



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación *in vitro* del efecto antimicobacteriano e
inmunomodulador de la naftoquinona lapazina
sobre dos cepas de *Mycobacterium tuberculosis*:
una farmacosensible y una drogoresistente.**

T E S I S

QUE PRESENTA:

DANIEL MÉNDEZ PÉREZ

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

BIÓLOGO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Dedico este trabajo por sobre todo a mi madre y a mi padre, quienes durante todo este tiempo me han demostrado un grandísimo apoyo hacia mi educación, mi formación escolar y personal, porque han realizado sacrificios y han abogado por mí, por toda la vida estaré eternamente agradecido con ustedes.

A mis hermanos, mi novia Mareli y el resto de mi familia, quienes me apoyaron durante la realización de este trabajo y me demostraron un apoyo moral para jamás rendirme, por soportarme y levantarme el ánimo cuando más lo he necesitado.

A mis amigos Maximiliano, Ricardo, Javier e Israel, por haberme soportado durante toda la carrera, demostrarme su apoyo, alentarme y debatir ideas sobre este tema para que floreciera, por no mencionar los grandiosos momentos que vivimos juntos durante la carrera que nunca olvidare.

A el Dr. Jorge Alberto Barrios Payán y todos los investigadores que forman parte del laboratorio de Patología Experimental, por brindarme su tiempo, conocimientos, confianza y aportaciones para mi formación académica.

Finalmente, me agradezco a mi persona (por egoísta que suene) ya que de no haber creído en mí y en seguir mis ideales, no hubiera obtenido los conocimientos que poseo ahora.

INDICE GENERAL

	Página
Dedicatoria	2
Índice	4 - 6
Índice de figuras	7 - 8
Índice de tablas	9
Abreviaciones	10
Introducción	11 - 13
Marco teórico	14 - 38
Planteamiento del problema	39
Hipótesis	40
Objetivo	41
Objetivos Particulares	42
Métodos	43 - 48
Resultados	49 - 60
Discusión	61 - 65
Agradecimientos	66
Referencias	67 - 69

Índice	Página
1. Introducción	11 - 13
2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14 - 15
2.1 Introducción sobre <i>M. tuberculosis</i>	14 - 15
2.2 Composición de la pared celular de <i>Mtb.</i>	14 - 16
2.3 Tuberculosis	16 - 17
2.4 Tuberculosis pulmonar	17 - 19
2.5 Inmunología de la tuberculosis pulmonar	19 - 21
2.6 Mecanismo de evasión de la actividad antimicrobiana del macrófago por <i>Mtb.</i>	21 - 22
3. Epidemiología de la TB	22 - 23
3.1 Estadísticas de la TB	23
4. Terapia curativa y preventiva para la TB pulmonar	23 - 27
4.1 Vacunas	23 - 24
4.2 Fármacos antifímicos y su mecanismo de acción	24 - 27
5. Introducción a la drogorresistencia	27 - 29
5.1 Definición	27 - 28
5.2 Panorama mundial de la TB	28
6. El lapacho y el lapachol	29 - 36
6.1 Taxonomía del árbol del lapacho	29
6.2 El lapachol y las naftoquinonas	29 - 30

6.3 Estructura química del lapachol	30 - 31
6.4 Antecedentes terapéuticos sobre el uso del lapachol y diferentes moléculas con estructura de naftoquinona	31 - 36
7. Lapazina	36 - 38
8. Planteamiento del problema	39
9. Hipótesis	40
10. Objetivo general	41
11. Objetivos particulares	42
12. Metodología	43 - 48
12.1 Verificación de la pureza de la cepa	43
12.2 Curvas de crecimiento de la cepa	43 - 44
12.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	44 - 45
12.4 Determinación de la concentración inhibitoria 50	45 - 46
12.5 Cuantificación de la disminución bacteriana intracelular de macrófagos infectados con <i>Mtb.</i> (killing)	46 - 47
12.6 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de Interleucina 12 y el Factor de Necrosis Tumoral	47 - 48
13. Resultados	49 - 60
13.1 Concentración mínima inhibitoria	49
13.2 Concentración inhibitoria 50	50 - 51
13.3 Ensayo de killing	52 - 55
13.4 ELISA de Interleucina 12 y TNF de los ensayos	

de determinación bacteriana	56 - 57
13.5 Cinética de ensayo de killing	58 - 60
14. Discusión	61 - 65
15. Agradecimientos	66
16. Referencias	67 - 69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Árbol del lapacho.	13
Figura 2. Foto micrografía electrónica de barrido de <i>Mtb</i> .	14
Figura 3. Composición de la pared celular de <i>Mtb</i> .	15
Figura 4. Macrófagos infectados con bacilos de <i>Mtb</i> . teñidos con la tinción de Ziehl Neelsen y Kinyoun.	16
Figura 5. Esquematización del proceso de infección de <i>Mtb</i> . por la vía aérea.	16
Figura 6. Conformación celular del granuloma.	18
Figura 7. Foto micrografía de un corte histológico de un granuloma teñido con hematoxilina.	19
Figura 8. Diferentes resultados de la infección con <i>Mtb</i> .	20
Figura 9. Mecanismo de evasión de la actividad antimicrobiana del macrófago por <i>Mtb</i> .	22
Figura 10. Incidencia de TB por cada 100,000 habitantes por año.	23
Figura 11. Historia del descubrimiento de fármacos y desarrollo de regímenes de tratamiento para la TB.	25
Figura 12. Mecanismos de acción de los fármacos de primera línea contra <i>Mtb</i> .	27
Figura 13. Porcentaje de casos reincidentes de TB MDR para el 2013.	28
Figura 14. Composición de las flores del lapacho.	29
Figura 15. Estructura química del lapachol.	30

Figura 16. Estructura química básica de las naftoquinonas y derivados del naftaleno.	31
Figura 17. Ejemplos de diversas naftoquinonas encontradas en la naturaleza que presentan diversas actividades biológicas.	32
Figura 18. Disminución de la sobrevivencia del parasito <i>P. berghei</i> administrando fenazinas derivadas del lapachol.	33
Figura 19. Ensayo de apoptosis de células estimuladas con lapachol, determinado por annexinaV.	34
Figura 20. Disminución bacilar intracelular de <i>M. avium</i> al estimular macrófagos con lapachol.	35
Figura 21. Determinación por citometría de flujo de la expresión del receptor 1 del interferón- γ y del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II), en células estimuladas con lapachol e infectadas con <i>M. avium</i> .	36
Figura 22. Comparación de la molécula de lapachol y lapazina.	36
Figura 23. Reacciones químicas para la síntesis de lapazina.	37

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Patologías en humanos, relacionadas a organismos del género <i>Mycobacterium</i> .	17

Abreviaciones

Agar, dextrosa, catalasa (**ADC**)

Bacilo Calmette–Guérin (**BCG**)

Concentración inhibitoria 50 (**IC 50**)

Complejo mayor de histocompatibilidad (**CMH**)

Concentración mínima inhibitoria (**CMI**)

Dimetil Sulfoxido (**DMSO**)

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (**ELISA**)

Factor de necrosis tumoral (**TNF**)

Gabinete de bioseguridad nivel 3 (**GBS3**)

Lipopolisacáridos (**LPS**)

Macrófagos (**MØ's**)

Nicotinamida adenina dinucleótido (**NAD**)

Interleucina 12 (**IL-12**)

Índice de multiplicidad de infección (**MOI**)

Mycobacterium tuberculosis (**Mtb.**)

Organización Mundial de la Salud (**OMS**)

Suero Fetal Bovino (**SFB**)

Tuberculosis (**TB**)

Tuberculosis multidrogorresistente (**TB MDR**)

Tuberculosis extremadamente drogorresistente (**TB XDR**)

Tuberculosis totalmente drogorresistente (**TB TDR**)

Unidades formadoras de colonias (**UFC's**)

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (**SIDA**)

Virus de inmunodeficiencia humana (**VIH**)

Introducción

Durante los últimos años el tratamiento de las enfermedades se ha orientado a la utilización de productos de origen natural, generalmente haciendo uso de partes específicas de plantas y aislando principios activos que puedan tener alguna actividad en particular, esta selección de plantas y su uso se ha basado principalmente en el conocimiento que poseen comunidades indígenas para el tratamiento de alguna enfermedad en particular.

La tuberculosis (TB) es una infección crónica, cuyo agente causal es el bacilo *Mycobacterium tuberculosis (Mtb.)*. Esta enfermedad afecta principalmente a los pulmones, pero puede llegar a afectar otros órganos conociéndose como TB extrapulmonar. El último reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) mostró en el 2015 que la incidencia de nuevos casos fue de 10.4 millones y el número estimado de muertes para el mismo año fue de 1.4 millones. Esta enfermedad es considerada como la más letal a nivel mundial ocasionada por un solo agente infeccioso y en los últimos años, la preocupación ha ido en aumento debido a la emergencia de cepas de *Mtb.* resistentes a fármacos (MDR), extremadamente drogorresistentes (XDR) e inclusive totalmente drogorresistentes (TDR)¹.

La aparición de cepas resistentes plantea la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento, así como evaluar el efecto de la lapazina, una molécula sintética derivada de un árbol llamado lapacho; esta molécula en diversos ensayos realizados en nuestro grupo de investigación ha mostrado poseer una gran actividad bacteriostática sobre cepas de *Mtb.* drogosenesibles y drogorresistentes.

La lapazina pertenece a la familia de las naftoquinonas, la cual se caracteriza por tener dentro de su estructura química al menos 2 anillos heterocíclicos que constituyen al naftaleno, además de diversas sustituciones en alguno de sus carbonos que la conforman. Las naftoquinonas se encuentran abundantemente en la naturaleza, particularmente en plantas en donde reciben también el nombre de metabolitos secundarios y que en estos organismos cumplen diversas funciones como es el caso de: comunicación extracelular e intracelular, protección hacia patógenos, quimiotaxis, entre muchas otras^{2,3,4}.

Por siglos, el hombre ha estudiado los posibles usos de diversas plantas, encontrando que muchas de éstas podrían usarse como tratamiento para diferentes enfermedades o malestares. Gran parte de dicho conocimiento se ha obtenido (y sigue obteniéndose) por las comunidades indígenas, ya que son ellas las que han descubierto y usado desde hace muchos años los extractos de dichas plantas y que sin saberlo, contenían naftoquinonas, asociando que el uso de dichos extractos ayudaban para el tratamiento de un malestar en particular debido a las propiedades que éstas poseen. Específicamente para el caso del precursor de la molécula de lapazina, es decir el lapachol, destaca el uso de dicho extracto por la tribu Chalaway la cual habitaba la zona brasileño-paraguaya, quienes empleaban dicho extracto del árbol del lapacho, para el tratamiento de malestares de tipo intestinal, respiratorio, circulatorio, entre otros⁵.

Por su parte, en la literatura se encuentran descritos diversos efectos de muchas naftoquinonas, como es el caso del lapachol (precursor de la molécula lapazina) que durante el siglo XX se descubrió que posee diversas actividades biológicas, entre ellas, el tratamiento contra el cáncer, fungicidas, antimicrobianas, anti-parasitarias, inmunomoduladoras y contra patógenos intracelulares, como el agente causal de la malaria y contra *Mtb.* y *M. avium*.⁶

Finalmente, se ha demostrado que la molécula lapazina en ensayos *in vitro*, posee un efecto bacteriostático en el crecimiento de *Mtb.* con una CMI de 3.0 µg/ml para cepas sensibles a fármacos y de 1.56 µg/ml para cepas resistentes a rifampicina a diferencia de su molécula precursora, el lapachol, que demostró una inhibición en *M. avium* con 32 µg/ml^{2,3}.

Aunado a esto, el aumento en la incidencia de cepas de *Mtb.* MDR, TB-XDR y TB-TDR^{1,7}, hace indispensable evaluar el efecto terapéutico de estas moléculas con el fin de encontrar nuevos fármacos potenciales con el propósito de minimizar los efectos tóxicos o secundarios de los medicamentos de primera línea, conocer si estas moléculas puede ayudar a disminuir la progresión de la enfermedad y para generar nueva información sobre los efectos que esta naftoquinona induce sobre el hospedero principal de *Mtb.* así como a las bacterias que se encuentran intracelularmente en los MØ's.



Figura 1. Árbol del lapacho (*Tabebuia avellanadae*).

Marco teórico

Mycobacterium tuberculosis

Mtb. es el agente causal de la TB pulmonar. Este bacilo fue descubierto por Robert Koch (1843-1910) en el año de 1882; sus trabajos lo llevaron a ganar el premio Nobel de medicina en el año 1905.

Los microorganismos que componen al género *Mycobacterium* presentan la característica de ser bacilos aerobios inmóviles (**figura 2**) y no esporulados con un tamaño de 0,2 a 0,6 μm de alto y de 1 - 10 μm de largo⁸.



Figura 2. Foto micrografía electrónica de barrido de *Mtb.*

Mtb. es aerobio obligado, sin movilidad y de crecimiento lento. Su envoltura celular es poco usual ya que está compuesta de dos partes principales: una membrana citoplásmica, que le otorga a la célula protección osmótica y transporte de iones y moléculas, y alrededor de ésta se encuentra la pared celular, que le brinda soporte mecánico y protección (**figura 3**).

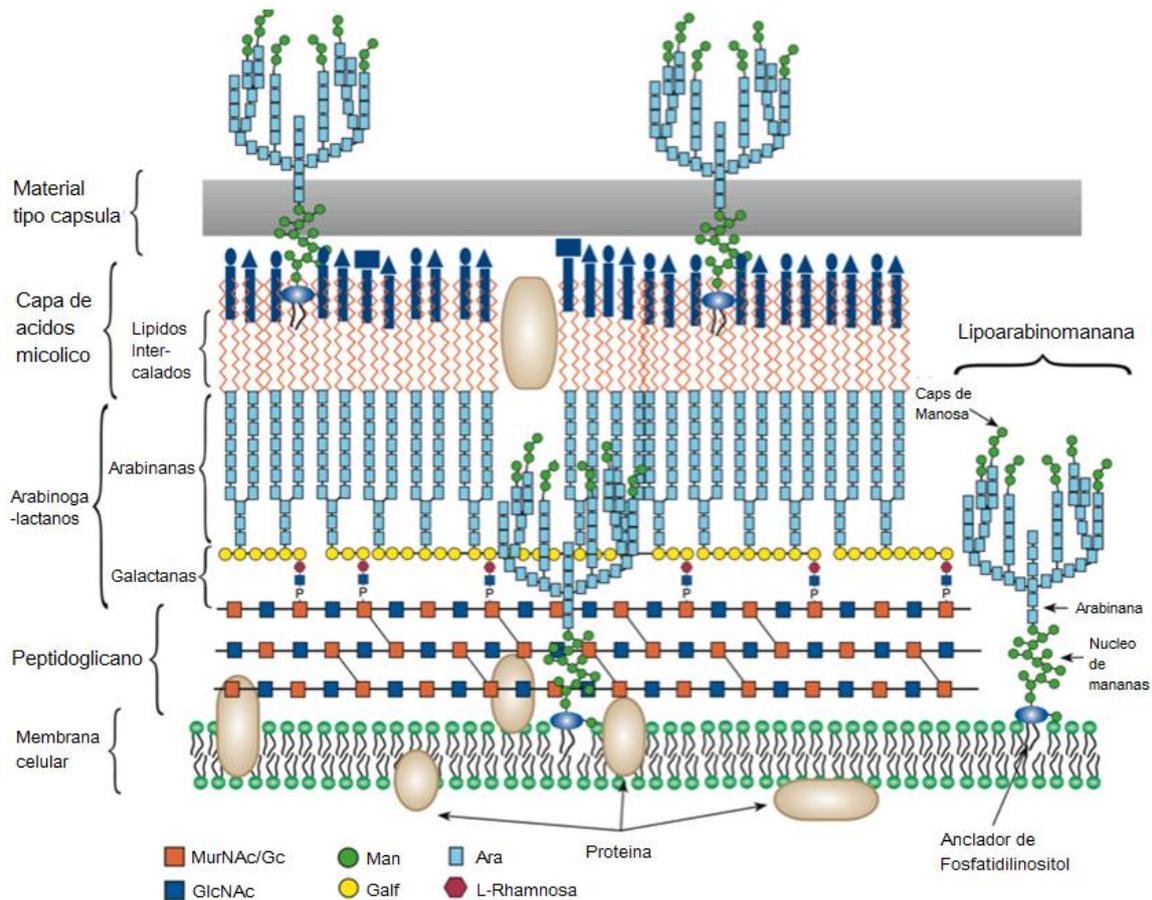


Figura 3. Composición de la pared celular de *Mtb*. (modificado de G. Black Jacquelyn, *Microbiology principles and explorations*, 2008).

La membrana plasmática se encuentra cubierta por una capa extensa de peptidoglicanos unidos a polisacáridos, los cuales se encuentran esterificados con ácidos micólicos, formados por lípidos libres, glicolípidos y peptidoglicolípidos. Estas características le confieren una alta hidrofobicidad, resistencia a detergentes y a un buen número de antibióticos, así como a tinciones habituales. Sin embargo debido a ésta, *Mtb*. también presenta cierta afinidad hacia la tinción ácido alcohol resistente de Ziehl Neelsen y Kinyoun (figura 4)^{9,10}.

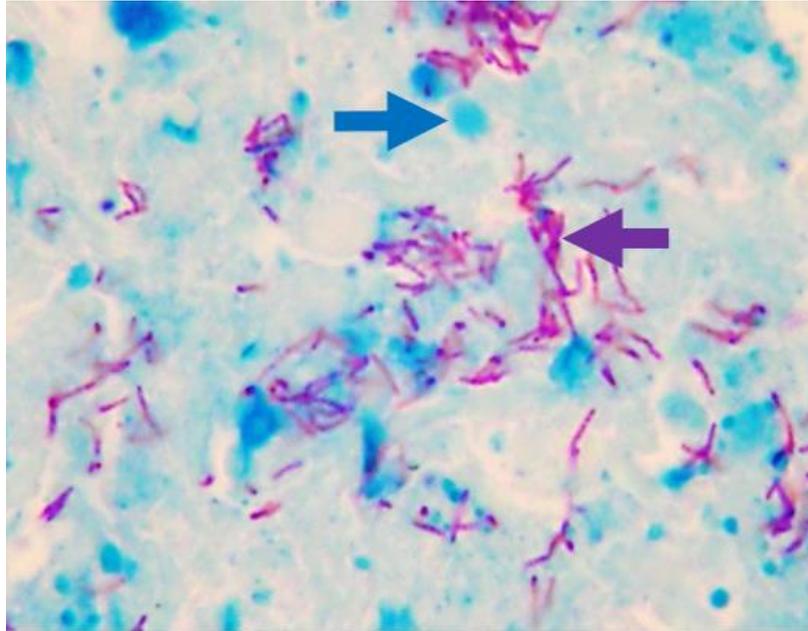


Figura 4. Macrófagos (flecha azul) infectados con bacilos de *Mtb.* (flecha morada) teñidos con la tinción de Ziehl Neelsen y Kinyoun.

Tuberculosis

La TB es una enfermedad infecciosa crónica que afecta principalmente a los pulmones y produce profundas alteraciones del sistema inmunológico¹¹. Se transmite de persona a persona por inhalación de aerosoles provenientes de los individuos enfermos al toser, hablar o estornudar (figura 5)¹². Aunque la enfermedad es generalmente pulmonar también puede afectar a otros órganos (TB extra-pulmonar) producto de la diseminación por vía linfática o hematogena, causando TB meníngea, digestiva, genital, oftálmica, renal, entre otras¹³.

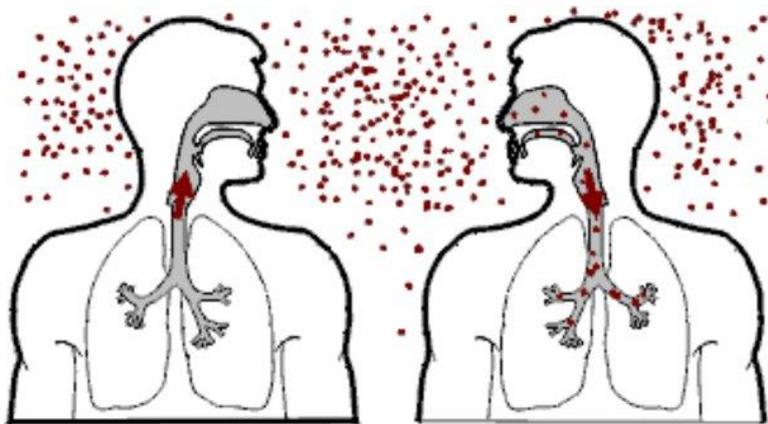


Figura 5. Esquemización del proceso de infección de *Mtb.* por la vía aérea.

El género *Mycobacterium* está conformado por 22 especies, las cuales se han agrupado en 2 categorías dependiendo de su patogenicidad hacia el humano: micobacterias tuberculosas y no tuberculosas. Dentro de éstas, se reconocen a 7 especies que ocasionan diferentes enfermedades en los humanos como la lepra, lesiones de tipo tuberculosas, lesiones ulcerativas y finalmente tuberculosis pulmonar (**tabla 1**)¹³.

Micobacterias causantes de enfermedades a humanos	
Especies	Enfermedad
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis Pulmonar
<i>M. avium</i>	Enfermedad tipo tuberculosis en humanos transmitida de aves a cerdos
<i>M. bovis</i>	Tuberculosis transmitida del ganado; puede ser transmitida por primates no humanos.
<i>M. kansasii</i>	Enfermedad tipo tuberculosis
<i>M. leprae</i>	Enfermedad de Hansen's (lepra)
<i>M. marinum</i>	Lesiones cutáneas en humanos, la tuberculosis de los peces
<i>M. ulcerans</i>	Lesiones ulcerativas

Tabla 1. Patologías en humanos relacionadas a organismos del genero *Mycobacterium*.

Tuberculosis pulmonar

Las lesiones típicas de la TB pulmonar son mejor conocidas como granulomas, los cuales son el resultado de la respuesta inmune del hospedero para contener al patógeno¹⁴. En gran medida la formación de esta compleja estructura está intrínsecamente mediada por varios componentes de la respuesta TH 1 de células T¹⁵; aunque su origen evolutivo así como su función principal aún se encuentran en debate. Conocer la composición celular de dicha estructura resulta fundamental (**figura 6 y 7**).

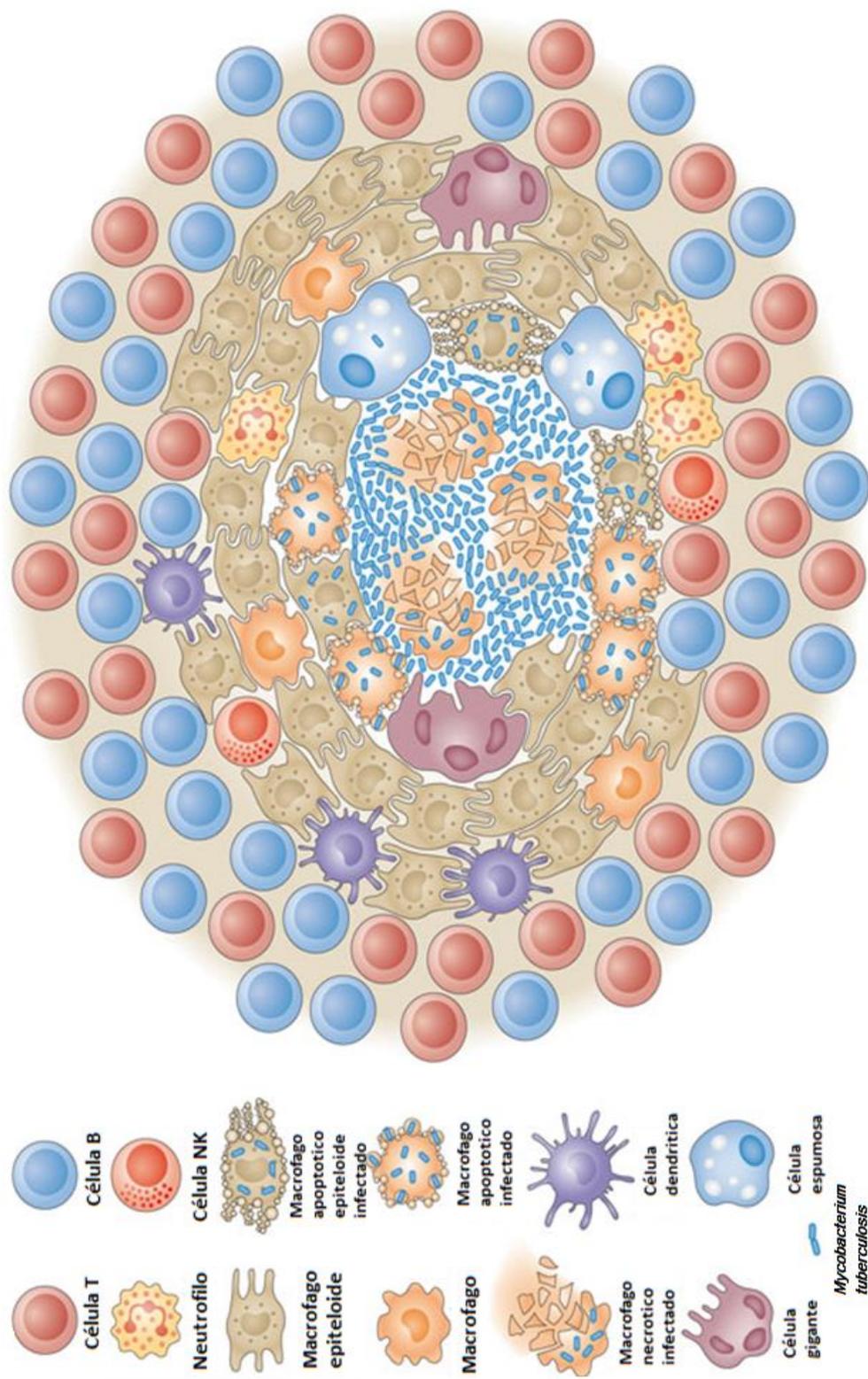


Figura 6. Conformación celular del granuloma (modificado de L. Ramakrishnan, Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis, 2012).

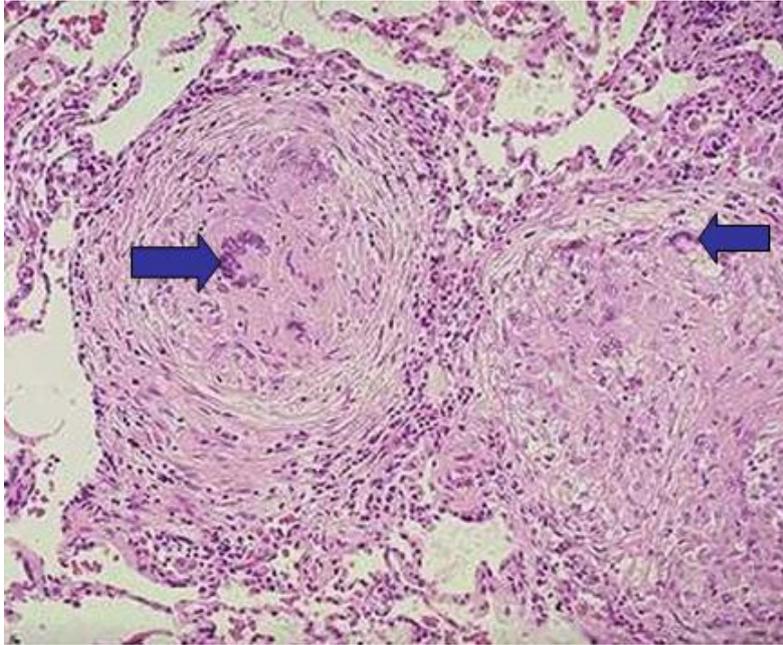


Figura 7. Foto micrografía a 40X de un corte histológico de un granuloma teñido con hematoxilina, característico en la tuberculosis pulmonar, la flecha señala al centro del granuloma en donde se concentran las bacterias confinadas.

Inmunología de la tuberculosis pulmonar

Se sabe que en esta patología el estado en el que se encuentre el sistema inmunológico del hospedero jugará un papel fundamental en la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado que en el 90% de los casos, en los cuales hay contacto entre el hospedero y *Mtb.* aproximadamente en el 30% de estos, se desarrolla la TB latente¹⁶, mientras que el resto resuelve la enfermedad satisfactoriamente confinando a *Mtb.* en las estructuras denominadas granulomas y posteriormente eliminando a los bacilos dentro de la misma, por lo que la interacción del sistema inmune será la determinante de los diferentes escenarios que se pueden presentar en la TB pulmonar (**figura 8**).

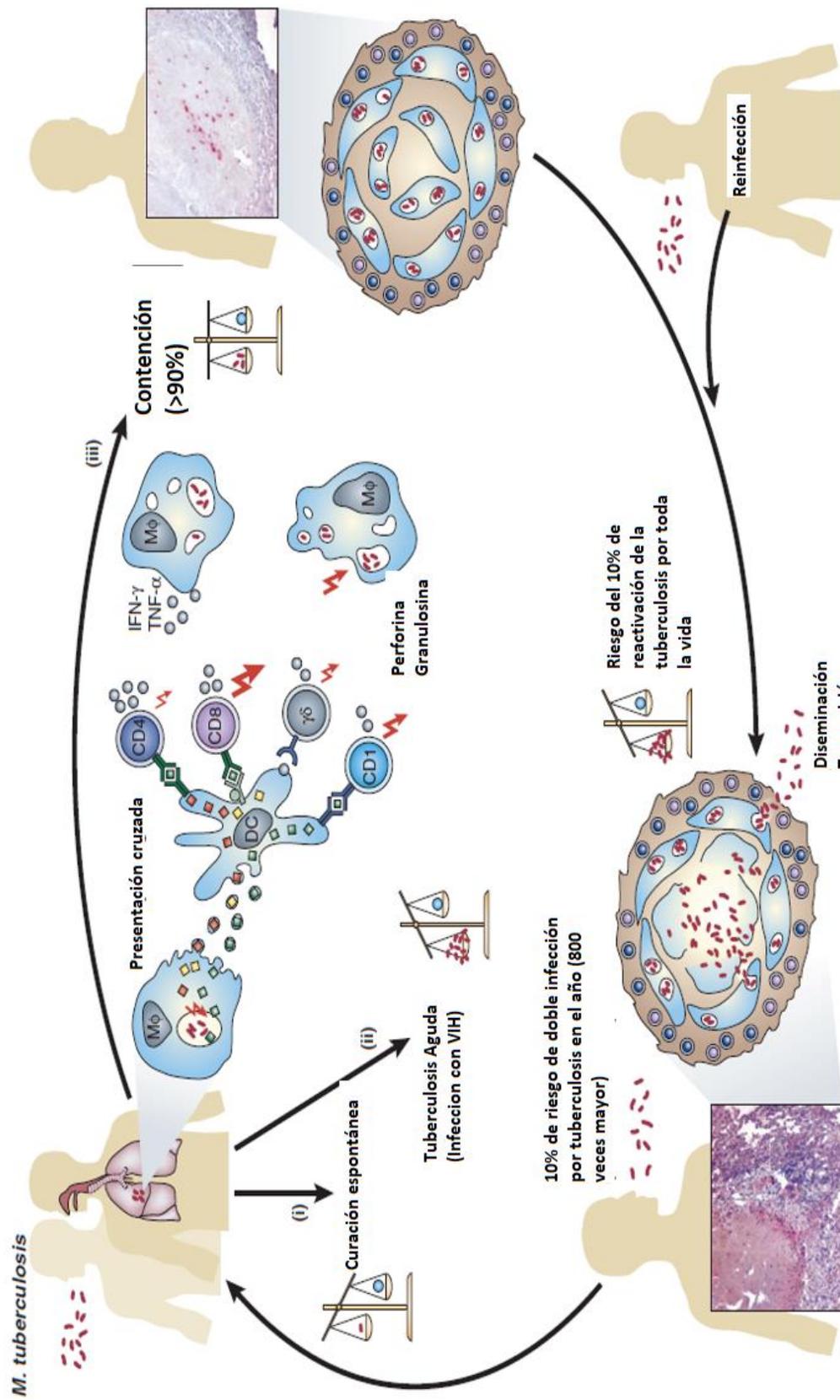


Figura 8. Diferentes resultados de la infección con *Mtb.* subyacente al sistema inmunológico (modificado de Stefan H. E. Kaufmann & Andrew J. McMichael, Annalling a dangerous liaison: strategies against AIDS and tuberculosis, 2005).

De la gran cantidad de células del sistema inmune que se encuentran involucradas en la enfermedad destacan 2: los macrófagos (MØ's) son las encargadas de participar en la eliminación del bacilo y componentes de la inmunidad innata y las células dendríticas, encargadas de desarrollar una respuesta inmunológica dirigida hacia el patógeno y que son parte de la inmunidad adaptativa. Los MØ's se encargan de fagocitar y desencadenar una serie de procesos fisiológicos para eliminar al bacilo utilizando distintas estrategias como son: la producción de especies reactivas de oxígeno, de nitrógeno, acidificar al fagosoma en donde se encuentra internalizado el bacilo, por medio de la fusión del fagosoma y el lisosoma, desarrollando los fagolisosomas y en algunos casos propiciando apoptosis, además de presentar antígenos del bacilo hacia distintas células inmunológicas, con el fin de desarrollar una respuesta adaptativa hacia el patógeno en caso de no ser capaz de degradarlo por los mecanismos antes mencionados. Por su parte las células dendríticas tienen la capacidad de presentar antígenos de *Mtb.* hacia linfocitos T ayudadores (CD4), T citotóxicos (CD8), linfocitos T γ - δ y células T CD1, estimulando la producción de citocinas, particularmente INF- γ y TNF- α , ambas activadoras de los MØ's, favoreciendo algunos de los procesos antes mencionados que culminan con la eliminación del bacilo o formación de granulomas^{15,16}.

Mecanismos de evasión de *Mtb.*

Mtb. ha desarrollado estrategias y posee en su compleja pared celular diversos receptores, proteínas y lípidos que interfieren en las vías de señalización que están involucradas en la activación del MØ, la fagocitosis y en la degradación del bacilo, entre las que destacan las lipoarabinomananas (LAM). Se ha propuesto que las LAM interfieren con el receptor de manosa del MØ, impidiendo la formación de intermediarios reactivos de oxígeno¹⁷; las proteínas SNARE (soluble n-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor), las cuales regulan la capacidad de las membranas del MØ a fusionarse (están involucradas en la biogénesis fagolisosomal) impidiendo la acidificación de los fagosomas que contienen a las bacterias, debido al reclutamiento de proteínas de la familia Rab, las cuales al estar presentes, impiden la fusión fagolisosomal y por lo tanto su

eliminación^{18,19}, además de la secreción de la fosfatasa SapM y la cinasa de serina y treonina PknG que también inhiben la fusión del fagosoma y el lisosoma y también la capacidad del proteosoma de *Mtb.* que recluta activamente a Coronina1/TACO, esta proteína también se encuentra involucrada en el impedimento de la fusión fagolisosomal (**figura 5**)^{19,20}.

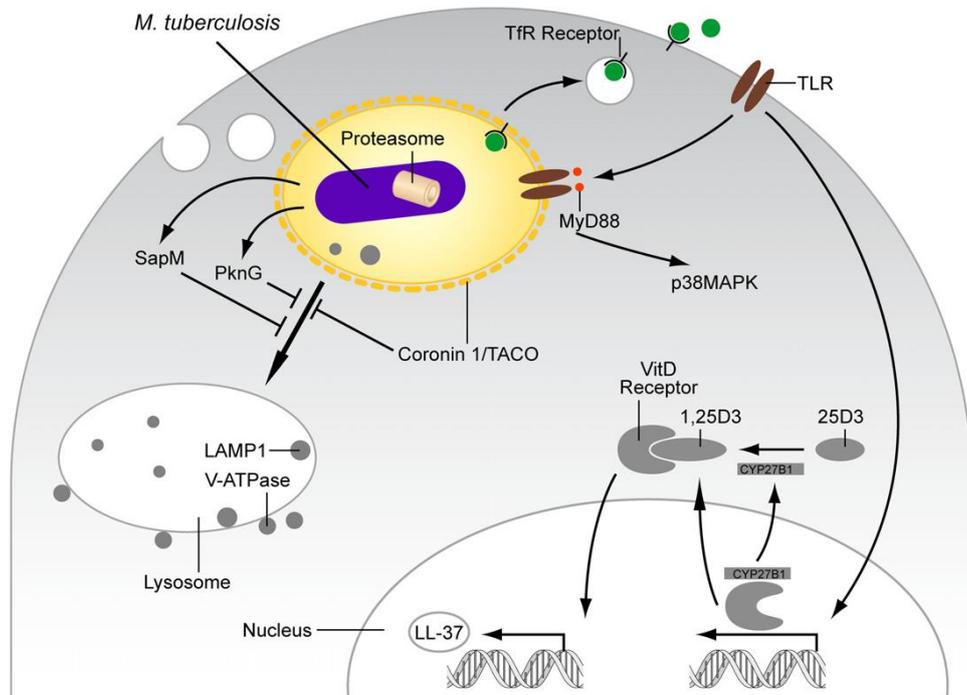


Figura 9. Mecanismo de evasión de la actividad antimicrobiana del macrófago por *Mtb.*

Finalmente al haber impedido su respectiva eliminación dentro del MØ, el bacilo comienza a replicarse dentro de éste pasando de ser uno de los componentes más importantes para la eliminación de la micobacteria a ser reservorios de la misma²⁰.

Epidemiología de la TB

El último reporte de TB MDR estimó la aparición de 480,000 casos más 100,000 casos de resistencia a la rifampicina, lo que implica que a pesar de haberse disminuido la tasa de mortalidad por TB en un 45% entre 1990 y 2015, y se estime que entre el año 2000 y 2013 se salvaron 37 millones de vidas mediante el diagnóstico y el tratamiento, aun hacen falta más esfuerzos e investigación para mejorar las terapias que se aplican y las condiciones de vida de quienes padecen la enfermedad (**figura 10**)¹.

Así mismo, 95% de las muertes ocurrieron en países de escasos recursos y en 2013, se estimó que 550,000 niños enfermaron y 80,000 niños comprometidos con el SIDA, murieron a causa de esta enfermedad¹. Así mismo, es la causa principal de muerte en las personas infectadas por el VIH, pues causa una cuarta parte de las defunciones en este grupo¹.

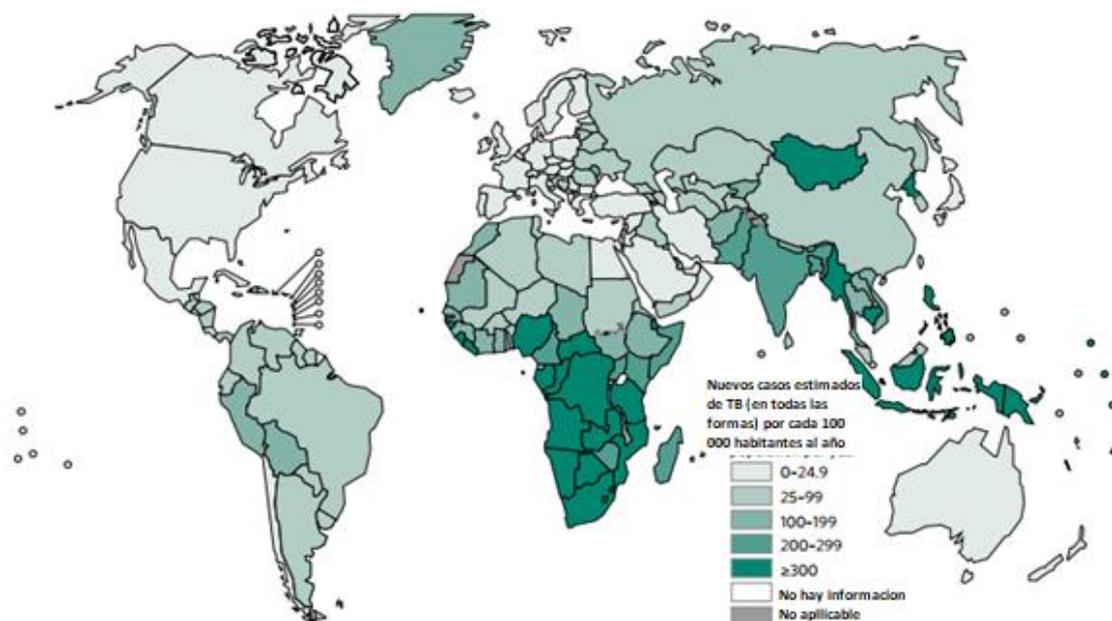


Figura 10. "Incidencia de TB por cada 100,000 habitantes por año.

Así mismo, para el año 2015 en México se presentaron 13,239 casos bacteriológicamente confirmados, 2,841 casos clínicamente diagnosticados, 3,623 casos extra pulmonares y 598 casos que ya habían sido tratados para un total de 21,306 casos notificados¹.

Terapia curativa y preventiva

El tratamiento farmacológico se puede dividir en 2 rubros: el tratamiento preventivo y el curativo. El primero consta de la aplicación de la vacuna Bacille Calmette–Guérin (BCG) desarrollada por Calmette y Guérin en el Instituto Pasteur en Lille, Francia²¹. La vacuna proviene de una cepa de *M. bovis* atenuada y se comenzó a aplicar en humanos en el año de 1921. Se ha observado que previene las complicaciones invasivas de la TB en la niñez, tales como la enfermedad miliar, pero la protección que ofrece contra la enfermedad pulmonar del adulto es variable.

Durante largos periodos se han realizado pruebas para evaluar su efectividad: en 1955 los resultados arrojaron que tenía una efectividad del 56% al 80%²², cabe aclarar que este no es el único dato disponible, en otros estudios en donde se analizó la vacuna proveniente del aislado denominado BCG Tice, se encontró que la eficacia fue variable, desde 0% hasta el 75%^{23,24}. Dichas variaciones son el resultado de diferencias genéticas de individuo a individuo, condiciones ambientales, mecanismos intrínsecos de evasión, que han evolucionado a lo largo del tiempo desde la administración y por supuesto la delicada y compleja interacción entre el hospedero y el parásito, la cual aún se desconoce en su totalidad.

Por tales motivos el desarrollo de una terapia curativa resulta aún indispensable, pues hasta el momento no se cuenta con ninguna vacuna que nos exente de contraer la enfermedad. El esquema terapéutico que se utiliza en la actualidad consiste en la administración de los fármacos más efectivos para la TB: la rifampicina, en conjunto con isoniazida, pirazinamida y etambutol o estreptomina; estos medicamentos son denominados como de primera línea y poseen un régimen de administración de 6 a 12 meses²⁵. Dicha combinación de fármacos fue establecida después de observar que la administración independiente de éstos, no aseguraba la eliminación de la bacteria. Además, el uso prolongado del tratamiento y el desarrollo de resistencia por parte de la micobacteria, hacen que el régimen antes descrito sea el más eficaz para cepas de *Mtb.* sensibles a fármacos y no para cepas MDR. En la **figura 11** se puede observar cómo es que han evolucionado las terapias hacia el tratamiento de la TB y el descubrimiento de los fármacos^{25,26}.

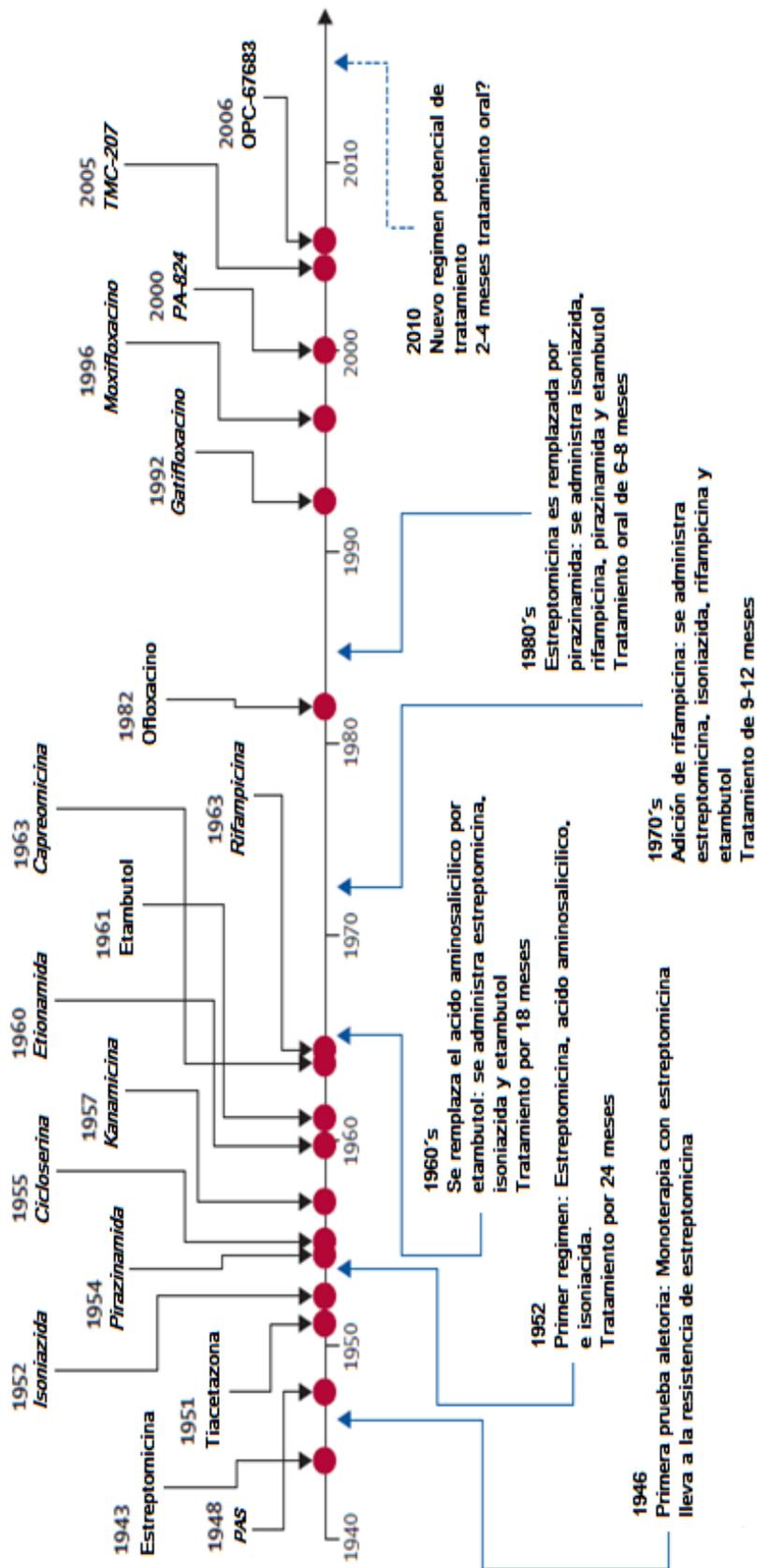


Figura 11. Historia del descubrimiento de fármacos y desarrollo de regímenes de tratamiento para la tuberculosis (modificado de Global tuberculosis drug development pipeline: The need and the reality Zhenkun Ma; et. al.)

La isoniazida ha sido el antifímico más utilizado desde que se descubrió su actividad clínica en 1952. Se ha propuesto que el fármaco penetra las células del hospedero, difunde a través de la membrana de *Mtb*; a su vez, requiere de la activación oxidativa por la enzima catalasa-peroxidasa KatG propia de la bacteria y específicamente inhibe la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos y el metabolismo de NAD, por mencionar solo algunos, dado que el mecanismo preciso aún no se ha descubierto^{27,28,29,30}.

La rifampicina por su parte, fue aislada en 1957 de la especie *Amycolaptosis mediterranei*, una bacteria gram positiva. Se ha propuesto que este tipo de compuestos difunde la membrana de *Mtb*. debido a su característica lipofílica, además de inhibir la replicación uniéndose con alta afinidad a la DNA polimerasa. Sin embargo, al igual que la isoniazida su mecanismo de acción específico sigue siendo desconocido³¹. La pirazinamida fue descubierta en el año 1952 y durante mucho tiempo se ha estudiado su mecanismo de acción. Este antibiótico se acumula en los compartimientos acidificados del MØ y actúa como bactericida, así mismo, entra de manera pasiva al bacilo y por la vía dependiente de ATP; dentro de la micobacteria necesita ser transformada a su forma activa, el ácido pirazinoico, por una reacción catalizada por la enzima pirazinamidasas. Una vez acumulado, este compuesto interrumpe el movimiento de protones el cual es esencial para las funciones del transporte de membrana³². Algunos de estos mecanismos de acción se pueden observar en la **figura 12**.

Finalmente, así como se ha indagado en los mecanismos de acción de estos fármacos, también se han estudiado sus efectos adversos y se sabe que el uso prolongado de estos antibióticos de primera línea, generan un efecto hepatotóxico en el organismo que acompañado con el largo régimen de administración y de su elevado costo, lleva al abandono del tratamiento, por parte de los pacientes y la generación de resistencia a estos agentes antifímicos por parte de la micobacteria²⁵

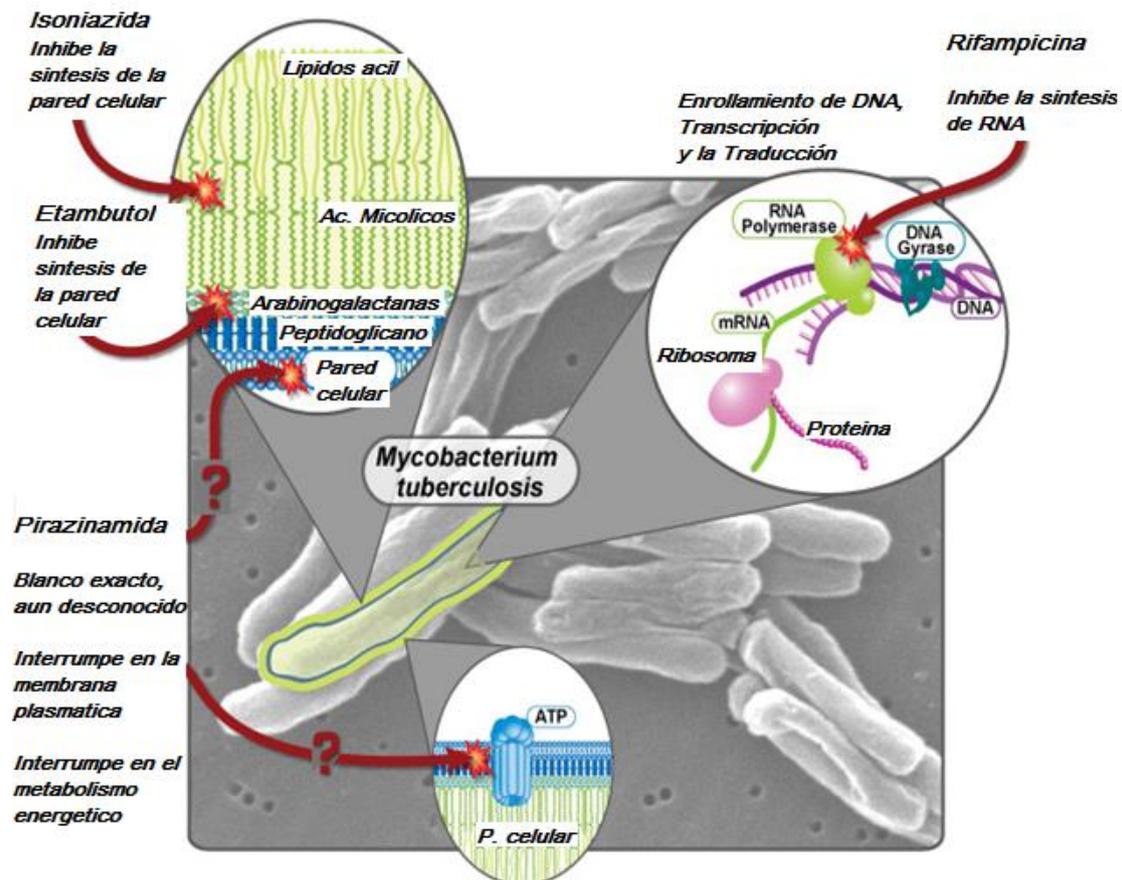


Figura 12. Mecanismos de acción de los fármacos de primera línea para *Mtb*.

Drogorresistencia

Actualmente, una de las problemáticas a nivel mundial para el tratamiento de la TB es el surgimiento de cepas de *Mtb*. resistentes a fármacos antituberculosos, éstas son mejor conocidas como cepas multidrogorresistentes (TB MDR). En el 2014 la OMS en su reporte global de la TB, estimó que para el 2013 hubo al menos 9 millones de nuevos casos de esta enfermedad, de los cuales 480,000 se encontraban afectados con cepas de tuberculosis resistente (TB MDR), es decir al menos el 5% de los casos totales (figura 13)¹; además, en países o sitios denominados como “hot spots” como algunos estados de Rusia, el porcentaje de emergencia de infecciones con TB MDR fue de un 20-30% de los casos totales de TB de dicho país. Aunado a esto, en países subdesarrollados como es en el caso de aquellos en África, hay un gran sesgo de información sobre la incidencia de estas cepas, por lo que esta cifra podría aumentar aún más¹.

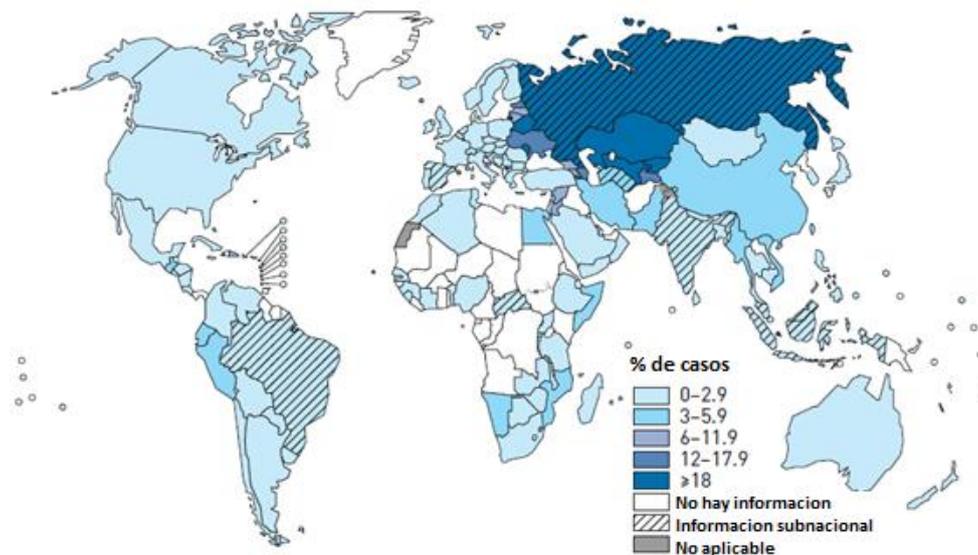


Figura 13. Porcentaje de nuevos casos de TB MDR para el 2013.

La característica drogorresistente de las micobacterias se define como la resistencia “*in vitro*” a isoniazida y pirazinamida. A su vez, se contempla también el surgimiento de cepas de TB XDR cuya magnitud aún se desconoce a nivel mundial. Ésta es definida como la resistencia a rifampicina e isoniazida + cualquier quinolona + al menos un agente inyectable de segunda línea, ya sea la capreomicina, amikacina o la kanamicina. Finalmente, una de las últimas formas descritas de TB es la TB-Totalmentedrogorresistente (TDR), la cual es resistente a todos los fármacos existentes de primera y segunda línea con excepción de fármacos en fase experimental. Se sabe que estos casos se han reportado en India en el año 2014 en 4 pacientes⁷.

El surgimiento de estas cepas de TB MDR conlleva al uso de medicamentos mucho más costosos y durante un periodo de tiempo mayor lo que a su vez puede generar una mayor toxicidad para el hospedero. Por tal motivo es indispensable la búsqueda de nuevas alternativas que puedan reducir la toxicidad y eliminar de mejor manera al bacilo de la TB²⁵.

Una de las explicaciones del surgimiento de la TB MDR es la discontinuidad del tratamiento por parte del paciente, la reincidencia de la enfermedad, la carencia de un diagnóstico oportuno y la ausencia de ensayos bioquímicos específicos para conocer si la cepa de TB por la cual se encuentra infectado el paciente presenta alguna resistencia a los antifímicos usados para el tratamiento de la misma.

Taxonomía del lapacho

Tabebuia avellanadae o mejor conocido como “lapacho” es un árbol nativo de Centro y Suramérica que llega a medir hasta 20 metros de altura; se caracteriza por presentar una corteza de color castaño agrietada y dura, sus flores son hermafroditas y tubulosas de color rosado, violáceo o púrpuras (figura 14)⁵.

El género *Tabebuia* abarca a 107 especies nativas de las zonas tropicales de América extendiéndose desde México hasta Argentina. Se encuentra distribuida ampliamente en Brasil, desde la zona centro-sur, hasta la Amazonia. Históricamente se ha encontrado que distintas comunidades indígenas utilizaban desde la época precolombina la parte interna de la corteza del árbol para el tratamiento de diversas enfermedades y en el año de 1858 se extrajo el primer compuesto de la corteza denominado lapachol⁵.



Figura 14. Composición de las flores del lapacho.

El lapachol y las naftoquinonas

El lapachol puede encontrarse en diversas especies pertenecientes al género *Tabebuia*, así como en organismos pertenecientes a la familia *Bignoniaceae*. Se ha considerado a Samuel C. Hooker como el descubridor debido a sus trabajos donde describe la extracción, así como la producción de derivados a partir del lapachol³³, estos trabajos datan desde el año 1858, los cuales fueron retomados por el investigador L.F. Fiesler.

Por su estructura química el lapachol pertenece a la familia de las Naftoquinonas (**figura 15**). Presenta un carácter lipofílico, es decir que tiende a disolverse en aceites, lípidos y grasas, así como en solventes no polares como el hexano y el dimetil sulfóxido (DMSO). Estructuralmente las naftoquinonas son compuestos cíclicos derivados del naftaleno cuya estructura consiste en dos anillos aromáticos hexagonales fusionados, que comparten un par de átomos de carbono y se caracterizan por tener dos grupos funcionales carbonilo en uno de los anillos aromáticos en posición 1,4 y 1,2 llamados respectivamente 1,4 naftoquinonas y 1,2 naftoquinonas (**figura 16**)⁶.

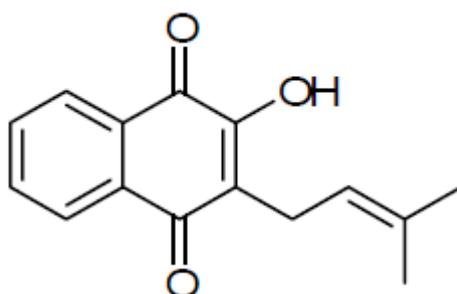


Figura 15. Estructura química del lapachol.

Las 1,4 naftoquinonas tanto de origen natural como sintético han demostrado diversas actividades biológicas como son: agentes antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos y antimaláricos⁶.

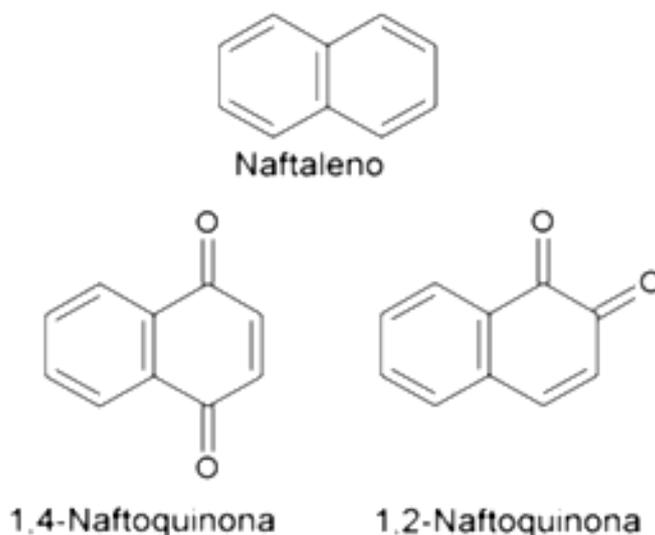


Figura 16. Estructura química básica de las naftoquinonas y derivados del naftaleno.

Sin embargo su mecanismo de acción específico aún se encuentra en investigación, aunque algunos autores mencionan que las naftoquinonas

promueven acciones inflamatorias, antiinflamatorias e inducen toxicidad⁴; además también se piensa que este tipo de moléculas ejercen sus acciones por medio una reacción, como agentes prooxidantes, reduciendo el oxígeno y generando especies reactivas³³.

Actualmente, se han identificado en la naturaleza un gran número de estas moléculas (**figura 17**). Como se mencionó anteriormente, algunas de ellas han sido extraídas a partir de diversas partes de los árboles de la familia *Bignoniaceae*, aunque también se ha descrito la presencia de naftoquinonas que son sintetizadas por bacterias como la menaquinona, la cual se ha observado que está involucrada con el transporte de electrones³⁴, en hongos se han encontrado toxinas derivadas de la naftazarina, éstas son producidas por varias especies del genero *Fusarium*³⁵. Así mismo, se han encontrado en animales como en los erizos de mar a los que se les denominan equinocromos y espinocromos dependiendo de su ubicación en el erizo³⁴.

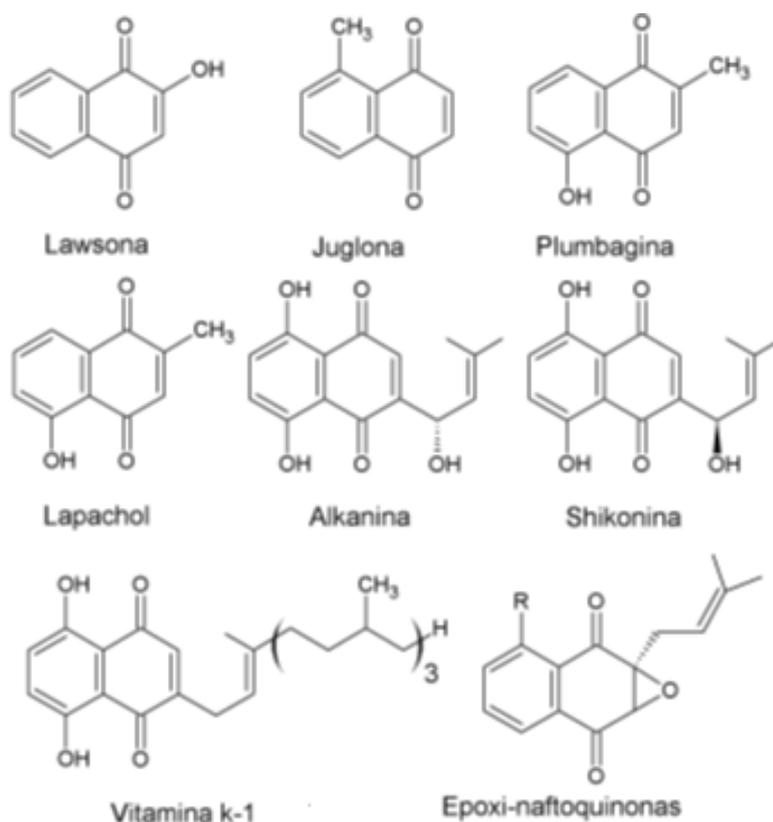


Figura 17. Ejemplos de diversas naftoquinonas encontradas en la naturaleza que presentan diversas actividades biológicas.

A grandes rasgos, se ha considerado que los compuestos con una base estructural de naftoquinonas son prometedores blancos terapéuticos contra la TB como lo explica Rangappa S. Keri, quien después de analizar 68 diferentes compuestos observó que su actividad esta mediada en gran medida por las sustituciones que se le realizan al naftaleno, muchas de las cuales muestran una mejor CMI que los actuales fármacos utilizados para el tratamiento de la TB y la TB MDR³⁶.

Uno de los ejemplos más destacados del uso de las naftoquinonas ha sido en el tratamiento de enfermedades parasitarias intracelulares como la malaria, en donde se ha encontrado que las fenazinas derivadas del lapachol, son eficaces para inhibir el crecimiento *in vitro* del parásito en un 50% en un ensayo de IC 50; además de eliminar en un modelo *in vivo* murino en un 98% la parasitemia en ratones infectados con *Plasmodium berghei* y, por lo tanto aumentando la sobrevivencia de los mismos (**figura 18**)³⁷.

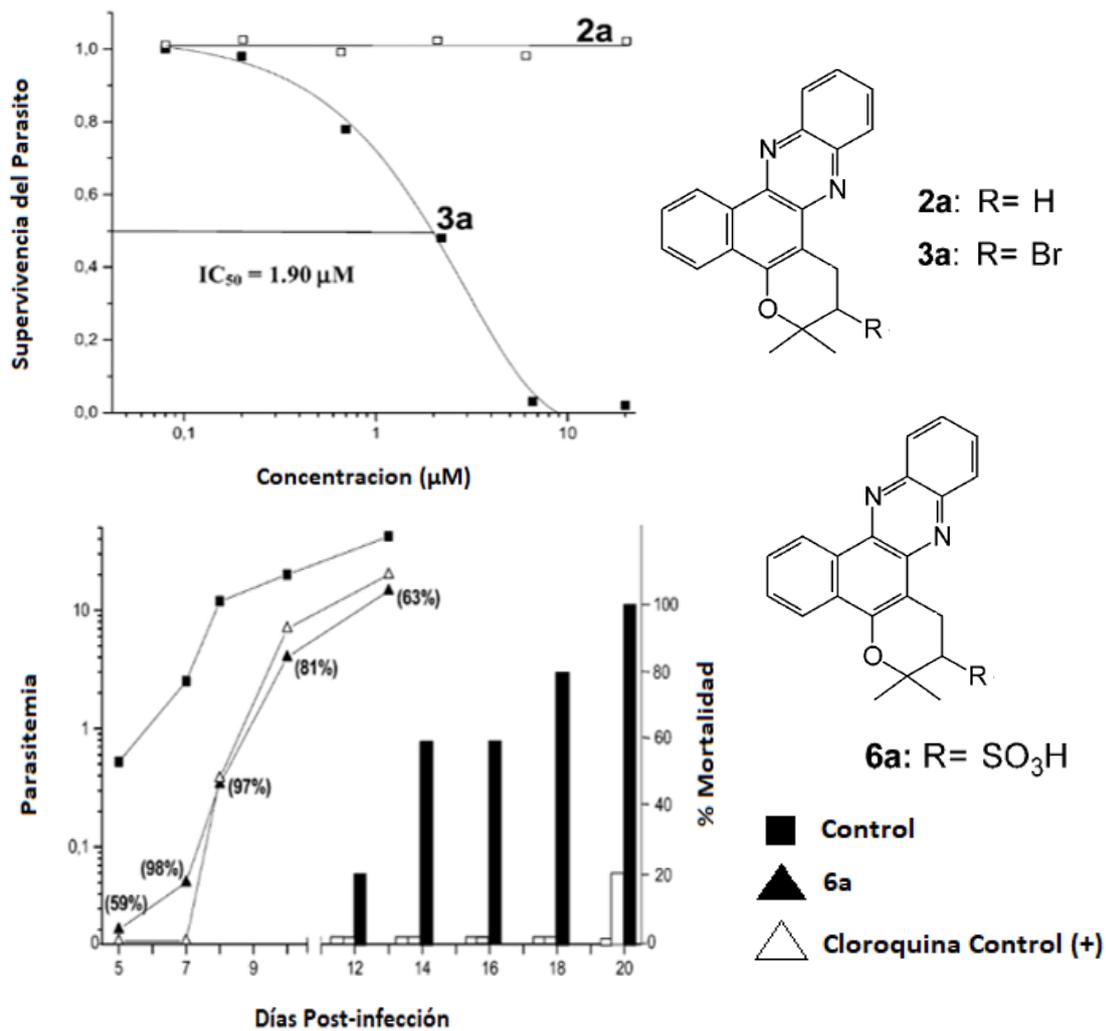


Figura 18. (Arriba) Disminución de la supervivencia del parásito *P. berghei* administrando 2 fenazinas distintas derivadas del lapachol. (Abajo) Disminución de la parasitemia y aumento de la sobrevivencia de ratones infectados por la administración de fenazinas.

Al encontrar que fenazinas derivadas del lapachol poseen la capacidad de eliminar patógenos intracelulares y aunado a los diversos procesos biológicos que se encuentra en la literatura que esta molécula es capaz de modular, Renato A.S. Oliveira y cols. realizaron una serie de experimentos en donde evaluaron si el lapachol podría ser utilizado para el tratamiento de la TB, ya que este patógeno también es intracelular, por lo que inicialmente evaluaron si esta molécula causaba citotoxicidad en un cultivo de MØ's, para esto, realizaron un ensayo para determinar si el lapachol les provocaba apoptosis, posteriormente evaluaron la integridad del DNA de los MØ's y finalmente evaluaron su morfología con el fin de conocer si se alteraba al recibir dicho estímulo; concluyendo que el compuesto no inducía citotoxicidad a las células fundamentales para el reservorio de *Mtb.* (figura 19)².

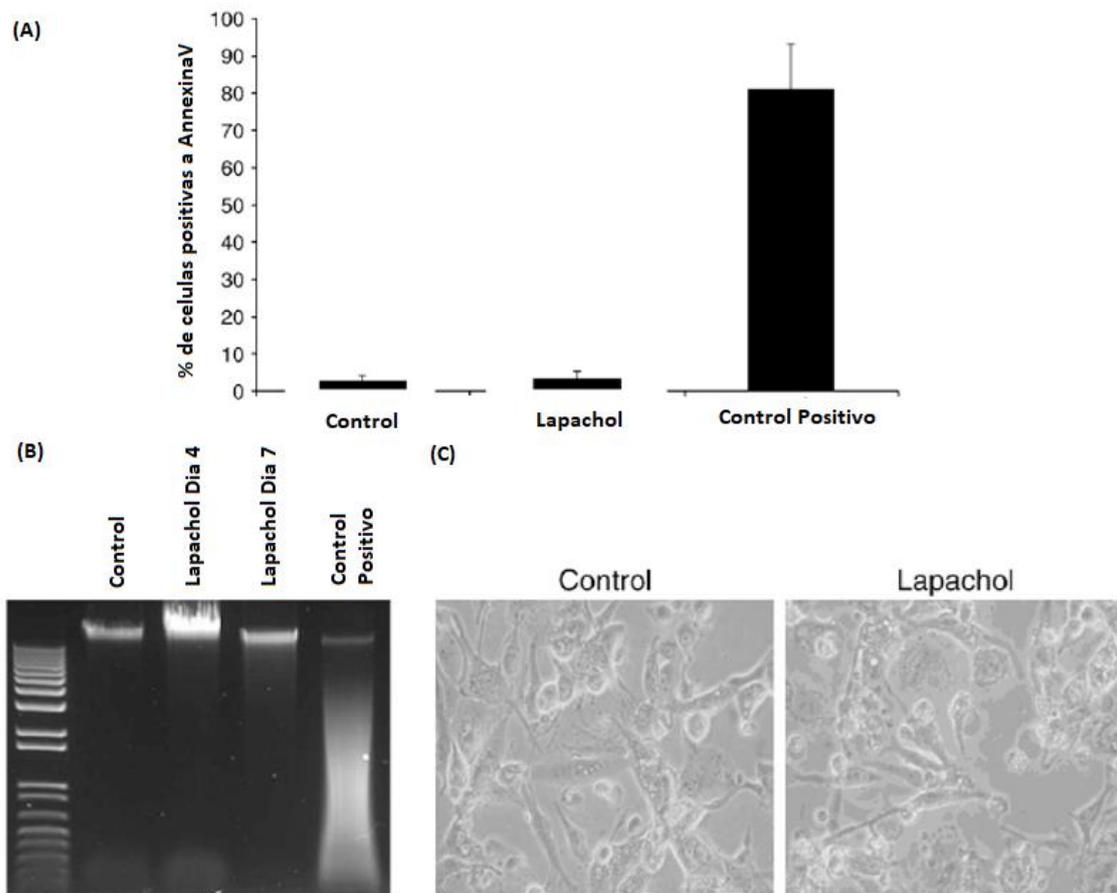


Figura 19. (A) Ensayo de apoptosis por annexinaV en células estimuladas con 32 μg lapachol (B) ensayo de integridad del DNA de MØ's estimulados, (C) comparación morfológica de MØ's en ausencia y presencia de lapachol.

Posteriormente a la determinación de la citotoxicidad, realizaron un ensayo de CMI con el fin de conocer si esta molécula era capaz de disminuir el crecimiento de micobacterias intracelulares, por lo que administraron a un cultivo líquido de *M. avium* una concentración de 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y observaron que esta concentración lograba disminuir el crecimiento de las bacterias, más no el número de bacterias presentes, indicando que el efecto que posee es únicamente bacteriostático y no bactericida².

Debido a este indicio se llevaron a cabo diversos experimentos en donde infectaron MØ's humanos de la línea celular THP-1 con *M. avium* y posterior a la infección, los estimularon agregando lapachol en el medio de cultivo, con el fin de conocer si esto propiciaba una mayor eliminación del patógeno (**figura 20**), pensando en que el efecto que ejerce el lapachol sobre el crecimiento intracelular es debido a una inmunomodulación del MØ, encontrando que además de

disminuir el crecimiento intracelular del bacilo al ser estimulados con 16 y 32 $\mu\text{g/ml}$ de lapachol estos MØ's expresaron en mayor cantidad al receptor R1 del INF- γ en su superficie (**figura 21**), además del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II), cuantificados por citometría de flujo y por medio de ensayos de ELISA determinaron la expresión de citocinas de los MØ's THP-1 y encontraron que disminuyó la expresión de la Interleucina 10 (IL-10), así como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α)².

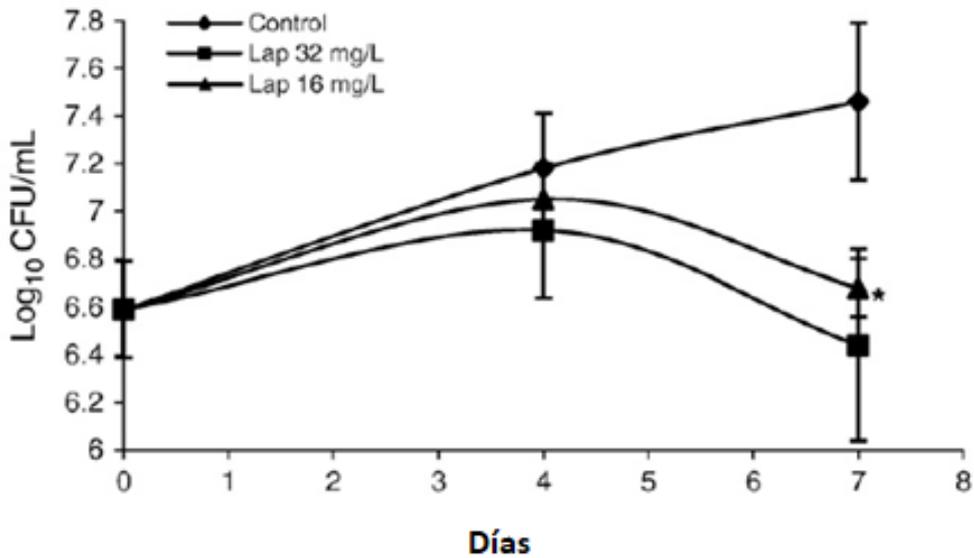


Figura 20. Disminución bacilar intracelular de *M. avium* en macrófagos THP-1 estimulados con 16 y 32 $\mu\text{g/ml}$ de lapachol.

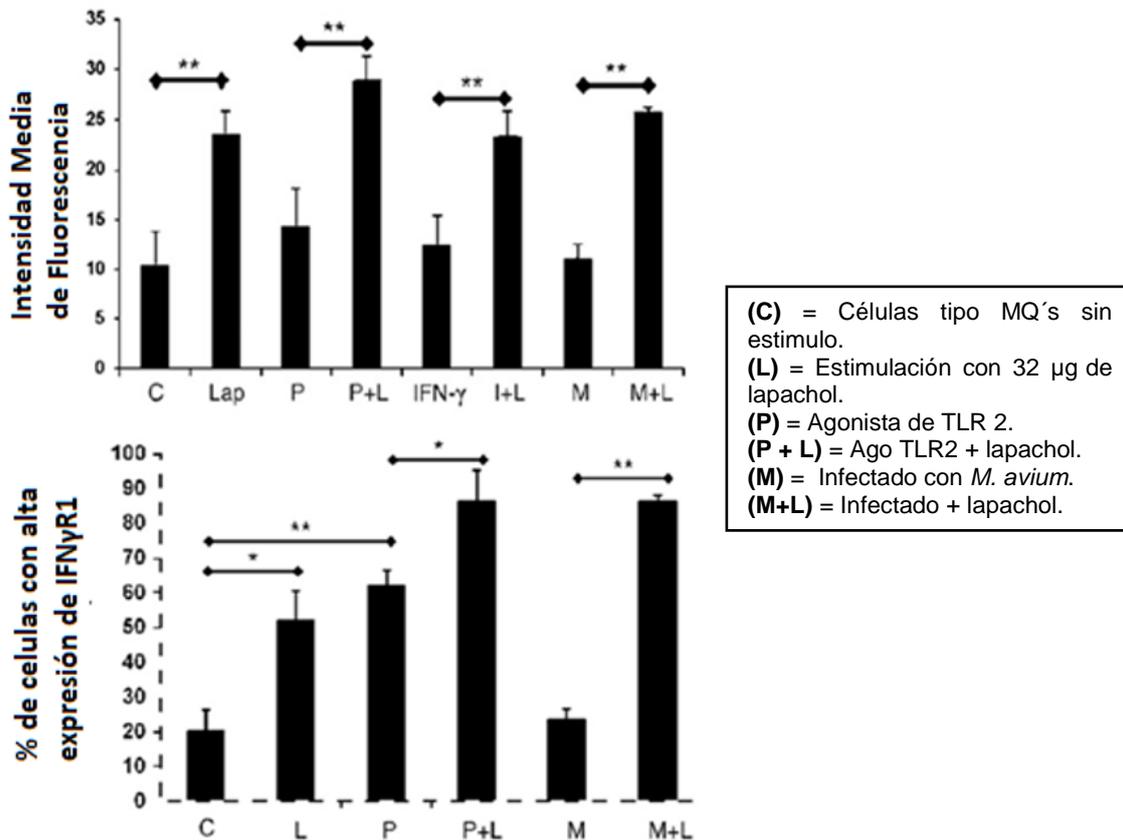


Figura 21. Expresión del MHC II (arriba) y del receptor 1 del IFN γ (abajo) en células estimuladas e infectadas con *M. avium*, determinada por citometría de flujo.

Sin embargo, este artículo es uno de los pocos en donde indagan a profundidad acerca del mecanismo de acción específico involucrado en la eliminación de las micobacterias al utilizarse el lapachol o estimular células con dicho compuesto².

Lapazina

Como ya se comentó anteriormente, proviene de la molécula precursora lapachol (figura 22), pertenece a la familia de las naftoquinonas, su obtención se lleva a cabo por medio de 2 reacciones, partiendo del árbol del lapacho y que se observan en la figura 23³.

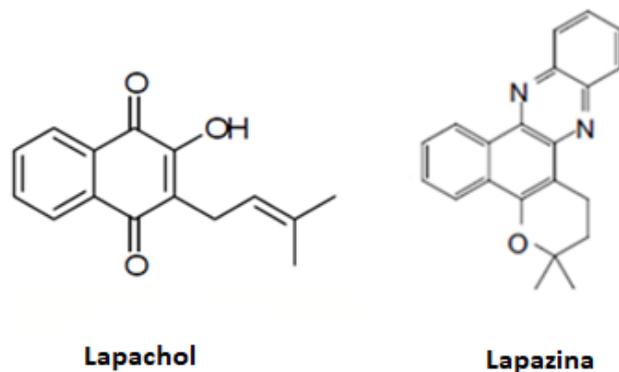


Figura 22. Comparación de la molécula de lapachol y lapazina.

Entre las propiedades que posee, se encuentran poseer baja solubilidad en agua y tener un carácter lipofílico; sin embargo una de las modificaciones de la estructura es para que sea una molécula más polar, esto le confiere una mejor biodisponibilidad para ser degradada dentro del organismo y ejercer un mejor efecto al ser metabolizada, en caso de que así sea el mecanismo de acción³.

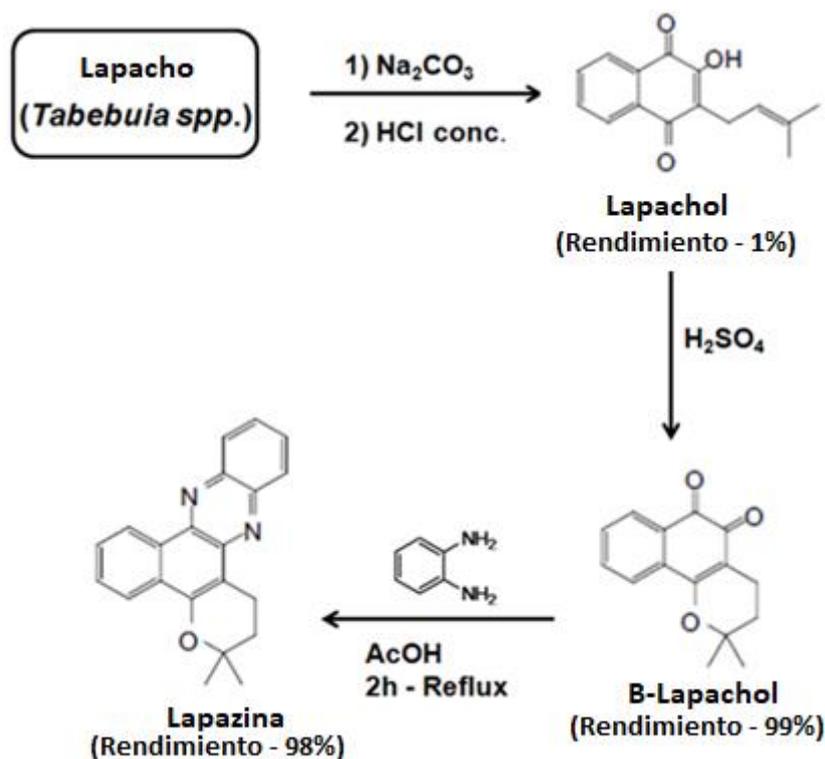


Figura 23. Reacciones químicas para la síntesis de lapazina, 1 y 2 son utilizados para la extracción y separación del lapachol de la materia vegetal, 3 ciclización de la molécula para formar β -lapachol, 4 adición de un grupo de ácido acético.

En experimentos recientemente realizados por el grupo de investigación de Priscilla V. Fino, Mariana M. Longuinho y Suzana G. Leitao de la Universidad Federal de Rio de Janeiro en el 2015, demostraron que la lapazina posee una alta actividad para inhibir el crecimiento de una cepa pansusceptible de *Mtb*; utilizando 3.00 µg/ml en un ensayo de CMI, además de ser aún más efectiva para cepas resistentes a rifampicina utilizando una dosis de 1.56 µg/ml³.

En la actualidad, este es el único indicio que se tiene publicado en la literatura sobre el efecto de esta molécula y dado al gran potencial que demuestra para inhibir el crecimiento de *Mtb*; así como para cepas MDR es necesaria la indagación tanto *in vivo* como *in vitro* sobre los efectos de esta molécula sobre *Mtb*.

Planteamiento del problema

Debido a la problemática mundial que existe en relación a la incidencia, tratamiento y surgimiento de nuevas cepas de TB resistentes a fármacos, así como la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para esta enfermedad, resalta la necesidad de explorar los múltiples efectos que poseen las naftoquinonas para detener el crecimiento de *Mtb.* y saber si la lapazina podría servir como alternativa terapéutica para esta enfermedad.

Hipótesis

Si estimulamos *in vitro* con lapazina a MØ's murinos después de infectarse con *Mtb*; observaremos una disminución en la carga bacilar, además de un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias.

Objetivo general

Evaluar *in vitro* el efecto de la molécula lapazina sobre el crecimiento de 2 cepas de *Mtb.* H37Rv y MDR.

Objetivos particulares

Determinar la CMI de lapazina necesaria *in vitro*, para eliminar o detener el crecimiento de 2 cepas de *Mtb.* (H37Rv y MDR) en un cultivo líquido.

Determinar cuantitativamente por medio de una tinción vital, si la lapazina induce un efecto citotóxico letal sobre MØ's murinos J774.2.

Evaluar si la estimulación con lapazina en el medio de cultivo de MØ's murinos infectados, produce un efecto en la eliminación bacilar de la micobacteria a través de una cinética.

Determinar si la expresión de citocinas, de MØ's infectados durante 1 hora y 24 horas con *Mtb.* y estimulados con 32 µg de lapazina durante 1 hora, induce la expresión de un perfil de citocinas protector.

Metodología

Verificación de la pureza de la cepa.

Con el fin de cerciorarnos de que nuestro cultivo de bacterias se encuentra completamente axénico, se tomó una asada de la cepa de interés (H37Rv y MDR) en medio 7H9 (Becton, Dickinson y Company, Sparks, MD) enriquecido con albúmina, catalasa y dextrosa, se depositó en un portaobjetos limpio, posteriormente se fijó con fenol al 5% en metanol dentro de un GBS3. Una vez seca la muestra, se irradió con luz UV y se fijó por calor. Posteriormente se tiñeron, brevemente: 15 minutos con fucsina fenicada previamente filtrada, se lavaron las laminillas en agua corriente y se les adicionó alcohol-ácido hasta la obtención de un frotis transparente, se contrastaron con azul de metileno previamente filtrado durante 2 minutos y se lavaron con agua corriente. Se dejaron secar y se montaron con resina. Finalmente se observaron al microscopio en el objetivo de 100x, con aceite de inmersión.

Este protocolo, al igual que el de las curvas de crecimiento de las cepas, es realizado en nuestro grupo de investigación en grandes lotes y de manera esporádica para la obtención de las bacterias que se utilizan en diversos experimentos en el laboratorio, por lo que es necesario hacer mención de su metodología, sin embargo para los fines de esta investigación, no son necesarios dichos resultados.

Curvas de crecimiento de las cepas.

Para obtener la cantidad necesaria de bacteria para todos nuestros experimentos, ambas cepas de *Mtb.* (H37Rv y MDR) se crecieron en medio 7H9 enriquecido con ADC. Se pesó 4.7 g del polvo y se disolvió en 900 ml de agua destilada adicionando 5 ml de glicerol y 0.05% de tween 80, posteriormente se esterilizó en una autoclave por 15 minutos a 121°C y se dejó enfriar, dentro de un GBS3 limpio y radiado con UV durante 10 minutos, se le adicionó 100 ml de ADC se mezcló y se fraccionó en botellas de 1 Lt. (Corning™) con cuello

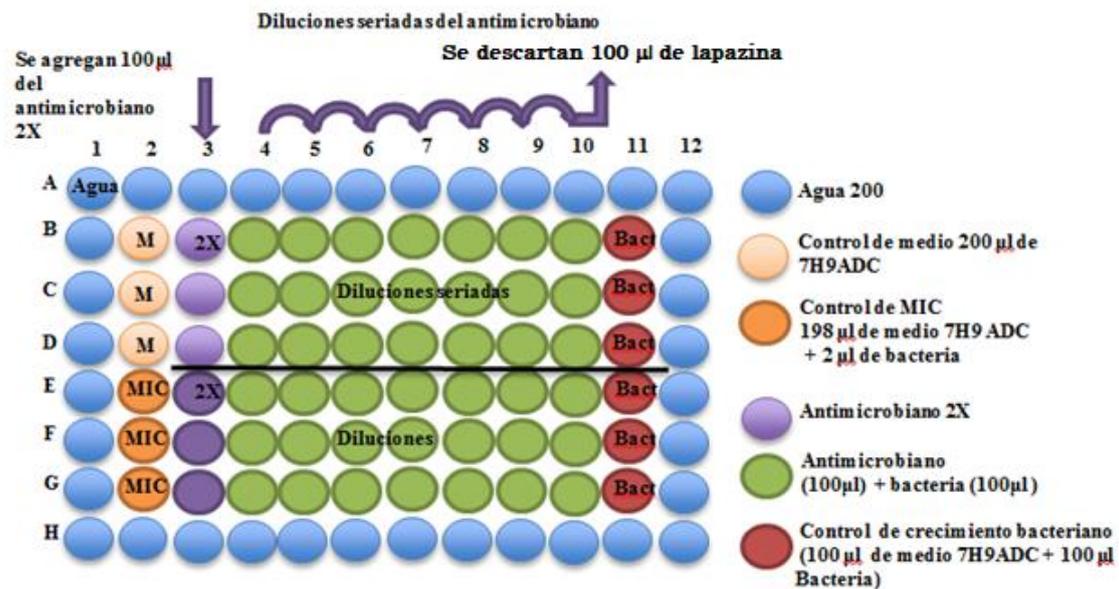
angulado y tapa con filtro, se incubaron con 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas, para comprobar su esterilidad.

Una vez que se confirmó la esterilidad del medio, se prepararon botellas de crecimiento a las que se les colocó 500 µl de bacteria por cada 8 ml del medio en botellas de 100 ml (Corning™) dentro de un GBS3. Se incubaron durante 48 horas con agitación constante a 35°C. Posteriormente se les colocó 4 ml de la bacteria antes incubadas en las botellas de cultivo con 60 ml de 7H9 estéril y se obtuvieron lecturas de absorbancia diariamente a 600 nm hasta obtener una D.O de 0.6 la cual indica la fase logarítmica del crecimiento bacteriano.

Determinación de la CMI

Se realizó una CMI inicial, con los datos que se nos proporcionó al inicio del proyecto, y que en ese entonces no se encontraban publicados, además de que nuestro grupo de investigación no encontró un efecto sobre el crecimiento de nuestras cepas de *Mtb. in vitro* a la concentración que se nos proporcionó, por lo tanto fue necesario determinar en nuestro laboratorio la CMI necesaria de lapazina que utilizaríamos en nuestros protocolos, por lo que en una placa de 96 pozos de fondo plano se llenaron los pozos exteriores con 200 µl de agua estéril, para mantener una humedad constante durante la incubación, en las filas B-G columnas 4-11, se agregó 100 µl de medio de cultivo 7H9 ADC, posteriormente en las filas B-D columna 2 se les colocó 200 µl de medio 7H9, en las filas E-G columna 2 se agregaron 198 µl de medio 7H9 + 2 µl de bacteria, estos pozos nos sirvieron como el control de la CMI (1% de bacteria). A las filas B-D y E-G de la columna 3, se les agregó 100 µl de lapazina doblemente concentrada con 1250 y 625 µg respectivamente (2X) por triplicado y preparada en fresco, se les agregó 100 µl de lapazina 2X a la columna 4 de estas mismas filas con una micropipeta multicanal, se resuspendieron y realizaron diluciones seriadas hasta la columna 10 (1:1) con 100 µl de medio 7H9, en esta última se desecharon los 100 µl sobrantes. Finalmente a las filas B-G columna 3-11 se les añadió 100 µl de la bacteria previamente preparada. La placa se tapó y selló para dejarlas incubando por 24 horas a 35°C. Posteriormente se les agregó 40 µl del reactivo Cell-

Titer96® (AQueous) en oscuridad a los pozos con bacterias. Para la interpretación de este experimento, el color amarillo en los pozos nos indica la ausencia de crecimiento por parte de la bacteria y el color anaranjado y virando a morado, la presencia de crecimiento, por lo tanto, la CMI es definida como la concentración más baja de lapazina que previene el viraje de color de anaranjado a purpura, finalmente se tomó una foto a la placa y se cuantificó la absorbancia en un lector para ELISA a 492nm. El resumen del esquema de este protocolo se puede observar en la **figura 24**.



Bacteria 3×10^5 por pozo
Volumen final 200 µl por pozo

Figura 24. Esquema de la placa del ensayo de CMI.

Determinación de la concentración Inhibitoria 50 (IC 50)

Ya que no conocíamos nada acerca de la citotoxicidad del compuesto, realizamos el ensayo de IC 50 para saber si éste pudiera ser citotóxico para nuestra línea, en dos placas de 96 pozos de fondo en U se sembraron 75,000 MØ's murinos de la línea celular J774.2 en cada pozo en medio RPMI, dicha placa se incubó durante 2 días para obtener un cultivo de 300,000 MØ's por pozo. Se procedió a realizar los siguientes grupos por sextuplicado: tiempo 0 (el cual se fijó inmediatamente), control negativo (DMSO 10%), control positivo (RPMI + SFB al 10%), control de vehículo (DMSO 0.01% + agua estéril + RPMI) y diferentes concentraciones de lapazina comenzando desde los 16 µg hasta los

0.5 µg, cada uno de estos grupos fue tratado durante 1 hora, se les retiró el sobrenadante se realizó 3 lavados y posteriormente una tinción vital con cristal violeta, se fijaron durante 1 hora con una solución de formaldehído al 4% para detener el crecimiento del cultivo y obtener una medición fija de todas las muestras, se cuantificó la absorbancia de cada uno de los pozos con un lector placa de 96 pozos, de las absorbancias obtenidas se realizó un promedio y finalmente se graficaron los resultados. Dado que el cristal violeta difunde a través de la pared celular en las células vivas y no así en las muertas una gran absorbancia nos indicaría que nuestros tratamientos no son tóxicos para las células y una baja absorbancia lo contrario.

Cuantificación por UFC's de la disminución bacteriana intracelular de macrófagos infectados con Mtb. (killing)

Con el fin de conocer si nuestro compuesto pudiera estar ejerciendo algún efecto no directamente sobre la bacteria, sino sobre los MØ's con bacterias ya fagocitadas, se sembraron 2 placas de 96 pozos de fondo plano con 15,000 MØ's de la línea celular J774 en cada pozo, la placa se mantuvo en incubación a 37°C con CO₂ al 5% y en un volumen de 200 µl de medio RPMI + SFB al 10% durante 2 días, para obtener un cultivo de 60,000 MØ's por pozo al tercer día, estos se infectaron durante 1 hora con 2 cepas de *Mtb.* a una MOI 5:1 (300,000 bacterias), se estimularon 3 grupos de MØ's por sextuplicado con: 16 y 32 µg de lapazina, y con 10 µg de LPS, con el microscopio invertido se tomaron fotografías de todos los grupos para observar la confluencia de las células, se realizaron lavados para eliminar el excedente de bacterias no fagocitadas y se les colocó medio RPMI, una de las placas se infectó durante 1 hora, se detuvo la infección realizando lavados, luego se les agrego medio RPMI con 16 y 32 µg de lapazina, esta placa se incubó a 37°C durante 48 horas para utilizarla posteriormente, mientras que la otra se utilizó el mismo día para cuantificar el número de bacterias eliminadas por los MØ's 1 hora después de la infección, antes de este procedimiento se recuperó el sobrenadante de los pozos, para cuantificar la producción de citocinas por parte de los MØ's, se guardó en 3 diferentes placas de 96 pozos de fondo plano, tomando 70 µl para cada placa y sellándolas con parafilm congelándolas a -70° C en un revco. Luego de retirar el sobrenadante a

los MØ's, se les agregó 100 µl de SDS a cada pozo con bacteria y se raspó el fondo durante algunos minutos con la micropipeta para desprenderlos de la placa durante 10 minutos, después se les agregó BSA para terminar la reacción de lisis, se resuspendió la muestra y finalmente se sembró el homogenado en las cajas de petri con medio 7H10, realizando antes 3 diluciones 1:1 de nuestro homogenado concentrado, se realizó un conteo preliminar de las UFC's al día 14 y el conteo final el día 21.

Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

De los sobrenadantes congelados de MØ's del ensayo de killing se realizó una dilución 1:3 para medir la expresión de Interleucina 12 (IL-12) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF). En una placa de 96 pozos se sensibilizaron los pozos a utilizar con el anticuerpo de captura para cada una de las citocinas a evaluar y se dejaron en incubación durante 24 horas a 8°C. Transcurrido el tiempo se desechó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados en todos los pozos con 200 µl de PBS-Tween 1X recientemente preparado, escurriendo entre cada lavado el buffer, en el último lavado, la placa se dejó secar sobre una toalla de papel limpia, una vez secos los pozos se les agregó 200 µl de Assay Diluent (PBS + SFB al 10%) para detener la reacción, posteriormente se sellaron con un plástico protector y se dejaron incubando en agitación y a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrida la hora, se procedió a realizar 3 lavados y en el último se colocó la muestra a analizar la cual se diluyó en Assay Diluent con una relación 1:3 y a un volumen final de 100 µl, en este paso también se preparó la curva estándar por duplicado para cada citocina comenzando por re-suspender el anticuerpo liofilizado en 1 ml de agua estéril.

Para TNF la curva inició con una concentración de 1000 µg/ml de la cual se realizaron 6 diluciones seriadas en distintos tubos eppendorf, hasta obtener una concentración de 15.6 µg/ml. Para IL-12 se llevó a cabo el mismo procedimiento antes descrito con la diferencia de que se partió de una concentración de 4000 µg/ml teniendo en nuestra dilución final una concentración de 62.5 µg/ml, finalmente de cada dilución se agregaron 100 µl en sus respectivos pozos de la curva y se dejó incubando la placa sellada en agitación y a temperatura ambiente

durante 2 horas, se volvió a lavar 5 veces y se procedió a agregar 100 μ l del anticuerpo secundario y la estreptavidina a cada pozo, con un volumen final de 100 μ l. Finalmente se cuantificó la muestra con un lector de placa de 96 pozos y se realizó una extrapolación en relación a la curva estándar, para conocer la concentración de citocina en cada una de las muestras, los resultados se promediaron y se representaron en una gráfica.

Resultados

Concentración mínima inhibitoria

Se determinó la CMI de lapazina para 2 cepas de micobacterias una drogosensible (H37Rv) y otra drogorresistente (MDR). Como ya se había explicado, una coloración amarilla, nos indica la inhibición de la respiración y por lo tanto la inhibición del crecimiento de la bacteria, mientras que un viraje de color de anaranjado a morado, nos indica que la presencia de respiración por parte de la cadena de transporte de electrones y por lo tanto presencia de crecimiento, (**figura 25**). Encontramos que el crecimiento de la cepa H37Rv es inhibido con una concentración de lapazina de 312.5 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para una cepa MDR se necesitan 156.25 $\mu\text{g/ml}$, este último resultado nos resulta muy interesante ya que esta cepa es resistente a antibióticos de primera línea como la isoniazida, pirazinamida y rifampicina, lo que resulta prometedor para el uso del fármaco propuesto en este estudio.

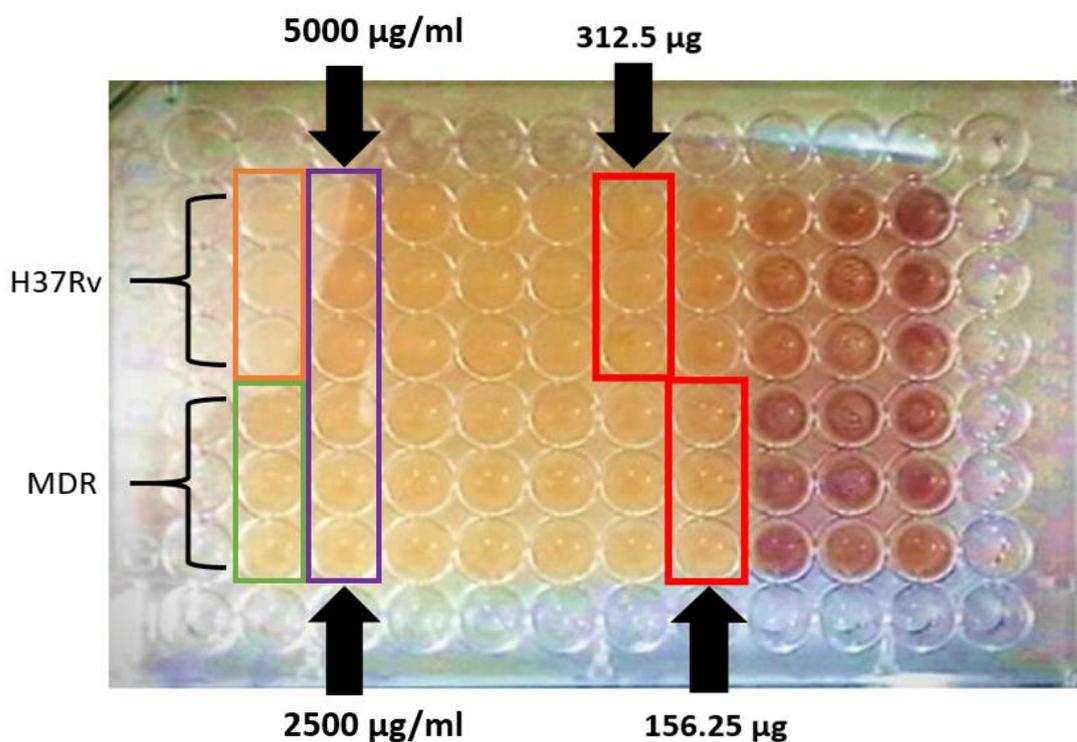


Figura 25. Ensayo de CMI por triplicado, 300,000 bacterias por pozo, el recuadro naranja es nuestro control del medio (7H9ADC), el verde es el control positivo (7H9ADC + 2 μl de bacteria), el morado es lapazina 2X, a partir de la columna morada se realizaron diluciones seriadas 1:1 hasta la penúltima columna, los pozos de color morado indican la presencia de crecimiento y los amarillos la inhibición del crecimiento bacteriano, los recuadros rojos indican la columna en donde se encontró la CMI de lapazina para cada cepa de *Mtb*.

Concentración inhibitoria 50

Luego de determinar la CMI de lapazina necesaria para un cultivo líquido, realizamos el ensayo de IC 50 con el fin de evaluar si el compuesto *per se* podría inducir algún tipo de citotoxicidad en el MØ, para esto se administró directamente a MØ's murinos de la línea celular J774.2 infectados y no infectados, desde una concentración de 16 µg/ml hasta 0.5 µg/ml realizando diluciones seriadas 1:1 de lapazina, sin encontrarse un efecto citotóxico, en comparación con el control positivo (DMSO al 10%) (**figura 26**).

Además, en uno de los experimentos, se elevó la concentración de lapazina cuatro veces (64 µg/mL), para saber si se podrían presentar signos de citotoxicidad, además de evaluar la capacidad de los MØ's para tolerar dicha molécula y así poder administrar diferentes concentraciones, en caso de ser requeridas. Se observó que a esa concentración se disminuyó la absorbancia, lo cual es un indicativo de presencia de células muertas por el efecto citotóxico de la lapazina.

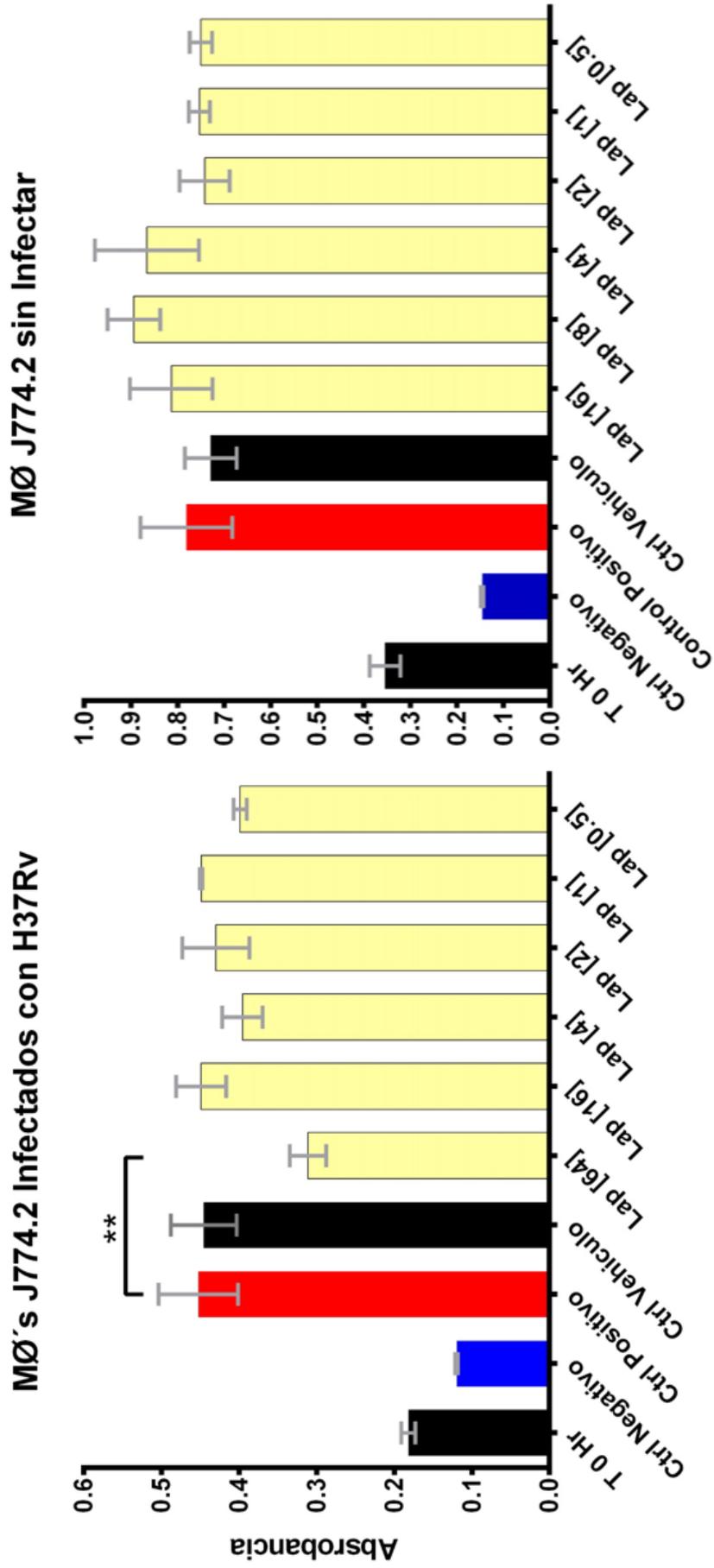


Figura 26. Absorbancias obtenidas por sextuplicado en un lector de placa de 96 pozos, T 0 (MØ's fijados inmediatamente al sembrar), control negativo (MØ's + DMSO 10%), control positivo (MØ's + medio RPMI + SFB), control de vehículo (MØ's + DMSO 0.01% + agua inyectable). ANOVA de 1 vía, valor de $P=0.0013$ $r^2=.772$.

Análisis de la disminución de la carga bacilar intracelular de macrófagos (killing)

Al observar que la lapazina posee un efecto sobre la micobacteria pero induce citotoxicidad a concentraciones elevadas de 64 μg , se decidió realizar un ensayo de killing, probando las concentraciones observadas en otros experimentos con el lapachol (16 y 32 $\mu\text{g/ml}$), encontrándose que para la cepa H37Rv la concentración de 16 $\mu\text{g/ml}$ a las 48 horas, muestra una marcada disminución de la carga bacilar, en comparación con la cepa MDR, en donde este efecto se presentó a la hora después de la infección utilizando 32 $\mu\text{g/ml}$, esto nos sugiere, que el efecto de nuestro compuesto es dosis dependiente para esta cepa, mientras que en el caso de la cepa H37Rv el efecto observado no lo es (**figura 27**).

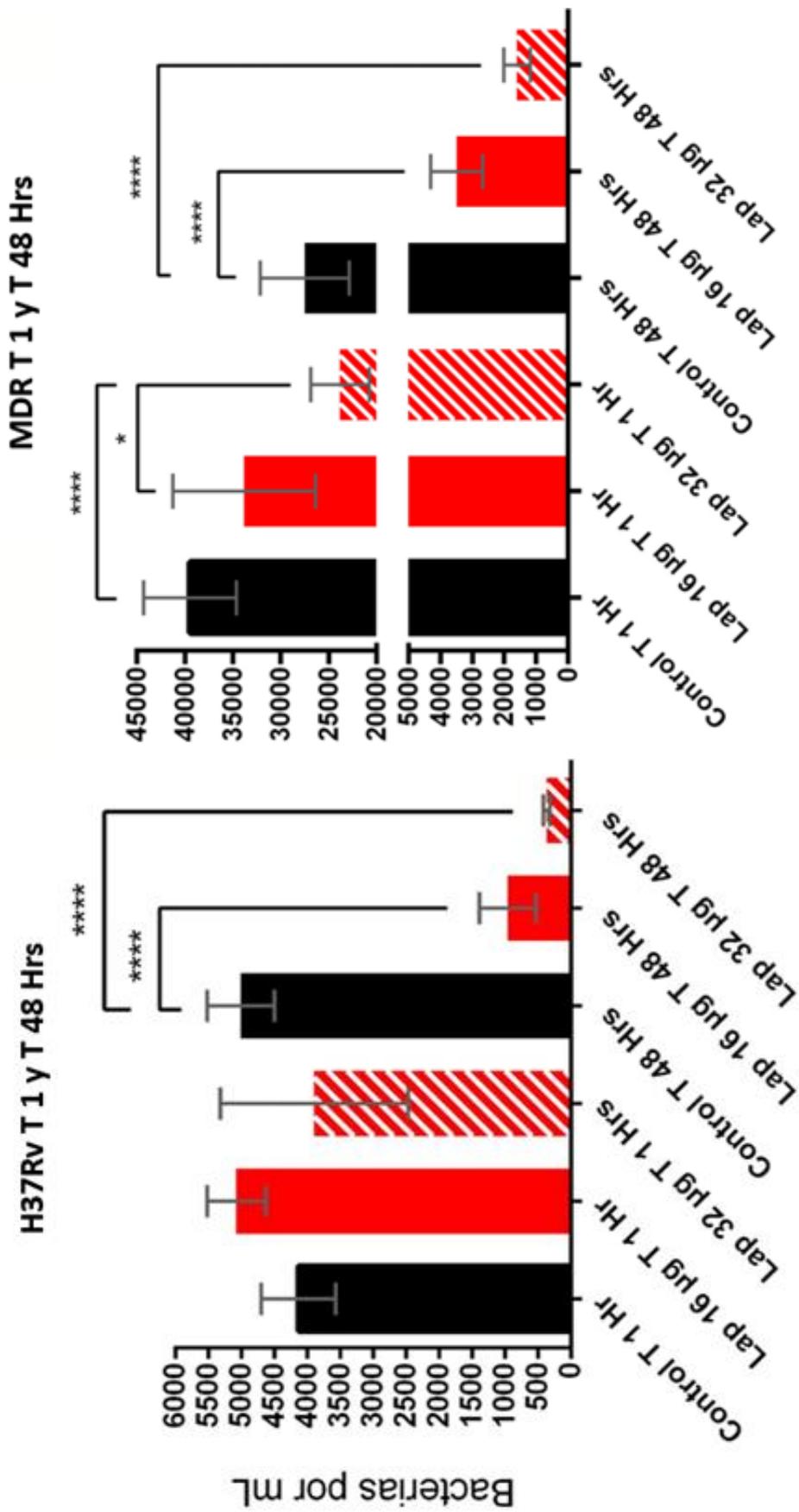


Figura 27. Conteo de UFC's por sextuplicado (n=6), del ensayo de killing, de MØ's infectados durante 1 hora con una MOI 5:1 de *Mtb.* (H37Rv o MDR) y estimulados o no, con lapazina a concentraciones de 16 o 32 µg/ml durante 1 hora. Para ambas graficas se realizó ANOVA de 2 vias $\alpha=0.05$, **** = $P < 0.0001$, * = $P 0.0143$

En la repetición del ensayo se encontró que los MØ's infectados se comportan de manera similar después de ser estimulados durante 1 hora con 16 µg/ml, aquí, el efecto de la eliminación bacilar se observó a las 48 horas después de la estimulación con lapazina en comparación con el grupo control (**figura 28**).

Sin embargo, con el fin de conocer algunos indicios sobre el mecanismo por el cual se eliminan las bacterias a las 48 horas, se recuperó el sobrenadante de los MØ's y se les congeló a -70°C para evaluar la expresión de citocinas.

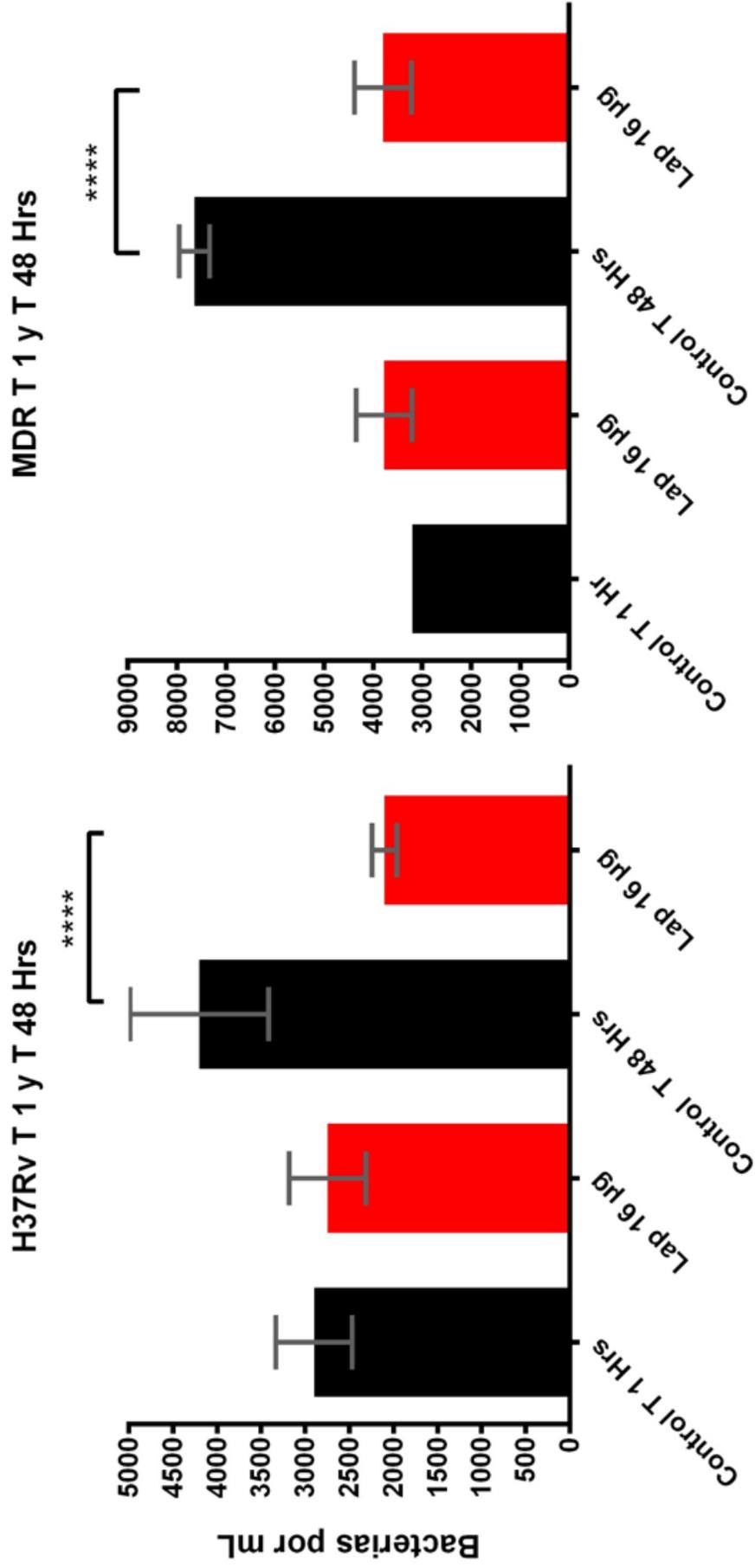


Figura 28. Repetición del conteo de UFC's por sextuplicado (n=6), del ensayo de killing, de MØ's infectados durante 1 hora con una MOI 5:1 de *Mtb*. (H37Rv o MDR) y estimulados o no, con 16 µg/ml lapazina durante 1 hora. Grafica H37Rv ANOVA 1 vía P=0.0046 r²=0.7133, MDR ANOVA de 2 vías α=0.05 P= <0.0001.

ELISA´s de los ensayos de killing

Utilizando los sobrenadantes de la repetición del ensayo de killing para conocer si la eliminación de las bacterias se debía a una sobreexpresión o disminución de alguna citocina excretada por el MØ, analizamos la expresión de 2 de ellas, la IL-12, y el TNF. Se encontró que la IL-12 presentó una mayor expresión en comparación con el grupo control en los grupos estimulados con lapazina, pero con un mismo nivel de expresión que los grupos con LPS, lo que nos indicó que la lapazina posee la capacidad de aumentar la expresión de IL-12 de la misma manera en que lo hacen los LPS (figura 29), así mismo, la expresión de TNF resultó disminuida con el estímulo de lapazina a diferencia del grupo control y con una mayor significancia estadística en comparación con el grupo de LPS (figura 30).

IL-12 de MØ's Infectados con H37Rv y MDR

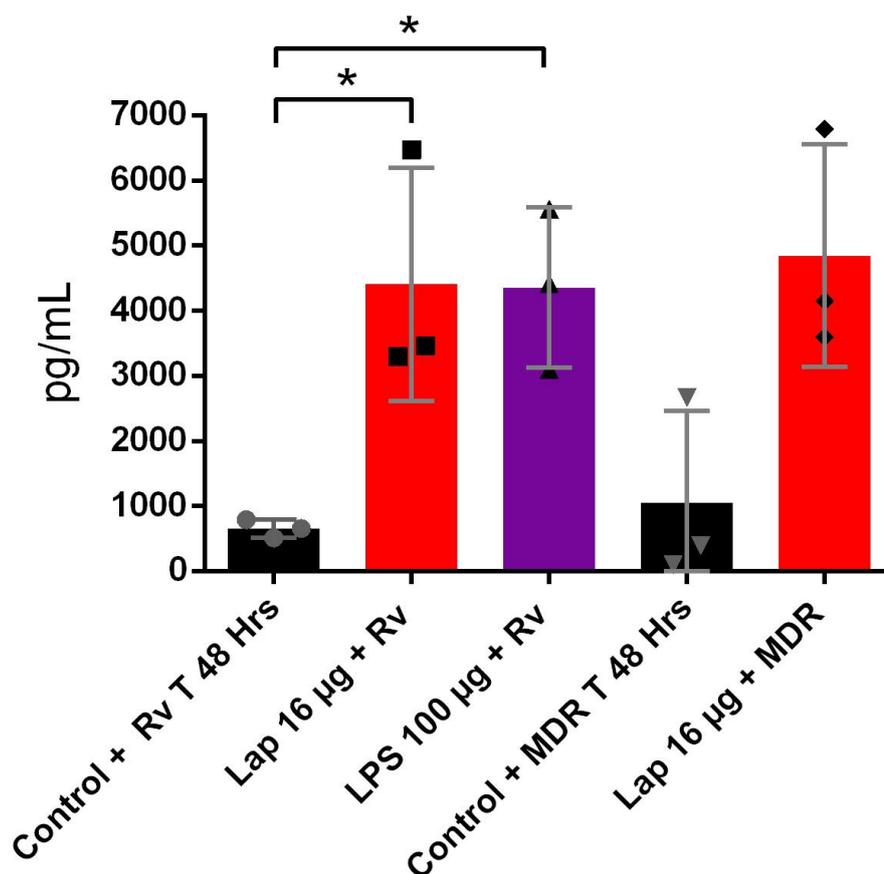


Figura 29. Cuantificación de IL-12 en sobrenadantes de MØ's infectados del ensayo de killing, estimulados o no, con 16 µg/ml de lapazina durante 48 horas y de MØ's infectados y estimulados durante 1 hora con 100 µg de LPS, cada barra representa un promedio de 3 muestras (n=3). Prueba de t, $\alpha=0.05$, $P=0.0223$.

TNF de MØ's Infeccionados con H37Rv y MDR

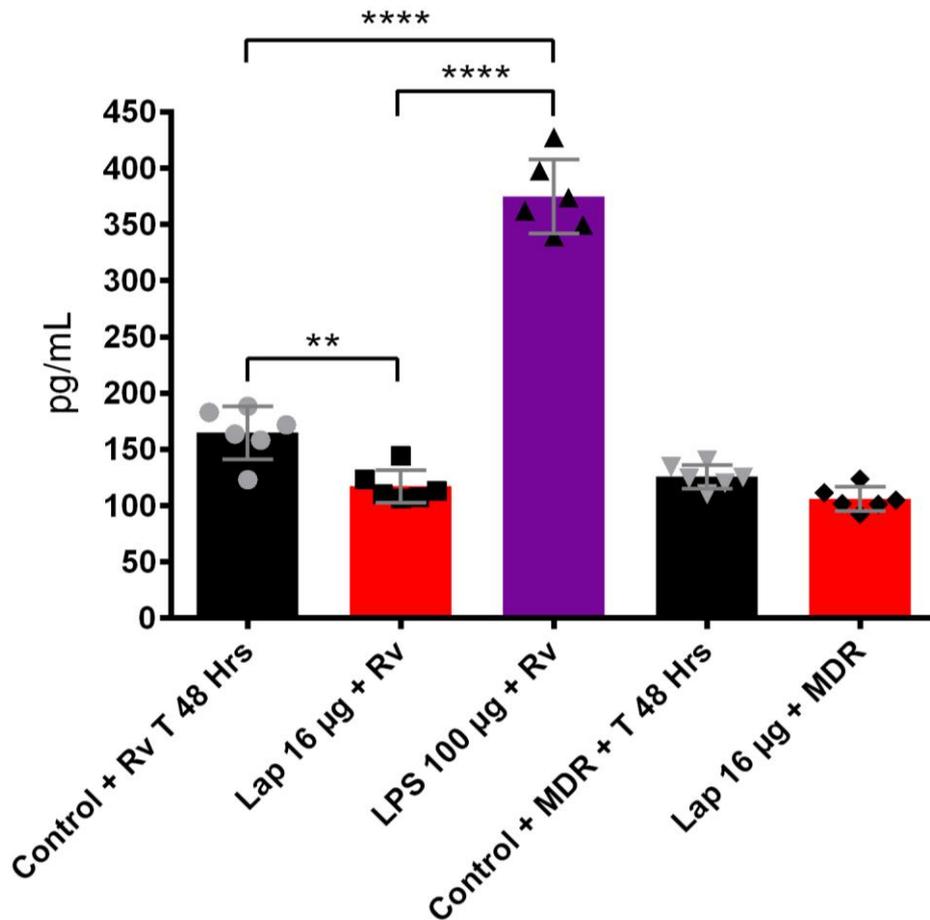


Figura 30. Cuantificación de TNF en sobrenadantes de MØ's infectados del ensayo de killing, estimulados o no, con 16 µg/ml de lapazina durante 48 horas y de MØ's infectados y estimulados durante 1 hora con 100 µg de LPS, cada barra representa un promedio de 6 muestras (n=6). ANOVA 2 vías $\alpha=0.05$, ****= $P<.0001$, **= $P .0017$.

Cinética del ensayo de killing

Al encontrar que estimulando durante 1 hora y 24 horas respectivamente a MØ's murinos con una concentración de lapazina de 16 µg/ml se disminuye la carga bacilar, se propuso realizar la repetición de dichos experimentos evaluando dicha carga, en periodos más cortos de tiempo (es decir a las 0, 4, 8, 12, 18 y 24 horas), con la finalidad de encontrar en qué momento en específico, comienza a observarse la disminución. Esto se realizó debido a que en los ensayos anteriores, el periodo de tiempo en el que se evaluó la carga bacilar fue bastante largo (24 horas), y desconocíamos como se comportaban las cargas bacilares de los MØ's durante todo este lapso. De manera interesante, se encontró que la carga bacilar disminuyó casi en su totalidad con la concentración mencionada, que en comparación con nuestro grupo control, muestra una menor cantidad significativa de bacterias (**figura 31**).

En el caso de la repetición, se observó que la tendencia en la eliminación bacilar fue de manera similar como se observa en la **figura 32**.

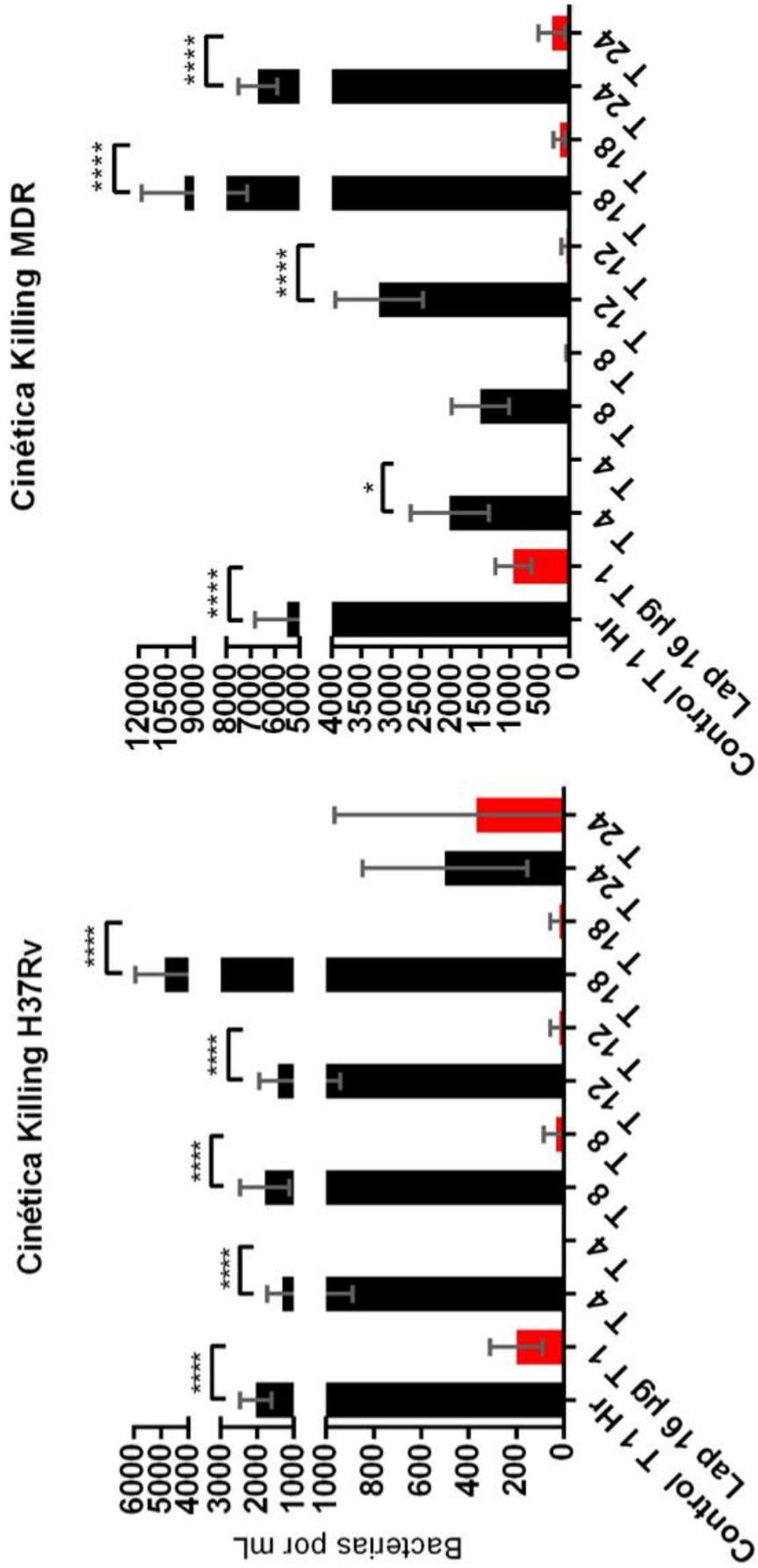


Figura 31. Disminución de las UFC's de MØ's J774.2, infectados con *Mtb.* H37Rv y MDR durante 1 hora, posterior a su estimulación con 16 µg/ml de lapazina durante 1 hora, cada barra representa 6 muestras independientes (n=6) (ANOVA 2 vías $\alpha=0.05$, **** P<0.0001, *= P 0.01).

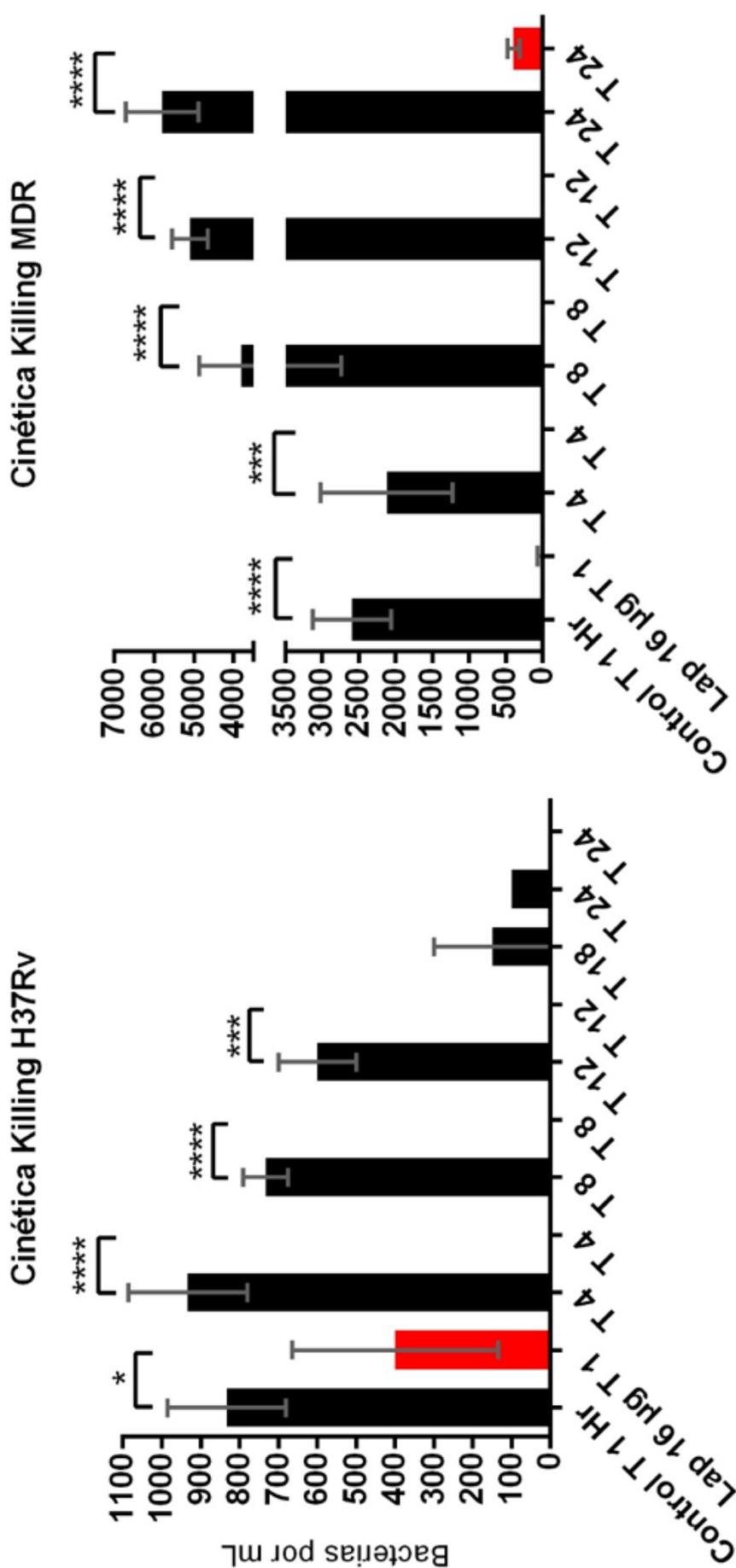


Figura 32. Repetición de la disminución en UFC's de MØ's J774.2, infectados con *Mtb. H37Rv* y MDR durante 1 hora, posterior a su estimulación con 16 µg/ml de lapazina durante 1 hora en los tiempos 1, 4, 8, 12, 18 y 24, cada barra representa 6 muestras independientes (n=6). ANOVA 2 vías $\alpha=0.05$, **** P<0.0001.

Discusión

Este trabajo se realizó con la finalidad de conocer los distintos efectos que la molécula lapazina pudiera poseer *in vitro*, sobre el crecimiento de 2 cepas de *Mtb.*, (H37Rv y MDR), además de evaluar si la estimulación con dicha molécula, ejerce un efecto inmunomodulador sobre MØ's murinos infectados con éstas, obteniéndose los siguientes resultados:

Encontramos que la CMI de lapazina necesaria para inhibir el crecimiento de 300,000 bacterias en cultivo líquido fue de 312.5 µg/ml para la cepa H37Rv, mientras que para la cepa MDR fue de 156.25 µg/ml, a diferencia de lo que reporta el grupo de investigación de Priscilla V. Fino, Mariana M. Longuinho et al; en donde mencionan que son necesarios 3 µg/ml para la cepa H37Rv y 1.56 µg/ml para una cepa MDR⁴, esto podría deberse a que las cepas de *Mtb* que se utilizaron en los ensayos pueden ser distintas entre sí, encontramos concordancia en que se necesita una menor cantidad de lapazina para inhibir el crecimiento de la cepa MDR.

Este resultado es interesante, ya que nos dice inicialmente que la molécula sí posee un efecto bactericida y bacteriostático directo sobre ambas cepas de *Mtb.* y que por lo tanto puede ser considerada como una molécula terapéutica para ser administrada en conjunto con el tratamiento de primera o segunda línea en un modelo murino de TB pulmonar experimental y observar un efecto sinérgico según la cepa que se utilice, con el fin de disminuir el tiempo de duración del esquema de tratamiento que se administra, sin embargo para establecer un esquema de tratamiento a un ratón infectado crónicamente, la cantidad de lapazina necesaria es elevada, por lo que se exploró el efecto que esta molécula puede ejercer en otros mecanismos involucrados en la evolución de esta enfermedad como la inmunomodulación.

Para esto se realizó el ensayo de killing, utilizando una concentración de 16 y de 32 µg/ml, con el fin de evaluar si el estímulo de lapazina a MØ's J774.2 infectados, a una menor concentración que la observada en el ensayo de MIC (156.25 para MDR y 312.5 µg/ml para H37Rv), puede disminuir la carga bacilar con respecto al grupo control contra ambas cepas H37Rv y MDR.

Se encontró que para la cepa H37Rv, ambas concentraciones de lapazina presentaron una disminución significativa de la carga bacilar del homogenado de los MØ's infectados, al realizar el conteo por UFC's a las 48 horas posteriores al estímulo, sin embargo, no ocurrió así después de 1 hora de estimulación. Esto se atribuyó a que una hora de estimulación fue relativamente corta y por ende la disminución se observó hasta las 48 horas.

Además no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de 16 y 32 µg/ml para la cepa H37Rv, lo que nos sugiere que la capacidad de disminuir la carga bacilar no es dosis dependiente para esta cepa.

Para la cepa MDR, encontramos que de manera similar a las 48 horas posteriores al estímulo, la carga bacilar disminuyó drásticamente en comparación al grupo control, además, como ya se había observado con la cepa H37Rv este efecto no es dosis dependiente, sin embargo, se debe destacar que en este ensayo, 1 hora después del estímulo con una concentración de 32 µg/ml se observó un efecto en la disminución de la carga bacilar significativo con respecto al control y a la concentración de 16 µg/ml, indicando que el efecto si es dosis dependiente.

Finalmente esto nos sugiere que el efecto que ejerce la lapazina es por la vía de la inmunomodulación hacia el MØ, ya que el hecho de utilizar una cantidad 10 veces menor o mayor según sea el caso, respecto a lo que nos indicaron los ensayos de MIC y de killing, sugiriendo que la lapazina puede estar estimulando la producción de citocinas o vías de señalización involucradas en la eliminación intracelular del patógeno.

Una duda que surgió sobre este primer ensayo fue ¿la molécula pudiera ser citotóxica para los MØ's?, para conocer esto se determinó la concentración mínima de lapazina a la cual comienza a tener este efecto en la línea celular, encontrándose que en ambas condiciones, tanto MØ's infectados y no infectados, no posee un efecto citotóxico en concentraciones que van de los 0.5 µg hasta los 16 µg/ml, sin embargo como ya se explicó anteriormente, se preparó una solución 4X de lapazina (64 µg/ml), la cual si mostro citotoxicidad para los MØ's murinos.

Posteriormente se realizó la repetición del ensayo de killing, únicamente con la concentración de 16 µg/ml, los resultados fueron muy similares para ambas cepas de *Mtb*. Se encontró que a las 48 horas después del estímulo, la carga bacilar disminuyó en comparación con el grupo control, lo que nos sugiere que la estimulación con lapazina en MØ's murinos ejerce un efecto en la disminución de las UFC's.

En los sobrenadantes se evaluó la expresión de algunas citocinas involucradas en la progresión de la enfermedad (TNF-α e IL-12), encontramos que de los grupos que fueron estimulados con lapazina a 16 µg/ml por 48 horas, se encuentra sobreexpresada la IL-12 en comparación con el control y de una manera similar al efecto que induce nuestro control positivo (LPS), sin embargo los niveles de TNF no se ven modificados en comparación con el control, pero si con nuestro control positivo que era lo que se esperaba. Por lo que esto nos sugiere que la eliminación de la carga bacilar por el estímulo de lapazina es debida a la producción de IL-12, indicando que posee un efecto inmunomodulador directo en los MØ's murinos.

Pensando en estos últimos resultados, nos surgió la duda de ¿En qué momento en particular, se lleva a cabo la eliminación bacilar dentro de los MØ's infectados? Por lo que se realizó una cinética de killing, abarcando tiempos intermedios que fueron 1, 4, 8, 12, 18 y 24 horas posteriores al estímulo con lapazina, ya que en nuestros ensayos de anteriores de killing únicamente evaluamos el tiempo 1 y 24 horas. En este ensayo se encontró que la carga bacilar de los MØ's infectados 1 hora después del estímulo, se abatió casi por completo, además esta tendencia se mantiene a través de la cinética, para ambas cepas de *Mtb*.

Exclusivamente para la cinética con H37Rv a las 24 horas de estimulación, se observó que las UFC's aumentaron ligeramente, en comparación con los demás grupos estimulados en la cinética, sin embargo, al observar la desviación estándar de este grupo, el aumento de las UFC's podría explicarse debido a una única muestra que se sale de la normalidad en que se distribuyen nuestros datos, ya que de las 6 muestras que constituyen a ese resultado, 4 de ellas son ausencia de bacterias, 1 corresponde a 200 bacterias, y la restante presenta

1600 bacterias, es por eso que la desviación es bastante grande y no presenta diferencia significativa con respecto al control, así mismo, observamos una disminución drástica de bacterias en nuestro control en ese mismo tiempo, para esto último proponemos que podría deberse a una carencia de medio de cultivo RPMI ya que después de estar 24 horas en incubación hemos observado que el volumen total de nuestros cultivos disminuye mientras más tiempo permanezcan incubadas las placas, esto conlleva a la muerte de algunos macrófagos, liberando las bacterias en su interior y finalmente disminuyendo las UFC's de nuestro grupo control, además al comparar en nuestros otros ensayos en cinética la tendencia de nuestros grupos control nos indica que esta se mantiene a lo largo de los periodos de incubación e inclusive suelen aumentar las UFC's mientras más tiempo permanezcan incubadas.

Para la cinética con la cepa MDR, observamos un comportamiento similar en comparación con la cinética con H37Rv en los grupos estimulados con lapazina, es decir, una casi nula presencia de UFC's desde la hora del estímulo y hasta las 24 horas, dicho resultado nos sugiere que el estímulo de 16 $\mu\text{g/ml}$, es suficiente para eliminar la carga bacilar dentro de los MØ's infectados para ambas cepas de *Mtb*. desde una hora posterior al estímulo, sin embargo, en este ensayo encontramos una discrepancia con nuestros experimentos anteriores de killing, en donde únicamente observamos una disminución de la carga bacilar una hora después de utilizar una concentración de 32 $\mu\text{g/ml}$ de lapazina contra la cepa MDR, dicha diferencia la atribuimos a que la preparación de la lapazina utilizada en los primeros experimentos de killing, en comparación a los realizados en cinética, mejoró, con base a la experiencia que se adquirió a lo largo del trabajo con la molécula entre los experimentos. En los primeros experimentos de killing, se preparaba con varios días de anticipación, además de que la solución de lapazina no se disolvía en su totalidad, a diferencia de los experimentos en cinética, en donde se preparó en fresco y el compuesto si se disolvió en su totalidad. Dicha diferencia, podría generarnos una pérdida en la actividad de nuestra molécula, lo que explicaría porque el efecto únicamente se observa con una mayor concentración (32 $\mu\text{g/ml}$) y hasta las 48 horas después del estímulo y no así como en la cinética, que el efecto es observable 1 hora después de la estimulación.

En la repetición de dicha cinética, observamos un comportamiento similar en cuanto a la capacidad de eliminar bacterias intracelulares por parte de los MØ's estimulados para ambas cepas de *Mtb.* específicamente con H37Rv, el efecto se observó a través de toda la cinética, eliminando nuevamente y casi en su totalidad el crecimiento bacilar, sin embargo, cabe señalar que este efecto no puede ser comparable con nuestros grupos controles de las 18 y 24 horas, debido a una disminución de las UFC's, aunque no nos queda claro en su totalidad a que se debió esto, en nuestra experiencia por parte del grupo de investigación, hemos observado que en ensayos *in vitro*, el título de bacterias con el que se infecta a los MØ's, es bastante importante para mantener la presencia de bacterias en los tiempos más largos del estudio y como se observa desde nuestro control, esta cinética para H37Rv, se fue con un título bajo, por lo que proponemos que debido a esto, en los tiempos de 18 horas y 24 horas la infección pudo ser controlada por los MØ's por algunos de los tantos mecanismos que poseen los MØ's para contener la enfermedad como ya se describió en el marco teórico y por lo tanto, el efecto que induce la lapazina no pudo ser observable.

A sí mismo, en la repetición de la cinética con la cepa MDR, los resultados también fueron similares, encontrando que efectivamente, la lapazina favorece la disminución de la carga bacilar hasta llevar las cuentas a 0 desde la hora de estimulación y hasta las 24 horas, así mismo podemos observar que en nuestro grupo control al tiempo de 24 horas, la carga bacilar se incrementó, casi al doble, en comparación con nuestro control en el tiempo 1 hora, esto nos resultó interesante debido a que el tiempo de división que poseen las micobacterias oscila entre las 18 a las 26 horas (en medio enriquecido para su crecimiento)³⁸, lo que podría sugerirnos que en tiempos largos de infección e incubación como en este experimento, el aumento en la carga bacilar de nuestros grupos controles podría deberse a la replicación de algunas micobacterias dentro de los MØ's infectados.

Agradecimientos

Le agradezco a la UNAM y al INCMNSZ por abrirme las puertas y depositar su confianza para desarrollar el trabajo que aquí presento, así como a todos los investigadores que participaron de manera directa e indirecta en este trabajo, por haber compartido el conocimiento, así como reactivos que se necesitaron en los experimentos.

Referencias

1. World Health Organization (2016). Global Tuberculosis Report.
2. Renato A.S. Oliveira, Azevedo-Ximenes E., Luzzati R. y C. Garcia R. (2010). The hydroxy-naphthoquinone lapachol arrests mycobacterial growth and immunomodulates host macrophages. *International Immunopharmacology*, 1463 – 1473.
3. Narjara Silveira, et. Al. (2016). Synthesis and characterization of the antitubercular phenazine lapazine and development of PLGA and PCL nanoparticles for its entrapment. *Materials Science and Engineering, C*. 58, 458 - 466.
4. Kumagai Y., Shinkai Y., Miura T., Cho AK. (2012). The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 10: 221 - 247.
5. Jorge R. Alonso (2000). El lapacho, *Revista de Fitoterapia*; 1 (2): 107 – 117.
6. Rosa Nelly Cantú González, et. Al. (2012). Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *Biológicas*, Diciembre, 14 (2): 48 – 56.
7. Zarir F. Udawadia, Rohit A. Amale Kanchan K., Ajbani Camilla Rodrigues (2014). Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India. *Clin. Infect. Dis.* 54 (4): 579 - 581.
8. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller (2006). *Microbiología médica*. 5^{ta} edición; Elsevier España, 963 pages.
9. Koch ML, Cote RA. (1965). Comparison of fluorescence microscopy with Ziehl-Neelsen stain for demonstration of acid-fast bacilli in smear preparations and tissue sections. *Am. Rev. Respir. Dis.* 91: 283 – 284.
10. Universidad de la República Facultad de Medicina Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*; 2^{da} edición; 381 - 399.
11. Rook, G.A.W. y Hernandez-Pando, R. (1996). The Pathogenesis Of Tuberculosis. *Ann. Rev. Microbiol.* 50, 259 - 84.
12. Ministerio de Salud de la Nación. *Enfermedades infecciosas Tuberculosis Diagnostico de Tuberculosis*. Guía para el equipo de salud Nro. 3; 2^{da} edición; (2009) pag. 5 - 7.
13. Fanlo P. Tiberio G. (2007). Extrapulmonary Tuberculosis; *An. Sis. Sanit.; Navar*; 30, 143 - 162.
14. Basaraba RJ. (2008). Experimental tuberculosis: the role of comparative pathology in the discovery of improved tuberculosis treatment strategies. *Tuberculosis*; 88 (Suppl. 1): S 35 – 47.
15. Ian M. Orme, Randall J. Basaraba RJ. (2014). The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Seminars in Immunology*, 26, 601 - 609.

16. Kaufmann SH, McMichael AJ. (2005). Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med.* May; 11 (5): 578.
17. Joel D. Ernst (1998). Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* Apr; 66 (4): 1277 – 1281.
18. Jean Pieters (2008). *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host & Microbe*, Volume 3, Issue 6, 12 June, Pages 399 - 407.
19. JoAnne L. Flynn, John Chan (2003). Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Current Opinion in Immunology*, Volumen 15, Issue 4, August, Pages 450 - 455.
20. Stefan H. E. Kaufmann, et. Al. (2017). Determinants of Phagocytosis, Phagosome Biogenesis and Autophagy for *Mycobacterium tuberculosis*. *Wiley Online Library*, 18 September.
21. Grange JM, Gibson J, Osborn TW. et. Al. (1983). What is BCG? *Tubercle*; June, Volumen 64: Issue 2, pages 129 – 39.
22. Clemens JD, Chuong JJH, Feinstein AR. (1983). The BCG controversy: a methodological and statistical reappraisal. *JAMA*; 249: 2362 – 2369.
23. Rosenthal SR, Loewinsohn E, Graham ML, et Al. (1961) BCG vaccination against tuberculosis in Chicago: a twenty-year study statistically analyzed. *Pediatrics*; 28: 622 – 41. 32.
24. Rosenthal SR, Loewinsohn E, Graham ML, et Al. (1961). BCG vaccination in tuberculous households. *Am. Rev. Respir. Dis*; 84: 690–704.
25. Gelband H. (1999). Regimens of less than six months for treating tuberculosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 4, 25 October.
26. C. Robert Horsburgh, Jr., M.D. Clif, et. Al. (2015). Treatment of Tuberculosis, *N. Engl. J. Med.* 2015; 373:2149-2160, Nov. 26.
27. Zhang Y, Heym B. (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* *Nature*. Aug 13; 358 (6387): 591 - 3.
28. F. G. Winder, P. B. Collins (1970). Inhibition by Isoniazid of Synthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of General Microbiology*, 63, 41 - 48.
29. Anastasia S. Kolyva and Petros C. Karakousis (2012). Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance. *Infectious Disease, InTech*. February 15.
30. Zhenkun Ma, Christian Lienhardt, et. Al. (2010). Global tuberculosis drug development pipeline: The need and the reality. *Volume 375, No. 9731, Pag. 2100 – 2109.*
31. Wade MM., Zhang Y. (2004) Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci.* Jan. 1; 9: 975 - 94.

32. Zhang Y, Wade MM., Scorpio A. et. Al. (2003). Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. J. Antimicrob. Chemother. Nov.; 52 (5): 790 – 5, Epub Oct 16.
33. Samuel C.Hooker (1893), The constitution of lapachol and its derivatives. Centro Federal de Educacao Tecnologica do Rio de Janeiro, Journal of the Chemical Society, Transactions 1896, Volume 69.
34. Marcano D, Hasegawa M. (2002). Naftoquinonas. Fitoquímica orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela, Venezuela. Pag. 209 – 211.
35. Riffel A. Medina LF. Stefani V. Santos RC. Bizani D. Brandelli A. (2002). *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1 – 4 naphthoquinones. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 35: 811 - 818.
36. Rangappa S. Keri, Siddappa A. (2014). Patil, Quinoline: A promising antitubercular target, Biomedicine & Pharmacotherapy, 29 Oct 68 (8): 1161 – 1175.
37. Valter F. de Andrade-Neto, et. Al. (2004). Antimalarial activity of phenazines from lapachol, B-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters: 14, Pag. 1145 – 1149.
38. Wendy P Gill. et. al. (2009). A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med. Feb; 15(2): 211–214.