



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S

**“EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA SUBAGUDA Y EFECTO  
ANTITUBERCULOSO PRELIMINAR DE LA LICARINA A”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A  
**LUIS JOVANI VALDOVINOS MARTÍNEZ**

**MÉXICO, D.F.**

**2009**





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.



## **AGRADECIMIENTOS:**

- A la jefa de la UIM-FPN, Dra. Mariana Meckes Fisher, por el apoyo brindado para la realización experimental del presente trabajo en la Unidad de Investigación.
- Al Dr. Rogelio Hernández-Pando jefe de la Unidad de Patología Experimental del INNCMSZ y a su grupo de colaboradores por las facilidades otorgadas en la realización de los estudios histológicos y de evaluación antituberculosa.
- A la Dra. Ma. Adelina Jiménez Arellanes por el apoyo, la paciencia, el tiempo dedicado y los consejos que hicieron posible ésta investigación y por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. IdAP 12732) para realizar el trabajo de Licenciatura mediante el proyecto U 48339-M.
- Al Fondo de Fomento e Investigación del IMSS (FOFOI-IMSS) y al CONACyT por el financiamiento otorgado a los proyectos.
- A la M en C. Rosalba León Díaz, por haberme apoyado en la realización de los estudios de actividad antituberculosa y análisis histológicos.
- Al M en C. Jorge Cornejo Garrido, por realizar las determinaciones de los estudios de biometría hemática y química sanguínea.
- A los compañeros y amigos de la UIM-FPN (Jorge, Rosalba, Nallely, Arlen, Omar, Martha, Cristina, Mónica, Tona, Carmen y Claudia) por los días y horas que estuvimos conviviendo en el laboratorio, por compartir sus conocimientos y hacer que la realización de esta tesis sea un grata experiencia.
- Así como a los miembros del jurado:  
Dra. María Isabel Aguilar Laurents  
Dra. Rachel Mata Essayag  
Dra. Ma. Adelina Jimenez Arellanes  
Dr. José Fausto Rivero Cruz  
M en C. Mario Alberto Figueroa Saldivar

Ya que con sus observaciones, comentarios y sugerencias permitieron el enriquecimiento del presente trabajo de Tesis.

## **DEDICATORIA:**

**A Dios:** Por permitirme llegar hasta aquí y concluir mis estudios profesionales.

**A mis padres:** Salvador y María Esther, por haberme dado la vida, procurarme siempre, inculcarme valores y principios y por haber pasado incontables noches sin dormir cuando llegue a estar enfermo. Por ser parte fundamental de mis éxitos, estar ahí en los momentos difíciles de mi vida y enseñarme que con dedicación, esfuerzo y constancia todas las metas se pueden lograr. Este presente trabajo va por ustedes jefes, de antemano les reitero mi más grande admiración y gratitud hacia cada uno. Los quiero mucho y espero tenerlos conmigo por muchos años más.

**A mis hermanos:** Salvador y Manuel, quienes siempre han estado conmigo compartiendo juegos, travesuras, anécdotas y demás circunstancias que me han traído hasta aquí. Doy gracias a dios por haberme dado hermanos como ustedes y espero que permanezcamos juntos y sigamos cosechando más y más éxitos.

**A mamá Tina:** Quién ha sido el pilar de la familia durante muchos años y que gracias a su sabiduría y cariño siempre me ha dado el mejor consejo. Jefecita gracias por tantos rezos, se que gran parte de nuestros logros se deben a que siempre pides a dios por nuestra salud y bienestar.

**A mi tía Lety:** Por abrirme incondicionalmente las puertas de tu hogar y por compartir éxitos, fracasos, salud y enfermedades (¡que fueron varias jaja!) durante los últimos 5 años. Letto tu sabes que también eres como una madre para mí.

**A mi abuelo Ranulfo:** Quién fue un ejemplo de sencillez, honestidad y sabiduría. Gracias abuelo por dejarme una de las enseñanzas más importantes de la vida, el respeto a ti mismo y a las demás personas.

**A mis tías:** Flory, Moni, Ade, Lili y Maritza por brindarme su apoyo en todo momento.

**A mis amigos de la Facultad de Química:** Sarahí, Vero, Nare, Ileana, Patty, Bertha, Rafa, Sergio y Luis, gracias por haber estado ahí ese primer día en la facu y por compartir diversas situaciones como: ordinarios A y B, fiestas, desvelos y todas aquellas circunstancias propias de una Facultad como la nuestra.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>Ac Ur:</b> Ácido úrico	<b>g:</b> gramo
<b>ALP:</b> Fosfatasa alcalina	<b>HDL:</b> Colesterol de alta densidad
<b>BAAR:</b> Bacilo Alcohol Ácido Resistente	<b>hex:</b> hexano
<b>BCG:</b> Bacilo Calmette-Guerin	<b>HPLC:</b> Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>BD:</b> Bilirrubina directa	<b>h:</b> horas
<b>BT:</b> Bilirrubina total	<b>Hz:</b> hertz
<b>C.H.C.M:</b> Concentración de hemoglobina corpuscular media	<b>I:</b> Isoniazida
<b>CAM:</b> Claritromicina	<b>INF-<math>\gamma</math>:</b> Interferón $\gamma$
<b>CBM:</b> Cuadro básico de medicamentos	<b>ITBL:</b> Infección tuberculosa latente
<b>ccf:</b> Cromatografía en capa fina	<b>kDa:</b> Kilo-Dalton
<b>cel:</b> células	<b>kg:</b> kilogramo
<b>CFZ:</b> Clofazimina	<b>L:</b> litro
<b>CMI:</b> Concentración mínima inhibitoria	<b>LAM:</b> Lipoarabinomanano
<b>cols:</b> Colaboradores	<b>LDL:</b> Colesterol de baja densidad
<b>Col Tot:</b> Colesterol total	<b>M:</b> media
<b>Creat:</b> Creatinina	<b>MAC:</b> Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
<b>DAF:</b> Diacetato de fluoresceína	<b>MeOH:</b> metanol
<b>DC:</b> dicroísmo circular	<b>MFLX:</b> Moxifloxacina
<b>DGE:</b> Dirección General de Epidemiología	<b>MFR:</b> Multifarmacorresistencia
<b>dL:</b> decilitro	<b>mg:</b> miligramo
<b>DL50:</b> Dosis letal 50	<b>MHz:</b> megahertz
<b>DS:</b> Desviación estándar	<b>min:</b> minuto
<b>E.S.M:</b> Error estándar de la media	<b>mL:</b> mililitro
<b>E:</b> Etambutol	<b>mmol:</b> milimol
<b>EE:</b> éter etílico	<b>MTB:</b> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>EM-IE:</b> Espectrometría de masas por impacto electrónico	<b>NIAID:</b> National Institute of Allergy and Infectious Diseases
<b>FDA:</b> Food and Drugs Administration	<b>nm:</b> nanómetro
<b>fL:</b> femtolitros	<b>NS:</b> Núcleo sacarídico
<b>GFLX:</b> Gatifloxacina	<b>OADC:</b> Ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa
<b>gGT:</b> Gamma glutamil transferasa	<b>OMS:</b> Organización Mundial de la Salud
<b>GI:</b> Gastrointestinal	<b>PBS:</b> Buffer de fosfato salino
<b>Glu:</b> Glucosa	<b>PCR:</b> Reacción de la Polimerasa en Cadena
<b>GOT:</b> Transaminasa glutámico-oxalacética	<b>PD:</b> Farmacodinamia
<b>GPT:</b> Transaminasa glutámico-pirúvica	

**PK:** Farmacocinética  
**R:** Rifampicina  
**RBT:** Rifabutina  
**Rf:** Factor de retención  
**RLZ:** Rifalazil  
**RMN-<sup>1</sup>H:** Resonancia magnética nuclear  
protónica  
**rpm:** revoluciones por minuto  
**RPT:** Rifapentina  
**S:** Estreptomina  
**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia  
Adquirida  
**SL-I:** Sulfolípido I  
**SS:** Sector Salud  
**SSI:** Solución salina isotónica  
**TAAC:** Tuberculosis Antimicrobial Acquisition  
and Coordinating Facility  
**TAES o DOTS:** Tratamiento acortado  
estrictamente supervisado

**TB:** Tuberculosis  
**TB-MFR:** Tuberculosis  
multifarmacorresistente  
**TB-XDR:** Tuberculosis extremadamente  
resistente a fármacos  
**TDM:** Dimicolato de trehalosa  
**TLR:** Receptor tipo toll  
**Tratado 5V:** Clave asignada para el grupo  
tratado con (+)-licarina A (5 mg/k)  
**Trig:** Triglicéridos  
**U/L:** Unidades por litro  
**UFC:** Unidad formadora de colonias  
**UI:** unidades internacionales  
**V.C.M:** Volumen corpuscular medio  
**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana  
**XFR:** Extremadamente resistentes a  
fármacos  
**Z:** Pirazinamida  
**µm:** micrómetro

## ÍNDICE GENERAL

	Páginas
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	i
<b>INTRODUCCIÓN</b>	iii
<b>ANTECEDENTES</b>	
• Agente etiológico	1
• Panorama mundial de la tuberculosis	3
• Tuberculosis multifarmacoresistente (TB-MFR)	5
• Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XFR)	7
• Tuberculosis en México	9
• Diagnóstico y Terapia antifélica	10
• Estado actual sobre el desarrollo de agentes antituberculosos	15
• Lignanós, ¿potenciales fármacos antituberculosos?	18
• El modelo experimental de la TB progresiva	22
<b>HIPÓTESIS</b>	25
<b>OBJETIVOS GENERALES</b>	25
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	25
<b>METODOLOGÍA</b>	
• Purificación del compuesto	26
• Determinación de la toxicidad subaguda de la licarina A	28
• Estudios histológicos	29
• Evaluación preliminar del efecto antituberculoso <i>in vivo</i> de la licarina A	30
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
• Obtención de licarina A	34
• Evaluación toxicológica subaguda de la (-)-licarina A	38
• Estudios histológicos	45
• Evaluación preliminar del efecto antituberculoso <i>in vivo</i> de la (-)-licarina A.	50



<b>RESUMEN Y CONCLUSIONES</b>	53
<b>PERSPECTIVAS</b>	53
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	54
<b>ANEXOS</b>	
• Anexo 1.- Estado actual de fármacos antituberculosos en el mundo	59
• Anexo 2.- Espectro de RMN Protónica de la (-)-licarina A	60
• Anexo 3.- EM-IE de la licarina A	62
• Anexo 4.- Dicroísmo Circular de la (-)-licarina A	63
• Anexo 5.- Espectro de UV de la (-)-licarina A	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.-</b> Representación de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> .	1
<b>Figura 2.-</b> Representación estructural de LAM. Diferenciación de los dominios terminales.	2
<b>Figura 3.-</b> Incidencia de la TB a nivel mundial por cada 100 000 habitantes (hasta marzo del 2008).	4
<b>Figura 4.-</b> Casos de TB a nivel mundial y su asociación con el VIH y el uso de drogas intravenosas.	5
<b>Figura 5.-</b> Porcentaje de casos primarios (A) y secundarios (B) de TB-MFR (1994-2007).	6
<b>Figura 6.-</b> Distribución mundial de TB-XFR (hasta febrero del 2008).	8
<b>Figura 7.-</b> Estructura y mecanismo de acción de los fármacos de primera línea empleados en el tratamiento de la TB.	12
<b>Figura 8.-</b> Estructura y mecanismo de acción de los principales antituberculosos de segunda línea.	14
<b>Figura 9.-</b> Estructura de lignanos, neolignanos, ciclolignanos, cicloneolignanos y oxilignanos.	19
<b>Figura 10.-</b> Neolignanos aislados del extracto hexánico de <i>A. taliscana</i> por fraccionamiento químico biodirigido.	21
<b>Figura 11.-</b> Ccf de licarina A purificadas por cromatografía de tipo preparativa y recristalización.	35
<b>Figura 12.-</b> Estructura química de los isómeros de licarina A. (-)-licarina A (a), (+)-licarina ó (+)-dehidrodiisoeugenol (b) e isolicarina A (c).	36
<b>Figura 13.-</b> Estructura de la (-)-licarina A obtenida de <i>A. taliscana</i> .	38
<b>Figura 14.-</b> Histología de hígado de los diferentes grupos de estudio.	46
<b>Figura 15.-</b> Histología de pulmones de los diferentes grupos de estudio	47
<b>Figura 16.-</b> Histología de riñones de los diferentes grupos de estudio.	48
<b>Figura 17.-</b> Histología de bazo de los diferentes grupos de estudio	49
<b>Figura 18.-</b> Neumonía de los animales al primer mes de tratamiento.	51
<b>Figura 19.-</b> Neumonía de los animales al segundo mes de tratamiento.	52

## ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
<b>Tabla 1.-</b> Tratamiento TAES contra la TB empleado en México.	11
<b>Tabla 2.-</b> Medicamentos de 2ª línea utilizados para el tratamiento de TB-MFR.	13
<b>Tabla 3.-</b> Nuevos agentes antituberculosos que se encuentran en fase de desarrollo.	18
<b>Tabla 4.-</b> Lignanós aislados de diversas plantas medicinales y su efecto biológico.	20
<b>Tabla 5.-</b> Efecto antimicobacteriano <i>in vitro</i> de neolignanós aislado de <i>A. taliscana</i> contra cepas de <i>M. tuberculosis</i> y sobre micobacterias atípicas.	22
<b>Tabla 6.-</b> Diferentes modelos usados para determinar actividad antifúngica de nuevos fármacos.	23
<b>Tabla 7.-</b> Comparación de los desplazamientos químicos en ppm de la licarina A en el espectro de RMN- <sup>1</sup> H.	35
<b>Tabla 8.-</b> Resultados de los estudios de EM-IE, DC, UV y RO de la licarina A.	37
<b>Tabla 9.-</b> Registro semanal de pesos (g) de los animales durante el estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A.	39
<b>Tabla 10.-</b> Peso (g) de los órganos de animales en estudio de toxicidad subaguda con (-)-licarina A.	40
<b>Tabla 11.-</b> Valores hematológicos del estudio toxicológico subagudo de la (-)-licarina A.	41
<b>Tabla 12.-</b> Valores de química sanguínea del estudio toxicológico subagudo de la (-)-licarina A.	43

## ÍNDICE DE GRÁFICAS Y DIAGRAMAS

	Páginas
<b>Gráfica 1.-</b> Peso semanal de animales en estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A.	39
<b>Gráfica 2.-</b> Representación gráfica de los pesos de órganos de los animales tratados (-)-licarina A.	40
<b>Gráfica 3.-</b> Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A.	41
<b>Gráfica 4.-</b> Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A (continuación).	42
<b>Gráfica 5.-</b> Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A (continuación).	42
<b>Gráfica 6.-</b> Valores de química sanguínea del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A.	43
<b>Gráfica 7.-</b> Valores de química sanguínea del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A (continuación).	44
<b>Gráfica 8.-</b> Valores de química sanguínea del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A (continuación).	44
<b>Gráfica 9.-</b> UFC en los animales con TB progresiva tratados con (-)-licarina A, a los 30 y 60 días de tratamiento.	51
<b>Diagrama 1.-</b> Metodología realizada para la purificación de la licarina A	27

## JUSTIFICACIÓN

El resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas como la tuberculosis (TB), malaria y parasitosis intestinales, ha ocasionado una emergencia global en lo que respecta al Sector Salud. Con el paso de los años, la TB se ha convertido en una de las principales enfermedades infecciosas en el mundo después del SIDA. La TB es considerada un desastre médico, económico y social de gran magnitud; en 1993 fue declarada por la OMS como emergencia global y se estima que actualmente una tercera parte de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), el agente causal de la TB, y aproximadamente el 10% de estos se encuentra en riesgo de desarrollar la enfermedad activa, al año aparecen 9 millones de casos nuevos y cerca de 3 millones mueren por esta causa. El tratamiento actual de la TB se basa en la multiterapia empleando cuatro fármacos de primera línea (isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida); sin embargo, los tratamientos y diagnósticos inadecuados y/o incompletos, han dado origen a la presencia y aparición de cepas multifarmacoresistentes (MFR), para las que se utilizan fármacos de segunda línea; estos últimos ocasionan severos efectos secundarios y resultan poco eficaces, por lo que los tratamientos son prolongados y de elevado costo. Aunado a esto, recientemente se han reportado casos de TB extremadamente farmacoresistentes (TB-XFR), lo que agrava en mucho el panorama en cuanto a alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, ya que estos últimos casos no responden ante fármacos de primera y segunda línea.

El incremento de esta problemática y el escaso desarrollo de fármacos antiTB durante los últimos treinta años, ha dado pauta a la creación de diversas líneas de investigación, entre ellas las dedicadas a la búsqueda de medicamentos que actúen contra este padecimiento y/o que reduzcan el tiempo de tratamiento. Esta búsqueda se realiza en fuentes naturales (plantas y/o microorganismos) y sintéticas; sin embargo, pese a los esfuerzos realizados, a la fecha sólo se tienen dos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la TB.

Por otro lado, el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas afecciones, así como la potencialidad que representa este recurso para la obtención de principios activos, está bien documentado. Solo por citar algunos ejemplos: la vinblastina obtenida de *Catharanthus roseus*, el taxol obtenido de *Taxus brevifolia* y la artemisina aislada de *Artemisia annua* (con actividad anticancerígena y antimalárica, respectivamente) son utilizadas en el terapéutica moderna. La Organización Mundial de la Salud (OMS) describe que el 80% de la población mundial hace uso de este recurso natural para solucionar sus problemas de salud.

En México, el conocimiento sobre el uso de las plantas es de gran importancia, ya que es un país con diversidad florística y con importante legado histórico sobre herbolaria medicinal; sin embargo, la exploración del potencial farmacológico de la flora medicinal es aún escaso, por lo que el estudio químico-biológico de este recurso representa una gran herramienta para la obtención de compuestos activos que ayuden en la lucha contra la TB y diversos padecimientos.

Con base en lo anterior, el presente proyecto propone evaluar el efecto antituberculoso preliminar de la licarina A en un modelo de TB progresiva, así como la toxicidad subaguda en ratones Balb/C. Este compuesto fue aislado del extracto hexánico y metanólico de *Aristolochia taliscana* y resultó, de entre otros aislados el compuesto más activo contra *M. tuberculosis* H37Rv, cepas monorresistentes y MFR de *M. tuberculosis*.

## INTRODUCCIÓN

La TB es una enfermedad infecto-contagiosa provocada por el complejo *M. tuberculosis* (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*) (**Rivers EC y Mancera RL, 2008; Palomino, 2007**), que afecta principalmente a los pulmones y provoca severas alteraciones en el sistema inmunológico (**Hernández-Pando et al., 2004**). Además, la TB también puede ser causada por micobacterias atípicas entre las que figuran *M. avium* (principal oportunista en individuos con VIH/SIDA), el complejo *M. avium-intracellulare* (MAC), *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. smegmatis* (**Palomino, 2007**). La forma más común de la enfermedad es la pulmonar, pero existen manifestaciones extrapulmonares (renal, ósea, meníngea, cerebral, gastrointestinal, pleural, linfática y miliar) que son de difícil diagnóstico y tratamiento (**Frieden et al., 2003**).

A nivel mundial, se estima que un tercio de la población está infectada; anualmente aparecen cerca de 9 millones de casos y 3 millones mueren por este padecimiento. Estimaciones recientes indican que para el 2020 habrá un billón de personas infectadas, 200 millones podrían desarrollar la enfermedad y 70 millones morirán por este padecimiento si no se toman las medidas necesarias para su control (**Aziz et al., 2006**). Otros estudios han demostrado que entre el 6 y 8 % de los casos recién infectados, desarrollarán eventualmente alguna forma de TB. Además, los pacientes con VIH/SIDA tienen de 50 a 100 veces más probabilidad de desarrollar TB activa, y se estima que del 50 al 60% de pacientes con infección tuberculosa latente (ITBL) y VIH/SIDA acabarán con TB activa (**Instituto Nacional de Salud Pública [www.insp.mx](http://www.insp.mx)**).

En México, la TB figura como uno de los principales problemas de salud, por su elevada incidencia; tan sólo en el 2007 se reportaron 14,454 casos (**DGE, 2007**), con una incidencia de 13.7 casos por cada 100 000 habitantes. Sin embargo, la

OMS, estimó en el periodo del 2002-2007 un total de 27,113 casos anuales **(WHO, 2008)**.

Debido al resurgimiento de la TB en el mundo, la OMS creó en 1993, el programa Directly Observed Therapy Short Course (DOTS) ó tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), basado en una multifarmacoterapia para el tratamiento de esta enfermedad, observándose que con el cumplimiento del mismo, se reducen los casos de TB. No obstante, en zonas donde no se tiene una cobertura total o implementación adecuada del TAES (no se sigue el régimen de dosificación adecuado o se interrumpe el tratamiento), hay un incremento de casos de MFR. Ante este problema, la OMS implementó el TAES–Plus, el cual hace uso de medicamentos de segunda línea para el tratamiento de TB-MFR, siendo más costoso, prolongado (hasta 24 meses), con severos efectos secundarios e induce fácilmente resistencia. Sin embargo; a pesar de contar con fármacos de 1ª y 2ª línea, el problema de la TB continua incrementándose y recientemente se han reportado en varias regiones del mundo (incluyendo nuestro país) casos de TB-XFR, los cuales presentan resistencia a los fármacos de primera línea, a alguno de los tres aminoglicósidos inyectables de segunda línea (amikacina, kanamicina ó capreomicina) y a una fluoroquinolona, por lo que estos últimos no tienen alternativa de tratamiento incrementado la pandemia y resaltando así la necesidad por desarrollar medicamentos antituberculosos que acorten o mejoren el esquema de tratamiento actual y con mecanismos de acción diferentes a los existentes **(O’Brien y Spigelman, 2005; Lenaerts et al., 2008b)**.

Hoy en día, el panorama sobre la búsqueda de fármacos alternos para el tratamiento de la TB apunta hacia tres objetivos: reducir el tiempo de tratamiento de TB activa, mejorar el tratamiento de TB-MFR y finalmente contar con una terapia para ITBL **(O'Brien y Spigelman, 2005)**. Es por eso que diversas instituciones privadas y de gobierno se han dado a la tarea de buscar estas fuentes alternas y actualmente se cuenta con dos fármacos (rifapentina y



rifabutina) aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la enfermedad.

Dentro de las diversas investigaciones se han encontrado numerosos metabolitos secundarios de origen vegetal con importante actividad antimicobacteriana *in vitro*, pero se desconoce su toxicidad y su efecto antituberculoso *in vivo*. Así mismo, los avances en la tecnología y métodos de aislamiento han permitido la detección de sustancias activas (**Pauli et al., 2005**) por lo que compuestos naturales y sintéticos pueden constituir alternativas para el tratamiento de la TB.

## ANTECEDENTES

### Agente etiológico

*Mycobacterium tuberculosis*, es un bacilo aerobio, no esporulado que mide entre 2-4  $\mu\text{m}$  de largo y 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, es intracelular facultativo, comúnmente infecta a los macrófagos alveolares y su tiempo de replicación es de 15-20 horas (**Todar's online**). La micobacteria tiene una estructura constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática (Figura 1). La primera la protege de factores externos adversos y está compuesta principalmente por ácido micólico y glicolípidos; esta envoltura juega un papel importante en la patogenia de la TB pulmonar, en la resistencia a antimicrobianos y en el mecanismo de respuesta inmune (**Gorocica et al., 2005; Herrera et al., 2005**).

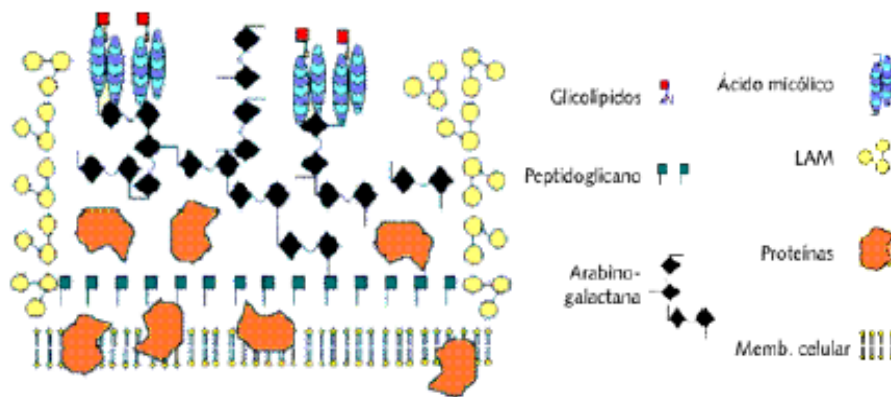


Figura 1.-Representación de la pared celular de *M. tuberculosis*. Tomado de Gorocica y cols, 2005.

La pared celular está compuesta por lípidos (50-60%), por el complejo macromolecular llamado factor cuerda y por ácidos micólicos; los cuales contienen glicolípidos y en particular trehalosa-6,6'-dimicolato (TDM), implicado en un importante número de procesos inmunológicos (**Karakousis et al., 2004**); arabinogalactano, y peptidoglucano, los cuales brindan un carácter hidrofóbico; además, de conferir protección. La membrana plasmática es semejante al resto de las bacterias, con la diferencia de presentar fosfolípidos altamente glicosilados que dan lugar al lipoarabinomano (LAM) que está compuesto de varias partes: un núcleo sacárido (NS), común en todas las especies de micobacterias y unidades repetitivas de D-manano y D-arabinomano; este núcleo se encuentra anclado a

una molécula de fosfatidil-mio-inositol. Algunos residuos de carbohidratos del NS se encuentran ramificados y dan lugar a dominios terminales, en los cuales existen diferencias que dan lugar a tres tipos de LAM (Figura 2): 1) ManLAM, este dominio presenta una extensa capa de manosa en el arabinano terminal y fue encontrado en las cepas MTB virulentas Erdman, H37Rv y en las avirulentas H37Ra y BCG; 2) PILAM, es otro dominio terminal compuesto por fosfatidil-mio-inositol y se localizó en las micobacterias de rápido crecimiento (*M. smegmatis* y *M. fortuitum*) y finalmente 3) AraLAM, descrito también en las micobacterias de rápido crecimiento (*M. chelonae*) carece de la manosilación en el arabinano terminal (**Gorocica et al., 2005; Karakousis et al., 2004**) (Figura 2). La glicoproteína LAM se encuentra involucrada en la expresión de la respuesta inmune debido a la unión con el receptor tipo toll 2 (TLR2) (**Herrera et al., 2005**).

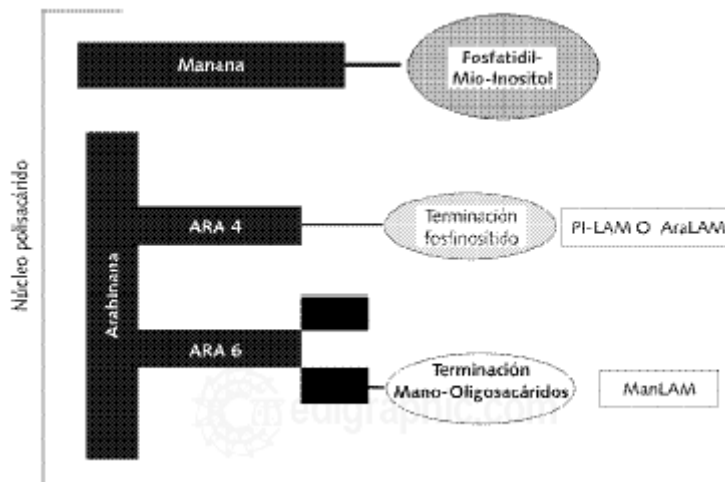


Figura 2.- Representación estructural de LAM. Diferenciación de los dominios terminales. Tomado de Gorocica y cols, 2005.

Otros componentes de la micobacteria son los sulfolípidos de trehalosa o sulfátidos de trehalosa, estas estructuras son ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa, pero sustituidos por grupos sulfatos. Para MTB se han descrito cinco de estos, siendo el más importante el sulfolípido I (SL-I), el cual se encuentra relacionado con la activación de neutrófilos, funciona como evasina y promueve la formación del granuloma (**Gorocica et al., 2005; Karakousis et al., 2004**).

Por último, la lipoproteína de 19 kDa, miembro de una familia de lipoproteínas procarióticas, se encuentra anclada a la pared celular del complejo MTB y se le atribuye un amplio rango de respuestas inmunológicas **(Karakousis et al., 2004)**.

La compleja envoltura de las micobacterias las hace resistentes a técnicas de tinción convencionales, por ejemplo a la tinción de Gram; por eso deben realizarse tinciones especiales para Bacilos Alcohol Ácido Resistentes (BAAR) como Ziehl-Neelsen y Kinyoun **(Collins y Kaufmann, 2001)**.

### **Panorama mundial de la tuberculosis**

Se calcula que durante la última mitad del siglo XX se presentaron alrededor de 10.2 millones de casos nuevos y fallecieron 3.5 millones de pacientes por TB **(WHO, 2001)**, la problemática de la enfermedad es tal que tan sólo para el 2005 se estimó un total de 8.8 millones de nuevos casos y 1.6 millones de muertes **(WHO, 2006)**.

Este padecimiento se transmite principalmente por vía aérea y solo es contagiada por quienes padecen TB pulmonar activa. Si bien la mayoría de las personas contagiadas no desarrolla la enfermedad debido a la acción del sistema inmune, esta permanece en estado latente, condición en que la bacteria viva y virulenta persiste en los tejidos del huésped pero en un estado de equilibrio. En el cual el microorganismo no destruye a las células que lo albergan y el sistema inmunológico tampoco lo elimina, de tal manera que en esta situación el bacilo tuberculoso es capaz de mantenerse viable por largos periodos de tiempo y en el momento en que el sistema inmune se ve debilitado, puede reactivarse produciendo la enfermedad progresiva **(Parrish et al., 1998)**.

Según la OMS, las zonas con mayor incidencia de TB (>100 casos por cada 100,000 hab) son: África, Asia sudoriental y la zona Occidental del Pacífico (Figura 3). Todo ello indica que la enfermedad sigue siendo un problema muy serio de salud en poblaciones de países en vías de desarrollo **(Aziz et al., 2006)**.

Su incidencia es tal, que se ha catalogado como una de las tres principales causas de muerte asociadas a un solo agente infeccioso a nivel mundial (**Tomioka y Namba, 2006**).

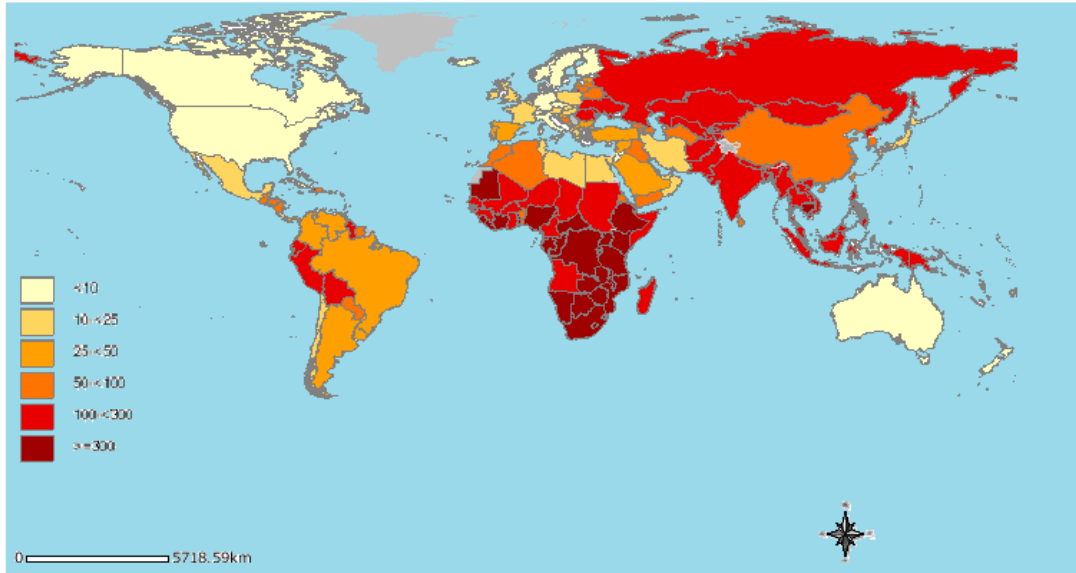


Figura 3.- Incidencia de la TB a nivel mundial por cada 100 000 habitantes (hasta marzo del 2008). Adaptado de WHO ([www.who.int/globalatlas](http://www.who.int/globalatlas))

Sin embargo, a pesar de ser una enfermedad con distribución mundial, grupos de investigadores han señalado algunas características clínicas y demográficas asociadas con la TB, destacando de manera prominente, el abandono social, el alcoholismo, la drogadicción, el VIH/SIDA (Figura 4), cáncer, diabetes mellitus, artritis reumatoide, lupus, entre otros. Además, han señalado que los grupos de mayor riesgo, tienden a ser hombres jóvenes residentes de núcleos urbanos o suburbanos, en condiciones de desempleo, falta de vivienda, adictos a drogas intravenosas, pertenecientes a minorías étnicas y con el antecedente de hospitalización previa contigua a enfermos con TB (**Frieden et al., 1993; Neville et al., 1994**). La prevalencia de casos de TB/VIH es de 0.7 millones y de VIH/drogadicción de 3 millones, pero se desconoce la cantidad de casos TB/VIH/drogadicción y de TB/drogadicción, casos que son de tener en cuenta.

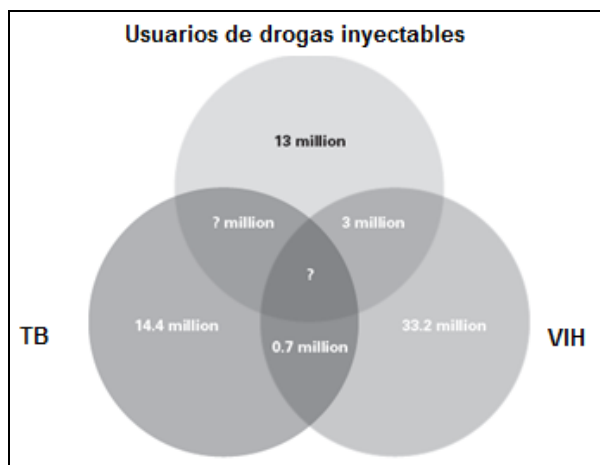


Figura 4.- Casos de TB a nivel mundial y su asociación con el VIH y el uso de drogas intravenosas. TB (prevalencia en el 2006, casos nuevos, crónicos y retratamientos) y VIH (prevalencia hasta el 2007). Adaptado de WHO, 2008.

### Tuberculosis MFR

Durante la pasada década, la incidencia anual de TB se incrementó debido al aumento de casos con VIH, así como al surgimiento de MFR, una nueva y potencial amenaza definida por la OMS, como aquellas cepas resistentes a rifampicina (R) e isoniazida (I), dos de los principales medicamentos de primera línea en el tratamiento de la enfermedad (**Zager y McNerney, 2008**). Estudios realizados en 2006, describieron 490,000 casos de MFR en 81 países a nivel mundial, y un promedio de 110,000 muertes a causa de este padecimiento (**Cox y McDermid, 2008; The Lancet, 2008**). Estimaciones recientes indican que del total de casos de TB a nivel mundial entre el 1 y 3% son MFR y que anualmente aparecen 425,000 casos nuevos de TB-MFR (**Jain y Mondal, 2008**). Por ejemplo, algunos países de la ex-uni3n Sovi3tica presentan cifras alarmantes de MFR primaria (>6%) y secundaria (>40%) y para la mayor3a de pa3ses Africanos no se tiene registrados estos datos (Figura 5).

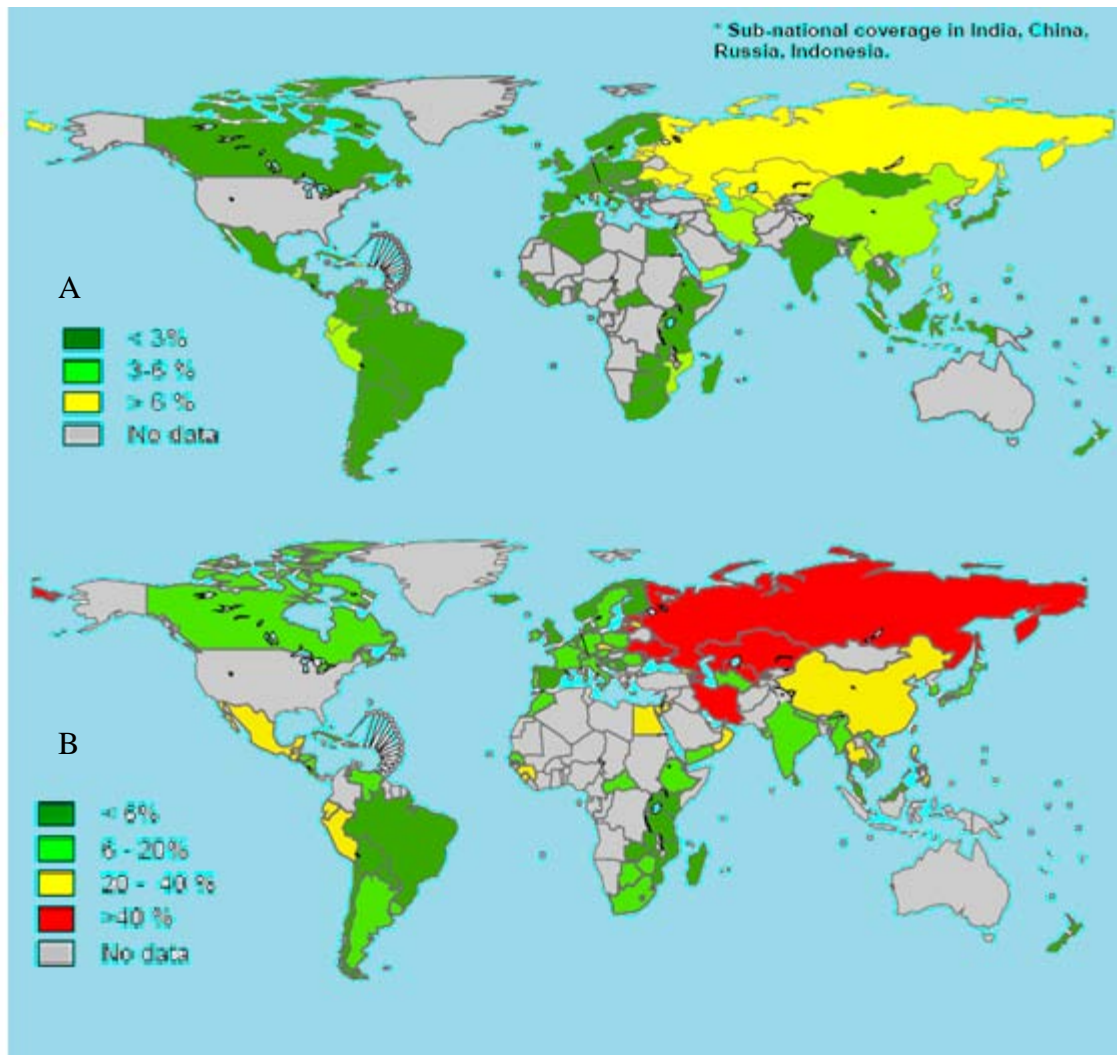


Figura 5.- Porcentaje de casos primarios (A) y secundarios (B) de TB-MFR (1994-2007). Adaptado de WHO, 2008.

La aparición de cepas MFR, se relaciona con factores potenciales como: tratamientos previos inadecuados e incompletos (pobre adherencia, uso de medicamentos de baja calidad, falta de información, reacciones adversas, etc), virulencia del microorganismo, alteración en los transportadores de fármacos, predisposición genética del huésped, etc (**Sharma y Mohan, 2006**). Por ejemplo, algunos autores describen que las mujeres son más propensas a desarrollar MFR. Otros estudios, señalan que existe una mayor probabilidad de adquirir MFR si se tiene resistencia a I o R en comparación con los casos, en los que no se observa resistencia hacia alguno de estos fármacos y que la resistencia a los medicamentos de primera línea se ha incrementado con el paso de los años por el

uso indiscriminado e irracional de estos (**Yoshiyama et al., 2004; Tudó et al., 2004; Su et al., 2008**).

Cabe mencionar que los tratamientos inadecuados o previos dan origen a la presencia de casos MFR secundarios. Hasta hace poco tiempo se pensaba que estos casos estaban asociados a un tratamiento previo, hoy en día se sabe de la existencia y el incremento de MFR primaria, definida como la resistencia a I y R en personas sin antecedente de terapia antituberculosa (**Tudó et al., 2004; Su et al., 2008**), lo anterior sugiere que la transmisión de esta clase de micobacterias ocurre de persona a persona y que probablemente esté relacionada con la cepa Beijing, la cual se caracteriza por su elevada patogenicidad (**Gilpin et al., 2008**).

La presencia de cepas MFR sin duda dificulta los esfuerzos por erradicar esta enfermedad; sin embargo, actualmente se han desarrollado estrategias para combatirla y se basan en una larga y costosa farmacoterapia que involucra el uso de medicamentos de segunda línea, los cuales presentan la desventaja de ser menos específicos, con mayor efecto tóxico e inducen fácilmente resistencia (**Zager y McNerney, 2008**). Actualmente, se estima que el 6.6% de todos los casos MFR son XFR y que menos del 5% de estos casos reciben tratamiento efectivo (**Cox y McDermid, 2008**), lo cual evidencia lo grave que es el problema de la TB en el mundo.

### **Tuberculosis XFR**

Los esfuerzos y medidas tomadas para el control de este padecimiento a nivel mundial, han sido insuficientes ya que recientemente se reportó la aparición de casos de TB que no responden a los tratamientos con fármacos de segunda línea. En el 2005, se observó en un hospital rural de la provincia KwaZulu en Sudáfrica, que pacientes con VIH y TB morían rápidamente; el 98% de los casos detectados murieron en un periodo de 16 días, después de la primera toma de esputo. La genotipificación de la cepa reveló que su existencia se tenía reportada desde una década atrás (**Raviglione y Smith, 2007; Zager y McNerney, 2008**).



Sin embargo, fue hasta el año 2006 que se incluyó en la literatura médica la denominación XFR, como resultado de un estudio para determinar la incidencia de la TB-MFR a nivel mundial (**Bonilla et al., 2008**).

La TB-XFR se define como aquellos casos causados por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a I y R (fármacos de primera línea), a un fármaco de segunda línea inyectable (capreomicina, kanamicina o amikacina) y a una fluoroquinolona (**CDC, 2006**). La aparición de este tipo de cepas se ha detectado en numerosos países, incluyendo México (Figura 6); además este tipo padecimiento tiene un limitado pronóstico de curación y altos índices de mortalidad (**Yew y Leung, 2008**). Algunos de los factores que aumentan su diseminación a nivel mundial son: el tratamiento inadecuado con fármacos de segunda línea, el uso irracional de los mismos, la transmisión primaria, la falta de diagnóstico oportuno y confiable y la elevada incidencia del VIH (**Raviglione y Smith, 2007; Bonilla et al., 2008**).

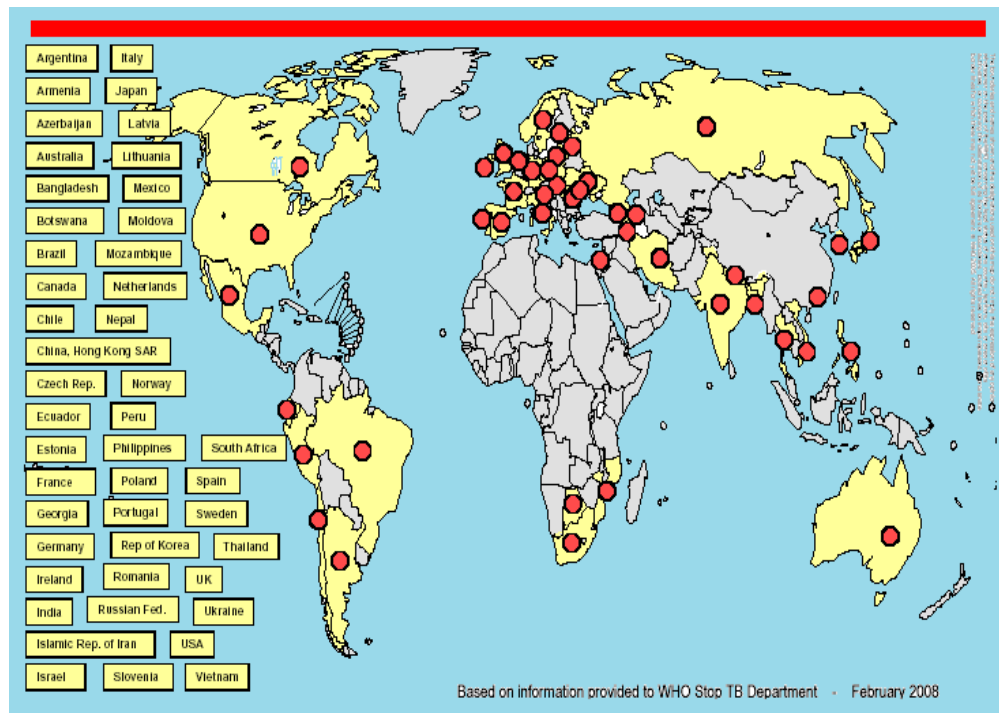


Figura 6.- Distribución mundial de TB-XFR (hasta febrero del 2008). Adaptado de WHO (Stop TB Department).

## **Tuberculosis en México.**

A una década de la reemergencia de la TB a nivel mundial, el panorama epidemiológico de la enfermedad continúa siendo un grave problema del sector salud en gran parte de los países en vías de desarrollo **(Dye et al., 1999)**. México, considerado un país con prevalencia media de TB no escapa de esta realidad ya que el padecimiento constituye la primera causa de muerte debida a un solo agente infeccioso y se ha estimado una prevalencia de 25 casos por cada 100,000 habitantes. Según la Secretaría de Salud (SS), se registraron entre 15,000-16,000 casos y 2,400 muertes anuales en el periodo 2002-2004 **(Salazar et al., 2004)**. Sin embargo, la OMS, estimó en el periodo del 2002-2007 un total de 27,113 casos anuales, de los cuales 1,579 fueron MFR **(WHO, 2008)**. Según datos de la Dirección General de Epidemiología (DGE) durante el 2004-2006 existieron en promedio 16,000 casos anuales y en el 2008 se registraron 14,865, siendo Veracruz (1,633), Chiapas (1,520), Baja California Norte (1,291), Tamaulipas (1045) y Nuevo León (925), los estados con mayor incidencia de TB **(DGE, 2008)**. Por otro lado, a nivel nacional, la edad promedio en pacientes infectados es de 42  $\pm$  12.5 años, de los cuales la mayoría son varones en edad productiva **(Salazar et al., 2004; Granich et al., 2000; Velasco et al., 2004)**. Además, se ha observado que el porcentaje de curación es menor al 85%, lo que indica que existen fallas en la implementación del programa TAES, asociada principalmente al abandono del tratamiento y diagnósticos inadecuados y tardíos **(García-García et al., 2001; 2000; 1998)**.

La persistencia de la enfermedad se debe principalmente a la mala implementación de los programas de control, pobreza, desnutrición, inmunodeficiencia y a diagnósticos inoportunos; lo que ha propiciado el surgimiento de cepas de MFR **(Salazar, et al., 2004; Velasco et al., 2004)**. Estudios realizados en grupos de pacientes mexicanos con TB no han encontrado valores de correlación significativos entre los grupos de riesgo y la influencia del medio como factores que aumenten el riesgo de padecer la enfermedad; sin embargo, se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre el

abandono del tratamiento y el hecho de pertenecer a un nivel socioeconómico bajo (**García-García et al., 2001; 2000; 1998**), donde las principales causas de deserción a la terapia se deben a la falta de comunicación del personal médico con el paciente, el costo elevado del mismo y la falta de información referente a la enfermedad (**Álvarez-Gordillo et al., 2001; 2000**). La tasa de recuperación en pacientes con TB no infectados con VIH rebasa apenas el 50%, en pacientes con infección asintomática por VIH la sobrevida es de 15 meses y en pacientes con SIDA es de solo 1.5 meses. Además se ha encontrado una mayor tasa de resistencia primaria a I ó R, así como un aumento en los casos de MFR primaria, lo cual sugiere que el contagio de la micobacteria MFR es semejante al contagio de *M. tuberculosis* pansensible (**Villalba-Caloca et al., 2003**).

Lo anterior remarca la necesidad por desarrollar estrategias ó nuevos fármacos que acorten o coadyuven el tratamiento de la TB pansensible y TB-MFR y disminuir el número de abandonos; en relación a este último punto, la implementación del TAES en algunas zonas del país ha logrado mejorar la adherencia al tratamiento e incrementar el porcentaje de curación (**García-García et al., 2001; 2000; 1998; Salazar et al., 2004**).

### **Diagnóstico y terapia antifímica.**

El diagnóstico de la enfermedad es difícil y aproximadamente el 30 % se da de manera incidental. Se lleva a cabo por radiografía de tórax y baciloscopía de esputo en pacientes que presentan el antecedente de tos, pérdida de peso y fiebres nocturnas. Actualmente, se realiza el diagnóstico de casos de TB-MFR mediante pruebas de sensibilidad a fármacos por el método convencional (concentración absoluta y radio de resistencia), métodos radiométricos (BACTEC-460) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); sólo por citar algunos de los más importantes (**Sharma y Mohan, 2006**). Cabe mencionar que *M. tuberculosis* es difícil de aislar a partir de muestras biológicas y además es de lento crecimiento por lo que la confirmación de un diagnóstico se tarda hasta un mes y medio.

El recrudecimiento de la TB se debe en gran parte al incremento de pacientes con VIH/SIDA y la falta de adherencia a los tratamientos establecidos, lo que ha propiciado el surgimiento de cepas MFR y XFR (**Sharma y Monhan *et al.*, 2006; Jain y Mondal, 2008**). Para enfrentar este problema, la OMS desarrolló la estrategia DOTS o TAES, la cual está enfocada al tratamiento y curación de los pacientes con TB sensible, ésta estrategia consiste en una multiterapia supervisada estrictamente por personal del sector salud que permite al paciente recibir en forma directa el tratamiento en instituciones de salud, con el fin de mejorar el apego y por consiguiente incrementar las tasas de curación. El TAES está basado en la administración de cuatro fármacos de primera línea: I, R, pirazinamida (Z), etambutol (E) ó estreptomycin (S) (Tabla 1 y Figura 7); la terapia consta de dos etapas; la primera, se denomina fase bactericida o intensiva; en la cual se administran un total de 60 dosis (de lunes a sábado) de los cuatro antifímicos. La segunda etapa, denominada fase de esterilización o de sostén consta de 45 dosis de R e I administradas tres veces por semana. El tratamiento es altamente efectivo y permite la curación de más del 95% de los casos cuando se implementa en forma adecuada (**Palomino *et al.*, 2007; Dye *et al.*, 1999**). En países con TAES bien implementado se reportan tasas de curación que oscilan entre un 80 y un 88% y una tasa <5% en recaídas. Además, se ha demostrado que esta terapia es una de las intervenciones en salud con mayor costo beneficio (**Martínez *et al.*, 2004; Resch *et al.*, 2006**).

Tabla 1.- Tratamiento TAES contra la TB empleado en México.

<b><i>Etapas y Dosis</i></b>	<b><i>Medicamentos</i></b>	<b><i>Tabletas Administradas</i></b>		
		Peso en kg.		
		<b>25 – 39</b>	<b>39 - 49</b>	<b>50 o más</b>
<b>Fase Intensiva</b>	<b>Gragea única</b>			
IRZE (CMB)	I 75 mg			
60 dosis/ diarias	R 150 mg	2	3	4
10 semanas	Z 400 mg			
	E 400 mg	1,5	2	3
<b>Fase Sostén</b>	<b>Gragea única</b>			
IR (CMB)	I 200 mg	2	3	4
45 dosis/ Lun, Mie y Vie	R 150 mg			
15 semanas				

I= Isoniazida, R= Rifampicina, Z= Pirazinamida, E= Etambutol y CBM= Cuadro Básico de Medicamentos (Enarson Donald A *et. al* 2000)

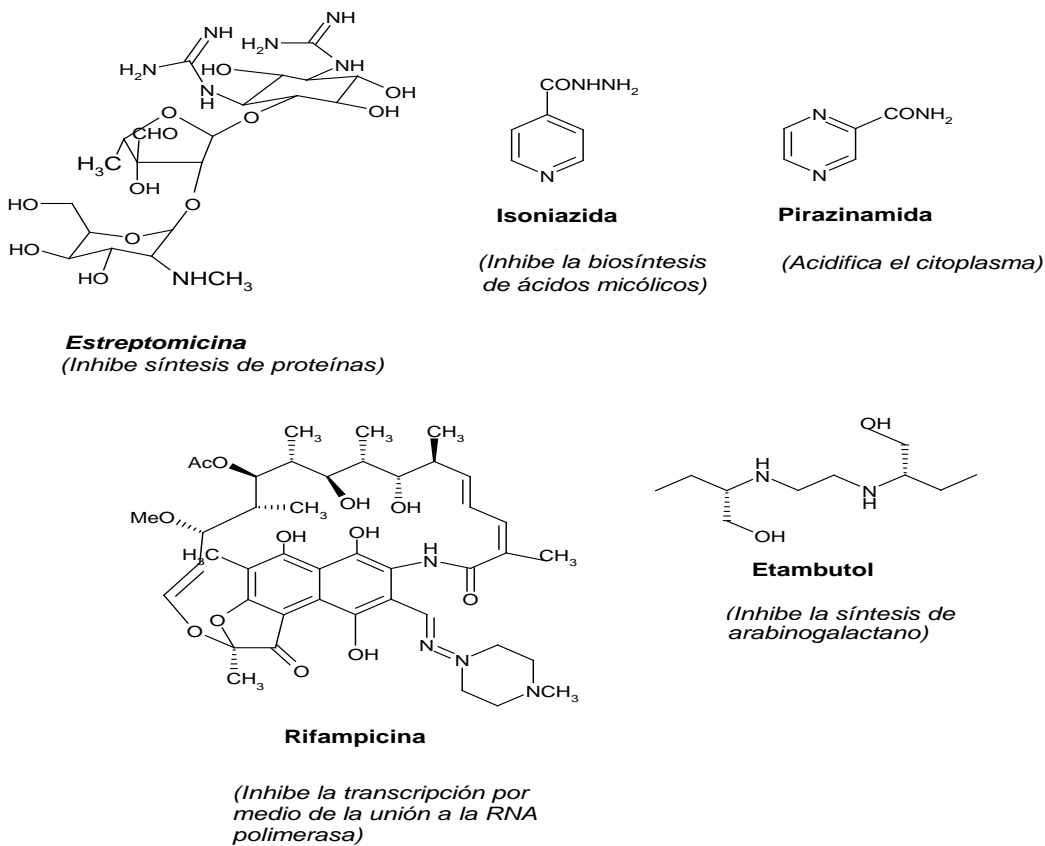


Figura 7.- Estructura y mecanismo de acción de los fármacos de primera línea empleados en el tratamiento de la TB.

Para TB-MFR, la OMS implementó el programa DOTS-Plus (TAES-Plus) en 1998, enfocándose al tratamiento y seguimiento de los casos MFR. Este programa consiste en una multiterapia basada en la administración de fármacos de segunda línea (etionamida, ácido *p*-aminosalicílico, cicloserina, tiacetazona, kanamicina, amikacina, capreomicina y fluoroquinolonas) (Figura 8). Además, el TAES-Plus contempla otras estrategias como: contar con diagnósticos asertivos, realizar pruebas de susceptibilidad en el menor tiempo posible; suministrar medicamentos de calidad (1ª y 2ª línea) sin interrupción, desarrollar tratamientos estratégicos utilizando fármacos de segunda línea bajo estricta supervisión para cada caso; llevar un sistema de reporte que permita monitorear y evaluar los resultados del tratamiento. Sin embargo, los principales inconvenientes del DOTS-Plus son la duración del tratamiento (hasta 24 meses) y la utilización de fármacos que tienen un elevado costo, inducen fácilmente resistencia (fluoroquinolonas) y provocan

severos efectos secundarios, en comparación con los fármacos de primera línea (Tabla 2). Cabe mencionar, que esta terapia sólo se implementa en áreas que presentan una elevada incidencia de TB-MFR y que cuentan con la cobertura del programa TAES en un 100% (Sharma y Mohan, 2006; Palomino *et al.*, 2007; Lenaerts *et al.*, 2008b).

El uso indebido e irresponsable de medicamentos de 2ª línea, ha provocado el surgimiento de TB-XFR, la cual presenta un elevado índice de mortalidad y carece de una terapia antituberculosa convencional por lo que las tasas de curación son pobres para este tipo de casos.

Tabla 2.- Medicamentos de 2ª línea utilizados para el tratamiento de TB-MFR.

<i>FASE INICIAL</i>				
<i>Resistencia</i>	<i>Fármaco</i>	<i>Duración</i>	<i>Dosis Diaria</i>	<i>Efectos Adversos</i>
I y R con ó sin resistencia a S	Aminoglicósidos	Tres meses	15 mg/kg	Dolor en el sitio de inyección
	Ofloxacina ó Levofloxacina,		§ 600-800 y 500-600 mg	Molestias GI, insomnio y mareo
	Z		20-30 mg/kg	Anorexia, náusea, hepatitis y vómito
	E		15 mg/kg	Hepatitis, artralgia, reacciones cutáneas
	Etionamida.		15 mg/kg	Hepatitis, sabor a metales y convulsiones
I, R y E con ó sin resistencia a S	Aminoglicósidos	Tres meses	15 mg/kg	Dolor en el sitio de inyección
	Ofloxacina ó levofloxacina		§ 600-800 y 500-600 mg	Molestias GI, insomnio y mareo
	Z		20-30 mg/kg	Anorexia, náusea, hepatitis y vómito
	Etionamida		15 mg/kg	Hepatitis, sabor a metales y convulsiones
	Cicloserina		15 mg/kg	Mareo, dolor de cabeza, convulsiones
<i>FASE DE CONTINUACIÓN</i>				
I y R con ó sin resistencia a S	Ofloxacin ó levofloxacina	18-24 Meses	§ 600-800 y 500-600 mg	Molestias GI, insomnio y mareo
	E		15 mg/kg	Hepatitis, artralgia, reacciones cutáneas
	Etionamida		15 mg/kg	Hepatitis, sabor a metales y convulsiones
I, R y E con ó sin resistencia a S	Ofloxacina ó levofloxacina	18-24 Meses	§ 600-800 y 500-600 mg	Molestias GI, insomnio y mareo
	Etionamida		15 mg/kg	Hepatitis, sabor a metales y convulsiones
	Cicloserina		15 mg/kg	Mareo, dolor de cabeza, convulsiones

Molestias GI = Anorexia, náusea, vómito. §= Dosis usual. Aminoglucosidos= Estreptomina, Kanamicina, Amikacina y Capreomicina. Adaptado de Sharma y Mohan, 2006; Yew y Leung, 2008.

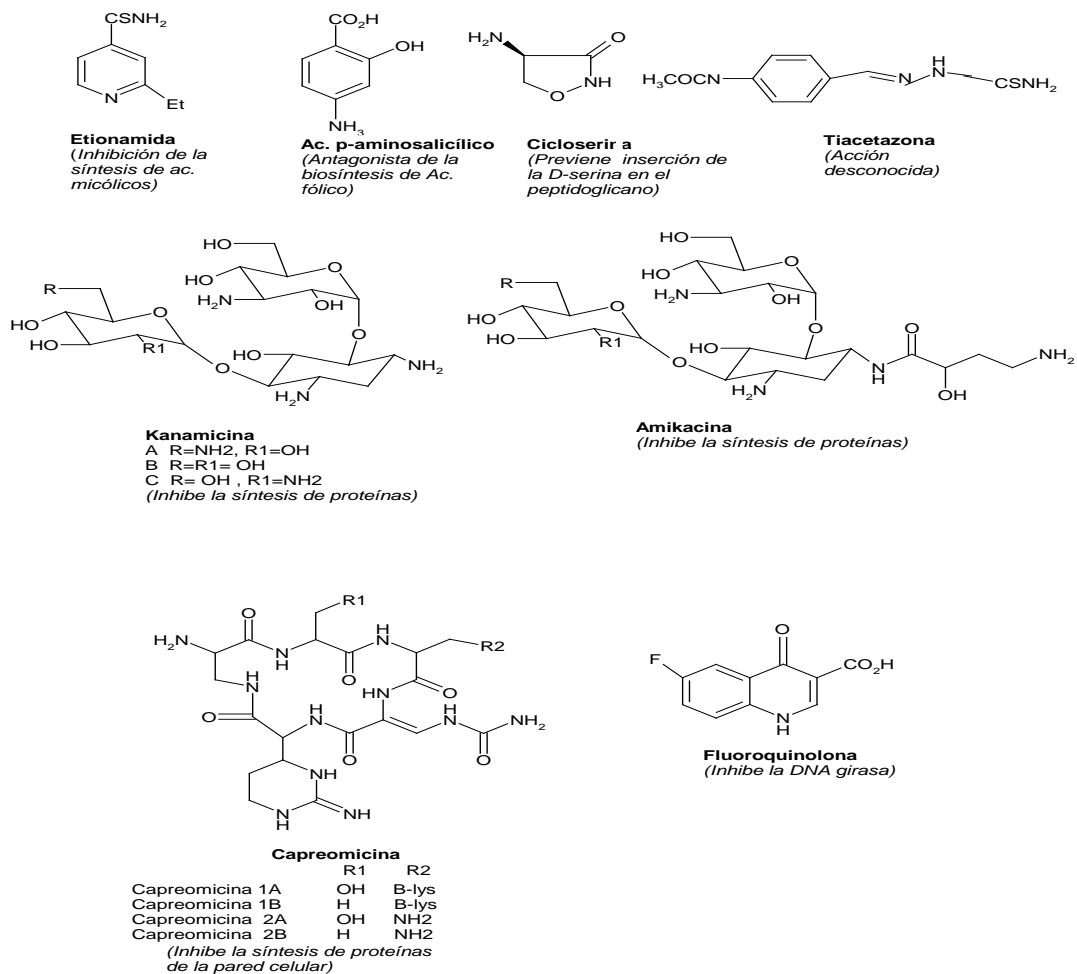


Figura 8. Estructura y mecanismo de acción de los principales antituberculosos de segunda línea.

Para combatir la problemática que representa la TB en el mundo, la OMS desarrolló el programa STOP TB, el cual es un movimiento global de acción social, económica y política que tiene como objetivo detener la expansión y controlar la TB a mediano plazo (2006–2015). El programa contempla a grandes rasgos:

- a) La disminución de la prevalencia y muerte por TB a niveles inferiores a los reportados en la década de los 90's mediante el desarrollo de nuevos fármacos.
- b) Mejorar técnicas de diagnóstico.
- c) La expansión del TAES.
- d) La implementación del TAES-Plus en pacientes MFR.
- e) Mejorar el seguimiento de pacientes TB/VIH.
- f) El desarrollo de vacunas.

- g) Mejorar la comunicación y movilización social.
- h) Capacitar al personal de salud involucrado en estos programas.
- i) Establecer redes de colaboración.

La aplicación de estas estrategias a largo plazo, pretende eliminar la TB como problema de salud alrededor del mundo para el 2050 (**Palomino et al., 2007**).

### **Estado actual sobre el desarrollo de agentes antituberculosos.**

Actualmente, para el tratamiento de la TB se cuenta con fármacos de 1ª y 2ª línea, la combinación de múltiples fármacos es necesaria para prevenir la aparición de cepas resistentes; sin embargo, el mal uso de medicamentos antituberculosos, desapego a la terapia y el escaso desarrollo de fármacos con nuevos mecanismos de acción por más de 40 años (después de la introducción de R al mercado en 1965) (**De Souza et al., 2006; Sharma y Mohan, 2006**) han ocasionado la aparición de cepas XFR, las cuales han rebasado toda clase de medidas preventivas causando altos índices de mortalidad y enorme gasto en las políticas de salud (**Yew y Leung, 2008**).

La prevalencia de la TB y la emergencia de TB-MFR y TB-XFR resaltan la importancia de desarrollar novedosos agentes antituberculosos, ya que de no ser así y continuar con la tendencia actual; la TB podría incrementar su incidencia hasta un 41% en los próximos 20 años (**Tomioka, 2006**). Con el fin de detener esta problemática, científicos, instituciones académicas, industrias farmacéuticas y la Alianza Global para el Desarrollo de Fármacos AntiTB han redoblado esfuerzos en la búsqueda, diseño y evaluación de sustancias activas contra el bacilo tuberculoso, persiguiendo esencialmente los siguientes objetivos: mejorar y/o acortar el tratamiento, contar con una terapia más cómoda para el paciente; mejorar el tratamiento para TB-MFR y proporcionar un terapia efectiva en el tratamiento de la ITBL (**Yew y Leung, 2008; Tomioka, 2006**).



Cabe mencionar que esta búsqueda contempla derivados de fármacos ya existentes y fármacos nuevos, los cuales se encuentran en diferentes etapas de investigación preclínica y clínica (**Sharma y Mohan, 2006; Lenaerts et al., 2008b**). Algunos de los compuestos que destacan en este rubro por su notable acción o que se encuentran en estudios clínicos son: fluoroquinolonas, derivados de la rifamicina, macrólidos, oxazolidinonas, nitroimidazoles, derivados de pirroles, diarilquinolonas, entre otros (**Lenaerts et al., 2008b; Tomioka, 2006**) (Anexo 1).

**Fluoroquinolonas.-** Tienen actividad *in vivo* e *in vitro* contra diversas bacterias incluyendo *M. tuberculosis* MFR. El mecanismo de acción se debe a la inhibición de dos enzimas, la DNA girasa y la topoisomerasa IV, involucradas en los procesos de transcripción, replicación y reparación del DNA de la bacteria. Dentro de estos está la gatifloxacina (GFLX) y moxifloxacina (MFLX) (**O'Brien y Spigelman 2005; De Souza et al., 2006; Tomioka, 2006**).

**Derivados de la rifamicina.-** Son compuestos claves en el tratamiento de TB-MFR, ya que inhiben la síntesis del RNA. Entre las moléculas importantes se encuentran la rifapentina (RPT), rifabutina (RBT), rifalazil (RLZ), rifametano, etc. Las dos primeras (RPT y RBT) han sido aprobadas por la FDA como una alternativa para el tratamiento de TB y para la prevención de TB causada por MAC y para TB/VIH. Rifabutina es más activa (4 a 8 veces) que R, mientras que la RPT es 2 a 4 veces más activa que R. RLZ está en fase II y es 100 veces más activa *in vitro* que R contra cepas de MTB y MAC.

**Macrólidos.-** Claritromicina (CAM) y azitromicina son activos contra enfermedades asociadas al MAC y en casos de TB-MFR. La clofazimina (CFZ), tiene efecto antiTB *in vitro* e *in vivo*, pero produce pigmentación en humanos.

**Oxazolidinonas.-** Figuran linezolide y eperezolide, presentan mínimos efectos tóxicos y potente actividad contra MTB susceptible y MFR. Inhiben la síntesis de proteínas ribosomales, no presenta resistencia cruzada con otros antimicrobianos,

poseen amplio espectro de actividad, buena biodisponibilidad oral y parenteral y no generan resistencia fácilmente.

**Nitroimidazoles.-** Algunos compuestos de este tipo están en estudio, especialmente los derivados del imidazo-oxazol e imidazo-oxazina por su actividad contra MTB y *M. bovis in vitro* e *in vivo*. Una desventaja es que provocan mutagénesis y carcinogénesis por la presencia del grupo nitro. Un ejemplo es CG1 17341 que es activo contra cepas MFR pero es altamente mutagénico. PA-824 o POC-67863 presentan una potente acción contra cepas MFR y activo en casos de ITBL debido a que inhibe la síntesis de proteínas y lípidos de la micobacteria y son menos mutagénicos que CG1 17341, convirtiéndolos en un importante prospecto a futuro.

**Pirroles.-** Destaca el derivado BM 212 por su moderada acción contra MTB sensible y MFR y MAC. Su lanzamiento es reciente y actualmente varios compuestos de este tipo se encuentra en evaluación *in vitro* e *in vivo*.

**Diarilquinolinas.-** De descubrimiento reciente, actúan a nivel de la ATP sintasa de la micobacteria. R207910 (o TMC207) muestra una potente y selectiva actividad *in vitro* en contra de MTB, MAC, *M. kansasii* y *M. fortuitum*. Los resultados hacia este compuesto son tan alentadores que no se descarta en un futuro su inclusión como medicamento de primera línea en el tratamiento de TB.

El desarrollo de nuevos fármacos antiTB continúa en estudio y en la literatura se describen alrededor de 83,000 compuestos naturales y sintéticos que muestran actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis*. En la Tabla 3 se mencionan otros compuestos que están en fase avanzada de investigación (**Tomioka, 2006; Lenearts et al., 2008b**).

Tabla 3. Nuevos agentes antituberculosos que se encuentran en fase de desarrollo.

Tipo de Fármaco o actividad	Fuente u Organización
Inhibidores de la pared celular	Universidad de Colorado
Moléculas multifuncionales	Cumbre
Diaril óxidos	TAACF/ Universidad de Colorado
Dihidrolipoamidas	Univesidad Cornell
Inhibidores de la aciltransferasa	
Dipiperidina SQ-609	Sequella
Econazol	TAACF/ Universidad de Colorado
Inhibidores de la FSA sintasa	FASgen
Hidrazonas	Universidad de Colorado
Inhibidores de la Isocitrato liasa	GlaxoSmithKline
Inhididores de la malato sintasa	GlaxoSmithKline
Análogos de la Mefloquina	TAACF/ Universidad de Colorado
Oxazolidinonas	Pfizer
Inhibidores de la péptido diformilasa	Novartis
Pleuromutilinas	GlaxoSmithKline/ TB Alliance
Riminofenazinas	IMM China /TB Alliance
Inhibidores de la tiolactomicina	NIAID
Inhibidores de la topoisomerasa	GlaxoSmithKline
Inhibidores de la traslocasa	Sequella/Sankyo

TAAC, Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility; NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Tomando de Lenearts *et al.* 2008.

### Lignanos, ¿potenciales fármacos antituberculosos?

Los lignanos, son compuestos de origen vegetal y se caracterizan por la presencia del dímero de fenilpropano ( $C_6C_3$ ) unidos en las posiciones  $\beta$  y  $\beta'$  de la cadena alifática; sin embargo, cuando las unidades de fenilpropano están unidas (carbono-carbono) en una posición diferente, el compuesto recibe el nombre de neolignano (Figura 9). Además, los lignanos se pueden clasificar como: oxineolignanos (dos unidades  $C_6C_3$  unidas en posición diferente a la  $\beta$  y  $\beta'$  por un átomo de oxígeno), ciclolignanos (dos unidades de fenilpropano unidas en posición  $\beta$  y  $\beta'$  y que forman un anillo), cicloneolignanos, sesquilignanos y dilignanos (trímeros y tetrámeros de fenilpropano respectivamente) (**IUPAC, 2000**). A la fecha, se han descrito un gran número de lignanos, sin embargo, debido a los escasos estudios realizados en estos compuestos, se desconoce con certeza su potencial biológico.

El papel biológico de los lignanos en las plantas aún se encuentra bajo discusión ya que se piensa que tienen un papel importante en la defensa de la planta y/o en la regulación del crecimiento de la misma (**Willför et al., 2006; Saleem et al., 2005**).

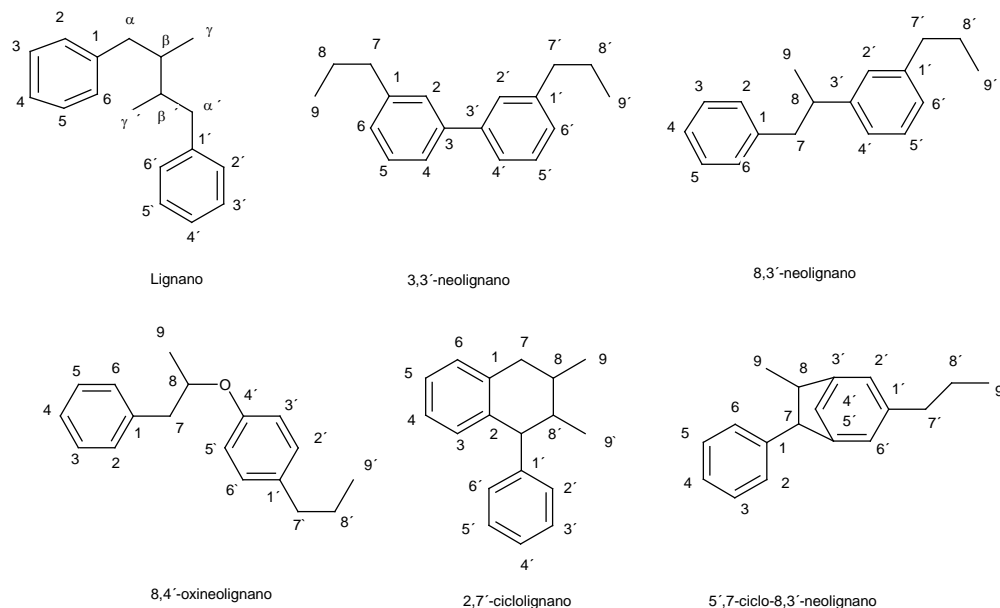
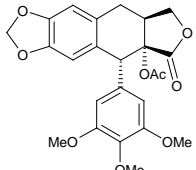
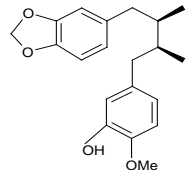
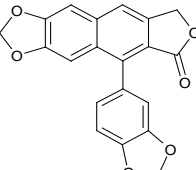
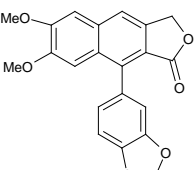
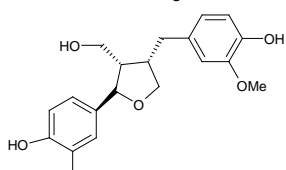
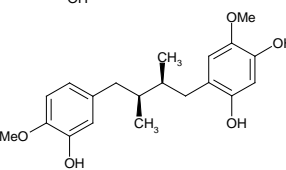
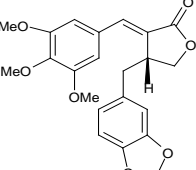


Figura 9.- Estructura de lignanos, neolignanos, ciclolignanos, cicloneolignanos y oxilignanos.

El papel biológico de los lignanos en las plantas aún se encuentra bajo discusión ya que se piensa que tienen un papel importante en la defensa de la planta y/o en la regulación del crecimiento de la misma (**Willför et al., 2006; Saleem et al., 2005**). Actualmente, el interés hacia esta clase de compuestos se centra en su posible aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria, debido a que han demostrado una gran variedad de propiedades biológicas, por ejemplo: antioxidantes, antitumorales, insecticidas, antimicrobianos, inmunosupresores, antiinflamatorios, antifúngicos, entre otros (**Kónya et al., 2001; Garcez, et al., 2005; Saleem et al., 2005**) (Tabla 4).

Tabla 4.- LignanOs aislados de diversas plantas medicinales y su efecto biológico.

<b>Fuente</b>	<b>Compuesto Obtenido</b>	<b>Efecto terapéutico</b>	<b>Estructura</b>
<i>Commiphora erlangeriana</i>	<b>Erlangerina C</b> , Erlangerina D, *Podofilotoxina, etc.	Antitumoral	
<i>Machilus tunbergii</i>	<b>Macelignano</b> , Oleiferina, etc.	Antitumoral	
<i>Pterocarpus santanilus</i>	<b>Taiwanina C</b>	Antiinflamatorio	
<i>Phyllanthus piscatorum</i>	<b>Justicidina B</b>	Antimicrobiano	
<i>Taxus baccata</i>	<b>(-)-Taxiresinol</b>	Antifúngico	
<i>Saururus chinensis</i>	<b>Ácido 2'-hidroxidihidroguairético</b>	Antioxidante	
<i>Bupleurum scorzonerifolium</i>	<b>Nemerosina</b>	Inmunosupresor	

\* Se utilizan en la medicina derivados semi-sintéticos de la podofilotoxina (Saleem *et al.*, 2005).

Respecto a la actividad antiTB de estos compuestos, a la fecha sólo se ha descrito el efecto antimicobacteriano *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv del dehidrobenzofurano-14-acetilviscidona aislado de propóleo chileno (CMI= 64 µg/mL) y del (+)-1-hidroxi-2,6-bis-*epi*-pinoresinol aislado de *Valeriana laxiflora*

(CMI= 127  $\mu\text{g/mL}$ ) (**Gu et al., 2004; Valcic et al., 1999**). Para los neolignanós, se han reportado actividades biológicas como: antileucémicos, antifúngicos, antioxidantes (**Kónya et al., 2001**), citotóxicos (**Garcez et al., 2005; Saleem et al., 2005**). Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó el efecto antimicrobiano *in vitro* de la licarina A, eupomatenoide 7 y licarina B (Figura 10) contra *M. tuberculosis* H37Rv. Estos neolignanós fueron aislados del extracto hexánico y metanólico de *Aristolochia taliscana* por fraccionamiento químico biodirigido (**León, 2005; Luna, 2005**). Un trabajo adicional realizado por **Calderón (2008)** reporta el efecto de estos compuestos, contra cepas de *M. tuberculosis* H37Rv monoresistentes, aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR y dos cepas de micobacterias atípicas (Tabla 5) (**Calderón, 2008**). Por otro lado, se determinó la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de la licarina A, licarina B, extracto y de la mezcla de los tres neolignanós en ratones Balb/C, siendo >1760 mg/kg para todas las muestras (**Datos en proceso de publicación**). Cabe mencionar que de los tres compuestos evaluados, el más activo fue la licarina A con CMI de 3.12 a 12.5  $\mu\text{g/mL}$ .

Otras actividades biológicas descritas para la licarina A es el efecto antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano, quimiopreventivo y como inhibidor de enzimas implicadas en el metabolismo de fármacos (**Li et al., 2008**).

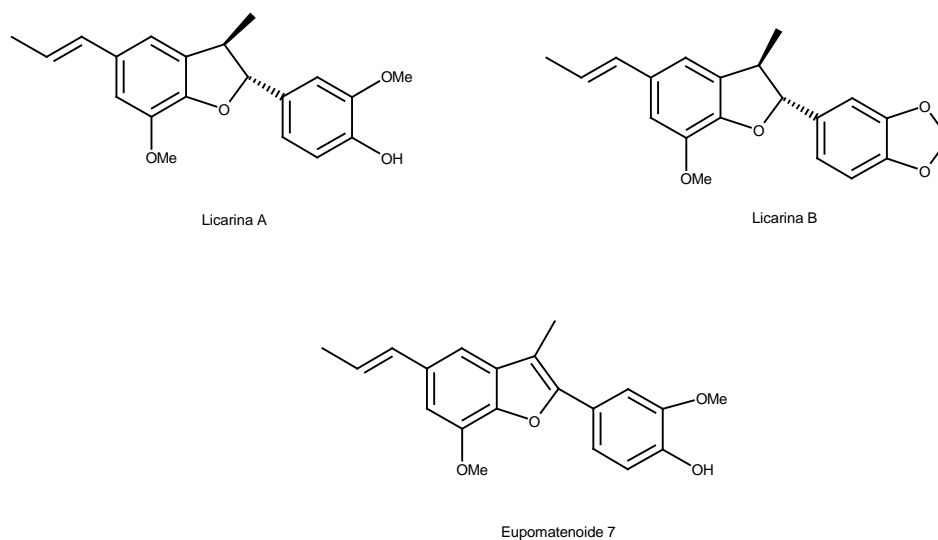


Figura 10.- Neolignanós aislados del extracto hexánico de *A. taliscana* por fraccionamiento químico biodirigido

Tabla 5.- Efecto antimicobacteriano *in vitro* de neolignanos aislado de *A. taliscana* contra cepas de *M. tuberculosis* y contra micobacterias atípicas.

Micobacterias atípicas	Patrón de Resistencia	CMI (µg/mL)	
		Eupomatenoide 7	Licarina A
<i>M. fortuitum</i>		50	6.25
<i>M. non-chromogenicum</i>		25	12.5
<b><i>M. tuberculosis</i></b>			
H37Rv (ATCC 27294)	Sensible a SIRE	25	25
<b>Monorresistente</b>			
INH-R (ATCC35822)	I	25	3.12
RIF-R (ATCC33838)	R	12.5	6.25
STR-R (ATCC35820)	S	25	3.12
EMB-R (ATCC35837)	E	25	6.25
<b>Aislados clínicos MFR*</b>			
MTY 663	S, I, R, E, Z	50	12.5
MTY 675	S, I, E	50	12.5
MTY 673	S, I, R, E, Z	50	12.5
MTY 282	I, S, E, Z	50	12.5

\* Patrón de farmacoresistencia determinada por el método MABA.

### El modelo experimental de la TB progresiva

La TB es una enfermedad muy compleja en la que participan factores del huésped, de la bacteria y del medio ambiente, por lo cual es necesario el desarrollo de modelos experimentales que asemejen lo más posible a la enfermedad humana.

Existen varios modelos experimentales de TB sobre todos los establecidos en ratones, cobayos y conejos (Tabla 6); sin embargo, los dos últimos presentan el inconveniente de ser animales genéticamente abiertos y relativamente grandes; por lo que existe el problema de respuesta inmune heterogénea y del espacio requerido para albergar a una gran cantidad de animales. Por estos motivos se considera al ratón como una especie muy conveniente para la reproducción experimental de la TB y para evaluar el potencial antituberculoso de diversas sustancias; además, recientemente se han desarrollado ratones knockout para la expresión de determinados genes que juegan un papel importante en el control del padecimiento, permitiendo así el desarrollo de nuevos estudios farmacológicos (Hernández-Pando *et al.*, 2004; Lenaerts *et al.*, 2008b). Actualmente, el desarrollo de modelos animales para evaluar la acción terapéutica contra el bacilo tuberculoso ha tenido grandes avances, por ejemplo: la realización de estudios

farmacocinéticos y farmacodinámicos que permiten determinar la absorción, biodisponibilidad, biotransformación, distribución en tejidos, eliminación del compuesto administrado y la eficacia de nuevos fármacos antituberculosos, además, el desarrollo de estudios bajo condiciones de hipoxia permite evaluar compuestos que actúen contra ITBL (**Lenaerts et al., 2008b**).

Tabla 6.- Modelos usados para determinar actividad antiTB de nuevos fármacos (Lenaerts et al., 2008b).

<b>Modelo Animal</b>	<b>Usos</b>
<b>Ratón</b> (Usualmente se utilizan ratones de la cepa C57BL/6 o Balb/C)	En la determinación de PK/PD Estudios de Toxicidad <i>in vivo</i> y de dosis máxima tolerada. Ensayo de actividad bactericida Ensayo de régimen terapéutico
Ratones knockout para INF- $\gamma$	Ensayo preliminar de actividad farmacológica <i>in vivo</i> .
Ratones knockout para GM-CFS	Ratones incapaces de prevenir la reactivación de la enfermedad.
Wayne <i>in vivo</i>	Determinar la replicación del bacilo bajo condiciones pobres de oxígeno.
<b>Rata</b>	Ensayos de farmacocinética.
<b>Cobayos</b>	Terapia estándar.

GM-CFS= Factor colonia-estimulante de granulocito-macrófago (GM-CFS).

En el modelo murino de TB pulmonar progresiva, la infección se induce por inyección intratraqueal con un determinado número de micobacterias permitiendo un mejor control de la dosis. La ventaja que este modelo ofrece en comparación con los demás es el utilizar una vía natural de infección, lo que permite reproducir con semejanza la sintomatología clínica observada en pacientes con TB pulmonar activa.

El modelo de TB progresiva presenta dos fases durante el desarrollo de la enfermedad. La primera es la etapa temprana, la cual corresponde al primer mes de infección y se caracteriza por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por macrófagos y linfocitos Th-1 en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios y la formación sistemática de granulomas a partir de la segunda semana, permitiendo el control temporal de la enfermedad. La segunda etapa corresponde a la fase avanzada o progresiva, la cual se caracteriza por el



incremento en el número de micobacterias vivas en pulmón, necrosis y extensa fibrosis intersticial, que en conjunto provocan la muerte. Durante esta etapa es evidente la presencia de linfocitos de tipo Th-2, los cuales contrarrestan la actividad protectora de las células Th-1 provocando la progresión de la enfermedad y es a partir de este momento cuando se inicia la evaluación de las sustancias **(Hernández-Pando *et al.*, 2004; 2006)**.

## HIPÓTESIS

- El efecto *in vitro* de la licarina A contra *M. tuberculosis* H37Rv se reproducirá en el modelo de TB progresiva reduciendo las UFC'S y la neumonía. Además presentará nulo efecto tóxico subagudo.

## OBJETIVOS GENERALES

- Evaluación preliminar del efecto antituberculoso de la licarina A en el modelo murino de tuberculosis progresiva y determinar su efecto tóxico subagudo en ratones.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener licarina A a partir de fracciones primarias del extracto metanólico de *Aristolochia taliscana* y *A. grandiflora*, mediante aplicación de cromatografía en capa delgada en fase normal y técnicas de recristalización.
- Establecer inequívocamente la estereoquímica de la licarina A, aislada de *A. taliscana*.
- Determinar la toxicidad subaguda de la licarina A en ratones Balb/C administrando el compuesto por vía subcutánea cada tercer día durante 48 días mediante la realización de estudios de química sanguínea, biometría hemática y análisis histológicos (hígado, riñón, bazo y pulmón).
- Evaluar en forma preliminar el efecto antituberculoso de la licarina A en el modelo murino de tuberculosis progresiva determinando UFC's y áreas neumónicas al día 30 y 60 de tratamiento.

## METODOLOGÍA

### 1. Purificación de la licarina A

Para la obtención de éste compuesto se realizó la siguiente metodología.

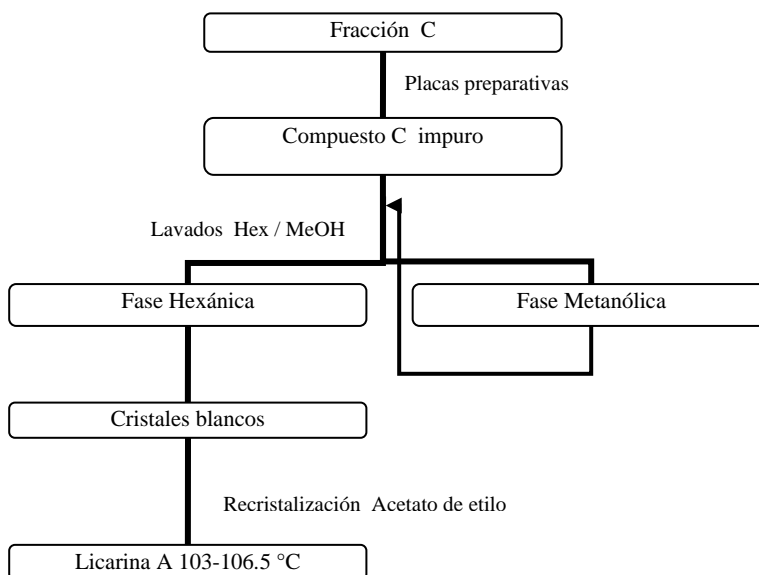
#### 1.1 Obtención de la fracción C

Se realizó cromatografía de capa fina (ccf) de diversas fracciones primarias obtenidas de un fraccionamiento previo de *A. taliscana* y *A. grandiflora*. La ccf fue eluida con el sistema  $\text{CHCl}_3$  + 5 gotas de MeOH, reuniendo todas aquellas fracciones que presentaron un perfil cromatográfico semejante a la referencia de licarina A obtenida por **Calderón, 2008**. Mediante este proceso, se obtuvieron 1.397g de muestra (fracción C) que contenían el compuesto de interés en forma impura.

#### 1.2 Purificación de la fracción C

La fracción C se sometió a proceso de purificación empleando placas preparativas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> de 20x20 cm (Merck, 1.05715), en cada una se sembraron 25 mg de muestra, previamente disuelta en  $\text{CHCl}_3$ . Después, las placas se eluyeron con sistema  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  99:1 y fueron observadas en una cámara de UV a 254 nm detectando la banda de interés, la cual se desadsorbió utilizando  $\text{CHCl}_3$  bidestilado (lavados 6x40 mL c/u), posteriormente el disolvente se eliminó a presión reducida empleando un rotaevaporador (Büchi RE 111) acoplado a una bomba de vacío (Büchi Vac-V513) y a un recirculador (Eco 20); el residuo obtenido (color crema) se purificó mediante lavados con hexano y metanol destilado y se sometió a proceso de recristalización con acetato de etilo destilado (Diagrama 1).

Diagrama 1. Metodología realizada para la purificación de la licarina A



### 1.3 Determinaciones químicas.

Una vez concluidos los lavados y la recristalización del compuesto, se determinó la apariencia, punto de fusión del mismo (utilizando un equipo Fisher-Johns y un equipo digital Büchi® B-540) y se realizó ccf empleando como sistema de elución  $\text{CHCl}_3$  + 5 gotas de MeOH y se comparó el  $R_f$  del compuesto obtenido contra una referencia pura e identificada previamente. Además, se enviaron 10 y 5 mg de compuesto para análisis de resonancia magnética nuclear protónica de 300 MHz (RMN- $^1\text{H}$ ) y espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE), respectivamente, 2 mg para análisis de dicroísmo circular (DC) y adicionalmente se realizó el análisis por UV con el excedente de compuesto enviado a DC y 5 mg para rotación óptica (RO). La RMN- $^1\text{H}$  se determinó en un espectrómetro Bruker-Avance de 300 MHz, empleando tetrametilsilano como referencia interna y el compuesto se solubilizó en  $\text{CDCl}_3$ . El espectro de masas por IE se determinó en un Jeol AX505HA, el análisis de DC se realizó en un espectropolarímetro JASCO J720 a 25°C en MeOH y el análisis de UV en un Shimadzu U160. La RO se determinó en un polarímetro Perkin-Elmer 343 a 25°C y el compuesto se solubilizó en  $\text{CHCl}_3$  a la concentración de 2.5 mg/mL.

## 2. Determinación de la toxicidad subaguda de la licarina A

### 2.1 Diseño del experimento.

Para la realización de este experimento se utilizaron 24 ratones macho de la cepa Balb/C con un peso de  $20 \pm 2$  g. Los cuales fueron seleccionados en forma aleatoria y agrupados de la siguiente forma:

- Grupo A (control negativo): 8 animales sin tratamiento alguno.
- Grupo B (control de vehículo): 8 ratones a los cuales se les administró por vía subcutánea 80  $\mu$ L (en aplicaciones de 40  $\mu$ L c/u) de aceite de olivo extravirgen (Sigma) previamente filtrado (utilizando un filtro estéril marca Acrodisc Syringe filter de 0.2  $\mu$ m).
- Grupo C (tratados 5V): 8 ratones a los que se les administró dosis de 5 mg/kg de licarina A disueltos en 80  $\mu$ L de aceite de olivo (previamente filtrado) mediante sonicación por 30 minutos. Dada la naturaleza química del compuesto éste únicamente se solubilizó en dicho vehículo.

Cada grupo de animales se colocó en cajas independientes y se mantuvieron durante el periodo de tratamiento en el Bioterio del CMN S. XXI a 27°C con ciclos de 12 horas luz/oscuridad y con libre acceso de alimento y agua. El manejo de los animales de experimentación se realizó de acuerdo a los estatutos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) revisada en 2001. La administración del compuesto y del vehículo se realizó cada tercer día durante 48 días, finalmente los animales se dejaron en ayuno de 12 h antes del día de sacrificio. Durante el periodo de tratamiento, se llevó un registro semanal del peso ponderal de los ratones, con el objetivo de detectar alguna anomalía o alteración sobre este parámetro. Al concluir el tiempo de experimentación, los animales fueron pesados y anestesiados con éter etílico, posteriormente se sacrificaron por exsanguinación y se obtuvo muestra sanguínea para realizar estudios de biometría hemática y química sanguínea, además, se extrajeron y pesaron algunos órganos (hígado, bazo, riñón, pulmón) y se llevo a cabo el análisis histológico de los mismos.

Por último, los residuos biológicos de los animales experimentales fueron incinerados en el mismo bioterio.

## *2.2. Análisis de los parámetros de biometría hemática, química sanguínea e histológicos.*

### *2.2.1 Biometría hemática.*

El análisis hematológico se realizó utilizando un equipo automatizado Coulter T 890 y se determinaron los siguientes parámetros: hematocrito, eritrocitos, hemoglobina, volumen corpuscular medio (V.C.M.), concentración de hemoglobina corpuscular media (C.H.C.M), plaquetas, eosinófilos, monocitos, leucocitos, linfocitos, bandas y basófilos.

### *2.2.2 Química sanguínea.*

Esta determinación se efectuó en suero utilizando un equipo semiautomatizado Selectra II (Italab), empleando reactivos comerciales Randox y se cuantificaron los siguientes elementos: Glu= glucosa, BT= bilirrubina total, BD= bilirrubina directa, urea, Trig= triglicéridos, Col Tot= colesterol total, LDL= colesterol de baja densidad, HDL= colesterol de alta densidad, ALP= fosfatasa alcalina, Creat= creatinina, Ac Ur= ácido úrico, GPT= transaminasa glutámico-pirúvica, gGT= gamma glutamil transferasa, GOT= transaminasa glutámico-oxalacética.

### *2.2.3 Análisis histológicos.*

Este análisis se realizó en los siguientes órganos: hígado, pulmón, riñón y bazo de cada ratón, con el objetivo de detectar anomalías histológicas. Los órganos fueron pesados y posteriormente se colocaron en tubos falcon (NUNC 50 mL), los cuales contenían 25 mL de formol al 10% para su conservación hasta su análisis. Cabe mencionar, que los pulmones fueron perfundidos por la tráquea con formol al 10 % y sumergidos en el mismo fijador. Cada tejido se deshidrató en etanol grado histológico y xilol (J.T.Baker®) y embebió en parafina Tissue-Tek VIP (Sakura Finetek®). Posteriormente, los tejidos fueron cortados parasagitalmente (3 µm) con un microtomo LEICA, teñidos con hematoxilina-eosina y observados en un microscopio (LEICA® DMLS) acoplado a una cámara digital (JVC® TK-C1380) y a un equipo analizador de imágenes (Q Win 5000, LEICA).

### 2.3 Análisis estadístico

Los resultados del estudio de química sanguínea y de biometría hemática fueron analizados mediante un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA-1) utilizando el programa Sigma Stat 3.5. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $M \pm DS$ ). En caso de observarse diferencia significativa se realizó un análisis t-student para comparar entre los grupos tratados con respecto al control.

### 3. Evaluación preliminar del efecto antituberculoso *in vivo* de la licarina A

Esta actividad se determinó en el modelo de TB pulmonar progresiva en ratón descrito previamente por **Hernández-Pando y cols (1996; 2004; 2005)**. Como primer paso se indujo la TB con *M. tuberculosis* H37Rv. El experimento se llevó a cabo bajo estrictas condiciones de bio-seguridad, en una campana de flujo laminar P3 y en concordancia con los lineamientos del Comité de Ética para el Manejo de Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Salvador Zubirán y de acuerdo a la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999.

#### 3.1 Crecimiento del agente infeccioso

El crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) se hizo en medio Proskauer y Beck modificado por Youmans (PBY) a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % por cuatro semanas. Después de este periodo, la biomasa bacteriana se colectó por centrifugación (3500 rpm x 20 min), al sedimento (paquete de micobacterias) se le adicionó 5 mL de la mezcla PBS/Tween 80 al 0.05%; posteriormente, fueron incubadas bajo las mismas condiciones por 24 h más. Transcurrido este tiempo, a la biomasa de micobacterias se le agregaron perlas de vidrio estériles para desintegrar los agregados mediante agitación vigorosa por un minuto y se dejó reposar otro minuto, este proceso se repitió 10 veces. Después, la suspensión de micobacterias se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. El proceso de desintegración se repitió nuevamente y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min, con la finalidad de obtener una suspensión de micobacterias totalmente

separadas, el sobrenadante se colectó y centrifugó a 3500 rpm por 20 min. El paquete celular se lavó dos veces con PBS estéril, después se resuspendió en 30 mL de PBS para determinar viabilidad celular.

### *3.2 Determinación de viabilidad celular*

De la suspensión de micobacterias (obtenidas en el paso anterior) se realizaron diluciones seriadas 1:50, 1:100 y 1:200 con PBS a pH 7.4. De cada dilución se tomaron 25  $\mu$ L y se les agregó 25  $\mu$ L de solución DAF [12.5  $\mu$ L de diacetato de fluoresceína (0.5 g en 100 mL de acetona fría) más 1 mL de PBS]. Unas gotas de esta mezcla se colocaron en la cámara de Neubauer, se realizó la observación al microscopio de fluorescencia donde se contabilizaron las micobacterias que metabolizaron el colorante y se ajustó la suspensión de micobacterias a la concentración de  $2.5 \times 10^5$  cel/100  $\mu$ L con PBS.

### *3.3 Inducción de tuberculosis pulmonar crónica en ratones*

El experimento se realizó con ratones machos ( $\pm 30$  g) Balb/C singénicos, se colocaron 10 animales en jaulas equipadas con microaisladores y filtros, las cuales fueron conectadas a un sistema de presión negativa con flujo constante y filtración de aire una vez inoculados. Cada animal fue anestesiado con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (56 mg/kg) y fijado boca arriba en una tabla con la finalidad de exponer la tráquea por medio de una incisión previa en la cara anterior del cuello, en la cual se administraron  $2.5 \times 10^5$  cel (100  $\mu$ L) de una suspensión de micobacterias usando una cánula recta. Después de inocular cada animal, la incisión fue suturada y los ratones se colocaron en posición vertical hasta su recuperación. Los animales se colocaron en las jaulas con microaislador, y mantuvieron en observación durante dos meses con libre acceso al alimento y agua, tiempo en el cual desarrollan la TB pulmonar avanzada similar a la observada en pacientes que acuden a consulta médica (**Hernández-Pando et al., 1996; 2005; 2006**).



### 3.4 Tratamiento de animales con licarina A

Los animales con TB progresiva (60 días después de la infección) fueron agrupados de la siguiente forma:

- **Grupo I:** 8 animales que recibieron únicamente vehículo (aceite de olivo extra virgen SIGMA) previamente filtrado (utilizando un filtro estéril marca Acrodisc Syringe filter de 0.2  $\mu\text{m}$ ).
- **Grupo II:** 8 animales tratados con licarina A (dosis 5 mg/kg), disuelta en aceite de olivo extra virgen (previamente filtrado) por sonicación de 30 min.

Los animales de cada grupo fueron administrados vía intradérmica (vehículo y licarina A) cada tercer día. Cuatro animales por grupo fueron sacrificados a los 30 y 60 días de tratamiento. Al finalizar cada periodo de tratamiento, los ratones fueron anestesiados con éter etílico (EE) y sacrificados por exanguinación para obtener los pulmones de cada animal.

### 3.5 Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Un pulmón (derecho o izquierdo) de cada ratón se colocó en criotubos NUNC de 1.8 mL y se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. El tejido obtenido de cada animal fue homogenizado por separado en tubos estériles conteniendo 300  $\mu\text{L}$  de PBS/Tween 80 al 0.05% en un Polytron (Kinematica, Luzern, Switzerland) para finalmente llevar el homogenizado a un volumen de 1 mL con la misma solución. De este homogenizado se realizaron tres diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) y 10  $\mu\text{L}$  de cada dilución se sembraron por duplicado en cajas Petri provistas de 10 mL de agar Middlebrook 7H10 (Difco) enriquecido con OADC (ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa). Las cajas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en presencia de  $\text{CO}_2$  al 5% y humedad al 70% por 21 días, posterior al tiempo de incubación se contabilizó el número UFC's con ayuda de un microscopio estereoscópico Stem 2000 (ZEISS®). Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa Sigma Stat 3.5 y se reportan como la  $M \pm DS$  en valores de millones de micobacterias por pulmón.

### *3.6 Observación de área neumónica.*

Se utilizó el pulmón izquierdo o derecho de cada animal, dicho órgano fue perfundido vía traqueal con etanol absoluto y fueron sumergidos en el mismo disolvente durante 48 horas para su fijación. Posteriormente, estos tejidos se deshidrataron en alcohol etílico absoluto y xilol (J.T. Baker), incluyeron en parafina Tissue-Tek VIP (Sakura Finetek®), realizaron cortes parasagiales de 3  $\mu\text{m}$  de grosor de c/u (mediante un microtomo LEICA) y fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Al término de este proceso se observó la presencia de neumonía en un sistema analizador de imágenes automatizado Q Win 5000, LEICA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recientemente, la búsqueda de agentes antituberculosos ha recobrado la atención de diferentes grupos de investigación a nivel mundial, debido al problema que representa la rápida diseminación de TB-MFR y TB-XFR (**Jain y Mondal, 2008**). A pesar de contar con fármacos de primera y segunda línea para tratar la enfermedad, muchos de los casos actuales no responden a los tratamientos establecidos mediante el programa TAES y TAES-Plus, incluso para los casos XFR no existe alternativa terapéutica (**Yew y Leung, 2008; Zager y McNerney, 2008; Jain y Mondal, 2008**). Por otro lado, el desarrollo de agentes antituberculosos fue escaso durante mucho tiempo y a la fecha sólo dos nuevos compuestos (RBT y RPT) han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de la enfermedad. Estos fármacos no son de uso extenso y solo se emplean para tratar casos de TB-MFR y aquellos provocados por MAC (**O'Brien y Spigelman, 2005; Tomioka, 2006; Tomioka y Namba, 2006**). En la literatura científica se describen numerosos compuestos, tanto de origen natural como sintéticos, con importante actividad *in vitro* (**Cantrell et al., 2001; Tomioka H, 2006; Okunade et al., 2004; O'Brien y Spigelman 2005; Lenaerts et al., 2008b**), pero son escasos los trabajos que describen el potencial antituberculoso de estos compuestos en modelos *in vivo* (**Hernández-Pando et al., 2005; Dinakaran et al., 2008; Lenaerts et al., 2008a; Villar et al., 2008; Sotver et al., 2000**) y los que existen

son principalmente derivados de fármacos de primera línea (I, R, S, E). Así mismo, pocos trabajos describen la toxicidad subaguda de compuestos puros de origen natural.

Dado el problema que representa la TB a nivel mundial y tomando en cuenta que México no escapa a esta realidad, nuestro grupo de trabajo desarrolla una línea de investigación permanente sobre el potencial antituberculoso de las plantas medicinales de México, como resultado de esta búsqueda, a la fecha se cuenta ya con candidatos potenciales para el tratamiento de la TB como la licarina A, licarina B y eupomatenoides 7.

Estos neolignanos obtenidos del extracto hexánico o metanólico de las raíces de *A. taliscana* por fraccionamiento químico biodirigido, inhibieron moderadamente el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv (Léon, 2005). Al evaluar estos compuestos contra cepas monorresistentes de *M. tuberculosis* H37Rv y contra aislados clínicos de *M. tuberculosis* MFR, se observó que la licarina A fue el más activo, mostrando valores de CMI de entre 3.12 a 12.5 µg/mL (Calderón, 2008) (Tabla 5, antecedentes). Dado el efecto antimicobacteriano observado, se procedió a determinar la DL<sub>50</sub> de la licarina A, mediante el método de Lorke (1983) obteniéndose un valor >1760 mg/kg.

### **Obtención de la licarina A**

Para el desarrollo del presente trabajo fue necesario obtener mayor cantidad del compuesto puro. A partir de 1.397 g de fracción que contenía licarina A se realizaron cromatografías de tipo preparativa y procesos de recristalización con acetato de etilo, mediante este procedimiento se obtuvieron 366.9 mg de licarina A con diferentes grados de pureza corroborado mediante ccf (Figura 11).

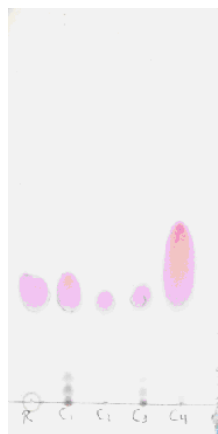


Figura 11.- Ccf de licarina A purificadas por cromatografía de tipo preparativa y recrystalización.

Sistema de elución:  $\text{CHCl}_3$  + 5 gotas MeOH,  
 Revelador:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%  
 Muestras: R=Referencia de licarina A, C1= licarina A fracción 1, C2=licarina A fracción 2, C3 y C4 se reunieron en las fracciones C1 y C2 según su perfil cromatográfico.

La identificación química del compuesto se realizó mediante el análisis de sus datos de RMN- $^1\text{H}$ , EM-IE (ANEXO 2 Y 3, Tabla 7 y 8), UV, DC y RO y por comparación con los datos previamente descritos (Enríquez *et al.*, 1984; León, 2005; Li y Yang, 2007, 2008; Phan *et al.*, 2006). Cabe mencionar, que en la literatura se describen isómeros para el compuesto, la (+)-licarina ó (+)-dehidrodiisoeugenol, la isolicarina y (-)-licarina A (Figura 12) aislados de *Myristica fragans* (Li y Yang, 2007, 2008) y de *Machilus odoratissima* (Phan *et al.*, 2006). En este trabajo se decidió determinar inequívocamente la estereoquímica del compuesto, analizando el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , el resultado de RO y el DC del compuesto obtenido. Cabe mencionar, que a la fecha solo se reporta la presencia de licarina A en algunas especies de *Aristolochia*, sin definir la estereoquímica del mismo (Enríquez *et al.*, 1984; León, 2005; Abe *et al.*, 2002).

Tabla 7.- Comparación de los desplazamientos químicos en ppm de la licarina A en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ .

Protón	Licarina A	Licarina A (León, 2005)
2	5.11, <i>d</i> , $J_{2-3}= 9.45$ Hz	5.09
3	3.49-3.39, <i>dq</i> , $J_{3-\text{Me}}= 6.7$ Hz, $J_{3-2}= 9.3$ Hz	3.39-3.47; $J_{3-\text{Me}}= 6.72$ Hz, $J_{3-2}= 9.3$ Hz
4	6.773, <i>d</i> , $J_{4-6}= 6.3$ Hz	6.77; $J_{4-6}=6.15$ Hz
6	6.773, <i>d</i> , $J_{6-4}= 6.3$ Hz	6.77; $J_{6-4}=6.15$ Hz
2'	6.972, <i>dd</i>	6.97
5'	6.898, <i>dd</i>	6.897
6'	6.891, <i>dd</i>	6.892
$\alpha$	6.36, <i>dd</i> , $J_{\alpha-\beta}=15.6$ Hz, $J_{\alpha-\gamma}= 1.5$ Hz	6.36; $J_{\alpha-\beta}=15.84$ Hz, $J_{\alpha-\gamma}= 1.77$ Hz
$\beta$	6.04-6.16, <i>qd</i> , $J_{\beta-\alpha}=15.6$ Hz, $J_{\beta-\gamma}= 6.6$ Hz	6.04-6.16, $J_{\beta-\alpha}= 15.7$ Hz, $J_{\beta-\gamma}= 6.45$ Hz
$\gamma$	1.86, <i>d</i> , $J_{\gamma-\alpha}= 1.62$ Hz, $J_{\gamma-\beta}= 6.57$ Hz	1.86, $J_{\gamma-\alpha}= 1.74$ Hz, $J_{\gamma-\beta}= 6.72$ Hz.

<b>CH<sub>3</sub> (3)</b>	<b>1.37, d, J<sub>3-Me</sub> = 6.81 Hz</b>	<b>1.3, J<sub>3-Me</sub> = 6.75 Hz</b>
OCH <sub>3</sub>	3.87, s	3.87
OCH <sub>3</sub> (3')	3.89, s	3.89
<b>OH (4)</b>	<b>5.62, s</b>	<b>5.62</b>

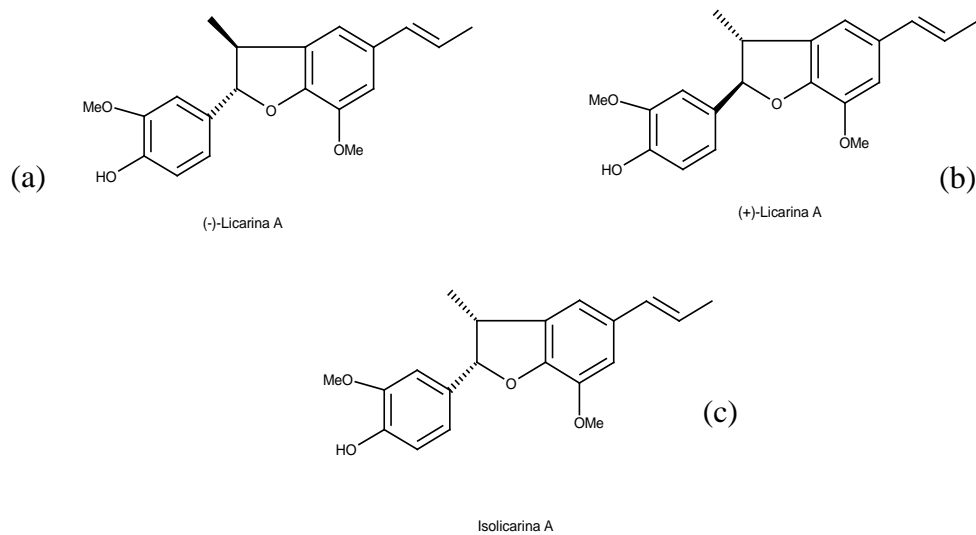


Figura 12.- Estructura química de los isómeros de licarina A. (-)-licarina A (a), (+)-licarina ó (+)-dehidrodiisoeugenol (b) e isolicarina A (c).

Los centros quirales que influyen en la estereoquímica de la licarina A son los C-2 y C-3 (Figura 12). En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, se observa un doblete en  $\delta$  5.09 con constante de acoplamiento ( $J$ ) = 9.45 Hz, que corresponde al H ubicado en C-2, el valor de la  $J$  es similar al reportado para la (+)-licarina y para la (-)-licarina A ( $J$  = 9.6 Hz) aislado de *Magnolia kachirachirai* (El-Ferally *et al.*, 1982), de *Myristica fragrans* ( $J$  = 9.0 Hz) (Li y Yang, 2007), de *Krameria cystisoides* ( $J$  = 9.3 Hz) (Achenbach *et al.*, 1987), de *Machilus odoratissima* ( $J$  = 9.5 Hz) (Phan *et al.*, 2006) y al aislado del género *Aristolochia* ( $J$  = 9.5 Hz) (León 2005; Enríquez *et al.*, 1984). Además, odoratisol A, autrobailgnano 7 son estructuras semejantes a la (-)-licarina A obtenidos a partir de *M. odoratissima* (Phan *et al.*, 2006). La comparación de los valores de  $J$  nos permiten proponer que el isómero aislado en este trabajo, corresponde a la (-)-licarina (Figura 13).

Por otro lado, el análisis del espectro de DC (ANEXO 4) nos muestra un efecto Cotton positivo a 237 nm (+) y otro negativo a 267 nm (-), lo que indica que en la molécula existen dos centros quirales. Estos datos concuerdan con lo reportado por **Phan et al., 2006**. Los máximos de absorción en UV, así como el patrón de fragmentación del compuesto son semejantes a los previamente descritos en la literatura para el (-)-licarina A (Tabla 8, ANEXO 3 y 5). Otro análisis que nos permitió determinar la estereoquímica del compuesto, fue el valor de la rotación óptica el cual fue negativo ( $[\alpha]_D^{25} = -0.159$ ), este dato coincide con lo reportado para la (-)-licarina A ( $[\alpha]_D^{25} = -44.0$ ) aislada de *M. odoratissima* (**Phan et al., 2006**) y para el producto de síntesis ( $[\alpha]_D^{25} = -44.0$ ) (**Nascimento et al., 2000**) cuya estereoquímica para el C-2 y C-3 es S.

Tabla 8.- Resultados de los estudios de EM-IE, DC, UV y RO de la licarina A.

Compuesto	EM-IE (m/z)	DC (nm)	UV (nm)	RO	Referencia
*(-)-Licarina A	326(100,M <sup>+</sup> ), 311([M-Me] <sup>+</sup> ), 309([M-OH] <sup>+</sup> ), 137([4-hidroxi-3-metoxifenilmetileno] <sup>+</sup> )	237 (+), 267(-)	$\lambda_{\max}=219$ y 274		
(+)-Licarina A	326(100,M <sup>+</sup> ), 311([M-Me] <sup>+</sup> ), 309([M-OH] <sup>+</sup> ), 295([M-MeO] <sup>+</sup> ), 264([M-2MeO] <sup>+</sup> ), 147([3-metoxi-5-(prop-1enil)fenil] <sup>+</sup> ) 137([4-hidroxi-3-metoxifenilmetileno] <sup>+</sup> )	225 (-), 266 (+), 307 (-)	$\lambda_{\max}=218$ y 274	+18.0 °	Li y Yang, 2007.
(+)-Licarina A	NR	275 (+), 222 (-)	$\lambda_{\max}=219$ y 273		Achenbach et al., 1987.
Licarina A	326(100,M <sup>+</sup> ), 311([M-Me] <sup>+</sup> ), 309([M-OH] <sup>+</sup> ), 137([4-hidroxi-3-metoxifenilmetileno] <sup>+</sup> )	NR	$\lambda_{\max}=218.4$ y 274.4		León, 2005.
(-)-Licarina A	NR	242 (+), 269 (-)	NR	-44.0 °	Phan et al., 2006
Isolicarina A	326(100,M <sup>+</sup> ), 311([M-Me] <sup>+</sup> ), 309([M-OH] <sup>+</sup> ), 295([M-MeO] <sup>+</sup> ), 264([M-2MeO] <sup>+</sup> ), 147([3-metoxi-5-(prop-1enil)fenil] <sup>+</sup> ) 137([4-hidroxi-3-metoxifenilmetileno] <sup>+</sup> )	220 (-), 243 (+), 289 (-)	$\lambda_{\max}=221$ y 272	-24.2 °	Li y Yang, 2007.

\* Valores obtenidos para compuesto aislado de *A. taliscana* en el presente trabajo. NR: No reportado.

Con base en el análisis de los datos espectroscópicos y constantes físicas proponemos con mayor certeza que el compuesto obtenido del rizoma de *A. taliscana* (extracto hexánico y metanólico) corresponde a la (-)-licarina, cuya estereoquímica de los dos centros quirales (C-2 y C-3) es S (Figura 13), de acuerdo a la regla de Cahn-Ingold-Prelog. Sin embargo, no descartamos la presencia de los otros isómeros pero en menor cantidad.

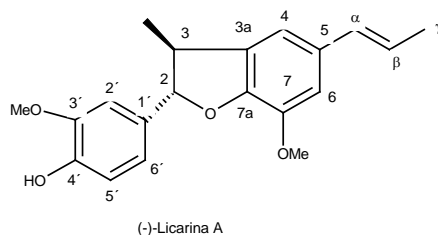


Figura 13.- Estructura de la (-)-licarina A obtenida de *A. taliscana*.

### Evaluación toxicológica subaguda de la (-)-licarina A.

En la literatura científica, son escasos los trabajos que describen la determinación toxicológica de compuestos puros de origen vegetal con potencial farmacológico, la mayoría se enfocan a la evaluación de extractos (**Déciga-Campos et al., 2007; Rasekh et al., 2008; Thanabhorn et al., 2006**). Erróneamente se cree que la mayor parte de los productos naturales y/o derivados de estos son inocuos; sin embargo, muchos de ellos resultan nocivos o provocan severos efectos adversos y en ocasiones irreversibles por contener principios altamente tóxicos (**Ferés et al., 2006; Deciga-Campos et al., 2007**), por lo que es necesario conocer el efecto tóxico de sustancias activas para determinar su potencial biológico.

La evaluación de la toxicidad subaguda de la (-)-licarina A se realizó en ratones Balb/C administrados cada tercer día por vía subcutánea durante 48 días. Los resultados obtenidos de este experimento se describen a continuación. El análisis estadístico del peso de los animales que recibieron vehículo y compuesto (dosis 5 mg/kg) no presentó diferencia significativa entre los grupos estudiados respecto al control (Tabla 9 y Gráfica 1). Además, no se observaron síntomas de toxicidad aparente, cambios en el comportamiento, ni alteraciones macroscópicas en piel,

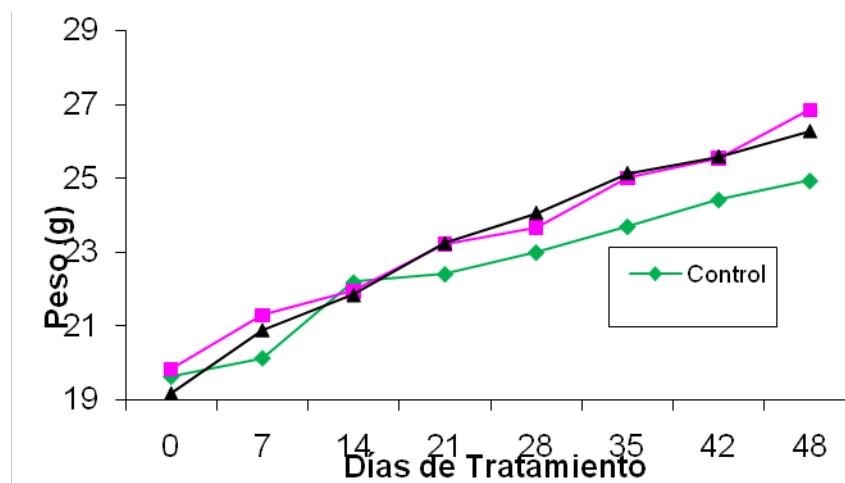


pelo, ojos y mucosas durante el transcurso del experimento. Cabe mencionar que durante el desarrollo del estudio un animal del grupo tratado con (-)-licarina A murió al día 42, al animal muerto se le realizó la autopsia y se observó la formación de un coágulo en arterias cercanas al corazón, por lo que la muerte del ratón muy probablemente estuvo asociada a un problema cardiaco ajeno a la administración del (-)-licarina.

Tabla 9.- Registro semanal de pesos (g) de los animales durante el estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A.

Grupo	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42	Día 48
<b>Control</b>	19.63 ± 0.42	20.14 ± 0.36	22.19 ± 0.40	22.41 ± 0.52	23.00 ± 0.56	23.70 ± 0.58	24.43 ± 0.54	24.94 ± 0.67
<b>Vehícul o</b>	19.85 ± 0.47	21.30 ± 0.58	21.95 ± 0.68	23.23 ± 0.69	23.68 ± 0.74	25.01 ± 0.68	25.55 ± 0.62	26.85 ± 0.66
<b>Tratado 5V</b>	19.19 ± 0.37	20.90 ± 0.62	21.85 ± 0.52	23.25 ± 0.59	24.08 ± 0.62	25.15 ± 0.55	25.60 ± 0.66	26.29 ± 0.73

Los valores están expresados como la  $M \pm E.S.M.$ ,  $n=7$ ,  $p<0.05$ . Control: Grupo que no recibió ningún tratamiento. Vehículo: Animales con aceite de olivo extravirgen previamente filtrado (filtro  $0.22 \mu m$ ). Tratado 5 V: Grupo tratado con (-)-licarina A (5 mg/kg) disuelta en aceite de olivo filtrado.



Gráfica 1.- Peso semanal de animales ( $n=7$ ) en estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A. Resultados expresados como la  $M \pm DS$ .

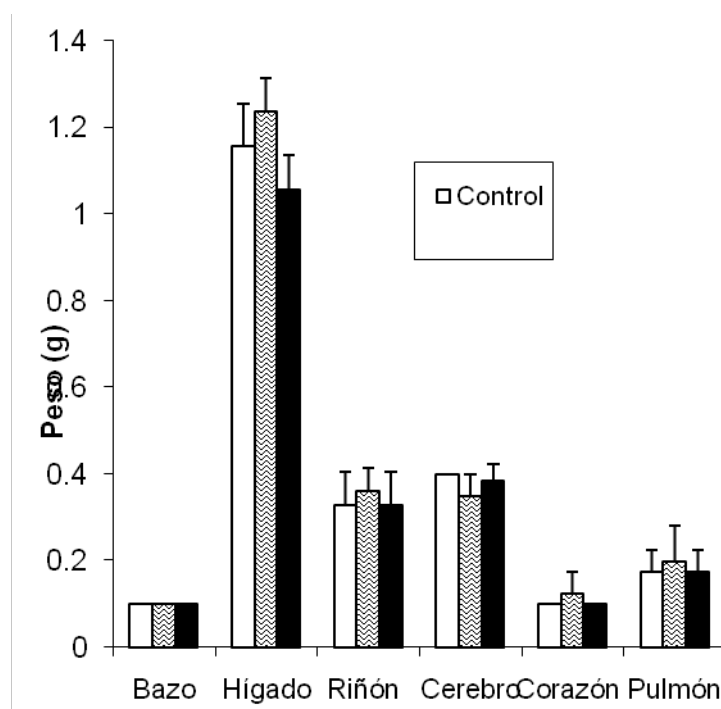
Al finalizar el experimento, los animales de cada grupo fueron anestesiados para proceder a tomar muestra sanguínea ( $800 \mu L$  aproximadamente); estos animales murieron por exanguinación y se les extrajo hígado, bazo, riñón, corazón, cerebro, pulmón y hueso. A primera vista no se observan alteraciones macroscópicas en cada uno de los órganos de los distintos grupos, por otro lado, el análisis estadístico del peso de órganos indicó que no existe diferencia significativa entre

los grupos tratados y únicamente se observa discrepancia en el peso del hígado de los distintos grupos (Tabla 10 y Gráfica 2), por lo que se consideró pertinente la realización de un análisis de t de Student. En este nuevo análisis estadístico se encontró que no existe diferencia significativa entre el peso de este órgano respecto al control. Sin embargo, se corroboraron estos resultados con el análisis histológico de los órganos y con el análisis de parámetros bioquímicos indicativos de daño hepático.

Tabla 10.- Peso (g) de órganos de animales en estudio de toxicidad subaguda con (-)-licarina A.

<i>Grupos</i>	<i>Bazo</i>	<i>Hígado</i>	<i>Riñón</i>	<i>Cerebro</i>	<i>Corazón</i>	<i>Pulmón</i>
<b>Control</b>	0.1 ± 0.00	1.15 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.40 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.17 ± 0.02
<b>Vehículo</b>	0.1 ± 0.00	1.23 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.20 ± 0.04
<b>Tratado 5V</b>	0.1 ± 0.00	1.05 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.17 ± 0.02

Valores expresados como la  $M \pm E.S.M.$ ,  $n=7$ , excepto corazón y pulmón  $n=4$   $p<0.05$ . Control: Grupo que no recibió ningún tratamiento. Vehículo: Animales tratados con aceite de olivo extravirgen (filtrado). Tratado 5 V: Corresponde al grupo tratado con 5 veces la CMI de (-)-licarina A disuelto en aceite de olivo filtrado.



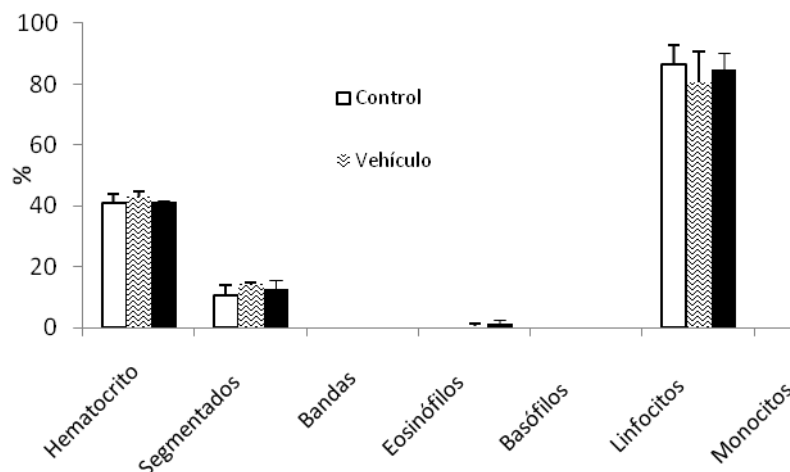
Gráfica 2. Representación gráfica de los pesos de órganos de animales tratados con (-)-licarina A. Resultados expresados como la  $M \pm DS$ .

A continuación se describen los parámetros hematológicos (serie blanca y serie roja) de los animales tratados (Tabla 11, Gráficas 3, 4 y 5). Cabe aclarar que de los siete ratones por grupo, tres se emplearon para determinación de este estudio y cuatro para análisis de química sanguínea, debido a la cantidad de sangre que se puede obtener de cada animal. El análisis estadístico (n=3) de los datos hematológicos mostró que no existen diferencias significativas entre los grupos estudiados, ya que no se observaron variaciones de importancia estadística entre los grupos vehículo y tratado 5 mg/kg con respecto al control.

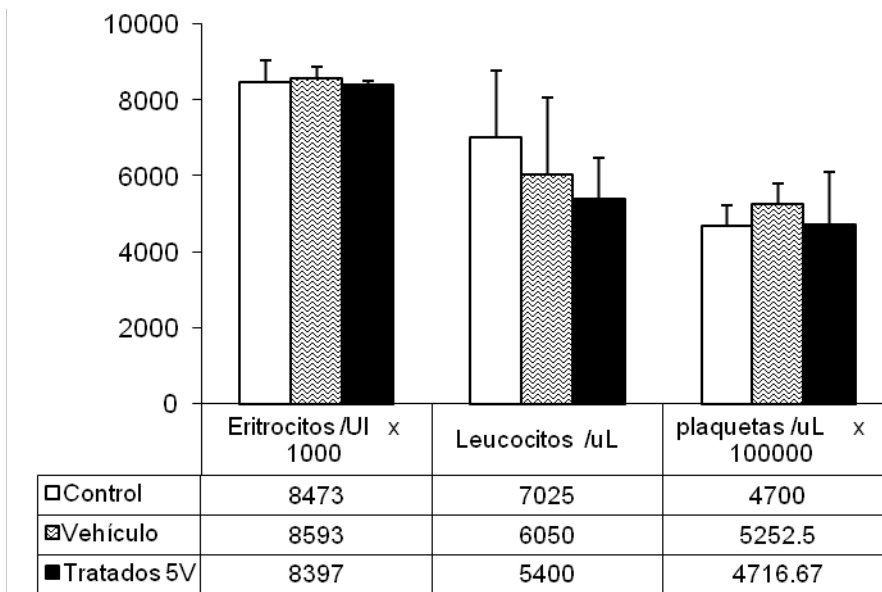
Tabla 11.- Valores hematológicos del estudio toxicológico subagudo de la (-)-licarina A.

<b>Parámetros</b>	<b>Blanco</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Tratado 5V</b>
<b>Eritrocitos x 10<sup>6</sup> /UI</b>	8.47 ± 0.29	8.59 ± 0.14	8.397 ± 0.07
<b>Hemoglobina g/dL</b>	13.65 ± 0.44	14.32 ± 0.30	13.7 ± 0.23
<b>Hematocrito %</b>	41.02 ± 1.46	43.12 ± 0.83	41.43 ± 0.20
<b>V.C.M. fL</b>	48.45 ± 0.17	50.15 ± 0.13	49.5 ± 0.35
<b>C.H.C.M. g/dL</b>	33.27 ± 0.23	33.17 ± 0.33	33.03 ± 0.46
<b>Leucocitos x 1000 /uL</b>	7.025 ± 0.87	6.05 ± 1.019	5.4 ± 0.62
<b>Segmentados %</b>	10.66 ± 1.85	14.33 ± 0.33	12.66 ± 1.76
<b>Bandas %</b>	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
<b>Eosinófilos %</b>	0 ± 0.00	0.5 ± 0.50	1.33 ± 0.66
<b>Basófilos %</b>	0 ± 0.00	0 ± 0.000	0 ± 0.00
<b>Linfocitos %</b>	86.50 ± 3.12	80.75 ± 4.92	84.66 ± 3.33
<b>Monocitos %</b>	0 ± 0.00	0 ± 0.000	0 ± 0.00
<b>Plaquetas x1000 /uL</b>	470000 ± 26897	525250 ± 27753	471666 ± 80741

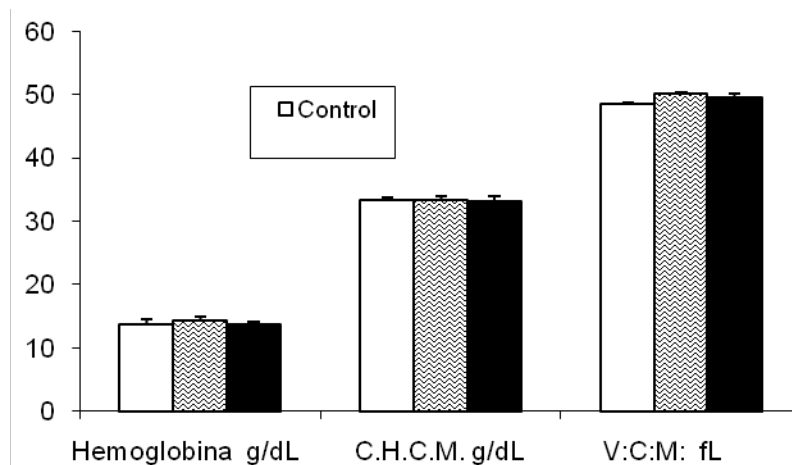
Los valores están expresados como la M ± E.S.M., n=3 p<0.05. Control: grupo que no recibió ningún tratamiento. Vehículo: animales tratados con aceite de olivo extravirgen (filtrado). Tratado 5 V: 5 veces la CMI de (-)-licarina A disuelta en aceite de olivo filtrado



Gráfica 3.- Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A. Resultados expresados como la M ± DS



Gráfica 4.- Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A (continuación). Resultados expresados como  $M \pm DS$



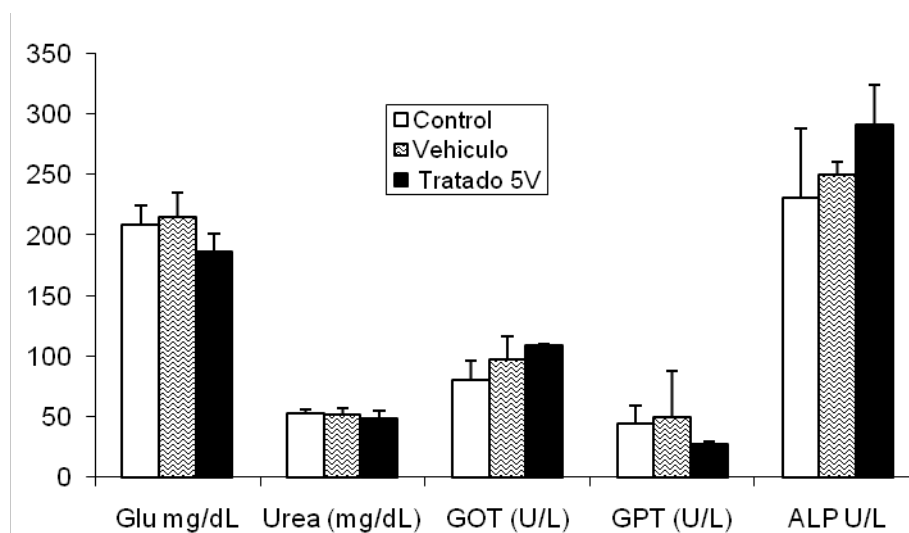
Gráfica 5.- Valores hematológicos del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A (continuación). Resultados expresados como la  $M \pm DS$

El análisis estadístico ( $n=4$ ) de los resultados de química sanguínea revela que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la mayoría de los elementos determinados en cada uno de los grupos de estudio (control, vehículo y tratados con (-)-licarina A). Sólo se reportaron variaciones en cuanto a los niveles de triglicéridos, colesterol de baja densidad y la enzima GPT, por lo que fue necesaria la realización de una prueba de t-Student, encontrando que no existen diferencias considerables entre el grupo tratado con respecto al grupo control (Tabla 12, Gráficas 6, 7 y 8).

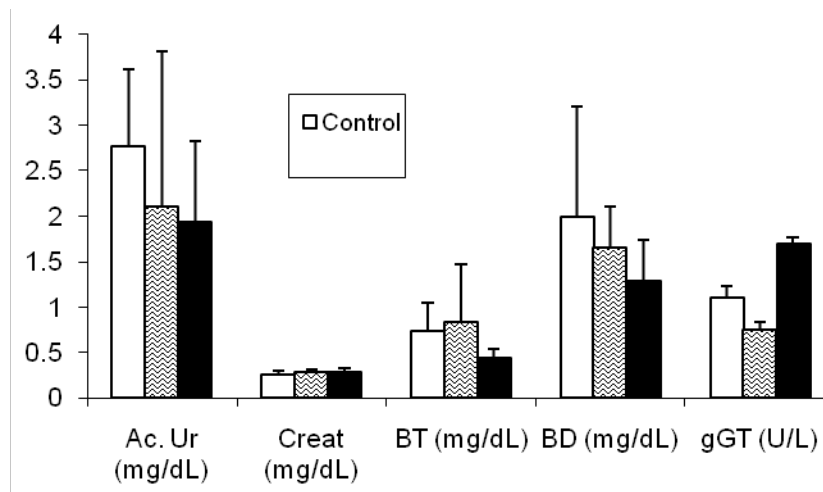
Tabla 12.- Valores de química sanguínea del estudio toxicológico subagudo de la (-)-licarina A.

<b>Parámetro</b>	<b>Control</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Tratado 5V</b>
<b>Glucosa mg/dL</b>	209.41 ± 7.57	215.65 ± 9.62	186.74 ± 7.16
<b>Colesterol mmol/L</b>	27.46 ± 0.53	30.29 ± 0.86	27.85 ± 1.29
<b>Triglicéridos mmol/L</b>	1.68 ± 0.10	1.78 ± 0.18	1.36 ± 0.31
<b>HDL mmol/L</b>	20.91 ± 1.03	26.23 ± 0.62	24.86 ± 1.16
<b>LDL mmol/L</b>	1.87 ± 0.14	2.41 ± 0.04	2.19 ± 0.18
<b>ALP U/L</b>	231.25 ± 28.68	250 ± 5.02	291.25 ± 16.35
<b>Urea mg/dL</b>	53.05 ± 3.33	51.90 ± 5.78	48.57 ± 6.08
<b>Ácido úrico mg/dL</b>	2.76 ± 0.42	2.10 ± 0.85	1.93 ± 0.44
<b>Creatinina mg/dL</b>	0.25 ± 0.02	0.280 ± 0.01	0.29 ± 0.01
<b>Bilirrubina total mg/dL</b>	0.73 ± 0.16	0.82 ± 0.32	0.44 ± 0.05
<b>Bilirrubina directa mg/dL</b>	1.98 ± 0.70	1.64 ± 0.27	1.28 ± 0.23
<b>GPT U/L</b>	44.12 ± 7.32	49.93 ± 19.14	27.14 ± 1.31
<b>gGT U/L</b>	1.10 ± 0.09	0.75 ± 0.062	1.69 ± 0.05
<b>GOT U/L</b>	80.91 ± 11.20	97.46 ± 10.69	109.28 ± 0.59

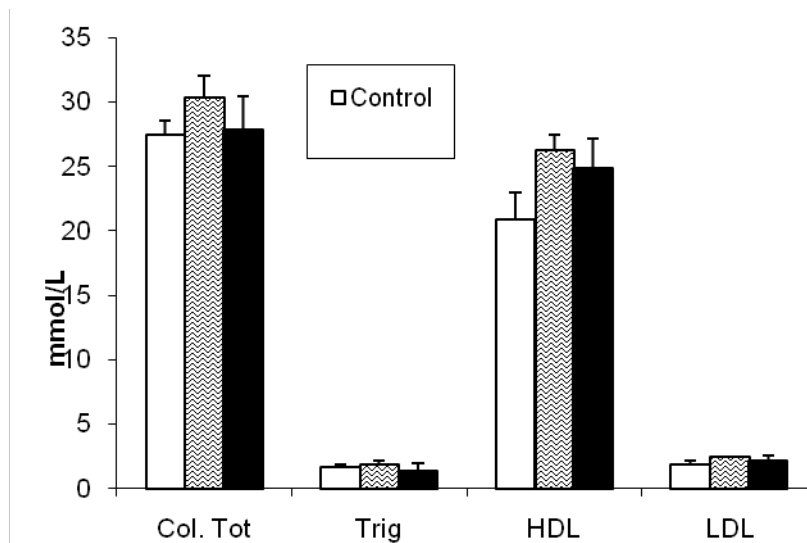
Los valores están expresados como M ± E.S.M., n=4 p<0.05. Control: grupo que no recibió ningún tratamiento. Vehículo: animales tratados con aceite de olivo extravirgen (filtrado). Tratado 5 V: animales con 5 veces la CMI de (-)-licarina A disuelta en aceite de olivo filtrado.



Gráfica 6.- Valores de química sanguínea del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A. Los resultados aparecen expresados como M ± DS.



Gráfica 7.- Valores de química sanguínea del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A (continuación). Los resultados están expresados como la M ± DS



Gráfica 8.- Valores de química sanguínea del estudio de toxicidad subaguda de (-)-licarina A (continuación). Los resultados aparecen expresados como M ± la DS

Los resultados de peso ponderal, peso de órganos y parámetros de biometría hemática no muestran alteración significativa respecto al control y concuerdan con lo encontrado en un estudio previo realizado para el mismo compuesto por **Calderón, 2008**. En caso de que la (-)-licarina A provocara daño sobre los parámetros de biometría hemática se observaría alteración en los valores de la serie roja y serie blanca, lo cual es indicativo de proceso infeccioso o inflamatorio y de anemia.

La alteración del peso corporal y de órganos en los animales tratados con extractos o sustancias de origen natural son indicativos de un potencial efecto tóxico provocado por estos **(Thanabhorn, et al., 2006)**. Así mismo, la inexistencia de alteraciones en los parámetros de urea, creatinina, Ac. Ur y gGT entre los grupos de estudio, señala que no existen alteraciones de la función renal. Además, al observarse los valores de ALP, BD, BT, gGT, GPT y GOT sin cambios significativos indica que no existe daño hepático en los animales de los grupos control, vehículo y tratado con el compuesto. Finalmente los valores de glucosa, colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos de los grupos (tratados 5V, vehículo y control) permanecieron sin cambios significativos, lo cual indica que no existen alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos **(Cornejo, 2008; El Hilaly et al., 2004; Thanabhorn, et al., 2006)**. Sin embargo, falta por corroborar estos datos mediante el análisis histológico del hígado, bazo y riñón.

### **Estudios histológicos**

Si bien los estudios de química sanguínea, biometría hemática, peso corporal y peso de órganos realizados en el presente trabajo no muestran la existencia de alteración o de un efecto tóxico evidente, producto de la administración subaguda de la (-)-licarina A, se procedió a realizar un estudio histológico a partir de las muestras de hígado, pulmón, riñón y bazo de cada grupo siguiendo la metodología previamente descrita, esto con la finalidad de confirmar la inexistencia de algún efecto tóxico a nivel microscópico causado por la administración subaguda del compuesto en estudio. A continuación se presenta el análisis por órgano de cada uno de los diferentes grupos experimentales, así como la interpretación del mismo.

#### **a) hígado:**

Este órgano es de gran importancia para el cuerpo y ha sido denominado “el guardián del medio interno” debido a sus funciones metabólicas y detoxificantes, por lo que un trastorno a nivel hepático tiene consecuencias que alteran gravemente la homeostasis **(Robbins y Cotran, 1988)**. La histopatología del hígado (Figura 14) mostró que no existe alteración alguna entre el grupo control

con respecto al vehículo y al tratado con (-)-licarina A (5V), lo cual se ve reflejado al observar integridad en la triada portal hepática (compuesta por arterias, venas y conductos biliares), disposición de hepatocitos en cordones homogéneos, no hay presencia de zonas necróticas y no se observa la presencia de tejido conjuntivo alrededor de las venas centrales. Sin embargo, se observó la presencia de mínima esteatosis (acumulación de ácidos grasos y triglicéridos en el citoplasma de hepatocitos) en los grupos vehículo y tratado con compuesto 5V. Esta alteración es causada muy probablemente por el uso del aceite de olivo como vehículo, ya que este daño se observa en ambos grupos y no en el control negativo. En la literatura está bien documentado que algunos fármacos (tetraciclinas, metotrexato), alcohol y alimentos ricos en grasas inducen esteatosis (**Robbins y Cotran, 1988**). Sin embargo, los valores indicativos de este padecimiento (colesterol, trig, GOT y GPT) en el análisis de química sanguínea de los animales del grupo de vehículo y tratado con la (-)-licarina A no se ven alterados en forma significativa.

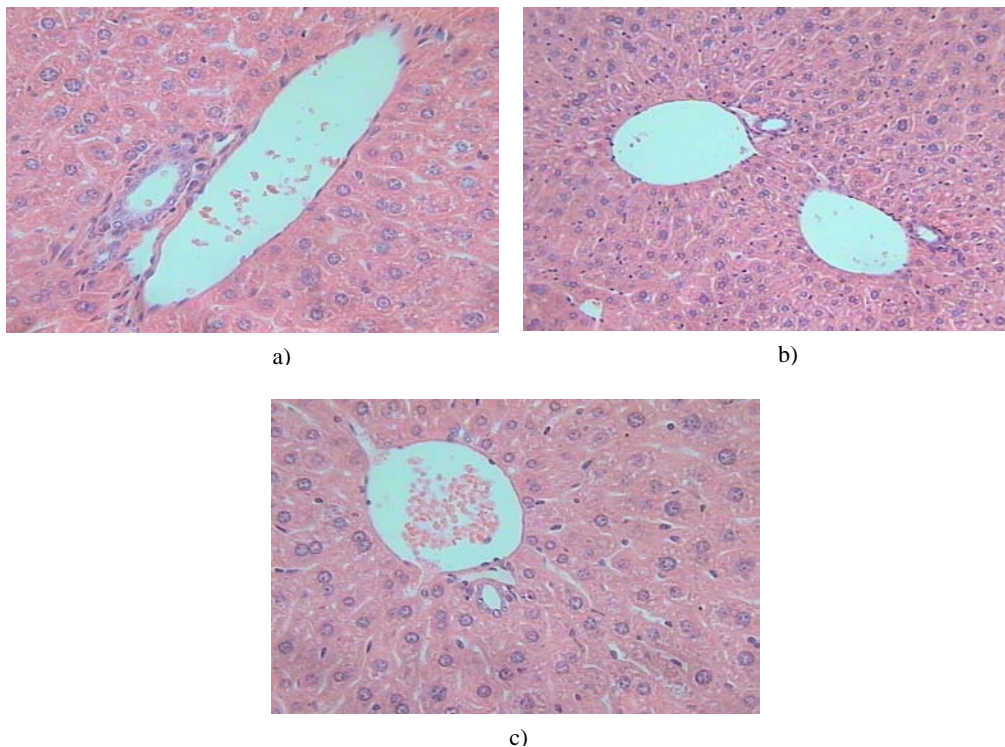


Figura 14.- Histología de hígado de los diferentes grupos de estudio. a) Control (aumento de 40X), b) vehículo (aumento de 20X) y c) Tratado 5V (aumento de 40X).



**b) pulmones:**

La función específica y principal de los pulmones es el realizar el intercambio gaseoso que tiene lugar particularmente a nivel de los alveolos (**Robbins y Cotran, 1988**). El estudio histopatológico (Figura 15) de este órgano no mostró alteración a nivel microscópico entre el grupo control y los grupos tratados (vehículo y tratado 5V), observándose una clara diferenciación de las principales estructuras del pulmón (bronquiolos, venas y alveolos). Por otro lado, no se observa precipitado granular intraalveolar, lo cual indica que no hubo edema pulmonar asociado a trastornos hemodinámicos y al aumento de la permeabilidad capilar o alveolar (**Robbins y Cotran, 1988**). Cabe aclarar que la histología de este órgano se realizó debido a que es el órgano más afectado en caso de TB progresiva.

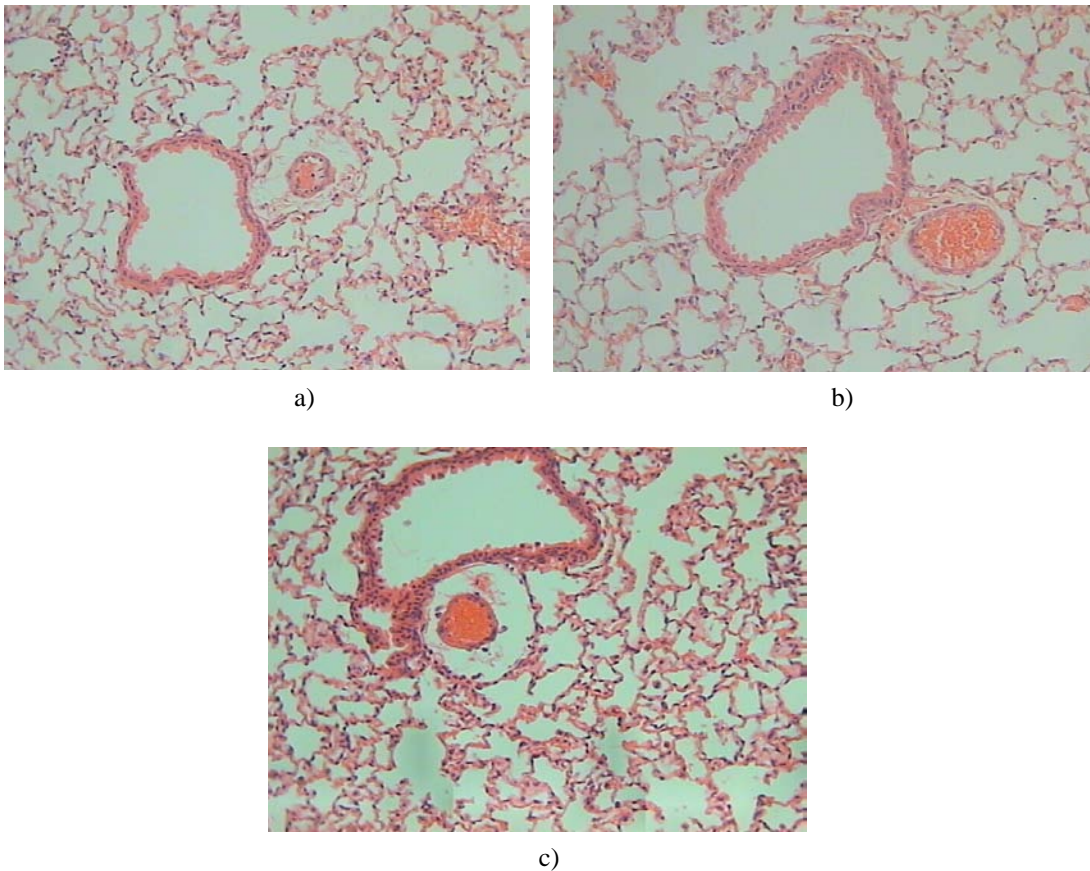


Figura 15.- Histología de pulmones de los diferentes grupos de estudio. a) Control (aumento 20X), b) Vehículo (aumento 20X) y c) Tratado 5V (aumento 20X)

### c) riñón:

Los riñones desempeñan algunas de las funciones más críticas necesarias para la supervivencia. Excretan los productos de desecho del metabolismo, regulan de manera exacta la concentración corporal de agua y electrolitos, mantienen el balance ácido adecuado del plasma y actúan como órgano endócrino al secretar hormonas tan importantes como la eritropoyetina, renina y prostaglandinas **(Robbins y Cotran, 1988)**. El análisis histopatológico de los riñones (Figura 16) muestra clara diferenciación morfológica entre la médula y corteza (dos de las principales zonas anatómicas del riñón expuestas a efectos tóxicos), así mismo existe integridad en los glomérulos en todos los grupos de animales evaluados (control negativo, vehículo y (-)-licarina A).

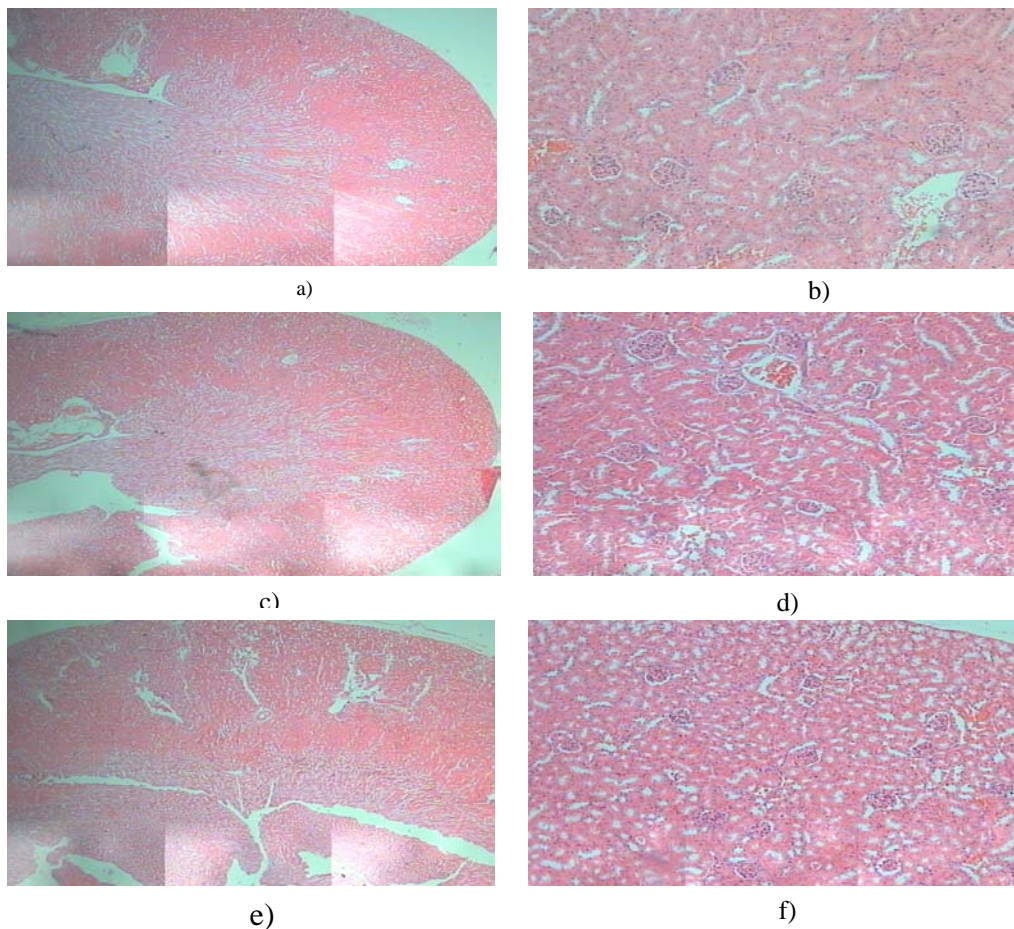


Figura 16.- Histología de riñones de los diferentes grupos de estudio. a) Control (aumento 2.5X), b) Control (aumento 10X), c) Vehículo (aumento 2.5X), d) Vehículo (aumento 10X), e) Tratado 5V (aumento 2.5X) y f) Tratado 5V (aumento 10X).

**d) bazo:**

En el bazo se lleva a cabo la maduración y la destrucción de glóbulos rojos viejos, lesionados o anómalos. Además, es el encargado de mantener a las plaquetas en buen estado y juega un papel importante en la respuesta inmune, ya que produce anticuerpos y también lleva a cabo la fagocitosis. Estructuralmente se aprecian en este órgano dos regiones, la pulpa roja (rica en células fagocíticas mononucleares) y la pulpa blanca (rica en células linfoides de tipo B y T) (**Robbins y Cotran, 1988**). El análisis histopatológico de este órgano (Figura 17) reveló una clara diferenciación entre la pulpa blanca y roja de los grupos estudiados y una ligera hiperplasia de la pulpa blanca, siendo más evidente en el grupo tratado con (-)-licarina A que en el vehículo. La presencia de hiperplasia se asocia a procesos inflamatorios y se puede presentar por dos razones: a) como resultado de un estímulo físico (inyección cada 3<sup>er</sup> día) o b) en respuesta a la presencia de un cuerpo extraño [(-)-licarina A] aunado a que la administración tanto del vehículo como del compuesto no se realizó en condiciones de esterilidad óptimas, lo cual estimula la producción de linfocitos T (**Robbins y Cotran, 1988**). Respecto al peso de este órgano, no observa alteración.

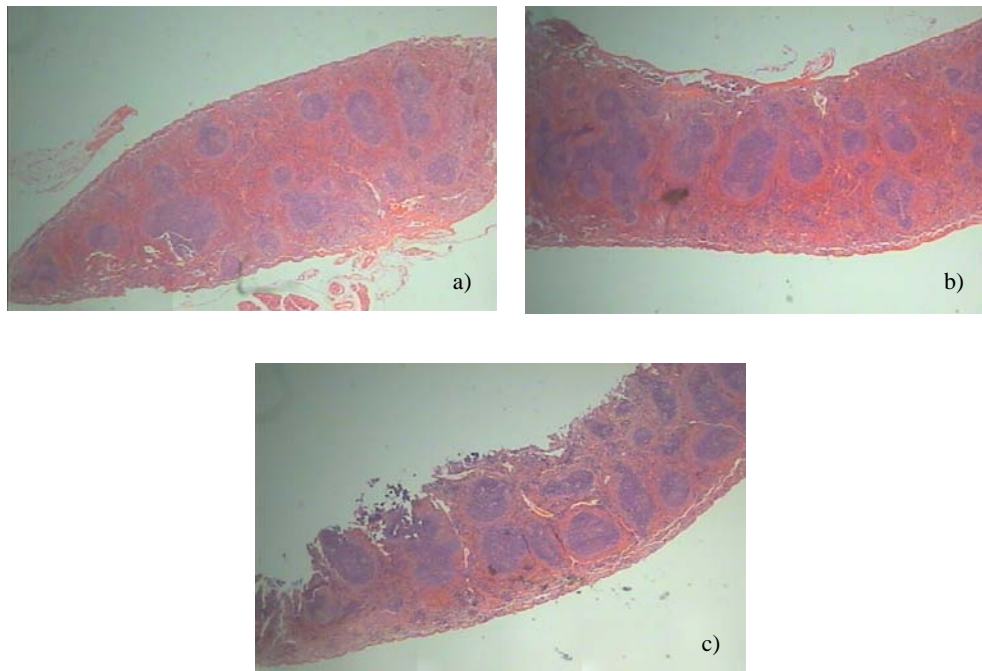


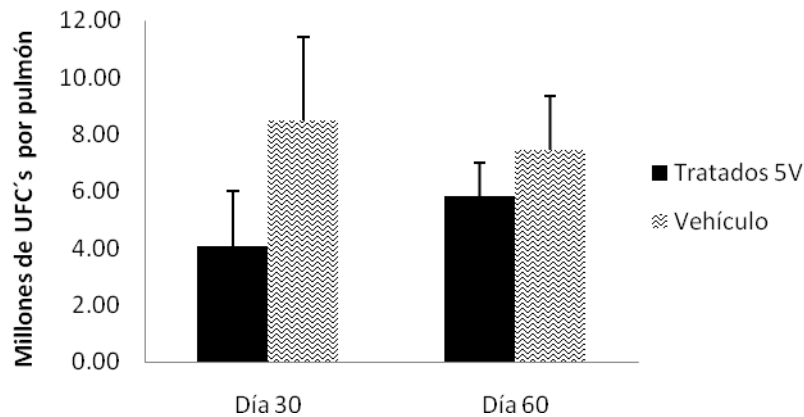
Figura 17.- Histología de Bazos de los diferentes grupos de estudio. (a) Control, (b) vehículo y (c) tratado con (-)-licarina A. Aumento 2.5X

### **Evaluación preliminar del efecto antituberculoso *in vivo* de la (-)-licarina A.**

El modelo de TB progresiva desarrollado por Hernández-Pando y cols, tiene la ventaja de mostrar con mayor precisión lo que ocurre en la infección tuberculosa activa en humanos; mediante este modelo se han evaluado algunos compuestos sintéticos e inmunoterapéuticos como posibles agentes antituberculosos **(Hernández-Pando *et al.*, 2005; 2006; 1998)**; sin embargo, el presente trabajo es uno de los primeros que describe el empleo de este modelo para evaluar el potencial antituberculoso de un compuesto obtenido de una especie vegetal.

La evaluación se realizó en ratones con TB progresiva (dos meses después de inducida la enfermedad con *M. tuberculosis* H37Rv), a los cuales se les administró (-)-licarina A (5 veces la CMI obtenida *in vitro* = 5 mg/kg) cada tercer día durante uno y dos meses. Al finalizar cada periodo de tratamiento, los animales fueron sacrificados y de cada uno se obtuvo el pulmón en donde se determinó la carga bacilar o UFC. La administración de la (-)-licarina A durante 30 días causó la reducción de cerca del 50% de las UFC en el grupo tratado con el compuesto respecto al control de vehículo (Gráfica 9) y al día 60 de tratamiento se observa una diferencia mínima de UFC entre ambos grupos. Esto nos indica que en el primer mes de tratamiento el compuesto ejerce un efecto protector, el cual es parecido a lo reportado previamente para 16 $\alpha$ -bromoepiandrosterona, androstenediol, dehidroepiandrosterona y  $\beta$ -glicano soluble **(Hernández-Pando *et al.*, 1998, 2005 y 2006)**; sin embargo, al segundo mes de tratamiento con la (-)-licarina A, se observa que la diferencia de UFC entre este grupo y el vehículo es mínima y no se aprecia una disminución gradual de las UFC, como era de esperarse.





Gráfica 9.- UFC en los animales con TB progresiva tratados con (-)-licarina A, a los 30 y 60 días de tratamiento. Los valores están expresados como la  $M \pm E.S.M.$ ,  $n=4$   $p<0.05$ . Vehículo: animales tratados con aceite de olivo extravirgen (filtrado). Tratado 5 V: grupo tratado con 5 veces la CMI de (-)-licarina A disuelta en aceite de olivo filtrado.

Posterior a la determinación de las UFC's, se procedió a realizar el análisis histopatológico de los pulmones de los animales tratados con (-)-licarina A. Para ello las muestras de tejido pulmonar fueron preparadas para análisis histopatológico (ver inciso 3.6 de metodología). Los resultados permitieron observar que al día 30 de tratamiento hubo una notable disminución de las áreas neumónicas en los animales tratados con compuesto respecto al vehículo. Observándose principalmente, la presencia de infiltrado inflamatorio alrededor del intersticio alveolo-capilar, vénulas y bronquiolos para el grupo tratado, mientras que se aprecian amplias zonas de necrosis y extensa fibrosis intersticial de infiltrado inflamatorio en el intersticio alveolo-capilar en el caso del grupo administrado con vehículo (Figura 18).

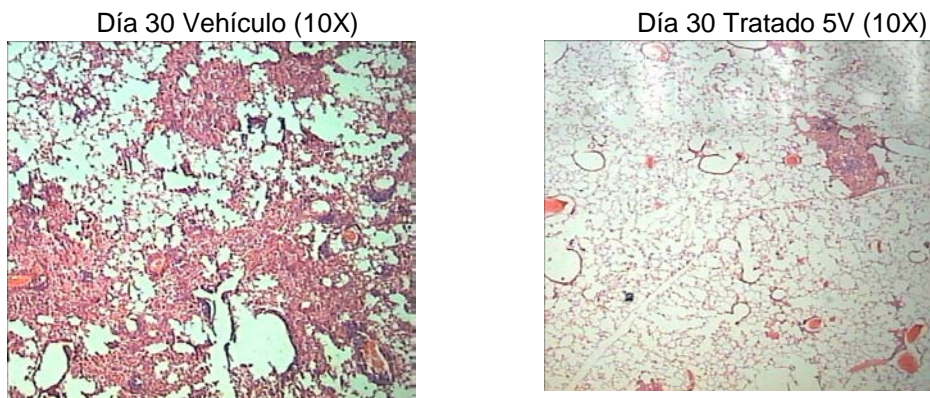


Figura 18.- Observación de áreas neumónicas al día 30 de tratamiento.

Respecto a los resultados para el día 60 de tratamiento (Figura 19), se observa que el grupo tratado con (-)-licarina A presenta menor área neumónica respecto al vehículo. En casos de TB activa se ha observado que la presencia de neumonía reduce el intercambio gaseoso y conlleva a la muerte de paciente o de los animales con TB progresiva. En el caso de los animales tratados con (-)-licarina la reducción de la neumonía al segundo mes no va acompañada de una clara disminución de las UFC; sin embargo, este hallazgo es de gran relevancia debido a que el compuesto natural puede coadyuvar al tratamiento de la TB al reducir la neumonía aunque no presente un evidente efecto bactericida.

Vehículo día 60 (20X)



Tratado día 60 (20X y 2.5X)

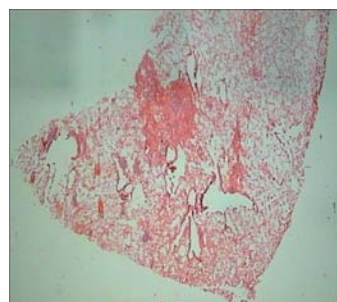
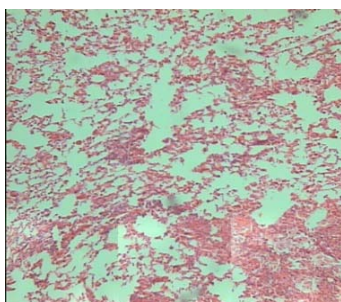


Figura 19.- Observación de áreas neumónicas al día 60 de tratamiento.

Finalmente, de manera conjunta los resultados de la evaluación preliminar de la actividad antituberculosa nos indican la existencia de efecto protector de la (-)-licarina A en el modelo murino de tuberculosis progresiva.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 366.9 mg de compuesto puro, así mismo el análisis de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, EM-IE, UV, DC y RO permitió determinar que la estructura inequívoca de la molécula obtenida corresponde a la (-)-licarina A.
- La administración subaguda (48 días) de la (-)-licarina A por vía subcutánea cada tercer día no produce alteraciones significativas en los parámetros de biometría hemática, química sanguínea y peso de órganos. Por otro lado, el análisis histológico de hígado, riñón y pulmón de los animales tratados no muestran alteraciones significativas como producto de la administración del compuesto. En el tejido del bazo, tanto del vehículo como del grupo tratado con compuesto se observa una ligera hiperplasia de la pulpa blanca.
- La evaluación preeliminar de la (-)-licarina A en el modelo murino de tuberculosis progresiva muestra una reducción de la carga bacilar y el área de neumónica a los 30 días de tratamiento. Sin embargo, a los 60 días de tratamiento solo se reduce el área neumónica pero no la carga bacilar (UFC) respecto al control de vehículo.

## PERSPECTIVAS

- Determinar en forma precisa el daño (hiperplasia) que provoca la (-)-licarina A sobre el bazo de animales en estudio de toxicidad subaguda.
- Desarrollar un método analítico en HPLC para determinar con certeza la presencia de los isómeros: (+)-licarina A e isolicarina A.

Realizar el perfil farmacocinético de la (-)-licarina A.

## BIBLIOGRAFÍA

- ☑ **Abe F**, Nagafuji S, Yamauchi T, et al. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol Pharm Bull.* 2002;25: 1188-1191
- ☑ **Achenbach H**, Grob J, Domínguez XA, et al. Lignans, neolignans and norneolignans from *Krameira cystisoides*. *Phytochemistry.* 1987;26: 1159-1166.
- ☑ **Álvarez Gordillo GC**, Dorantes Jiménez JE, Molina Rosales D. Seeking tuberculosis care in Chiapas, México. *Rev Panam Salud Publica.* 2001;9: 285-293.
- ☑ **Álvarez-Gordillo GC**, Álvarez-Gordillo JF, Dorantes-Jiménez JE, et al. Perceptions and practices related with tuberculosis and treatment compliance in Chiapas, México. *Salud Publica Mex.* 2000;42: 520-528.
- ☑ **Aziz MA**, Wright A, Laszlo A, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance (The Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance) an updated analysis. *Lancet* 2006; 368: 2142-2154.
- ☑ **Bonilla CA**, Crossa A, Jave HO, et al. Management of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in Perú: Cure is Possible. *Plos ONE* 2008;3: e2957.
- ☑ **Calderón CA**. Obtención y evaluación toxicológica de compuestos antimicobacterianos en especies del género *Aristolochia*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM 2008.
- ☑ **Cantrell CL**, Franzblau SG, Fischer NH. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med.* 2001;67: 685-694.
- ☑ **CDC**: Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. *MMWR* 2006;55: 1176.
- ☑ **Chin YW**, Balunas MJ, Chai HB, et al. Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal.* 2006;8: E 239-253.
- ☑ **Collins HL** y Kaufmann SH. The many faces of host responses to tuberculosis. *Inmunology* 2001;103: 1-9.
- ☑ **Cornejo GJ**. Evaluación Químico Biológica de la especie *Rubus liebmannii* micropropagada. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Escuela Nacional del Ciencias Biológicas IPN 2008.
- ☑ **Cox H** y McDermid C. XDR tuberculosis can be cured with aggressive treatment. *Lancet.* 2008
- ☑ **De Souza MV**, Vasconcelos TR, De Almeida MV, et al. Fluoroquinolones: an important class of antibiotics against tuberculosis. *Curr Med Chem.* 2006;13: 455-463.
- ☑ **Déciga-Campos M**, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, et al. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2007;110: 334-342.
- ☑ **Desig RK**. Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. WHO (2002).
- ☑ **DGE** (Dirección General de Epidemiología) [www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem35/pdf/cua5.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem35/pdf/cua5.pdf)
- ☑ **Dinakaran M**, Senthilkumar P, Yogeewari P, et al. Novel ofloxacin derivatives: synthesis, antimycobacterial and toxicological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18:1229-1236.
- ☑ **Dye C**, Scheele S, Dolin P, et al. Global burden of tuberculosis. *JAMA* 1999;282: 677-686.
- ☑ **El Hilaly J**, Israili ZH, Lyoussi B. et al. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *J Ethnopharmacol.* 2004;91: 43-50.
- ☑ **El-Ferally FS**, Cheatham SF, Hufford CD, et al. Optical Resolution of (±)-dehydrodiisoeugenol: Structure revision of acuminatin. *Phytochemistry.* 1982;21: 1133-1135.



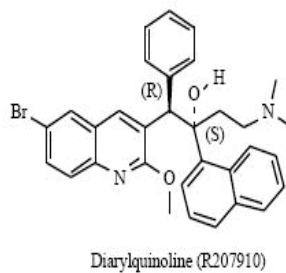
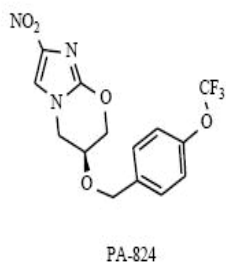
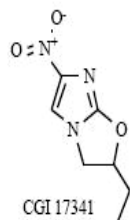
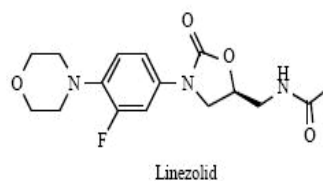
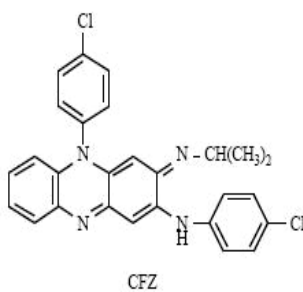
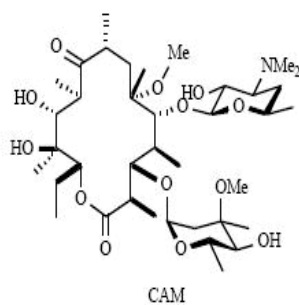
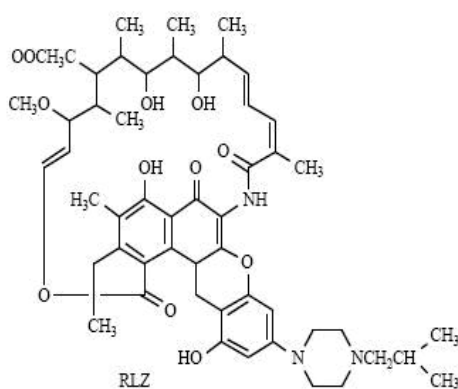
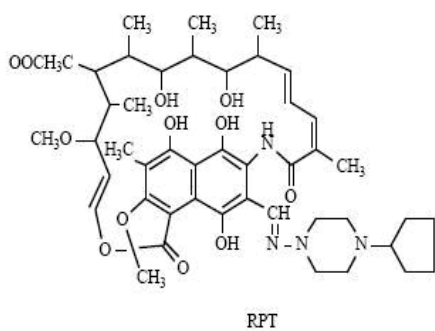
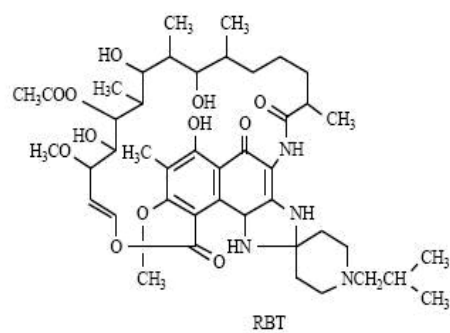
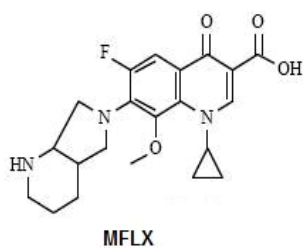
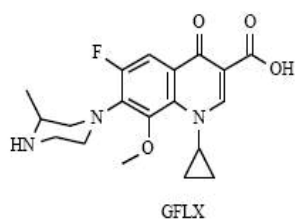
- ☑ **Enríquez RG**, Chávez MA, Reynolds WF. Phytochemical investigations of plants of the genus *Aristolochia*, 1. Isolation and NMR spectral characterization of eupomatenoid derivatives. *J Nat Prod.* 1984;47: 896-899
- ☑ **Féres CA**, Madalosso RC, Rocha OA, et al. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. *J Ethnopharmacol.* 2006;108: 450-456.
- ☑ **Frieden TR**, Sterling T, Pablos-Mendez A, et al. The emergence of drug resistant tuberculosis in New York city. *N. Engl J Med.* 1993;328: 521-526.
- ☑ **Frieden TR**, Sterling TR, Munsiff SS, et al. Tuberculosis. *Lancet* 2003;362: 887-899.
- ☑ **Garcez FR**, Garcez WS, Martins M et al. Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. *Planta Med.* 2005;71: 923-927.
- ☑ **García-García ML**, Jiménez-Corona ME, Ponce-de-León A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in a suburban community in southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4: S168-170.
- ☑ **García-García ML**, Mayar-Maya ME, Ferreyra-Reyes L., et al. Eficacia y Eficiencia del tratamiento antituberculoso en jurisdicciones sanitarias de Morelos. *Salud pública de México.* 1998;40: 421-429.
- ☑ **García-García ML**, Sifuentes-Osornio J, Jiménez-Corona ME, et al. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Orizaba, Veracruz. Implications for the tuberculosis prevention and control program. *Rev Invest Clin.* 2001;53: 315-23.
- ☑ **Gilpin CM**, Simpson G, Vincent S, et al. Evidence of primary transmission of multidrug-resistant tuberculosis in the Western Province of Papua New Guinea. *Med J Aust.* 2008;188: 148-152.
- ☑ **Gorocica P**, Jiménez MC, Garfías Y., et al. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2005;18: 142-153.
- ☑ **Granich RM**, Balandrano S, Santaella AJ, et al. Survey of Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican States, 1997. *Arch Intern Med.* 2000;160: 639-644.
- ☑ **Gu J**, Wang Y, Franzblau S et al. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med.* 2004;70: 509-514.
- ☑ **Hada S**, Hattori M, Tezuka Y, et al. New neolignans from the aril of *Myristica fragrans*. *Phytochemistry.* 1988;27: 563-568.
- ☑ **Hernández-Pando R**, Aguilar-Leon D, Orozco H, et al. 16 $\alpha$ -Bromoepiandrosterone Restores T Helper Cell Type 1 Activity and Accelerates Chemoterapy Induced Bacterial Clearance in a Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. *J Infect Dis.* 2005;191: 299-306.
- ☑ **Hernández-Pando R**, De La Luz Streber M, Orozco H, et al. The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology.* 1998;95: 234-241.
- ☑ **Hernández-Pando R**, Orozco H, Aguilar D, et al. Inmunología de la tuberculosis pulmonar experimental. En *Mensaje Bioquímico*. Eds. Flores HO, Riveros RH, Sosa PA, Vázquez CE. Vol XXVIII, Dpto de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM. Cd Universitaria, México 2004.
- ☑ **Hernández-Pando R**, Orozco H, Sampieri A, et al. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1996;89: 26-33.
- ☑ **Hernández-Pando R**, Orozco-Esteves H, Maldonado HA, et al. A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2006;144: 264-272.

- ☑ **Herrera MT**, Torres M, Juárez E, et al. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2005;18: 327-336.
- ☑ **Instituto Nacional de Salud Pública** ([www.insp.mx](http://www.insp.mx))
- ☑ **International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)**. Nomenclature of Lignans and Neolignans. *Pure Appl. Chem.* 2000;72, 1493-1523.
- ☑ **Jain A** y Mondal R. Extensively drug-resistant tuberculosis: current challenges and threats. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;53: 145-150.
- ☑ **Karakousis PC**, Bishai WR, Dorman SE. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cell Microbiol.* 2004;6: 105-116.
- ☑ **Kónya K**, Varga ZS, Antus S. Antioxidant properties of 8.0.4'-neolignans. *Phytomedicine.* 2001;8: 454-459.
- ☑ **Lenaerts AJ**, Bitting C, Woolhiser L, et al. Evaluation of a 2-pyridone, KRQ-10018, against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008a;52: 1513-1515.
- ☑ **Lenaerts AJ**, Degroote MA, Orme IM. Preclinical testing of new drugs for tuberculosis: current challenges. *Trends Microbiol.* 2008b;16: 48-54.
- ☑ **León DR**. Potencial antimicobacteriano de las especies medicinales del género *Aristolochia*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM 2005.
- ☑ **Li F** y Yang XW. Simultaneous determination of diastereomers (+)-licarin A and isolicarin A from *Myristica fragrans* in rat plasma by HPLC and its application to their pharmacokinetics. *Planta Med.* 2008;74: 880-884.
- ☑ **Li F** y Yang XW. Three neolignans from the aril of *Myristica fragrans*. *Helvetica Chimica Acta.* 2007;90: 1491- 1496.
- ☑ **Luna MT**. Estudio químico de dos especies medicinales con actividad antimicobacteriana. Tesis de Licenciatura. Universidad del Valle de México, 2005.
- ☑ **Martin A**, Takiff H, Vandamme P, et al. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58: 327-331.
- ☑ **Martínez MA**. Efecto del tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) sobre la adherencia y la tasa de curación de la tuberculosis pulmonar. *Gac Méd Méx.* 2004;140: 1-6.
- ☑ **Nascimento IR**, Lopes LM, Davin LB, et al. Stereoselective synthesis of 8,9-licarinediols. *Tetrahedron.* 2000;56: 9181-9193.
- ☑ **Neville K**, Bromberg A, Bromberg R, et al. The third epidemic: multidrug resistant tuberculosis. *Chest.* 1994;105: 45-48.
- ☑ **O'Brien RJ** y Spigelman M. New drugs for tuberculosis: current status and future prospects. *Clin Chest Med.* 2005;26: 327-340
- ☑ **Okunade AL**, Elvin-Lewis MP, Lewis WH. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry.* 2004;65: 1017-1032.
- ☑ **Palomino JC**, Cardoso S y Ritacco V. Tuberculosis 2007 from basic science to patient care. *TuberculosisTextbook.com*. Primera edición. BourcillierKamps.com.
- ☑ **Parrish NM**, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trend Microbiol.* 1998;6: 107-112.
- ☑ **Pauli GF**, Case RJ, Inui T, et al. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sci.* 2005;78: 485-494.
- ☑ **Phan MG**, Phan TS, Matsunami K, et al. New neolignans and lignans from Vietnamese medicinal plant *Machilus odoratissima* NEES. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2006;54: 380-383.
- ☑ **Rasekh HR**, Nazari P, Kamli-Nejad M, et al. Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats. *J Ethnopharmacol.* 2008;116: 21-26.

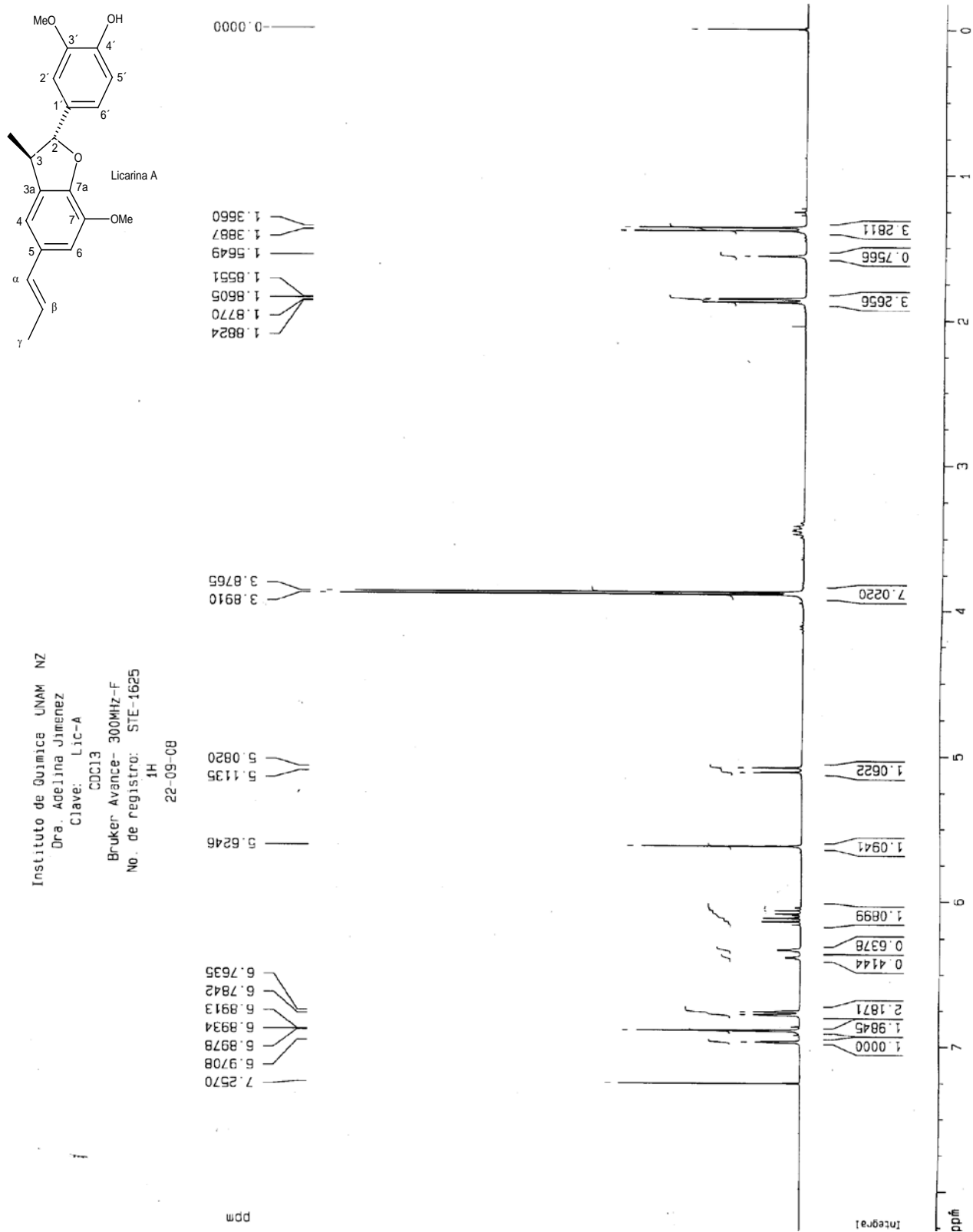
- ☑ **Raviglione MC** y Smith IM. XDR Tuberculosis- Implications for Global public Health. N Engl J Med. 2007.
- ☑ **Resch SC**, Salomon JA, Murray M, et al. Cost-Effectiveness of Treating Multidrug-Resistant Tuberculosis. Plos Medicine. 2006;3: 1048-1057.
- ☑ **Rivers EC** y Mancera RL. New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. Drug Discov Today. 2008;13: 1090-1098.
- ☑ **Robbins SL y Cotran RS**. Patología Estructural y Funcional. 3ra Edición. Editorial Interamericana. México, DF, 1988.
- ☑ **Salazar MA**, Torres A, et al. Resultados de tratamiento de tuberculosis resistente en 91 pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias: 2001-2003. Rev. Inst. Nal Enf. Resp. 2004;17: 15-21.
- ☑ **Saleem M**, Kim HJ, Ali MS et al. An update on bioactive plant lignans. Nat Prod Rep. 2005;22: 696-716.
- ☑ **Sharma SK** y Mohan A. Multidrug Resistant Tuberculosis: A menace that Threatens to destabilize Tuberculosis control. Chest. 2006;130: 261-272.
- ☑ **Shi R**, Itagaki N, Sugawara I. Overview of Anti-tuberculosis (TB) Drugs and their resistance mechanisms. Mini Rev Med Chem. 2007;7: 1177-1185.
- ☑ **Sifuentes-Osornio J**, Ponce-de-León LA, Camacho-Mezquita F., et al. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos. Características Clínicas y factores de riesgo. Rev Inv Clin. 1995;47: 273-281.
- ☑ **Stover CK**, Warren P, VanDevanter DR, et al. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. Nature. 2000;405: 962-966.
- ☑ **Su WJ**, Feng JY, Huang CC, et al. Increasing drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a medical center in northern Taiwan. J Formos Med Assoc. 2008;107: 259-264.
- ☑ **Thanabhorn S**, Jaijoy K, Thamaree S, et al. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Lonicera japonica* Thunb. J Ethnopharmacol. 2006;107: 370-373.
- ☑ **The lancet**. The rise and spread of drug-resistant tuberculosis. Lancet. 2008;371: 698.
- ☑ **Todar's Online Textbook of Bacteriology**  
www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html
- ☑ **Tomioka H** y Namba K. Development of antituberculous drugs: current status and future prospects. (abstract). Kekkaku 2006;81: 753-774.
- ☑ **Tomioka H**. Current status of some antituberculosis drugs and the development of new antituberculous agents with special reference to their in vitro and in vivo antimicrobial activities. Curr Pharm Des. 2006;12 :4047- 4070.
- ☑ **Tudó G**, González J, Obama R, et al. Study of resistance to anti-tuberculosis drugs in five districts of Equatorial Guinea: rates, risk factors, genotyping of gene mutations and molecular epidemiology. Int J Tuberc Lung Dis. 2004;8: 15-22.
- ☑ **Valcic S**, Montegro A, Mujica G et al. Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from Central Chile. Z Naturforsch C 1999; 54: 406-416.
- ☑ **Velasco VM**, Padua A, et al. Epidemiología y resistencia primaria a fármacos en casos incidentes de tuberculosis pulmonar. Rev. Méd. IMSS. 2004;42: 303-308.
- ☑ **Villalba-Caloca J**, García-García M de L, Sifuentes-Osornio J, et al. Tuberculosis: a current problem. Gac Med Mex. 2003;139: 471-492.
- ☑ **Villar R**, Vicente E, Solano B, et al. *In vitro* and *in vivo* antimycobacterial activities of ketone and amide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide. J Antimicrob Chemother. 2008;62: 547-554.
- ☑ **WHO**. Global tuberculosis control. Geneva, Switzerland: 2001. 287.

- ☑ **WHO.** Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World. Fourth Global Report. Geneva, Switzerland 2008.
- ☑ **WHO.** Global Task Force on XDR-TB. Meeting (2006 Geneva Switzerland World Health Organization 2007) Report of the meeting of the WHO Global Task force on XDR-TB: Geneva, Switzerland, 9-10 October 2006.
- ☑ **WHO.** Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva, Switzerland 2006.
- ☑ **WHO.** Policy guidelines for collaborative TB and VIH services for injecting and other drugs user and integrated approach. Geneva, Switzerland 2008.
- ☑ **Willför SM,** Smeds AI, Holmbom BR. Chromatographic analysis of lignans. J Chromatogr A. 2006;1112: 64-77.
- ☑ **Yew WW** y Leung CC. Management of multidrug-resistant tuberculosis: Update 2007. Respirology. 2008;13: 21-46.
- ☑ **Yoshiyama T,** Yanai H, Rhiengtong D, et al. Development of acquired drug resistance in recurrent tuberculosis patients with various previous treatment outcomes. Int J Tuberc Lung Dis. 2004;8: 31-38.
- ☑ **Zager EM** y McNerney R. Multidrug resistant Tuberculosis (Debate). BMC Infect Dis. 2008;8: 10.

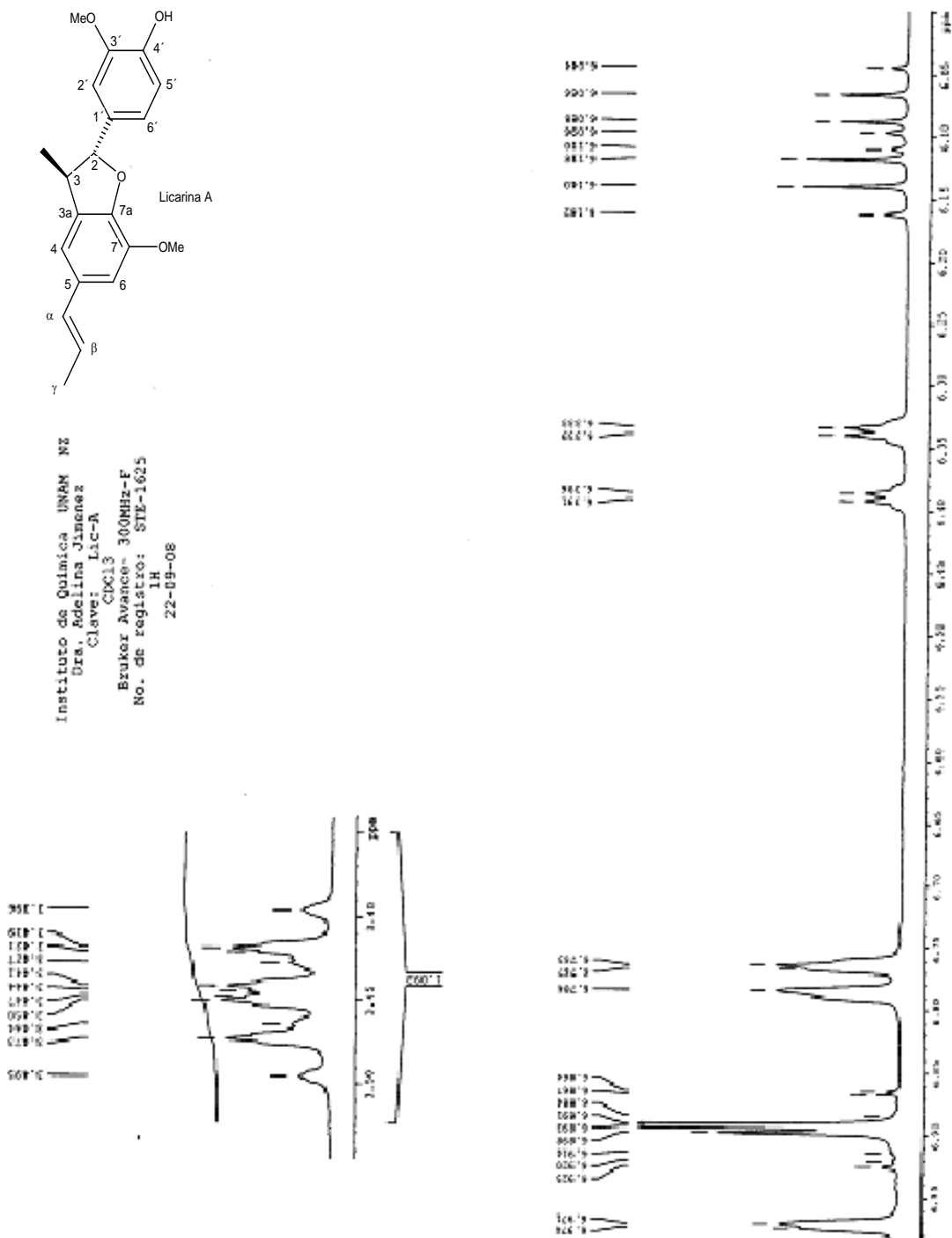
ANEXO 1.- Estado actual de fármacos antituberculosos en el mundo (Estructuras).



ANEXO 2.- Espectro de RMN-1H de la (+)-licarina A

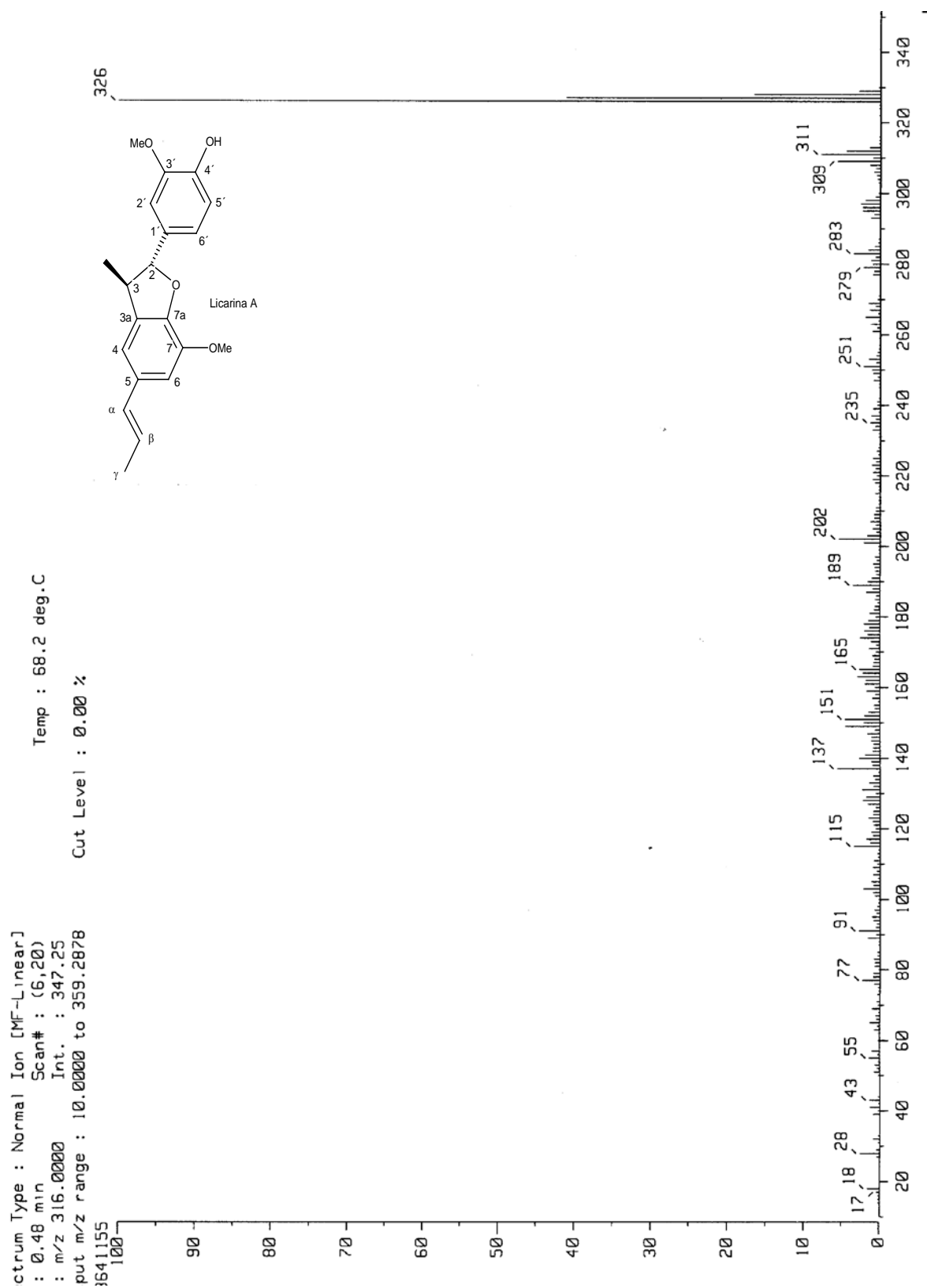


ANEXO 2.- Espectro de RMN Protónica de la (+)-licarina A (Continuación)



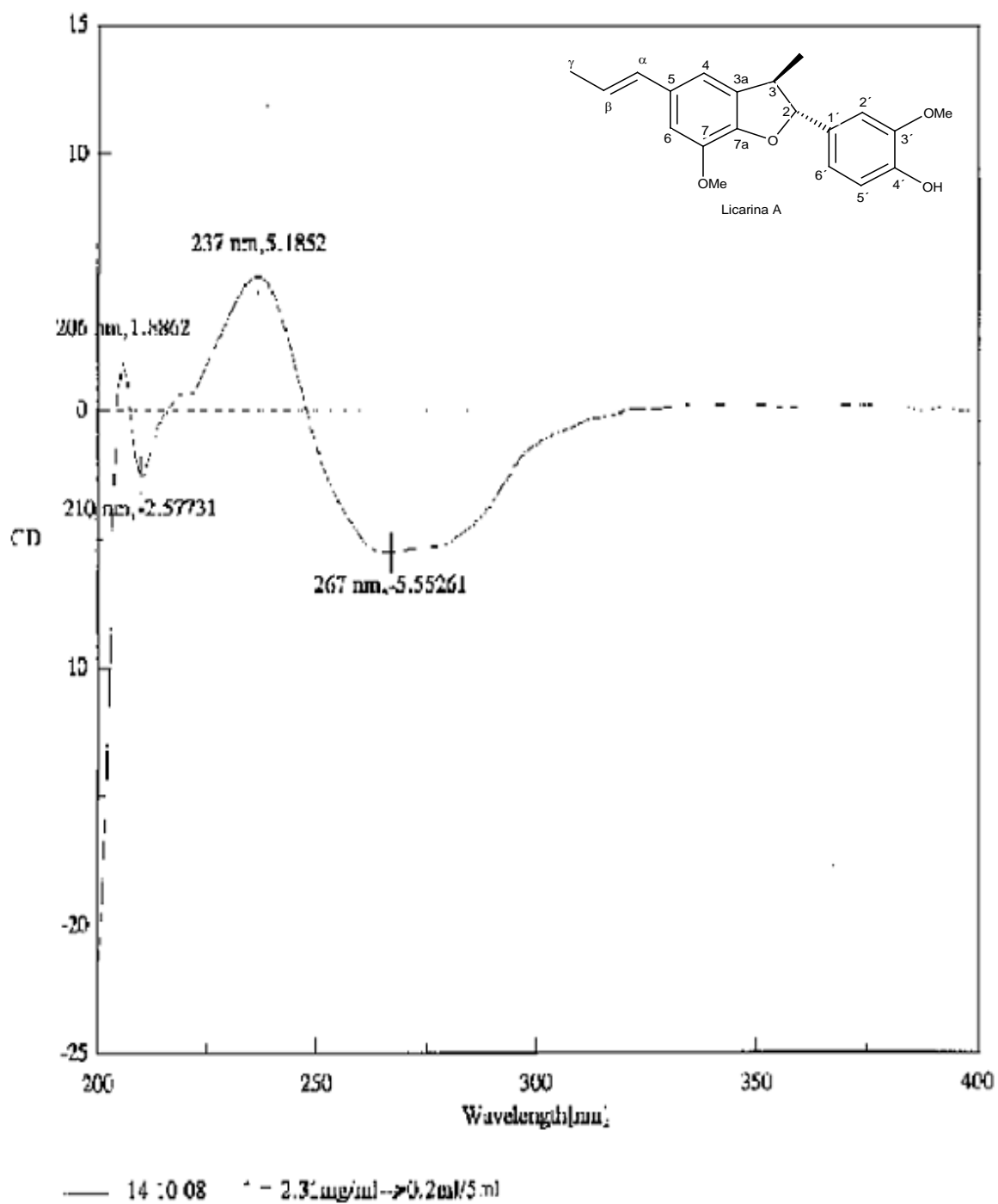
Instituto de Química UNAM X2  
 Dra. Adalina Jimenez  
 Clave: Lic-A  
 CIC13  
 Bruker Avance- 300MHz-F  
 No. de registro: STE-1625  
 1H  
 22-03-08

# ANEXO 3.- EM-IE de la licarina A.





ANEXO 4.- Dicroísmo Circular de la (+)-licarina A



ANEXO 5.- Espectro de UV de la (+)-licarina A

