIALES COMO
NUEVA ESTRATEGIA EN EL
TRATAMIENTO DE
*LEISHMANIA SPP.***

Revisión Bibliográfica Sistemática

Autor: **Paloma Ruiz Aznárez**

Villaviciosa de Odón, **Junio 2024**

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. TRATAMIENTO	4
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA Y BASES DE DATOS.....	7
3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	7
3.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1. <i>Azadirachta indica</i>	9
4.2. Género <i>Citrus</i>	10
4.3. Género <i>Origanum</i>	13
4.4. <i>Olea europaea</i>	15
4.5. Otras especies vegetales	20
4.5.1. <i>Artemisia scoparia</i>	21
4.5.2. <i>Nigella sativa</i>	21
4.5.3. <i>Juniperus excelsa</i>	23
4.5.4. <i>Vernonia brasiliana</i>	23
4.5.5. <i>Gossypium hirsutum</i>	24
4.5.6. <i>Carthamus tinctorius</i>	24
5. CONCLUSIONES.....	25
6. BIBLIOGRAFÍA	26
7. ANEXOS.....	28
ANEXO I. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	28
ANEXO II. TABLA RESULTADOS.....	29
ANEXO III: AGRADECIMIENTOS.....	34

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria de transmisión vectorial, causada por diferentes especies del género *Leishmania*. La OMS incluye a la leishmaniasis en el grupo de Enfermedades Tropicales Desatendidas, debido a su impacto en la salud humana y en la economía de países endémicos, además de la escasa investigación existente. Se trata de un parásito digenético que alterna la forma promastigote flagelada extracelular y una forma amastigote intracelular, pudiendo provocar una clínica cutánea, mucocutánea o visceral. Actualmente no existe un tratamiento universal para la leishmaniasis, y no existen vacunas autorizadas en humanos, siendo más frecuente el uso de antimoniales pentavalentes, anfotericina B liposomal, miltefosina, aminoglucósidos y derivados azólicos. Sin embargo, estos tratamientos presentan numerosos efectos secundarios, elevada toxicidad, diversas resistencias y un alto coste. Esto, sumado a la necesidad de tratamientos accesibles de manera global a toda la población, hace necesaria la investigación de nuevas líneas de tratamiento más seguras, eficaces y menos tóxicas. En la presente revisión sistemática se tiene como objetivo recoger información sobre aquellas especies vegetales cuyos aceites esenciales han sido evaluados por su potencial antileishmania. Se ha evaluado la actividad antiprotozoaria frente a las especies de *Leishmania* que abarcan la Cuenca Mediterránea de las siguientes especies vegetales: *Azadirachta indica*, *C.sinensis*, *C.limon*, *C.clementina*, *Origanum onites*, *Origanum vulgare*, *Olea europaea*, *Artemisia scoparia*, *Nigella sativa*, *Juniperus excelsa*, *Vernonia brasiliana*, *Gossypium hirsutum* y *Carthamus tinctorius*. Los resultados de esta revisión concluyen que, en general, los aceites esenciales extraídos a partir de especies vegetales presentan una eficacia similar a los fármacos actuales con una menor toxicidad. Así pues, según los datos observados, estos productos podrían presentarse como una alternativa en desarrollo para la producción de nuevos fármacos frente a *Leishmania*.

Palabras clave: *Leishmania*, tratamiento, aceites esenciales, leishmaniasis.

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria de transmisión vectorial, causada por diferentes especies del género *Leishmania* (1). Son organismos protozoarios pertenecientes al orden Kinetoplastida y la familia Trypanosomatidae (2). La leishmaniasis es una enfermedad que se transmite a través de flebotomos, insectos del orden Diptera, y la familia Psychodidae (3). Es una enfermedad con una distribución mundial (Europa, América, Asia, África y Australia), siendo endémica en más de 90 países (3). La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye a la leishmaniasis en el grupo de Enfermedad Tropical Desatendida (ETD), debido a su impacto en la salud humana y en la economía de los países endémicos, además de la escasa investigación existente en comparación con el elevado número de personas que se encuentran en riesgo de padecer esta enfermedad, entre otros motivos. Se estima que cada año se producen entre 700.000 y 1 millón de casos nuevos (4) y su prevalencia global asciende a la cifra de 12 millones de casos, pues no en todos los países es una enfermedad de declaración obligatoria lo que sugiere una subestimación del número de casos conocidos (5). Se trata de una enfermedad ampliamente distribuida, presente en cuatro continentes (Europa, América, Asia y África), en función de la especie de *Leishmania* causante de la enfermedad, como se observa en la [Figura 1](#), y la segunda causa de muerte por parásitos en el mundo, después de la malaria (4).

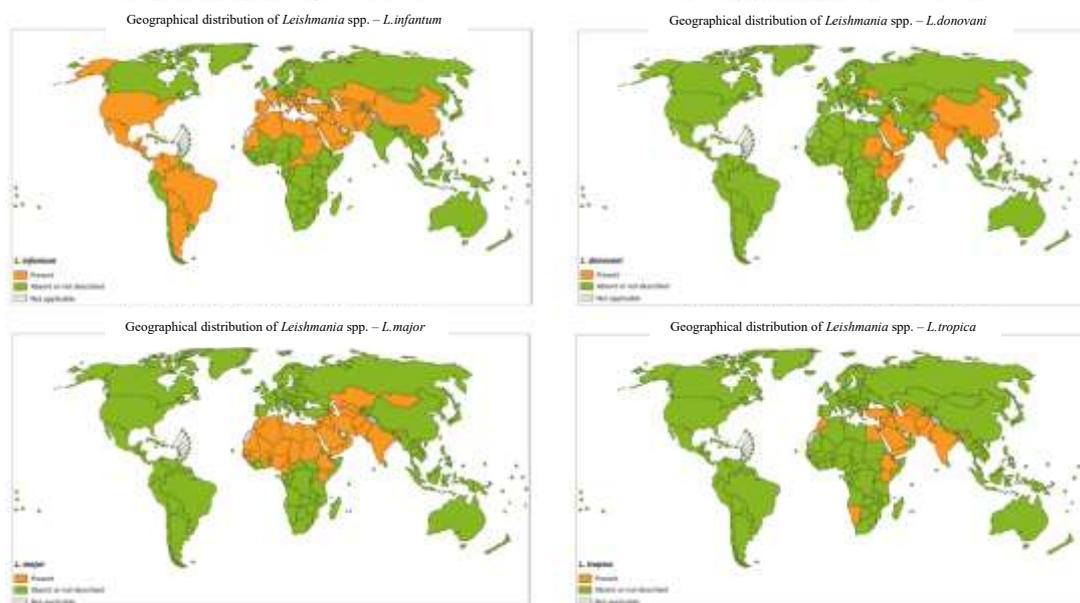


Figura 1. Se representa en naranja la distribución geográfica global de diferentes especies de *Leishmania*: *L.infantum*, *L.donovani*, *L.major* y *L.tropica*, obtenida de la Organización Mundial de la Salud (2019) (6).

La leishmaniasis puede presentarse con diferentes formas clínicas que variarán entre sí, según cuál sea la especie causante de la infección, la distribución geográfica y la respuesta del

hospedador. La mayor parte de las personas y animales infectados por este parásito no presentan síntomas, pero su presencia puede derivar en la aparición de diferentes formas clínicas (3) definidas por la ubicación del parásito en los tejidos que este infecta: leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis mucocutánea (LMC) (7).

La LC es la forma más común, se manifiesta con lesiones cutáneas, pudiendo llegar a ocasionar lesiones ulcerosas, que en ocasiones se acompañan de lesiones satélite y/o linfangitis nodular (5). La LMC ocasiona lesiones destructivas de las mucosas y de las estructuras cartilaginosas y los tejidos conectivos subyacentes (5).

La forma más grave de la enfermedad es la LV, que presenta manifestaciones en bazo, médula ósea, hígado y tejidos linfoides debido a la afectación de células del sistema fagocítico mononuclear de los órganos internos y manifestándose con fiebre y pérdida de peso (2,4,5). La LV presenta una tasa de mortalidad que alcanza el 95% en aquellos casos en los cuales no se recibe tratamiento (2,4,5). La leishmaniasis dérmica post-kala-azar (LDPK) se produce en pacientes curados de LV, que años después desarrollan una afección cutánea severa, especialmente en países como India (8).

En la actualidad se tiene conocimiento de hasta 54 especies de *Leishmania*, no todas capaces de infectar al ser humano (7). De manera general, la LV es causada por *L. donovani*, *L. infantum* (8,9). La LC es causada principalmente por especies como *L. major*, *L. tropica* y *L. infantum*, especies predominantes en las regiones de la Cuenca Mediterránea, además de zonas de África, Oriente Medio e India (9), también *L. aethiopica* y *L. donovani* causan LC (1). Especies como *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. naiffi*, *L. braziliensis* y *L. guayanensis*, causan LC, que prevalecen en América Central y del Sur (9). En el caso de LMC, *L. braziliensis*, *L. aethiopica* y *L. panamensis* son los principales agentes etiológicos (8,9). La LV curada, previamente ocasionada por la infección con *L. infantum* y *L. donovani*, es la responsable de LDPK (9).

Leishmania es un parásito digenético que alterna la forma promastigote flagelada extracelular que se localiza y reproduce por fisión binaria en el intestino medio del vector y una forma amastigote intracelular que se encuentra en el interior del fagolisosoma de los macrófagos de los mamíferos que infecta (10). El ciclo biológico, por tanto, alterna ambas fases, donde el promastigote es la forma infectante para el mamífero que actuará como hospedador definitivo, y el amastigote, presente en sangre, infectará nuevos flebótomos hembra, que son hematófagos.

El ciclo biológico comienza con la picadura de un flebótomo (principalmente de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomya*) (3), el cual a través de la picadura perfora la piel del mamífero hospedador definitivo ingiriendo los macrófagos infectados con amastigotes. Las células infectadas de la sangre pasan al sistema digestivo del flebótomo donde ocurre la digestión, ahí los amastigotes se transforman a promastigotes procíclicos, es decir, a la forma replicativa. Una vez estos promastigotes se localizan en el intestino, el parásito comienza su proceso de replicación a través del mecanismo de fisión binaria y se adhiere a las microvellosidades del intestino. Posteriormente, el parásito se desprenderá de esa región y se desplazará a la región anterior al intestino medio, donde seguirá replicándose hasta desarrollar la forma infecciosa del parásito (forma metacíclica) que se desplazará hacia la probáscide del flebótomo. A continuación, el insecto pica a un mamífero, se liberan las formas metacíclicas en el nuevo hospedador, siendo fagocitadas por macrófagos, allí se transformarán de nuevo a la forma de amastigote, que comenzará su proceso de división a través de fisión binaria hasta alcanzar un elevado número de amastigotes conduciendo así al siguiente ciclo de infección [Figura II](#) (10).

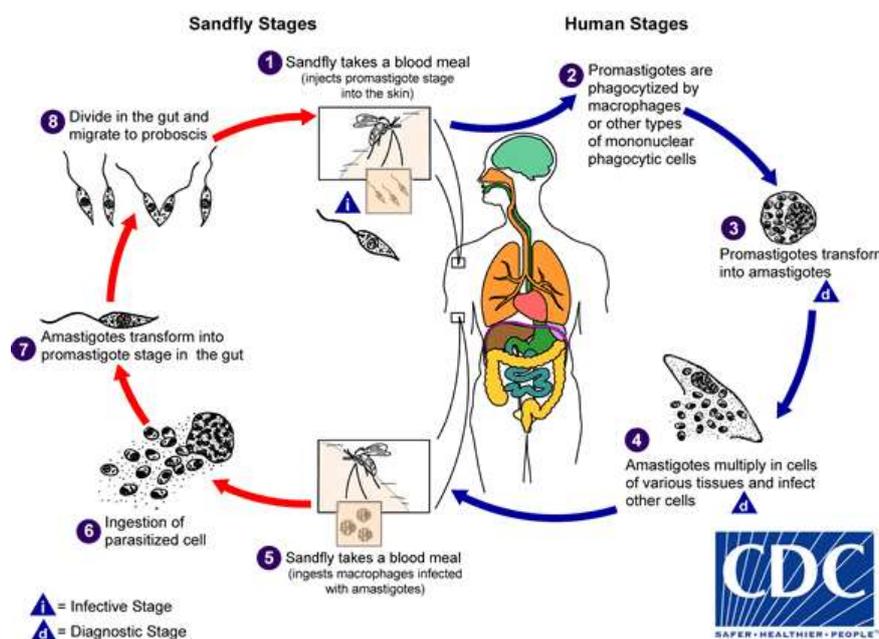


Figura II. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Fuente extraída a través de la base de datos del CDC (2017) (11).

Leishmania spp. presenta un diagnóstico complejo debido a la patología clínica de esta enfermedad que abarca desde formas cutáneas a formas viscerales. También, se han descrito manifestaciones clínicas similares ocasionadas por especies diferentes, como puede ejemplificarse en la LC que puede ser causada por *L.donovani* y por dermatrópicas como *L.major*, y *L.tropica* (7). Además, se debe atender al estado inmunológico del hospedador, a la

similitud de signos clínicos, como la hepatoesplenomegalia, presente en otras enfermedades, y a determinadas afecciones de alta incidencia en regiones endémicas de *Leishmania* que pueden facilitar la presencia de esta enfermedad (7).

El diagnóstico de *Leishmania* está basado en características clínicas, que se respaldan por datos epidemiológicos, además de por pruebas de laboratorio. Existen diversos métodos de diagnóstico que varían según la sensibilidad de los mismos. Además, la selección de la mejor prueba diagnóstica se basa generalmente en la forma clínica, la toma de muestras y en la disponibilidad de recursos. Cualquier prueba de detección debe ser sensible, específica, precisa y eficaz (7). Para los ensayos de identificación de especies, además se debe considerar el poder discriminatorio, la versatilidad, rentabilidad, detección y cuantificación de *Leishmania* spp. (7). Los principales métodos diagnósticos son: diagnóstico parasitológico directo (microscopía, histopatología y cultivo), diagnóstico serológico y pruebas de amplificación de ácidos nucleicos. En ocasiones, se pueden utilizar otras técnicas como las pruebas de diagnóstico dérmico o el xenodiagnóstico (5,7,8).

1.1. TRATAMIENTO

Actualmente no existe un tratamiento universal para el tratamiento de la leishmaniasis. Además, se observan múltiples respuestas a los diferentes tratamientos en función de la especie de *Leishmania* causante de la enfermedad. Es por ello que, un aspecto crucial a la hora de enfrentar la enfermedad, es la identificación de la especie causante de la leishmaniasis que presenta cada paciente en particular. Los tratamientos de la leishmaniasis varían en función del parásito causante, el estado inmunológico del paciente y sobre todo en función de la región y de la disponibilidad de fármacos. Existen diferentes alternativas de tratamientos para abordar la patología (4).

Generalmente se trata esta enfermedad con administraciones intravenosas o intramusculares de antimoniales, siendo estos el tratamiento de primera línea para la leishmaniasis. Los principales antimoniales pentavalentes son el antimonio de meglumina y el estibogluconato de sodio. Ambos presentan una toxicidad y eficacia similar, que se basa en su composición química parecida y en el contenido de antimonio de estos, presentando un 8,1% y 10% de este compuesto respectivamente (8). Los antimoniales presentan numerosos efectos adversos como pueden ser daños cardíacos y afectaciones en órganos como hígado y páncreas, llegando a ocasionar daños potencialmente mortales. Los antimoniales suelen ser más efectivos cuando se emplean como tratamiento de infecciones ocasionadas por especies como *L.major* y *L.donovani*. En ciertas

regiones se emplea el estibogluconato de sodio, administrado por vía intramuscular para la infección por *L.tropica* (4,9).

La anfotericina B liposomal se emplea como tratamiento de la LC y LMC, ocasionadas por especies como *L.tropica* o *L.major*, obteniendo resultados positivos. Sin embargo, la administración de este antiparasitario, ha presentado casos de nefrotoxicidad, además de efectos secundarios como fiebre, escalofríos, hipopotasemia y miocarditis (8). Este tratamiento requiere una cadena de frío constante y una administración llevada a cabo por profesionales sanitarios, además de la necesidad de monitorización continua, lo que en numerosas regiones afectadas resulta un gran impedimento a la hora de abordar la leishmaniasis (4,9).

La miltefosina es un análogo de fosfolípido, que se emplea para el tratamiento oral de la enfermedad. Este tratamiento presenta un perfil de seguridad más favorable en comparación con otros tratamientos. A pesar de ello, la miltefosina ocasiona alteraciones gastrointestinales como anorexia, náuseas, vómitos y fuertes diarreas, efectos que en ocasiones requieren la interrupción del tratamiento (8). Este tratamiento presenta una eficacia variable en lo que a diferentes especies de *Leishmania* se refiere, además de la presencia de resistencias naturales a la miltefosina, que se demuestran a través del estudio del mecanismo molecular de la resistencia, determinándose que ante la infección de especies como *L.infantum* se producía una eliminación de un locus susceptible al fármaco (4,9).

Otros fármacos que se emplean en el tratamiento de la leishmaniasis son los aminoglucósidos como la paromomicina, administrada por vía intramuscular o el isetionato de pentamidina, administrado por vía intramuscular o intravenosa, pero su administración está limitada por los efectos adversos que presentan, pues su uso deriva en casos de hipoglucemia grave, miocarditis y nefrotoxicidad, entre otros (8). Existen derivados azólicos que se emplean como tratamiento de la leishmaniasis, como: ketoconazol, fluconazol e itraconazol, que presentan una eficacia variable en función de cuál sea la especie de *Leishmania* causante de la enfermedad (8).

Actualmente, existen varios estudios centrados en la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento, con el objetivo de superar las resistencias y la toxicidad de los medicamentos, alternativas aún en desarrollo. En relación a las vacunas, no existen vacunas autorizadas para la leishmaniasis humana, a pesar de que se han llevado estudios preclínicos aparentemente prometedores, pero el traslado de estos a humanos continúa sin éxito (4).

Los medicamentos químicos previamente mencionados presentan numerosas limitaciones, entre las cuales se destacan sus efectos adversos, su toxicidad y aparición de resistencias,

además de su alto coste y la necesidad de ciertos recursos que no se encuentran en determinadas regiones endémicas, convirtiendo la búsqueda de nuevas alternativas a estos fármacos en una necesidad (4,8,9). Existe una compleja relación recíproca entre la leishmaniasis y el ciclo de la pobreza, pues más pobreza implica más riesgo de leishmaniasis y la infección deriva en la necesidad de un tratamiento y consecuentemente en gastos sanitarios y pérdida económica tanto del paciente afectado como de los familiares involucrados en hacer frente a los gastos ocasionados por la enfermedad (8). Atendiendo al concepto Una Sola Salud, del inglés *One Health*, se ha determinado la importancia de abordar de manera conjunta la salud humana y animal que a su vez se relacionan con el medio ambiente. Más de la mitad de las enfermedades humanas transmisibles son zoonóticas, de manera que el desarrollo de nuevas terapias accesibles de manera global frente a éstas, implicaría de manera directa un aumento de la salud y sostenibilidad, que contribuye además al equilibrio y mantenimiento del medio ambiente (12,13).

Actualmente un campo de investigación en auge es aquel que se focaliza en la búsqueda de compuestos naturales bioactivos que permitan hacer frente a infecciones ocasionadas por protozoos, ofreciendo, con estas alternativas, tratamientos que contemplan el contexto socioeconómico de la enfermedad. La extracción de aceites esenciales (AE) es un proceso más económico en comparación con la propia síntesis química de estos compuestos, y más respetuoso con el medioambiente, por su biodegradabilidad, su presencia innata en la naturaleza, lo que evita las emisiones requeridas en caso de síntesis química de otros compuestos, y por su baja toxicidad. Proponer alternativas de tratamiento naturales incrementa la sostenibilidad de los tratamientos y combate los efectos perjudiciales de los actuales medicamentos químicos (1–11).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de revisión es recoger información sobre aquellas especies vegetales cuyos aceites esenciales han sido evaluados por su potencial frente a *Leishmania* spp.

Los objetivos específicos son:

1. La identificación de tratamientos a partir de aceites esenciales frente a las diferentes especies de *Leishmania*.
2. Análisis de los tratamientos alternativos de las especies que ocupan la Cuenca Mediterránea: *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major* y *L. tropica*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA Y BASES DE DATOS

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica siguiendo la metodología PRISMA, con el propósito de dar respuesta a los objetivos de la revisión. Para ello, se consultaron tres bases de datos: PubMed, Medline Complete y Web of Science (WoS). Empleando el descriptor MeSHs, se seleccionaron unos términos claves que fueron: “*Leishmania*”, “treatment” y “natural oils”. Se unieron las palabras mediante el uso del operador booleano AND que implica obligación. De esta manera se llevó a cabo la siguiente búsqueda bibliográfica: ((*Leishmania*) AND (*treatment*) AND (*natural oils*)).

Se seleccionaron unos criterios de inclusión y exclusión con el objetivo de acotar la búsqueda, de manera que cada uno de los artículos seleccionados debía ajustarse a esos criterios para ser incluido en la revisión.

3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Artículos originales (estudios/ensayos clínicos).
- Artículos publicados en el periodo de tiempo que abarca entre 2017-2024.
- Artículos que presentaban libre acceso al texto completo.
- Artículos escritos en inglés y castellano.

3.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Revisiones bibliográficas, revisiones sistemáticas y metaanálisis.
- Artículos publicados antes de enero de 2017.
- Artículos escritos en idiomas diferentes al inglés y al castellano.
- Artículos que hagan referencia exclusivamente a especies de *Leishmania* diferentes a las que son objeto del estudio.

En la [Figura III](#) se refleja el esquema de las búsquedas llevadas a cabo y de los resultados obtenidos aplicando los diferentes criterios.

Las publicaciones científicas finalmente seleccionadas, que cumplían con los criterios anteriormente expuestos, fueron manejadas gracias a la herramienta bibliográfica Zotero (Corporation for Digital Scholarship. George Mason University. USA).

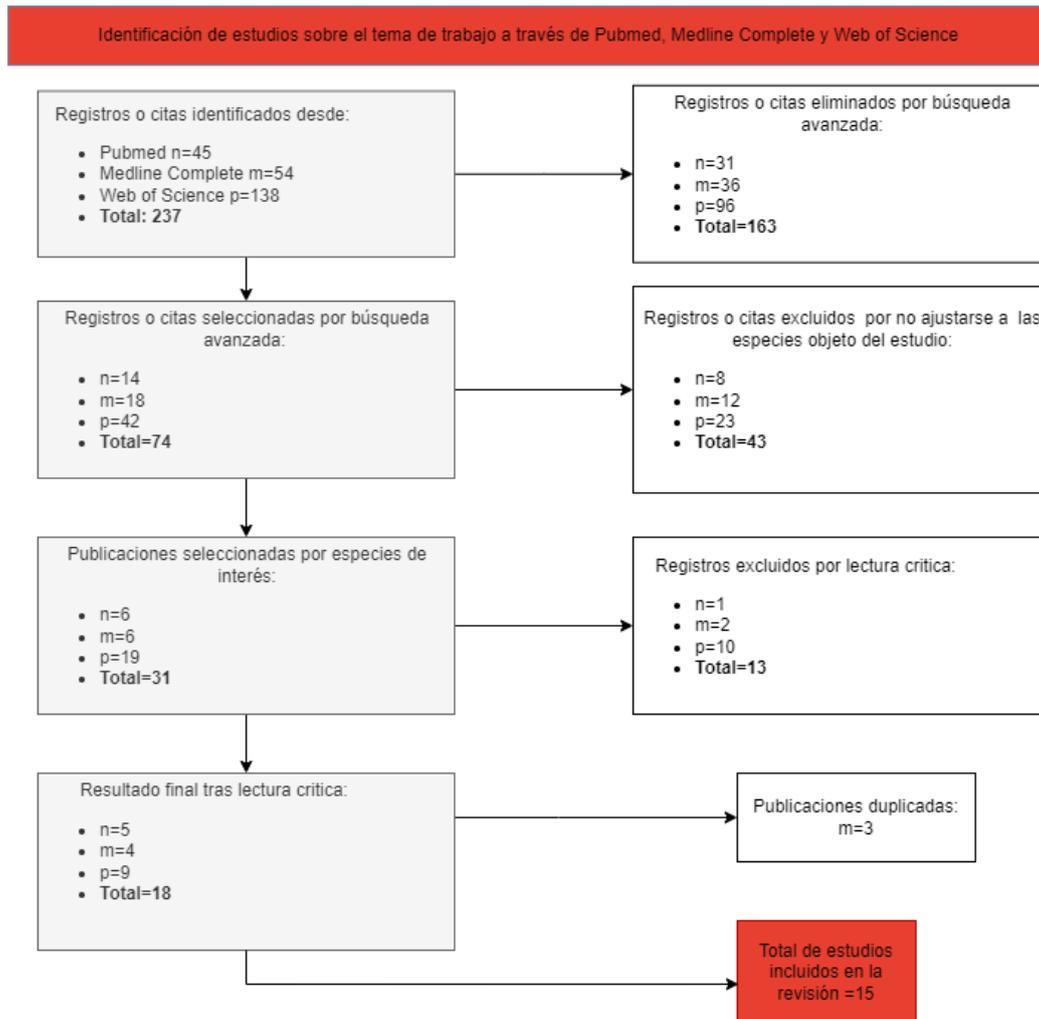


Figura III. Procedimiento de búsqueda realizado a través de las diferentes bases de datos. n: publicaciones procedentes de Pubmed; m: publicaciones procedentes de Medline Complete; p: publicaciones procedentes de Web of Sciences. Figura de elaboración propia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la base de datos de PubMed se recuperaron un total de 45 artículos a través de la búsqueda inicial, de los cuales tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión se obtuvieron 6 artículos. En la base de datos de Medline Complete se recogieron en la búsqueda inicial 54 artículos, de los cuales 6 cumplían criterios de inclusión y exclusión. En la base de datos Web of Science se obtuvieron 138 artículos en la búsqueda inicial, de los cuales 19 cumplieron los criterios de inclusión y exclusión.

El número total de artículos que cumplieron los criterios seleccionados fue de 31, de los cuales 13 se excluyeron tras una lectura en profundidad a partir de la cual se excluyeron aquellos artículos que no presentaban requisitos comparables a los seleccionados para ajustarse a los

objetivos de la revisión, teniendo tras esta un total de 18 artículos de los cuales 3 estaban duplicados, por lo que finalmente se obtuvieron 15 artículos incluidos en la revisión sistemática mediante el uso de la herramienta bibliográfica empleada, Zotero.

Para presentar los resultados de aquellos estudios finalmente incluidos en la presente revisión bibliográfica sistemática, se ha decidido dividirlos en función de la especie vegetal de la cual se extrae el aceite esencial (AE) y, a su vez, se establece una división en función de la especie de *Leishmania* a la que hacen referencia los estudios.

4.1. *Azadirachta indica*

Azadirachta indica, comúnmente conocida como Neem, perteneciente a la familia Meliaceae, presenta numerosas actividades biológicas, entre las que se encuentran propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antimicrobiana y anticancerígenas, entre otras (14). Los extractos de hojas, semillas y frutos de esta planta originaria de la India, se han empleado en el pasado en la realización de numerosos preparados farmacológicos, pues este aceite posee diversos componentes que afectan a la actividad biológica (14).

En lo que a actividad antiprotozoaria se refiere, se ha evaluado la actividad del aceite de la semilla de Neem frente a *L.tropica* (14). A partir de un aislado clínico de *L.tropica*, se evaluaron los estadios de promastigote y amastigote empleando para este último células THP-1 (línea celular de leucemia monocítica aguda humana diferenciada a macrófagos), mediante la evaluación de viabilidad celular a través del ensayo con MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolo). Se midió la dosis del compuesto necesaria para inhibir el crecimiento celular del parásito un 50% expresado como IC₅₀ (por sus siglas en inglés *Inhibitory Concentration*). La IC₅₀ alcanzó 211 µg/mL frente a la etapa promastigote. Sin embargo, el aceite de Neem mostró inhibición frente amastigotes intracelulares alcanzando valores de IC₅₀ de 17,6 µg/mL. Evaluando la citotoxicidad frente THP-1, los resultados fueron satisfactorios determinándose una baja toxicidad en macrófagos humanos y una alta selectividad (14).

También, ha sido empleada para la determinación de su actividad frente a *L.donovani*. La evaluación de los extractos de hojas de Neem determinó la presencia de acetato de etilo (EAF). Cesa y colaboradores (14) determinaron que este compuesto por sí mismo ejercía un efecto antileishmania, a través de la evaluación de la viabilidad celular mediante un ensayo MTT (14). Esto fue contrastado por un ensayo de toxicidad que estimó que frente a la etapa promastigote de *L.donovani* el resultado era 4 o 5 veces mayor que el obtenido al analizar el efecto del Neem en *L.tropica* (14).

Esta especie vegetal ha sido empleada también para la determinación de su actividad frente a estadios de promastigote y amastigote de *L.infantum*. Evaluándose la viabilidad celular, al igual que para *L.donovani* y *L.tropica* con un ensayo MTT. La IC₅₀ fue superior a 215 µg/mL frente a la etapa promastigote. El aceite de Neem mostró inhibición frente amastigotes intracelulares alcanzando valores de IC₅₀ de 15,3 µg/mL. Se obtuvieron resultados satisfactorios en relación a ensayos de evaluación de toxicidad, refiriendo una actividad superior contra amastigotes que citotoxicidad frente a células no infectadas (14).

Tabla I. Se representa la actividad antileishmanial determinada *in vitro* frente a estadios promastigotes y amastigotes de *L.tropica* y *L.infantum* y citotoxicidad frente a macrófagos humanos (THP-1). Se emplea la miltefosina como control. Se representan resultados que hacen referencia a la media de la \pm DE de la IC₅₀ calculada en experimentos duplicados. ND: no determinado (14). Tabla de elaboración propia.

	Promastigotes		Amastigotes		THP-1
	IC ₅₀ (µg/mL)		IC ₅₀ (µg/mL)		IC ₅₀ (µg/mL)
	<i>L.infantum</i>	<i>L.tropica</i>	<i>L.infantum</i>	<i>L.tropica</i>	
Aceite de Neem	215±64	211±32	15,3±3,2	17,6±1,2	710,5±31
Miltefosina	9,9±1,7	15,2±4,6	1,1±0,27	ND	>50

Como se visualiza en la [Tabla I](#), los valores de IC₅₀ obtenidos para *L. infantum* y *L.tropica* se encontraban en torno a 200 µg/mL frente a la etapa promastigote. Para *L.donovani*, se estimó una IC₅₀ de en torno a 45 µg/mL, resultados que refieren una actividad en torno a 5 veces mayor del aceite extraído de Neem frente a promastigotes de *L.donovani*. En relación a los amastigotes se obtuvieron valores de IC₅₀ de 17,6 µg/mL y 15,3 µg/mL, para *L.tropica* y *L.infantum*, respectivamente, resultados que implican una actividad más potente contra amastigotes que frente a promastigotes. En cuanto a la evaluación de citotoxicidad frente a macrófagos humanos, se observan valores que suponen una ausencia de toxicidad frente a células no infectadas. Además, en relación a la miltefosina se determina que el fármaco ejerce un efecto más potente pero más tóxico. Ambas opciones de tratamiento presentaban un alto índice de selectividad (IS) (14).

Los resultados respaldan que el aceite extraído a partir de la semilla de Neem presenta actividad antileishmanial segura determinada en líneas celulares humanas (THP-1), de manera que se propone este aceite esencial como alternativa de tratamiento en desarrollo frente a *L.tropica*, *L.donovani* y *L.infantum* (14).

4.2. Género *Citrus*

Citrus sinensis, comúnmente conocido como naranjo dulce, perteneciente a la familia Rutaceae (1), hace referencia a una especie a partir de cuyas cáscaras se puede extraer su aceite esencial

(15). Las plantas de cítricos destacan por la presencia de aceites volátiles que están compuestos por determinadas sustancias capaces de hacer frente a numerosos organismos y patógenos (1). Los aceites esenciales de la cáscara de los cítricos presentan numerosos beneficios para la salud, capaces de reducir la hipercolesterolemia, actuar como antihipertensivos y como diuréticos (15).

Mediante la extracción del AE de la cáscara de *C.sinensis* a través del procedimiento Soxhlet, se evaluó, entre otras, su actividad antiparasitaria frente a promastigotes de *L.tropica*. En el estudio llevado a cabo por Anwar y colegas (15) se determinó que la temperatura se relacionaba de manera directa con el rendimiento del aceite. Además, se demostró que el componente principal de las cáscaras de las especies de cítricos es el D-limoneno, compuesto que se cree que es el responsable de las propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiparasitarias (15).

Atendiendo a su potencial antileishmanial, tras la evaluación de los promastigotes expuestos al aceite en diferentes intervalos de tiempo (12, 24, 48 y 72 horas), se determinó un aumento del potencial antileishmanial a medida que aumentaba la concentración, alcanzando el valor máximo de inhibición (60%) a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ transcurridas 48 horas de incubación, tras ese periodo de tiempo la actividad disminuyó (Figura IV) (15).

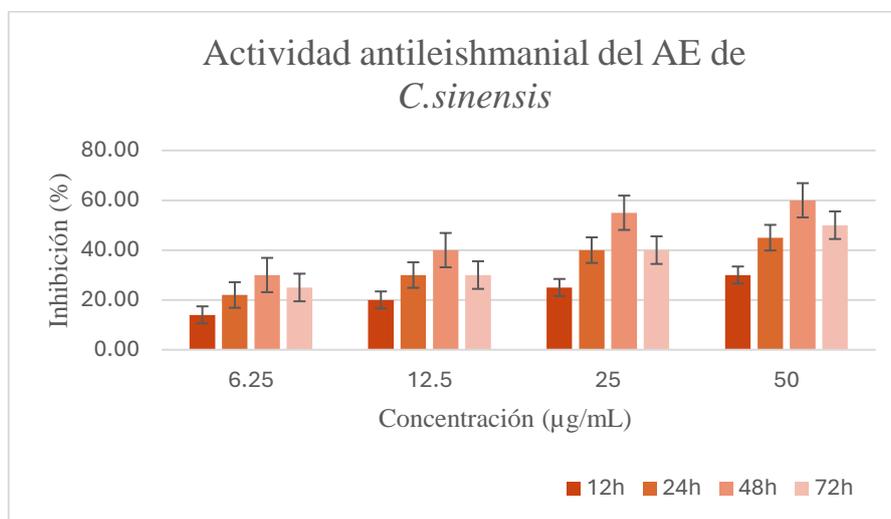


Figura IV. Se representa a través de un gráfico de barras la actividad antileishmanial del aceite extraído de la cáscara de *C.sinensis*. Se representa el porcentaje de inhibición frente a la concentración del aceite ($\mu\text{g/mL}$). Las diferentes tonalidades de color hacen referencia a las horas de incubación a las que han sido sometidas las diferentes muestras de promastigotes de *L.tropica* (15). Figura de elaboración propia.

El aceite de cítricos es capaz de producir especies reactivas de oxígeno (ROS), que intervienen en la señalización celular y en las principales vías de apoptosis. El exceso de ROS provoca daños en proteínas, ácidos nucleicos, daños mitocondriales y además estas afectan a las

propiedades físicas de las membranas celulares (16), provocando su ruptura y la consecuente liberación de componentes intracelulares, lo que explicaría la sensibilidad de *Leishmania* a ROS. A la vista de los resultados, el aceite de los cítricos resulta un agente efectivo frente al tratamiento de la leishmaniasis (15).

También, se estudiado la actividad antileishmanial de los aceites esenciales de hojas de cítricos (*C.sinensis*, *C.limon* y *C.clementina*) frente a *L.infantum* y *L.major* (1). Bouabdallh y colaboradores llevaron a cabo la extracción de los compuestos de los aceites esenciales de las especies vegetales previamente nombradas, mediante extracción por microondas sin disolventes (EMSD) y el aislamiento del aceite de limón por hidrodestilación (HD) (1). Se identificaron los componentes de los AE mediante GC-MS (por sus siglas en inglés *gas chromatography mass spectrometry*), procedimiento ampliamente utilizado en los estudios incluidos en la revisión para la identificación de los componentes de los aceites esenciales. El aceite hidrodestilado de *C.limon* contenía geranial (30,08%), limoneno (27,09%) y neral (22,87%), representando un 96,67% de los picos identificados. Los picos referentes al *C.limon* (EMSD) que hacían referencia al 93,6% del total de componentes detectados hacían referencia a linalool (44,21%), sabineno (14,22%) y ocimeno (6,09%). El 89,82% del aceite obtenido de *C.sinensis* contenía neral (27,52%), linalol (25,83%) y geranial (23,44%). Por último tras la identificación de 26 componentes en el aceite de las hojas de *C.clementina*, suponiendo estos un 65,54% del total de elementos detectados, se destacan geranial (42,40%), neral (26,79%) y el limoneno (14,48%) (1).

Una vez identificados los componentes principales de los AE de las especies de cítricos, se probó cada uno de ellos con el fin de establecer una actividad antileishmania contra promastigotes de *L.major* y *L.infantum* (Tabla II).

Tabla II. Se representan los resultados de actividad antileishmania y citotóxica de los diferentes aceites esenciales del género *Citrus* frente a promastigotes de *L.major* y *L.infantum*. IS: Índice de selectividad. Los datos se presentan en unidades de $\mu\text{g/mL}$ y como media SD ($n = 4$) (1). Tabla de elaboración propia.

	IC ₅₀ ±DE($\mu\text{g/mL}$)		IC ₈₀ ±DE($\mu\text{g/mL}$)	IS	
	<i>L.major</i>	<i>L.infantum</i>	Macrófagos	<i>L.major</i>	<i>L.infantum</i>
<i>C.limon</i>, EMSD	1,13±0,30	0,57±0,09	0,30±0,39	0,26	0,78
<i>C.clementina</i>	1,03±0,27	0,32±0,18	0,18±0,11	0,17	0,56
<i>C.sinensis</i>	5,25±0,56	9,48±0,25	0,16±0,09	0,03	0,016
<i>C.limon</i>, HD	0,90±0,29	0,52±0,15	3,32±0,24	3,68	6,38
Anfotericina B	0,80±0,18	0,23±0,13	9,23±0,13	41,95	11,53

A la vista de los resultados se determinó una mayor sensibilidad de los promastigotes pertenecientes a *L.infantum* que a los de *L.major* para todas las especies de cítricos analizadas, exceptuando *C.sinensis* determinándose baja potencia tanto para promastigotes de *L.infantum* como para *L.major*, mostrando un resultado superior, en lo que a potencia se refiere, para la segunda (1). Además, los resultados refieren una actividad antileishmania similar de los AE y el fármaco control (anfotericina B) (1). La mayor actividad fue atribuida al aceite hidrodestilado de *C.limon* HD, seguido de *C.clementina* y *C.limon* EMSD para *L.major*. Para *L.infantum* el mayor efecto fue el del AE extraído de *C.clementina*, seguido por *C.limon* HD y EMSD (1).

También, se determinó la toxicidad mediante el ensayo MTT, de los AE, analizando su posible efecto citotóxico contra células de macrófagos murinos (RAW 264.7). Se obtuvieron resultados de toxicidad a una concentración IC₈₀ frente a estas células murinas. Se obtuvo un valor superior de toxicidad en *C. limon*, HD ($3,32 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$) y un valor menor de toxicidad para *C. sinensis* ($0,16 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$), comparándose con los resultados para el fármaco control ($9,23 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$). El aceite hidrodestilado de *C.limon* además de resultar el más potente frente a *L.major*, mostró una toxicidad moderada frente a los macrófagos murinos, con un mejor índice de selectividad, en ambas especies de *Leishmania* (IS: 3,68;6,38 respectivamente) (1).

En los estudios analizados en este trabajo, los componentes con mayor actividad fueron el linalol, limoneno, neral y geranial, de manera que sus AE presentan actividad frente a *Leishmania* en distintas fases de su ciclo, destacando el aceite hidrodestilado de *C.limon* y el de *C.clementina* (1).

4.3. Género *Origanum*

La especie *Origanum onites*, familia Lamiaceae (17), es una especie mediterránea conocida bajo el nombre común orégano, ha sido empleado en medicina popular, además de su uso comúnmente reconocido como saborizante de alimentos. Las preparaciones de orégano vía oral, se emplean también como antiespasmódicos, analgésico, expectorante, antitusivo, entre otros. Por vía tópica destaca su efecto antiséptico y astringente (17). A partir de especies del género *Origanum*, se ha evaluado la eficacia de los monoterpenos fenólicos que se extraen a partir de los aceites esenciales de estas plantas (18).

Tasdemir y compañeros (17) llevaron a cabo la obtención del AE, por hidrodestilación de regiones aéreas de *O.onites*, para probar la actividad *in vitro* contra los amastigotes de *L.donovani*, obteniéndose unos resultados de IC₅₀ de $17,8 \mu\text{g/mL}$ (17). La planta presenta unos niveles altos de AE destacando en su composición el carvacrol (70,6%), además de timol que

aunque se presenta en menor cantidad (1,8%), demostró una actividad antiparasitaria igual al carvacrol (17). Tanto carvacrol como timol demostraron una baja toxicidad frente a células de mamíferos y elevados índices de selectividad (17). También, se evaluó la actividad de la timoquinona, compuesto derivado del timol, presente este en la composición del AE, los resultados mostraron una actividad hasta 10 veces más potente de la timoquinona frente a *L.donovani* (IC₅₀ 1,7 µg/mL) (17).

Además, otras especies del género *Origanum*, se han estudiado frente a diferentes especies de *Leishmania*: *O.virens* contra promastigotes de *L.infantum* (IC₅₀ 196 µg/mL, ensayo MTT, 24 horas); *O.compactum* frente *L.tropica*, *L.major* y *L.infantum*, demostrando una potencia superior frente a *L.infantum* (IC₅₀ 0,02 µg/mL, MTT, 72 horas) (17).

Se ha estudiado la presencia de eficacia del timol, carvacrol y linalol, *in vitro* e *in vivo* frente a promastigotes y amastigotes de *L.infantum* (18).

Youssefi y colaboradores llevaron a cabo un ensayo MTT con promastigotes evaluándose a diferentes concentraciones (1,3, 2,5, 5 y 10 µg/mL) de los monoterpenos, la inhibición del crecimiento de *L.infantum*. Como control positivo se empleó la glucantina (antimoniato de meglumina). Transcurridas 24 horas se determinó que el timol y carvacrol a concentraciones de 10 y 5 µg/mL presentaban una inhibición significativa en comparación con el control negativo. Pero el efecto inhibitorio de ambos monoterpenos no fue superior que el del fármaco (18). La exposición a diferentes concentraciones de linalol no afectaron de manera significativa al crecimiento. Se obtuvieron unos valores de IC₅₀ para carvacrol y timol de 7,2 µg/mL y 9,8 µg/mL, respectivamente. Esto determina un efecto prometedor de inhibición de ambos monoterpenos capaces de causar daños estructurales y funcionales frente a promastigotes de *L.infantum* (18).

Además, se evaluó *in vivo* la actividad de timol y carvacrol en hámsters infectados por *L.infantum* con LV (18). El estudio determinó la presencia de actividad antileishmania del timol en modelos *in vivo*, pues la exposición a este derivó en una reducción del número de amastigotes hepáticos en comparación con el grupo control. Sin embargo, en relación a los amastigotes localizados en el bazo el timol no reflejó en este estudio un efecto más potente que el carvacrol.

La presencia parasitaria desencadena un proceso inflamatorio en el hígado, órgano que se ve afectado por los denominados infiltrados celulares inflamatorios. El grupo control y los animales tratados con timol presentaron un mayor número de infiltrados inflamatorios comparado con los otros compuestos. En el bazo se presentó una menor infiltración en los

animales tratados con carvacrol y timol. Se observó un aumento de la irrigación en todos los grupos infectados, siendo esta mayoritaria en aquellos infectados con timol. La hiperplasia de las vías biliares acompañada de células inflamatorias es un síntoma de toxicidad, el grupo control y el tratado con carvacrol mostró hiperplasia grave, sin embargo, en los infectados con timol y glucantina se observó una hiperplasia moderada y leve. Además, el tratamiento con timol reflejaba una leve degeneración vacuolar de los hepatocitos, cambio patológico que sucede en respuesta a lesiones letales. Mientras que en otros se observó necrosis hepática moderada, en el grupo tratado con timol se presentó de manera leve. Este estudio *in vivo* determinó que el timol hace referencia al tratamiento más seguro con menos efectos secundarios en el hígado (18).

4.4. *Olea europaea*

Olea europaea conocido comúnmente como olivo, pertenece a la familia Oleaceae, se localiza en la región mediterránea y se caracteriza por la presencia de compuestos bioactivos que presentan efectos beneficiosos para la salud (16,19). El aceite de oliva virgen extra (AOVE) presenta mayoritariamente en su composición fracciones lipófilas ricas en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI). Además, contiene una fracción polar que hace referencia a la fracción fenólica total (TPF por sus siglas en inglés *total phenolic fraction*) contenida en polifenoles, secoiridoides, ácidos fenólicos, flavonoides, alcoholes fenólicos y lignanos, que se caracterizan por presentar propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias (19). Se han llevado a cabo diversos estudios que tienen como objetivo determinar la actividad antileishmania de la TPF del aceite de oliva (16,19–21).

Gogou y colaboradores (19) llevaron a cabo un análisis comparativo *in vitro* de las propiedades de secoiridoides (oleaceína (OLEA) y oleocantal (OLEO)) y alcoholes fenólicos (hidroxitirosol (HT) y tirosol (T), frente a *Leishmania* (19). Koutsoni y equipo a través de la determinación cualitativa y cuantitativa de TPF determinaron la presencia de HT y T y destacaron la mayoritaria composición de secoiridoides OLEA y OLEO (20). Otros estudios anteriores demostraron la actividad protectora frente a enfermedades cardiovasculares del OLEA y el potente efecto antiinflamatorio del OLEO, además de la actividad de ambos sumado a la de HT y T como potenciales agentes inhibidores del crecimiento de los diferentes estadios de *Leishmania* (19,20).

Karampetsou y colegas (16) evaluaron la viabilidad de promastigotes de *L.infantum* y *L.major* a través de un ensayo de viabilidad con resazurina (16), ensayo ampliamente empleado en los

estudios que recogen la actividad del AOVE frente a *Leishmania* (16,19,20). Este compuesto puede reducirse de manera irreversible a través de enzimas en células viables que producen un producto rojo fluorescente (16), relacionándose proporcionalmente el color de la resazurina con la proliferación celular (20). Se determinó una reducción de la viabilidad dosis dependiente al someter las formas promastigotas de ambas especies a diferentes concentraciones de TPF derivada del AOVE, obteniendo una IC_{50} de 335,4 $\mu\text{g/mL}$ para *L.infantum* y 207 $\mu\text{g/mL}$ para *L.major* (16). Otros autores llevaron a cabo años anteriores el mismo modelo experimental que Karampetsou y colegas determinando también los mismos valores de IC_{50} para promastigotes, además de unos valores de IC_{50} frente al estadio amastigote del parásito de 196,64 $\mu\text{g/mL}$ para *L.major* y 213,78 $\mu\text{g/mL}$ para *L.infantum*, siendo la actividad de TPF ligeramente mayor para *L.major* en la forma amastigota (20). Posteriormente, el mismo grupo continuo esta línea de investigación y llevaron a cabo un segundo estudio en el que buscaban al igual que en los anteriores, describir la actividad intrínseca del OLEO frente a *L.major* (21). Empleando al igual que los anteriores el ensayo basado en resazurina, se obtuvieron valores de IC_{50} de 18,7 y 87 $\mu\text{g/mL}$ para promastigotes y amastigotes, respectivamente (21).

Koutsoni y colaboradores (20) determinaron la citotoxicidad celular de TPF en macrófagos, empleando el ensayo de viabilidad celular de resazurina previamente descrito (20). Se añadió TPF en concentraciones crecientes a un cultivo de macrófagos, empleando miltefosina como control positivo. Tras la incubación, se agregaron 20 $\mu\text{g/mL}$ de resazurina, se determinó la densidad óptica (570nm) y empleando como parámetro para la actividad citotóxica la IC_{50} de TPF y miltefosina (273 $\mu\text{g/mL}$ y 60,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) frente a macrófagos (20). Se determinó una toxicidad aparentemente menor de TPF frente al fármaco (20).

Gogou y equipo (19) evaluaron los efectos biológicos frente a promastigotes de *L.infantum* y *L.major* de la fracción denominada TPF1 que contenía HT y T (7,02 \pm 0,4 y 42,07 \pm 0,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) y la fracción TPF2 compuesta por HT, T, OLEA y OLEO (5,01 \pm 0,2, 12,03 \pm 0,1, 144,12 \pm 5,4, 301,24 \pm 6,5, respectivamente) (19). Se evaluó la viabilidad de ambas especies empleando el reactivo resazurina, determinando al igual que en el caso anterior una reducción de la viabilidad dosis dependiente. La exposición de promastigotes a concentraciones crecientes de TPF1 y TPF2 y tras 72 horas de incubación implicaron una disminución de la viabilidad dosis dependiente en ambos casos, comparándolo con aquellos sin tratar (19).

Los valores de IC_{50} de TPF1 y TPF2 frente a promastigotes de *L.infantum* fueron 1186,48 \pm 45,82 y 322,58 \pm 18,87 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se determinaron valores de IC_{50} frente a

promastigotes de *L.major* de $976,03 \pm 21,56$ $\mu\text{g/mL}$ para TPF1 y $252,58 \pm 30,16$ $\mu\text{g/mL}$ para TPF2, siendo ambas especies más susceptibles a TPF2. También, se evaluó la susceptibilidad de los amastigotes de ambas especies infectando macrófagos con diferentes concentraciones de TPF1 y TPF2. Los valores de IC_{50} fueron $207,02 \pm 6,57$ y $104,98 \pm 10,02$ $\mu\text{g/mL}$ para *L.infantum* y $142,3 \pm 28,24$ y $76,07 \pm 14,5$ $\mu\text{g/mL}$ para *L.major* (19). A través del ensayo de resazurina se determinó una no toxicidad de TPF1 y TPF2, calculando además el índice de selectividad para amastigotes, determinando que ambas fracciones fueron selectivas frente a *Leishmania* (19).

Atendiendo a los resultados de viabilidad, se determina que el TPF de manera general presenta un efectivo poder inhibitorio, demostrando resultados que implican una mayor potencia de este compuesto frente a *L.major* (16,19). Además, se ha determinado que composiciones de TPF que presentaban HT, T, OLEA y OLEO (TPF2) eran más potentes que aquellas que solo presentaban OLEA y OLEO, para ambas especies de *Leishmania* (19). A su vez, existe una mayor susceptibilidad de los amastigotes de ambas especies frente a TPF2 (19). Gogou y equipo determinaron cómo afectaba la combinación de TPF1, TPF2 y miltefosina a las formas promastigotes y amastigotes de *L.infantum* y *L.major* (19). Ambas combinaciones de tratamiento (TPF1-miltefosina y TPF2-miltefosina) mostraron como una asociación aditiva de tratamientos presentaba mejores resultados. Estas combinaciones permitían la reducción de la dosis requerida de miltefosina (19). Los autores que analizaron la actividad *in vitro* del OLEO determinaron que era un compuesto con actividad antileishmania frente a promastigotes y amastigotes de *L.major* (21), resultados que se respaldan a través de otros estudios previamente mencionados que indican que una fracción fenólica que presente OLEO presenta potentes efectos inhibitorios contra ambas formas de *L.major* (16). En este último se demostró una mayor resistencia de los promastigotes frente a amastigotes, sin embargo en el resto de la bibliografía recogida se determinó una mayor resistencia de amastigotes frente al OLEO (16,19,20). Esta diferencia de resultados se debe a las diferentes condiciones de cultivo, que pueden afectar a la biodisponibilidad del fármaco y con ello a los valores de IC_{50} (21).

Se evaluó para ambos estudios la cinética de crecimiento de promastigotes de *L.infantum* y *L.major* *in vitro* a diferentes concentraciones. Unos autores llevaron a cabo esta evaluación a través del conteo diferencial de promastigotes vivos y muertos de manera diaria valiéndose de un hemocitómetro, durante un período de 72 horas empleando el colorante de exclusión azul tripán (19). A partir de una concentración inicial de 20×10^6 parásitos/mL, para ambas especies, los parásitos sin tratar presentaron un crecimiento exponencial, mientras que los tratados con

TPF1, TPF2 y miltefosina mostraron una reducción significativa en las primeras 24 horas (19). Se produjo una mayor disminución del crecimiento del cultivo en aquellos tratados con TPF2 que frente a una concentración de IC₅₀ mostraron una reducción de 75% y 62,7%. Ante el tratamiento con TPF1 a una concentración de IC₅₀ la reducción fue de 88,1 % y del 88,6 %. Los parásitos tratados con el fármaco mostraron una disminución relativa de 51,7% y 25,4% (19). Otros autores evaluaron el efecto replicativo del parásito de forma similar cultivando promastigotes durante un periodo de 72 horas, tiñendo con azul tripán y recontando en una cámara de hemocitómetro (16). Aquellos parásitos sin tratar presentaban un patrón de crecimiento exponencial, mientras que aquellos sometidos a TPF presentaron una reducción significativa en la proliferación. Además, TPF mostró una potencia mayor frente a ambas especies en comparación con los resultados de inhibición de la miltefosina (16), resultado que respaldado por ambos estudios, determina una mayor afectación sobre la cinética de crecimiento de *Leishmania* del compuesto bioactivo en comparación con el fármaco (16,19).

La bibliografía recogida que hace referencia al potencial de AOVE como compuesto con actividad antileishmanial ha determinado en todas las ocasiones documentadas la generación de ROS al exponer ambas formas del parásito frente al TPF (16,19,20). Todos ellos emplean la sonda fluorescente carboxil-H₂ DCFDA y un posterior análisis por citometría de flujo (20).

Koutsoni y colaboradores determinaron que tratar macrófagos infectados con parásitos de *L.infantum* y *L.major* con TPF generaba una producción de ROS (20). Aumentando la concentración de TPF se producía un aumento proporcional en la generación intracelular de ROS, observando producciones significativas a concentraciones de 80 µg/mL. Los macrófagos infectados con *L.major* mostraron hasta 6 veces mayor producción de ROS que el control negativo, y se determinaron resultados ligeramente mayores en cuanto a generación de ROS respecto al grupo tratado con miltefosina, resultado muy similar al obtenido al analizar la generación de ROS de la misma manera en macrófagos infectados con *L.infantum* (20). Además, de la determinación de la relación directa entre la concentración y la producción de ROS, Karampetsou y colegas determinaron que TPF desencadenaba en promastigotes de *L.infantum* y *L.major*, un aumento en la producción de ROS dependiente de dosis y tiempo (16). A las 25 horas, la producción de ROS frente a los parásitos no tratados era de en torno a 8 veces más, a las 48 horas se alcanzaron concentraciones de ROS de hasta 15 veces y alcanzando concentraciones de hasta 30 veces superiores en comparación con el control negativo a las 72 horas (16).

Gogou y equipo analizaron la generación de ROS en promastigotes de *L.infantum* y *L.major* frente a TPF1, TPF2, un control negativo y un control positivo (miltefosina). Para ambas especies de *Leishmania* el tratamiento con TPF1 y TPF2 generó ROS en aquellos promastigotes sometidos a la concentración de IC₅₀, obteniéndose un aumento notable en la producción de estas ROS alcanzando valores medios de 95,35% para *L.infantum* y 96,85% para *L.major*, presentando el control negativo una producción de 18,1%. Además, se observó que la producción de ROS ante el tratamiento con el fármaco fue menor que con TPF1 y TPF2. Determinándose que TPF2 fue más efectivo contra *L.infantum* y *L.major* en lo que a producción de ROS se refiere (19).

Cabe destacar que también se han llevado a cabo modelos experimentales con ratones BALB/c infectados con promastigotes de *L.major* (16,21). Los ratones fueron infectados por vía subcutánea y resultados de este estudio *in vivo* reflejaron como la administración de 20mg/kg de peso corporal de TPF supuso una reducción de la inflamación de la zona de inoculación del parásito en comparación con aquellos ratones infectados que no recibieron tratamiento (16). El peso de aquellos ratones que habían recibido tratamiento permaneció estable lo que indica indirectamente una no toxicidad del TPF (16). Además, los resultados revelaron que el tratamiento con TPF inducía una reducción de hasta el 84% de la carga parasitaria localizada en los ganglios linfáticos poplíteos en comparación con aquellos ratones infectados sin tratamiento. En relación a la miltefosina se obtuvieron resultados de reducción del 60% de la carga parasitaria en comparación con modelos no tratados (16). Resultados en modelos experimentales *in vivo* que determinan la presencia de efecto terapéutico de TPF, siendo este superior al efecto relativo del fármaco analizado (16).

Autores a los que se hace referencia en este apartado, evaluaron la actividad antileishmania *in vivo* (21). Se infectaron al igual que en estudios anteriores ratones BALB/c con promastigotes de *L.major* en fase estacionaria (21). Se administraron 5 mg/kg de OLEO por vía subcutánea en las almohadillas de los ratones. Previo a la administración se llevó a cabo un análisis de la toxicidad del compuesto, evaluando comportamientos y manifestaciones de los animales frente a la exposición progresiva del OLEO, determinándose una no toxicidad aparente del mismo (21). La LC manifiesta una hinchazón en las almohadillas de los ratones, con la administración del OLEO de la manera previamente descrita se visualizó como aparecía una reducción significativa de la hinchazón y del grosor de las almohadillas, reduciendo esta manifestación un 45% en comparación con un grupo control que no recibió tratamiento. Se destaca que en

relación a los resultados obtenidos frente al fármaco de referencia ambos compuestos mostraron la misma reducción en las lesiones (21).

En relación a la disminución de la carga parasitaria evaluada a través del drenaje de los ganglios linfáticos de los ratones, el tratamiento con OLEO provocó una disminución en la carga parasitaria mayor que la que presentaban los modelos no tratados, pero menos eficiente que la reducción parasitaria que presentaban aquellos en tratamiento con miltefosina (21).

De manera general se establece que el OLEO presenta una efectiva actividad antileishmania *in vitro* e *in vivo* frente a los parásitos de *L.major* (21). Los resultados de este último estudio se respaldan con otros que determinan que componentes de la fracción fenólica total del AOVE presentan una vía de investigación prometedora (16,19,20), sugiriendo el uso de compuestos novedosos como el OLEO en futuras estrategias inmunoterapéuticas para hacer frente a la leishmaniasis.

Las fracciones fenólicas totales compuestas por HT, T, OLEA y OLEO, presentan potentes efectos inhibitorios frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp. a través del mecanismo de inducción de una muerte celular parecida a la apoptosis. Al igual que ocurre con otros aceites, la composición de estos puede verse afectada por múltiples factores. En los estudios descritos, se determinó que la TPF de AOVE presentó fuertes efectos inhibitorios contra promastigotes y amastigotes de *L.infantum* y *L.major*, especies causantes de LV y LC en la Cuenca Mediterránea. Se determinó que TPF2 era más potente frente a ambas especies, potencia determinada por su diferente composición. También, se demostró eficacia de tratamiento en ratones BALB/c infectados con *L.major* mostrando una reducción de la inflamación de la almohadilla plantar, zona de inoculación del parásito. Además, los fármacos antileishmania existentes presentan inconvenientes como la toxicidad y la resistencia de los parásitos, efectos que podrían reducirse mediante la estrategia de la terapia combinada (19). En general se establece que TPF de AOVE presenta una actividad antileishmania potente, existiendo estudios que respaldan y contribuyen al potencial uso de extractos naturales del olivo, proponiendo estos como candidatos al tratamiento de la leishmaniasis (16,19–21).

4.5. Otras especies vegetales

Se ha evaluado la efectividad de otros AE extraídos de especies vegetales frente a distintas especies de *Leishmania*, a diferencia de los casos anteriores, las especies vegetales incluidas en estos apartados generalmente han sido estudiadas, en menor profundidad que las anteriores, de

manera que aún no se tienen resultados concluyentes que permitan hacer estudios comparativos en lo que a los siguientes AE se refiere.

4.5.1. *Artemisia scoparia*

Yousaf y colaboradores (22) llevaron a cabo un estudio de la actividad antiprotozoaria de los AE extraídos de *Artemisia scoparia*, de la familia Asteraceae, a través de cultivos de callos *in vitro*, que resultan ser el método de cultivo más empleado cuando se tiene como objetivo la producción controlada de biomasa destinada a la extracción de productos naturales medicinales (22). Se llevó a cabo un ensayo MTT con el objetivo de determinar el potencial antileishmania frente a promastigotes de *L.tropica*. Los resultados indicaban que la actividad metabólica de los parásitos se veía afectada, indicando que las líneas celulares de los callos presentaban metabolitos secundarios que detenían la actividad de los promastigotes (22). La mayor actividad antileishmania mostró un valor de IC₅₀ de 19,13 µg/mL *in vitro* en presencia de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), en concreto para la obtención de este resultado se combinó la presencia de 6-bencilaminopurina (BA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), a una concentración de 1,5 mg/L de cada uno ellos. Además, a través de un ensayo de apoptosis se demostró que la exposición de *Leishmania* al extracto de callo en presencia de BA más 2,4-D, daba lugar a la visualización de células apoptóticas en etapas tempranas y tardías. También, se sometieron muestras de plantas empleadas previamente para el ensayo MTT a un análisis por GC-MS mostrándose un aumento de metabolitos totales en la muestra que presentaba la combinación de RCV previamente descrita, destacando el nerodilol y concluyendo que este presenta una efectiva actividad antileishmania pues ocasiona alteraciones morfológicas en el parásito (22).

4.5.2. *Nigella sativa*

La timoquinona es el principal componente bioactivo que se extrae a través del aceite de *N.sativa*, especie perteneciente a la familia Ranunculaceae. Este compuesto ha sido evaluado en profundidad por un grupo de autores, como agente inhibidor del crecimiento *in vitro* e *in vivo* de promastigotes y amastigotes de *L.donovani* (23). La evaluación del efecto antileishmania de este compuesto frente a los promastigotes se llevó a cabo mediante un estudio de degradación de MTT. Se observó cómo un incremento en la dosis de timoquinona significó una reducción en la proliferación de promastigotes, que tras 72 horas de incubación la totalidad parecía haber muerto. Como control positivo se empleó pentamidina, fármaco que mostró una tendencia similar al compuesto objeto de estudio. La IC₅₀ y IC₉₀ de la timoquinona se

alcanzaron en $6,33 \pm 1,21$ y $20,71 \pm 2,15$ μM , respectivamente. Sin embargo, para la pentamidina los valores de IC_{50} y IC_{90} fueron $1,67 \pm 0,4$ y $6,11 \pm 1,24$ μM , respectivamente. Se determinó, que tras un tratamiento a una concentración IC_{90} ($20,71 \pm 2,15$ μM) de timoquinona la proliferación se veía mermada en función del tiempo de exposición al compuesto, de manera que transcurridas 12 horas el número de parásitos se había reducido a la mitad y transcurridas las 24 horas casi la totalidad de los parásitos habían muerto. El efecto antileishmania se confirma, pues se llevó a cabo una comprobación de este efecto incubando los promastigotes tratados y no tratados. Aquellos previamente tratados con timoquinona y el fármaco control, una vez transcurridas 72 horas de incubación presentaban una mortalidad absoluta, sin embargo aquellos promastigotes que no habían sido sometidos a tratamiento restablecieron su fase de crecimiento (23).

En lo relativo a los amastigotes de *L.donovani* la actividad antileishmania de la timoquinona fue evaluada través de la tinción de Giemsa valiéndose de un microscopio óptico de luz clara. El tratamiento a una concentración de IC_{90} determinó una reducción dosis dependiente de la carga de amastigotes intracelulares con IC_{50} e IC_{90} alcanzados a $7,83 \pm 1,65$ y $27,25 \pm 2,20$ μM , respectivamente. A la vista de los resultados de la tinción se concluyó que a una dosis superior a 100 μM , el resultado de amastigotes intracelulares vivos era inexistente. Además, se evaluó la citotoxicidad en la línea celular de macrófagos de mamíferos para evaluar los efectos tóxicos de pentamidina y timoquinona, determinándose que esta última no afectó a la morfología de los macrófagos ni la viabilidad celular hasta que no se alcanzó el valor de 200 μM , a diferencia del fármaco estándar que mostró resultados de toxicidad aparente (23).

Exámenes de microscopía determinan que la exposición de promastigotes de *L.donovania* a timoquinona alteraba la morfología celular de estos, ocasionando una condensación citoplasmática, redondeo de células, acortamiento, pérdida de flagelos y contracción celular, situaciones que ocurrían de igual manera al tratar con pentamidina y se compararon estos resultados con aquellos promastigotes sin tratamiento, señalando de manera general una muerte celular programada ocasionada por la variación de la configuración morfológica de las células (23).

La timoquinona ha demostrado ser eficaz frente a promastigotes y amastigotes de *L.donovani*, sugiriéndose este aceite esencial como un compuesto de partida para el desarrollo de una alternativa al tratamiento de LV. La timoquinona presenta una inhibición del crecimiento dependiendo de dosis en promastigotes y amastigotes de *L.donovani* además de un potente

efecto antiparasitario alcanzándose una IC_{50} a $0,71 \pm 2,15$ y $27,25 \pm 2,20$ μM frente a promastigotes flagelados y amastigotes intracelulares, respectivamente (23). También, se muestran resultados que determinan la no toxicidad de timoquinona hasta 200 μM en células de macrófagos de mamíferos. Además, los estudios demuestran que la administración de *N.sativa* y sus moléculas no presentan una elevada toxicidad en roedores (23). Se concluye que la timoquinona presenta una actividad antileishmania significativa segura para mamíferos, a pesar de su toxicidad a dosis elevadas, validando este compuesto como un nuevo punto de partida para la elaboración de agentes antileishmania contra las manifestaciones viscerales de la enfermedad (23).

4.5.3. *Juniperus excelsa*

A través de los extractos de hojas, frutos y otras fracciones de *Juniperus excelsa*, familia Cupressaceae, se ha evaluado aunque en menor profundidad la actividad antileishmanial que presenta el AE extraído de esta especie vegetal frente a *L.major* (24). Mirzavand y colaboradores, llevaron a cabo una evaluación *in vitro*, a partir de la cual determinó que las fracciones correspondientes a las hojas y aquellas que contenían acetato de etilo presentaban la mayor potencia *in vitro* con resultados de IC_{50} de $0,97 \pm 3,53$ $\mu\text{g/mL}$ y $19,5 \pm 5,30$ $\mu\text{g/mL}$ (24). A través de la evaluación *in vivo* en modelos experimentales de ratones BALB/c se obtuvieron resultados significativos de inhibición frente al grupo control, sin embargo los modelos que habían sido tratados con el fármaco de referencia glucantina no mostraban diferencias significativas respecto al control (24).

4.5.4. *Vernonia brasiliana*

Vernonia brasiliana, perteneciente a la familia Asteraceae ha sido objeto de estudio para la determinación de su actividad frente a *Leishmania* spp. (25). Se ha determinado el potencial antileishmanial de este AE frente a *L.infantum* (25). Se llevó a cabo la extracción del AE de las hojas del vegetal por HD, posteriormente se evaluó su composición química mediante GC-MS, procedimiento común a numerosos estudios previamente descritos (25). Se determinó que el principal componente era el β -cariofileno (21,47%) seguido del germacreno-D (14,75%) (25). A través de un ensayo MTT, se determinó la actividad antileishmanial y la citotoxicidad del compuesto. En primer lugar, se determinó una actividad inhibitoria dosis dependiente del AE, alcanzando un valor de IC_{50} de $39,01 \pm 1,08$ $\mu\text{g/mL}$. Después, evaluando la citotoxicidad se determinó que el aceite resultaba tóxico a una concentración de $63,13 \pm 1,2$ $\mu\text{g/mL}$, de manera que existe una mayor toxicidad del aceite frente a los parásitos que respecto a las células de

mamíferos, siendo la dosis eficaz no tóxica, algo que no ocurre con la exposición al fármaco, pues a pesar de presentar un efecto más potente, resulta tóxico (25).

A través de H₂ DCFDA se determinó la generación de ROS, relacionada con la despolarización del potencial de membrana mitocondrial, que implicó un aumento en la producción de hasta el 66% en promastigotes de *L.infantum*, comparando esta producción con la de los parásitos no tratados (25). Estos autores evaluaron la asociación entre AEVB y miltefosina, otros estudios previos han evaluado la actividad conjunta de AE y fármacos como miltefosina o glucantina, en ocasiones obteniendo resultados de inhibición conjunta positivos, sin embargo, en el presente estudio se muestra que la combinación de AEVB y miltefosina mostraba un efecto antagónico (25).

4.5.5. *Gossypium hirsutum*

Otros autores han evaluado la actividad antileishmanial de diferentes AE extraídos de especies vegetales. Sharifi y colaboradores evaluaron la actividad *in vitro* del extracto crudo de *Gossypium hirsutum*, familia Malvaceae, comparando su actividad con la glucantina, ambos frente a promastigotes y amastigotes de *L.major* (26). Los resultados mostraron que el AE no mostraba efectos citotóxicos significativos, presentando un elevado índice de selectividad y determinándose además efectos antileishmania superiores en relación con el fármaco (26).

4.5.6. *Carthamus tinctorius*

Turgumbayeva y colaboradores evaluaron la actividad del aceite extraído de *Carthamus tinctorius*, familia Asteraceae, frente a promastigotes de *L.donovani*, comparando su actividad *in vitro* con la de la pentamidina y la anfotericina B (27). Determinaron finalmente que el aceite volátil de esta especie vegetal presentaba con un perfil de seguridad elevado, evaluado *in vivo* en modelos experimentales de ratones, y concluyendo con la determinación del posible potencial antileishmanial del compuesto (27).

Atendiendo a los resultados observados en los estudios consultados, se observa que la composición química de los AE varían en función de variaciones cualitativas y cuantitativas de los aceites en relación al estudio descrito y otros datos recogidos, donde variaciones geográficas, genéticas, estacionales o factores intrínsecos de la propia planta como puede ser la etapa de maduración, las condiciones de cultivo, los métodos de extracción o las condiciones climáticas (1). Se observa que el efecto antiparasitario de los AE viene determinado por los efectos combinados de sus componentes mayoritarios y minoritarios (1,15). Los AE presentan potentes efectos inhibitorios frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp. a través

del mecanismo de inducción de una muerte celular parecida a la apoptosis. Además, los fármacos antileishmania existentes presentan inconvenientes como la toxicidad y la resistencia de los parásitos, efectos que podrían reducirse mediante la estrategia de la terapia combinada (16,19–21).

5. CONCLUSIONES

1. La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria de transmisión vectorial, cuyo tratamiento actualmente incluye fármacos con elevada toxicidad y desarrollo de resistencias. Esto hace de la búsqueda de nuevas alternativas a estos fármacos una necesidad, siendo la búsqueda de compuestos naturales bioactivos un campo de investigación en auge.
2. Los resultados respaldan que el aceite extraído a partir de la semilla de Neem presenta actividad antiprotozoaria segura, determinada en líneas celulares humanas (THP-1), presentando una menor toxicidad que la miltefosina, de manera que se propone como alternativa de tratamiento en desarrollo frente a *L.tropica*, *L.donovani* y *L.infantum*.
3. En relación al género *Citrus*, se ha determinado que el AE extraído a partir de *C.sinensis* presenta un elevado potencial inhibitorio frente a *L.tropica*. El aceite hidrodestilado de *C.limon* mostró una mayor efecto antileishmanial, similar al fármaco control, frente a *L.major* y *L.infantum*, determinándose también una toxicidad moderada *C.limon* evaluada en macrófagos murinos.
4. Se ha determinado el potencial antileishmania del timol frente a *L.infantum*, este componente presente en especies vegetales del género *Origanum*, ha resultado ser el compuesto más eficaz y seguro de los presentes en el género. Así mismo, presentó menores efectos secundarios en modelos murinos.
5. Se establece que la TPF del AOVE presenta elevado poder inhibitorio frente a amastigotes de *L.major*. Además, combinaciones de HT, T, OLEO y OLEA han demostrado presentar actividad antiprotozoaria frente a *L.infantum* y *L.major*.
6. Se ha evaluado la actividad de AE de otras especies vegetales en estudios aislados que se centran en una sola especie de *Leishmania* spp. Destacando que la timoquinona principal componente bioactivo *Nigella sativa*, presenta un efecto letal frente a *L.donovani*.
7. Los AE presentan efectos inhibitorios frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp, lo que podría ser una esperanzadora alternativa de tratamiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Bouabdallah S, Cianfaglione K, Azzouz M, Batiha GES, Alkhuriji AF, Al-Megrin WAI, et al. Sustainable Extraction, Chemical Profile, Cytotoxic and Antileishmanial Activities In-Vitro of Some Citrus Species Leaves Essential Oils. *Pharmaceuticals (Basel)*. 19 de septiembre de 2022;15(9):1163.
2. Novo SPC, Leles D, Bianucci R, Araujo A. The process of *Leishmania* infection - disease and new perspectives of paleoparasitology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;58:45.
3. Azami-Conesa I, Gómez-Muñoz MT, Martínez-Díaz RA. A Systematic Review (1990-2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic *Leishmania*. *Microorganisms*. 20 de mayo de 2021;9(5):1101.
4. eBioMedicine. *Leishmania*: an urgent need for new treatments. *EBioMedicine*. enero de 2023;87:104440.
5. de Vries HJC, Schallig HD. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *Am J Clin Dermatol*. noviembre de 2022;23(6):823-40.
6. WHO. Essential maps [Internet]. 2019 [citado 1 de junio de 2024]. Disponible en: <https://leishinfowho-cc55.es/essential-maps/>
7. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*. octubre de 2017;57:1-29.
8. WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases, World Health Organization. Control of the leishmaniases WHO TRS n° 949. 2010 [citado 30 de abril de 2024]; Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-TRS-949>
9. Wu Y, Jiang M, Li S, Waterfield NR, Yang G. Establish an allele-specific real-time PCR for *Leishmania* species identification. *Infect Dis Poverty*. 2 de junio de 2022;11(1):60.
10. Sundar S, Singh B. Understanding *Leishmania* parasites through proteomics and implications for the clinic. *Expert Rev Proteomics*. mayo de 2018;15(5):371-90.
11. CDC. Ciclo de vida de «*Leishmania*» [Internet]. 2017 [citado 20 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
12. ONU. Objetivos y metas de desarrollo sostenible [Internet]. [citado 1 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-development-goals/>
13. OMS. Una sola salud [Internet]. 2023 [citado 1 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/one-health>
14. Cesa S, Sisto F, Zengin G, Scaccabarozzi D, Kokolakis AK, Scaltrito MM, et al. Phytochemical analyses and pharmacological screening of Neem oil. *South African Journal of Botany*. enero de 2019;120:331-7.
15. Anwar T, Qureshi H, Fatima A, Sattar K, Albasher G, Kamal A, et al. *Citrus sinensis* Peel Oil Extraction and Evaluation as an Antibacterial and Antifungal Agent. *Microorganisms*. 26 de junio de 2023;11(7):1662.

16. Karampetsou K, Koutsoni OS, Gogou G, Angelis A, Skaltsounis LA, Dotsika E. Total Phenolic Fraction (TPF) from Extra Virgin Olive Oil: Induction of apoptotic-like cell death in *Leishmania* spp. promastigotes and in vivo potential of therapeutic immunomodulation. *PLoS Negl Trop Dis.* enero de 2021;15(1):e0008968.
17. Tasdemir D, Kaiser M, Demirci B, Demirci F, Baser KHC. Antiprotozoal Activity of Turkish *Origanum onites* Essential Oil and Its Components. *Molecules.* 3 de diciembre de 2019;24(23):4421.
18. Youssefi MR, Moghaddas E, Tabari MA, Moghadamnia AA, Hosseini SM, Farash BRH, et al. In Vitro and In Vivo Effectiveness of Carvacrol, Thymol and Linalool against *Leishmania infantum*. *Molecules.* 30 de mayo de 2019;24(11):2072.
19. Gogou G, Koutsoni OS, Stathopoulos P, Skaltsounis LA, Halabalaki M, Dotsika E. Direct In Vitro Comparison of the Anti-Leishmanial Activity of Different Olive Oil Total Polyphenolic Fractions and Assessment of Their Combined Effects with Miltefosine. *Molecules.* 21 de septiembre de 2022;27(19):6176.
20. Koutsoni OS, Karampetsou K, Kyriazis ID, Stathopoulos P, Aligiannis N, Halabalaki M, et al. Evaluation of total phenolic fraction derived from extra virgin olive oil for its antileishmanial activity. *Phytomedicine.* agosto de 2018;47:143-50.
21. Karampetsou K, Koutsoni OS, Badounas F, Angelis A, Gogou G, Skaltsounis LA, et al. Exploring the Immunotherapeutic Potential of Oleocanthal against Murine Cutaneous Leishmaniasis. *Planta Med.* agosto de 2022;88(9-10):783-93.
22. Yousaf R, Khan MA, Ullah N, Khan I, Hayat O, Shehzad MA, et al. Biosynthesis of anti-leishmanial natural products in callus cultures of *Artemisia scoparia*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology.* 4 de diciembre de 2019;47(1):1122-31.
23. Islamuddin M, Ali A, Afzal O, Ali A, Ali I, Altamimi ASA, et al. Thymoquinone Induced Leishmanicidal Effect via Programmed Cell Death in *Leishmania donovani*. *ACS Omega.* 29 de marzo de 2022;7(12):10718-28.
24. Mirzavand S, Hatam G, Moein M, Zarshenas MM. In vitro and in vivo Assessment of Anti-Leishmanial Efficacy of Leaf, Fruit, and Fractions of *Juniperus excelsa* Against Axenic Amastigotes of *Leishmania major* and Topical Formulation in BALB/c Mice. *Iran Red Crescent Med J [Internet].* 8 de junio de 2019 [citado 25 de mayo de 2024];21(6). Disponible en: <https://archive.ircmj.com/article/21/6/ircmj-21-6-87754.pdf>
25. Mondêgo-Oliveira R, De Sá Sousa JC, Moragas-Tellis CJ, De Souza PVR, Dos Santos Chagas MDS, Behrens MD, et al. *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of *Leishmania infantum* promastigotes. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* enero de 2021;133:111025.
26. Sharifi F, Sharifi I, Keyhani A, Asadi-Khanuki A, Sharififar F, Pournamdari M. Leishmanicidal, cytotoxic and apoptotic effects of *Gossypium hirsutum* bulb extract and its separated fractions on *Leishmania major*. *J Vector Borne Dis.* 2019;56(4):330.
27. Turgumbayeva A, Ustenova G, Datkhayev U, Rahimov K, Abramavicius S, Tunaityte A, et al. Safflower (*Carthamus Tinctorius* L.) a Potential Source of Drugs against Cryptococcal Infections, Malaria and Leishmaniasis. *Phyton.* 2020;89(1):137-46.

7. ANEXOS

ANEXO I. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ETD: Enfermedad Tropical Desatendida.
- LV: Leishmaniasis visceral.
- LC: Leishmaniasis cutánea.
- LDPK: Leishmaniasis dérmica post-kala-azar.
- LMC: Leishmaniasis mucocutánea.
- AE: Aceite esencial.
- THP-1: Línea celular de leucemia monocítica aguda humana diferenciada a macrófagos.
- MTT: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolo.
- IC₅₀: Dosis del compuesto necesaria para inhibir el crecimiento celular un 50% expresado por sus siglas en inglés (*inhibitory concentration*).
- EAF: Acetato de etilo.
- DE: Desviación estándar (término estadístico).
- IS: Índice de selectividad.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno.
- EMSD: Extracción por microondas sin disolventes.
- HD: Hidrodestilación.
- GC-MS: Cromatografía de gases-espectrometría de masas, por sus siglas en inglés (*gas chromatography mass spectrometry*).
- IC₈₀: Dosis del compuesto necesaria para inhibir el crecimiento celular un 80% expresado por sus siglas en inglés (*inhibitory concentration*).
- AOVE: Aceite de oliva virgen extra.
- AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados.
- TPF: Fracción fenólica total por sus siglas en inglés (*total fenolic fraction*).
- OLEA: Oleaceína.
- OLEO: Oleocantal.
- HT: Hidroxitirosol.
- T: Tirosol.
- RCV: Reguladores de crecimiento vegetal.
- BA: 6-bencilaminopurina.
- 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
- IC₉₀: Dosis del compuesto necesaria para inhibir el crecimiento celular un 90% expresado por sus siglas en inglés (*inhibitory concentration*).

ANEXO II. TABLA RESULTADOS

Autores y Año	Especie vegetal	Especie de <i>Leishmania</i>	Método	Conclusión
Cesa S. et al. 2019 (14)	<i>Azadirachta indica</i>	<i>L.tropica</i> <i>L.donovani</i> <i>L.infantum</i>	Cálculo de viabilidad celular y citotoxicidad empleando células THP-1, a través del ensayo MTT.	El aceite de Neem mostró actividad antileishmanial, además de un perfil de seguridad frente a células THP-1.
Bouabdallah S. et al. 2022 (1)	<i>C.sinensis</i> <i>C.limon</i> <i>C.clementina</i>	<i>L.major</i> <i>L.infantum</i>	Extracción de aceites esenciales por HD y EMSD. Análisis CG-MS. Evaluación de actividad antileishmanial, viabilidad celular y efecto citotóxico, mediante ensayo MTT.	Se determinó una potente actividad antileishmanial del aceite de <i>C.limón</i> (HD) en <i>L.major</i> , seguido de <i>C.clementina</i> , resultados a la inversa obtenidos frente a <i>L.infantum</i> .
Anwar T. et al. 2023 (15)	<i>C.sinensis</i>	<i>L.tropica</i>	Extracción Soxhlet. Análisis de composición GC-MS. Evaluación <i>in vitro</i> del potencial antileishmania. Evaluación de producción de ROS (H ₂ DCFDA).	Los productos químicos bioactivos presentes en el aceite de cítricos pueden emplearse en la producción de nuevos fármacos antiparasitarios.
Tasdemir D. et al. 2019 (17)	<i>Origanum onites</i>	<i>L.donovani</i>	Extracción de aceites esenciales por HD. Análisis GC-MS. Análisis del potencial antileishmania a través de ensayo de resazurina.	El aceite de orégano presenta efectos beneficiosos para la salud, además de su uso potencial frente a enfermedades parasitarias. Determinando

				que el timol, puede ser un punto de partida para el uso de nuevos agentes antiparasitarios.
Youssefi M. R. et al. 2019 (18)	<i>Origanum vulgare</i>	<i>L.infantum</i>	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antileishmania de carvacrol, timol y linalol empleando ensayo MTT. Evaluación <i>in vivo</i> en modelos murinos de timol y carvacrol mediante el análisis de resultados histopatológicos.	Se determinó una mayor actividad antileishmania de carvacrol y timol frente a linalol. El timol presenta mayor actividad y seguridad en modelos <i>in vivo</i> .
Karampetsou K. et al. 2021 (16)	<i>Olea europaea</i>	<i>L.infantum</i> <i>L.major</i>	Análisis y cuantificación (HPLC-DAD). Evaluación viabilidad celular con ensayo de resazurina. Análisis cinética de crecimiento. Evaluación producción de ROS (H ₂ DCFDA). Evaluación la actividad antileishmania <i>in vivo</i> con ratones BALB/c.	Se establece la actividad antileishmanial <i>in vitro</i> del TPF derivada del AOVE, contenido en HT, T, OLEA Y OLEO, provocando generación de ROS. Demostrando además eficacia <i>in vivo</i> en modelos murinos.
Gogou G. et al. 2022 (19)	<i>Olea europaea</i>	<i>L.infantum</i> <i>L.major</i>	Análisis y cuantificación (HPLC-DAD) Evaluación viabilidad celular, actividad y citotoxicidad con ensayo de	Se determina la actividad antileishmanial <i>in vitro</i> del TPF derivada del AOVE, contenido en HT, T, OLEA Y OLEO,

			resazurina. Análisis cinética de crecimiento. Evaluación de producción de ROS (H ₂ DCFDA).	provocando generación de ROS.
Koutsoni O. S. et al. 2018 (20)	<i>Olea europaea</i>	<i>L.infantum</i> <i>L.major</i>	Análisis y cuantificación (HPLC-DAD). Evaluación viabilidad celular, actividad y citotoxicidad con ensayo de resazurina. Evaluación producción de ROS (H ₂ DCFDA).	Se establece la actividad antileishmanial <i>in vitro</i> del TPF derivada del AOVE, contenido en HT, T, OLEA Y OLEO, provocando generación de ROS. Demostrando además eficacia <i>in vivo</i> en modelos murinos.
Karampetsou K. et al. 2022 (21)	<i>Olea europaea</i>	<i>L.major</i>	Análisis y cuantificación (HPLC-DAD). Evaluación viabilidad celular con ensayo de resazurina. Evaluación la actividad antileishmania <i>in vivo</i> con ratones BALB/c.	Se determina la actividad antileishmanial <i>in vitro</i> del TPF derivada del AOVE, destacando el efecto del OLEO, entre ellos. Demostrando además eficacia <i>in vivo</i> en modelos murinos.
Yousaf R. et al. 2019 (22)	<i>Artemisia scoparia</i>	<i>L.tropica</i>	Establecimiento cultivos de callos <i>in vitro</i> . Análisis GC-MS. Determinación de actividad antileishmanial, empleando ensayo MTT y apoptosis celular.	<i>Artemisia scoparia</i> es una hierba medicinal importante con actividad antileishmania, establecida en cultivos de callos y mostrando una mayor actividad suplementando los cultivos con RCV.

<p>Islamuddin M. et al. 2022 (23)</p>	<p><i>Nigella sativa</i></p>	<p><i>L. donovani</i></p>	<p>Evaluación del efecto antileishmania de promastigotes con ensayo MTT y de amastigotes con tinción de Giemsa. Examen de microscopía y evaluación de citotoxicidad.</p>	<p>La timoquinona presenta actividad antileishmania significativa segura para mamíferos, a pesar de su toxicidad a dosis elevadas, lo que implica un nuevo punto de partida para la elaboración de agentes antileishmania.</p>
<p>Mirzavand S. et al. 2019 (24)</p>	<p><i>Juniperus excelsa</i></p>	<p><i>L. major</i> <i>L. tropica</i></p>	<p>Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antileishmania. Evaluación la actividad antileishmania <i>in vivo</i> con ratones BALB/c.</p>	<p>Se determinó que las fracciones que contenían acetato de etilo presentaban poder inhibitorio <i>in vitro</i>, obteniéndose además resultados significativos de inhibición <i>in vivo</i>.</p>
<p>Mondêgo O. R. et al. 2021 (25)</p>	<p><i>Vernonia brasiliiana</i></p>	<p><i>L. infantum</i></p>	<p>Extracción de aceite esencial por HD. Análisis CG-MS. Análisis del potencial antileishmania y citotoxicidad a través de ensayo MTT. Evaluación de producción de ROS (H₂ DCFDA). Determinación del efecto asociativo con fármacos.</p>	<p>El aceite esencial de <i>Vernonia brasiliiana</i> presenta actividad antileishmanial siendo más tóxico para los parásitos que para células de mamíferos. Produce un aumento en la producción de ROS. Sugiriendo las moléculas activas de este AE como fuente para nuevos tratamientos.</p>
<p>Sharifi F. et al. 2019</p>	<p><i>Gossypium hirsutum</i></p>	<p><i>L. major</i></p>	<p>Extracción Soxhlet. Obtención por CC y TLC. Análisis</p>	<p>El extracto crudo de <i>Gossypium hirsutum</i> tiene efectos</p>

(26)			de citotoxicidad y viabilidad celular a través de ensayo MTT.	antileishmania significantes y no tóxicos, superiores a los del fármaco.
Turgumbayeva A. et al. 2019 (27)	<i>Carthamus tinctorius</i>	<i>L.donovani</i>	Extracción del aceite esencial por HD. Análisis CG-MS. Evaluación del efecto antileishmania <i>in vivo</i> .	El aceite volátil de <i>Carthamus tinctorius</i> presenta efecto antileishmania con un perfil de toxicidad seguro.

ANEXO III: AGRADECIMIENTOS

A mi novio y mejor amigo, gracias por creer en mí más incluso de lo que yo lo hago, gracias por apoyarme y quererme de la manera incondicional en la que lo haces. Me siento la persona más afortunada del mundo por tenerte a mi lado.

A mi hermana, que es la persona más valiente que conozco, nunca dudes de lo orgullosa que estoy de ti, estoy segura de que vas a conseguir todo aquello que te propongas. Siempre juntas tatita.

A mi madre y a mi padre, gracias por enseñarme, quererme y apoyarme todos los días de mi vida, muchas gracias por todas las lecciones de vida y aprendizajes, sin vosotros jamás hubiese llegado a ser quien soy.

A mi abuela Conchita, espero que allá donde estés, te sientas tan orgullosa de ser mi abuela como me siento yo de ser tu nieta.

A mi tutora que me ha apoyado a lo largo de este proceso, brindándome todo su apoyo y conocimiento, ojalá hubiese tenido la suerte de tenerla como profesora.