



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de compuestos naturales sobre el  
crecimiento de *Mycobacterium  
tuberculosis* H37Ra**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**NELLY ARACELI ABURTO RODRIGUEZ**



Directora de Tesis: Dra. Silvia Guzmán  
Beltrán

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

1. Datos del alumno  
Aburto  
Rodríguez  
Nelly Araceli  
56 64 37 38  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
305000358
2. Datos del tutor  
Dra  
Silvia  
Guzmán  
Beltrán
3. Datos del sinodal 1  
Dra  
Clara Inés  
Espitia  
Pinzón
4. Datos del sinodal 2  
Dr  
Jesús  
Ramírez  
Santos
5. Datos del sinodal 3  
M en C  
Fernando  
Hernández  
Sánchez
6. Datos del sinodal 4  
Dr  
José Eduardo  
Rodríguez  
Bustamante
7. Datos del trabajo escrito  
Efecto de compuestos naturales sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra  
54 p  
2012

Este trabajo está dedicado a mis padres, Silvia y Efrén, quienes durante 23 años me han dado amor, comprensión, confianza y apoyo incondicionales para superar los obstáculos de la vida. Gracias por ser la fuente de mi inspiración y alegría.

Dedicado a mi pequeño hermano Jesús, quien con sus chistes y pláticas amenizaba esas largas noches de la escritura de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y a todos los profesores que me aportaron sus conocimientos y me encaminaron a esta meta.

A la Dra. Silvia Guzmán Beltrán por dirigirme en este proyecto. Gracias por su tiempo, confianza, consejos, paciencia, conocimientos, y sobre todo su amistad.

A mis sinodales, la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, el Dr. Jesús Ramírez Santos, el M. en C. Fernando Hernández Sánchez y el Dr. José Eduardo Rodríguez Bustamante, por aceptar la revisión de mi tesis y todos sus acertados comentarios que sirvieron para mejorarla.

Al Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por brindarme el apoyo, tiempo, espacio y consejos para realizar este proyecto.

A Sandra y Abigail por darme su amistad incondicional, por escuchar mis charlas biológicas interminables, por estar conmigo en los buenos o malos momentos y por alentarme a finalizar mi tesis.

A mi abuela, mi tía Jacqueline, mi tía Tere y mi tía Elizabeth por estar al pendiente de mi desarrollo académico y el día de mi graduación.

ÍNDICE	Página
1. Resumen	1
2. Antecedentes	2
2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
2.1.1. Genética	4
2.1.2. Condiciones de crecimiento	5
2.2. Tuberculosis	5
2.2.1. Historia	7
2.2.2. Situación actual de la TB	8
2.2.3. Historia natural de la tuberculosis pulmonar	8
2.3. Tratamiento	9
2.3.1. Primera línea	10
2.3.2. Segunda línea	11
2.4. Fitoquímicos	14
2.4.1. Ácido nordihidroguayaretico (NDGA)	14
2.4.2. Curcumina (CUR)	15
2.4.3. N-acetil cisteína (NAC)	16
2.4.4. Alfa-mangostina (MAN)	17
3. Justificación	19
4. Objetivo general	19
5. Objetivos particulares	19
6. Materiales y métodos	20
6.1. Cepa de <i>M. tuberculosis</i> y medios de cultivo	20
6.2. Cinética de crecimiento	20
6.3. Actividad antimicobacteriana del NDGA, CUR, NAC y MAN	20
6.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la MAN, el NDGA y la NAC	21

6.5.	Cuantificación del crecimiento	21
6.5.1.	Indirecta por método colorimétrico (MTT)	21
6.5.2.	Directa por método de cuentas viables (UFC)	22
6.6.	Efecto citotóxico de los compuestos sobre la línea celular monocítica humana THP-1	23
6.7.	Análisis estadísticos	23
7.	Resultados	24
7.1.	Cinética de crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> en medio líquido	24
7.2.	Efecto del NDGA, CUR, NAC y MAN sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> por MTT	26
7.3.	Cuantificación de la actividad antimicobacteriana de NDGA, CUR, NAC y MAN por el método UFC	27
7.4.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos naturales	28
7.4.1.	Ácido nordihidroguayaretico (NDGA)	28
7.4.2.	Alfa-mangostina (MAN)	30
7.4.3.	N-acetil cisteína (NAC)	32
7.5.	Efecto tóxico del NDGA, la MAN y la NAC sobre la línea celular de monocitos humanos THP-1	34
8.	Discusión	37
9.	Perspectivas	41
10.	Conclusiones	42
11.	Referencias	43
12.	Anexos	52

## 1. RESUMEN.

La tuberculosis (TB) es un problema de salud pública a nivel mundial, ya que un tercio de la población se encuentra infectada y es la segunda causa de muerte debida a una enfermedad infecciosa. De hecho, se calcula que cada año ocurren 9.7 millones de casos nuevos de TB que generan más de 3 millones de muertes debido a su asociación con otras enfermedades como VIH/SIDA y diabetes.

Este panorama unido a la aparición constante de casos de fármaco resistencia, hace necesario ampliar el espectro de fármacos para el combate de la TB. Los extractos naturales de plantas han desempeñado un papel importante en el tratamiento empírico de la TB, según la OMS más del 65% de la población mundial utiliza las plantas como modalidad primaria del cuidado médico.

En México, para el tratamiento de la TB se han utilizado *Allium sativum* (ajo), *Larrea tridentata* (gobernadora), *Curcuma longa* (curcuma) y *Garcinia mangostana* (mangostán). Los compuestos aislados de estas plantas como: la N-acetil cisteína (NAC) el ácido nordihidroguayaretico (NDGA), la curcumina (CUR) y la  $\alpha$ -mangostina (MAN) respectivamente, son compuestos con diversas actividades biológicas. Los tres últimos comparten grupos catecol en su estructura. Se ha demostrado que diversos antioxidantes con catecoles presentan actividad bactericida o potencian el efecto de fármacos antimicobacterianos como la isoniazida.

En este trabajo el objetivo principal fue evaluar el efecto de estos compuestos sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. Dichos compuestos se adicionaron a los cultivos bacterianos en fase exponencial y se incubaron durante siete días. Posteriormente se cuantificó el efecto de los compuestos sobre el crecimiento y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los resultados muestran que el NDGA (500  $\mu\text{g/ml}$ ) y la MAN (25  $\mu\text{g/ml}$ ) inhibieron totalmente el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis* H37Ra, mientras que la NAC solo lo disminuye en un 18% y la CUR lo favorece en un 2%.

Posteriormente se valoró la citotoxicidad de los compuestos que presentaron actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis* en células humanas (la línea celular monocítica THP-1) al menos durante 24 h. Concentraciones altas de NAC ( $\leq 500$   $\mu\text{g/mL}$ ) no tienen efecto sobre las THP-1. Sin embargo, la MAN (10  $\mu\text{g/mL}$ ) y el NDGA (100  $\mu\text{g/mL}$ ) disminuyeron su viabilidad a 15 y 50%, respectivamente.

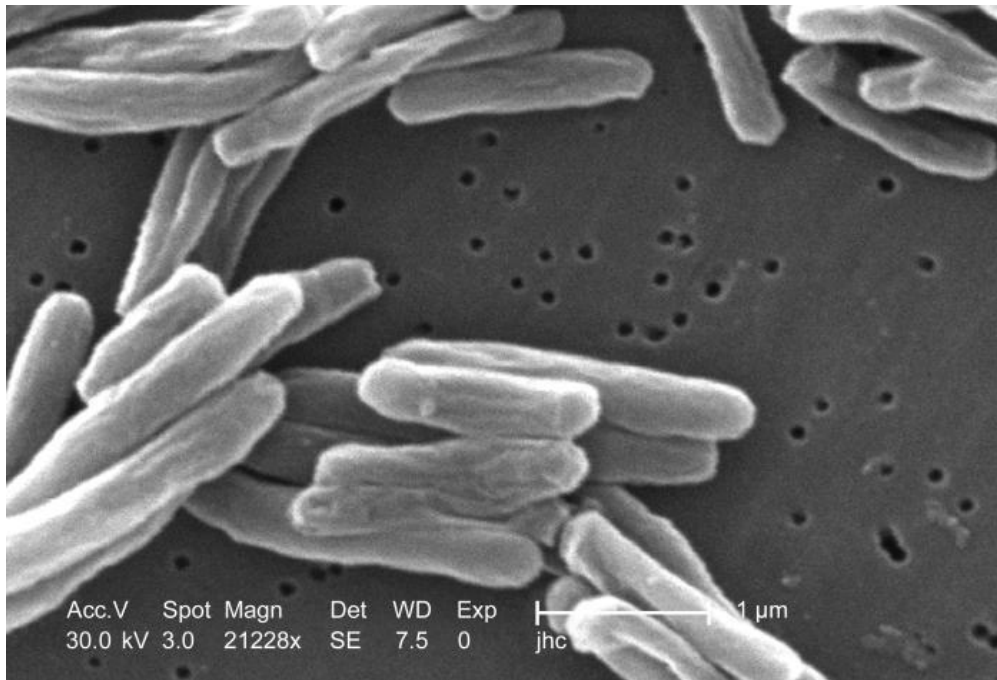
En conclusión, el NDGA (500  $\mu\text{g/mL}$ ) y la MAN (25  $\mu\text{g/mL}$ ) presentan actividad bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis*. Estos compuestos mostraron potencial para incrementar el arsenal de compuestos para el tratamiento de la TB.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Mycobacterium tuberculosis*.

*M. tuberculosis* es una bacteria Gram positiva no esporulada, inmóvil, con gránulos citoplasmáticos de naturaleza lipídica. Morfológicamente es un bacilo curvo de 3-5  $\mu\text{m}$  de longitud que posee una envoltura celular constituida por: cápsula, pared celular y membrana plasmática (Fig. 1). La complejidad de su envoltura le confiere la capacidad de ser ácido alcohol resistente (Brennan, 1989). En el anexo 1 se muestra su ubicación taxonómica.

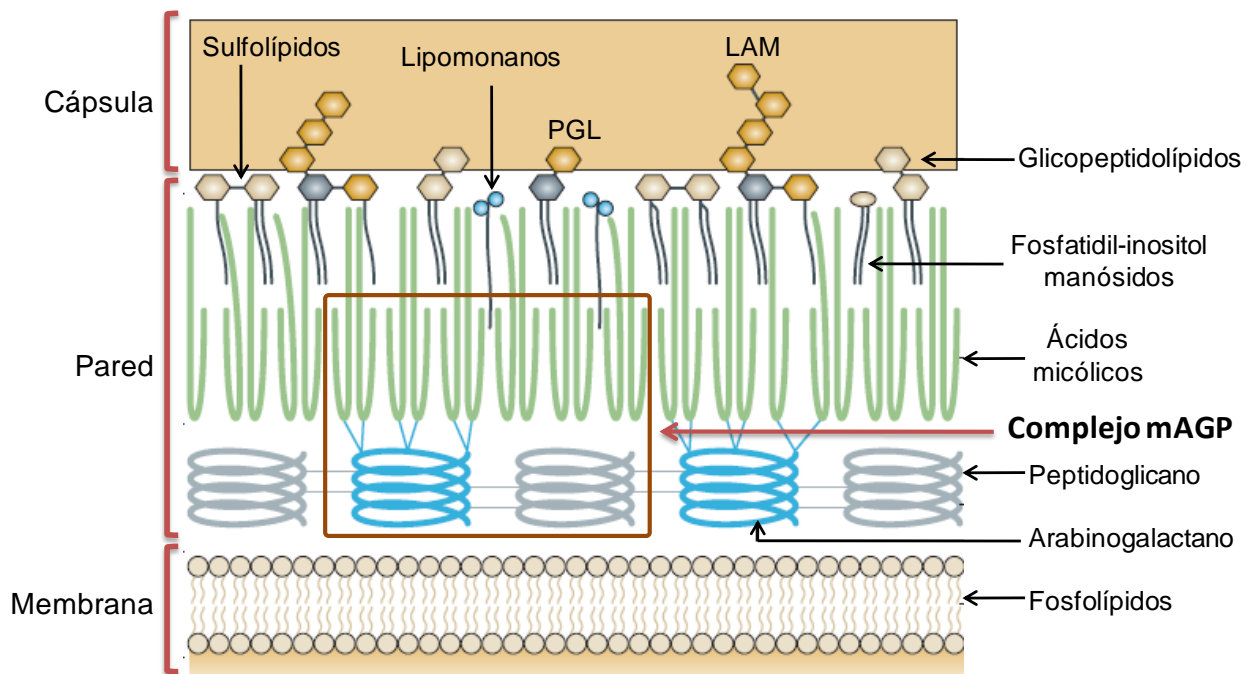


**Fig. 1. *Mycobacterium tuberculosis*.** Figura obtenida de Center of Diseases Control and Prevention, Public Health Image Library, 2006<sup>1</sup>

La cápsula es la capa exterior de la envoltura, está conformada por glicolípidos fenólicos (PGL's), lipoarabinomananos (LAM) y glicopeptidolípidos (Grange, 1996). Es una barrera que protege contra factores externos como: desecación, frío y congelación. Los glicolípidos y algunas proteínas presentes son responsables de las características antigénicas de la bacteria (Brennan, 1989; Steck et al., 1978).

<sup>1</sup> <http://phil.cdc.gov/phil/quicksearch.asp> ID#: 8437

La pared micobacteriana se caracteriza por la presencia de polisacáridos y contenido elevado de lípidos complejos (50-60%). Es una barrera que impide la entrada de antibióticos y antisépticos (Gorocica et al., 2005). Está formada por peptidoglicanos, arabinogalactanos y ácidos micólicos. Estas moléculas se encuentran unidas covalentemente formando el complejo mAGP. Los ácidos micólicos (60-90 átomos de carbono) están asociados a otros lípidos como los lipomonanos, fosfatidil-inositol-manósidos y LAM (Crick et al., 2001). Los LAM juegan un papel importante en la patogénesis de la TB (Gorocica et al., 2005). En la figura 2 se muestra un esquema de la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis*.



**Fig. 2. Representación esquemática de la envoltura celular de *M. tuberculosis*.** En la pared se observa el complejo mAGP formado por la unión covalente de ácidos micólicos, arabinogalactano y peptidoglicano. En la cápsula se encuentran varias moléculas involucradas en la patogénesis de la bacteria. Figura modificada de (Abdallah, et. al., 2007).

### 2.1.1 Genética

En 1998 se secuenció el genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv. El genoma es circular y tiene un tamaño de 4, 411,259 pares de bases (pb) con un contenido de guanina citosina (G-C) del 65.6%. El 10% del genoma lo constituyen las familias PE/PPE que contienen secuencias de prolina (Pro) y glutamato (Glu) altamente conservadas en el extremo amino terminal (Cole et al., 1998; Mohareer et al., 2011).

La familia PE se divide en dos subfamilias: PE y PE-PGRS. La subfamilia PE-PGRS está asociada con secuencias polimórficas ricas en G-C y las proteínas se encuentran en la pared micobacteriana y membrana. Esta subfamilia puede estar involucrada en la morfología celular, supervivencia dentro del macrófago, fuente principal de variación antigénica e interfiere en la respuesta inmune al inhibir el procesamiento de antígenos. La familia PPE se asocia con el sistema de secreción ESAT-6 que está localizado en la pared o membrana, está involucrada en la variación antigénica, comunicación hospedero-parásito y virulencia (Chen and Jian-Ping, 2010; Deng and Xie, 2011; Mohareer et al., 2011).

Además, se sabe que el genoma es rico en DNA repetitivo como secuencias de inserción, familias multigénicas y genes duplicados. En la siguiente tabla se muestra diferencias genéticas entre *M. tuberculosis* H37Rv y H37Ra.

	H37Rv	H37Ra
Tamaño del genoma	4, 411, 529 pb	4, 419, 977 pb
Porcentaje G-C	65.6%	65.6%
Secuencias codificantes	3924	4034
Densidad codificante	91%	90.1%
Tamaño de genes	1100 pb	1000 pb

Elaborada a partir de (Zheng et. al. 2008)

### 2.1.2. Condiciones de crecimiento

*M. tuberculosis* es un parásito intracelular, microaerófilico e incluso se ha descrito que anaerobio (Rustad et al., 2009). Es mesófilo, su temperatura óptima es de 37°C aunque puede crecer en un rango de temperatura de 30 a 42 °C. Crecen en rangos amplios de pH (3.5 a 7.5), aunque el óptimo es de 5.5 (Cole et al., 1998).

Su tiempo de generación en medio de cultivo y en modelos animales es aproximadamente de 24 horas. El crecimiento lento de esta bacteria y su capacidad de permanecer latente contribuyen a la naturaleza crónica de la enfermedad (Cole et al., 1998).

*M. tuberculosis* forma agregados celulares compactos debido a la naturaleza hidrofóbica de su pared celular. Cuando se cultiva en medio sólido, las colonias son grandes, compactas, secas, granulares, amorfas, convexas, elevadas, con bordes irregulares y de color amarillento (Lemus, 2007).

## 2.2 Tuberculosis (TB)

La palabra tuberculosis viene del latín *tuberculum*, que significa “protuberancia pequeña” y del sufijo griego *-osis* que denota enfermedad. Este nombre fue acuñado en 1839 por el profesor y médico alemán Johann Lucas Schlönlein. En 1882, el médico alemán Robert Koch, describió por primera vez a *M. tuberculosis* como el agente causal de la enfermedad (Daniel, 2006).

Este padecimiento afecta a diferentes especies de mamíferos como: roedores, ganado bovino y porcino; tejones, venados, elefantes, cabras, leones, mamíferos marinos pertenecientes a la superfamilia *Pinnipedia* y humanos (Cole, 2002; Frota et al., 2004).

Es causado por bacterias del complejo *M. tuberculosis* (CMTB), denominado así porque comparten el 95.5% de su genoma (Fig. 3). Este grupo incluye ocho especies: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. caprae*, *M. microti*, y *M. pinnipedi* (Reddington et al., 2011).



La diversidad en la virulencia y el tipo de hospedero que infectan las especies del CMTB parecen depender de ciertas secuencias en el genoma llamadas regiones de diferencia (RD's). Éstas determinan la patogenicidad de cada especie. En la tabla 2 se muestran las diferencias genéticas entre los miembros del CMTB.

Especies	RD1	RD4	RD9	RD12
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	+
<i>M. africanum</i>	+	+	-	+
<i>M. cannetii</i>	+	+	+	-
<i>M. bovis</i>	+	-	-	-
<i>M. bovis</i> BCG	-	-	-	-
<i>M. microtti</i>	-	+	-	+
<i>M. pinnipedii</i>	+	+	-	+
<i>M. caprae</i>	+	-	-	-

Resultados determinados por PCR. Presente (+); ausente (-).  
Elaborada a partir de (Alexander et. al., 2010; Halse et. al., 2011).

### 2.2.1. Historia

Existe evidencia sólida que la TB es una enfermedad infecto-contagiosa que afecta al ser humano desde hace muchos siglos. Los casos de TB más antiguos se describieron en India y China hace 3,300 y 2,300 años respectivamente. En la región andina se encontró la evidencia arqueológica más antigua de TB en América indicando que esta enfermedad ya se encontraba en este hemisferio antes de la llegada de los primeros exploradores europeos (Daniel, 2000; Roberts and Buikstra, 2003)

Esta enfermedad estuvo presente entre los antiguos egipcios y fue bien conocida en la Grecia clásica, donde fue llamada *phthisis*, palabra que significa “consunción”. Entre los siglos XVII y XVIII la TB provocó la cuarta parte de las muertes en adultos del continente europeo (Daniel, 2006; Roberts and Buikstra, 2003)

Hasta la década de 1980 los casos de TB habían disminuido considerablemente, por lo que se pensaba que estaban cerca de erradicarla. Sin embargo, en las últimas décadas esta enfermedad ha retomado importancia mundial debido a su asociación con otras patologías y al aumento continuo de casos con cepas multidrogoresistentes.

### *2.2.2. Situación actual de la TB*

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* y de estas personas una de cada 10 contraerá TB activa en algún momento de su vida, incluso hay registro de que en el año 2011 hubo 8.8 millones de casos nuevos; de los cuales murieron 1.4 millones de personas. Por tal motivo la TB es la segunda causa de muerte debida a una enfermedad infecciosa a nivel mundial solo por debajo del VIH/SIDA (OMS, 2011).

La TB se asocia con la pobreza, por lo que la mayoría de casos se encuentran en Asia (59%) y África (26%), mientras que en el Mediterráneo, Europa y América solo se registraron el 7%, 5% y 3%, respectivamente (OMS, 2011).

Según el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE), en nuestro país durante el año 2010 se reportaron 18, 848 casos de TB, de los que el 81.6% fue pulmonar, 1.6% meníngea, 5.7% ganglionar y 11.1% de otras formas [riñones, huesos, intestinos y genitales] (CENAPRECE, 2011).

Los casos de TB pulmonar (15, 384) se han asociado con diversas patologías. El 22% con pacientes diabéticos, el 13.7% con desnutrición, el 6% con alcoholismo y el 4.1% con VIH/SIDA. Es importante resaltar que los individuos que padecen estas enfermedades se encuentran inmunocomprometidos, por lo que la TB se desarrolla hacia una enfermedad activa rápidamente (CENAPRECE, 2011).

### *2.2.3. Historia Natural de la tuberculosis pulmonar*

La TB se caracteriza por la presencia de “granulomas” en los pulmones, que afecta principalmente a los adultos jóvenes. Se transmite de persona a persona por la vía respiratoria, debido al contacto con las gotitas de *Pflüge* provenientes de la tos o estornudo de pacientes con enfermedad pulmonar activa. Estas gotitas tienen de 1 a 3 bacilos y pueden permanecer suspendidas en el aire varias horas. Cuando una persona inhala estas partículas y llegan hasta los alveolos comienza la infección. Los bacilos

son fagocitados por macrófagos alveolares, desencadenando una respuesta inmune que involucra citocinas y quimiocinas (Henderson et al., 1997; Manca et al., 1999; OMS, 2011)

En el 90% de los casos la infección se limita al sitio primario de invasión, ya que infecta a individuos inmunocompetentes. Mientras que el 10% de los casos no se limita y continúa la replicación bacilar dando lugar a la enfermedad activa. Los síntomas clínicos de la TB son dolor de pecho, escalofríos, astenia, síndrome pseudogripal, pérdida de apetito, disminución de peso, fiebre, sudoración nocturna, eritema nodoso, necrosis de tejidos, tos de larga evolución (más de tres semanas) con sangre y hemoptisis (Bloom and Murray, 1992; Kishore et al., 2009).

### *2.3. Tratamiento*

El tratamiento actual contra la TB fue establecido en la década de 1960 y se administra en un intervalo de 6-9 meses. Este tratamiento tiene dos objetivos principales: matar a los bacilos metabólicamente activos y destruir a los bacilos que se encuentran latentes (Onyebujoh et al., 2005; Rivers and Mancera, 2008). A mediados de la década de 1990 la OMS introdujo la estrategia del tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), del cual se ha medido su éxito (OMS, 2011).

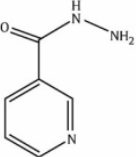
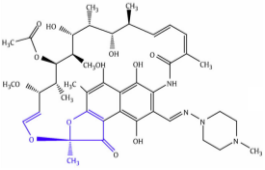
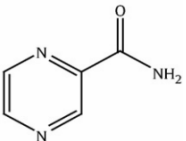
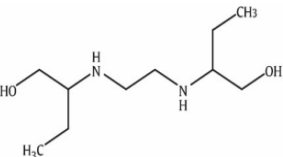
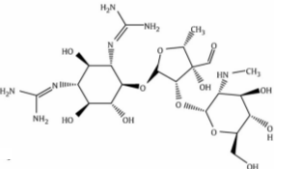
El éxito del TAES se define como un paciente curado o que completó el tratamiento. En México durante el año 2010 se reportó una tasa de éxito del 82.3% para el tratamiento primario de TB. La mayoría de los casos no exitosos se deben al abandono del tratamiento (CENAPRECE, 2011; OMS, 2011).



### 2.3.1 Primera línea

Un tratamiento típico para TB no resistente comprende la administración de isoniazida, pirazinamida, etambutol y rifampicina durante dos meses, seguido por cuatro meses de rifampicina e isoniazida (Zhang et al., 2006). En la tabla 3 se muestran los mecanismos de acción y los diversos efectos secundarios de los antibióticos antes mencionados.

**Tabla 3. Antibióticos de primera línea utilizados para el tratamiento de la TB**

Nombre y fórmula	Mecanismo de acción	Efectos secundarios
<p>Isoniazida</p> 	<p>Activada por la enzima catalasa peroxidasa. Inhibe la síntesis de ácidos micólicos</p>	<p>Insomnio, inquietud, deficiencia de vitamina B6, daño hepático, polineuritis periférica</p>
<p>Rifampicina</p> 	<p>Evita la transcripción, ya que se une a la subunidad β de la RNA polimerasa</p>	<p>Trastornos dermatológicos, hepáticos, hematológicos, ginecológicos, inmunológicos y gastrointestinales</p>
<p>Pyrazinamida</p> 	<p>Activa por las pyrazinamidasa. Inactiva enzimas vitales al disminuir el pH</p>	<p>Hepatotoxicidad, artralgia, fotosensibilización de la piel, hiperuricemia y trastornos gastrointestinales</p>
<p>Etambutol</p> 	<p>Inhibe la síntesis de arabinogalactano, LAM y arabinosiltransferasa (pared celular)</p>	<p>Neuritis óptica y periférica, dolor general, trastornos gastrointestinales y dermatológicos</p>
<p>Estreptomicina</p> 	<p>Inhibe síntesis de proteínas, se une a subunidad 30s del ribosoma</p>	<p>Ototoxicidad, insuficiencia renal, bloqueo unión neuromuscular, reacciones cutáneas</p>

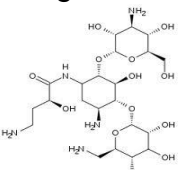
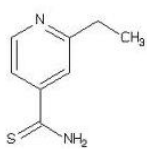

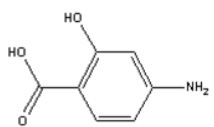
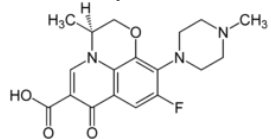
Modificada de (Coll, 2003; Rivers and Mancera, 2008)

La duración tan larga y los múltiples efectos secundarios que tienen estos fármacos, provocan que el paciente interrumpa el tratamiento. Generalmente en estos casos se favorece la selección de cepas resistentes a isoniazida y rifampicina, llamadas cepas multidrogoresistentes [TB-MDR] (Raviglione and Smith, 2007). Los casos de TB-MDR han aumentado en los últimos años lo que se ha reflejado en el aumento de fondos para su diagnóstico y tratamiento, en el 2012 se espera alcanzar \$0.6 billones de dólares (OMS, 2011).

### *2.3.2. Segunda línea.*

El tratamiento de TB-MDR tiene una duración de 18-24 meses y consiste en una combinación de fármacos de primera línea a los que la bacteria siga siendo susceptible (estreptomina, pirazinamida y etambutol), conjuntamente con fármacos de segunda línea como: aminoglucósidos (kanamicina, capreomicina, amikacina), etionamida, cicloserina, fluoroquinolonas (levofloxacino, ciprofloxacino) y ácido p-amino-salicílico (Lado Lado et al., 2004). En la tabla 4 se muestran los mecanismos de acción y los diversos efectos secundarios de estos fármacos.

**Tabla 4. Antibióticos de segunda línea utilizados para el tratamiento de la TB**

Nombre y fórmula	Mecanismo de acción	Efectos secundarios
<p><b>Aminoglucósidos</b></p> 	Inhibe la síntesis proteica	Ototoxicidad, nefrotoxicidad, hipersensibilidad cutánea, hipopotasemia, hipocalcemia, hipomagnesemia
<p><b>Etionamida</b></p> 	Inhibe síntesis de ácidos micólicos	Hepatitis, neurotoxicidad, reacciones cutáneas, neuropatía periférica, hipoglucemia, hipotiroidismo y desorden gastrointestinal
<p><b>Cicloserina</b></p> 	Inhibe la síntesis de D-alanil-D-alanina (pared celular). Bacteriostática.	Hepatitis, hipersensibilidad, anemia megaloblástica, alteraciones del Sistema Nervioso Central y psicóticas
<p><b>Acido para-amino-salicílico</b></p> 	Antifólico. Bacteriostático	Hepatitis, malestar gastrointestinal, efecto antitiroideo, hipersensibilidad e hipopotasemia
<p><b>Fluoroquinolonas</b></p> 	Evitan la síntesis de DNA inhibiendo la enzima girasa	Malestar gastrointestinal, alteraciones del Sistema Nervioso Central, hipersensibilidad, fotosensibilidad

Modificada de (Coll, 2003; Lado Lado et al., 2004)

Los medicamentos de segunda línea no son específicos por lo que presentan un efecto bacteriostático, son menos potentes, más tóxicos y más costosos. Por esta razón, el tratamiento debe prolongarse, aunque en muchos casos genera tasas menores de recuperación (Dorman and Chaisson, 2007)

Todos estos factores contribuyen a que el paciente no siga estrictamente el tratamiento y eventualmente lo abandone, favoreciendo la persistencia de cepas extremadamente resistentes (TB-XDR). Estas se caracterizan por ser resistentes a la isoniazida, rifampicina, flouoroquinolonas y al menos uno de los aminoglucósidos (Raviglione and Smith, 2007).

La resistencia alta que presentan las cepas XDR obliga a usar un tratamiento alternativo que utiliza los medicamentos de segunda línea menos eficientes y más tóxicos (Chan et al., 2008). Además, requiere un seguimiento estricto y supervisión para prevenir la resistencia a todos los medicamentos que podrían hacer la enfermedad incurable (Hopewell et al., 2006; Raviglione and Smith, 2007).

Por lo anterior, es necesario explorar nuevos agentes antimicobacterianos. En las últimas décadas, ha resurgido la investigación sobre la TB, así como el uso de nuevos fármacos para su tratamiento (Mdluli and Spigelman, 2006). De hecho, existen varios compuestos sintéticos que están progresando hacia su uso terapéutico (Tabla 5).

<b>Tabla 5. Fármacos en desarrollo clínico contra la TB</b>	
<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Rifapentina	Inhibe síntesis de RNA
Moxifloxacina	Inhibe síntesis de DNA
Gatifloxacina	Inhibe síntesis de DNA
TMC207	Inhibe síntesis de ATP
PA-824	Inhibe síntesis de pared celular y proteínas
OPC-67683	Inhibe síntesis de pared celular y proteínas
SQ109	Inhibe síntesis de pared celular
Linezolida	Inhibe síntesis de proteínas
PNU-100480	Inhibe síntesis de proteínas
AZD5847	Inhibe síntesis de proteínas
LL-3858	Desconocido

Elaborada a partir de (Nuermberger et. al., 2010).

## 2.4 Fitoquímicos

Los compuestos naturales son moléculas que tienen un gran impacto en la salud humana, por lo que han desempeñado un papel importante en el descubrimiento de fármacos (Kishore et al., 2009). Se ha demostrado que diversos extractos o compuestos aislados de plantas o frutas poseen varias actividades biológicas como: bactericida, antiviral, antioxidante e inclusive efectos anti-cancérogos e inmunomoduladores (Eloff, 2001).

El 75% de los fármacos probados se derivan de las plantas medicinales, de hecho según la OMS, más del 65% de la población mundial utiliza las plantas medicinales como modalidad primaria del cuidado médico (Cragg et al., 1997; Farnsworth et al., 1985). A nivel mundial se utilizan 350 especies de plantas para el tratamiento de la TB (McGaw et al., 2008; Okunade et al., 2004). Entre ellas se encuentran *Larrea tridentata*, *Curcuma longa*, *Garcinia mangostana* y *Allium sativum*.

### 2.4.1. Ácido nordihidroguayaretico (NDGA).

El NDGA es un polifenol con estructura de catecol. Su fórmula química es  $C_{18}H_{22}O_4$  (Fig. 4) y su masa molecular es de 302.36 g/mol. Es un producto natural con varias propiedades biológicas como: antioxidante, antitumoral, antiviral (Floriano-Sanchez et al., 2006; Lu et al., 2010; Nishimura et al., 2002; Park et al., 2004).

No se ha reportado actividad antibacteriana del NDGA, sin embargo, su estructura es semejante a un flavonoide. Estos compuestos presentan actividad sobre *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*. La acción bactericida de algunos flavonoides como: buteina, isoliquirtigenina y miricetina, se debe a la presencia de estructuras complejas que pudieran romper la pared celular e inhibir la síntesis de ácidos micólicos y ácidos grasos (Brown et al., 2007; Nakayama et al., 2000; Tsuchiya et al., 1996). Recientemente se ha reportado que el NDGA inhibe la anhidrasa carbónica de *M. tuberculosis* (Davis et al., 2011).

Se ha reportado que el NDGA en concentraciones altas (100  $\mu$ M) rompe el citoesqueleto e inhibe la activación de cinasas, lo que induce la apoptosis en líneas celulares (Holland et al., 2001; Nishimura et al., 2002; Park et al., 2004). Se ha identificado que tiene un papel importante en la terapia de cáncer de próstata, pulmón, esófago y piel (Lu et al., 2010).

El NDGA es el compuesto más abundante (aprox. 80%) de los fenoles que son extraídos de *Larrea tridentata* (Fig. 4). En la medicina tradicional han usado esta planta para tratar desordenes como: varicela, llagas en la piel, diabetes, cáncer, TB, resfriados, reumatismo, enfermedades venéreas y piedras en los riñones o vesícula (Arteaga et al., 2005; Hyder et al., 2002; Lia et al., 2001). El extracto clorofórmico de esta planta inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv MDR y no-MDR (Camacho-Corona et al. 2008).

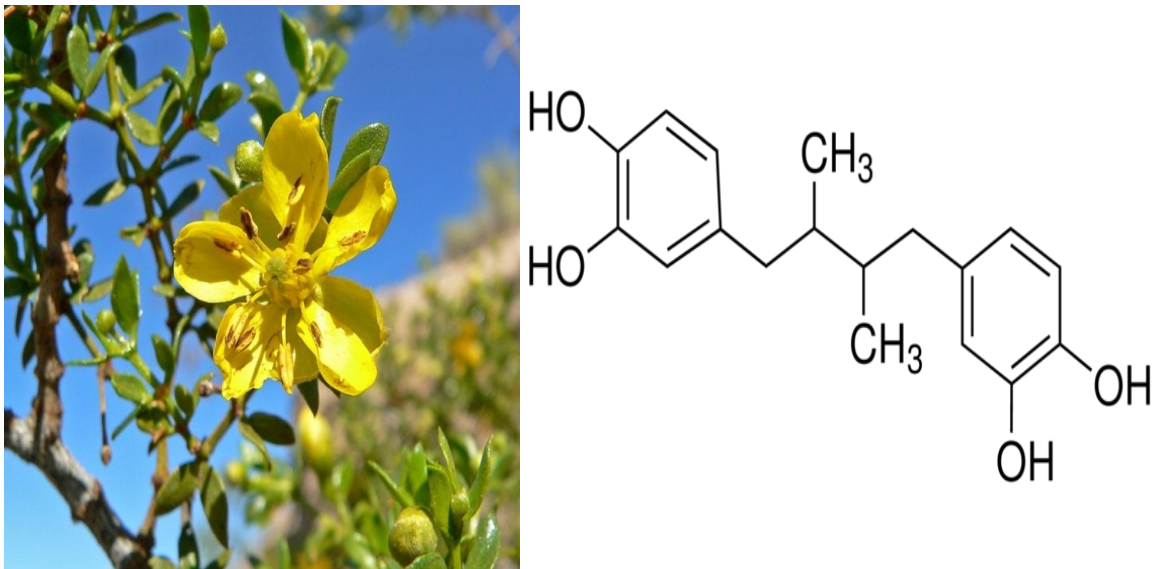


Fig. 4. Flor de *Larrea tridentata* y estructura química del NDGA.

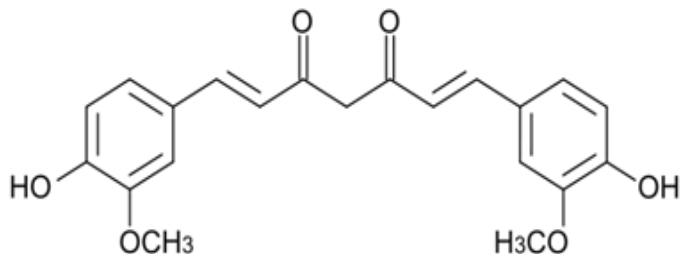
#### 2.4.2. Curcumina (CUR)

La CUR es un polifenol lipofílico e insoluble en agua. Su fórmula química es C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> (Fig. 5) con un peso molecular de 368.37 g/mol (Padhye et al., 2010). Se ha reportado que tiene actividad antioxidante, anti-inflamatoria, anti-parasítica, anti-cancerígena, antiviral e hipoglucemiante (Anand et al., 2008; Araujo and Leon, 2001; Eigner and Scholz, 1999; Jurenka, 2009; Mazumder et al., 1995; Pari and Murugan, 2005).

La CUR presenta actividad bactericida contra *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* (Wang et al., 2009). Según Rai y col. (2008) la curcumina inhibe el ensamblaje de la proteína FtsZ, la cual está involucrada en la formación del anillo Z durante la división celular (Rai et. al., 2008).

Se ha reportado que la CUR induce apoptosis dependiente de caspasa y calpaina en células cancerosas de sangre, cerebro, pecho, cabeza, cuello, hígado, páncreas, colon, próstata, ovarios, piel y sistema gastrointestinal (Anand et al., 2008; Singh et al., 2009).

La CUR es extraída de los tubérculos de *Curcuma longa* conocida como “cúrcuma” (Fig. 5), esta planta se ha utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de trastornos biliares y hepáticos, anorexia, tos, reumatismo, sinusitis, lesiones diabéticas, TB e inflamación (Jurenka, 2009).



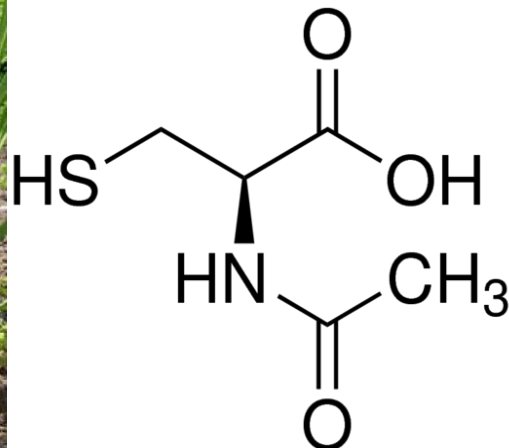
**Fig. 5.** Flor de *Curcuma longa* y estructura química de la CUR.

#### 2.4.3. N-acetil cisteína (NAC).

La NAC es un compuesto sulfurado precursor de la cisteína y del glutatión. Su fórmula química es  $C_5H_9NO_3S$  (Fig. 6), con un peso molecular de 163.19 g/mol (van Zandwijk, 1995). Es una molécula con diversas actividades biológicas como: mucolítica, anti-inflamatoria, antioxidante, antiviral y anti-cancerígena (Hurst et al., 1967; Kalebic et al., 1991; Mitchell et al., 1974; Roederer et al., 1990).

Se ha reportado que la NAC tiene actividad bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc mesenteroides* y *E. coli*. Esta actividad puede deberse a su antagonismo con el aminoácido cisteína o a la inhibición de enzimas metabólicas con grupo sulfhidrilo, debido a su interacción con el grupo SH- (Parry and Neu, 1977; Zigmunt and Martin, 1968).

La NAC es extraída de la raíz de *Allium sativum*, conocido como ajo (Fig. 6). Este es usado en la medicina tradicional como estimulante, antiséptico, expectorante, diurético, hipotensor y para tratar fiebre, dolor de cabeza, cólera, disentería, problemas del corazón, reumatismo, diabetes, diarrea, trastornos intestinales o pulmonares y TB. Se reportó que el extracto etanólico del ajo inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* MDR y no-MDR con una concentración mínima inhibitoria de 1 a 3 mg/ml (Aviello et al., 2009; Hannan, et. al. 2011; Thomson and Ali, 2003; Thring and Weitz, 2006).



**Fig. 6.** Planta *Allium sativum* y estructura química de la N-acetil cisteína (NAC).

#### 2.4.4. Alfa-mangostina (MAN).

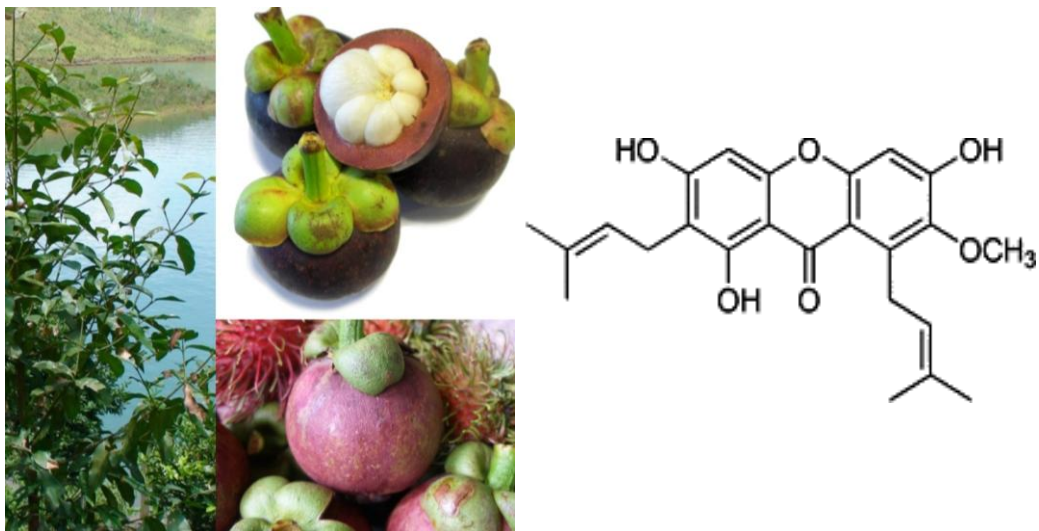
La MAN es una xantona diprenilada y tetraoxigenada, su fórmula química es C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub> (Fig. 7), con un peso molecular de 410.46 g/mol. Se ha demostrado que tiene actividad anti-fúngica, antiviral, hipoglucemiante, antitumoral y anti-cancerígena (Muhanji and Hunter, 2007; Pedro et al., 2002; Pinto et al., 2005; Riscoe et al., 2005).



Se ha reportado que la MAN tiene actividad bactericida contra *S. aureus* susceptible y resistente a la meticilina (MRSA), *Streptococcus mutans*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *B. subtilis* y *M. tuberculosis* (Sundaram et al., 1983; Suksamrarn et al., 2003). Este compuesto puede diluir sustancias lipofílicas e inhibe enzimas involucradas en la glucólisis como: aldolasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y deshidrogenasa láctica (Nguyen and Marquis, 2011; Suksamrarn et al., 2006).

Se ha reportado que la MAN tiene efecto tóxico sobre las células cancerosas de sangre, pecho y colon. Este compuesto puede inducir el arresto del ciclo celular y apoptosis por vía mitocondrial dependiente del calcio y la ATPasa (Obolskiy et al., 2009).

La MAN es extraída del pericarpio de *Garcinia mangostana* (Fig. 7), un árbol conocido como mangostán. Sus frutos tienen un sabor muy apreciado, por lo que se conoce como “la reina de las frutas” (Chin and Kinghorn, 2008; Pedraza-Chaverri et al., 2008). En la medicina tradicional, la cáscara del mangostán se ha usado en el tratamiento de la diarrea, infecciones cutáneas, heridas, úlceras, disentería, inflamación, TB, alergias, artritis, micosis, gonorrea, cistitis, fiebre y cólera (Moongkarndi et al., 2004; Ngawhirunpat et al., 2010; Pedraza-Chaverri et al., 2008; Suksamrarn et al., 2006).



**Fig. 7.** Árbol y fruto de *Garcinia mangostana* y estructura química de la MAN.

### **3. JUSTIFICACION.**

La TB es un problema de salud en México, ya que ha aumentado el número de casos nuevos en los últimos años debido a la co-infección con la diabetes, la desnutrición y la constante selección de cepas MDR y XDR.

El tratamiento anti-TB es muy largo y con múltiples efectos secundarios, lo que promueve que el paciente lo abandone. Por esta razón, se requiere acortar la duración del tratamiento para lograr un mayor apego y por lo tanto mayores tasas de curación. Aunque existen algunos fármacos en prueba para el tratamiento de la TB es indispensable aumentar la gama de compuestos para su combate.

Una fuente de fármacos nuevos son los compuestos naturales que se extraen de plantas usadas en la medicina tradicional. Por ello, en este trabajo se analiza la actividad micobactericida de cuatro compuestos naturales en forma pura que son extraídos de *Larrea tridentata*, *Curcuma longa*, *Garcinia mangostana* y *Allium sativum*, plantas usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la TB.

### **4. OBJETIVO GENERAL:**

Determinar el efecto del ácido nordihidroguayaretico, la curcumina, la alfa-mangostina y la N-acetil cisteína sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Ra en medio líquido 7H9, así como su toxicidad en la línea celular monocítica humana, THP-1.

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Evaluar el crecimiento de *M. tuberculosis* en medio líquido mediante dos métodos: uno indirecto colorimétrico (MTT) y uno directo unidades formadoras de colonia (UFC)
2. Determinar el efecto del ácido nordihidroguayaretico, la curcumina, la alfa-mangostina y la N-acetil cisteína sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* cultivado en medio líquido (7H9) con ambos métodos.
3. Evaluar el efecto citotóxico del ácido nordihidroguayaretico, la curcumina, la alfa-mangostina y la N- acetil cisteína en la línea celular monocítica humana THP-1.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 6.1 Cepa de *M. tuberculosis* y medios de cultivo.

Se utilizó la cepa de *M. tuberculosis* H37Ra, la cual fue obtenida de la colección ATCC (American Type Culture Collection). Las bacterias se cultivaron en medio líquido 7H9 (complementado con ADC 20% y glicerol al 1%) y en medio sólido 7H10 (complementado con OADC 10%, asparagina 0.5% y glicerol al 1%) a temperatura constante de 37°C. Los componentes de los medios de cultivo se ven en el anexo 2.

### 6.2 Cinética de crecimiento.

Se evaluó el crecimiento del cultivo de *M. tuberculosis* en medio líquido a través del tiempo. Esto con el fin de asegurar el período en el cual las bacterias sean viables y se estén dividiendo, para posteriormente evaluar el efecto de los compuestos sobre el crecimiento de la bacteria.

Para ello, se cultivaron las bacterias a una concentración de  $1 \times 10^6$  bacterias/mL. Se sembraron 270  $\mu$ l de suspensión bacteriana en cada pozo en placas de 96 pozos (Corning, INC) y se incubaron en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 27 días.

El crecimiento se cuantificó cada tercer día por dos métodos: uno directo por la cuenta de unidades formadoras de colonia (UFC) y uno indirecto colorimétrico que cuantifica la actividad metabólica (MTT).

### 6.3 Actividad antimicobacteriana del NDGA, CUR, NAC y MAN.

Los compuestos puros se obtuvieron comercialmente para asegurar el mínimo de impurezas y evitar interferencia en el resultado. La preparación y procedencia de los compuestos se muestran en el anexo 3.

Para detectar la actividad antimicobacteriana, se cultivaron 270  $\mu$ l de la suspensión de *M. tuberculosis* ( $1 \times 10^6$  bacterias/mL) en medio líquido con el fin de asegurar cultivos homogéneos y disponibilidad fácil de los compuestos. Además la adición de los compuestos se realizó cuando las bacterias se encontraban viables, metabólicamente activas y en fase de duplicación, se incubaron hasta el inicio de la fase estacionaria para evitar cuantificar el crecimiento en etapas de muerte y obtener falsos positivos.

Es importante señalar que se utilizó una concentración inicial de 200  $\mu$ g/mL para cada uno de los compuestos. Esta es una concentración estándar que se usa comúnmente para evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos o extractos naturales (Jimenez-Arellanes et al., 2003).

Como controles experimentales se incluyeron: un cultivo de bacterias sin ningún tratamiento, un control bactericida, cultivo en presencia de rifampicina [25 µg/ml], (antibiótico de primera línea que se usa para el tratamiento de la TB) y el último control consistió en medio de cultivo 7H9 sin bacterias. Finalizado el tiempo de incubación de cada tratamiento se cuantificó el crecimiento bacteriano por MTT y UFC.

#### *6.4 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la MAN, el NDGA y la NAC.*

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de un compuesto que evita totalmente el crecimiento bacteriano (Jimenez-Arellanes et al., 2003). Para determinar la CMI de cada compuesto, las bacterias se cultivaron en medio líquido como se describió anteriormente y se incubaron hasta la fase exponencial. Luego se adicionaron concentraciones crecientes de: MAN (5, 10, 15, 25, 50 y 100 µg/mL), NDGA (400, 500, 750 y 1000 µg/mL) y NAC (500 µg/mL), después se incubaron hasta el inicio de la fase estacionaria, luego se cuantificó del crecimiento.

#### *6.5 Cuantificación del crecimiento.*

##### *6.5.1 Indirecta por el método colorimétrico tetrazolio (MTT).*

El método directo de bacterias viables es confiable, no obstante se han desarrollado técnicas colorimétricas reproducibles que se pueden emplear también como indicadores de la actividad metabólica (enzimática de óxido-reducción). Por ello en este trabajo se utilizó esta técnica para llevar a cabo una evaluación primaria de los compuestos con actividad antimicrobiana, rápida, fácil y comparativa.

El método colorimétrico del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) se basa en cuantificar la actividad metabólica de la célula. El MTT es un tinte amarillo de tetrazolio, el cual es reducido por la enzima deshidrogenasa de las células metabólicamente activas y se produce un producto morado llamado formazán. Existe una relación lineal entre la absorbancia de formazán y la concentración bacteriana (Mshana et al., 1998). Con base en lo anterior, se definió la CMI como la concentración más baja de cada compuesto que evita el cambio de color (amarillo-morado).

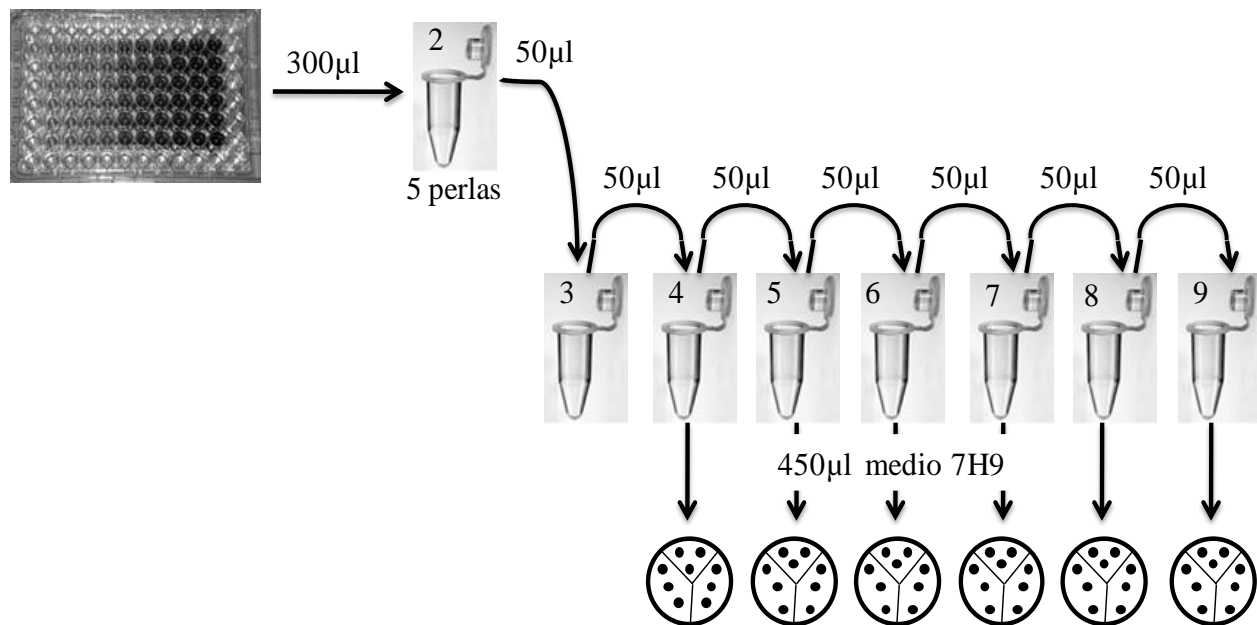
Para ello, a los cultivos con los diferentes tratamientos se les agregó MTT (5 mg/mL) durante 24 h a 37°C y después se detectó el viraje de color (Gordien et al., 2009). Para cuantificar la producción de formazán, se tomaron 50 µl del cultivo y se transfirieron a otra placa, luego se adicionaron 200 µl de isopropanol ácido (1:24) y se agitaron las placas durante 5 minutos para permitir que los cristales de formazán se disolvieran, después se monitoreó el cambio de color en el espectrofotómetro a 570 nm de longitud

de onda en un lector de microplacas Biotek. El control (blanco) fue un pozo con isopropanol ácido y MTT.

### 6.5.2 Directa por método de cuentas viables (UFC)

Es un método directo donde se cuantifican las Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Las UFC es el número mínimo de células sobre la superficie, en un medio de agar semi-sólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes. Esta técnica indica el número relativo de bacterias en un mililitro.

Para cuantificar el efecto de los compuestos en cada uno de los tratamientos. Se tomó el cultivo completo de cada pozo y se transfirió a un tubo cónico de 1.6 mL (ependorf) que contenía 5 perlas de vidrio. Cada muestra se homogeneizó en el vortex durante 5 min para disgregar a las bacterias, luego se tomaron 50  $\mu$ L para llevar a cabo diluciones seriadas (1/10). Cada dilución se sembró por triplicado (10  $\mu$ l) en medio sólido 7H10 y se incubaron durante 21 días. Finalmente se realizó la cuenta de unidades formadoras de colonia para cada uno de los tratamientos (Fig. 8).



**Fig. 8.** Método para contar Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

### *6.6 Efecto citotóxico de los compuestos sobre la línea celular monocítica humana, THP-1.*

Otra parte esencial de este trabajo fue evaluar el efecto citotóxico de los compuestos en células humanas (línea celular monocítica THP-1). Para ello, las THP-1 ( $0.6 \times 10^6$ /mL), se cultivaron en placas de 48 pozos (450  $\mu$ L de la suspensión celular) en presencia de las diferentes concentraciones de los compuestos por 24 horas en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y se monitoreó la viabilidad celular.

El efecto citotóxico se determinó mediante el método colorimétrico MTT, el cual solo detecta células metabólicamente activas y por lo tanto vivas. Por lo tanto la concentración de formazán generada es directamente proporcional al número de células viables (Mossman, 1983). El método se encuentra estandarizado y automatizado para detectar toxicidad en células eucariontes (Alley et al., 1988; Carmichael et al., 1987)

### *6.7 Análisis estadísticos.*

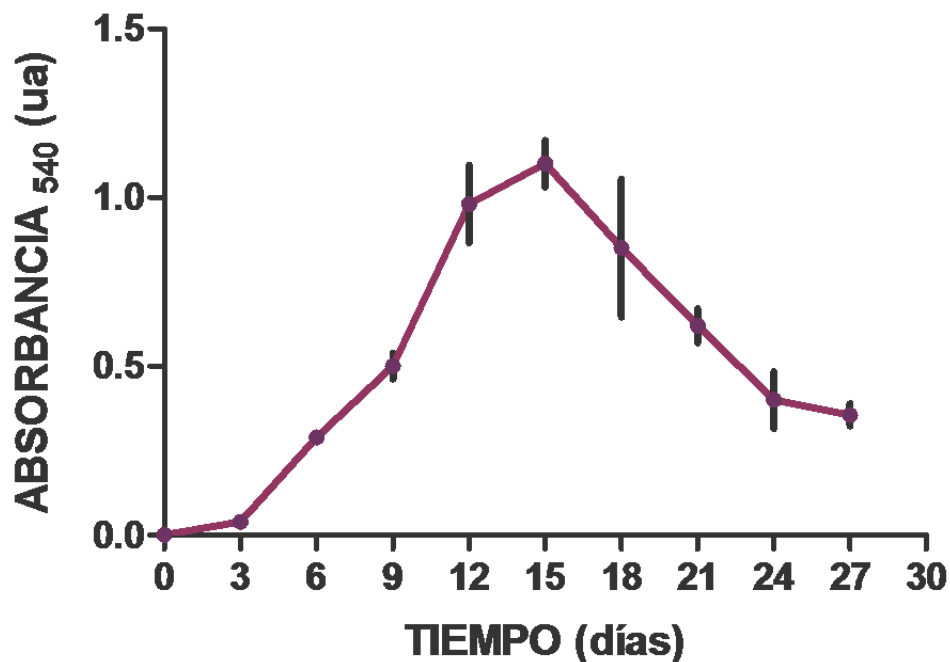
Los experimentos se realizaron al menos tres veces de manera independiente por triplicado y las variaciones observadas fueron constantes siempre menores del 10%. Los análisis se llevaron a cabo en el programa GraphPadPrism 5. Se realizó la prueba ANOVA de una vía con un estudio posterior de Dunnett para evaluar si había diferencia significativa entre el control que fue el cultivo bacteriano sin tratamiento y los cultivos crecidos en presencia de los diferentes compuestos naturales. Los valores  $p < 0.05$  fueron considerados significantes.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1 Cinética de crecimiento de *M. tuberculosis* en medio líquido.

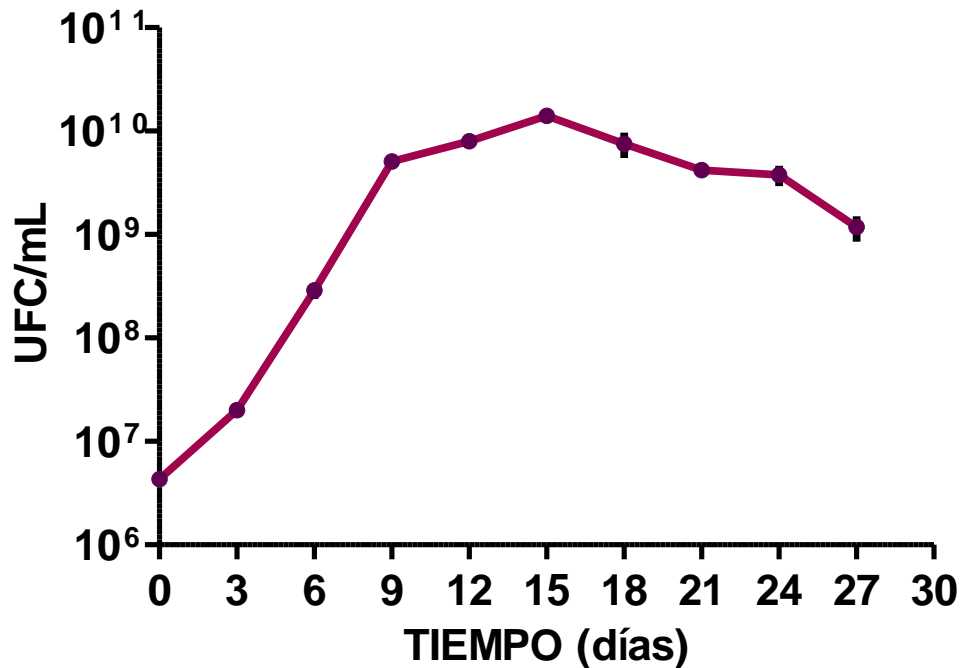
Con la finalidad de determinar los tiempos óptimos para la adición de los compuestos y evaluar su efecto antimicobacteriano, se realizó una cinética de crecimiento de *M. tuberculosis* cultivada en medio líquido, la cuantificación del crecimiento se realizó por los métodos MTT y UFC.

En la cinética de crecimiento determinada por MTT se observa que al inicio del cultivo no hay detección de formazán. Sin embargo, al día 3 hay detección por cambio en la absorbancia (0.04 ua), esto representa que las bacterias se encuentran metabólicamente activas. El metabolismo se incrementa significativamente desde el día 3 hasta el 15, donde alcanza su punto máximo de absorbancia (1.1 ua). A partir de ese día la actividad metabólica bacteriana disminuye progresivamente hasta 0.33 ua en el día 27 (Fig. 9).



**Fig. 9. Cinética de la actividad metabólica de *M. tuberculosis* en medio líquido determinada por MTT.** Se realizó un cultivo con una concentración inicial de  $4.3 \times 10^6$  bacterias/mL, el cual se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 días. Cada tercer día se agregó MTT (5 mg/mL) y se realizó la cuantificación de la actividad metabólica hasta el día 27 (n=12).

Con respecto a la cuantificación del crecimiento monitoreada por UFC se observa que del día 0 al 3 de incubación, las bacterias crecieron de  $4.3 \times 10^6$  a  $2.0 \times 10^8$  bacterias/mL. Del día 3 al 15 las bacterias siguen creciendo hasta  $1.4 \times 10^{10}$  bacterias/mL. La fase exponencial se encuentra entre los días 3 y 9. Las UFC disminuyen lentamente desde el día 15, alcanzando  $1.18 \times 10^9$  UFC/mL al día 27 (Fig. 10).



**Fig. 10. Cinética de crecimiento de *M. tuberculosis* en medio líquido cuantificada por UFC.** Se realizó un cultivo con una concentración inicial de  $4.3 \times 10^6$  bacterias/mL, el cual se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 días. Cada tercer día se cuantificó el crecimiento por UFC, para lo cual se realizaron diluciones seriadas del cultivo. Luego estas se sembraron en medio 7H10 y se incubaron 21 días. (n=12).

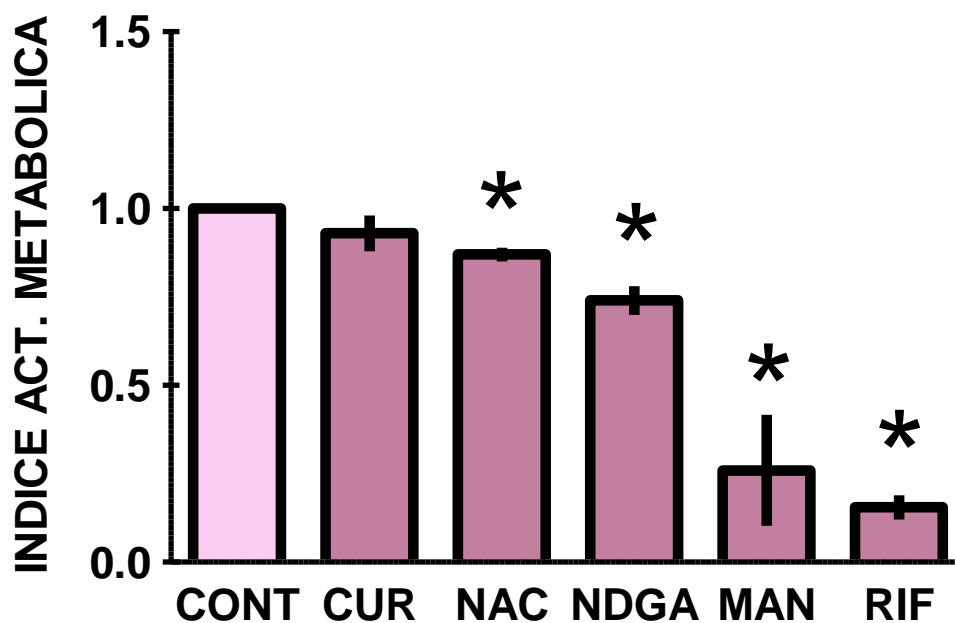
Con base en los resultados, se adicionaron los compuestos naturales al séptimo día de cultivo, esto para asegurar que las bacterias estuvieran metabólicamente activas y en crecimiento (duplicación). Mientras que la cuantificación del efecto de cada tratamiento se realizó hasta los catorce días, un día antes de que el cultivo llegue a su máximo crecimiento. De esta manera, se asegura que el efecto en el crecimiento se debe al tratamiento y no a la muerte bacteriana debido a la limitación de nutrientes.



## 7.2 Efecto del NDGA, la CUR, la NAC y la MAN sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* por MTT.

Los compuestos naturales (200 µg/mL) se adicionaron a los cultivos en el séptimo día de incubación, luego se dejaron siete días más. Se realizó la cuantificación de la actividad metabólica detectando la reducción de MTT a formazán en el espectrofotómetro ( $\lambda = 570$  nm). Las unidades de absorbancia obtenidas en cada tratamiento se reportaron como índices de actividad metabólica con respecto al control (bacterias cultivadas en medio 7H9 representan un índice de 1). La CMI se definió como aquella condición en la cual no hubo cambio de color (amarillo a morado), lo que indica la ausencia de actividad metabólica.

De los cuatro compuestos probados, solo la NAC, el NDGA y la MAN presentan un efecto inhibitorio sobre la actividad metabólica de *M. tuberculosis*, ya que se observó disminución significativa en el índice con respecto al control de 0.89, 0.74 y 0.26, respectivamente. El tratamiento con RIF (25 µg/mL) tuvo un índice de 0.15 (Fig. 11).

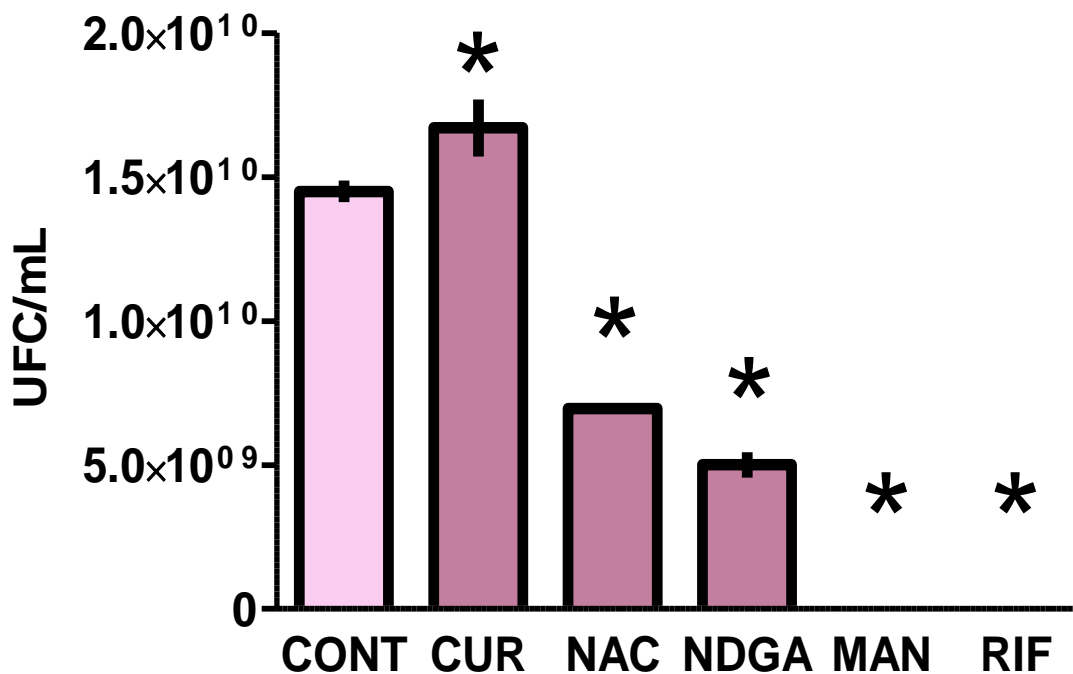


**Fig. 11.** Efecto de los compuestos sobre la actividad metabólica de *M. tuberculosis* cuantificada por MTT. A cultivos de siete días se adicionaron los compuestos con una concentración de 200 µg/mL y se incubaron hasta los catorce días. Luego se añadió el MTT (5 mg/ml) y se detectó la reducción a formazán. Los valores se reportaron como índices de actividad metabólica con respecto al control, igual a 1. (CUR), Curcumina; (NAC), N-acetil cisteína; (MAN), alfa-mangostina; (NDGA) ácido nordihidroguayaretico y (RIF), rifampicina. (n = 12). \* p<0.05

### 7.3 Cuantificación de la actividad antimicobacteriana de NDGA, CUR, NAC y MAN por el método UFC.

Este método nos permitió corroborar el efecto inhibitorio de los compuestos naturales sobre *M. tuberculosis* directamente sobre el número de células viables (UFC). Los cultivos en presencia de la CUR presentan aumento significativo en el crecimiento ( $1.67 \times 10^{10}/\text{mL}$ ) con respecto al control ( $1.4 \times 10^{10}/\text{mL}$ ). Esto puede ser debido a que la *M. tuberculosis* pudiera utilizarla como fuente de carbono.

La NAC mostró disminución significativa en el crecimiento ( $6.95 \times 10^9/\text{mL}$ ). El NDGA tuvo efecto inhibitorio ( $5 \times 10^9/\text{mL}$ ) ya que disminuyó 75% con respecto al cultivo sin tratamiento ( $1.4 \times 10^{10}/\text{mL}$ ). En los cultivos con MAN no hubo crecimiento bacteriano, lo que demuestra su potencial inhibitorio sobre *M. tuberculosis*. Es importante señalar que las bacterias con rifampicina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tampoco crecieron (Fig. 12).



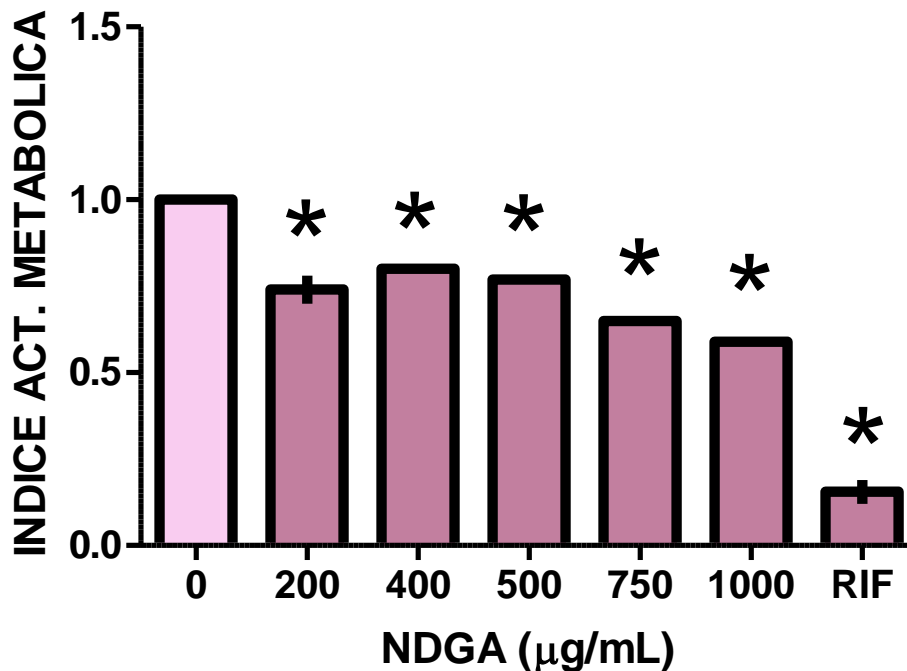
**Fig. 12. Efecto de los compuestos sobre el crecimiento de *M. tuberculosis* cuantificado por UFC.** A cultivos de siete días se adicionaron los compuestos con una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubaron hasta los catorce días. Para la cuenta de UFC, se hicieron diluciones seriadas del cultivo que se sembraron en medio sólido (7H10) y se incubaron durante 21 días. Los valores se reportaron como UFC/mL. (CUR), Curcumina; (NAC), N-acetil cisteína; (MAN), alfa-mangostina; (NDGA) ácido nordihidroguayaretico y (RIF), rifampicina. (n = 12). \* p<0.05

#### 7.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos naturales.

La CMI se define como aquella concentración en la cual un compuesto inhibe completamente el crecimiento micobacteriano (Gordien et al., 2009). Para determinarla, a los cultivos de siete días se agregaron la NAC, NDGA y MAN a diferentes concentraciones (5-1000  $\mu\text{g/mL}$ ), siete días después, se cuantificó el crecimiento por MTT y UFC.

##### 7.4.1. Ácido nordihidroguayaretico (NDGA).

Mediante el método MTT, se observa que todas las concentraciones usadas de NDGA inhiben significativamente la actividad metabólica de *M. tuberculosis*. En la concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$  se obtuvo un índice de 0.74. Mientras que en las siguientes concentraciones: 400, 500, 750 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  los índices reportados son 0.80, 0.77, 0.65 y 0.59 respectivamente (Fig. 13).



**Fig. 13. Efecto del NDGA sobre la actividad metabólica de *M. tuberculosis* cuantificado por MTT.** Cultivos bacterianos de siete días se incubaron en presencia de las diferentes concentraciones de NDGA hasta los catorce días. Luego se añadió el MTT (5 mg/mL) y se detectó la reducción a formazán. Los valores se reportaron como índice de actividad metabólica con respecto al control equivalente a 1.  $n = 12$ . \* $p < 0.05$

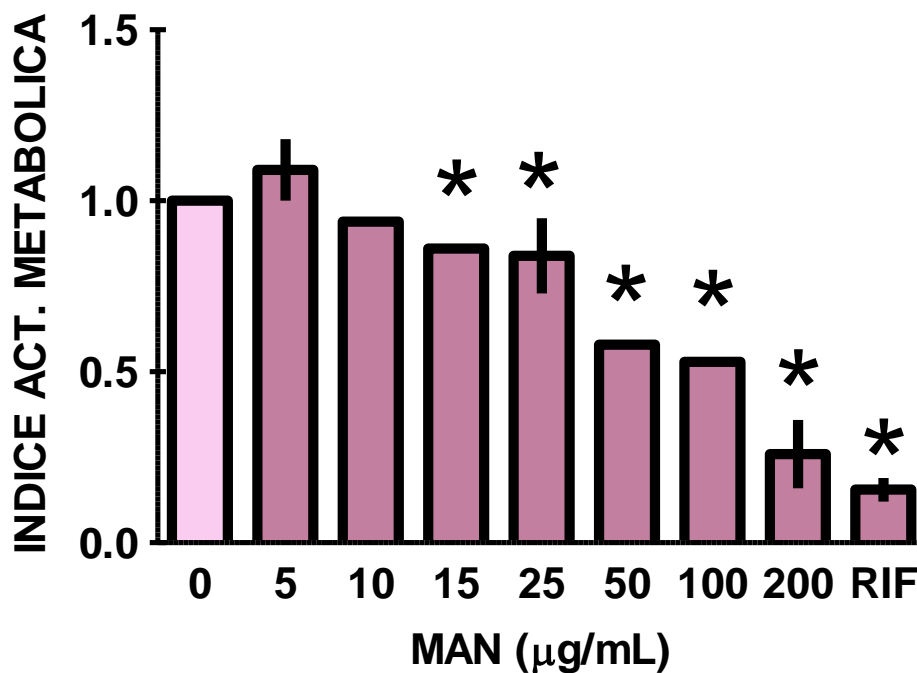
Mediante el método UFC, se observa que en presencia de NDGA (200 y 400 µg/mL) los cultivos presentaron disminución significativa del crecimiento con respecto al control de  $1.4 \times 10^{10}$ /mL (control) hasta  $5.62 \times 10^9$ /mL y  $2.4 \times 10^9$ /mL, respectivamente. Cabe mencionar que la CMI del NDGA fue de 500 µg/mL (Tabla 6).

NDGA (µg/ml)	UFC (millones/ml)	n
0	14000 ± 167	28
200	* 5620 ± 271	7
400	* 2400 ± 172	6
<b>500</b>	<b>* 0.0 ± 0.0</b>	<b>14</b>
750	* 0.0 ± 0.0	12
1000	* 0.0 ± 0.0	18
RIF	* 0.0 ± 0.0	24

n = número de experimentos. \*p<0.05

#### 7.4.2. Alfa-mangostina (MAN)

Con el método MTT se observa que la MAN muestra efecto inhibitorio sobre la actividad metabólica de *M. tuberculosis*. A partir de 15  $\mu\text{g/mL}$  hay disminución significativa en el índice (0.86) con respecto al control. En las concentraciones 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ , los valores reportados son: 0.84, 0.58, 0.53 y 0.26. Esto nos indica que el efecto inhibitorio de este compuesto depende de la concentración, ya que los índices disminuyen conforme aumenta la concentración (Fig. 14).



**Fig. 14. Efecto de la MAN sobre la actividad metabólica de *M. tuberculosis* cuantificado por MTT.** Cultivos de siete días, se incubaron en presencia de las diferentes concentraciones de la MAN hasta los catorce días. Luego se añadió el MTT (5 mg/mL) y se detectó la reducción a formazán. Los valores se reportaron como índice de actividad metabólica con respecto al control, equivalente a 1. (n = 12). \* p<0.05

Con relación a los resultados obtenidos por UFC se observa disminución significativa en el crecimiento a partir de 5 µg/mL de  $1.4 \times 10^{10}$ /mL a  $5.08 \times 10^9$ /mL respectivamente. En 15 µg/mL la población disminuye 93%, a partir de 25 µg/mL no hay crecimiento bacteriano, por lo que esta concentración es la CMI (Tabla 7).

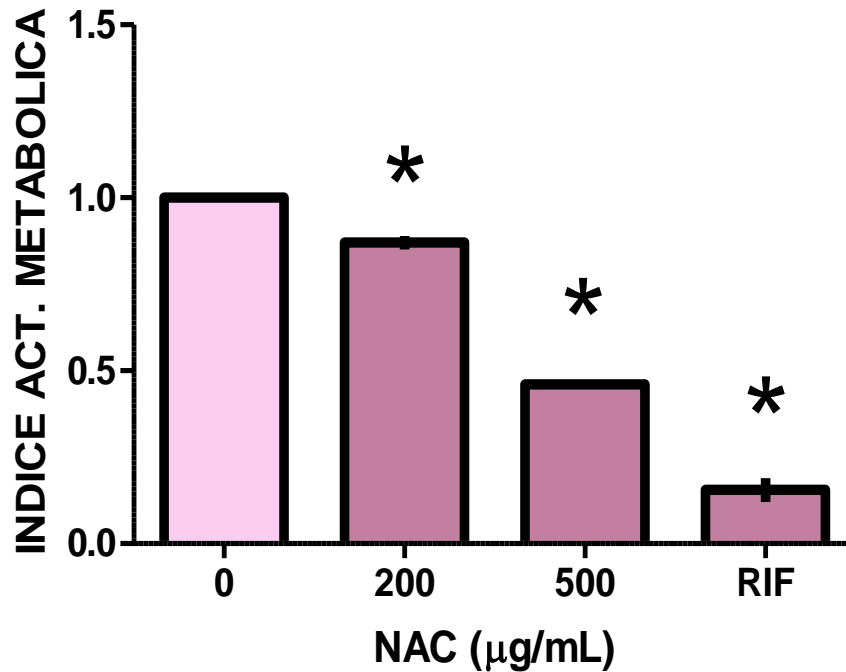
**Tabla 7. CMI de la MAN sobre el crecimiento de *M. tuberculosis***

MAN (µg/ml)	UFC (millones/ml)	n
0	14500 ± 250	28
5	* 5080 ± 1860	12
10	* 4970 ± 972	12
15	* 106 ± 6.75	4
<b>25</b>	<b>* 0 ± 0.00</b>	<b>6</b>
50	* 0 ± 0.00	6
100	* 0 ± 0.00	6
200	* 0 ± 0.00	6
RIF	* 0 ± 0.00	24

n = número de experimentos. \* p<0.05

#### 7.4.3. N-acetilcisteína (NAC).

El efecto de la NAC sobre *M. tuberculosis* es dependiente de la concentración. Se muestra crecimiento del 85% y 46% con respecto al control en presencia de 200 y 500  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (Fig. 15).



**Fig. 15. Efecto de la NAC sobre la actividad metabólica de *M. tuberculosis* cuantificado por MTT.** Cultivos de siete días, se incubaron en presencia de las diferentes concentraciones de la NAC hasta los catorce días. Luego se añadió el MTT (5 mg/mL) y se detectó la reducción a formazán. Los valores se reportaron como índice de actividad metabólica con respecto al control, que es igual a 1.  $n = 12$ . \* $p < 0.05$ .

Se cuantificó el efecto inhibitorio de la NAC por UFC. En la tabla 8 se muestra que a 200 y 500 µg/mL hay inhibición significativa del crecimiento de *M. tuberculosis*, de  $1.4 \times 10^{10}$  a  $6.94 \times 10^9$  y  $2.17 \times 10^9$  bacterias/mL respectivamente. Sin embargo, no se encontró una CMI, ya que las concentraciones que se utilizaron no mataron a toda la población.

NAC (µg/ml)	UFC (millones/ml)	n
0	14500 ± 167	28
200	* 6940 ± 663	6
500	* 2170 ± 362	5
RIF	* 0 ± 0.0	24

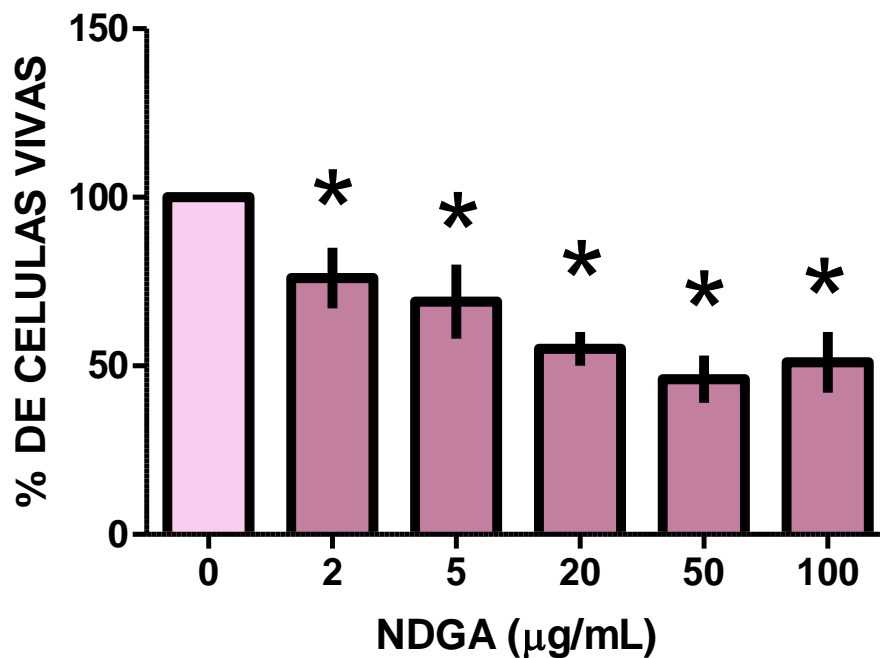
n = número de experimentos. \* p<0.05



### 7.5 Efecto tóxico del NDGA, la MAN y la NAC sobre la línea celular de monocitos humanos THP-1.

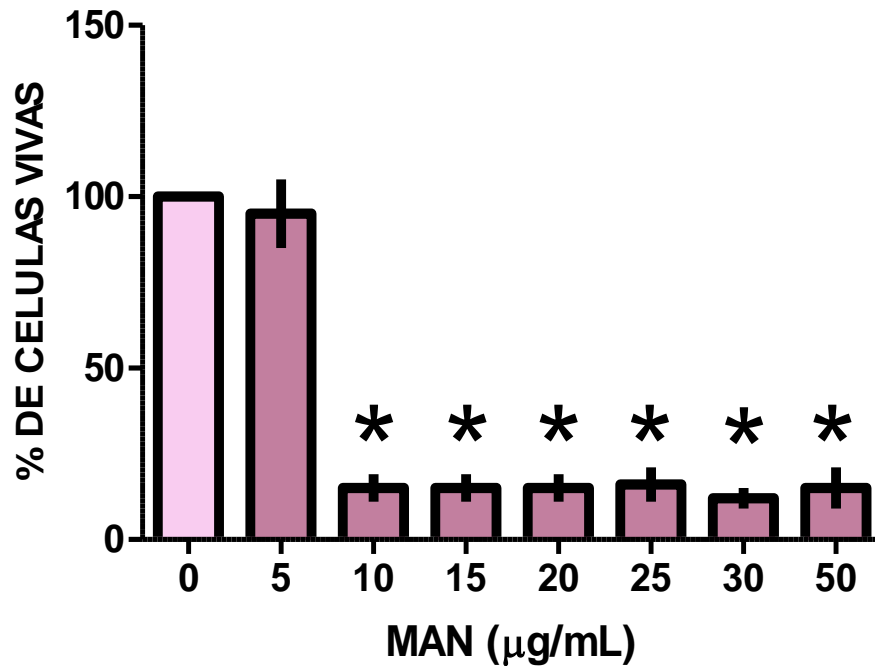
Se evaluó la citotoxicidad de los compuestos naturales sobre las células THP-1. Para ello se cultivaron las células en presencia de diferentes concentraciones (2-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y se incubaron con los compuestos durante 24 h, finalmente se cuantificó por el método MTT. Este método se encuentra estandarizado, por lo que la actividad metabólica detectada está directamente relacionada con el número de células vivas. Este método es común para detectar toxicidad en células eucariontes (Alley et al., 1988; Carmichael et al., 1987; Mossman, 1983).

Con respecto al NDGA, se observó que disminuyó significativamente la viabilidad con respecto a la concentración. Las concentraciones de 2, 5, 20, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presentan 76, 69, 55, 46 y 51% de células vivas respectivamente. Estos resultados muestran que desde 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  el NDGA tuvo efecto tóxico en las THP-1 (Fig. 16).



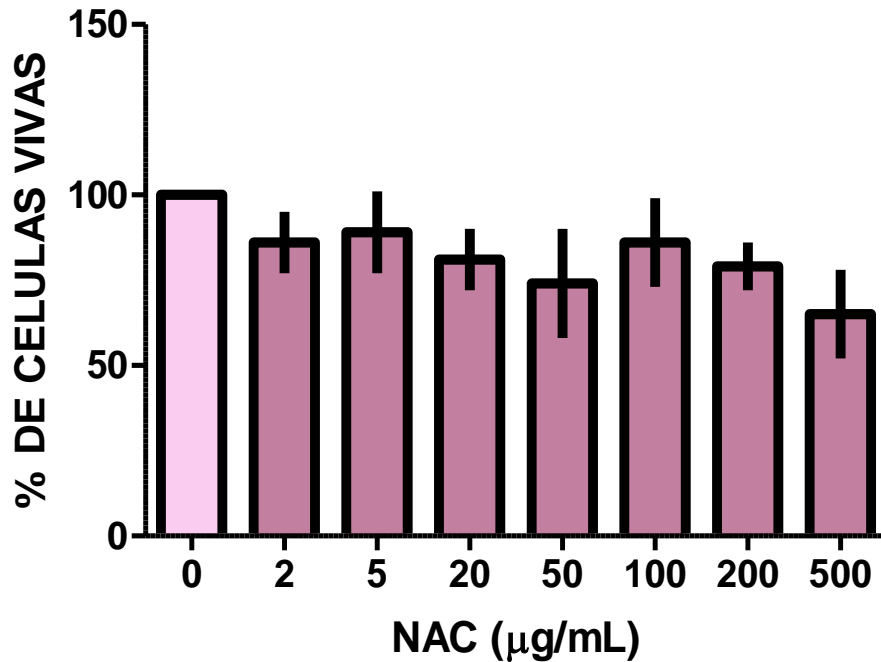
**Fig. 16. Efecto citotóxico del NDGA cuantificado por MTT.** Las células se cultivaron en presencia de las diferentes concentraciones del NDGA durante 24 horas. Luego se añadió MTT (5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) y se detectó la reducción a formazán. Los valores se reportaron como porcentaje de células vivas con respecto al control (100%).  $n = 6$ . \* $p < 0.05$

La MAN a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no afectó significativamente la viabilidad celular. Sin embargo, se observó efecto tóxico a concentraciones  $\geq$  al 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ya que mata al 85% de los monocitos con respecto al control sin tratamiento. Con base en nuestros resultados, parece que la citotoxicidad es dependiente de la concentración (Fig. 17).



**Fig. 17. Efecto citotóxico de la MAN cuantificado por MTT.** Las células se cultivaron en presencia de las diferentes concentraciones de la MAN durante 24 horas. Luego se añadió el MTT (5 mg/mL) y se detectó la reducción a formazán. Los valores se reportaron como porcentaje de células vivas con respecto al control (100%). n = 6. \* $p < 0.05$ .

La NAC no tiene efecto tóxico sobre los monocitos humanos THP-1, ya que las diferentes concentraciones de este compuesto no afectaron la viabilidad de manera significativa (Fig. 18).



**Fig. 18. Efecto citotóxico de la NAC cuantificado por MTT.** Las células se cultivaron en presencia de las diferentes concentraciones de la NAC durante 24 horas. Luego se añadió el MTT (5 mg/mL) y se detectó la reducción a formazán. Los valores se reportaron como porcentaje de células vivas con respecto al control (100%). n = 6.

## 8. DISCUSION.

Según la OMS, más del 65% de la población mundial recurre a las plantas como modalidad del cuidado médico. En la medicina tradicional se utilizan 350 especies de plantas para el tratamiento de la TB entre las que se encuentran *Larrea tridentata*, *Curcuma longa*, *Garcinia mangostana* y *Allium sativum*. Es importante mencionar que a partir de plantas medicinales, se han aislado diversos compuestos que poseen varias actividades biológicas (Eloff, 2001; McGaw et al., 2008).

En este trabajo se evaluaron las propiedades antimicobacterianas y la citotoxicidad de cuatro compuestos naturales puros: CUR, NAC, NDGA y MAN, éstos son abundantes (>80) en las plantas de las que se aislaron.

Para conocer el tiempo óptimo de adición de los compuestos y cuantificar su efecto sobre *M. tuberculosis*, se monitoreó la progresión del cultivo bacteriano en medio líquido cuantificando la actividad metabólica por MTT y el crecimiento bacteriano por UFC (Figs. 9 y 10).

En estas cinéticas no se ve una fase estacionaria, ya que a partir de que alcanzan su desarrollo máximo la población empieza a disminuir, esto podría pasar porque hay un gran número de bacterias ( $1.4 \times 10^{10}$ /mL) en un espacio limitado (270 µl). Además, la cinética por MTT nos muestra que la actividad metabólica de las bacterias aumenta rápido a partir del día 3 de cultivo, esto agotó los nutrientes y por lo tanto la población tiene una disminución acelerada a partir del día 15.

El método MTT nos proporciona resultados en 24h, requiere poca manipulación y es de fácil automatización, ya que se puede leer en lector de placas de absorbancia en menos de un minuto. Sin embargo, este método mide principalmente actividad metabólica y no crecimiento bacteriano por lo que los resultados obtenidos se corroboraron por medio de la cuenta directa de las UFC (Plumb et al., 1989; Mossman, 1983).

El método UFC es tedioso y requiere de mayor tiempo para obtener el resultado, ya que es necesario incubar 21 días las placas debido a la progresión lenta del cultivo de *M. tuberculosis*, pero nos permite conocer el efecto de los compuestos sobre el crecimiento bacteriano.

Con base en los resultados obtenidos por MTT se determinó que de los cuatro compuestos evaluados solo la NAC, el NDGA y la MAN a 200 µg/mL presentan actividad anti-*M. tuberculosis* mientras que la CUR no disminuye significativamente la actividad metabólica de la bacteria.

Con base en el conteo de células viables (UFC) se corroboró que estos compuestos disminuyen el crecimiento de *M. tuberculosis*. Además se estableció que la CMI de la MAN es 25 µg/mL y del NDGA es de 500 µg/mL, mientras que la NAC a 500 µg/mL solo controla el crecimiento de la población. La CUR a 200 µg/mL favorece su crecimiento.

Para determinar si éstos tienen efecto bactericida o bacteriostático se calcularon las tasas de crecimiento comparando el número de células entre el día 7 y 14. Tiempo en el cual están en presencia de los compuestos naturales.

La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) se define como el número de generaciones que transcurren por unidad de tiempo (7 días), la fórmula utilizada para calcularla fue:

$$\mu = \frac{2.303(\log N - \log N_0)}{t}$$

Este valor nos indica la razón de crecimiento que tiene una población bacteriana. Si es positivo nos muestra que la población está aumentando, si es cero nos indica que la población no cambia, lo cual representa que el tratamiento tiene efecto bacteriostático, es decir, evita la duplicación bacteriana. Mientras que un valor negativo representa que la población bacteriana está disminuyendo porque produce muerte en la población micobacteriana, debido al efecto bactericida del compuesto evaluado (Schaechter et al., 2006). En la tabla 9 se muestran las tasas de crecimiento de *M. tuberculosis* en cada tratamiento.

<b>Tabla 9. Tasas de crecimiento de <i>M. tuberculosis</i></b>		
Condición	Concentración (µg/mL)	Tasa de crecimiento (µ)
CONTROL	-----	0.294
CUR	200	0.314
NAC	200	0.189
	500	-0.008
NDGA	200	0.118
	400	0.037
	500-1000	-----
MAN	5	0.144
	10	0.141
	15	-0.409
	25-200	-----
RIF	25	-----

----- No hay crecimiento de *M. tuberculosis*

En el cultivo de *M. tuberculosis* sin tratamiento (control) se observa una tasa de crecimiento de 0.294 en siete días, lo que representa que aproximadamente cada 2.36 días las bacterias se duplican en las condiciones de cultivo antes descritas. Mientras que las bacterias cultivadas en presencia de CUR muestran un valor de 0.314, lo que significa que el crecimiento de una generación se da en 2.21 días. Este fenómeno puede deberse a que la curcumina se degrada rápidamente en el cultivo y favorezca su utilización como fuente de carbono.

Con relación a esto se ha descrito que la CUR es inestable *in vitro* en condiciones fisiológicas (buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.2 y 37° C), ya que cerca del 90% se descompone en 30 min (Wang et al., 1997). El medio 7H9 contiene fosfatos monopotásico (1.1 g/mL) y disódico (2.8 g/mL), lo que podría favorecer el rompimiento de la CUR en moléculas más pequeñas que se pudieran usar como fuente de carbono.

Además se sabe que *M. tuberculosis* utiliza compuestos fenólicos (ácido *p*-hidroxi-fenil-alcanoico) como precursores para sintetizar glicopeptidolípidos fenólicos (PGL's), moléculas involucradas en la patogenicidad (Perez et al., 2004).

A pesar de que en nuestro modelo no se detectó actividad bactericida de la CUR, se ha reportado que dos derivados de este compuesto, como la demetoxicurcumina y la mono-O-metil-curcumina-isoxazola presentan actividad micobactericida con CMI de 7.8 y 0.09 µg/mL respectivamente (Agrawal et al., 2008; Changtam et al., 2010).

Con relación a los compuestos (NAC, NDGA y MAN) que muestran actividad anti-*M. tuberculosis*, la cual es dependiente de la concentración. La NAC a 200 y 500 µg/mL tiene actividad bacteriostática, ya que se disminuye la tasa de crecimiento a 0.189 y 0.008 respectivamente controlando solo el crecimiento bacilar. Esta actividad puede deberse a su antagonismo con el aminoácido cisteína o a la inhibición de enzimas metabólicas con grupo sulfhidrilo, debido a su interacción con el grupo SH- (Parry and Neu, 1977; Zigmunt y Martin, 1968).

El NDGA es bacteriostático a 200 y 400 µg/mL, pero a partir de 500 µg/mL es bactericida porque tiene una tasa de crecimiento negativa. Esta actividad puede estar relacionada con su semejanza estructural a los flavonoides. Hay evidencia que los flavonoides (buteina, isoliquirtigenina) poseen estructuras complejas que pudieran romper la pared celular e inhibir la síntesis de ácidos micólicos y grasos. Recientemente se ha reportado que el NDGA inhibe la anhidrasa carbónica de *M. tuberculosis* (Brown et al., 2007; Davis, et al., 2011; Nakayama et al., 2000; Tsuchiya et al., 1996).

La MAN es bacteriostática a 5 y 10 µg/mL, ya que solo mantienen la tasa de crecimiento por debajo del cultivo control, pero a partir de 15 µg/mL tiene efecto bactericida sobre *M. tuberculosis*, ya que disminuye la población inicial (Tabla 9). Este compuesto puede diluir sustancias lipofílicas (compuestos en pared de *M. tuberculosis*) e inhibe enzimas involucradas en la glucólisis como: aldolasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y deshidrogenasa láctica (Nguyen y Marquis, 2011; Suksamrarn et al., 2006).

Investigaciones anteriores reportaron que la MAN purificada por cromatografía a partir del extracto metanólico de fruto del mangostán (pureza reportada del 98.5%), posee actividad contra *M. tuberculosis*. Se demostró que este compuesto a una concentración de 6.25 µg/mL, es capaz de evitar totalmente el crecimiento bacteriano a una concentración de  $5 \times 10^4$  CFU/mL (Suksamrarn et al., 2003). En contraste en este trabajo la MAN se obtuvo comercialmente con una pureza del 99%. Además se pudo determinar que a 15 µg/mL tiene efecto bactericida en cultivo líquido a una concentración bacteriana de  $1 \times 10^6$  bacterias/mL

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se pretende evaluar el efecto bactericida de NDGA, MAN y NAC en macrófagos humanos infectados con *M. tuberculosis*. Por lo que se evaluó su efecto tóxico en la línea celular de monocitos humanos THP-1. De los tres compuestos que tienen actividad bactericida solo el NDGA y la MAN presentan efecto citotóxico en las THP-1.

El NDGA a partir de 2 µg/mL tiene efecto tóxico sobre los monocitos humanos THP-1, mientras que la CMI para *M. tuberculosis* es de 500 µg/mL. Se ha reportado que este compuesto en altas concentraciones (100 µM) rompe el citoesqueleto e inhibe la activación de cinasas, lo que induce la apoptosis en líneas celulares (Holland et al., 2001; Nishimura et al., 2002; Park et al., 2004). Sin embargo, la modificación estructural del NDGA cambia su toxicidad *in vivo*, además se ha reportado que la dosificación diaria y continua con una dosis de 2250 mg/día es bien tolerada hasta seis meses (Lu, et al., 2010; Ryan et al., 2008). Este compuesto debido a su capacidad bactericida y tolerancia alta en humanos es un candidato a ser suplemento en el tratamiento contra la TB.

La MAN tiene efecto tóxico sobre los monocitos humanos THP-1 con una concentración de 10 µg/mL, la que es menor a su CMI bactericida. Se reportó que la MAN promueve la activación de caspasas, lo que induce la apoptosis en células cancerígenas de leucemia (Matsumoto et al., 2004). En ratas, la administración oral de la MAN da una biodisponibilidad muy baja. Sin embargo, después de la administración intravenosa (2 mg/mL) la biodisponibilidad fue de 3 min y se eliminó en 3.5 horas (Li et al., 2011).

La NAC no tiene efecto tóxico en ninguna de las concentraciones evaluadas sobre los monocitos humanos THP-1, esto aunado a su actividad bacteriostática sobre *M. tuberculosis*, lo señalan como el candidato a ser ocupado como suplemento en el tratamiento contra la TB.

## **9. PERSPECTIVAS.**

Determinar el efecto bactericida de NDGA, MAN y NAC en macrófagos humanos infectados con *M. tuberculosis*

Evaluar el efecto sinérgico de NDGA, MAN y NAC en presencia de isoniazida y rifampicina sobre el crecimiento de *M. tuberculosis*. Esto con el fin de disminuir la CMI de los fármacos de primera línea.



## 10. CONCLUSIONES.

El método colorimétrico MTT es un método rápido que cuantifica la actividad metabólica micobacteriana, la cual representa el crecimiento en medio líquido. Esto nos permitió hacer una selección primaria de compuestos con actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis*.

La técnica de cuantificación de las UFC nos permitió cuantificar el número de bacterias viables y evaluar el efecto de los compuestos sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

El NDGA (500 µg/ml) y la MAN (25 µg/ml) poseen actividad bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra evaluada por UFC.

La NAC (500 µg/mL) presenta actividad bacteriostática sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra evaluada por UFC.

La CUR favorece el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, aumentando significativamente la tasa de crecimiento.

El NDGA (2 µg/mL) y la MAN (10 µg/mL) presentan toxicidad sobre la línea celular de monocitos humanos THP-1 evaluada por MTT.

La NAC no afecta la viabilidad de la línea celular de monocitos humanos THP-1 evaluada por MTT.

## 11. REFERENCIAS

1. Abdallah, A.M., N.C. Gey van Pittius, P.A. Champion, J. Cox, J. Luirink, C.M. Vandenbroucke-Grauls, B.J. Appelmelk, and W. Bitter. 2007. Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol.* 5:883-891.
2. Agrawal, D.K., D. Saikia, R. Tiwari, S. Ojha, K. Shanker, J.K. Kumar, A.K. Gupta, S. Tandon, A.S. Negi, and S.P. Khanuja. 2008. Demethoxycurcumin and its semisynthetic analogues as antitubercular agents. *Planta Med.* 74:1828-1831.
3. Alexander, K.A., P.N. Laver, A.L. Michel, M. Williams, P.D. van Helden, R.M. Warren, and N.C. Gey van Pittius. 2010. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis.* 16:1296-1299.
4. Alley, M.C., D.A. Scudiero, A. Monks, M.L. Hursey, M.J. Czerwinski, D.L. Fine, B.J. Abbott, J.G. Mayo, R.H. Shoemaker, and M.R. Boyd. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48:589-601.
5. Anand, P., C. Sundaram, S. Jhurani, A.B. Kunnumakkara, and B.B. Aggarwal. 2008. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett.* 267:133-164.
6. Araujo, C.C., and L.L. Leon. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96:723-728.
7. Arteaga, S., A. Andrade-Cetto, and R. Cardenas. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol.* 98:231-239.
8. Aviello, G., L. Abenavoli, F. Borrelli, R. Capasso, A.A. Izzo, F. Lembo, B. Romano, and F. Capasso. 2009. Garlic: empiricism or science? *Nat Prod Commun.* 4:1785-1796.
9. Bloom, B.R., and C.J. Murray. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science.* 257:1055-1064.
10. Brennan, P.J. 1989. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev Infect Dis.* 11 Suppl 2:S420-430.
11. Brown, A.K., A. Papaemmanouil, V. Bhowruth, A. Bhatt, L.G. Dover, and G.S. Besra. 2007. Flavonoid inhibitors as novel antimycobacterial agents targeting Rv0636, a putative dehydratase enzyme involved in Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase II. *Microbiology.* 153:3314-3322.
12. Camacho-Corona, M. R., M. A. Ramirez-Cabrera, O. González-Santiago, E. Garza-González, I. de Paz, and J. Luna-Herrera. 2008. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytother Res.* 22:82-85.

13. Carmichael, J., W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna, and J.B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47:936-942.
14. CENAPRECE. 2011. Situación actual de la Tuberculosis en México. Avances y desafíos. Disponible en: <http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/XV%20curso%20hgm%202011/lunes%202011/Situaci%C3%B3n%20y%20retos%20TB%20Curso%202011%20HGM.pdf>. Consultado 5 enero 2012
15. Cole, S.T. 2002. Comparative and functional genomics of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Microbiology.* 148:2919-2928.
16. Cole, S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B.G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature.* 393:537-544.
17. Coll, P. 2003. [Drugs with activity against Mycobacterium tuberculosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 21:299-307; quiz 308, 326.
18. Cosivi, O., J.M. Grange, C.J. Daborn, M.C. Raviglione, T. Fujikura, D. Cousins, R.A. Robinson, H.F. Huchzermeyer, I. de Kantor, and F.X. Meslin. 1998. Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries. *Emerg Infect Dis.* 4:59-70.
19. Cousins, D.V., R. Bastida, A. Cataldi, V. Quse, S. Redrobe, S. Dow, P. Duignan, A. Murray, C. Dupont, N. Ahmed, D.M. Collins, W.R. Butler, D. Dawson, D. Rodriguez, J. Loureiro, M.I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga, and A. Bernardelli. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53:1305-1314.
20. Cragg, G.M., D.J. Newman, and K.M. Snader. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.* 60:52-60.
21. Crick, D.C., S. Mahapatra, and P.J. Brennan. 2001. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of Mycobacterium tuberculosis. *Glycobiology.* 11:107R-118R.
22. Chan, E.D., M.J. Strand, and M.D. Iseman. 2008. Treatment outcomes in extensively resistant tuberculosis. *N Engl J Med.* 359:657-659.
23. Changtam, C., P. Hongmanee, and A. Suksamrarn. 2010. Isoxazole analogs of curcuminoids with highly potent multidrug-resistant antimycobacterial activity. *Eur J Med Chem.* 45:4446-4457.

24. Chin, Y.W., and A.D. Kinghorn. 2008. Structural Characterization, Biological Effects, and Synthetic Studies on Xanthones from Mangosteen (*Garcinia mangostana*), a Popular Botanical Dietary Supplement. *Mini Rev Org Chem*. 5:355-364.
25. Daniel, T.M. 2000. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int J Tuberc Lung Dis*. 4:395-400.
26. Daniel, T.M. 2006. The history of tuberculosis. *Respir Med*. 100:1862-1870.
27. Davis, R. A., A. Hofmann, A. Osman, R. A. Hall, F. A. Mühlischlegel, D. Vullo, A. Innocenti, C. T. Supuran, and S. A. Poulsen. 2011. Natural product-based phenols as novel probes for mycobacterial and fungal carbonic anhydrases. *J Med Chem*. 54:1682-1692.
28. de Jong, B.C., A. Martin, and S. Gagneux. 2010. *Mycobacterium africanum*—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *Plos One Negl Trop Dis*. 4:e774.
29. Deng, W., and J. Xie. 2011. Ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* PPE family in pathogenesis and implications for novel measures against tuberculosis. *J Cell Biochem*.
30. Dorman, S.E., and R.E. Chaisson. 2007. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat Med*. 13:295-298.
31. Eigner, D., and D. Scholz. 1999. *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. *J Ethnopharmacol*. 67:1-6.
32. Eloff, J.N. 2001. Antibacterial activity of *Marula* (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. subsp. *caffra* (Sond.) Kokwaro) (*Anacardiaceae*) bark and leaves. *J Ethnopharmacol*. 76:305-308.
33. Fabre, M., Y. Hauck, C. Soler, J.L. Koeck, J. van Ingen, D. van Soolingen, G. Vergnaud, and C. Pourcel. 2010. Molecular characteristics of "*Mycobacterium canettii*" the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. *Infect Genet Evol*. 10:1165-1173.
34. Farnsworth, N.R., O. Akerele, A.S. Bingel, D.D. Soejarto, and Z. Guo. 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ*. 63:965-981.
35. Floriano-Sanchez, E., C. Villanueva, O.N. Medina-Campos, D. Rocha, D.J. Sanchez-Gonzalez, N. Cardenas-Rodriguez, and J. Pedraza-Chaverri. 2006. Nordihydroguaiaretic acid is a potent in vitro scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radic Res*. 40:523-533.
36. Frota, C.C., D.M. Hunt, R.S. Buxton, L. Rickman, J. Hinds, K. Kremer, D. van Soolingen, and M.J. Colston. 2004. Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiology*. 150:1519-1527.

37. Frothingham, R., P.L. Strickland, G. Bretzel, S. Ramaswamy, J.M. Musser, and D.L. Williams. 1999. Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from West Africa. *J Clin Microbiol.* 37:1921-1926.
38. Gagneux, S. 2012. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367:850-859.
39. Gordien, A.Y., A.I. Gray, S.G. Franzblau, and V. Seidel. 2009. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). *J Ethnopharmacol.* 126:500-505.
40. Gorocica, P., M.d.C. Jimenez-Martinez, Y. Garfias, I. Sada, and R. Lascurain. 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 18:142-153.
41. Grange, J.M. 1996. The biology of the genus *Mycobacterium*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 25:1S-9S.
42. Halse, T. A., V. E. Escuyer, and K. A. Musser. 2011. Evaluation of a single-tube multiplex real-time PCR for differentiation of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 49:2562-2567.
43. Hannan, A, M. Ikram Ullah, M. Usman, S. Hussain, M. Absar, and K. Javed K. 2011. Anti-mycobacterial activity of garlic (*Allium sativum*) against multi-drug resistant and non-multi-drug resistant mycobacterium tuberculosis. *Pak J Pharm Sci.* 24:81-85.
44. Henderson, R.A., S.C. Watkins, and J.L. Flynn. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 159:635-643.
45. Holland, J.A., R.A. Goss, R.W. O'Donnell, M.M. Chang, D.K. Johnson, and L.M. Ziegler. 2001. Low-density lipoprotein induced actin cytoskeleton reorganization in endothelial cells: mechanisms of action. *Endothelium.* 8:117-135.
46. Hopewell, P.C., M. Pai, D. Maher, M. Uplekar, and M.C. Raviglione. 2006. International standards for tuberculosis care. *Lancet Infect Dis.* 6:710-725.
47. Horstkotte, M.A., I. Sobottka, C.K. Schewe, P. Schafer, R. Laufs, S. Rusch-Gerdes, and S. Niemann. 2001. *Mycobacterium microti* llama-type infection presenting as pulmonary tuberculosis in a human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol.* 39:406-407.
48. Hurst, G.A., P.B. Shaw, and C.A. LeMaistre. 1967. Laboratory and clinical evaluation of the mucolytic properties of acetylcysteine. *Am Rev Respir Dis.* 96:962-970.
49. Hyder, P.W., E.L. Fredrickson, R.E. Estell, and M.E. Lucero. 2002. Transport of phenolic compounds from leaf surface of creosotebush and tarbush to soil surface by precipitation. *J Chem Ecol.* 28:2475-2482.
50. Jimenez-Arellanes, M. M, R. R, T. J, and Luna-Herrera. 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytother Res.* 17:903-908.

51. Jurenka, J.S. 2009. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev.* 14:141-153.
52. Kalebic, T., A. Kinter, G. Poli, M.E. Anderson, A. Meister, and A.S. Fauci. 1991. Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically infected monocytic cells by glutathione, glutathione ester, and N-acetylcysteine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:986-990.
53. Kishore, N., B.B. Mishra, V. Tripathi, and V.K. Tiwari. 2009. Alkaloids as potential anti-tubercular agents. *Fitoterapia.* 80:149-163.
54. Kremer, K., D. van Soolingen, J. van Embden, S. Hughes, J. Inwald, and G. Hewinson. 1998. *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J Clin Microbiol.* 36:2793-2794.
55. Lado Lado, F.L., R. Garcia Ramos, M.L. Perez Del Molino, M.J. Ferreiro Regueiro, S. Maceda Vilarino, and V. Tunez Bastida. 2004. [Resistant tuberculosis by drugs]. *An Med Interna.* 21:190-196.
56. Lemus, M.D. 2007. Métodos rápidos para la detección de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*. Vol. Doctorado. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", La Habana. 136.
57. Li L, I. Brunner, A. R. Han, M. Hamburger, A. D. Kinghorn, R. Frye, and V. Butterweck. 2011. Pharmacokinetics of  $\alpha$ -mangostin in rats after intravenous and oral application. *Mol Nutr Food Res.* Suppl 1:S67-74
58. Lia, V.V., V.A. Confalonieri, C.I. Comas, and J.H. Hunziker. 2001. Molecular phylogeny of *Larrea* and its allies (Zygophyllaceae): reticulate evolution and the probable time of creosote bush arrival to North America. *Mol Phylogenet Evol.* 21:309-320.
59. Lu, J.M., J. Nurko, S.M. Weakley, J. Jiang, P. Kougias, P.H. Lin, Q. Yao, and C. Chen. 2010. Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: an update. *Med Sci Monit.* 16:RA93-100.
60. Manca, C., L. Tsenova, C.E. Barry, 3rd, A. Bergtold, S. Freeman, P.A. Haslett, J.M. Musser, V.H. Freedman, and G. Kaplan. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol.* 162:6740-6746.
61. Matsumoto, K., Y. Akao, H. Yi, K. Ohguchi, T. Ito, T. Tanaka, E. Kobayashi, M. Iinuma, and Y. Nozawa. 2004. Preferential target is mitochondria in alpha-mangostin-induced apoptosis in human leukemia HL60 cells. *Bioorg Med Chem.* 12:5799-5806.
62. Mazumder, A., K. Raghavan, J. Weinstein, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1995. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochem Pharmacol.* 49:1165-1170.

63. McGaw, L.J., N. Lall, J.J. Meyer, and J.N. Eloff. 2008. The potential of South African plants against Mycobacterium infections. *J Ethnopharmacol.* 119:482-500.
64. Mdluli, K., and M. Spigelman. 2006. Novel targets for tuberculosis drug discovery. *Curr Opin Pharmacol.* 6:459-467.
65. Mignard, S., and J. P. Flandrois. 2008. A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58:1432-1441.
66. Miltgen, J., M. Morillon, J.L. Koeck, A. Varnerot, J.F. Briant, G. Nguyen, D. Verrot, D. Bonnet, and V. Vincent. 2002. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by Mycobacterium tuberculosis subsp canetti. *Emerg Infect Dis.* 8:1350-1352.
67. Mitchell, J.R., S.S. Thorgeirsson, W.Z. Potter, D.J. Jollow, and H. Keiser. 1974. Acetaminophen-induced hepatic injury: protective role of glutathione in man and rationale for therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 16:676-684.
68. Mohareer, K., S. Tundup and S. E. Hasnain. 2011. Transcriptional regulation of Mycobacterium tuberculosis PE/PPE genes: a molecular switch to virulence? *J Mol Microbiol Biotechnol.* 21:97-109.
69. Moongkarndi, P., N. Kosem, S. Kaslungka, O. Luanratana, N. Pongpan, and N. Neungton. 2004. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by Garcinia mangostana (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol.* 90:161-166.
70. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65:55-63,
71. Mshana, R. N., G. Tadesse, G. Abate, H. Miörner. 1998. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 36:1214-1219.
72. Muhanji, C.I., and R. Hunter. 2007. Current developments in the synthesis and biological activity of HIV-1 double-drug inhibitors. *Curr Med Chem.* 14:1207-1220.
73. Nakayama, T., T. Hashimoto, K. Kajiya, and S. Kumazawa. 2000. Affinity of polyphenols for lipid bilayers. *Biofactors.* 13:147-151.
74. Ngawhirunpat, T., P. Opanasopi, M. Sukma, C. Sittisombut, A. Kat, and I. Adachi. 2010. Antioxidant, free radical-scavenging activity and cytotoxicity of different solvent extracts and their phenolic constituents from the fruit hull of mangosteen (Garcinia mangostana). *Pharm Biol.* 48:55-62.
75. Nguyen, P. T., and R. E. Marquis. 2011. Antimicrobial actions of  $\alpha$ -mangostin against oral streptococci. *Can J Microbiol.* 57:217-225
76. Nishimura, K., H. Tsumagari, A. Morioka, Y. Yamauchi, K. Miyashita, S. Lu, M. Jisaka, T. Nagaya, and K. Yokota. 2002. Regulation of apoptosis through arachidonate cascade in mammalian cells. *Appl Biochem Biotechnol.* 102-103:239-250.

77. Nuermberger, E. L., M. K. Spigelman, and W. W. Yew. 2010. Current development and future prospects in chemotherapy of tuberculosis. *Respirology*. 15:764-778.
78. Obolskiy D, I. Pischel, N. Siritwatanametanon, and M. Heinrich. 2009. *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. *Phytother Resp*. 23:1047-1065.
79. Okunade, A.L., M.P. Elvin-Lewis, and W.H. Lewis. 2004. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*. 65:1017-1032.
80. OMS. 2011. Global tuberculosis control: WHO report 2011. Disponible en: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2011/gtbr11\\_full.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf). Consultado 5 enero 2012.
81. Onyebujoh, P., A. Zumla, I. Ribeiro, R. Rustomjee, P. Mwaba, M. Gomes, and J. M. Grange. 2005. Tratamiento de la tuberculosis: situación actual y perspectivas. *Bull. OMS*. 83, 857
82. Padhye, S., D. Chavan, S. Pandey, J. Deshpande, K.V. Swamy, and F.H. Sarkar. 2010. Perspectives on chemopreventive and therapeutic potential of curcumin analogs in medicinal chemistry. *Mini Rev Med Chem*. 10:372-387.
83. Pari, L., and P. Murugan. 2005. Effect of tetrahydrocurcumin on blood glucose, plasma insulin and hepatic key enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 16:257-274.
84. Park, S., E.R. Hahm, D.K. Lee, and C.H. Yang. 2004. Inhibition of AP-1 transcription activator induces myc-dependent apoptosis in HL60 cells. *J Cell Biochem*. 91:973-986.
85. Parry, M.F., and H.C. Neu. 1977. Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. *J Clin Microbiol*. 5:58-61.
86. Pedraza-Chaverri, J., N. Cardenas-Rodriguez, M. Orozco-Ibarra, and J.M. Perez-Rojas. 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem Toxicol*. 46:3227-3239.
87. Pedro, M., F. Cerqueira, M.E. Sousa, M.S. Nascimento, and M. Pinto. 2002. Xanthenes as inhibitors of growth of human cancer cell lines and their effects on the proliferation of human lymphocytes in vitro. *Bioorg Med Chem*. 10:3725-3730.
88. Perez, E., P. Constant, A. Lemassu, F. Laval, M. Daffe, and C. Guilhot. 2004. Characterization of three glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the phenolic glycolipid antigens from the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Biol Chem*. 279:42574-42583.
89. Pinto, M.M., M.E. Sousa, and M.S. Nascimento. 2005. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr Med Chem*. 12:2517-2538.
90. Plumb, J.A., R. Milroy, and S.B. Kaye. 1989. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on



chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* 49:4435-4440.

91. Raviglione, M.C., and I.M. Smith. 2007. XDR tuberculosis--implications for global public health. *N Engl J Med.* 356:656-659.
92. Reddington, K., J. O'Grady, S. Dorai-Raj, M. Maher, D. van Soolingen, and T. Barry. 2011. Novel multiplex real-time PCR diagnostic assay for identification and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol.* 49:651-657.
93. Rai, D., J. K. Singh, N. Roy, and D. Panda. 2008. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem J.* 410:147-155.
94. Riscoe, M., J.X. Kelly, and R. Winter. 2005. Xanthonones as antimalarial agents: discovery, mode of action, and optimization. *Curr Med Chem.* 12:2539-2549.
95. Rivers, E.C., and R.L. Mancera. 2008. New anti-tuberculosis drugs with novel mechanisms of action. *Curr Med Chem.* 15:1956-1967.
96. Roberts, C.A., and J.E. Buikstra. 2003. The bioarchaeology of tuberculosis. A global view on a reemerging disease. University of Florida Press.
97. Roederer, M., F.J. Staal, P.A. Raju, S.W. Ela, and L.A. Herzenberg. 1990. Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:4884-4888.
98. Rustad, T.R., A.M. Sherrid, K.J. Minch, and D.R. Sherman. 2009. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell Microbiol.* 11:1151-1159.
99. Ryan, C. J. , A. H. Harzstark, J. Rosenberg, A. Lin, C. Claros, I. D. Goldfine, J. F. Kerner, E. J. Small, and J. F. Youngren. 2008. A pilot dose-escalation study of the effects of nordihydroguareacetic acid on hormone and prostate specific antigen levels in patients with relapsed prostate cancer. *BJU Int.* 101:1483.
100. Schaechter, M., J.L. Ingraham, and F.C. Neidhardt. 2006. *Microbe.* Wiley-Blackwell. 534 pp.
101. Singh, N., A. Shrivastav, and R. K. Sharma. 2009. Curcumin induces caspase and calpain-dependent apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Mol Med Report.* 2:627-631
102. Smith, N. H., K. Kremer, J. Inwald, J. Dale, J. R. Driscoll, S. V. Gordon, D. van Soolingen, R. Glyn Hewinson, and J. Maynard Smith. 2005 Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Theor. Biol.* 239:220-225
103. Steck, P.A., B.A. Schwartz, M.S. Rosendahl, and G.R. Gray. 1978. Mycolic acids. A reinvestigation. *J Biol Chem.* 253:5625-5629.
104. Suksamrarn, S., O. Komutiban, P. Ratananukul, N. Chimnoi, N. Lartpornmatulee, and A. Suksamrarn. 2006. Cytotoxic prenylated xanthonones from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 54:301-305.

105. Suksamrarn, S., N. Suwannapoch, W. Phakhodee, J. Thanuhiranlert, P. Ratananukul, N. Chimnoi, and A. Suksamrarn. 2003. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 51:857-859.
106. Sundaram, B.M., C. Gopalakrishnan, S. Subramanian, D. Shankaranarayanan, and L. Kameswaran. 1983. Antimicrobial Activities of *Garcinia mangostana*. *Planta Med.* 48:59-60.
107. Thomson, M., and M. Ali. 2003. Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. *Curr Cancer Drug Targets*. 3:67-81.
108. Thring, and Weitz. 2006. Medicinal plant use in the Bredasdorp/Elim region of the southern Overberg in the western Cape province of South Africa. *J Ethnopharmacol.* 103:261-275.
109. Tian, C., and X. Jian-Ping. 2010. Roles of PE\_PGRS family in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and novel measures against tuberculosis. *Microb Pathog.* 49:311-314
110. Tsuchiya, H., M. Sato, T. Miyazaki, S. Fujiwara, S. Tanigaki, M. Ohyama, T. Tanaka, and M. Iinuma. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 50:27-34.
111. van Zandwijk, N. 1995. N-acetylcysteine for lung cancer prevention. *Chest.* 107:1437-1441.
112. Wang, Y. J., M.H. Pan, A. L. Cheng, L.I. Lin, Y. S. Ho, C. Y. Hsieh, J. K. Lin. 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 15:1867-1876.
113. Wang, Y., Z. Lu, H. Wu, and F. Lv. 2009. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol.* 136:71-74.
114. Zhang, Y., K. Post-Martens, and S. Denkin. 2006. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discov Today.* 11:21-27.
115. Zheng, H., L. Lu, B. Wang, S. Pu, X. Zhang, G. Zhu, W. Shi, L. Zhang, H. Wang, S. Wang, G. Zhao, and Y. Zhang. 2008. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One.* 3:e2375
116. Zygmunt, W.A., and T.A. Martin. 1968. Cysteine analogs as potential amino acid antagonists in bacteria. *J Med Chem.* 11:623-625.

## 12. ANEXOS

### Anexo 1. Ubicación taxonómica.

Reino: *Bacteria*

Phylum: Actinobacteria

Clase: Actinobacteridae

Orden: Actinomycetales

Familia: Mycobacteriaceae

Género: *Mycobacterium*

Especie: *Mycobacterium tuberculosis*

## **Anexo 2. Composición de los medios de cultivo.**

Las cantidades mencionadas para cada uno de los componentes están consideradas en 900mL de agua.

COMPONENTE	MEDIO 7H10 (gramos)	MEDIO 7H9 (gramos)
Acido L-glutámico	0.5	0.5
Agar	15	-----
Biotina	0.0005	0.0005
Citrato de amonio férrico	0.04	0.04
Citrato de sodio	0.4	0.1
Clorhidrato de piridoxina	0.001	-----
Cloruro de calcio	0.0005	0.0005
Fosfato disódico	1.5	2.5
Fosfato monopotásico	1.5	1.0
Piridoxina	-----	0.001
Sulfato de amonio	0.5	0.5
Sulfato de cobre	0.001	0.001
Sulfato de magnesio	0.025	0.05
Sulfato de zinc	0.001	0.001
Verde de malaquita	0.00025	---

### **Anexo 3. Preparación de los compuestos naturales.**

Los compuestos se obtuvieron comercialmente. El NDGA es de sigma (No. Cat. 74540) con una pureza >97%. La CUR es de ENZO de lifescience (No. Cat. ALX-350-028) con una pureza >99%. La MAN tiene una pureza de >98.5% obtenida de Chengdu Biopurify Phytochemicals (No. Cat. A07045) y la NAC es de sigma con una pureza del 99% (No. Cat. A8199).

Los compuestos naturales usados sufren foto-oxidación por lo que se preparan en fresco y en la oscuridad. Se preparó una solución stock de 10 mg/mL de cada compuesto. Debido a que son compuestos hidrofóbicos primero se diluyeron en dimetilsulfoxido (DMSO) y luego se adicionó medio 7H9 en una dilución 1:1.

A partir del stock se hicieron diluciones seriadas para obtener un stock 10X de las concentraciones mencionadas: 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 500, 250, 100 y 50 µg/mL. A las placas se les adicionaron 30µl del stock 10X para obtener las concentraciones deseadas en un volumen final de 300 µl.

En las pruebas de citotoxicidad de los compuestos en la línea celular THP-1, se hicieron las diluciones de la misma manera, pero el primer stock se realizo con DMSO y medio RPMI complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% en una dilución 1:1. Y las diluciones seriadas en RPMI con SFB.