

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



MODELOS EXPERIMENTALES DE TUBERCULOSIS



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:

MARIO HUESCA CONTRERAS

1 9 8 2



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

El desarrollo de modelos experimentales de tuberculosis es un aspecto importante desde el punto de vista de la investigación de esta enfermedad, ya que a pesar que ha sido bastante estudiada, existen diferentes aspectos que no son plenamente entendidos y un modelo experimental puede ayudar a comprenderlos. Entre los más importantes aspectos destaca su patogenicidad, es decir, los mecanismos mediante los cuales el bacilo causa las lesiones características de esta enfermedad, aunque se sabe que se basan principalmente en un fenómeno de hipersensibilidad celular, en el cual el organismo causa daño a su propio tejido al tratar de establecer un mecanismo de defensa contra la bacteria, aún quedan otros aspectos básicos sin comprender; por ejemplo, el hecho de que los macrófagos no sólo no pueden destruir a Mycobacterium, sino que le sirven a éste como un medio propicio para su desarrollo y reproducción.

Otro aspecto lo constituye el tratamiento hasta ahora utilizado, que consiste en la administración de dos o tres medicamentos antituberculosos combinados. Aunque actualmente se considera eficaz, existen enfermos cuyos agentes etiológicos son resistentes a todos los antifímicos; en estos pacientes, el empleo de esquemas terapéuticos no origina ninguna mejoría, por lo que resulta imprescindible el desarrollo de nuevos medicamentos antituberculosos. Se sabe además, que la obtención de nuevos medicamentos es difícil y costosa; y lo cual origina que este tipo de investigación quede reservada casi exclusivamente para los países desarrollados. Sin embargo, en algunas naciones como la India, ac-

tualmente se llevan a cabo estudios farmacológicos sobre su propia medicina tradicional, basados en la utilización de productos naturales (16). Por lo que respecta al estudio de las propiedades antifímicas de las plantas a nivel mundial, existen en la literatura informes sobre el estudio farmacológico del extracto de Canscora decussata (Gentianaceas), el cual contiene ciertos derivados de las xantonas y presentó efectos de inhibición sobre M. tuberculosis "in vitro" y baja toxicidad en ratones (16).

Finalmente, el Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A.C. (IMEPLAM) publicó en el año de 1976 una monografía sobre el uso de las plantas medicinales de México, en el cual se citan 37 especies diferentes de plantas con posible actividad antifímica, que no han sido hasta la fecha estudiadas científicamente (5).

Estos son algunos casos que pueden justificar el desarrollo de un modelo experimental; en el primer caso para investigar aspectos de la relación huésped-parásito y, en el segundo, como una herramienta en la búsqueda de nuevos medicamentos antituberculosos.

Objetivo

El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo experimental de tuberculosis, en ratones que presenten una respuesta uniforme a la infección con Mycobacterium tuberculosis, y con predominio pulmonar.

CAPITULO I

GENERALIDADES

a) Antecedentes de la Tuberculosis

La tuberculosis es aparentemente tan antigua como el hombre mismo, sus antecedentes se remontan a eras tan antiguas como la neolítica; se han encontrado indicios de lesiones de tuberculosis en vértebras de hombres que existieron en esa época en Europa, al igual que en momias egipcias que quizás provienen desde el año 3700 A.C. En las épocas helénicas y romana, así como en la India y China antiguas, era común la escrófula (tuberculosis de huesos y articulaciones); se ha calculado que en la mitad del siglo XIX la cuarta parte de la población adulta en Europa murió por tuberculosis pulmonar (7).

El nombre de "tuberculosis" se le atribuye a un médico de Leyden llamado F. de la Boe Sylvius (1762), el cual describió a las lesiones características de esta enfermedad como "tubérculos".

Laennec (1781-1826) inicia la investigación científica de la tuberculosis y es el primero en reconocer la correspondencia entre las lesiones hísticas y la enfermedad. Willeim (1865) y Klecke (1943) lograron la transmisión experimental de tuberculosis a conejos, y finalmente Robert Koch (1882) aisló el bacilo causal de esta enfermedad.

b) Breve Descripción de la Enfermedad

Actualmente sabemos que la tuberculosis es causada por una bacteria del género Mycobacterium, que provoca lesiones inflamatorias con necrosis caseosa y que el organismo al tratar de lograr una defensa contra la agresión bacteriana, produce un granuloma.

Al inicio de la infección se puede observar un proceso inflamatorio exudativo al igual que cuando las defensas orgánicas se encuentran inhibidas, o cuando el bacilo infectante es muy virulento.

El tubérculo consiste en un nódulo de tejido de granulación formado por células epitelioideas a las que se asocian linfocitos y neutrófilos; en medio de éstas, se encuentran generalmente células gigantes llamadas de Lanhans con varios núcleos marginales. Se ha observado que estas lesiones carecen de irrigación sanguínea lo cual provoca una especie de necrosis del centro del tubérculo, semejante en apariencia a la cascina de la leche y del queso (caseificación).

La licuefacción del foco caseoso origina las cavidades; el proceso de curación consiste en el enquistamiento del foco por una capa de tejido conjuntivo, transformándose de esta manera en una masa fibrosa que se observa como una cicatriz, la cual puede guardar bacilos virulentos en su interior.

El género Mycobacterium abarca una variedad de microorganismos desde algunos patógenos, como M. tuberculosis y M. paratuberculosis, hasta especies aparentemente no patógenas como M. phlei, M. smegmatis y M. lacticola. La propiedad común que caracteriza a este género bacteriano, es la estructura de su pared celular constituida por peptidoglicanos, micósidos y ácidos micólicos. Esta estructura con 20-60% de su peso seco constituido por lípidos le confiere características tales como su resistencia a ácidos, álcalis y alcoholes; otra de sus propiedades es su lento crecimiento (4-8 semanas) y su nulo desarrollo en medios de cultivo con--

vencionales. Tres especies son responsables de la tuberculosis en mamíferos y aves, y son: M. tuberculosis, M. bovis y M. avium, aunque existen otras especies denominadas Mycobacteria "Atípicas", como M. intracelularis, M. kansasii y M. scrofulaceum, a las cuales se les atribuye un papel cada vez mas frecuente en el hombre como causante de esta enfermedad.

Aunque la tuberculosis se desarrolla generalmente en los pulmones, la infección se puede propagar a otros órganos. La forma más común de penetración de la bacteria es por medio de gotitas o polvo contaminado, al ser inhalada penetra por las vías respiratorias, se instala en el tejido pulmonar o bien se transporta por vía hemática al resto del organismo. Otra forma de contagio de la tuberculosis puede consistir en la deglución de alimentos contaminados, pudiendo desarrollar en éste caso una tuberculosis intestinal.

Existen diferentes tipos de tuberculosis según su localización, como: la tuberculosis en cavidad bucal, la bronquial, la pulmonar, la del conducto digestivo, la urogenital, la aseoarticular, la de las meninges, etc. (7).

c) Estado Actual de la Tuberculosis en Nuestro País

Debido a que no existen datos epidemiológicos actualizados es difícil conocer el estado actual de la tuberculosis en nuestro país; sin embargo, con los datos disponibles del Programa Nacional de Control de la Tuberculosis, podemos observar que en el año de 1961 hubo una y media veces más muertes por tuberculosis en los países subdesarrollados --

que en los países desarrollados, esta diferencia entre ambos tipos de países aumentó a tres veces más en el año de 1970; ésto significa una mayor tendencia de disminución en ésta enfermedad en los países desarrollados, sin embargo como podemos observar, los datos globales muestran una reducción en la mortalidad por tuberculosis en ambos casos. (Tabla No. 1).

Tabla No. 1

TASAS PROMEDIO DE MORTALIDAD POR TUBERCULOSIS EN
PAISES DESARROLLADOS Y PAISES EN DESARROLLO

| Grupos de países | 1961 | 1970 | Reducción |
|----------------------|------|------|-----------|
| Países desarrollados | 10.7 | 5.6 | 47.7% |
| Países en desarrollo | 24.1 | 14.7 | 39.1% |

Fuente: Programa Nacional de Control de la Tuberculosis, S.S.A. 1977.

México ocupó el tercer lugar en mortalidad entre los países americanos registrados epidemiológicamente. (Tabla No. 2).

Tabla No. 2

MORTALIDAD POR TUBERCULOSIS EN ALGUNOS
PAISES DE AMERICA
1972

| País | Coef.* |
|-----------------|--------|
| Chile | 23.7% |
| Paraguay | 22.5% |
| México | 17.3% |
| Panamá | 16.1% |
| El Salvador | 9.9% |
| Puerto Rico | 9.8% |
| Venezuela | 8.7% |
| Costa Rica | 7.2% |
| Rep. Dominicana | 6.1% |
| Honduras | 6 % |
| Cuba | 4.7% |
| Bahamas | 3.7% |
| Barbados | 2.5% |
| Belice | 2.3% |
| Canadá | 2.1% |

* por 100,000 habitantes

Fuente: Programa Nacional de Control
de la Tuberculosis, S.S.A.,
1977.

En el año de 1974, se consideraba a la tuberculosis como una de las diez causas de mortalidad y la segunda entre las enfermedades infecciosas y parasitarias (Tabla 3 y 4).

Tabla No. 3

PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD EN LA REPUBLICA MEXICANA

1974

| Causas | Defunciones | Coef.* |
|---|-------------|--------|
| Influenza, neumonías y otras infecciones respiratorias agudas | 63,700 | 109.6 |
| Enteritis y otras enfermedades diarreicas | 50,842 | 87.5 |
| Accidentes, envenenamientos y violencias | 49,026 | 84.4 |
| Enfermedades del corazón | 42,449 | 73.0 |
| Problemas perinatales | 22,026 | 37.9 |
| Tumores malignos | 20,912 | 36.0 |
| Enfermedades cerebro-vasculares | 13,635 | 23.5 |
| Cirrosis hepática | 11,244 | 19.3 |
| Tuberculosis | 8,614 | 14.8 |
| Diabetes mellitus | 8,417 | 14.5 |

*Por 100,000 habitantes

Fuente: Estadísticas vitales de los Estados Unidos Mexicanos.
Dirección General de Bioestadística, S.S.A.

Tabla No. 4

PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD POR ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y PARASITARIAS

REPUBLICA MEXICANA

1974

| Causas | Defunciones | Coef.* |
|--|-------------|--------|
| Enteritis y otras enfermedades diarréicas | 50,842 | 87.5 |
| Tuberculosis del aparato respi- ratorio u otras | 8,614 | 14.8 |
| Tosferina | 3,032 | 5.2 |
| Disentería bacilar y amibiasis | 2,617 | 4.5 |
| Fiebre tifoidea y otras salmone- nelosis | 1,024 | 1.8 |
| Parasitosis intestinal sin otra especificación | 798 | 1.4 |
| Hepatitis infecciosa | 492 | 0.8 |

* Por 100,000 habitantes

Fuente: Dirección General de Estadística, SIC

Como puede observarse en las tablas anteriores, en el año de 1974, 8614 personas fallecieron a causa de tuberculosis de diferentes -- localizaciones. Dentro de las enfermedades infecciosas y parasitarias, únicamente fué superada en número de defunciones por enteritis y enferme-
dades diarréicas con 50,842 muertes en ese año. Estos datos pueden dar-
nos una idea de la importancia epidemiológica de la tuberculosis en nues

tro país.

En lo relativo a la distribución de esta enfermedad en la -- República Mexicana, podemos observar en la tabla No. 5, que existe una -- distribución bastante heterogénea desde el punto de vista de la localización en los diferentes estados. De acuerdo a la mortalidad, relacionada al número de habitantes (tasa por 100,000 habitantes), los estados de la República que sobresalen en incidencia de tuberculosis son Veracruz, Coahuila y San Luis Potosí, mientras que Zacatecas, Tlaxcala y Jalisco presentan las 3 tasas menores de mortalidad.

La tuberculosis predomina, sin embargo en la población de más bajos ingresos económicos (23).

Por otra parte, el tipo predominante de tuberculosis, es la pulmonar, aunque en el caso de los niños es muy importante la tuberculosis meningítica. Como podemos observar en la tabla No. 6, en el año de 1974, el 88.9% de las defunciones por tuberculosis correspondieron a la -- del aparato respiratorio, 7.5% a tuberculosis de las meninges y sistema -- nervioso y el 3.6% a tuberculosis de otras localizaciones.

Finalmente durante el año de 1980, solamente en el Instituto Nacional de Enfermedades Pulmonares de la S.S.A. ingresaron 1350 pacientes con diagnóstico de tuberculosis, de los cuales 239 (17.6%) fallecieron a causa de esta enfermedad. Como puede observarse en las tablas 7 y 8 se muestran los diferentes tipos de tuberculosis en pacientes de diferentes edades, su morbilidad y mortalidad.

Tabla No. 5

MORTALIDAD POR TUBERCULOSIS EN LA REPUBLICA MEXICANA

1974

| Entidad | Defunciones | Coef.* |
|-----------------------|-------------|--------|
| Aguascalientes | 35 | 8.6 |
| Baja California Norte | 228 | 20.1 |
| Baja California Sur | 27 | 16.5 |
| Campeche | 40 | 12.3 |
| Coahuila | 331 | 16.0 |
| Colima | 70 | 23.7 |
| Chiapas | 411 | 22.5 |
| Chihuahua | 396 | 20.9 |
| Distrito Federal | 721 | 8.0 |
| Durango | 135 | 12.6 |
| Guanajuato | 203 | 7.6 |
| Guerrero | 196 | 10.4 |
| Hidalgo | 309 | 22.9 |
| Jalisco | 318 | 8.1 |
| México | 546 | 10.0 |
| Michoacán | 288 | 10.8 |
| Morelos | 105 | 13.3 |
| Nayarit | 109 | 16.6 |
| Nuevo León | 385 | 18.0 |
| Oaxaca | 374 | 16.6 |
| Puebla | 417 | 14.4 |
| Querétaro | 111 | 19.1 |
| Quintana Roo | 11 | 9.5 |
| San Luis Potosí | 373 | 25.5 |
| Sinaloa | 240 | 15.2 |
| Sonora | 228 | 17.2 |
| Tabasco | 111 | 11.5 |
| Tamaulipas | 407 | 23.1 |
| Tlaxcala | 33 | 6.9 |
| Veracruz | 1257 | 27.4 |
| Yucatán | 133 | 15.4 |
| Zacatecas | 66 | 6.2 |

* Por 100,000 habitantes

Fuente: Dirección General de Estadística, SIC.

Tabla No. 6

MORTALIDAD POR TUBERCULOSIS POR LOCALIZACION

REPUBLICA MEXICANA

1974

| Localizaciones | Defunciones | % | Coef.* |
|---|-------------|------|--------|
| Tuberculosis del aparato respiratorio | 7660 | 88.9 | 13.2 |
| Tuberculosis de las meninges y del sistema nervioso | 649 | 7.5 | 1.1 |
| Tuberculosis de otras localizaciones | 305 | 3.5 | 0.5 |
| Total | 8614 | 100 | 14.8 |

* Por 100,000 habitantes

Fuente: Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. S.S.A. 1977.

Tabla No. 7

MORBILIDAD HOSPITALARIA 1980

TUBERCULOSIS

| Edad (años) | 1-14 | | 15-44 | | 45--+ | | Suma M | Suma F | Total |
|---------------------------------|------|----|-------|-----|-------|-----|--------|--------|-------|
| Sexo | M | F | M | F | M | F | | | |
| T.B.P. Reinfección | 12 | | 340 | 110 | 256 | 104 | 596 | 226 | 822 |
| T.B.P. Excavada | | | 118 | 72 | 54 | 20 | 172 | 92 | 264 |
| T.B.P. Miliar- | 6 | 12 | 52 | 20 | 48 | 14 | 106 | 46 | 152 |
| Efectos tardíos de T.B.P. | 2 | | 32 | 8 | 16 | 4 | 50 | 12 | 62 |
| Bronquiec- tasias T.B. | | | 18 | 4 | 20 | 8 | 38 | 12 | 50 |
| | 6 | 26 | 560 | 214 | 394 | 150 | 962 | 388 | 1350 |

T.B. = tuberculosis
T.B.P. = tuberculosis pulmonar
M = masculino
F = femenino

Fuente: Departamento de Estadística. Instituto Nacional de Enfermedades Pulmonares, S.S.A.

Tabla No. 8

LETALIDAD HOSPITALARIA 1980

TUBERCULOSIS

| Edad (años) | 1-14 | | 15-44 | | 45-+ | | Suma M | Suma F | Total |
|---------------------------|------|---|-------|----|------|----|--------|--------|-------|
| Sexo | M | F | M | F | M | F | | | |
| T.B.P. Reinfección | | | 57 | 14 | 77 | 21 | 134 | 35 | 169 |
| T.B.P. Excavada | | | 15 | 8 | 18 | 8 | 33 | 16 | 49 |
| Efectos tar- dios T.B. | | | 2 | 1 | 3 | 5 | 5 | 6 | 11 |
| T.B.P. miliar | 1 | | 4 | 1 | | | 6 | 1 | 7 |
| • Meningitis T.B. | 1 | 1 | | | | | 1 | 1 | 2 |
| Secuelas T.B. | | | | | | | 1 | 1 | 1 |
| | 2 | 1 | 78 | 24 | 100 | 34 | 180 | 59 | 239 |

T.B. = tuberculosis
T.B.P. = tuberculosis pulmonar
M = masculino
F = Femenino

Fuente: Departamento de Estadística. Instituto Nacional de Enfermedades Pulmonares, S.S.A.

d) Fármacos Antituberculosos

Antes del año de 1948 no existía un tratamiento efectivo contra la tuberculosis. Entre los años de 1948 y 1960, se desarrollaron -- los fármacos antituberculosos y a partir de este último año, se comprobó que esta enfermedad puede ser curable en un 100% de los casos, siempre y cuando el tratamiento se apegue a determinados requisitos, como son el - uso de asociaciones de antifímicos, tiempo adecuado de tratamiento, supervisión, etc.

Actualmente se utilizan doce fármacos contra la tuberculosis, los cuales varían en su utilización desde el punto de vista de su dosis, efectividad, vía de administración, toxicidad, etc., en la siguiente tabla se enlistan los doce fármacos antituberculosos generalmente utilizados en esta enfermedad (23).

Tabla No. 9

| Fármaco | Dosis |
|-------------------------------------|-------------|
| 1. Estreptomina | 15-20 mg/Kg |
| 2. Isoniacida | 3-5 mg/Kg |
| 3. Rifampicina | 10 mg/Kg |
| 4. Pirazinamida | 30-40 mg/Kg |
| 5. Estambutol | 15-25 mg/Kg |
| 6. Etionamida | 15-20 mg/Kg |
| 7. Cicloserina | 15-20 mg/Kg |
| 8. Acido para-aminosalicílico (PAS) | 200 mg/Kg |
| 9. Tiacetazona | 150 mg/día |
| 10. Kanamicina | 1 g/día |
| 11. Capreomicina | 1 g/día |
| 12. Viomicina | 1 g/día |

1. Estreptomina

Este medicamento fué el primero que se utilizó en el tratamiento de la tuberculosis. La Estreptomina actúa sobre los ribosomas de la bacteria, inhibiendo la síntesis de proteínas, afectando con esto - la translación del código genético. Provoca una serie de efectos indeseables, como son reacciones de hipersensibilidad, reacciones tóxicas y rechazo del enfermo (11,13,14).

Las reacciones de hipersensibilidad pueden ser alteraciones - de la piel, eosinofilia, estomatitis, pudiendo llegar inclusive al choque anafiláctico. Las reacciones tóxicas consisten principalmente, en alteraciones de la función vestibular, que consisten en la aparición de vértigo y pérdida del equilibrio, puede presentarse también la pérdida de la audición, aunque este efecto es mas frecuente con la hidroestreptomina. -- Otro efecto tóxico consiste en alteraciones del Sistema Nervioso y daño renal (10,13).

2. Isoniacida

El descubrimiento de la Isoniacida y su utilización en el año de 1952, provocó un gran avance en el tratamiento de la tuberculosis, ya que este fármaco es el mas activo de los utilizados actualmente contra el bacilo de la tuberculosis. Su mecanismo de acción no se conoce, pero aparentemente puede inhibir la síntesis de los ácidos micólicos, compuestos que forman parte de la pared celular de estas bacterias, como ya fué mencionado. A pesar que la isoniacida es uno de los medicamentos más innocuos, provoca también diversas reacciones adversas como polineuritis periferica

ferica, reacciones alérgicas como fiebre, erupciones cutáneas e incluso hepatitis, que ha provocado muertes (10,13,14).

3. Rifampicina

Este fármaco es activo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y también es efectiva contra el bacilo de la tuberculosis. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la polimerasa responsable de la formación de las cadenas en la síntesis de RNA. La rifampicina provoca reacciones adversas, aunque no con mucha frecuencia, -- estos efectos consisten en alteraciones gastrointestinales, fatiga, debilidad muscular, alteraciones en el sistema nervioso, etc. (11,13).

4. Pirazinamida

Este medicamento es activo también contra M. tuberculosis, -- aunque se ha comprobado "in vitro", que actúa únicamente a un pH ácido; -- este hecho al parecer se relaciona con su efectividad contra los bacilos que se encuentran en el interior de los macrófagos, donde se ha comprobado también que existe un pH ácido. Este fármaco presenta una alta toxicidad, que consiste generalmente en lesiones hepáticas, esta característica ha hecho que la pirazinamida sea un antifímico de segunda elección, -- utilizada generalmente en enfermos que alberguen bacilos tuberculosos -- resistentes a otros medicamentos antituberculosos. Otro de sus efectos adversos puede consistir en hemoptisis, que incluso ha llegado a provocar la muerte en pacientes en tratamiento con este fármaco (10,11,13).

5. Etambutol

Aproximadamente el 75% de las cepas de M. tuberculosis son - sensibles a este fármaco, incluso aquellas que son resistentes a la isoniacida y a la estreptomina. Su mecanismo de acción se desconoce. Puede presentar algunos efectos adversos que consisten en dermatitis, prurito, alteraciones gastrointestinales, fiebre y confusión mental. Algunas veces también puede provocar anafilaxia y leucopenia, aunque esto sucede rara vez. El efecto adverso más importante es la neuritis óptica, que - provoca un decremento de la percepción visual, la cual desaparece al suspender su administración. (10,13).

6. Etionamida

Este fármaco es parecido estructuralmente a la isoniacida, - aunque esto no provoca reacción cruzada en lo relativo a la aparición de resistencia frente a ambos medicamentos. La dosis utilizada en el tratamiento contra la tuberculosis, generalmente no es bien tolerada ya que - provoca una intensa irritación gástrica y síntomas neurológicos (10,13).

7. Cicloserina

La cicloserina es un antibiótico aislado en el año de 1955 y utilizado también en el tratamiento de la tuberculosis. Su mecanismo de acción consiste aparentemente en la inhibición de la síntesis de la pared celular de M. tuberculosis. Las reacciones adversas más comunes consisten en alteraciones del Sistema Nervioso Central que pueden ir desde somnolencia hasta síntomas paranoicos (10,11,13).

8. Acido para-aminosalicílico (PAS)

Entre los compuestos derivados de los ácidos salicílicos y benzoico, éste medicamento tiene el efecto más marcado contra el bacilo de la tuberculosis. Su mecanismo de acción al parecer es similar al de las sulfonamidas, el cual consiste en un antagonismo competitivo entre el ácido para-aminobenzoico (PABA) y estos compuestos. Esto provocaría que la bacteria no utilice al PABA en su metabolismo normal, evitando así su desarrollo. Sin embargo, las sulfonamidas no son efectivas contra M. tuberculosis y el PAS es inactivo contra bacterias susceptibles a las sulfonamidas (10,13).

El PAS presenta diferentes efectos adversos como: anorexia, náuseas, diarrea, dolor epigástrico y ardor. Pueden presentarse también úlcera péptica y hemorragia, daño renal, hepático y lesiones de la glándula tiroidea. Puede provocar también reacciones de hipersensibilidad (13).

9. Tiacetazona

Este fármaco es también efectivo contra el bacilo de la tuberculosis, actualmente es utilizado como medicamento de primera línea en esta enfermedad. En países como Uganda y Kenia se ha reemplazado al PAS por la tiacetazona, la ventaja de su utilización es su bajo costo y su efectividad que es comparada con la del PAS. Se han reportado efectos adversos, como poca frecuencia, como dermatitis e incluso daños hepáticos (11,13).

10. Kanamicina

La kanamicina también es utilizada en el tratamiento de la tuberculosis, aunque su mecanismo de acción no se encuentra reportado, por lo menos en lo que respecta a su acción contra M. tuberculosis. Presenta diferentes efectos adversos como reacciones de hipersensibilidad (en 8 al 10% de los casos). Otros efectos importantes son la ototoxicidad y la nefrototoxicidad, ya que tienen efectos tóxicos parecidos a la estreptomycin (10,11,13).

11. Capreomicina

Este fármaco es un antibiótico que es efectivo contra la bacteria de la tuberculosis, es muy parecido en sus propiedades a la viomicina. Ambos compuestos son menos utilizados que los otros antifímicos y su importancia radica en que son una posibilidad más de tratamiento en tuberculosis causadas por cepas poli-resistentes. Las reacciones asociadas con este fármaco son eusinofilia en la mayoría de los casos, leucocitosis, leucopenia y fiebre (11,13).

12. Viomicina

Este fármaco presenta diversos efectos adversos entre los cuales los más serios son los daños al riñón y al octavo par, con la resultante pérdida del equilibrio y sordera. Se le considera más tóxica que la -- estreptomycin (11,13).

Como puede observarse todos los antifímicos son capaces de -- provocar resistencia en la bacteria causante de la tuberculosis. Este fe-- nómeno radica en la aparición de mutantes resistentes de M. tuberculosis. Por otra parte, el uso inadecuado de estos medicamentos aumenta el desarro-- llo de cepas resistentes. Esta es una de las razones por las cuales el -- tratamiento de la tuberculosis consiste en la administración combinada de varios fármacos, ya que por un lado se ha observado que la resistencia -- disminuye cuando se pone en contacto al bacilo con varios antifímicos y - por otro lado, también en muchos casos existe un mecanismo de sinergismo entre los fármacos administrados.

Por lo que respecta al tiempo de tratamiento, anteriormente - era largo, pudiendo durar hasta varios años. En el año de 1977 la Direc-- ción General de Control de la Tuberculosis (23) recomendó diferentes es-- quemas de tratamiento, en los cuales se utilizan en un principio la combi-- nación de la isoniacida (que es el antifímico más potente) con otros 2 an-- tifímicos, que pueden ser estreptomina, tiacetazona, etambutol y PAS, - posteriormente se disminuye el número de fármacos administrados, a 2; el tratamiento debe durar 1 año ininterrumpido. En la siguiente tabla se -- muestra un ejemplo de dos esquemas de tratamiento (A y B) con duración de un año.

Actualmente se están valorando esquemas terapéuticas para la tuberculosis con menos tiempo de tratamiento, los cuales duran 6 meses y son llamados de corta duración.

Tabla No. 10

ESQUEMAS MODELO PARA TRATAMIENTO PRIMARIO SUPERVISADO
(Adulto de 60 a 70 Kg. de peso)

| Esquema "A" | Esquema "B" |
|--|--|
| Isoniacida (HAIN) 300 mg. diariamente en una toma | Isoniacida (HAIN) 300 mg. diariamente en una toma |
| Estreptomycin 1 g. diariamente por vía in- tramuscular | Estreptomycin 1 g. diariamente intramuscular |
| Etambutol 1200 mg. diariamente en una toma | Tiacetazona 150 mg. diariamente en una toma |

Fase intensiva
(Dos meses)

Isoniacida (HAIN) 800 mg. dos veces a la
semana en una toma.

Estreptomycin 1 g. intramuscular dos ve
ces a la semana.

Fase de sostén

(Hasta completar doce meses para ambos
esquemas).

Fuente: Programa nacional de Control de la Tubercu
losis. México 1977.

Tabla No. 11

ESQUEMAS TERAPEUTICOS PARA EL TRATAMIENTO
ANTITUBERCULOSOS DE CORTA DURACION

1979

| Fase | Fármaco y dosis | Frecuencia | Duración (meses) |
|------------------------------------|---|----------------------|---------------------|
| <u>Esquema I</u> | | | |
| Primera (supervisada) | Estreptomicina 1 g. HAIN 300 mg Rifampicina Pirazinamida 2 g. | 6 días por semana | 2 |
| Segunda (autoadminis- trada) | Rifampicina 600 g. Isoniacida 300 mg. | diaria | 4 |
| | | | <hr/> 6 |
| <u>Esquema II</u> | | | |
| Primera (supervisada) | Estreptomicina 1 g. Isoniacida 300 mg. Rifampicina Pirazinamida 2 g. | 6 días por semana | 2 |
| Segunda (supervisada) | Isoniacida 600 mg. Rifampicina 600 mg. | 3 días semana | 4 |
| | | | <hr/> 6 |

Fuente: Dirección General de Control de la Tuberculosis y de las Enfermedades del Aparato Respiratorio, S.S.A. 1980.

En la Tabla No. 11 se muestran 2 esquemas terapéuticos de este tipo.

e) Modelos Experimentales

Los modelos experimentales juegan un papel importante en la investigación científica. Inclusive algunos autores definen a la Ciencia como "La elaboración de un modelo de la naturaleza" (2).

Se puede decir que un modelo experimental es la sustitución de un fenómeno que ocurre en la naturaleza, por otro, el cual va a poder ser objeto de experimentación. Puede haber modelos formales y modelos -- materiales o experimentales. En el primer caso, un modelo se refiere a -- una ley o teoría relacionada con algún fenómeno natural; en el segundo, -- se utilizan generalmente animales de experimentación como ratas, ratones, o bien bacterias, virus, etc. así como experimentos sin utilizar organismos vivos, pero con los cuales se puedan obtener datos que se apliquen al fenómeno natural.

En el caso de la tuberculosis se han utilizado diferentes animales de experimentación como ratones, cobayos, hámsters, ratas y monos. Cada especie presenta ventajas y desventajas según el aspecto de la enfermedad que se pretende investigar. Los conejos, los cobayos y los ratones, en general, son los más utilizados para el estudio de la tuberculosis. A continuación mencionamos algunas características como modelos experimentales de estos animales.

Conejo

Cuando se inocula esta especie con cepas de Mycobacterium -- bovis desarrolla una tuberculosis progresiva y generalmente mortal similar a la del cobayo cuando es inoculado con M. tuberculosis; sin embargo, el conejo es muy resistente a esta última especie. La tuberculosis en este animal como consecuencia de la inhalación de las bacterias presenta -- características morfológicas parecidas a las de los pacientes con lesiones cavitarias crónicas, por lo cual el conejo puede ser utilizado para -- estudiar aspectos específicos de este tipo de lesiones como por ejemplo -- el mecanismo de acción de fármacos en estas circunstancias patogénicas.

Cobayo

El cobayo es muy sensible a las infecciones por micobacterias y después de inoculado, la infección tiende a ser progresiva y siempre -- mortal. Dicha infección es esencialmente extracelular, la alergia y la necrosis son notables, por lo que los aspectos de la infección intracelular de la tuberculosis no puede ser bien estudiada. En el caso de estudios -- farmacológicos conviene utilizar al cobayo para la investigación de fármacos que produzcan su efecto fuera de la célula y en tejido necrótico.

Ratón

El ratón es muy resistente a la infección con M. tuberculosis y necesita ser inoculado con gran cantidad de bacterias; esta propiedad -- da cierto margen de seguridad en cuanto a la implantación crónica y la reproductibilidad del modelo.

La enfermedad en estas condiciones, a diferencia en la producida en el cobayo, es esencialmente intracelular, con alergia mínima y necrosis comparativamente ligera sin que aparezca caseificación. Esto - representa una ventaja en lo que representa al estudio de la infección - intracelular, que de hecho es lo que ocurre en el orden. Para el estudio de fármacos antituberculosos, esta característica del ratón es importante ya que estos tienen que actuar en el bacilo localizado en el interior de la célula; por otra parte, si esta especie animal es inoculada - con bajas concentraciones bacterianas por vía intravenosa, desarrolla -- una infección crónica y generalizada que puede utilizarse en diferentes clases de estudios. Finalmente, inóculos muy pequeños de microorganismos viables, inyectados en córnea, producen una enfermedad progresiva de tiempo determinado y aprovechable en la evaluación de fármacos antituberculosos.

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

f) Material

Material Biológico

Cepa de M. tuberculosis H₃₇R_v

Cepa de ratones Balb-c

Material y Equipo

Papel Wathman No. 42

Portafiltros para jeringa

Porta asa y asa bacteriológicos

Matraces Erlenmeyer de 50, 250 y 500 (ml.)

Estufa bacteriológica a 37°C

Baño de agua

Tubos de ensayo de 12 x 75 mm. con tapón metálico de presión

Fotómetro marca Coleman Jr. II

Jeringas de insulina

Agujas No. 27 con bicel corto

Pipetas automáticas

Pipetas serológicas de diferentes volúmenes

Cajas Petri de 50 ml.

Tubos con tapón de rosca para cultivo

Centrífuga refrigerada Beckman J-21C

Jaulas para ratones

Agitador Vortex

Batas para cirugía

Cubre bocas

Guantes de hule

Lentes de plástico grueso

Medios de Cultivo

Lowenstein Jensen

Middlebrook 7H-10 agar

Proskawer and Beck

Kirchner agar blando

g) Metodología

Preparación de Medios de Cultivo

"Lowenstein Jensen (L-J)

Composición de la solución de sales:

| | |
|------------------------------|--------|
| Fosfato monopotásico anhidro | 2.4 g |
| Sulfato de magnesio | 0.24 g |
| Citrato de magnesio | 0.6 g |
| Aspargina | 3.6 g |
| Glicerol | 12.6 g |
| Agua destilada | 600 ml |

Dividir los 600 ml de esta solución en dos porciones de 300 - ml, agregarles 15 g de harina de papa y 40 g de cloruro de sodio a una de ellas solamente ya que la otra será el medio de testigo. Esterilizar ambas soluciones en autoclave, enfriar y agregar 500 ml de un homogenizado de huevo y 10 ml de una solución al 0.01% de verde de malaquita. Vaciar en tubos con tapón de rosca y pasar a un coagulador hasta que solidifique.

Homogenizado de huevo. Utilizar huevos frescos (de no más de una semana), lavarlos con detergente y dejarlos en la solución por media hora. Enjuagarlos con agua corriente y sumergirlos en alcohol al 70% por 15 minutos, romperlos y vaciarlos en un frasco estéril y finalmente homogenizar. Pasar el homogenizado a través de una gasa estéril y recolectar en una probeta, también estéril.

"Middlebrook 7H-10 Agar" (M7H-10)

Suspender 3.8 g de medio base Middlebrook 7H-10 (comercial) en 180 ml de agua destilada y añadir 1 ml de glicerol. Esterilizar la suspensión en autoclave por 10' a 120°C. Agitar hasta disolver el sedimento y colocar la solución en un baño de agua entre 50 C. y 56 C. Agregar 20 ml del enriquecimiento OADC (comercial) y vaciar a cajas Petri.

Nota: Conviene incubar este medio de cultivo, colocándo la caja Petri dentro de una bolsa de plástico sellada con calor, con el fin de evitar la evaporación exagerada de vida a largo tiempo de incubación (3 - 4 semanas).

"Medio sintético de Kirchner agar blando"

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de agua destilada, agregar en el siguiente orden:

| | |
|---------------------------------|--------|
| NaHPO ₄ | 0.3 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.4 g |
| MgSO ₄ | 0.6 g |
| Citrato de sodio | 0.25 g |
| Aspargina | 0.50 g |
| Citrato férrico amoniacal | 0.005g |
| Glicerina | 2 ml |
| Agar | 0.5 g |

Esterilizar la suspensión en autoclave, agitar hasta disolver los componentes del medio y pasar 0.9 ml a tubos de ensayo, con tapón de presión metálico.

Nota: Los tubos con el medio de cultivo se pueden guardar en una estufa hasta utilizarse, si son utilizados el mismo día; o bien refrigerarse y volver a licuar si el tiempo que transcurre hasta que se utilice es mayor.

"Proskawer y Beck" (P y B)

Colocar 100 ml de agua destilada en un matraz de 250 ml y disolver en el siguiente orden:

| | |
|----------------------|--------|
| Aspargina | 0.5 g |
| Fosfato monopotásico | 0.5 g |
| Sulfato de potasio | 0.05 g |
| Glicerol | 2 ml |
| Citrato de magnesio | 0.15 g |

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH al 40% y esterilizar en autoclave.

Nota: El crecimiento de M. tuberculosis en este medio de cultivo líquido es sobre la superficie, por lo que al sembrar las colonias, es importante depositarlas suavemente de tal manera que floten.

Precauciones en el Manejo de M. tuberculosis

Es importante tomar ciertas precauciones al manejar microorganismos patógenos, como es el caso de M. tuberculosis: el lugar de trabajo debe ser adecuado, tener paredes lisas, lámparas de luz ultravioleta

y sistema de extracción con filtros microbiológicos. La manipulación de la bacteria debe de realizarse dentro de una campana bacteriológica, de tal manera que la persona que realiza el trabajo nunca este en contacto con ésta. Debe usar bata de cirugía, cubrebocas, gorro y guantes. En el caso de la inoculación en animales de experimentación es conveniente utilizar además lentes para evitar el riesgo de que al moverse el animal pueda llegar el inóculo a los ojos.

Al terminar de trabajar es necesario limpiar la superficie de trabajo con fenol al 5% y esterilizar en autoclave el material inmediatamente después de utilizarlo. El autoclave debe de estar en la misma área de trabajo para evitar la contaminación de otras áreas al tener que transportar dicho material lejos del sitio de trabajo.

Preparación de la Suspensión de "Mycobacterium tuberculosis" para inoculación.

Se resembró el cultivo original de M. tuberculosis H₃₇Rv en Lowenstein-Jensen en varios tubos con el mismo medio de cultivo; se incubó a 37°C durante 3 a 4 semanas; posteriormente se tomaron tres asadas -- del cultivo resembrado y se depositaron en un matraz Erlenmeyer estéril de 50 ml con perlas de vidrio en su interior. Se agitó en un Vortex hasta disgregar los grumos del cultivo bacteriano.

Se agregaron 10 ml de la solución estéril de solución salina-tween (1:100) y se agitó suavemente hasta formar una suspensión. Posteriormente esta suspensión se pasó por un papel filtro Wathman No. 42, fijo en un portafiltros para jeringas, con el objeto de eliminar los preci-

pitados bacterianos de mayor tamaño. El inóculo consistió en 0.5 ml de una dilución 1:10 de esta suspensión, por otro lado, se sembraron 0.1 ml de diferentes diluciones del inóculo para investigar el número de bacterias vivas inyectadas a los ratones.

Nota: La eliminación de los agregados bacterianos se realiza más adecuadamente con un sonicador, pero desafortunadamente no se contó con éste en el laboratorio.

Cuantificación del Número de Bacterias

Se realizan diluciones de la suspensión bacteriana con solución salina-Tween (desde 1:10 hasta 1:100,000), se toman 0.1 ml de las diluciones 1:100, 1:1000, 1:10,000 y 1:100,000 añadiéndolas a tubos con medio de cultivo Kirchner agar blando.

Se agitan en un Vortex y se vacían sobre la superficie de cajas Petri con medio M7H-10 moviendo las cajas de tal manera, que el contenido se distribuya en forma homogénea. Se deja que la capa de Kirchner solidifique a temperatura ambiente y se incuba a 37°C.

Por otro lado se mide el porcentaje de transmitancia de la suspensión sin diluir con el objeto de poder conocer el número aproximado de micobacterias por volumen de suspensión preparada, con solo conocer un % de transmitancia.

Ensayos Preliminares

Se formaron dos grupos de 9 ratones cada uno, distribuidos por pesos (método de "culebra japonesa") de la siguiente manera;

| Lote No. 1 | | Lote No. 2 | |
|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| <u>No. de ratón</u> | <u>Peso (g)</u> | <u>No. de ratón</u> | <u>Peso (g)</u> |
| 1 | 40.6 | 19 | 38.9 |
| 12 | 35.7 | 9 | 36.1 |
| 18 | 34.0 | 17 | 33.5 |
| 21 | 30.6 | 5 | 31.2 |
| 22 | 28.9 | 24 | 27.8 |
| 20 | 27.3 | 0 | 27.7 |
| 16 | 26.6 | 14 | 26.6 |
| 6 | 25.8 | 3 | 25.8 |
| 26 | 24.7 | 15 | 22.5 |

A los ratones del Lote No. 1 se les inyectaron 0.5 ml de la solución salina-tween, por vía intravenosa y a los del Lote No. 2, 0.5 ml de la suspensión de M. tuberculosis H₃₇Rv por la misma vía. Se sembraron diferentes diluciones del inóculo en medios de cultivo M7H-10 para conocer el número de bacterias vivas inyectadas.

Después de ser inoculados, se sacrificaron 4 ratones cada semana (dos en cada lote) y se les realizó la necropsia con el fin de buscar lesiones características de tuberculosis en los diferentes órganos -- (bazo, hígado y pulmones). Posteriormente se separaron y se hizo un homogeneizado de cada uno de ellos, utilizando solución salina-tween (100:1), en un mortero con arena estéril.

El homogeneizado así preparado se centrifugó en una centrifuga refrigerada (J21-C Beckman) a 2000 r.p.m., durante 10 mins. con el objeto de sedimentar los restos del tejido; se separó el sobrenadante y se volvió a centrifugar, ahora a 12000 r.p.m. durante 30 mins. para sedimen-

tar las bacterias. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en un agitador Vortex. Se tomó aproximadamente 1 ml de cada suspensión con pipetas Pasteur y se sembró en los medios de cultivo. Se incubaron a 37°C, durante 4 semanas y al no observarse desarrollo en este tiempo se incubaron 2 semanas más (6 semanas en total), considerándose negativo al no aparecer colonias características.

Se repitió el procedimiento anterior en las mismas condiciones, se inyectaron 2 lotes, (3 y 4) de 10 ratones cada uno, cambiándose el cultivo bacteriano. El peso de los ratones fué de 21.5 g para el lote No. 3 y 21.8 g para el lote No. 4, ambos peso promedio.

Se aislaron hígados, bazos y pulmones de ratones infectados con M. tuberculosis y se hizo un homogeneizado con el procedimiento mencionado anteriormente, sembrándose en el medio de cultivo de Lowenstein - Jensen. Posteriormente se inyectaron las bacterias del cultivo así obtenido por vía intravenosa a un lote de 5 ratones, se hizo lo mismo con una cepa de M. tuberculosis obtenido de un homogeneizado de pulmones únicamente. Las bacterias obtenidas se inyectaron por la misma vía a otro lote (No. 5 y No. 6 respectivamente). Ambos lotes tuvieron un promedio de pesos de 16.5 g. A cada lote se le determinó el T_{50} (tiempo en que falleció el 50% de los ratones) por el método gráfico. Se realizaron también cortes histológicos de bazos, hígados y pulmones de cada ratón por separado en el laboratorio de Histología del Instituto.

Comparación de la Virulencia de Bacterias Cultivas en los Medios de Cultivo M7H-10 y Proskawer y Beck

El objetivo de esta última parte del trabajo experimental fué la optimización de las siguientes variables: medio de cultivo, con cepa bacteriana y número de bacterias inoculadas, con el fin de obtener un T_{50} adecuado, se consideró "a priori" que con un T_{50} cercano a los 30 días, se desarrollaría una tuberculosis más o menos crónica sin que el experimento fuera demasiado tardado. Se utilizaron 2 medios de cultivo diferentes: Middlebrook 7H-10 y Proskawer y Beck, se inyectaron dos suspensiones, la primera de una cepa "A" aislada de pulmones, de ratones infectados y la segunda "B" aislada de pulmones, hígado y bazo obtenidos también de ratones infectados, ambas a dos concentraciones diferentes: una dosis diluida (d.d) con 80% de transmitancia (aproximadamente 150,000 células vivas) y una dosis concentrada (d.c.) con 40% de transmitancia (aproximadamente 1,000.00 de bacterias vivas).

Optimización de la dosis de bacterias inoculadas a los ratones. Se preparó una suspensión de M. tuberculosis aislada de pulmones de ratones infectados cultivada en el medio P y B, con una transmitancia inicial de 40%. Se hicieron diluciones obteniéndose los siguientes valores de -- transmitancia:

1. 40%
2. 52%
3. 60%
4. 68%

Se inyectaron por vía intravenosa una dilución 1:10 de cada una de las suspensiones a 4 lotes de ratones (No. 7, 8, 9 y 10). Por otro lado, se sembraron las diluciones en cajas PETRI CON MEDIO M7H-10 con el objeto de cuantificar el número de micobacterias inoculadas.

CAPITULO III

RESULTADOS

En los ensayos preliminares se obtuvieron los siguientes resultados: en los dos primeros lotes, tanto el No. 1 que fué el control como el No. 2, no se observaron lesiones en ninguno de los órganos de los ratones sacrificados, por lo cual no se muestra ninguna tabla. Al repetir el procedimiento con ratones de 21.5 a 21.8 g de peso promedio en dos lotes de 10 ratones cada uno respectivamente, el control y el de prueba - en éste último se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla - No. 12.

Tabla No. 12

LOTE No. 4

| Ratón No. | Volumen de inóculo inyectado (ml.) | Localización | | | | | | | | |
|--------------|---|--------------|---|--------|---|----------|---|------|---|---|
| | | Piel | | Hígado | | Pulmones | | Bazo | | |
| | | L | C | L | C | L | C | L | C | |
| 13 | 0.5 | - | - | - | + | + | + | + | - | + |
| 20 | 0.5 | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 22 | 0.5 | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 24 | 0.5 | - | - | + | + | + | + | - | + | + |
| 25 | 0.5 | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 33 | 0.5 | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 44 | 0.5 | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| 45 | 0.25 | - | - | + | + | - | - | + | + | + |
| 54 | 0.20 | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 17 | 0.20 | - | - | + | + | + | - | - | + | + |

L = lesiones características de tuberculosis
 C = cultivo de los homogeneizados de los órganos

Inoculación de M. tuberculosis aislado previamente de un homogeneizado de bazos, hígados y pulmones de ratones infectados: los resultados obtenidos a partir de los ratones inyectados por vía intravenosa con bacterias aisladas de éstos órganos, pueden observarse en la Tabla No. 13. El valor de T_{50} se pueden encontrar en la parte inferior de dicha tabla.

Tabla No. 13

LOTE No. 5

| Ratón No. | Localización de lesiones y bacilos | | | | | | | | |
|--------------|------------------------------------|---|---|--------|---|---|----------|---|---|
| | Bazo | | | Hígado | | | Pulmones | | |
| | L | C | M | L | C | M | L | C | M |
| 14 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 15 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 18 | - | + | + | - | + | + | + | + | + |
| 21 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 26 | - | + | + | + | + | + | + | + | + |

$T_{50} = 24.2$ días

Inoculación de M. tuberculosis aislado previamente de un homogeneizado de pulmones de ratones infectados.

LOTE No. 6

| Ratón No. | Localización de lesiones y bacilos | | | | | | | | |
|--------------|------------------------------------|---|----|--------|---|----|----------|---|----|
| | Bazo | | | Hígado | | | Pulmones | | |
| | L | C | M | L | C | M | L | C | M |
| 19 | -* | - | + | - | - | + | + | + | + |
| 29 | -* | + | No | - | - | No | + | + | + |
| 31 | + | - | + | -* | + | No | + | + | + |
| 57 | + | + | + | + | + | - | + | + | No |
| 64 | - | + | + | -* | + | + | + | + | No |

T₅₀ = 18 días

L = lesiones macroscópicas, C = Cultivo de M. tuberculosis del órgano, M = Observación microscópica de los bacilos en cortes de tejido. -* = Sin lesiones características con -- aparente aumento del tamaño del órgano. No = No se realizó.

Comparación de la virulencia de bacterias cultivadas en los -
medios de cultivo M7H-10 y Proskawer y Beck:

| Medio de cultivo | Dosis | Cepa de <u>M. tuberculosis</u> | |
|--|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| | | A | B |
| M7H-10 (M ₁ ⁰) | d.d. (80% trans.) | T ₅₀ = 54 días | T ₅₀ = 63 días |
| | dc ₁ (40% trans.) | T ₅₀ = 18 días | T ₅₀ = 27 días |
| P y B (M ₂) | d.d. (80% trans.) | T ₅₀ = 47 días | T ₅₀ = 58 días |
| | d.c ₂ (40% trans.) | T ₅₀ = 14 días | T ₅₀ = 18 días |

Optimización de la dosis de bacterias inoculadas a los ratos para obtener un T_{50} cercana a los 30 días:

| % Transmitancia | No. de bacterias | Volumen del inóculo (ml) | T_{50} (días) |
|-----------------|------------------|--------------------------|-----------------|
| 40 | 1200,000 | 0.5 | 16 |
| 52 | 500,000 | 0.5 | 28 |
| 60 | 270,000 | 0.5 | 37 |
| 68 | 190,000 | 0.5 | 39 |

CAPITULO IV

DISCUSION DE RESULTADOS

En los primeros ensayos de inoculación de M. tuberculosis en los lotes de ratones de 1 y 2, control y experimental respectivamente, no se observaron lesiones de tuberculosis en ninguno de ellos. El cultivo - del cual se tomaron las bacterias inyectadas a dichos lotes de ratones, - se encontraban en refrigeración antes de utilizarse, por lo que se pensó que dicha cepa estaba muerta o en estado latente al ser inoculada; por es te motivo se repitió el experimento utilizando un cultivo de M. tubercu-- losis que se encontraba en su fase logarítmica de crecimiento, en este ca se se inocularon los lotes 3 y 4 de 10 ratones cada uno; se observaron -- lesiones en bazo, hígados y pulmones de la mayoría de los ratones del -- Lote No. 4 que era el lote experimental, estos resultados se confirmaron con el desarrollo de la bacteria en los medios de cultivo sembrados con - los homogeneizados de los diferentes órganos. Hubo casos en los que no - se observaron lesiones macroscópicas, sin embargo, el cultivo fue positi- vo, esto se debió quizás a que las bacterias que estaban presentes en di- chos tejidos no habían llegado todavía a ocasionar las lesiones. Otra -- posibilidad es que las bacterias fueran muy pocas y que por lo tanto no - hubieran lesionado al órgano. En el caso del ratón No. 17 sí se observa- ron lesiones macroscópicas sin que hubiera crecimiento de las bacterias - en el medio de cultivo. Esto pudo deberse a fallas en la preparación de ese medio de cultivo específico (pH inadecuado, ingredientes mal pesados, etc.) o bien a que el inóculo no haya sido suficiente.

Por lo que respecta a los resultados de la inoculación de -- M. tuberculosis y el aislamiento de homogeneizados de hígados, bazo, y - pulmones y de pulmones exclusivamente, inyectados respectivamente a los - lotes de ratones 5 y 6 se puede observar que con el primer homogeneizado

se produce una tuberculosis generalizada que se puede observar por las lesiones en hígados, bazo y pulmones, mientras que en el lote número 6 inyectado con bacterias aisladas de pulmones únicamente se observan lesiones predominantes en pulmones ya que hay ratones en los cuales no se produjeron lesiones macroscópicas en hígado y bazo, mientras que en todos los pulmones estudiados se encontraron evidencias de tuberculosis -- tanto por lesiones macroscópicas como por cultivo y cortes histológicos, donde se observaron Micobacterias en el tejido. Estos resultados estan de acuerdo con un trabajo publicado por Collins y Montalbine (3), en el cual reportaron la existencia de un fenómeno de adaptación previa de -- M. tuberculosis a pulmones que consistía en que las bacterias aisladas - de pulmones de ratones infectados cuando eran inyectados nuevamente a -- otro lote de ratones, tendían a establecerse nuevamente en el tejido pulmonar. Estos resultados deberían de confirmarse inyectando lotes de ratones con un número mayor ya que en este experimento se utilizaron únicamente 5 ratones por lote, por lo que los resultados no son muy claros. - En algunos casos se observó un aumento de tamaño de algunos órganos sin lesiones aparentes, pudiendo deberse esto a alguna reacción inflamatoria provocada por alguna sustancia o restos de tejidos de los órganos de los ratones de los cuales se aislaron previamente las bacterias. Se observó también que la cepa aislada de pulmones presentó una mayor virulencia, - ya que el T_{50} que es el tiempo que mueren la mitad de los ratones del -- lote, fue menor (18 días) que en la cepa aislada de hígado, bazo y pulmones ($T_{50} = 24.2$ días). Esto se puede deber a que, o bien las bacterias fueran mas virulentas por si mismas, o que al estar mas afectado el pulmón de los ratones, siendo este un órgano muy importante en el funciona-

miento del organismo, hubiera provocado muertes más rápidas.

Con respecto a la última parte experimental que consistió, - en la comparación de diferentes variables relacionadas con la muerte de los ratones por tuberculosis, se probaron básicamente dos medios de cultivo (M7H-10 y P y B), inoculados con las dos cepas mencionadas anteriormente, una aislada de pulmones y la otra de hígados, bazos y pulmones, - estas dos cepas a dos concentraciones diferentes de bacterias cada una de ellas; esto se hizo con el objeto de encontrar las condiciones en las cuales se provocaba una mayor virulencia, es decir el T_{50} mas pequeño para los lotes de ratones. Por otra parte, basándose en estos resultados, se optimizó la dosis de bacterias inoculadas para obtener un T_{50} cercano a los 30 días. Los resultados obtenidos muestran que utilizando el medio de cultivo de Proskawer y Beck para cultivar las Micobacterias aisladas de un homogeneizado de pulmones a una concentración bacteriana del inóculo de 40% de transmitancia se obtiene un T_{50} de 14 días que es menor - al de las otras condiciones experimentales. Utilizando dichas condiciones (T_{50} menor) se procedió a optimizar la dosis. Los resultados muestran que si se inoculan aproximadamente 500,000 bacterias vivas, se obtiene un T_{50} de 28 días, que es lo mas cercano a lo que se había propuesto.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Se logró provocar tuberculosis en ratones Balb-c, en forma generalizada y también con predominio pulmonar, al inyectar M. tuberculosis adaptada previamente a dicho tejido. Esto se comprueba de diferentes maneras: por las lesiones características de la enfermedad en pulmones, bazo e hígado de los ratones inoculados con la bacteria, con cultivo y aislamiento de M. tuberculosis de los homogeneizados de los órganos y por la observación de las bacterias en cortes de tejido.
2. La enfermedad provocada en los ratones les causó la muerte, encontrándose las condiciones apropiadas para que el T_{50} fuera cercano a los 30 días, estas condiciones fueron: medio de cultivo, cepa bacteriana inoculada y dosis de bacterias inyectadas.
3. La utilización del ratón se justifica tanto por las características mencionadas dentro del capítulo de generalidades, como por ser relativamente fácil de manejar, barato y que no requiere áreas muy grandes para vivir.
4. El modelo experimental desarrollado en esta tesis podría ser utilizado tanto para realizar estudios de la enfermedad en sí, como para investigar las propiedades antifímicas de algunas sustancias. En este último caso sería necesario utilizar, además, otras especies animales, para tener una mayor seguridad de las respuestas que se obtengan. Otro aspecto importante que hubiera sido deseable en este modelo experimental sería la evaluación de la respuesta inmune celular en las diferentes etapas de la enfermedad de los ratones. Esto nos hubiera

dado una idea más exacta de la cercanía de este modelo a lo que suce
de en la tuberculosis en el humano.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- (1) Bernstein, R.: Isoniazid hepatotoxicity and acetylation during tuberculosis chemoprophylaxis. Am. Rev. Res. Dis. 121(3): 429-430. Marzo, 1980.
- (2) Bunge, M.: La Ciencia, su Método y su Filosofía. Ed. Siglo XX, Buenos Aires, Argentina, 1978.
- (3) Collins, F.M., Wayne, L.G. and Montalbino, V.: The effects of cultural conditions on the distribution of M. tuberculosis in the spleens and lungs of specific pathogen free mice. Am. Rev. Res. Dis. 110, 147, 1974.
- (4) Collins, F.M., Montalbino, V.: Distribution of mycobacteria grown "in vivo" in the organs of intravenously infected mice. Am. Rev. Res. Dis. 113 (3): 281-286, Marzo, 1976.
- (5) Díaz, J.L. (editor). Usos de las Plantas Medicinales de México. Inst. Mex. para el Est. de las Plantas Med. A.C., México, 1976.
- (6) Díaz, J.L. (editor). Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México. Inst. Mex. para el Est. de las Plantas Med. A.C., México, 1976.
- (7) Einis Vladimir. "Tuberculosis". Editorial MIR, Moscú, 1968.
- (8) Ellard, G.A. et al. The hepatic toxicity of isoniazid among rapid and slow acetylators of the drug. (letter). Am. Rev. Res. Dis. 118(3) 628-629, Septiembre, 1978.
- (9) Fenner, F., S.P. Martin and Ch. Pierce.: The enumeration of viable tubercle bacilli in cultures and infected tissues. Ann. N.Y. Acad. Sci. 52: 751-764, 1949.

- (10) Frederik, H., Meyers, Jawets y Coldfien: Manual de Farmacología -- Clínica. 3a. ed. México, 1977.
- (11) Goldstein, Aronow and Kalman: Principles of drug action. Second edition. U.S.A. 1977.
- (12) Geoffrey, R. et al.: The use of the mouse in standardized test for antituberculous activity of compounds of natural or synthetic origin. II y III. Am. Rev. Tub. 60, 109-120 (II). 121-130 (III). 1949.
- (13) Goodman and Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. Fifth edition. USA, 1970.
- (14) Gingauz, A.: Drugs: How act and why? USA, 1978.
- (15) Hidalgo y Mondragón, M.C.: Aspectos bioquímicos de interés farmacológico Ed. CECSA 1a. ed. México, 1977.
- (16) INEPLAM. Revista de Medicina tradicional. Vol. II, No. 5, 1978.
- (17) Kubica, G.P., Dye, W.E. and Middlebrook. Sputum digestion and decontamination with n-acetyl-lcysteine, sodium hidroxide for culture of mycobacteria. Am. Rev. Resp. Dis. 87: 775-779, 1963.
- (18) Kudoh, S., Kudoh, T.A.: A simple technique for culturing tubercle bacilli. Bull. WHO 51(1) 71-82, 1974.
- (19) Martin, R.S., Sumarın, R.K., Kobart, E.M.: Comparison of four culture media for the isolation of Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Micr. 2(5): 538-440, Noviembre, 1975.

- (20) O'Hea, A.J.: Counting viable tubercle bacilli. J. Path. Bac. 69: 169, 1955.
- (21) Pérez Amarillo. Homogenization of samples for the culture of Mycobacterium. A comparative study of sample with and without centrifugation. Revista Cubana de Medicina Tropical 29(2) May-Aug., 1977.
- (22) Pierce, C.H., R.V. Dubos and W.B. Schaefer: Multiplication and survival of tubercle bacilli in the organs of mice. J. Exp. Med. N.Y. 97: 189-205, 1953.
- (23) Programa Nacional de Control de la Tuberculosis, S.S.A., 1977.
- (24) Rees, R.J.W. and Robson, J.M.: Experimental tuberculosis infection of the cornea of the mouse; A screening test for anti-tuberculouse substances. Brit. J. Pharm. 5: 77, 1950.
- (25) Rodríguez Carranza, R.: Investigación preclínica en el desarrollo de medicamentos. Lozoya X. IMEPLAM. Estado actual del conocimiento en plantas medicinales mexicanas. México, 1976.
- (26) Segal, W.: Comparative study of "in vivo" and "in vitro" grown Mycobacterium tuberculosis; immunogenic differentiation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118: 214, 1965.
- (27) Zaener, F.S.P., Martin and Ch. Pierce: Methods and medium for the culture of tubercle bacilli. Tubercle 58(3) 143-145, Septiembre, 1977.