



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Evaluación del efecto inmunoterapéutico de las micropartículas de almidón y los péptidos del factor de transferencia en ratones con tuberculosis

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Alejandra Elizabeth Barrera Rosales

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta

Catedrática CONACyT. Instituto de Investigaciones Biomédicas

COMITÉ TUTOR:

Dra. Romina Ma. de la Paz Rodríguez Sanoja Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando Instituto Nacional de Ciencias Médicas y  
Nutrición "Salvador Zubirán"

Ciudad de México, agosto de 2020



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.

# **EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO DE LAS MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN Y LOS PÉPTIDOS DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA EN RATONES CON TUBERCULOSIS.**

## **Agradecimientos**

Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta, y el desarrollo fue supervisado por el comité tutor conformado por la Dra. Romina Rodríguez Sanoja y el Dr. Rogelio Hernández Pando. Agradezco enormemente a cada uno de ustedes por su tiempo y atención.

Este proyecto se desarrolló en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con apoyo del proyecto PAPIIT IN216419, CB A1-S-14446 y CONACyT A1-S-9849, así como en la sección de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, con apoyo de Fronteras de la Ciencia de CONACyT Fon Inst./58/2016. Agradezco a ambas sedes y al apoyo recibido por parte de los programas mencionados.

Agradecimiento al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por la ayuda otorgada para asistir a congresos.

La autora recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de Maestría en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con el número de becario 894774.

Agradecimiento al jurado asignado, por cada observación y sugerencia para enriquecer este trabajo.



CGEP/PMDCBQ/706/20220

**Barrera Rosales Alejandra Elizabeth**  
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas  
**P r e s e n t e**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 09 de marzo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Evaluación del efecto inmunoterapéutico de las micropartículas de almidón y los péptidos del factor de transferencia en ratones con tuberculosis**", dirigida por el/la Dr(a). **Moreno Mendieta Silvia Andrea**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado Integrado por los doctores:

PRESIDENTE	López Vidal Yolanda
VOCAL	Mancilla Jiménez Raúl
VOCAL	Sánchez Esquivel Sergio
VOCAL	Mata Espinosa Dulce
SECRETARIO	Espitia Pinzón Clara Inés

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 09 de marzo de 2020

**Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**  
**COORDINADORA**

## **Dedicatoria**

A mi familia por su amor y apoyo total e incondicional. Ustedes me enseñan la luz en el camino en cada momento. Me enseñaron las bases para ser perseverante y luchar por alcanzar mis metas. Gracias por estar ahí siempre y darme fuerza.

A la Dra. Silvia Andrea, estoy sumamente agradecida y siempre se lo expresaré. Su constante atención y el enriquecimiento que surge de cada sesión, son la pieza clave para las metas que hemos logrado.

A mis queridos amigos: Viru, Mile, Cha, Arge, Angye, que me escucharon en cada momento con toda su paciencia y cariño. Doy gracias por tenerlos presentes en mi vida.

A mis amigos del INCMNSZ, principalmente a Iris, Rafa, Su, Vasti, Octa, Ilse, Manu y Jacquie Lara, cada momento en el lab, en cada mudanza o viaje, su amistad y apoyo hicieron la diferencia.

Dan, Nat, Joce y mis amigos del lab en Biomédicas, gracias por siempre estar presentes. Nos esperan muchas aventuras por delante.

Irri y Tai, gracias por hacerme sentir como parte de una familia (desde antes de la pandemia). Los quiero mucho, roomies.

A todos mis amigos que me apoyaron en estos dos años, por cada palabra de aliento y cariño.

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja y al Dr. Rogelio Hernández Pando, les agradezco por permitirme estar en sus laboratorios y por sus valiosos comentarios en cada sesión de trabajo y seminarios.

# EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO DE LAS MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN Y LOS PÉPTIDOS DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA EN RATONES CON TUBERCULOSIS.

## Contenido

---

LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
2. ANTECEDENTES	7
2.1 INMUNOTERAPIA	7
2.2 TUBERCULOSIS	9
2.2.1 Tratamiento con antibióticos	11
2.2.2 Inmunoterapia en la enfermedad	13
2.3 USO DE SISTEMAS PARTICULADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA TB	16
2.3.1 Aplicaciones de las Micropartículas de almidón (MPAs) en el MRTPP	17
2.4 PÉPTIDOS INMUNOTERAPÉUTICOS	19
2.4.1. Aplicaciones de los péptidos del factor de transferencia (PFTs) en el MRTPP	22
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	24
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
5. MATERIALES Y METODOLOGÍA	25
5.1 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LOS PFTs	25
5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL E INFECCIÓN	26
5.2.1 FASE EXPERIMENTAL 1	27
5.2.2 FASE EXPERIMENTAL 2	28
5.3 DETERMINACIÓN DE CARGA BACILAR EN PULMÓN	30
5.4 DETERMINACIÓN DE ÁREA AFECTADA POR NEUMONÍA Y GRANULOMAS	31
5.5 INMUNOHISTOQUÍMICA	31
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
6. RESULTADOS	33

6.1 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	33
6.2 FASE EXPERIMENTAL 1	38
6.2.1 SUPERVIVENCIA	38
6.2.2 CARGA BACILAR EN PULMÓN	39
6.2.3 PRESENCIA DE NEUMONÍA	40
6.2.4 GRANULOMAS	41
6.2.5 INMUNOHISTOQUÍMICA	43
6.2 FASE EXPERIMENTAL 2	45
6.2.1 SUPERVIVENCIA	45
6.2.2 CARGA BACILAR EN PULMÓN	48
6.2.3 PRESENCIA DE NEUMONÍA	50
7. DISCUSIÓN	52
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	57
8.1 CONCLUSIONES	57
8.2 PERSPECTIVAS	58
9. BIBLIOGRAFÍA	58

## LISTA DE FIGURAS

---

	Pág
<b>Figura 1.</b> Efecto de la administración de MPAs como refuerzo y adyuvante de la vacuna BCG.	19
<b>Figura 2.</b> Obtención y composición del FT.	22
<b>Figura 3.</b> Efecto inmunoterapéutico de los PFTs por vía intraperitoneal (i.p) 3 y 4 meses después de la infección con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	24
<b>Figura 4.</b> Diseño experimental y distribución de grupos de la fase 1.	27-28
<b>Figura 5.</b> Diseño experimental y distribución de grupos de la fase 2.	29-30
<b>Figura 6.</b> Curva de supervivencia frente a la infección con la cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Stanford. Fase experimental 1.	39
<b>Figura 7.</b> Carga bacilar en pulmones al primer mes post-tratamiento. Fase experimental 1.	40
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de neumonía en ratones infectados con la cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Stanford. Fase experimental 1.	41
<b>Figura 9.</b> Número y área de granulomas para cada grupo experimental a los 2 meses post-tratamiento.	42
<b>Figura 10.</b> Análisis de citocinas por inmunohistoquímica.	44
<b>Figura 11.</b> Resumen de resultados de la primera fase experimental.	45
<b>Figura 12.</b> Curva de supervivencia frente a la infección con la cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Stanford. Fase experimental 2.	46
<b>Figura 13.</b> Curva de supervivencia frente a la infección con la cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Stanford tras la inmunosupresión.	48
<b>Figura 14.</b> Carga bacilar en pulmones al primer mes post-tratamiento y posterior a la inmunosupresión. Fase experimental 2.	49
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de neumonía en ratones infectados con la cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Stanford. Fase experimental 2.	50
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de neumonía en ratones infectados con la cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Stanford, tras la inmunosupresión.	51
<b>Figura 17.</b> Resumen de resultados de la segunda fase experimental.	52



## LISTA DE TABLAS

---

	Pág
<b>Tabla 1.</b> Tipos de inmunoterapia.	8
<b>Tabla 2.</b> Antibióticos contra tuberculosis y su mecanismo de acción.	12
<b>Tabla 3.</b> Sistemas particulados evaluados como inmunoterapia por vía parenteral en ratones con TB.	17
<b>Tabla 4.</b> Sistemas particulados evaluados como inmunoterapia por vía inhalada en animales con TB.	17
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos primarios usados para la inmunohistoquímica.	33
<b>Tabla 6.</b> Resultados del análisis <i>in silico</i> de la estructura primaria.	34
<b>Tabla 7.</b> Análisis BLAST para las secuencias de los péptidos del factor de transferencia. A) General y B) Restringido a Mtb.	35-36
<b>Tabla 8.</b> Análisis de unión a MHC.	37
<b>Tabla 9.</b> Número de ratones inicial y final para cada grupo, durante la inmunosupresión.	47

## RESUMEN

---

La tuberculosis (TB) es una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial ocasionada por un agente infeccioso, el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. El tratamiento contra la TB consiste en la administración de antibióticos durante largos periodos de tiempo que oscilan entre los 6 y los 24 meses dependiendo del nivel de resistencia de la micobacteria causante de la infección. Este tiempo tan largo de tratamiento además de generar efectos secundarios adversos como la hepatotoxicidad, conlleva al abandono prematuro de la terapia, lo que a su vez es un factor que favorece la generación de cepas resistentes a fármacos. El uso de la inmunoterapia como complemento del tratamiento convencional, bien para acortarlo o para disminuir los efectos adversos que éste ocasiona, es una alternativa prometedora que busca mejorar la respuesta inmune durante la infección. En el modelo en ratón de tuberculosis pulmonar progresiva (MRTPP) se ha evaluado el efecto de la inmunoterapia con compuestos naturales, citocinas y péptidos. Así mismo se ha evaluado en este modelo el efecto inmunoestimulante de micropartículas de almidón (MPAs) administradas como refuerzo o adyuvante de la vacuna BCG y el efecto protector de péptidos del factor de transferencia (PFTs). En este trabajo se evalúa por primera vez el efecto inmunoterapéutico de ambas moléculas contra la infección con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, tanto en conjunto como por separado por vía intranasal y bajo dos esquemas de administración con y sin antibiótico.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

La tuberculosis pulmonar es la décima causa mundial de muerte y la primera por enfermedades infecciosas. En el 2018 se reportaron 10 millones de nuevos casos y 1.5 millones de decesos (Reporte Global de Tuberculosis. OMS, 2019).

Se han realizado múltiples esfuerzos para disminuir estos números, buscando prevenir y combatir la enfermedad con alternativas para mejorar la vacuna BCG, así como para optimizar el tratamiento con los antibióticos ya existentes. La vacunación con BCG resulta en una eficiente protección de hasta el 90% para neonatos y menores de 5 años de edad. No obstante, en adultos se ha observado una protección muy variable, entre 0 al 80% (Martín, 2005; Gupta *et al.*, 2007), por lo que la comunidad científica se ha enfocado en encontrar alternativas que refuercen la protección conferida con la vacuna.

Desde el punto de vista de la terapia, la principal estrategia para tratar la enfermedad y disminuir el número de decesos es el uso de antibióticos, que si bien ha disminuido significativamente el número de enfermos, se requieren administrar por tiempos muy largos (de 6 a 9 meses para cepas sensibles a fármacos y de 12 a 24 meses, al menos, para las cepas multidrogo-resistentes (MDR)), lo que en muchos casos implica efectos adversos como el daño hepático además del abandono del esquema de tratamiento antes de finalizar. En consecuencia, también es un área de investigación muy importante la búsqueda de alternativas para mejorar o acortar el tratamiento con antibióticos. Entre estas opciones se encuentra la inmunoterapia con moléculas como la silimarina (Rodríguez *et al.*, 2019), adenovirus codificantes para la producción de citocinas como TNF- $\alpha$ , para péptidos antimicrobianos como LL-37 y para el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Ramos-Espinosa *et al.*, 2016; Francisco-Cruz *et al.*, 2013; Francisco-Cruz *et al.*, 2016), así como péptidos derivados del veneno de escorpión (Cárcamo-Noriega *et al.*, 2019) y antraciclinas de origen microbiano (Trenado-Uribe *et al.*, 2018).

En la sección de Patología Experimental del INCMNSZ, se ha desarrollado un modelo en ratón de tuberculosis pulmonar progresiva (MRTPP) (Hernández-Pando *et*

al., 1996), en el que se han probado diferentes alternativas para mejorar tanto la eficacia protectora de BCG, incluyendo el uso de las micropartículas de almidón (MPAs) (Patente MX/2017/14206; solicitud de patente MX/a/2016/005434) como refuerzo y adyuvante de la vacuna BCG (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017; Moreno-Mendieta *et al.*, 2019), así como el uso de los péptidos del factor de transferencia (PFTs) (Fabre *et al.*, 2004) como refuerzo de la vacuna BCG (Mayoral, 2014) y como tratamiento (Aguilar *et al.*, 2014, INCMNSZ, datos sin publicar).

Como objetivo del presente proyecto se busca explorar por primera vez el efecto inmunoterapéutico potencial de las MPAs y los PFTs (en combinación y por separado), administrados por vía intranasal a ratones con tuberculosis bajo dos esquemas, uno sin antibiótico y otro con antibiótico.

---

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1 INMUNOTERAPIA

---

Dada la actual y alarmante aparición de cepas resistentes a medicamentos en los principales patógenos infecciosos (bacterias, hongos y protozoos), y el abandono de la terapia debido a los nocivos efectos secundarios que muchos de los medicamentos causan, existe una necesidad apremiante de buscar alternativas que refuercen la eficacia de los tratamientos disponibles y disminuyan sus efectos adversos. Una alternativa es la inmunoterapia, que busca restaurar y aumentar la capacidad del sistema inmune para reconocer y matar las células malignas, infectadas o dañadas (Liegel *et al.*, 2018), y consiste en la administración de agentes terapéuticos que funcionan como inmunoestimulantes y/o como inmunomoduladores en una amplia gama de enfermedades como las enfermedades crónicas degenerativas, metabólicas, alérgicas, cáncer y las enfermedades infecciosas (Morales *et al.*, 2007; Mannan, 2017). Algunas de las estrategias inmunoterapéuticas evaluadas en estas enfermedades incluyen el uso de péptidos para tratar la diabetes tipo I (Smith & Peakman, 2018) y alergias (Couroux *et al.*, 2015), el uso de sistemas particulados en modelos murinos de anafilaxis (Gamazo *et al.*, 2017), la terapia celular en cáncer (Liegel *et al.*, 2018), el uso

de anticuerpos monoclonales para mieloma (de Weers *et al.*, 2011; van der Veer *et al.*, 2011; Bret *et al.*, 2002), y el uso de la vacunación terapéutica en cáncer (Guo *et al.*, 2013; Leone *et al.*, 2015; Nooka *et al.*, 2016). En la mayoría de los casos el objetivo es reactivar o modular la respuesta del sistema inmune y poder acortar o incluso reemplazar los tratamientos extensos, que generan efectos secundarios adversos. Esto último es muy importante en las enfermedades infecciosas, para las cuales el estudio de la inmunoterapia también es muy relevante; particularmente enfermedades como la tuberculosis cuyo tratamiento incluye más de un antibiótico y por largos periodos de tiempo. En el caso de los extensos tratamientos con antibióticos, se generan efectos secundarios que van desde alterar dramáticamente la composición de la microbiota (Lange *et al.*, 2016; Isaac *et al.*, 2017) y generar daño hepático (Björnsson, 2017) hasta ocasionar cambios en la neuroquímica del cerebro (Neufeld *et al.*, 2011). En la tabla 1 se resumen los tipos más comunes de inmunoterapia.

**Tabla 1.** Tipos de inmunoterapia

Tipo de inmunoterapia	Definición	Ejemplo de uso	Referencia
Terapia celular	Administración de células madre sanas a partir de sangre o médula ósea	Aislamiento y expansión <i>ex vivo</i> de células T específicas de tumor que luego se administran nuevamente a los pacientes	Liegel <i>et al.</i> , 2018 Kim, 2013
Anticuerpos monoclonales	Anticuerpos que bloquean puntos de control que frenan la respuesta inmune	Bloqueo de PD-1/PD-L1 mejora la actividad citolítica específica para el mieloma, mediada por CD8 y NK	de Weers <i>et al.</i> , 2011 van der Veer <i>et al.</i> , 2011 Bret <i>et al.</i> , 2002 Ray <i>et al.</i> , 2015)
Estimulación inespecífica del sistema inmune	A través de la interacción con células del sistema inmune	Ensayos preclínicos (fase I) en pacientes con diabetes tipo I, usando la secuencia peptídica natural derivada de proinsulina NBI-6024, modula la respuesta de células T específicas de antígeno	Smith & Peakman, 2018 Couroux <i>et al.</i> , 2015 Gamazo <i>et al.</i> , 2017
Vacunación terapéutica	Administración de Ag con el fin de generar una respuesta específica	Las vacunas tumorales provocan una respuesta inmune específica del mieloma a través de la administración de un antígeno específico.	Guo <i>et al.</i> , 2013 Leone <i>et al.</i> , 2015 Nooka <i>et al.</i> , 2016 Le <i>et al.</i> , 2013 Liegel <i>et al.</i> , 2018

## 2.2 TUBERCULOSIS

---

La tuberculosis pulmonar (TB) es la décima causa mundial de muerte y la primera por enfermedades infecciosas, por encima del VIH/sida. De acuerdo al reporte global de la TB del 2019, en el 2018 la cifra estimada de muertes fue de 1.2 millones, y el número de nuevos casos reportados de 10 millones de personas. De forma preocupante, los casos de enfermedad resistente a rifampicina han rondado los 500 mil casos durante los últimos años (Reporte Global de Tuberculosis, OMS, 2019).

En México de acuerdo con el Boletín Epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, hasta el 6 de junio del presente año (2020), se han reportado 16,254 casos de TB en el país, siendo el Estado de México el que más casos registrados tiene hasta la semana 22 (Boletín epidemiológico semanal 23, 2020).

Factores como la comorbilidad con otras enfermedades, la diabetes, el tabaquismo, el alcoholismo, la desnutrición (Narasimhan *et al.*, 2013), así como la exposición a altas cargas antigénicas de micobacterias saprófitas (Hernández-Pando *et al.*, 1997), incrementan el riesgo de padecer la enfermedad y hacerla más grave. El agente etiológico de la TB es el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), bacterias ácido-alcohol resistentes, aerobias, pertenecientes al género *Mycobacterium*, que entran al organismo a través de la vía respiratoria afectando principalmente a los pulmones; son fagocitadas por los macrófagos alveolares, siendo capaces de sobrevivir y multiplicarse en ellos a través de complejos mecanismos de evasión de respuesta inmune (Patil *et al.*, 2018; Flynn & Chan, 2003), tales como la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma (Russell *et al.*, 2002; Fratti *et al.*, 2000), el escape al ambiente ácido dentro del fagolisosoma (Meena, 2010), y la evasión de la toxicidad de las especies reactivas de nitrógeno (Ehrt *et al.*, 1997; Flynn *et al.*, 1998). Mtb posee una envoltura celular que consta de tres estructuras principales: la membrana plasmática, la pared celular y una capa más externa, conocida como la cápsula (Daffé & Draper, 1998). De acuerdo con Ortalo-Magné *et al.* (1995) la cápsula de los bacilos está compuesta principalmente por proteínas y polisacáridos como D-glucano (120 kDa),

D-arabinomanano (13 kDa) y D-manano (4 kDa) (Lemassu & Daffé, 1994). De acuerdo con Geurtsen *et al.* (2009) el principal componente de carbohidratos es un  $\alpha$ -glucano que consiste en un polímero de 5-6 residuos de  $\alpha$ -D-(1,4)-glucosa (Ortalo-Magné *et al.*, 1995; Lemassu *et al.*, 1996). Por su parte, la pared celular consiste en dos segmentos: peptidoglicanos unidos covalentemente al heteropolisacárido D-arabino-D-galactano, que está unido a ácidos grasos de cadena larga llamados ácidos micólicos, y un segmento con glicolípidos intercalados (Daffé & Draper, 1998), que le permiten modular y evadir la respuesta inmune del huésped a favor de las micobacterias, mediando su interacción con los monocitos e interfiriendo en su diferenciación (Gagliardi *et al.*, 2007), así como en la fusión del fagosoma-lisosoma (Forrellad *et al.*, 2013; Flynn & Chan, 2003). La compleja estructura de su membrana contribuye no solo a la virulencia de las distintas cepas de Mtb, sino que complica el efecto y mecanismo de acción de los antibióticos (Jarlier & Nikaido, 1994). Si bien la complejidad de la estructura formada por peptidoglucano, arabinogalactano y ácidos micólicos está presente tanto en cepas avirulentas como en las virulentas (Barry, 2001), la principal diferencia radica en la cantidad y distribución de estas moléculas y la presencia de algunos componentes y factores de virulencia encontrados solo en cepas virulentas. Por ejemplo, el gen *mas* codifica para una ácido micocerosico sintasa, una enzima que cataliza la síntesis de múltiples ácidos grasos metilados de cadena larga, llamados ácidos micocerosicos (Smith *et al.*, 2003), y se encuentra solamente en micobacterias patogénicas (Azad *et al.*, 1997; Forrelland *et al.*, 2013).

De la misma forma, esta heterogeneidad en el complejo Mtb define las consecuencias posteriores al encuentro entre el bacilo y el huésped, pues de la respuesta inmune que se induzca los resultados pueden ser la infección latente, la enfermedad tuberculosa o la eliminación completa del patógeno. Los macrófagos y los linfocitos T CD4+, junto con la formación de granulomas y la inducción de un perfil de respuesta celular (Th1), constituyen el pilar de defensa contra la micobacteria. Sin embargo, también resulta de suma importancia la participación de las células epiteliales de la vía aérea, los neutrófilos y las células dendríticas, así como el ambiente de citocinas previo a la infección (de Martino *et al.*, 2019). Cada respuesta debe

permanecer en equilibrio, ya que, si se altera, puede favorecer la proliferación de Mtb, lo que resulta en la progresión de la enfermedad y el daño del tejido por el propio sistema inmune. Tal y como ocurre con la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  para la cual se ha descrito un papel dual. Esta citocina, liberada en un sitio inflamatorio en el que hay un tipo de respuesta mixta (Th1/Th2) puede producir daño tisular necrótico con inflamación excesiva (Hernández & Rook, 1994).

---

### 2.2.1 TRATAMIENTO CON ANTIBIÓTICOS

---

El tratamiento convencional para la tuberculosis consta principalmente de 3 grupos de fármacos (Tabla 2). El grupo 1 incluye fármacos de primera línea como: isoniazida, rifampicina, rifabutina, pirazinamida y etambutol. Los fármacos de primera línea son eficientes contra la tuberculosis sensible a fármacos, dividido en dos fases. La fase intensiva que implica la toma diaria de 4 fármacos por vía oral, durante 2 meses. La segunda fase en la que se continúa con la toma diaria de rifampicina e isoniazida durante 4 a 6 más meses para eliminar a las bacterias que sobrevivieron a la primera fase, lo que da un total 6 a 9 meses para el tratamiento contra la TB sensible a fármacos, tiempo suficiente para que se generen efectos adversos como la hepatotoxicidad, además de una posible reinfección o reactivación de la enfermedad (Tousif *et al.*, 2017; Skakun & Shman'ko, 1985; Fountain *et al.*, 2005; Younossian *et al.*, 2005; Tousif *et al.*, 2014) e incluso problemas neuropsiquiátricos e hiperuricemia (Gülbay *et al.*, 2006).

Los fármacos de segunda línea son aquellos que se administran cuando los de primera línea fallan, debido al desarrollo de resistencia (Floss & Yu, 2005; Kunin, 1996). En la tabla 2 se resumen los antibióticos usados para el tratamiento de la TB, así como su mecanismo de acción.



**Tabla 2.** Antibióticos contra tuberculosis y su mecanismo de acción. Adaptada de Patil *et al.*, 2018

Grupo	Antibiótico	Mecanismo de acción
1	Isoniazida	Inhíbe a la proteína acarreadora del acil y a la enzima sintetasa de la proteína acarreadora KasA que conduce a la inhibición de la síntesis de ácido micólico.
1	Rifampicina y rifabutina	Se unen a la subunidad $\beta$ de la RNA-polimerasa bacteriana dependiente de DNA, inhibiendo así la síntesis de RNA bacteriano.
1	Pirazinamida	Inhíbe traducción y producción de energía, y de pantotenato/coenzima A.
1	Etambutol	Inhíbe a la arabinosiltransferasa, enzima que polimeriza arabinosa en arabinano y en arabinogalactano, componentes de la pared celular micobacteriana.
2	Ofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino	Inhíben a la topoisomerasa II (DNA girasa) y a la topoisomerasa IV, por lo que se inhibe la síntesis de DNA.
3	Estreptomina, kanamicina, amicanina y capreomicina.	Se unen a una proteína ribosomal específica de la subunidad 30S, lo que conduce a la irreversible inhibición de la síntesis de proteínas.

Grupo 1: antibióticos orales de primera línea. Grupo 2: antibióticos fluoroquinolonas. Grupo 3: Antibióticos inyectables.

La emergente resistencia a antibióticos en las cepas de Mtb, ha generado tasas de recuperación muy bajas y tasas de mortalidad elevadas (Reporte Mundial de Tuberculosis, OMS, 2019).

Mtb ha desarrollado diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, tales como la modificación de los blancos y de los propios antibióticos, la degradación enzimática de éstos, la presencia de bombas de eflujo y las mutaciones de genes que codifican enzimas activadoras de fármacos, como es el caso del gen *pncA* que codifica para la enzima pirazinamidasa, encargada de la activación enzimática de la pirazinamida a ácido pirazinoico (Scorpio & Zhang, 1996; Scorpio *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2013). Sin embargo, la baja permeabilidad de la pared celular de la micobacteria resulta por sí misma una barrera muy efectiva para los fármacos (Jarlier & Nikaido, 1994; Nguyen & Pieters, 2009). Por una parte, la naturaleza hidrofílica dada por las

capas de peptidoglicano y arabinogalactano dificultan la entrada de moléculas hidrofóbicas (Brennan & Nikaido, 1995). Estas dos capas a su vez están unidas de manera covalente a los ácidos micólicos y ácidos grasos de cadena larga, lo que forma una barrera hidrofóbica para las moléculas hidrofílicas (Liu *et al.*, 1995; Nguyen, 2016). Estas propiedades de la micobacteria y los mecanismos que ha desarrollado en combinación con el uso inadecuado de los antibióticos propician las condiciones que dan origen a cepas MDR.

La TB MDR se define como la enfermedad causada por las micobacterias resistentes a dos medicamentos de primera línea: rifampicina e isoniazida. Mientras que la tuberculosis extensamente resistente (XDR) se refiere a la resistencia al menos a una fluoroquinolona y un fármaco inyectable de segunda línea adicional a la rifampicina e isoniazida (Trauner *et al.*, 2014). Más de 480,000 casos de MDR-TB ocurren cada año en todo el mundo, siendo el 9% casos XDR-TB. Aunado al extenso tiempo, este tratamiento no solo resulta más costoso, sino que causa efectos secundarios potencialmente mortales (sobre todo daño renal y daño hepático) (Chan *et al.*, 2008; Millard *et al.*, 2015). Incluso y dada la dificultad para tratar la enfermedad, se ha llegado a casos extremos de TB totalmente drogo-resistente (TDR-TB) en algunas clínicas en Sudáfrica (Klopper *et al.*, 2013; Slomski, 2013).

---

### 2.2.2 INMUNOTERAPIA EN LA ENFERMEDAD

---

El progreso en el desarrollo de fármacos contra la tuberculosis ha sido lento y ninguno de los fármacos recientemente probados ha permitido el acortamiento del régimen de tratamiento convencional (WGNTD, 2016). La inmunoterapia puede modular el sistema inmunológico en pacientes con TB, permitiendo un mejor control de la replicación de *Mtb*. La terapia dirigida con inmunomoduladores es un enfoque prometedor que debe explorarse para un mejor control de la enfermedad (Abate & Hoft, 2016). Algunos productos micobacterianos (Van Rhjin & Moody, 2015; Dey *et al.*, 2015), citocinas y fármacos han sido considerados como posibles candidatos. Por ejemplo, la inyección intradérmica y la administración oral de *Mycobacterium vaccae* en conjunto con antibióticos mejoró la eliminación de bacilos del esputo y promovió

una mejora en las lesiones visualizadas por análisis radiográficos en pacientes enfermos que no habían sido tratados previamente (Yang *et al.*, 2011; Butov *et al.*, 2013). También se ha reportado que la administración subcutánea y oral de *M. vaccae* induce una respuesta Th1 y disminuye la carga bacilar en ratones infectados con altas cargas bacterianas de H37Rv (Hernández-Pando *et al.*, 2008; Hernández-Pando *et al.*, 2000). Xu *et al.* (2009), también reportaron el uso de *M. vaccae* como potencial agente inmunoterapéutico contra la infección con la cepa H37Rv al administrarse vía intramuscular, observando una menor carga bacilar, aunque no tan baja como la lograda tras la administración de isoniazida. En el 2018 Chahar *et al.*, reportaron en cobayos el uso de *Mycobacterium indicus pranii* (Mw), una micobacteria saprófita no patogénica y de rápido crecimiento, como inmunoterapia frente a la infección con la cepa H37Rv.

RUTI es una vacuna hecha de fragmentos celulares detoxificados de Mtb administrados en liposomas (Cardona *et al.*, 2005), a ratones y cobayos, que tiene potencial tanto para la profilaxis como para el tratamiento de la enfermedad (Vilaplana *et al.*, 2011). Ésta ha sido probada en ensayos clínicos de fase I y II en voluntarios sanos y con tuberculosis latente, comprobando seguridad e inmunogenicidad (Vilaplana *et al.*, 2010; Nell *et al.*, 2014). Otro objeto de estudio, han sido las vacunas de DNA que expresan genes relevantes de Mtb. Tal es el caso de la vacuna de DNA con el plásmido cDNA3.1, que expresa los genes de Hsp65 e IL-12, ésta aumentó la supervivencia de ratones infectados con cepas de TB MDR/XDR y de primates infectados con las micobacterias (Okada *et al.*, 2011), sugiriendo su posible avance hacia ensayos clínicos en humanos como complemento de la quimioterapia (Abate & Hoft, 2016). Así mismo, las citocinas han sido otro objeto de estudio interesante dado que las respuestas inmunes celulares son esenciales para inhibir el crecimiento intracelular y limitar la diseminación. Las células T producen citocinas y moléculas efectoras como perforina, granzima y granulicina (Flesch & Kauffman, 1987; Feng *et al.*, 1999), por lo que las citocinas que mejoran la expansión de las células T y la activación/diferenciación de las células presentadoras de antígeno pueden ayudar a controlar la infección. El uso complementario de IFN- $\gamma$  e IL-12 en

algunos casos de MDR-TB produjo resultados favorables (Condos *et al.*, 1997; Giosue *et al.*, 2000). En modelos murinos de TB, el IFN- $\gamma$  administrado con IgA intranasal produjo una disminución de la carga de Mtb en los pulmones (Balu *et al.*, 2011), y con adenovirus recombinantes que codifican para IFN- $\gamma$  (AdIFN $\gamma$ ) administrado en una dosis única por vía intratraqueal en combinación con la quimioterapia convencional favoreció la disminución de la carga bacilar en pulmón y el daño por neumonía (Mata-Espinosa *et al.*, 2008). De manera similar, se demostró que los inhibidores de IL-4 y TGF- $\beta$  aumentan la inmunidad de tipo Th1 y ayudan a reducir la carga bacteriana en los pulmones de ratones infectados (Hernández-Pando *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2008). Por otra parte, los anticuerpos, fármacos o suplementos y péptidos también han sido alternativas terapéuticas evaluadas. Los anticuerpos de individuos vacunados con BCG aumentaron significativamente la capacidad de los macrófagos para matar las micobacterias intracelulares *in vitro* (de Valliere *et al.*, 2005). La administración de anticuerpos *in vivo* ha tenido resultados controversiales (López *et al.*, 2009; Hamasur *et al.*, 2004), dependiendo la ruta de administración, la frecuencia y la combinación de anticuerpos monoclonales, por lo que se requieren más estudios y evidencias de su seguridad antes de su aprobación en ensayos clínicos. El uso de la vitamina D también se ha estudiado, ya que activa los macrófagos a través de la vía de señalización de receptores tipo-Toll (TLRs) lo que conduce a una mayor producción de péptidos micobactericidas, catelicidina y su forma activa LL-37 (Liu *et al.*, 2006). Desafortunadamente, los ensayos clínicos con suplementos de vitamina D han dado resultados muy diversos por lo que se requiere más investigación (Selvaraj *et al.*, 2015). Entre los fármacos probados se encuentra la metformina, la cual inhibió el crecimiento intracelular de Mtb, restringió la inmunopatología de la enfermedad y mejoró la eficacia de los fármacos convencionales contra la TB en ratones (Singhal *et al.*, 2014). En un estudio retrospectivo de pacientes con diabetes mellitus y con TB, se encontró que los pacientes que estaban tomando metformina tenían menos cavidades pulmonares y mayor supervivencia (Singhal *et al.*, 2014). De manera similar, otros inductores de autofagia, como las estatinas (simvastatina, rosuvastatina), dehidroepiandrosterona (Bongiovanni *et al.*, 2015) y el antineoplásico gefitinib, mostraron disminuir la carga bacteriana en ratones infectados con Mtb (Parihar *et al.*,

2014; Stanley *et al.*, 2014). En cuanto a sistemas particulados, se han utilizado liposomas de fosfatidilcolina y colesterol por vía intratraqueal, demostrándose su efecto en una disminución significativa (del 80%) de los bacilos vivos en pulmones y una reducción del daño por neumonía tanto en animales infectados con *M. tuberculosis* H37Rv como con una cepa MDR (Mata-Espinosa *et al.*, 2015).

Los péptidos antimicrobianos también representan una estrategia inmunoterapéutica potencial en la infección por Mtb, ya que poseen actividades quimiotácticas e inmunomoduladoras (Lai & Gallo, 2009). La producción y/o la sobreexpresión de péptidos antimicrobianos y citocinas, son aplicaciones terapéuticas que se han propuesto para acortar el tratamiento convencional contra la tuberculosis demostrado en los modelos de infección resistente a múltiples fármacos (TB-MDR). Ramos-Espinosa *et al.* (2018), estudiaron en un modelo de latencia, el efecto de una única administración por vía intratraqueal de adenovirus codificantes para diferentes citocinas Th1 (TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ ) y péptidos antimicrobianos (LL-37), lo que controló de manera significativa la carga bacilar en pulmón y redujo el porcentaje de neumonía hasta el día 30 de infección.

Finalmente, y de especial relevancia es el uso de sistemas particulados y péptidos como alternativa para favorecer o mejorar el tratamiento contra la TB.

### 2.3 USO DE SISTEMAS PARTICULADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA TB

Recientemente se ha descrito el uso de diversos sistemas particulados, en su mayoría como sistemas de administración de antibióticos, con el fin de disminuir la duración de los esquemas, dirigir la entrega a las células blanco, utilizar las vías de administración parenteral y mucosa, y en algunos casos reducir la toxicidad generada por los antibióticos. En las tablas 3 y 4 se describen algunos de los usos de estos sistemas para la liberación dirigida de fármacos antimicrobianos por vía parenteral e inhalada, respectivamente.

**Tabla 3.** Sistemas particulados evaluados como inmunoterapia por vía parenteral en ratones con TB

Sistema Particulado y Fármaco	Esquema, Dosis, Vía	Respuesta Obtenida	Referencias
Liposomas de fosfatidilcolina, colesterol y diacetilfosfato -Isoniazida y rifampicina.	Una vez por semana, durante 6 semanas por vía intravenosa	Reducción de la carga bacteriana en pulmones	Labana <i>et al.</i> , 2002 Mata-Espinosa <i>et al.</i> , 2015
Liposomas de di-palmitoil fosfatidil colina, colesterol -Pirazinamida.	2 veces por semana por vía subcutánea hasta completar 7 dosis	Reducción de la carga bacteriana en pulmón a los días 10, 20 y 30 post-tratamiento	El-Ridy <i>et al.</i> , 2007
Liposomas de fosfatidilserina (PS) y ácido fosfatídico (PA) -Isoniazida	3 veces por semana por vía intranasal durante 4 semanas	Reducción de 100 veces la carga bacteriana en pulmón, evitando el daño por respuesta inflamatoria con PS	Greco <i>et al.</i> , 2012
Nanopartículas de curcumina.	10 mg/kg de peso en 100 uL de PBS diariamente por vía intraperitoneal hasta erradicar infección (75 días y 60 días)	Reducción de hepatotoxicidad generada por isoniazida. Disminución de la carga bacilar por incremento en la respuesta Th1	Tousif <i>et al.</i> , 2017

**Tabla 4.** Sistemas particulados evaluados como inmunoterapia por vía inhalada en animales con TB

Sistema Particulado y Modelo	Fármaco	Vía de administración	Respuesta generada	Referencias
Microesferas de PLGA -Cobayo	Rifampicina	Primera dosis 24 h antes de la infección por insuflación, segunda dosis 10 días después de la infección por nebulización	Reducción de carga bacteriana en pulmón por ambas vías	Suárez <i>et al.</i> , 2001
Microesferas de PLGA -Rata	Rifampicina	Intratraqueal, un día después de la infección, una vez al día durante 14 días	Ligera disminución de la carga bacteriana en pulmón.	Yoshida <i>et al.</i> , 2006
Micropartículas de PLGA -Ratón	Isoniazida y rifabutina	Inhalación, 3 días de dosis 24 horas después de la infección	Acumulación de vesículas de Golgi en las proximidades de los fagosomas con micropartículas en los macrófagos alveolares. Mayor producción de intermediarios reactivos de nitrógeno	Sharma <i>et al.</i> , 2007

Adaptada de Verma *et al.*, 2011

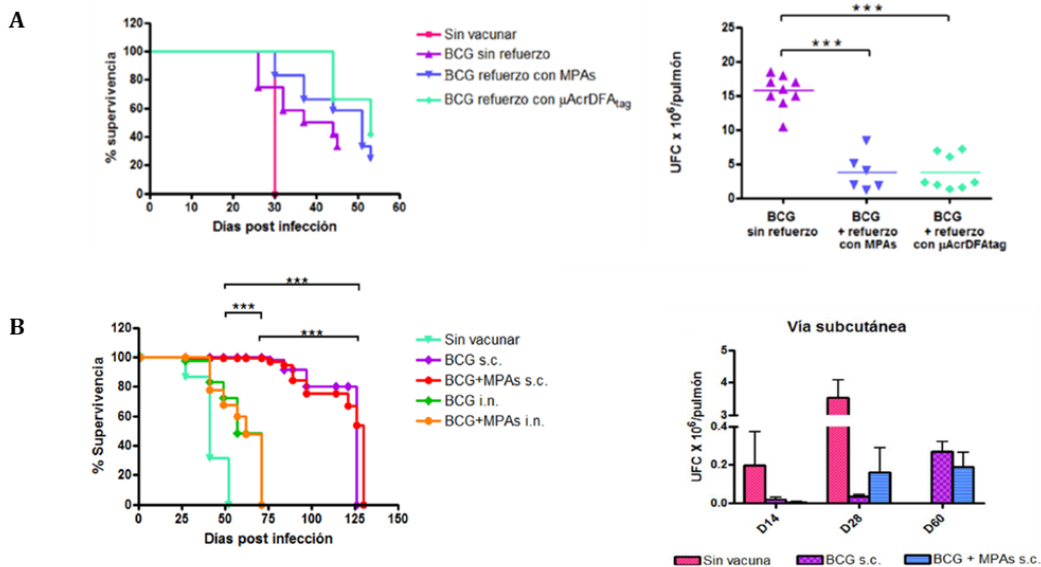
### 2.3.1 APLICACIONES DE LAS MICROPARTÍCULAS DE ALMIDÓN (MPAS) EN EL MRTTP

Las MPAs que se usaron en este proyecto son partículas naturales, sin modificaciones químicas, constituidas por dos polímeros de D-glucosa, la amilosa y la amilopectina. La amilosa consta de glucosas unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 entre el carbono anomérico de un monosacárido y el grupo hidroxilo (OH) del otro

(Bertozzi *et al.*, 2009), y la amilopectina que tiene las glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 y ramificaciones en los enlaces  $\alpha$ -1,6. Estos polímeros se acomodan de forma compleja para formar los gránulos, que dependiendo de su origen botánico pueden tener diversos tamaños y formas.

Dado que las MPAs no tienen modificaciones químicas presentan un amplio número de ventajas como su biocompatibilidad, biodegradabilidad e inocuidad, lo que ha permitido su uso como vehículo de antígenos y adyuvante por las vías oral y nasal en ratones sanos (Guillén *et al.*, 2014; Moreno-Mendieta *et al.*, 2014) y en conejos sanos (Landón-Vázquez, 2019). Recientemente las MPAS se utilizaron como refuerzo intranasal de la vacuna BCG en el MRTPP, en un esquema de 3 refuerzos con intervalo semanal, un mes después de la vacunación con BCG. Tras la infección con la cepa hipervirulenta 9005186 genotipo LAM de Mtb, se observó mayor porcentaje de supervivencia y menor carga bacilar en pulmón en los animales que recibieron el refuerzo, mejorando la eficacia protectora de BCG (Figura 1A) (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017). En estudios posteriores, las MPAs se evaluaron como adyuvante por vía subcutánea (s.c.) de la vacuna BCG. La figura 1B muestra la curva de supervivencia y el número de UFC de los ratones que fueron retados con la cepa hipervirulenta 9005186. En este trabajo, la eficacia protectora de la vacuna BCG coadministrada con las partículas varió dependiendo de la cepa de infección (Barrera-Rosales, 2017).

### III. Reto con *M. tuberculosis* 9005186



**Figura 1.** Efecto de la administración de las MPAs **A.** (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017) como refuerzo intranasal (i.n.) y **B.** (Barrera-Rosales, 2017) como adyuvante subcutáneo (s.c.) de la vacuna BCG. Se muestra la supervivencia (izquierda) y carga bacilar en pulmón (derecha) después de la infección con *M. tuberculosis* 9005186.

## 2.4 PÉPTIDOS INMUNOTERAPÉUTICOS

El uso de péptidos como terapéuticos ha sido ampliamente reportado dada la amplia gama de ventajas que representan en el área y que se pueden resumir en alta eficacia, alta seguridad, metabolismo predecible (Wetzler & Hamilton, 2018), alta especificidad, alta actividad biológica y alta habilidad de penetración a membrana (Chames *et al.*, 2009; Benson *et al.*, 2012).

En la actualidad, existe una gran variedad de péptidos usados como terapéuticos y muchos otros con potencial terapéutico que se encuentran en la fase preclínica de evaluación (Vlieghe *et al.*, 2010; Dahno *et al.*, 2009). Algunos de estos son la carnosina, las defensinas, las catelicidinas y la dermcidina. La carnosina es un dipéptido natural de bajo peso molecular, hidrofílico, con propiedades antioxidantes, compuesto por histidina y alanina ( $\beta$ -alanil-1-histidin). Es sintetizado y contenido en músculo humano y tejido nervioso, es fácilmente absorbido en el tracto digestivo,

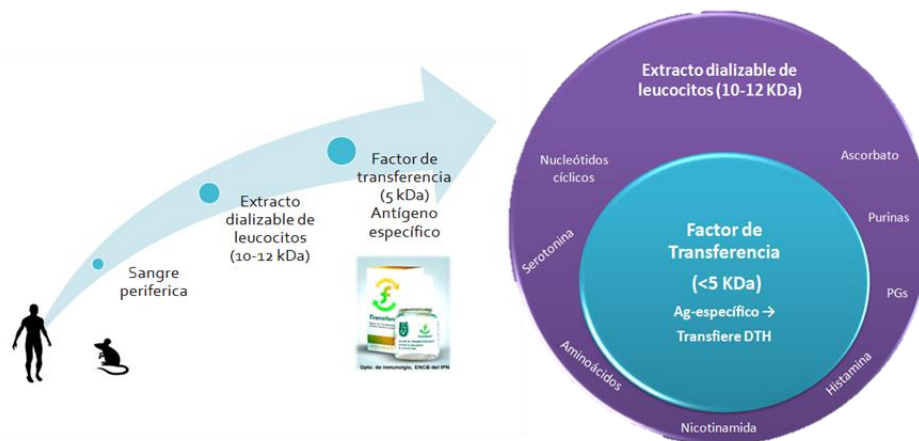


penetra la barrera hematoencefálica y es altamente biodisponible (Schaalan *et al.*, 2018). Se ha usado para tratar enfermedades como la enfermedad de Alzheimer (Dukic-Stefanovic *et al.*, 2001; Hobart *et al.*, 2004), autismo (Chez *et al.*, 2002), enfermedad de Parkinson (Kang & Kim, 2003) y epilepsia (Petroff *et al.*, 2001). Las defensinas son péptidos naturales catiónicos, de los que se ha reportado una amplia actividad antimicrobiana (Cullor *et al.*, 1990), se clasifican en  $\alpha$  y  $\beta$ -defensinas y ambas tienen peso molecular entre 3 y 6 kDa. Se ha reportado que las defensinas muestran actividades anti-VIH y de manera sintética se han usado como terapia antiviral (Pace *et al.*, 2017). Las catelicidinas son péptidos catiónicos que también poseen propiedades antimicrobianas contra diferentes bacterias, hongos y virus. Son activados proteolíticamente y son parte del sistema inmune innato de humanos y animales vertebrados (Kosciuczuk *et al.*, 2012; Fabisiak *et al.*, 2016; Reinholz *et al.*, 2012). La dermicidina, es un péptido natural en forma de  $\alpha$ -hélice, aniónico, con propiedades antimicrobianas contra hongos y bacterias patógenas (Zeth & Sancho-Vaello, 2017). La granulicina es otro péptido antimicrobiano producido por los linfocitos T citotóxicos humanos y NK que ha demostrado actividad inhibitoria contra diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas. Zhang *et al.* (2013), reportaron la actividad antibacteriana de un péptido derivado de veneno de serpiente (OH-CATH), contra *E. coli* resistente a cefalosporina. Otro péptido que se ha investigado ampliamente es el péptido Gk-1, derivado de *Taenia crassiceps* y conformado por 18 residuos de aminoácidos, al que se ha descrito que *in vitro* promueve la activación de células presentadoras de antígeno a través de la expresión de CD80/86 y MHC clase II. También promueve la secreción de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y CCL-2 (MCP-1) (Segura-Velázquez *et al.*, 2009), la proliferación de T CD4+ y TCD8+ (Toledo *et al.*, 1999) y la infiltración de células mononucleares (linfocitos y macrófagos) (Segura Velázquez *et al.*, 2006). En investigaciones más recientes para entender el mecanismo inmunoestimulante y adyuvante, se ha observado que Gk-1 promueva la activación clásica de macrófagos peritoneales, induce la expresión de mediadores proinflamatorios y óxido nítrico e incrementa la actividad fagocítica de los macrófagos (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

Se sabe que la vía de administración y la dosis, pueden tener un efecto significativo en los perfiles farmacocinético y farmacodinámico de los péptidos inmunoterapéuticos (Wetzler & Hamilton, 2018). La administración por vías mucosas (oral e intranasal) tiene múltiples ventajas dada la facilidad de administración en comparación con las vías parenterales, por lo que es amigable con el paciente al poder ser autoadministrable. Otra de las ventajas es la simulación de entrada de muchos patógenos, así como la estimulación de linfocitos T CD8+ que resultan de suma importancia para combatir microorganismos patógenos intracelulares. Entre estas rutas de administración, la vía intranasal es a menudo recomendada sobre la vía oral, debido a la cantidad de enzimas proteolíticas presentes en el tracto gastrointestinal (GIT), que hacen susceptibles a los péptidos a degradación (Wetzler & Hamilton, 2018). Uno de los péptidos que se han estudiado por vía intranasal y se encuentra disponible para tratar la diabetes es Levemir®, que tiene reemplazada una treonina en la región C-terminal de la insulina humana recombinante, con un residuo de lisina y unido covalentemente al grupo amino del ácido mirístico (Meredith *et al.*, 2015; Morales, 2007).

Finalmente, una fuente importante de péptidos con potencial inmunoterapéutico es el Factor de Transferencia (FT), el componente antígeno-específico que contiene moléculas de <5kDa obtenido a partir del Extracto Dializable de Leucocitos (EDL) el cual es derivado de sangre periférica y que tiene una gran variedad de componentes (Arnaudov & Kostova, 2015). Obtenido a partir de donadores sanos (Figura 2), el FT se comercializa como el Transferon® para reforzar el sistema inmune y a partir de donadores que padecieron una patología particular como coadyuvante en el tratamiento. Dada la variedad de respuestas que induce, se ha estudiado y utilizado en diferentes enfermedades bacterianas, virales, parasitarias, en alergias e incluso en cáncer (Arnaudov & Kostova, 2015). El FT es producido por linfocitos T CD4+ Th1 y posee componentes inductores, supresores y de tipo adyuvante. Los componentes inductores potencian el estímulo antigénico, lo que causa la producción de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8 por los T CD4+ Th1, también está relacionado con la activación de monocitos (Arnaudov & Kostova, 2015). La

producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 está asociada la expresión de TLR2 y TLR4 y a la activación del factor nuclear kB (Ojeda *et al.*, 2005). La producción de IL-6 de las células presentadoras de antígeno cargadas, provoca la producción de IL-17 por células T CD8+ de memoria, y además por células dendríticas (Myles *et al.*, 2017). Los componentes supresores intervienen en la regulación y atenuación del sistema inmune, estimulando la formación de IL-10 y citocinas de tipo Th2. Finalmente el componente de tipo adyuvante posee actividad no específica que potencia la respuesta inmune a alergenitos (Arnaudov & Kostova, 2015). La interacción en conjunto de todos estos componentes es lo que hace tan amplio el uso del FT en diversas patologías.

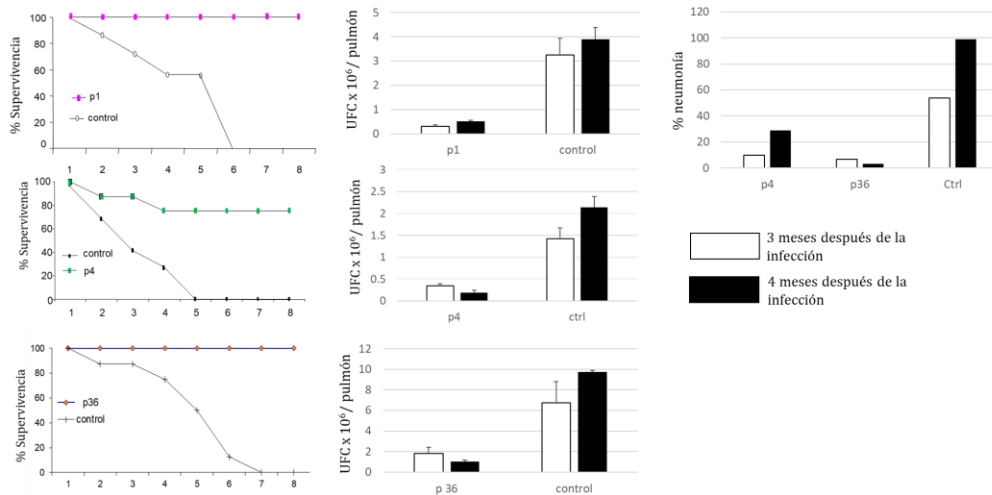


**Figura 2.** Obtención y composición del FT. Adaptada de Arnaudov & Kostova, 2015.

#### 2.4.1. APLICACIONES DE LOS PÉPTIDOS DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA (PFTs) EN EL MRTPP

A partir del FT se lograron purificar 2000 péptidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés *high performance liquid chromatography*) y espectrofotometría de masas (Kirkpatrick *et al.*, 2000). Estos péptidos poseen una secuencia conservada (LLYADQDL/VEDN) de unión a receptores de linfocitos T. Estudios posteriores demostraron que al menos 500 péptidos del Factor de Transferencia derivado de sangre periférica humana presentaron identidad con proteínas de la pared de Mtb (Dr. Benito Antón-Palma, INPRFM, datos no

publicados), de los que 40 fueron capaces de transferir hipersensibilidad retardada (DTH, por sus siglas en inglés *Delayed-type hypersensitivity*) en ratones. Los 40 péptidos seleccionados fueron estudiados por Aguilar *et al.* (2014, datos no publicados) como potenciales agentes inmunoterapéuticos. Los péptidos fueron administrados por vía intraperitoneal y a partir de los resultados, se seleccionaron los péptidos que fueron sintetizados para continuar su evaluación como refuerzo e inmunoterapia. Mayoral en 2014 utilizó concretamente los PFTs 1, 4 y 36 como refuerzo de la vacunación BCG, por vía subcutánea, mejorando la eficacia protectora de la vacuna al obtener una menor carga bacilar y menor neumonía en pulmón en comparación con el grupo que fue vacunado y no recibió los refuerzos con los PFTs. Aguilar en el 2014, utilizó los mismos péptidos como inmunoterapia en ratones Balb/c infectados con  $2.5 \times 10^5$  UFC de *M. tuberculosis* H37Rv. Dos meses después de la infección los péptidos fueron administrados por vía intraperitoneal una vez por semana durante uno y dos meses (3 y 4 meses postinfección respectivamente). Tal y como se observa en la figura 3, con la administración de los PFTs 1 y 36 a una concentración de  $1 \mu\text{g}$  se logró el 100% de supervivencia de los animales, mientras que con la administración del PFT 4 a una concentración de  $0.5 \mu\text{g}$  bajo el mismo esquema se logró la supervivencia del 80% de los animales. Con los tres péptidos se logró una disminución significativa de carga bacilar en pulmón a los 3 y 4 meses de la infección con respecto al grupo control que solo recibió Solución Salina Fisiológica (SSF) y para el caso de los PFTs 1 y 36 también se logró una disminución del daño por neumonía en los pulmones. Con dichos resultados ha resultado de interés evaluar en el MRTTP el potencial terapéutico de estos tres péptidos sintéticos, administrados por otras vías como la intranasal.



**Figura 3.** Efecto inmunoterapéutico de los PFTs por vía intraperitoneal (i.p) 3 y 4 meses después de la infección con *M. tuberculosis* H37Rv (Aguilar *et al.*, 2014. INCMSZ, datos sin publicar).

## JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

### JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que las micropartículas de almidón y los péptidos del factor de transferencia, administrados de manera independiente, como refuerzos de la vacuna BCG mejoran su eficacia protectora en el modelo de MRTPP. Esto evidencia el potencial inmunoestimulante que poseen estas moléculas, reflejado en el aumento de la supervivencia después de la infección y la disminución de UFC en pulmón. Por lo tanto resulta de interés evaluar y caracterizar el potencial inmunoterapéutico de ambos como alternativa para optimizar el tratamiento con antibióticos.

### HIPÓTESIS

La administración de las micropartículas de almidón en combinación con los péptidos del factor de transferencia, tendrá un efecto inmunoterapéutico que mejorará la eficacia del tratamiento con antibióticos.

---

## OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL

---

Evaluar y caracterizar el efecto inmunoterapéutico de las MPAs y los PFTs administrados por vía intranasal, frente a la infección con la cepa H37Rv de Mtb.

### OBJETIVOS PARTICULARES

---

- ❑ Determinar la eficacia de las MPAs y PFTs (1, 4 y 36) para tratar la tuberculosis experimental sin y con antibióticos de primera línea, mediante el análisis de la supervivencia a la infección, carga bacilar en pulmón y el desarrollo de neumonía.
- ❑ Caracterizar la respuesta inducida con la inmunoterapia mediante el análisis de granulomas y citocinas producidas en pulmón.

---

## 5. MATERIALES Y METODOLOGÍA

---

### 5.1 ANÁLISIS *IN SILICO* DE LOS PFTs

---

A partir de la secuencia de cada péptido (de 12 aminoácidos cada uno), se realizó un alineamiento a través de BLAST general y restringido a Mtb con tres diferentes bases de datos: No Redundante (NR), SwissProt y Protein Data Base (PDB), con el fin de buscar alguna relación con diferentes organismos, así como posibles proteínas homólogas de Mtb. En el análisis se busca tener un mayor porcentaje de cobertura de la secuencia así como un parámetro E (e-value) bajo, lo que indica que el alineamiento no se debe al azar dando mayor significancia al análisis, debido a que al ser péptidos pequeños es probable que puedan alinear con otros segmentos no homólogos de las pares de bases. También se realizaron análisis de estructura primaria a través de las plataformas ProtParam de ExPASy <https://web.expasy.org/protparam/> (Gasteiger *et al.*, 2005) y predicciones de su posible estructura secundaria con el programa Scratch Protein Predictor <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/> (Cheng *et al.*, 2005) y UCSF Chimera

<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera> (Pettersen *et al.*, 2004). A partir de la base de datos Immune Epitope Database and Analysis Resource [www.iedb.org](http://www.iedb.org) (Vita *et al.*, 2018) se realizó un análisis de predicción de unión específica y cargado de los péptidos en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

---

## 5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL E INFECCIÓN

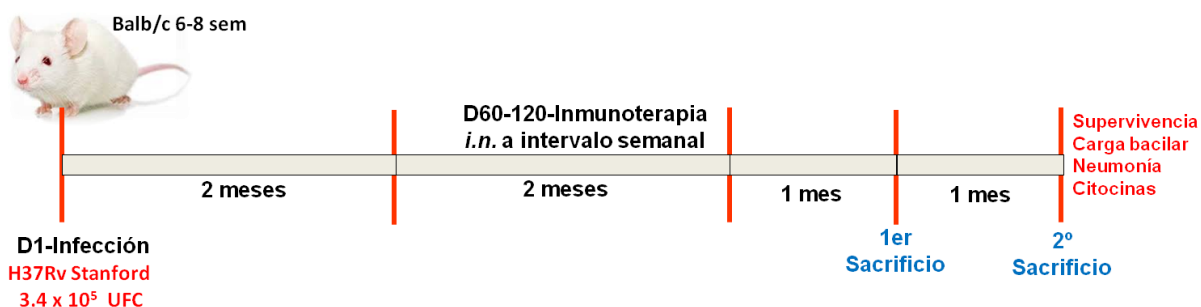
---

Los experimentos con el modelo de protección basado en el MRTPP se realizaron en la Sección de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), en condiciones de bioseguridad animal nivel 3 (ABSL-3 por sus siglas en inglés) y siguiendo los lineamientos de la Comisión para Investigación con Animales (CINVA) bajo protocolo aprobado PAT-1834-16/19-1 con vigencia hasta el año 2021 y los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 sobre las Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Para los estudios *in vivo*, se utilizaron ratones BALB/c machos de 8 semanas de edad con peso aproximado de 22 gramos, proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ. Los ratones fueron alojados en condiciones controladas de temperatura, humedad, ciclos de luz/oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*. La infección se realizó por vía intratraqueal con la cepa de Mtb H37Rv Stanford. Brevemente, los animales se anestesiaron con vapor de sevoflurano (100  $\mu$ L por ratón) dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm para la inoculación intratraqueal, se colocaron sobre una placa de unisel revestida con aluminio y se sujetaron los incisivos con una liga de caucho, se introdujo por la tráquea una cánula de calibre 22 G x 1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm. A partir de la infección se mantuvo a los animales en un sistema de microaisladores (Allentown Air Flow System) con flujo constante y filtración de aire, garantizando que no hay intercambio de aire entre cajas ni con el medio exterior. Diariamente se registró el estado de los animales de los diferentes grupos para la construcción de las curvas de supervivencia.

### 5.2.1 FASE EXPERIMENTAL 1

Dos meses después de la infección con  $3.4 \times 10^6$  UFC de la cepa H37Rv Stanford, se inició el tratamiento semanal durante dos meses, por vía intranasal, con las MPAs (preparadas como se describe en Barrera-Rosales 2017) y/o los PFTs con una distribución de grupos experimentales como se muestra en la Figura 4. El tratamiento se administró por vía intranasal por goteo, con 250  $\mu$ g de MPAs por ratón, y/o con el cocktail de PFTs (P1, P4, P36) con 1  $\mu$ g de P1 y P36 y 0.5  $\mu$ g de P4, preparados en SSF en un volumen final de 10  $\mu$ L. Al finalizar la administración del tratamiento, se esperó uno y dos meses para el sacrificio y la toma de muestra. Cada ratón fue anestesiado con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal con una dosis de 210 mg/kg y sacrificado por exsanguinación. De cada animal se expuso la cavidad torácica de donde se colectaron los pulmones. Tres pulmones izquierdos por grupo se perfundieron vía intratraqueal con etanol absoluto y se colectaron en tubos Falcon de 50 mL por al menos 72 horas, para su posterior procesamiento y análisis histológico. Cuatro pulmones derechos por grupo (cuando fue posible) se colocaron en criotubos de 2 mL y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento para determinar la carga bacilar. Todos los procedimientos se realizaron dentro de un gabinete de flujo laminar en condiciones ABSL-3.





<b>Grupos</b>	<b>n</b>
Infectado (SSF)	18
Infectado tratado con MPAs + PFTs i.n	18
Infectado tratado con MPAs i.n. (250ug por ratón)	18
Infectado tratado con PFTs i.n. (1 ug de P1 y P36, 0.5 ug de P4)	18
Total de animales (*10 de supervivencia, 4 ratones por tiempo de sacrificio)	72
<b>Cantidad de MPAs administradas cada semana, durante 2 meses</b>	<b>8 dosis → 2 mg por ratón</b>
<b>Cantidad de PFTs administradas cada semana, durante 2 meses</b>	<b>P1 y P36 → 8 ug P4 → 4 ug</b>

**Figura 4.** Diseño experimental y distribución de grupos de la fase 1.

---

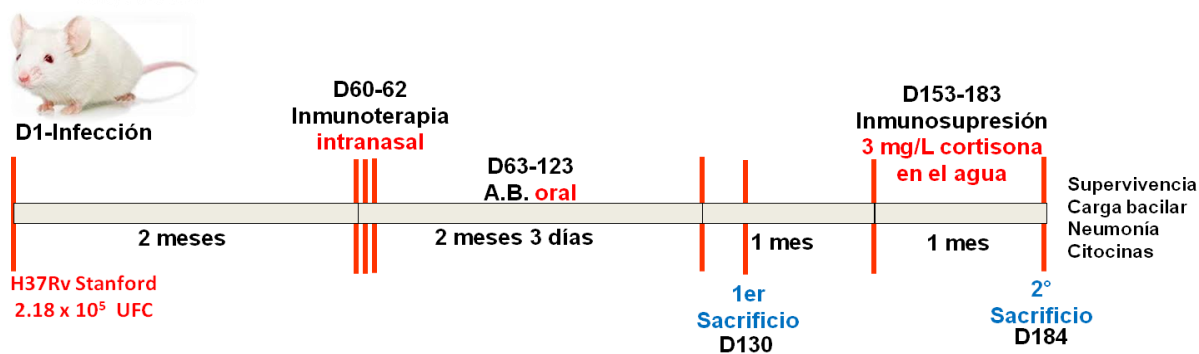
### 5.2.2 FASE EXPERIMENTAL 2

---

Para la fase experimental 2 el proceso de infección fue el mismo que se realizó para la fase 1, por vía intratraqueal con 218 mil UFC de H37Rv Stanford. Dado que para la fase 1 no se observaron diferencias significativas en la supervivencia, la carga bacilar y el desarrollo de neumonía, se propuso la segunda fase experimental con el esquema mostrado en la figura 5. Dos meses después de la infección, se administraron por vía intranasal 3 dosis repetidas de los grupos de inmunoterapia a los días 60, 61 y 62 post-infección, manteniendo las dosis que se administraron en la fase 1 tanto para MPAs como PFTs. Al siguiente día se comenzó el tratamiento convencional con antibióticos de primera línea (10 mg/kg de peso para la rifampicina y la isoniazida, y 30 mg/kg de peso de pirazinamida) administrados por vía intragástrica con ayuda de una cánula de calibre 22 G x 1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm, diariamente durante dos meses. Una semana después de finalizar el tratamiento con los antibióticos se realizó el primer sacrificio, considerando de 3 a 4 ratones por grupo. Cada ratón fue anestesiado, exanguinado y removidos y procesados sus pulmones como se detalla en

la sección anterior. Todos los procedimientos se realizaron dentro de un gabinete de flujo laminar en condiciones ABSL-3.

Del número total de ratones infectados se destinaron de 3 a 6 por grupo, para la fase de inmunosupresión. Al finalizar la inmunoterapia y el tratamiento con antibióticos de primera línea, se les administró cortisona (3 mg/L) en el agua de beber diariamente durante un mes, con el fin de suprimir la respuesta inmune Th1 y evaluar si los grupos que recibieron la inmunoterapia presentaban una menor reactivación de la enfermedad. Durante el período de administración se registró la supervivencia y al finalizar la administración de la cortisona, se realizó la segunda toma de muestras, siguiendo el protocolo de sacrificio previamente explicado, y se analizaron las muestras para carga bacilar en pulmón y el desarrollo de neumonía.



Grupos	n
Infectado (SSF)	13
Infectado tratado con antibióticos de primera línea (AB) diario, vía intragástrica, dos meses	13
Infectado tratado con MPAs + PFTs i.n. por 3 días consecutivos	13
Infectado tratado con MPAs + PFTs i.n., por 3 días consecutivos y AB diariamente por 2 meses	13
Infectado tratado con MPAs i.n., 3 días consecutivos y AB diariamente por 2 meses	13
Infectado tratado con PFTs i.n., 3 días consecutivos y AB diariamente por 2 meses	13
Total de animales	78
<b>Cantidad de MPAs administradas en dosis repetidas, 1 cada día por 3 días</b>	<b>3 dosis → 750 ug por ratón</b>
<b>Cantidad de PFTs administradas en dosis repetidas, 1 cada día por 3 días</b>	<b>3 dosis → 1.5 ug del P4 y 3 ug del P1 y P36</b>

AB: antibióticos de primera línea (Rifampicina, isoniazida, pirazinamida). MPAs+P: micropartículas de almidón + péptidos del factor de transferencia (en cocktail 1, 4, 36). MPAs: micropartículas de almidón. PFTs: cocktail de péptidos del factor de transferencia (1, 4 y 36).

**Figura 5.** Estrategia experimental y distribución de los grupos de la fase 2.

### 5.3 DETERMINACIÓN DE CARGA BACILAR EN PULMÓN

El recuento de Unidades formadoras de colonias (UFC) de Mtb se realizó siguiendo los protocolos de la Sección de Patología Experimental del INCMNSZ. Los pulmones derechos de los ratones se homogeneizaron con el equipo MP Biomedicals FastPrep-24, moliendo una vez en seco con una perla de cerámica y posteriormente agregando 1 mL de buffer PBS-5T (0.05% Tween 80 Sigma) estéril para moler de 3-5 veces más. Las muestras se sonicaron 45 segundos con el fin de disgregarlas y evitar sembrar cúmulos de bacterias y se procedió a hacer diluciones seriadas de cada homogeneizado para sembrar por goteo 10 µL, por duplicado en cajas con agar Middlebrook 7H10 (Difco Labs) preparado con 0.5% de glicerol (Sigma Aldrich) y

complementado con OADC (Oleic Albumin Dextrose Catalase). Las placas se incubaron durante 14 días a 37°C en incubadoras (Thermo Scientific) con CO<sub>2</sub> 5%, para el posterior conteo de colonias con el fin de determinar la cantidad total de UFC por pulmón.

Al día 21 de incubación, se registró el número de colonias en cada dilución y se procedió a realizar los cálculos para determinar los millones de UFC presentes por pulmón (como se describe en Barrera-Rosales, 2017).

#### 5.4 DETERMINACIÓN DE ÁREA AFECTADA POR NEUMONÍA Y GRANULOMAS

---

Pasadas mínimo 72 horas en etanol absoluto, los pulmones se diseccionaron por el hilo, se deshidrataron en pases sucesivos con etanol y xilol, y se embebieron en parafina. Tras la deshidratación y fijación, se realizó la inclusión en bloques de parafina para hacer los cortes histológicos en el microtomo (Leica RM2145), con un grosor de 4 µm. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E). Las áreas afectadas por la neumonía se midieron y analizaron mediante el sistema Leica QWin (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK, 25X). En cada caso se midió en µm<sup>2</sup> el área total y zonas neumónicas de cada pulmón y se calculó el porcentaje de pulmón afectado por neumonía.

Para el conteo de granulomas se usaron las mismas laminillas para cada grupo, buscando en todo el tejido para registrar el número de granulomas y medir su área mediante el mismo programa (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK, 25X). Una vez identificados los granulomas se tomó foto de cada uno y se midió el área.

#### 5.5 INMUNOHISTOQUÍMICA

---

Para la inmunohistoquímica, usando el micrótopo (Leica RM2145), se realizaron cortes de 3 µm de los tejidos embebidos en el bloque de parafina y se montaron en portaobjetos cargados (BioCare Medical REF SFH1103A LOTE 040616), se dejaron a temperatura ambiente sin mover durante toda la noche. Al día siguiente

de realizar los cortes, se colocaron los portaobjetos a 60°C durante 20 minutos, para eliminar el exceso de parafina del corte. Seguido de esto se procedió a hidratar las muestras gradualmente a través de incubaciones de 3 minutos en xileno, seguido de xileno-alcohol (1:1), alcohol absoluto, alcohol 96% y finalmente en agua destilada. Para el bloqueo de peroxidasa endógena se usó peróxido de hidrógeno al 40% con PBS 1x. Se realizaron 3 lavados en agitación durante 5 minutos con PBS Tween 20 0.05%. Posteriormente se rodeó el tejido con un plumón hidrofóbico para delimitar la zona en la que se encontrará el anticuerpo y evitar fuga del reactivo. Se agregaron 200 µL de Sniper (BioCare Medical REF BS966M LOTE 042417), por 20 minutos, en agitación para bloquear cualquier señal inespecífica. Las laminillas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y en agitación, con el correspondiente anticuerpo primario para cada citocina (Santa Cruz Biotechnology) a diferentes diluciones de acuerdo a la estandarización previa (tabla 5).

Para eliminar el exceso de anticuerpo, se realizaron 3 lavados continuos con PBS Tween 20 0.05%. Todos los anticuerpos primarios utilizados fueron hechos en conejo, por lo que el anticuerpo secundario que se usó fue el mismo para todas las muestras. Los cortes se incubaron durante 8 minutos con el kit de anticuerpo secundario Goat-on-rodent HRP Polymer REF GHP516H Lot. 032812 Biocare medical. Biotinilado (GP626H lot. 021612), seguido de 3 lavados y 8 minutos con estreptavidina (GH627H lot. 021612). Finalmente se reveló con diaminobencidina (DAB) (Vector Laboratories REF Sk-4105 LOT ZF0716), aproximadamente durante 3-5 minutos, hasta que era visible a simple vista la reacción. Tras la contratinción, las muestras se deshidrataron de nuevo de manera gradual por alcohol 96%, alcohol absoluto, xilol-alcohol (1:1), xilol y se montó con resina y se dejó reposar durante 48 h para su posterior análisis en el microscopio. Una vez en el microscopio se seleccionan 5 áreas distribuidas a lo largo del pulmón para tomar fotografías de donde se realizó el conteo correspondiente a las células totales vs células positivas para cada citocina, de manera que se obtiene el porcentaje de células positivas.

**Tabla 5.** Anticuerpos primarios para inmunohistoquímica.

<b>Citocina</b>	<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Dilución</b>
IFN $\gamma$	Goat polyclonal IgG Santa Cruz Biotechnology sc-1379	1:250
TNF $\alpha$	Goat polyclonal IgG Santa Cruz Biotechnology sc-1351	1:50
IL-12	Goat polyclonal IgG Santa Cruz Biotechnology sc-1283	1:250
IL-4	Goat polyclonal IgG Santa Cruz Biotechnology sc-1260	1:100

---

## 5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de las curvas de supervivencia se utilizó el análisis de Kaplan-Meier y la prueba de rango logarítmico (Log Rank Test). Los datos de UFC e histología se analizaron con el programa GraphPad Prism versión 6 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, expresando los resultados como el promedio  $\pm$  DE. La comparación entre grupos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con post-test Tukey. Las diferencias se consideraron significativas con  $p < 0.05$ .

---

## 6. RESULTADOS

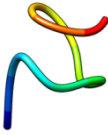


---

### 6.1 ANÁLISIS *IN SILICO*

---

Con la finalidad de conocerlas características bioquímicas, se realizaron análisis *in silico* de cada secuencia de los PFTs 1, 4 y 36, de las que se obtuvieron características como carga e hidropaticidad, y un modelo de su posible estructura secundaria (tabla 6).

**Tabla 6.** Análisis *in silico* de los péptidos 1, 4 y 36 del Factor de Transferencia. Análisis de estructura primaria con ProtParam ExPASy y Predicción de estructura hechas con el programa Scratch y Chimera

Péptido	Modelo de estructura secundaria (obtenido por Scratch y Chimera)	Carga e hidropatia
1 PM 1268.34 pI 3.56		2 residuos (-) (Asp) Hidrofílico
4 PM 1325.57 pI 6		1 residuo (-) (Glu) 1 residuo (+) (Arg) Ligeramente hidrofóbico
36 PM 1186.37 pI 4		1 residuo (-) (Glu) Hidrofóbico

Es de interés que los PFTs 4 y 36 tengan una estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice, dado que se ha reportado esta estructura aporta rigidez y mayor estabilidad a péptidos utilizados como adyuvantes o inmunoestimulantes, y protege de la degradación proteolítica (Wetzler & Hamilton, 2018). En cuanto a la hidropaticidad, se ha reportado que los péptidos con mayor hidrofobicidad tienen una mayor interacción con las membranas celulares (Prior *et al.*, 2002), por lo que el PFT 36 seguido del 4 es probable que tengan una mejor interacción con las células. Con estos resultados se podría decir que el PFT 1 no reúne las condiciones mínimas requeridas y que dada su estructura simple podría ser degradado fácilmente.

El análisis de secuencia con BLAST se realizó con tres diferentes bases de datos: No Redundante (NR), SwissProt y Protein Data Base (PDB), con el fin de buscar alguna relación con diferentes organismos, así como posibles proteínas homólogas de Mtb. Los resultados para cada péptido con las 3 bases de datos se presentan en la tabla 7. En este mismo análisis, se realizó un BLAST restringido a proteínas de Mtb (Tabla 7B), con el fin de observar si existe identidad con alguna proteína, lo cual resultaría de sumo interés ya que podría generar una respuesta Ag específica.

**Tabla 7.** Análisis BLAST de los péptidos 1, 4 y 36 del Factor de Transferencia. Bases de datos usadas: No redundante (NR), Swissprot y Protein Data Base (PDB) **A.** BLAST sin restricción a Mtb. **B.** BLAST restringido a Mtb.

**A.** BLAST general

Base de datos	P1	P4	P36
NR	<p><b><u>Growth/differentiation factor 7 isoform 1 preprotein [Mus musculus]</u></b></p> <p><b><u>Max score: 40.5</u></b></p> <p><b><u>Query cover: 100%</u></b></p> <p><b><u>E-value: 0.009</u></b></p> <p><b><u>Ident: 100%</u></b></p>	<p>Two pore calcium channel protein 2 isoform X1 [Mus musculus]</p> <p>Max score: 39.7</p> <p>Query cover: 100%</p> <p>E-value: 0.018</p> <p>Ident: 100%</p>	<p><b><u>Hypothetical protein Z584 00710 [Mycobacterium tuberculosis variant bovis B2 7505]</u></b></p> <p><b><u>Max score: 38.8</u></b></p> <p><b><u>Query cover: 100%</u></b></p> <p><b><u>E-value: 0.032</u></b></p> <p><b><u>Ident: 100%</u></b></p>
SwissProt	<p><b><u>RecName: Full=Growth/differentiation factor 7; Short=GDF-7; Flags: Precursor [Mus musculus]</u></b></p> <p><b><u>Max score: 40.5</u></b></p> <p><b><u>Query cover: 100%</u></b></p> <p><b><u>E-value: 2e-04</u></b></p> <p><b><u>Ident: 100%</u></b></p>	<p><u>RecName: Full=Two pore calcium channel protein 2; AltName: Full=Voltage-dependent calcium channel protein TPC2 [Mus musculus]</u></p> <p><u>Max score: 39.7</u></p> <p><u>Query cover: 100%</u></p> <p><u>E-value: 4e-05</u></p> <p><u>Ident: 100%</u></p>	<p>RecName: Full=D-alanine-D-alanine ligase; AltName: Full=D-Ala-D-Ala ligase; AltName: Full=D-alanylalanine synthetase [Pseudomonas mendocina ymp]</p> <p>Max score: 28.6</p> <p>Query cover: 91%</p> <p>E-value: 0.3</p> <p>Ident: 90.91%</p>
PDB	<p>Chain A, methyl-accepting chemotaxis protein, putative [Geobacter sulfurreducens PCA]</p> <p>Max score: 23.1</p> <p>Query cover: 91%</p> <p>E-value: 4.7</p> <p>Ident: 72.73%</p>	<p><u>Chain A, two pore calcium channel protein 2 [Homo sapiens]</u></p> <p><u>Max score: 33.7</u></p> <p><u>Query cover: 91%</u></p> <p><u>E-value: 7e-04</u></p> <p><u>Ident: 90.91%</u></p>	<p>Chain A, probable dipeptidyl-peptidase 3 [Saccharomyces cerevisiae]</p> <p>Max score: 24</p> <p>Query cover: 58%</p> <p>E-value: 2.3</p> <p>Ident: 100%</p>

**B.** BLAST restringido a Mtb

Base de datos/péptido	P1	P4	P36
-----------------------	----	----	-----



<b>NR</b>	Hypothetical protein X011 00885 [ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> variant microti OV254] Max Score: 24.4 Query cover: 91% E value: 14 Ident: 63%	Probable transferase [ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> str. Kurono] Max Score: 25.2 Query cover: 75% E value: 6.8 Ident: 89%	<a href="#">Hypothetical protein Z584-00710 [<i>Mycobacterium tuberculosis</i>]</a> <a href="#">Max Score: 38.8</a> <a href="#">Query cover: 100%</a> <a href="#">E value: 8e-05</a> <a href="#">Ident: 100%</a>
<b>SwissProt</b>	RecName: Full=Dormancy associated translation inhibitor Max Score: 22.3 Query cover: 50% E value: 0.31 Ident: 100%	RecName: Full=Putative mycofactocin system creatinine amidohydrolase family protein MftE Max Score: 21.8 Query cover: 66% E value: 0.44 Ident: 88%	RecName: Full=Uncharacterized protein Mb2597 Max Score: 24 Query cover: 66% E value: 0.76 Ident: 88%
<b>PDB</b>	Chain A, Crystal structure Analysis of N terminal región containing the dimerization domain and DNA binding domain of HU protein (Histone like protein-DNA binding) from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> [H37Rv] Max Score: 18.9 Query cover: 41% E value: 1.9 Ident: 100%	Chain A, Crystal structure of intern Domain of Proteasome-Associated ATPase, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Max Score: 20.2 Query cover: 83% E value: 0.67 Ident: 41%	Chain A, X-ray structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, Dxr, Rv2870c, from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Max Score: 22.7 Query cover: 83% E value: 0.081 Ident: 64%

En el BLAST sin restricción a Mtb, el análisis para el PFT 1 con la base de datos de SwissProt arrojó un valor E muy bajo, con 100% de cobertura y 100% de identidad con el factor de crecimiento/diferenciación 7 del ratón común, lo que indica que esta secuencia está relacionada. Para el BLAST restringido a Mtb no se encontró una relación estrecha dados los valores obtenidos de E y % de cobertura e identidad.

El PFT 4 en el análisis de BLAST no restringido a Mtb, en las 3 bases de datos coincide con la proteína 2 del canal de Ca<sup>2+</sup> (ya sean isoformas o la cadena A (PDB)), con porcentajes de cobertura e identidad entre 90 y 100, y un valor E bajo, para organismos como el ratón y el humano. Esta proteína se le ha descrito la función en la señalización mediada por Ca<sup>2+</sup> desde la contracción muscular, la regulación

transmembranal del transporte de iones, regulación de la autofagia y organización del lisosoma (Uniprot). En cuanto al BLAST restringido a Mtb para el PFT 4 los valores de E son muy altos y los porcentajes de cobertura e identidad son bajos, lo que indica que no hay relación entre estas secuencias.

Para el PFT 36 los análisis de BLAST sin restricción a Mtb y el restringido a Mtb en cuanto a la base de datos NR, arrojan que hay una posible relación con una proteína hipotética de Mtb, dados los porcentajes de cobertura e identidad, así como un valor E bajo. Sin embargo en esta base de datos, de las proteínas registradas no necesariamente se ha caracterizado su función biológica, por lo que es de interés profundizar el estudio de este P36.

A partir de la base de datos con Immune Epitope Database and Analysis Resource se realizó un análisis de predicción de cargado de los péptidos en MHC. Este análisis permite, basado en la secuencia alimentada, determinar la capacidad del péptido de unirse específicamente a una molécula de MHC por familia y alelo (tabla 8).

**Tabla 8.** Análisis de unión a MHC

Péptido	Unión MHC-I Humano	Unión MHC-II Humano	Unión MHC-I Ratón	Unión MHC-II Ratón
1	Ninguno	No se pueden analizar de forma separada porque se requieren mínimo 15 aminoácidos	Ninguno	No se pueden analizar de forma separada porque se requieren mínimo 15 aminoácidos
4	HLA-A*02:03, HLA-B*07:02, HLA-A*02:06		H-2-Kk	
36	HLA-A*26:01, HLA-B*44:02, HLA-B*35:01, HLA-B*07:02, HLA-B*44:03		H-2-Kk H-2-Db	
1+4+36	Los anteriores más: HLA-A*01:01 para P1 HLA-A*01:01 para P4 HLA-A*02:03 para P36	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01, HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02, HLA-QA1*01:02/DQB1*06:02; HLA-QA1*03:01/DQB1*03:02; HLA-QA1*04:01/DQB1*04:02, HLA-QA1*05:01/DQB1*03:01; HLA-DRB1*01:01, HLA-RB1*03:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*08:02, HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB3*02:02, HLA-DRB5*01:01	H-2-Kk H-2-Db	Solo con secuencias de P4 y P36 H2-IAd H2-IAd

HLA-A, HLA-B y HLA-C son genes que codifican para las cadenas pesadas de moléculas de MHC clase I (Choo, 2007). Las moléculas de MHC clase II tienen una serie de subregiones, cada una con genes A y genes B que codifican para las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente. Tienen una familia de genes DR que consiste en un gen DRA y 9 DRB (DRB1-9) (Choo, 2007). El análisis de unión a MHC se realizó contra ratón y humano (HLA), ya sea con las secuencias de cada péptido por separado o juntos ya que para MHC clase II se requieren mínimo 15 aminoácidos. El análisis arroja que los PFTs 4 y 36 se pueden unir a MHC clase I de ratón y a HLA de humano, en diferentes regiones. Para el PFT 1 al analizarse por separado no se encontró posible unión con alguna molécula de MHC de la base de datos. Esto es de interés dado que el análisis *in silico* sugiere que por lo menos los PFT 4 y 36 podrían ser cargados en MHC-I por lo que podrían ser presentados a los linfocitos CD8+ y generar una respuesta inmune celular, la cual se busca inducir preferentemente en infecciones con microorganismos intracelulares como la tuberculosis.

Dadas sus características fisicoquímicas y los resultados de BLAST y de unión a MHC, el PFT 4, y sobre todo el PFT 36, reúnen condiciones mínimas que se buscan en un péptido con funciones terapéuticas por lo cual se recomienda seguir investigando su potencial terapéutico para esta enfermedad en posteriores estudios.

---

## 6.2 FASE EXPERIMENTAL 1

---

### 6.2.1 SUPERVIVENCIA

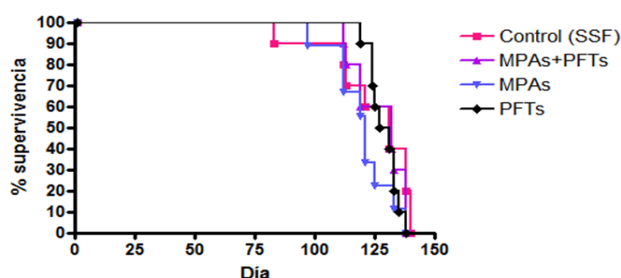
---

La figura 6 muestra la supervivencia de los ratones por cada grupo durante la fase experimental 1 que en total duró 6 meses. En todos los casos la supervivencia de los animales fue semejante tal y como lo indica la mediana de supervivencia (MS). Esta medición representa el tiempo en el que la mitad de los ratones por grupo aún estaba con vida durante la infección, tras recibir los diferentes tratamientos. Para el grupo control la MS fue de 131 días, para el grupo que recibió las MPAs en conjunto con los PFTs de 132 días, siendo muy similar a la observada para el grupo control. El grupo al que se le administró solo las MPAs tuvo una MS de 121 días, mientras que para el

grupo que recibió los PFTs fue de 129 días. Los ratones del grupo control comenzaron a morir primero y murieron en un lapso de 56 días. El grupo de ratones que recibieron solo las MPAs empezaron a morir después del control, en un lapso de 41 días. El grupo que recibió la combinación de MPAs y PFTs murió en un lapso de 26 días. Por su parte los ratones del grupo de PFTs comenzaron a morir después de los otros grupos, sin embargo murieron en un lapso de tan solo 21 días.

Estos resultados indican, que por si sola la inmunoterapia con las MPAs y los PFTs tanto de forma individual como en combinación, no tuvo ningún efecto en el control de la enfermedad en términos de supervivencia después de la infección bajo este esquema de administración y dosis.

**Supervivencia a la infección con  $3.4 \times 10^5$  UFCs H37Rv Stanford**



**Figura 6.** Curva de supervivencia de los grupos infectados con la cepa H37Rv Stanford de Mtb y tratados con la inmunoterapia sin antibiótico

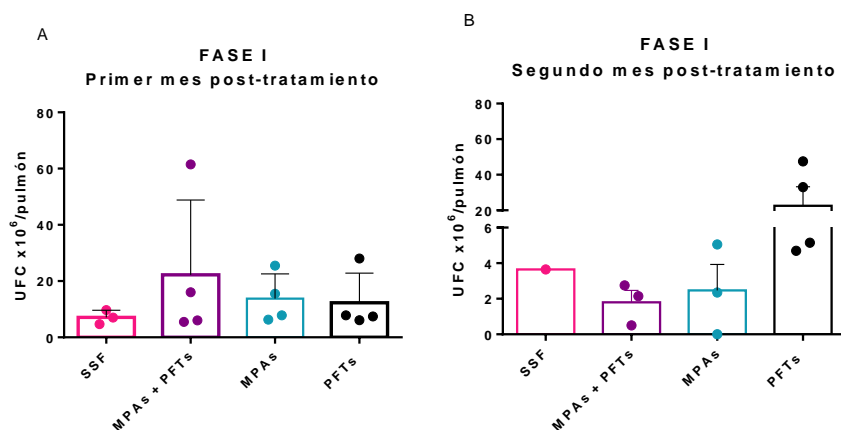
---

## 6.2.2 CARGA BACILAR EN PULMÓN

---

La carga bacilar en pulmón de los ratones de todos los grupos al mes y los dos meses de haber terminado el tratamiento se muestra en la figura 7. Para el primer mes post-tratamiento se puede observar que la carga bacilar en los 4 grupos es bastante similar, con la excepción de un ratón en el grupo que recibió las MPAs con PFTs cuya carga bacilar excede los 60 millones. Para el segundo mes post-tratamiento, se observó una menor carga bacilar tanto en el grupo control como en los grupos que recibieron MPAs con PFTs y solo las MPAs. Para el grupo que recibió solo los PFTs se

observó mayor carga bacilar en comparación con el primer mes post-tratamiento, con cuentas variables entre 4 y 47.5 millones.



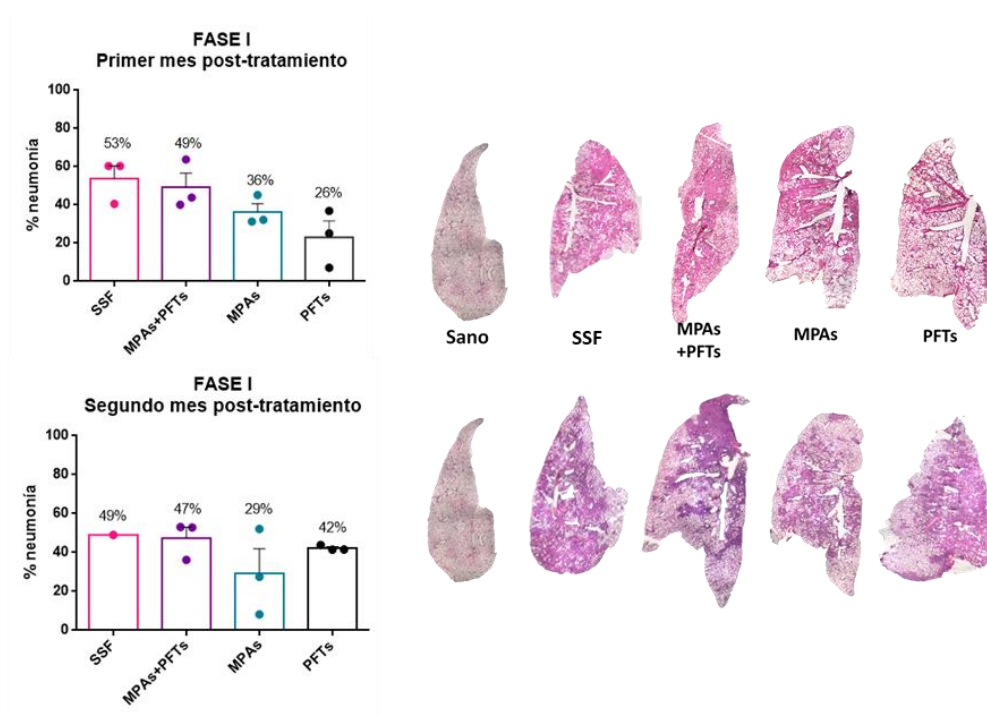
**Figura 7.** Carga bacilar en pulmones de ratones infectados con Mtb cepa H37Rv Stanford, al primer (A) y segundo mes post-tratamiento (B) con la inmunoterapia sin antibiótico

De este resultado se puede concluir que en concordancia con lo observado en el análisis de supervivencia, la administración de las MPAs y los PFTs administrados por separado o en combinación no tuvo efecto sobre el control de la infección en el pulmón. Al segundo mes post tratamiento, la mayor carga bacilar en el grupo que recibió los PFTs podría explicar por qué en este grupo, si bien los animales empezaron a morir después que los otros grupos al final murieron en menor tiempo.

### 6.2.3 PRESENCIA DE NEUMONÍA

Los pulmones de cada grupo de ratones obtenidos en los tiempos de sacrificio se analizaron para determinar el porcentaje de área de pulmón afectado por neumonía, los resultados se presentan en la figura 8. Para el primer mes post-tratamiento, se observa menos neumonía en los grupos tratados con respecto al grupo control siendo el porcentaje más bajo para el grupo que recibió los PFTs. Para el segundo mes post-tratamiento, el porcentaje de neumonía se mantiene similar y sin diferencia estadística entre los grupos, siendo menor para el grupo tratado solo con las MPAs. Excepto para el grupo que recibió los PFTs los porcentajes de neumonía en

todos los grupos al segundo mes post-tratamiento parecen no correlacionar con los niveles de carga bacilar, excepto por el alto nivel de virulencia de la cepa de infección.

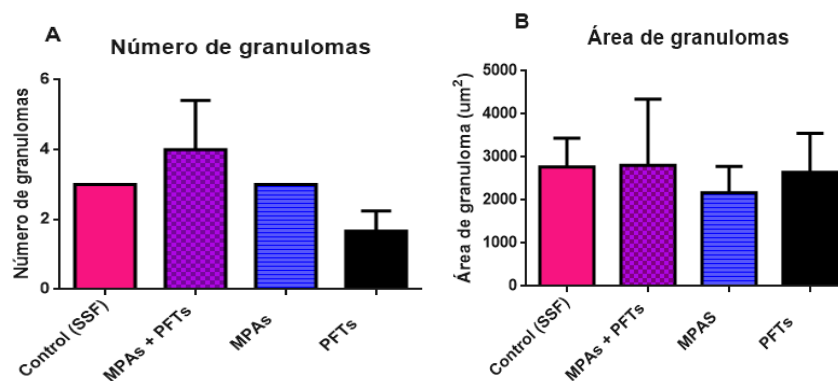


**Figura 8.** Porcentaje de neumonía en pulmones de ratones infectados con *Mtb* cepa H37Rv Stanford y tratados con la inmunoterapia sin antibiótico

#### 6.2.4 GRANULOMAS

Los granulomas son estructuras nodulares formadas por macrófagos y linfocitos, cuya función es contener a las bacterias y evitar su propagación. Sin embargo, su presencia puede resultar controversial ya que se ha descrito una constante dinámica entre las células que los constituyen, puesto que se pueden reclutar macrófagos que fagocitan a las micobacterias pero además pueden migrar a otras áreas pulmonares permitiendo su diseminación (Ramos-Espinosa *et al*, 2018). En la figura 9, se detalla el número y área promedio de los granulomas para cada grupo experimental al segundo mes post-tratamiento. El grupo que recibió la inmunoterapia combinada presenta un mayor número de granulomas (en promedio 8 granulomas) en comparación con el grupo que no recibió tratamiento (3 granulomas)

(Figura 9A). En cuanto al área, sin embargo todos los granulomas son bastante similares (Figura 9B). Para los demás grupos de tratamiento la diferencia con el control es de 3 y 2 granulomas, en los grupos tratados con las MPAs y con los PFTs, respectivamente, con áreas también muy similares con un rango de 2200 a 2800  $\mu\text{m}^2$ . La observación más importante de este análisis es que el tratamiento con la inmunoterapia combinada puede generar un mayor número de granulomas sin generar un área mayor en éstos. Dado el papel que tienen los granulomas como una estructura de contención se esperaría que los granulomas fueran de menor tamaño ya que esto podría significar que hay pocas bacterias en su interior, disminuyendo así el riesgo de reactivación de la enfermedad dada la dinámica que existe en las células que pueden fungir también como un caballo de troya. En este tiempo de sacrificio el porcentaje de neumonía del grupo que recibió la inmunoterapia combinada fue en promedio de 47% siendo el grupo con más granulomas por grupo, lo que indicaría que los granulomas, que están formados por macrófagos y linfocitos, estarían generando una mayor inflamación reflejado a su vez en un mayor porcentaje de neumonía.



**Figura 9.** Número y área de granulomas para cada grupo experimental a los 2 meses post-tratamiento con la inmunoterapia sin antibiótico.

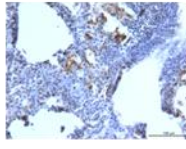
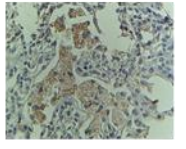
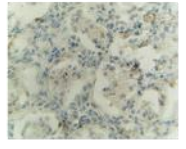
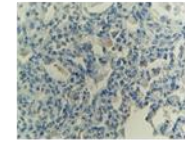
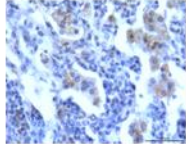
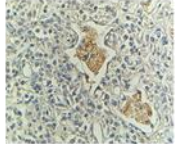
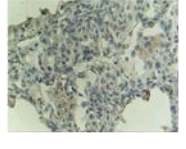
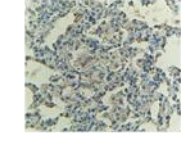
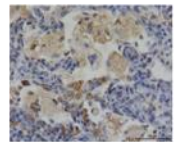
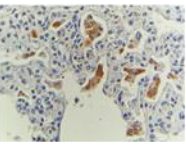
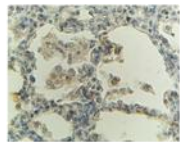
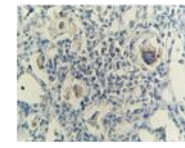
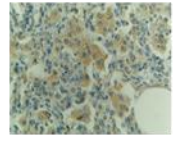
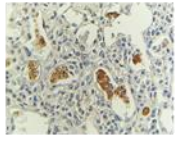
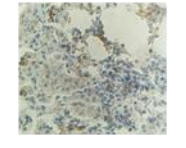
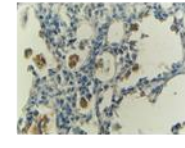
---

### 6.2.5 INMUNOHISTOQUÍMICA

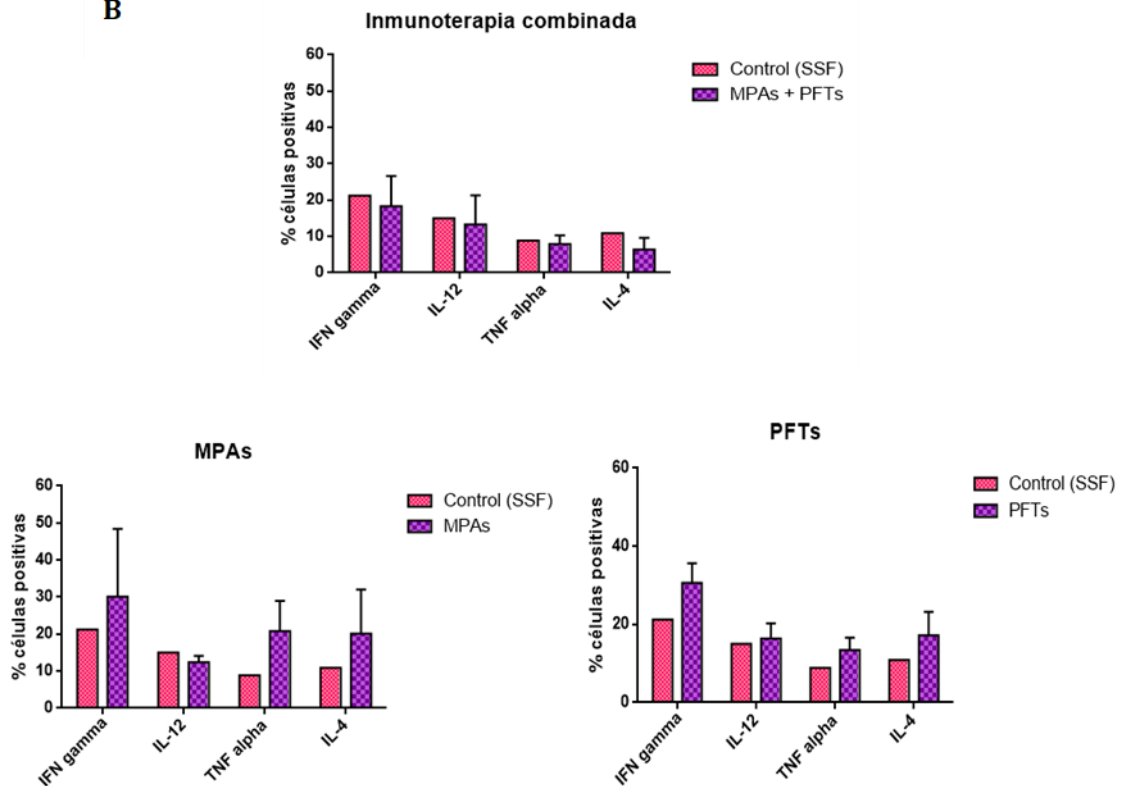
---

Para cada grupo de tratamiento se realizó un análisis de producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias mediante inmunohistoquímica (IHQ), con el fin de evaluar que tanto influyó el tratamiento administrado bajo este esquema en la inducción de una respuesta Th1 que es la respuesta protectora contra la enfermedad. Para esto se analizaron IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 como citocinas pro-inflamatorias, e IL-4 de las citocinas anti-inflamatorias. En la figura 10A se pueden observar imágenes representativas para cada grupo y citocina y en la figura 10B el porcentaje de células positivas para cada grupo en comparación con el grupo control de SSF. Para el grupo de la inmunoterapia combinada, el porcentaje de células positivas resulta muy similar al grupo control, incluso menor para cada una de las citocinas, lo que indica que la adición de estas moléculas combinadas bajo este esquema no generó una respuesta inmune diferente a la inducida solo por la infección. En ambos grupos y con cerca del 20% la citocina más elevada fue el IFN- $\gamma$  indicativo de la respuesta inflamatoria inducida por el microorganismo. En comparación con el grupo control, el grupo que solo recibió las MPAs presenta mayor producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4 lo cual sería indicativo de una respuesta mixta Th1/Th2 como se espera en estados avanzados de la infección. Es importante resaltar que los porcentajes de células positivas para estas citocinas fueron un poco más altos que los obtenidos en el grupo que recibió los PFTs que también muestra una respuesta Th1/Th2. Particularmente se observa mayor producción de TNF- $\alpha$ , citocina que se ha reportado pueden inducir los sistemas particulados. A diferencia del grupo de solo MPAs, en el grupo de los PFTs se observó un discreto aumento de IL-12, sin embargo, el perfil general no muestra cambio, ni impacta en la mortalidad o UFC de los animales.



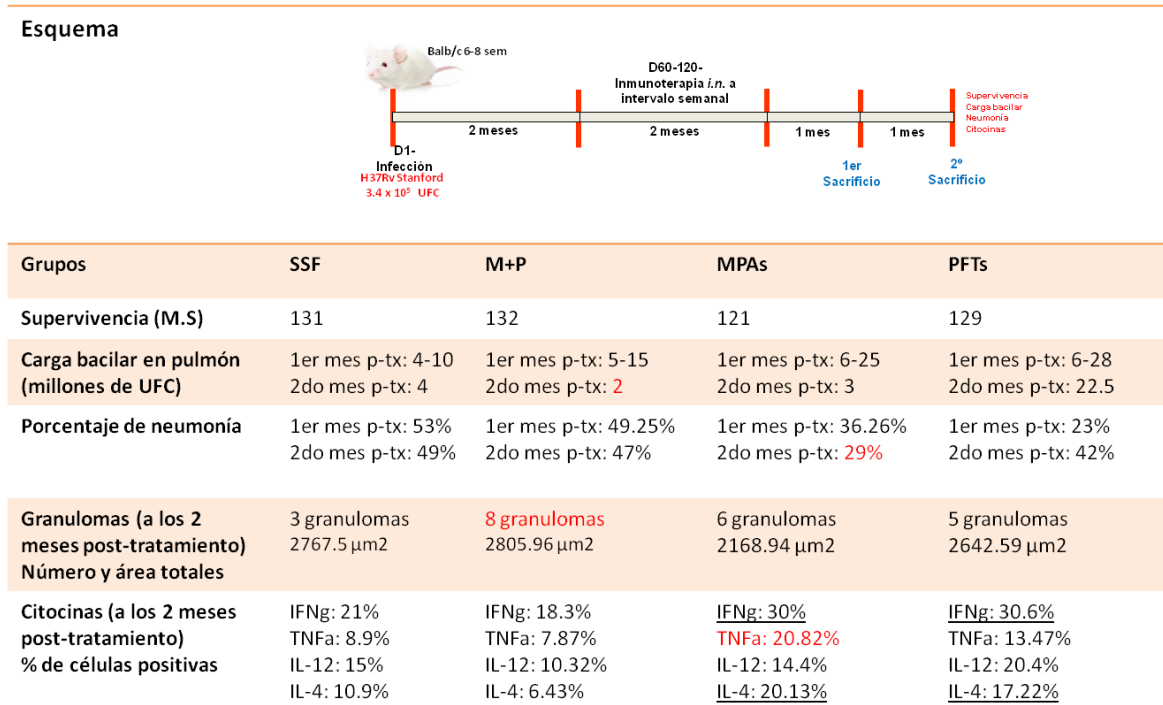
A	Grupo	IFN gamma	IL-4	TNF alpha	IL-12
	SSF				
	MPAs +PFTs				
	MPAs				
	PFTs				

B



**Figura 10.** Análisis de citocinas por inmunohistoquímica. **(A)** Cortes histológicos de pulmón de ratones infectados durante 180 días con Mtb cepa H37Rv Stanford y tratados con MPAs, PFTs y la combinación de ambas. **(B)** Porcentaje de células positivas para cada tratamiento en comparación con el control.

En resumen y como se detalla en la figura 11, podemos concluir que la inmunoterapia combinada con MPAs y PFTs, administrada bajo este esquema y sin antibiótico parece anular el potencial efecto terapéutico o inmunomodulador que por separado puedan tener estas moléculas. Resulta importante resaltar también que con un esquema tan largo, fue complicado diferenciar la respuesta inmune inducida por la sola infección de aquella inducida con la administración de estas moléculas, por lo cual se propuso un esquema más corto, con dosis más bajas, y en combinación con antibióticos.



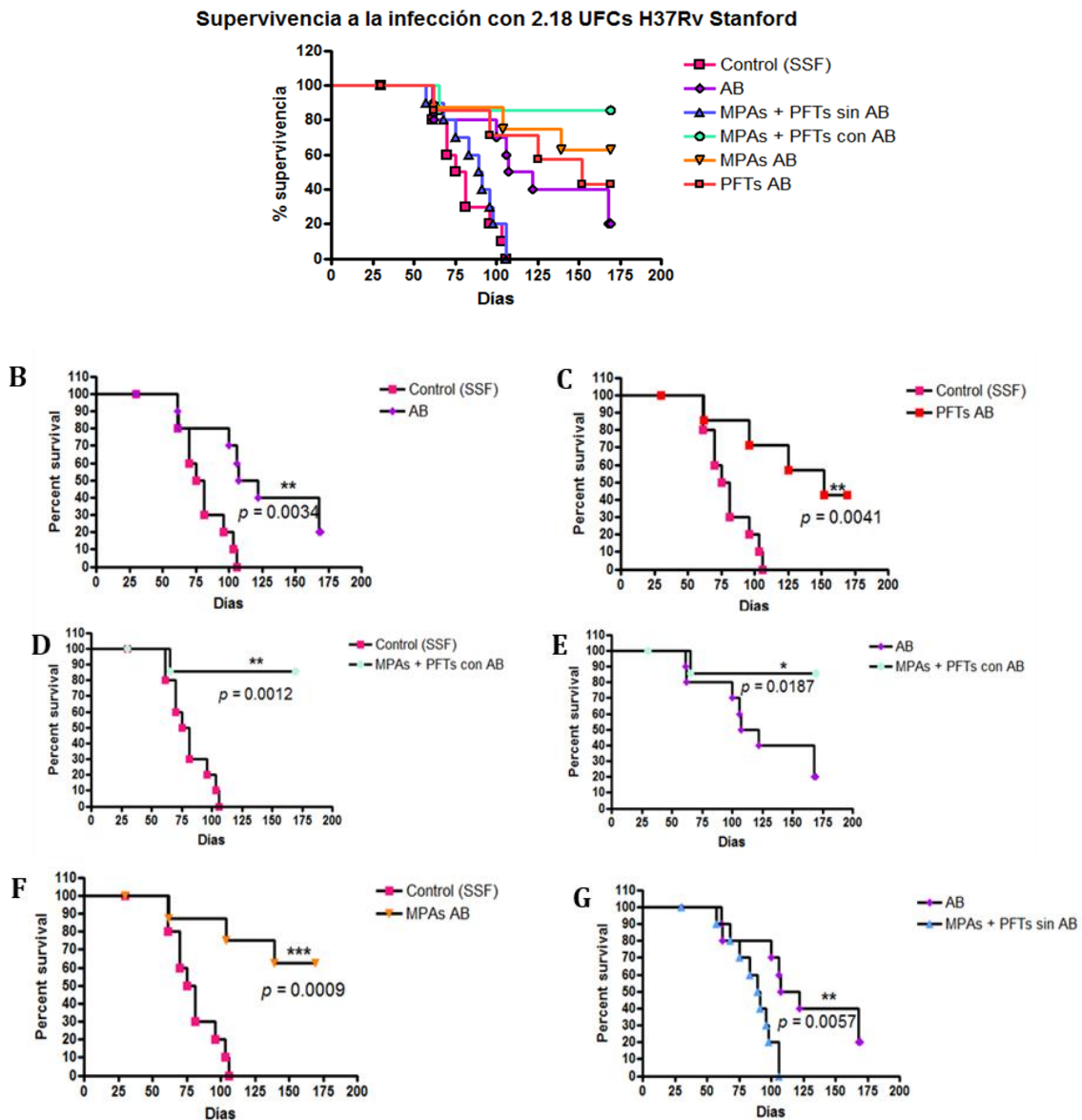
**Figura 11.** Resumen de resultados de la fase experimental 1.

## 6.2 FASE EXPERIMENTAL 2

### 6.2.1 SUPERVIVENCIA

La curva de supervivencia de todos los grupos de la segunda fase experimental, también con una duración de 6 meses, se muestra en la figura 12. No se observó diferencia entre los grupos sin AB (SSF y MPAs+PFTs sin AB) por lo que en la figura 12B se detalla la comparación de los grupos de inmunoterapia + AB y el grupo control

con AB. En todos los casos se presenta el respectivo valor estadístico tras realizar el análisis de Log Rank Test. Las primeras muertes en algunos grupos se registraron antes de iniciar los tratamientos debido a la alta virulencia del lote utilizado para la infección, por lo que en algunos grupos se ajustó el 100% de supervivencia al número de animales vivos al iniciar los tratamientos.



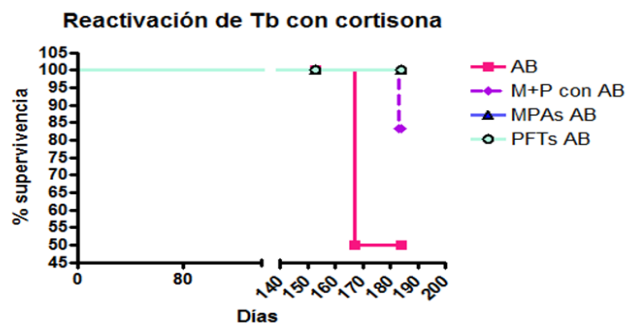
**Figura 12.** Curvas de supervivencia de cada grupo de la segunda fase experimental infectados con *Mtb* cepa H37Rv Stanford y tratados con la inmunoterapia y antibióticos de primera línea. Valor de *p* considerado como significativo  $p < 0.05$ .

De este análisis de supervivencia podemos concluir que la administración de la inmunoterapia combinada administrada en el esquema de 3 dosis repetidas, en conjunto con los antibióticos de primera línea, aumentan la supervivencia de los ratones. Esta diferencia es significativa ( $p = 0.0187$ ) en comparación con el grupo que solo recibió los antibióticos, en el que se registró 20% de supervivencia al día 169 post-infección vs 85.7% de supervivencia registrada para el grupo que recibió la inmunoterapia combinada con antibióticos.

Después de un mes de finalizar el tratamiento con antibióticos, se comenzó a administrar cortisona (3 mg/L de agua), diariamente durante un mes, con el fin de inmunosuprimir a los ratones y así reactivar la TB. En la tabla 9 se detalla el número de animales con que se inició el mes de inmunosupresión (al día 153 de infección) y el número de animales al final (día 184 de infección). Podemos concluir que la administración de la inmunoterapia combinada junto con los antibióticos aumentó la supervivencia en comparación con el grupo que solo recibió los antibióticos (Figura 13), comportamiento que se observó también al inicio de esta fase experimental. De igual manera, se extendió la supervivencia de los grupos que recibieron la inmunoterapia por separado, tanto el grupo que recibió las MPAs como el grupo que recibió los PFTs, el número de animales fue el mismo que se registró al iniciar la inmunosupresión, manteniendo el 100% de supervivencia durante todo el mes, lo que evidencia el potencial inmunoestimulante que posee cada molécula por separado.

**Tabla 9.** Número de ratones inicial y final para cada grupo, durante la inmunosupresión.

<b>Grupo</b>	<b>No. de ratones al inicio de la inmunosupresión</b>	<b>No. de ratones al final de la inmunosupresión</b>
Antibióticos	4	2 (50%)
M+P con antibióticos	6	5(83%)
MPAs con antibióticos	3	3 (100%)
PFTs con antibióticos	3	3 (100%)



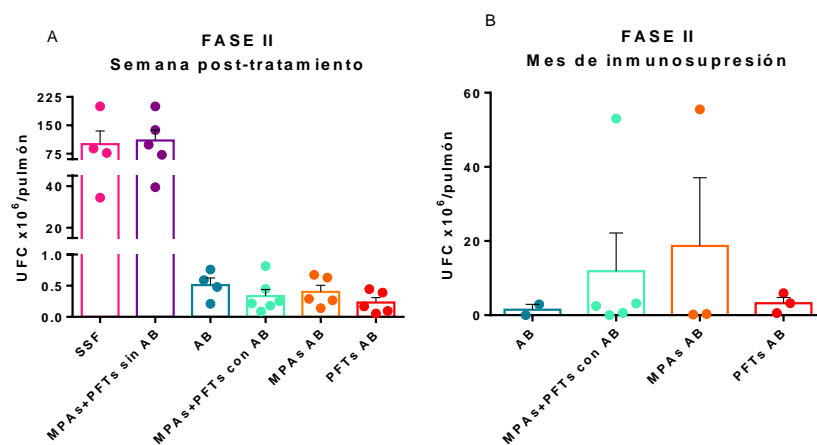
**Figura 13.** Curva de supervivencia durante la inmunosupresión (reactivación de la tuberculosis) para los grupos tratados con la inmunoterapia y antibióticos de primera línea.

### 6.2.2 CARGA BACILAR EN PULMÓN

La carga bacilar en pulmón para la primera semana post-tratamiento se muestra en la figura 14. La administración de la sola inmunoterapia no disminuye la carga bacilar en pulmón, siendo muy similar al control de SSF. Esta observación es consistente con lo que se observó en la primera fase experimental, en la que independientemente del esquema en que se administre, la inmunoterapia en ausencia de antibióticos no disminuye la carga bacilar. Por su parte, los grupos que recibieron antibióticos tienen carga bacilar muy similar. El grupo control que solo recibió antibióticos se observó un promedio de 500 mil UFC, el grupo que recibió la inmunoterapia combinada más antibióticos en promedio tuvo 270 mil UFC, 470 mil UFC en el grupo que recibió las MPAs con antibióticos y 210 mil UFC para el grupo que recibió los PFTs con antibióticos. Estos resultados implican que la adición de la inmunoterapia sí tiende a disminuir la carga bacilar en pulmón, al registrar en promedio un menor número de UFC en pulmón en comparación con el grupo que solamente recibió la inmunoterapia. Tras realizar el análisis estadístico, no se observan diferencias significativas entre los grupos, pese a que si es menor la carga bacilar en los ratones que recibieron la inmunoterapia en conjunto con los antibióticos, consistente con la mayor supervivencia observada en los grupos.

Desafortunadamente, aún no se ha logrado que el tratamiento con antibióticos resulte en una eliminación esterilizante de los bacilos, por lo que en pacientes

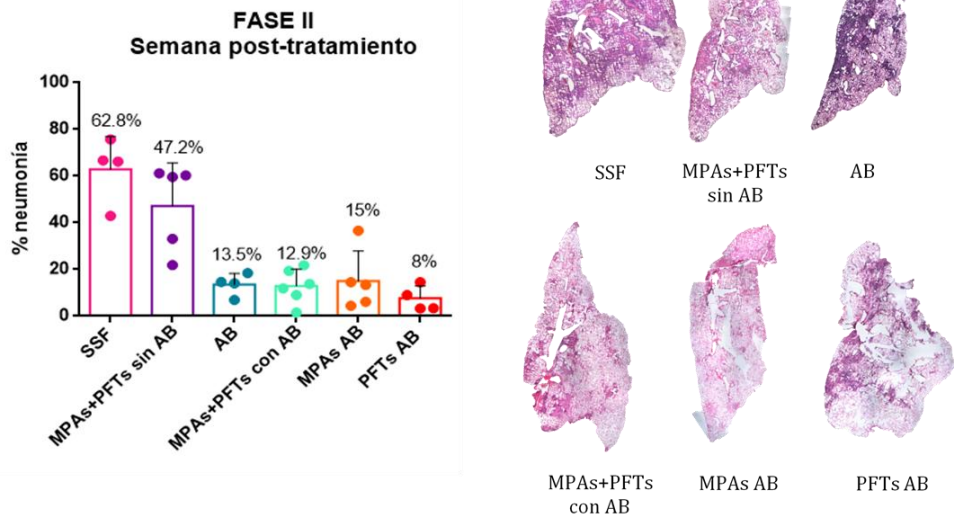
enfermos resulta riesgosa una posterior inmunosupresión, ya que se puede reactivar la enfermedad por los bacilos aún presentes en el organismo. Por este motivo es de relevancia seguir explorando potenciales inmunoterapias que permitan disminuir las dosis de los antibióticos y el tiempo de su administración a la vez que se logra la completa eliminación de Mtb en el organismo. En la segunda fase experimental de este trabajo se llegó a una fase de inmunosupresión para evaluar si la administración de la inmunoterapia además de influir en la supervivencia, la carga bacilar y el desarrollo de neumonía, implicaba una menor o nula reactivación de la enfermedad. En esta fase, la carga bacilar en los grupos aumenta debido a que se suprime la respuesta inflamatoria tras la administración diaria de cortisona, por vía oral durante 1 mes, por lo que los bacilos que no fueron eliminados reactivan la enfermedad. Para el grupo control que solo recibió los antibióticos, la carga bacilar registrada fue en promedio de 1.46 millones de UFC, mientras que el grupo que recibió las MPAs en conjunto con los PFTs tuvo 1.58 millones de UFC. El grupo que recibió las MPAs por separado tuvo una gran variación, dos ratones tuvieron un promedio de 255 mil UFC pero un animal tuvo una carga de 55.5 millones de UFC. El grupo que recibió los PFTs con los antibióticos tuvo en promedio 9.74 millones de UFC, también con una gran dispersión en los datos.



**Figura 14.** Carga bacilar en pulmones de ratones infectados con Mtb cepa H37Rv Stanford y tratados con inmunoterapia y antibióticos de primera línea **(A)** A la semana post-tratamiento. **(B)** Al terminar la inmunosupresión.

### 6.2.3 PRESENCIA DE NEUMONÍA

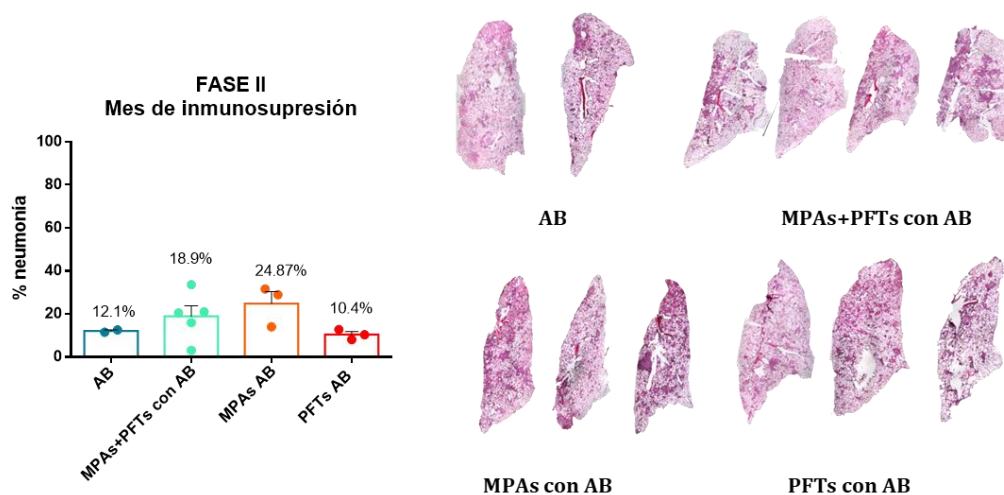
El porcentaje de área afectada por neumonía en cada grupo experimental se muestra en la figura 15. Se puede observar que el grupo que recibió la inmunoterapia combinada sin antibióticos tiene un porcentaje menor (47.23%) que el grupo que no recibió tratamiento (62.88%), lo que es indicativo que la adición de estas moléculas no contribuye per sé al desarrollo de neumonía. Por su parte los grupos que recibieron la inmunoterapia y los antibióticos, mantuvieron porcentajes de entre 8 y 15% de neumonía siendo el grupo de PFTs el que tuvo menos neumonía (8%), seguido del grupo que recibió la inmunoterapia combinada (12.9%).



**Figura 15.** Desarrollo de neumonía en pulmones de ratones infectados con Mtb cepa H37Rv Stanford, a una semana de finalizar el tratamiento con la inmunoterapia y antibióticos de primera línea.

Tras la inmunosupresión, el desarrollo de neumonía (figura 16) aumentó en todos los grupos excepto en el grupo que recibió el solo antibiótico y cuyo porcentaje de neumonía bajó ligeramente de 13.5 a 12.21%. El grupo que recibió la inmunoterapia combinada más antibióticos presentó un 18.9% de neumonía (5.98% más que en el primer mes post-tratamiento), el grupo que recibió las MPAs con antibióticos un 24.9% (9.9% más que en el primer mes post-tratamiento) y el grupo

que recibió los PFTs con antibióticos 10.4% (2.4% más que en el primer mes post-tratamiento). Estos datos resultan consistentes con los de carga bacilar en pulmón. Debido a que en el grupo control de esta parte experimental (antibióticos), solo contábamos con 2 datos, no se pudo realizar un análisis estadístico. En este bloque podemos destacar que el grupo que tuvo menor porcentaje de neumonía fue el grupo que recibió los PFTs con antibióticos.



**Figura 16.** Desarrollo de neumonía en pulmones de ratones infectados con Mtb cepa H37Rv Stanford, tratados con antibióticos, inmunoterapia combinada más antibióticos, MPAs con antibióticos y PFTs con antibióticos al finalizar la inmunosupresión con cortisona.

En la figura 17 se resumen los resultados obtenidos en la segunda fase experimental, en la que se destaca que tanto para la semana post-tratamiento como después de la inmunosupresión, la inmunoterapia combinada en conjunto con los antibióticos aumenta significativamente la supervivencia de los ratones. En cuanto a la carga bacilar y porcentaje de neumonía se mantienen similar entre los grupos que recibieron antibióticos, con una tendencia a ser menor en los grupos que recibieron la inmunoterapia de manera independiente.



Esquema						
Grupos	SSF	M+P sin AB	AB	M + P AB	MPAs AB	PFTs AB
Supervivencia	M.S. 78 Sobrevivieron hasta el D106 de infección	M.S. 90	M.S 114 20% de supervivencia al D169 de infección p= 0.0034 vs SSF	M.S ND 85.7% de supervivencia al D169 de infección p= 0.0187 vs AB; p= 0.0012 vs SSF	M.S ND 62.7% de supervivencia al D169 de infección p= 0.0009 vs SSF	M.S. 152 42% de supervivencia al D169 de infección p= 0.0041 vs SSF
Carga bacilar en pulmón	70 millones UFC	102 millones UFC	500 mil UFC	270 mil UFC	470 mil UFC	210 mil UFC
Neumonía	62.88%	47.23%	13.51%	12.92%	15%	8%

Esquema	Inmunosupresión con cortisona (3mg/L de agua) diario, vía oral durante 1 mes, a partir del día153 de infección			
Grupos	AB	M+P AB	MPAs AB	PFTs AB
Supervivencia	175.5 50% del día 153 al D184 de infección, tras la inmunosupresión	ND 83.3% del día 153 al D184 de infección, tras la inmunosupresión	ND 100% del D153 al D184 de infección, tras la inmunosupresión	ND 100% del D153 al D184 de infección, tras la inmunosupresión
Carga bacilar en pulmón	1.46 millones UFC	1.58 millones UFC	1 dato con 55.5 millones y dos datos con 255 mil UFC	9.74 millones UFC
Neumonía	12.21%	18.9%	24.9%	10.4%

**Figura 17.** Resumen de resultados de la fase experimental 2

## 7. DISCUSIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa reemergente de suma importancia a nivel mundial, en los últimos años el número de casos se ha mantenido alto así como el número de recaídas con infecciones resistentes a antibióticos. Aunque la administración de antibióticos es aún imprescindible para disminuir significativamente la carga bacilar, los esquemas de administración son demasiado extensos y tienen efectos adversos, lo que conlleva al abandono del tratamiento y en consecuencia a la generación de cepas resistentes a los antibióticos incluso a los de cuarta generación. Como alternativa para mejorar el tratamiento con antibióticos, se encuentra la inmunoterapia que tiene como objetivo disminuir el tiempo de los

esquemas de administración, reducir los efectos secundarios que estos causan, así como prevenir la reactivación de la enfermedad.

El estudio de la inmunoterapia para optimizar el tratamiento contra la tuberculosis es bastante extenso. Entre estos resalta el uso de extractos de semillas (Rodríguez *et al.*, 2019), componentes micobacterianos (Hernández-Pando *et al.*, 2000; Hernández-Pando *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009; Chahar *et al.*, 2018), péptidos antimicrobianos, el uso de citocinas (Ramos-Espinosa *et al.*, 2016; Francisco-Cruz *et al.*, 2013; Francisco-Cruz *et al.*, 2016; Mata-Espinosa *et al.*, 2008), así como el uso de sistemas particulados (Tousif *et al.*, 2017) que resulta de especial interés.

En el presente estudio se evaluó el potencial inmunoterapéutico de dos moléculas, cuyo efecto protector contra la tuberculosis se describió en estudios anteriores. Las MPAs como refuerzo y adyuvante de la vacuna BCG por las vías intranasal y subcutánea respectivamente (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017; Moreno-Mendieta *et al.*, 2019), y los PFTs como refuerzo de la vacuna BCG e inmunoterapia por la vía intranasal e intraperitoneal, respectivamente (Mayoral, 2014; Aguilar *et al.*, 2014 datos no publicados). En esta ocasión se evalúan por primera vez las MPAs, los PFTs y su combinación como inmunoterapia intranasal bajo dos esquemas distintos; un tratamiento semanal durante dos meses en ausencia de antibióticos y un esquema de 3 dosis repetidas administradas antes de iniciar el tratamiento convencional con antibióticos de primera línea.

La administración de la inmunoterapia propuesta en el presente trabajo en ausencia de antibióticos durante dos meses, no protegió de la infección con Mtb cepa H37Rv Stanford, ya que no se observó diferencia entre los grupos en términos de supervivencia, carga bacilar en pulmón y desarrollo de neumonía. Esto coincide con otros estudios en los que por sí sola la inmunoterapia no protege contra la TB. Tal es el caso de la inmunoterapia con nanopartículas de curcumina (Figura 2 de Tousif *et al.*, 2017) o con micobacterias saprófitas (Figura 2 de Chahar *et al.*, 2018) que sin antibiótico no tuvieron un efecto terapéutico en los animales infectados con Mtb. Sin embargo, y con el objetivo de entender los resultados obtenidos y conocer el tipo de

respuesta inducida con la inmunoterapia en ausencia de antibiótico, se realizó el análisis de granulomas y perfil de citocinas. Al día 180 de infección se registró un mayor número de granulomas en el grupo que recibió la inmunoterapia combinada en comparación con el grupo control que solo recibió SSF. En cuanto al área de estos, fue muy similar al grupo control de SSF. El perfil de citocinas producidas en este esquema de inmunoterapia combinada en los grupos experimentales fue semejante al del grupo control, con lo cual no se observó polarización a una respuesta inflamatoria. Cuando las moléculas se administraron de manera independiente se observó un discreto aumento en la producción de citocinas tipo Th1 para las MPAs, principalmente de TNF- $\alpha$ , lo cual coincide con reportes previos en los que se potencia la secreción de TNF en macrófagos infectados con Mtb cuando fueron tratados con micropartículas de PLA y PLGA (Sharma *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 2010; Terada, 2010; Prior *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2011). Sin embargo, y dada la falta de datos en el grupo control no se pudo realizar un análisis estadístico que sustente el resultado. Por parte de los PFTs se vio incrementada la producción de IFN- $\gamma$  e IL-4 en comparación con el grupo control, lo que sugiere una respuesta mixta Th1/Th2.

Para la segunda fase experimental se aumentó de manera significativa la supervivencia en el grupo que recibió la inmunoterapia con los antibióticos en comparación con el grupo control que solo recibió los antibióticos. Esto resulta de suma importancia al ser el primer reporte de aumento significativo de la supervivencia en animales infectados bajo este modelo experimental y tratados con inmunoterapia por vía intranasal. Sin embargo, el aumento en la supervivencia de los grupos tratados no tuvo correlación con la carga bacilar en pulmón y el desarrollo de neumonía. Después de la inmunosupresión también se observó una mayor supervivencia en el grupo que recibió la inmunoterapia con los antibióticos, 100% en los grupos administrados con las moléculas por separado y antibióticos, 85% en el grupo de la inmunoterapia combinada más los antibióticos y 50% para el grupo que solo recibió los antibióticos. En cuanto a la carga bacilar y el desarrollo de neumonía se observan resultados similares a los obtenidos para el grupo que solo recibió los

antibióticos, con una carga bacilar menor en los grupos que recibieron la inmunoterapia por separado.

En otros estudios se ha reportado el uso de nanopartículas de curcumina administradas por vía intraperitoneal, de manera simultánea con isoniazida para combatir la infección con una dosis baja de Mtb cepa H37Rv (110 UFC aproximadamente). Los autores mencionan que la administración de las nanopartículas potencia la eliminación de las bacterias al incrementar la respuesta de tipo Th1 así como la disminución de la hepatotoxicidad generada por la isoniazida (Tousif *et al.*, 2017). Sin embargo, en dicho trabajo la dosis de infección es baja en comparación con la dosis usada en este estudio (340 mil UFC y 218 mil UFC, para la fase experimental 1 y 2, respectivamente), así como el inicio del tratamiento inicia al día 15 de infección, en comparación con el modelo usado en este estudio que comienza el tratamiento en la etapa avanzada de la infección (día 60 de infección) para asemejar lo que ocurre realmente en el tratamiento de la enfermedad en humanos. En dicho estudio también realizaron una comparación entre el grupo infectado no tratado contra el grupo que recibió solamente las nanopartículas de curcumina, sin diferencia significativa entre los grupos (figura 2 de Tousif *et al.*, 2017), reiterando que el uso de la inmunoterapia en ausencia de antibióticos aun no resulta suficiente para eliminar la carga bacilar, como también observamos en este estudio.

Utilizando el MRTPP, se ha evaluado el uso de moléculas como la silimarina (Rodríguez *et al.*, 2019), adenovirus codificantes para la producción de citocinas como TNF  $\alpha$ , para péptidos antimicrobianos como LL-37 y para el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Ramos-Espinosa *et al.*, 2016; Francisco-Cruz *et al.*, 2013; Francisco-Cruz *et al.*, 2016), así como péptidos derivados del veneno de escorpión (Cárcamo-Noriega *et al.*, 2019). En el estudio de la silimarina (Sm) evaluaron su potencial microbicida contra micobacterias sensibles a fármacos y contra una cepa MDR (derivada de un aislado clínico) tanto *in vitro* como *in vivo*. Los autores demostraron su potencial terapéutico al usarse diariamente por vía intragástrica ya sea sola o en conjunto con antibióticos durante 2 meses, tras la infección con 250 mil bacterias. La Sm indujo mayor expresión de citocinas Th1 como

INF- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$  y una reducción en la carga bacilar y neumonía en pulmón. En este estudio también realizaron la inmunosupresión con el fin de evaluar que tanto se reactivaba la enfermedad. La carga bacilar se mantuvo muy similar entre los grupos que recibieron la inmunoterapia y los antibióticos. A diferencia de lo reportado en el presente estudio, no se muestra la gráfica de supervivencia, aunque los resultados de una menor carga bacilar y neumonía para ambas cepas, resultan prometedores. En otros estudios a través de la única administración por vía intratraqueal, de adenovirus codificantes para el GM-CSF, diferentes citocinas Th1 (TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ ) y péptidos antimicrobianos (LL-37), los autores lograron inducir una respuesta inflamatoria suficiente para controlar de manera significativa la carga bacilar en pulmón. También observaron un mayor número y área de los granulomas así como un menor porcentaje de neumonía hasta el día 30 post-tratamiento tanto en un modelo de latencia (Ramos-Espinosa *et al.*, 2016; Francisco-Cruz *et al.*, 2016) como en uno de TB progresiva (Mata-Espinosa *et al.*, 2008). Las principales diferencias son que en este esquema los sacrificios se realizaron al día 15 y al día 30 post-tratamiento, mientras que en el presente estudio, las muestras analizadas fueron a la semana y a los dos meses de finalizar el tratamiento, con una infección más avanzada. En cuanto al área de los granulomas, el reportado en esta tesis es similar al reportado para el adenovirus vehículo del estudio de Francisco-Cruz *et al.* (2016). Dado el papel controversial que se ha descrito de los granulomas en la TB ya sea por las células que los conforman (macrófagos y linfocitos) que a largo plazo pueden desarrollar fibrosis e incluso necrosis cuando se reactiva la enfermedad (Pagán & Ramakrishnan, 2018), o por la dinámica entre las células de los granulomas que pueden fungir como caballos de troya y diseminar la enfermedad, se podría considerar que tener muchos y grandes granulomas resulta un factor de riesgo a largo plazo. Esto debido a que se ha descrito que las bacterias en los granulomas pueden pasar a un estado no replicativo persistente caracterizado por disminución del metabolismo mostrando un fenotipo distinto al de las bacterias en división (Bacon *et al.*, 2014) y así permanecer por extensos periodos de tiempo (Wayne & Hayes, 1996).

En uno de los últimos estudios publicados, Cárcamo-Noriega *et al.*, (2019) reportaron que una benzoquinona azul derivada del veneno del escorpión *Diplocentrus melici* tiene potencial contra Mtb MDR al administrarse por vía intratraqueal diariamente por 2 meses, disminuyendo de manera significativa la carga bacilar y el porcentaje de neumonía en pulmón en comparación con los grupos no tratados. Esto muestra la variedad de esquemas que se han reportado, por lo que resulta complejo determinar la mejor combinación de vía y dosis de administración de la inmunoterapia para combatir con la infección, que a su vez depende de la virulencia de la cepa. Por otra parte resulta importante considerar que las propiedades y mecanismos de acción que tengan las moléculas administradas como inmunoterapia, también pueden afectarse por el esquema de administración utilizado.

---

## 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

### 8.1 CONCLUSIONES

---

Los datos obtenidos indican que la administración de 3 dosis repetidas de las MPAs y los PFTs como inmunoterapia por vía intranasal, en combinación con antibióticos de primera línea, resultó una estrategia adecuada para aumentar de manera significativa la supervivencia en ratones con una avanzada infección con Mtb, incluso después de la inmunosupresión. Considerando que a la fecha no existe una inmunoterapia que por sí sola tenga un efecto esterilizante que reemplace el uso de antibióticos, con los resultados obtenidos no se descarta que estas moléculas sean buenos candidatos para potenciar el efecto de los antibióticos y/o reducir el tiempo de administración y efecto del mismo, en estados menos avanzados de la enfermedad. Sin embargo, la escasa correlación de los datos de supervivencia con la carga bacilar en pulmón, demandan mayor investigación de las propiedades inmunoterapéuticas de estas moléculas.

## 8.2 PERSPECTIVAS

---

El segundo esquema de inmunoterapia evaluado es el más apto para seguir explorando el potencial inmunoterapéutico de estas moléculas. Sin embargo, deben evaluarse por separado ya que en conjunto no mostraron sinergia en ausencia de antibióticos. Por otra parte sería conveniente evaluar la eficacia del esquema en animales previamente vacunados ya que esto representaría mejor lo que ocurre en los humanos que siendo vacunados en la infancia, desarrollan la enfermedad en la vida adulta.

Así mismo es de importancia profundizar en la caracterización de los mecanismos que tienen estas moléculas para ejercer su efecto inmunoestimulante con miras al desarrollo de vacunas y tratamientos para la TB y otras enfermedades.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Abate G, Hoft DF. 2016. Immunotherapy for tuberculosis: future prospects. *Immuno.Targets. Ther.* 5: 37-45.
2. Ahmad A, Yadav SP, Asthana N, Mitra K, Srivastava SP, Ghosh JK. 2006. Utilization of an amphipathic leucine zipper sequence to design antibacterial peptides with simultaneous modulation of toxic activity against human red blood cells. *J. Biol. Chem.* 281: 22029–22038.
3. Arnaudov A, Kostova Z. 2015. Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy. *Biotech. Biotech. Equip.* 29: 10171023.
4. Azad AK, Sirakova TD, Fernandes ND, Kolattukudy PE. 1997. Gene knockout reveals a novel gene cluster for the synthesis of a class of cell wall lipids unique to pathogenic mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 272: 16741-16745.
5. Bacon J, Alderwick LJ, Allnut JA, Gabasova E, Watson R, Hatch KA, *et al.* 2014. Non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* elicits a reduced infectivity profile with corresponding modifications to the cell wall and extracellular matrix. *PLOS ONE.* 9(2).

6. Baig MH, Ahmad K, Saeed M, Ahmed MA, Barreto GE, Ashraf GM, *et al.* 2018. Peptide based therapeutics and their use for the treatment of neurodegenerative and other diseases. *Biomed. Pharmacother.* 103: 574-581.
7. Balu S, Reljic R, Lewis MJ, Pleass RJ, McIntosh R, van Kooten C, *et al.* 2011. A novel human IgA monoclonal antibody protects against tuberculosis. *J. Immunol.* 186: 3113–3119.
8. Bancovik J, Moreira DF, Carrasco D, Yao J, Porter D, Moura R, *et al.* 2015. Dermicidin exerts its oncogenic effects in breast cancer via modulation of ERBB signaling, *BMC Cancer.* 15: 70.
9. Barrera-Rosales AE. 2017. Evaluación del potencial adyuvante de las micropartículas de almidón a la vacunación con BCG. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
10. Barry CE. 2001. Interpreting cell wall “virulence factors” of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends. Microbiol.* 9: 237-41.
11. Benson N, Cucurull-Sanchez L, Demin O, Smirnov S, van der Graaf P. 2012. Reducing systems biology to practice in pharmaceutical company research; Selected case studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 736: 607–615.
12. Bertozzi CR, Rabuka D, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, *et al.* 2009. Chapter 2. Structural basis of glycan diversity. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, & C. R. Bertozzi (Eds.), *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1955/>.
13. Bleicher P, Mackin W. 1995. Betafectin PGG-glucan: a novel carbohydrate immunomodulator with anti-infective properties. *J. Biotechnol. Healthcare.* 2: 207–222.
14. Björnsson ES. 2017. Drug-induced liver injury due to antibiotics. *Scand. J. Gastroenterol.* 52: 617-623.
15. Boletín epidemiológico semanal 23, 2020 (<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/557690/sem23.pdf>).
16. Bongiovanni B, Mata-Espinosa D, D’Attilio L, León-Contreras JC, Marquez-Velasco R, Bottasso O, *et al.* 2015. Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-



- derived macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 95: 562-569.
17. Bowden RA, Siegel MS, Steele RW, Day LM, Meyers JD. 1985. Immunologic and clinical responses to varicella-zoster virus-specific transfer factor following marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* 152: 1324-1327.
  18. Brennan PJ, Nikaido H. 1995. The envelope of Mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 29-63.
  19. Brett BT, Smith SC, Bouvier CV, Michaeli D, Hochhauser D, Davidson BR, *et al.*, 2002. Phase II study of anti-gastrin-17 antibodies, raised to G17DT, in advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 20: 4225-4231.
  20. Browder W, Williams D, Pretus H, Olivero G, Enrichens F, Mao P, *et al.* 1990. Beneficial effect of enhanced macrophage function in the trauma patient. *Ann. Surg.* 211: 605-613.
  21. Burgaleta C, Territo MC, Quan SG, Golde DW. 1978. Glucan activated macrophages: functional characteristics and surface morphology. *J. Reticuloendothel. Soc.* 23: 195-204.
  22. Butov DA, Efremenko YV, Prihoda ND, Zaitzeva SI, Yurchenko LV, Sokolenko NI, *et al.* 2013. Randomized, placebo-controlled Phase II trial of heat-killed *Mycobacterium vaccae* (Immodulon batch) formulated as an oral pill (V7). *Immunother.* 5: 1047-1054.
  23. Cárcamo-Noriega EN, Sathyamoorthi S, Banerjee S, Gnanamani E, Mendoza-Trujillo M, Mata-Espinosa D, *et al.* 2019. 1,4-benzoquinone antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis* derived from scorpion venom. *PNAS.* 116: 12642-1647.
  24. Cardona PJ, Amat I, Gordillo S, Arcos V, Guirado E, Díaz J, *et al.* 2005. Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis. *Vaccine.* 23: 1393-1398.
  25. Chahar M, Rawat KD, Reddy PVJ, Gupta UD, Natrajan M, Chauhan DS, *et al.* 2018. Potential of adjuvant *Mycobacterium w* (Mw) immunotherapy in

- reducing the duration of standard chemotherapy against tuberculosis. *Indian. J. Tuberculosis*. 65: 335-344.
26. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. 2009. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future, *Br. J. Pharmacol.* 157: 220–233.
  27. Chan ED, Strand MJ, Iseman MD. 2008. Treatment outcomes in extensively resistant tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 359: 657–659.
  28. Cheng J, Randall AZ, Sweredoski MJ, Baldi P. 2005. SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic. Acids. Res.* 33 (Web Server issue):W72-W76. doi:10.1093/nar/gki396.
  29. Chez MG, Buchanan CP, Aimonovitch MC, Becker M, Schaefer K, Black C, *et al.* 2002. Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *J. Child. Neurol.* 17: 833–837.
  30. Choo, 2007. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei. Med. J.* 48: 11-23.
  31. Cleary JA, Kelly GE, Husband AJ. 1999. The effect of molecular weight and beta-1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)-beta-D-glucan. *Immunol. Cell. Biol.* 77: 395–403.
  32. Condos R, Rom WN, Schluger NW. 1997. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet.* 349: 1513–1515.
  33. Couroux P, Patel D, Armstrong K, Larché M, Hafner RP. 2015. Fel d 1-derived synthetic peptide immune-regulatory epitopes show a long-term treatment effect in cat allergic subjects. *Clin. Exp. Allergy* 45: 974–981.
  34. Cullor JS, Mannis MJ, Murphy CJ, Smith WL, Selsted ME, Reid TW. 1990. In vitro antimicrobial activity of defensins against ocular pathogens, *Arch. Ophthalmol.* 108: 861–864.
  35. Cywes, C, Hoppe HC, Daffé M, Ehlers MRW. 1997. Non-opsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect. Immun.* 65: 4258–4266.

36. Czap JK, Austen KF. 1985a. Generation of leukotrienes by human monocytes upon stimulation of their beta-glucan receptor during phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2751–2755.
37. Czap JK, Austen KF. 1985b. Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte beta-glucan receptor. *J. Immunol.* 135: 3388–3393.
38. Daffé M, and Draper P. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39: 131–203.
39. Danho W, Swistok J, Khan W, Chu XJ, Cheung A, Fry D, *et al.* 2009. Opportunities and challenges of developing peptide drugs in the pharmaceutical industry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 611: 467–469.
40. de Martino M, Lodi L, Galli L, Chiappini E. 2019. Immune response to *Mycobacterium tuberculosis*: A narrative review. *Front. Pediatr.* 7:350. doi: 10.3389/fped.2019.00350.
41. de Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. 2005. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect. Immun.* 73: 6711–6720.
42. de Weers M, Tai YT, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DCH, *et al.* 2011. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J. Immunol.* 186: 1840–1848.
43. Delville J, and Jacques PJ. 1977. Therapeutic effect of yeast glucan in mice infected with *Mycobacterium leprae*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 85: 965–966.
44. Dey B, Dey RJ, Cheung LS, Pokkali S, Guo H, Lee JH, *et al.* 2015. A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis. *Nat. Med.* 21:401–406.
45. Dinadayala P, Sambou T, Daffé M, Lemassu A. 2008. Comparative structural analyses of the alpha-glucan and glycogen from *Mycobacterium bovis*. *Glycobiology.* 18: 502–508.
46. Doita M, Rasmussen LT, Seljelid R, Lipsky PE. 1991. Effect of soluble aminated beta-1, 3-D-polyglucose on human monocytes: stimulation of cytokine and

- prostaglandin E2 production but not antigen-presenting function. *J. Leukoc. Biol.* 49: 342–351.
47. Dube A, Reynolds JL, Law WC, Maponga CC, Prasad PN, Morse GD. 2014. Multimodal nanoparticles that provide immunomodulation and intracellular drug delivery for infectious diseases. *Nanomedicine Elsevier*. 10: 831–838.
  48. Dukic-Stefanovic S, Schinzel R, Riederer P, Munch G. 2001. AGES in brain ageing: AGE-inhibitors as neuroprotective and anti-dementia drugs? *Biogerontology*. 2: 19–34.
  49. Dvorožnáková E, Porubcová J, Sevcíková Z. 2009. Immune response of mice with alveolar echinococcosis to therapy with transfer factor, alone and in combination with albendazole. *Parasitol Res.* 105: 1067-1076.
  50. Ehlers MRW, Daffé M. 1998. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol.* 6: 328–335.
  51. Ehrt S, Shiloh MU, Ruan J, Choi M, Gunzburg S, Nathan C, *et al.* 1997. A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 186: 1885-1896.
  52. El-Ridy M, Mostafa D, Shehab A, Nasr EA, El-Alim SA. 2007. Biological evaluation of pyrazinamide liposomes for treatment of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Pharm.* 330: 82–88.
  53. Estrada-Parra S, Nagaya A, Serrano E, Rodríguez O, Santamaría V, Ondarza R, *et al.* 1998. Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster. *Int. J. Immunopharmacol.* 20: 521-35.
  54. Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. 2016. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity, *Pharmacol. Rep.* 68: 802–808.
  55. Fabre A, Perez TM, Aguilar LD, Rangel J, Estrada GI, Hernández Pando R, *et al.* 2004. Transfer factors as immunotherapy and a supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 215-223.
  56. Feng CG, Bean AG, Hooi H, Briscoe H, Britton WJ. 1999. Increase in gamma interferon-secreting CD8+, as well as CD4+, T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 67: 3242–3247.

57. Fenton MJ, Riley LW, Schlesinger LS. 2005. Receptor-mediated recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by host cells. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. S. T. Cole, K. Davis Eisenach, D. N. McMurray, and W. R. Jacobs Jr., eds. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, DC, pp. 405–426.
58. Flesch I, Kaufmann SH. 1987. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma activated bonemarrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 138: 4408–4413.
59. Floss T, Yu W. 2005. Rifamycin mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chem. Rev.* 105: 621–632.
60. Flynn JL, Scanga CA, Tanaka KE, Chan J. 1998. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J. Immunol.* 160: 1796-1803.
61. Flynn JL, Chan J. 2003. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr. Opin. Immun.* 15: 450-455
62. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio J, Morbidoni HR, Santangelo MP, *et al.* 2013. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence.* 4: 3-66.
63. Fountain FF, Tolley E, Chrisman CR, Self TH. 2005. Isoniazid hepatotoxicity associated with treatment of latent tuberculosis infection: a 7-year evaluation from a public health tuberculosis clinic. *Chest.* 128: 116–123.
64. Francisco-Cruz A, Mata-Espinosa D, Estrada-Parra S, Xing Z, Hernández-Pando R. 2013. Immunotherapeutic effects of recombinant adenovirus encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 171: 283-297
65. Francisco-Cruz A, Mata-Espinosa D, Ramos-Espinosa O, Marquina-Castillo B, Estrada-Parra S, Xing Z, *et al.* 2016. Efficacy of gene-therapy based on adenovirus encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in drug-sensitive and drug-resistant experimental pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis.* 100: 5-14.
66. Fratti RA, Vergne I, Chua J, Skidmore J, Deretic V. 2000. Regulators of membrane trafficking and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation block. *Electrophoresis.* 21: 3378-3385.

67. Gagliardi MC, Lemassu A, Teloni R, Mariotti S, Sargentini V, Pardini M, *et al.* 2007. Cell wall-associated alpha-glucan is instrumental for *Mycobacterium tuberculosis* to block CD1 molecule expression and disable the function of dendritic cell derived from infected monocyte. *Cel. Microbiol.* 9: 2081–2092.
68. Gamazo C, García-Azpíroz M, De Souza Reboucas J, Gastaminza G, Ferrer M, Agüeros M. 2017. Oral immunotherapy using polymeric nanoparticles loaded with peanut proteins in a murine model of fatal anaphylaxis. *Immunotherapy.* 9: 1205–1217.
69. García AE, Carreón JG, Ramírez E, Toledo M, Estrada-Parra S, Pérez-Tapia M, *et al.* 2014. Randomized clinical trial to evaluate oral dializable leukocyte extracts as immunomodulator treatment in atopic dermatitis. *World. Allergy. Organ. J.* 2014; 7(Suppl 1):P16. Published 2014 Feb 3. doi:10.1186/1939-4551-7-S1-P16.
70. Garcia-Contreras L, Sethuraman V, Kazantseva M, Godfrey V, Hickey AJ. 2006. Evaluation of dosing regimen of respirable rifampicin biodegradable microspheres in the treatment of tuberculosis in the guinea pig. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 980–986.
71. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, *et al.* 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. pp. 571-607.
72. Gautam A, Chaudhary K, Singh S, Joshi A, Anand P, Tuknait A, *et al.* 2014. Hemolytik: a database of experimentally determined hemolytic and non-hemolytic peptides. *Nucleic. Acids. Res.* 42: D444-D449.
73. Geurtsen J, Chedammi S, Mesters J, Cot M, Driessen NN, Sambou T, *et al.* 2009. Identification of mycobacterial  $\alpha$ -glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation. *The J. Immunol.* 183: 5221-5231.
74. Giosue S, Casarini M, Ameglio F, Zangrilli P, Palla M, Altieri AM, *et al.* 2000. Aerosolized interferon-alpha treatment in patients with multi-drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Eur. Cytokine. Netw.* 11: 99–104.

75. Giovagnoli S, Blasi P, Schoubben A, Rossi C, Ricci M. 2007. Preparation of large porous biodegradable microspheres by using a simple double-emulsion method for capreomycin sulfate pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.* 333: 103–111.
76. Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. 2009. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol. Rev.* 230: 38–50.
77. Gordon S, Martinez FO. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 32: 593–604.
78. Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 23–35.
79. Greco E, Quintiliani G, Santucci MB, Serafino A, Ciccaglione AR, Marcantonio C, *et al.* 2012. Janus-faced liposomes enhance antimicrobial innate immune response in mycobacterium tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 109:E1360–8.
80. Guillén D, Moreno-Mendieta S, Pérez R, Espitia C, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R. 2014. Starch granules as a vehicle for the oral administration of immobilized antigens. *Carbohydr Pol.* 112: 210–215.
81. Gülbay BE, Gürkan ÖU, Yıldız ÖA, Önen ZP, Erkeköl FÖ, Baççioğlu A, *et al.* 2006. Side effects due to primary antituberculosis drugs during the initial phase of therapy in 1149 hospitalized patients for tuberculosis. *Respir Med.* 100: 1834–1842.
82. Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. 2013. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv. Cancer Res.* 119: 421–475.
83. Gupta UD, Katoch VM, McMurray DN. 2007. Current status of TB vaccines. *Vaccine*, 25: 3742–3751.
84. Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, Schroder U, Kallenius G, Svenson SB. 2004. A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F (ab') fragment prolong survival of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.* 138: 30–38.

85. Hernández-Pando R, Rook GAW. 1994. The role of TNF alpha in T-cell mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology*. 82: 591-95.
86. Hernández-Pando R, Pavón L, Arriaga K, Orozco EH, Madrid MV, Rook GAW. 1997. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect. Immun.* 6: 84-90.
87. Hernández-Pando R, Pavon L, Orozco EH, Rangel J, Rook GAW. 2000. Interactions between hormone-mediated and vaccine-mediated immunotherapy for pulmonary tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology*. 100: 391-398.
88. Hernandez-Pando R, Orozco-Esteves H, Maldonado HA, Aguilar-León D, Vilchis-Landeros MM, Mata-Espinosa DA, *et al.* 2006. A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 144: 264-272.
89. Hernández-Pando R, Pavon L, Orozco EH, Rangel J, Rook GAW. 2008. Orally administered *Mycobacterium vaccae* modulates expression of immunoregulatory molecules in BALB/c mice with pulmonary tuberculosis. *Clin. Vaccine. Immunol.* 15: 1730-1736.
90. Hobart LJ, Seibel I, Yeargans GS, Seidler NW. 2004. Anti-crosslinking properties of carnosine: significance of histidine. *Life. Sci.* 75: 1379-1389.
91. Isaac S, Scher JU, Djukovic A, Jiménez N, Littman DR, Abramson SB, *et al.*, 2017. Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *J Antimicrob. Chemoth.* 72: 128-136.
92. Jangsun H, Jaewoo S, Youngmin S, Yeonho J, Kyungwoo L, Dohyun L, *et al.* 2018. Functional silica nanoparticles conjugated with beta-glucan to deliver anti-tuberculosis drug molecules. *J. Ind. Eng. Chem.* 58: 376-385.
93. Jarlier V, Nikaido H. 1994. Mycobacteria cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Let.* 123: 11-18.



94. Juarez PC. 2011. Effect of Transferon® as an adjuvant in the treatment of osteosarcoma [in Spanish] [dissertation]. Mexico City: National Polytechnic Institute.
95. Kang JH, Kim KS. 2003. Enhanced oligomerization of the alpha-synuclein mutant by the Cu, Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system, *Mol. Cells*. 15: 87–93.
96. Kernodle D, Gates H, Kaiser AB. 1998. Prophylactic anti-infective activity of poly-[1-6]-beta-D-glucopyranosyl-[1-3]-beta-D-glucopyranose glucan in a guinea pig model of staphylococcal wound infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42: 545–549.
97. Kim I. 2013. A brief overview of cell therapy and its product. *J. Korean. Assoc. Oral. Maxillofac. Surg.* 39: 201-202.
98. Kirkpatrick CH. 2000. Transfer factors: Identification of conserved sequences in transfer factor molecules. *Mol. Med.* 6: 332-334.
99. Klopper M, Warren RM, Hayes C, van Pittius NCG, Streicher EM, Müller B, *et al.* 2013. Emergence and spread of extensively and totally drug-resistant tuberculosis, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 449-455.
100. Konopski, Z, Seljelid R, Eskeland T. 1993. Cytokines and PGE2 modulate the phagocytic function of the beta-glucan receptor in macrophages. *Scand. J. Immunol.* 37: 587–592.
101. Kosciuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzalkowska N, Jozwik A, Horbanczuk J, *et al.* 2012. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides, *A Rev. Mol. Biol. Rep.* 39: 10957–10970.
102. Kunin CM. 1996. Antimicrobial activity of rifabutin. *Clin. Infect. Dis.* 22: S3–S14.
103. Labana S, Pandey R, Sharma S, Khuller G. 2002. Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 20: 301–304.
104. Lai Y, Gallo RL. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends. Immunol.* 30: 131–141.

105. Landón-Vázquez, Paulina. 2019. Desarrollo de dos formas farmacéuticas para el sistema vacunal almidón-DFA<sub>tag</sub>-antígenos. Tesis de Maestría, UAM-Xochimilco.
106. Lange K, Buerger M, Stallmach A, Bruns T. 2016. Effects of antibiotics on gut microbiota. *Dig. Dis.* 34: 260–268.
107. Le DT, Lutz E, Uram JN, Sugar EA, Onners B, Solt S, *et al.* 2013. Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *J. Immunother.* 36: 382–389.
108. Lemassu A, Daffé M. 1994. Structural features of the extracellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* 297: 351-357.
109. Lemassu A, Ortalo-Magné A, Bardou F, Silve G, Laneéle MA, Daffé M. 1996. Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous mycobacteria. *Microbiology.* 142: 1513–1520.
110. Leone P, Berardi S, Frassanito MA, Ria R, De Re V, Cicco S, *et al.* 2015. Dendritic cells accumulate in the bone marrow of myeloma patients where they protect tumor plasma cells from CD8+ T-cell killing. *Blood.* 126: 1443–1451.
111. Li P, Wang F. 2015. Polysaccharides: Candidates of promising vaccine adjuvants. *Drug. Discov. Ther.* 9: 88-93.
112. Liang J, Melican D, Cafro L, Palace G, Fiset L, Armstrong R, *et al.* 1998. Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. *Int. J. Immunopharmacol.* 20: 595–614.
113. Liegel J, Avigan D, Rosenblatt J. 2018. Cellular immunotherapy as a therapeutic approach in multiple myeloma. *Expert. Rev. Hematol.* 11: 525-536.
114. Liu J, Rosenberg EY, Nikaido H. 1995. Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 11254-258.
115. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Ton BL, Kutzik SR, *et al.* 2006. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 311: 1770–1773.

116. Lopez Y, Yero D, Falero-Diaz G, Olivares N, Sarmiento ME, Sifontes S, *et al.* 2009. Induction of a protective response with an IgA monoclonal antibody against *Mycobacterium tuberculosis* 16 kDa protein in a model of progressive pulmonary infection. *Int. J. Med. Microbiol.* 299: 447–452.
117. Lu D, Garcia-Contreras L, Muttill P, Padilla D, Xu D, Liu J, *et al.* 2010. Pulmonary immunization using antigen 85-B polymeric microparticles to boost tuberculosis immunity. *AAPS J.* 12: 338–347.
118. Mannan S. 2017. *Immunotherapy* Vol. 10 No. 1 <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0158>.
119. Martín, C. 2005. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *Eur. Respir. J.* 26: 162–167.
120. Mata-Espinosa DA, Mendoza-Rodríguez V, Aguilar León D, Rosales R, López-Casillas F, Hernández-Pando. 2008. Therapeutic effect of recombinant adenovirus encoding interferon-gamma in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Mol. Ther.* 16: 1065-1072.
121. Mata-Espinosa D, Molina-Salinas GM, Barrios-Payán J, Navarrete-Vázquez G, Marquina B, Ramos-Espinosa O, *et al.* 2015. Therapeutic efficacy of liposomes containing 4-(5-pentadecyl-1, 3, 4-oxadiazol-2-yl) pyridine in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Pulm. Pharm. Therap.* 32: 7-14.
122. Mayoral H. 2014. Efecto inmunoproliférico de péptidos purificados del Factor de Transferencia en el desarrollo de tuberculosis pulmonar en un modelo murino de vacunación con Bacilo Calmette-Guerín (BCG). Tesis de maestría. Escuela Superior de Medicina, sección de estudios de posgrado e investigación, IPN.
123. Meena LS, Rajni. 2010. Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS J.* 277: 2416-2427.
124. Meredith ME, Salameh TS, Banks WA. 2015. Intranasal delivery of proteins and peptides in the treatment of neurodegenerative diseases. *AAPS J.* 17: 780-787.
125. Millard J, Ugarte-Gil C, Moore DA. 2015. Multidrug resistant tuberculosis, *BMJ.* 350:h882. Published 2015 Feb 26. doi:10.1136/bmj.h882

126. Morales J. 2007. Defining the role of insulin detemir in basal insulin therapy. *Drugs*. 67: 2557–2584.
127. Moreno-Mendieta SA, Guillén D, Espitia C, Hernández-Pando R, Sanchez S, Rodríguez-Sanoja R. 2014. A novel antigen-carrier system: The *Mycobacterium tuberculosis* Acr protein carried by raw starch microparticles. *Int. J. Pharm.* 474: 241–248.
128. Moreno-Mendieta SA, Barrios-Payán JA, Mata-Espinosa DA, Sánchez-Esquivel S, Hernández-Pando R, Rodríguez-Sanoja R. 2017. Raw starch microparticles have immunostimulant activity in mice vaccinated with BCG and challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*. 35: 5123-5130.
129. Moreno-Mendieta S, Barrera-Rosales A, Mata-Espinosa D, Barrios-Payán J, Sánchez S, Hernández-Pando R, *et al.* 2019. Raw starch microparticles as BCG adjuvant: Their efficacy depends on the virulence of the infection strains. *Vaccine*. 37: 5731-5737.
130. Muttill P, Kaur J, Kumar K, Yadav AB, Sharma R, Misra A. 2007. Inhalable microparticles containing large payload of antituberculosis drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 32: 140–150.
131. Myles IA, Zhao M, Nardone G, Olano LR, Reckhow JD, Saleem D, *et al.* 2017. CD8+ T cells produce a dialyzable antigen-specific activator of dendritic cells. *J. Leukoc. Biol* 101:307-320.
132. Narasimhan P, Wood J, Macintyre CR, Mathai D. 2013. Risk factors for tuberculosis. *Pulm Med*. 2013: 828939. doi.org/10.1155/2013/828939
133. Nell AS, D’Lom E, Bouic P, Sabaté M, Bosser R, Picas J, *et al.* 2014. Safety, tolerability, and immunogenicity of the novel antituberculous vaccine RUTI: randomized, placebo-controlled phase II clinical trial in patients with latent tuberculosis infection. *PLoS One*; 9(2):e89612.
134. Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. 2011. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol. Motil.* 23: 255–264.
135. Nooka AK, Wang M, Yee AJ, Thomas SK, O’Donnell EK, Shah JJ, *et al.* 2016. Final results of a phase 1/2a, dose escalation study of Pvx-410 multi-peptide cancer

- vaccine in patients with smoldering multiple myeloma (SMM). *Blood*. 128: 2124–2124.
136. Nguyen L, Pieters J. 2009. Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagents and host defense tactics: challenges in tuberculosis drug development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49: 427-453.
  137. Nguyen L. 2016. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Arch. Toxicol.* 90: 1585-1604.
  138. Ojeda MO, van't Veer C, Fernández-Ortega CB, Araña-Rosainz MdeJ, Buurman WA. 2005. Dialyzable leukocyte extract differentially regulates the production of TNFalpha, IL-6, and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells. *Inflamm. Res.* 54:74-81.
  139. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, *et al.* 2011. Novel therapeutic vaccine: granulysin and new DNA vaccine against tuberculosis. *Hum. Vaccin.* 7 Suppl: 60–67.
  140. Ortalo-Magné A, Dupont MA, Lemassu A, Andersen AB, Gounon P, Daffé M. 1995. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiol.* 141: 1609–1620.
  141. Pace BT, Lackner AA, Porter E, Pahar B. 2017. The Role of Defensins in HIV Pathogenesis. *Mediators. Inflamm.* 5186904.
  142. Pagán AJ, Ramakrishnan. 2018. The formation and function of granulomas. *Annu. Rev. Immunol.* 36: 639–665.
  143. Parihar SP, Guler R, Khutlang R, Lang DM, Huralayal R, Mhlanga MM, *et al.* 2014. Statin therapy reduces the *Mycobacterium tuberculosis* burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation. *J. Infect. Dis.* 209: 754–763.
  144. Patchen ML, Lotzova E. 1980. Modulation of murine hemopoiesis by glucan. *Exp. Hematol.* 8: 409–422.
  145. Patil K, Bagade S, Bonde S, Sharma S, Saraogi G. 2018. Recent therapeutic approaches for the management of tuberculosis: Challenges and opportunities. *Biomed. Pharmacother.* 99: 735-745.

146. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, *et al.* 2004. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25: 1605-1612.
147. Petroff OA, Hyder F, Rothman DL, Mattson RH. 2001. Topiramate rapidly raises brain GABA in epilepsy patients. *Epilepsia.* 42: 543–548.
148. Poerio N, Bugli F, Taus F, Santucci MB, Rodolfo C, Cecconi F, *et al.* 2017. Liposomes loaded with bioactive lipids enhance antibacterial innate immunity irrespective of drug resistance. *Sci. Rep.* 7: 45120.
149. Prior S, Gander B, Blarer N, Merkle HP, Subirá ML, Irache JM, *et al.* 2002. *In vitro* phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly (lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15: 197-207.
150. Ramos-Espinosa O, Hernández-Bazán S, Francisco-Cruz A, Mata-Espinosa D, Barrios-Payán J, Marquina-Castillo B, *et al.* 2016. Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis. *Pathog. Dis.* 2016; 74(7):ftw075. doi:10.1093/femspd/ftw075.
151. Ramos-Espinosa O, Islas-Wenstein L, Peralta-Álvarez MP, López-Torres MO, Hernández-Pando R. 2018. The use of immunotherapy for the treatment of tuberculosis. *Expert Rev. Respir. Med.* 12:427-440.
152. Ray A, Das DS, Song Y, Richardson P, Munshi NC, Chauhan D, *et al.* 2015. Targeting PD1-PDL1 immune checkpoint in plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells, natural killer cells and multiple myeloma cells. *Leukemia.* 29: 1441-1444.
153. Reinholz M, Ruzicka T, Schaubert J. 2012. Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Ann. Dermatol.* 24: 126–135.
154. Reporte Global de Tuberculosis. OMS. 2019
155. Riggi SJ, DiLuzio NR. 1961. Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. *Am. J. Physiol.* 200: 297–300.
156. Rodríguez-Flores EM, Mata-Espinosa D, Barrios-Payán J, Marquina-Castillo B, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R. 2019. A significant therapeutic effect of silymarin administered alone, or in combination with chemotherapy, in

- experimental pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive or drug-resistant strains: *In vitro* and *in vivo* studies. *PLOS ONE* 14(5): e0217457.
157. Roy E, Brennan J, Jolles S, Lowrie DB. 2008. Beneficial effect of anti-interleukin-4 antibody when administered in a murine model of tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 88: 197–202.
  158. Russell DG, Mwandumba HC, Rhoades EE. 2002. *Mycobacterium* and the coat of many lipids. *J. Cell. Biol.* 158: 421-426.
  159. Sánchez-Hernández L, Montero L, Mojica-Espinosa R, Reyes-Grajeda JP, Cervantes-Torres J, Parkhouse RM, *et al.* 2018. Impact of the GK-1 adjuvant on peritoneal macrophages gene expression and phagocytosis. *Immunol. Let.* 201: 20-30.
  160. Schaalán MF, Ramadan BK, Elwahab AH. Abd. 2018. Synergistic effect of carnosine on browning of adipose tissue in exercised obese rats; a focus on circulating irisin levels, *J. Cell. Physiol.* 233: 5044-5057.
  161. Schitteck B. 2012. The multiple facets of dermicidin in cell survival and host defense. *J. Innate. Immun.* 4: 349–360.
  162. Schoubben A, Blasi P, Giovagnoli S, Ricci M, Rossi C. 2010. Simple and scalable method for peptide inhalable powder production. *Eur. J. Pharm. Sci.* 39: 53–58.
  163. Scorpio A, Zhang Y. 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* 2: 662-667.
  164. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddigi S, Cynamon M, *et al.* 1997. Characterization of *pncA* mutations in pirazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41: 540-543.
  165. Segura-Velazquez R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A. 2009. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin. Vaccine. Immunol.* 16: 1338–1343.
  166. Segura-Velazquez R, Perez-Torres A, Rosas G, Toledo A, Restelli M, Acosta E, *et al.* 2006. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine.* 24: 1073–1080.

167. Selvaraj P, Harishankar M, Afsal K. 2015. Vitamin D: Immuno-modulation and tuberculosis treatment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93: 377–384.
168. Sharma R, Muttill P, Yadav AB, Rath SK, Bajpai VK, Mani U, *et al.* 2007. Uptake of inhalable microparticles affects defense responses of macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 499–506.
169. Shima F, Akagi T, Akashi M. 2014. The role of hydrophobicity in the disruption of erythrocyte membrane by nanoparticles composed of hydrophobically modified poly (gamma-glutamic acid). *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 25: 203–210.
170. Singhal A, Jie L, Kumar P, Hong GS, Leow M, Paleja B, *et al.* 2014. Metformin as adjunct antituberculosis therapy. *Sci. Transl. Med.* 6(263):263ra159.
171. Skakun NP, Shman'ko VV. 1985. Synergistic effect of rifampicin on hepatotoxicity of isoniazid. *Antibiot. Med. Biotekhnol.* 30: 185–189.
172. Slomski A. 2013. South Africa warns of emergence of “totally” drug-resistant tuberculosis. *JAMA.* 309: 1097–1098.
173. Smith E, Peakman M. 2018. Peptide Immunotherapy for Type 1 Diabetes – Clinical Advances. *Front. Immunol.* 9: 392.
174. Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical. Microb. Rev.* 16: 463-496.
175. Smith T, Wolff KA, Nguyen L. 2013. Molecular biology of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 374: 53-80.
176. Stanley SA, Barczak AK, Silvis MR, Luo S, Sogi K, Vokes M, *et al.* 2014. Identification of host-targeted small molecules that restrict intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth. *PLoS Pathog.* 10(2):e1003946.
177. Steele RW, Myers MG, Vincent MM. 1980. Transfer factor for the prevention of varicella-zoster infection in childhood leukemia. *N. Engl. J. Med.* 303: 355-359.
178. Stokes RW, Norris-Jones R, Brooks DE, Beveridge TJ, Doxsee D, Thorson L M. 2004. The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect. Immun.* 72: 5676–5686.



179. Suarez S, O'Hara P, Kazantseva M, Newcomen CE, Hopfer R, McMurray DN, *et al.* 2001. Airway delivery of rifampicin microparticles for the treatment of tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 431–434.
180. Trenado-Uribe M, Miranda-Silva M, Rivero-Cruz JF, Rodríguez-Peña K, Espitia-Pinzón CI, Rodríguez-Sanoja R, *et al.* 2018. Antimycobacterial activity of anthacycline produced by an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens*. *Molec. Biol. Reports.* 45: 2563-2570.
181. Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernandez M, *et al.* 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 67:2522–2530.
182. Tousif S, Singh DK, Ahmad S, Moodley P, Bhattacharyya M, van Kaer L, *et al.* 2014. Isoniazid induces apoptosis of activated CD4+ T cells: implications for post-therapy tuberculosis reactivation and reinfection. *J. Biol. Chem.* 289: 30190–30195.
183. Tousif S, Singh DK, Mukherjee S, Ahmad S, Arya R, Nanda R, *et al.* 2017. Nanoparticle-formulated curcumin prevents posttherapeutic disease reactivation and reinfection with *Mycobacterium tuberculosis* following isoniazid therapy. *Front. Immun.* 8: 739.
184. Trauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S. 2014. Evolution of drug resistance in tuberculosis: recent progress and implications for diagnosis and therapy. *Drugs.* 74: 1063–1072.
185. Tsapis N, Bennett D, O'Driscoll K, Shea K, Lipp MM, Fu K, *et al.* 2003. Direct lung delivery of para-aminosalicylic acid by aerosol particles. *Tuberculosis (Edinb.)* 83: 379–385.
186. Tzianabos AO, Cisneros RL. 1996. Prophylaxis with the immunomodulator PGG glucan enhances antibiotic efficacy in rats infected with antibiotic-resistant bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 797: 285–287.
187. Tzianabos A. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinic. Microbiol. Reviews.* 13: 523-533.

188. van der Veer MS, de Weers M, van Kessel B, Bakker JM, Wittebol S, Parren P, *et al.* 2011. Towards effective immunotherapy of myeloma: enhanced elimination of myeloma cells by combination of lenalidomide with the human CD38 monoclonal antibody daratumumab. *Haematologica*. 96: 284–290.
189. van Rhijn I, Moody DB. 2015. CD1 and mycobacterial lipids activate human T cells. *Immunol. Rev.* 264: 138–153.
190. Verma RK, Singh AK, Mohan M, Agrawal AK, Misra A. 2011. Inhaled therapies for tuberculosis and the relevance of activation of lung macrophages by particulate drug-delivery systems. *Ther. Deliv.* 2: 753–768.
191. Vilaplana C, Montane E, Pinto S, Barriocanal AM, Domenech G, Torres F, *et al.* 2010. Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI. *Vaccine*. 28: 1106–1116.
192. Vilaplana C, Gil O, Caceres N, Pinto S, Diaz J, Cardona PJ. 2011. Prophylactic effect of a therapeutic vaccine against TB based on fragments of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 6(5):e20404.
193. Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, *et al.* 2018. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gky1006. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30357391.
194. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M. 2010. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug. Discov. Today*. 15: 40–56.
195. Wakshull E, Brunke-Reese D, Lindermuth J, Fisette L, Nathans RS, Crowley JJ, *et al.* 1999. PGG-glucan, a soluble beta-(1, 3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid beta-(1, 3)-glucan receptor. *Immunopharmacol.* 41: 89–107.
196. Wang C, Hickey AJ. 2010. Isoxyl aerosols for tuberculosis treatment: preparation and characterization of particles. *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* 11: 538–549.
197. Wang F, Qiao L, Chen L, Zhang C, Wang Y, Wang Y, *et al.* 2016. The immunomodulatory activities of pullulan and its derivatives in human pDC-like CAL-1 cell line. *Int. J. Biol. Macromol.* 86: 764–771.

198. Wayne LG, Hayes LG. 1996. An *in vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of non-replicating persistence. *Infect. Immun.* 64: 2062–2069
199. Wetzler M, Hamilton P. 2018. Chapter 8 Peptides as therapeutics. Sotirios Koutsopoulos. Peptide applications in biomedicine, biotechnology and bioengineering. Woodhead Publishing. First edition. 656 pp.
200. Williams DL, Browder IW, DiLuzio NR. 1983. Immunotherapeutic modification of *Escherichia coli*-induced experimental peritonitis and bacteremia by glucan. *Surgery.* 93: 448–454.
201. Working Group on New Drugs. *Drug Pipeline*. Available from: <http://www.newtdrugs.org/pipeline.php>. Accessed January 25, 2016.
202. Xu LJ, Wang YY, Zheng XD, Gui XD, Tao LF, Wei HM. 2009. Immunotherapeutical potential of *Mycobacterium vaccae* on *M. tuberculosis* infection in mice. *Cell. Mol. Immunol.* 6: 67-72.
203. Yadav AB, Sharma R, Muttill P, Singh AK, Verma RK, Mohan M, *et al.*, 2009. Inhalable microparticles containing isoniazid and rifabutin target macrophages and stimulate the phagocyte to achieve high efficacy. *Indian J. Exp. Biol.* 47: 469–474.
204. Yadav AB, Muttill P, Singh AK, Verma RK, Mohan M, Agrawal AK, *et al.* 2010. Microparticles induce variable levels of activation in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 90: 188-196.
205. Yang XY, Chen QF, Li YP, Wu SM. 2011. *Mycobacterium vaccae* as adjuvant therapy to anti-tuberculosis chemotherapy in never-treated tuberculosis patients: a meta-analysis. *PLoS One.* 6(9):e23826.
206. Yoshida A, Matumoto M, Hshizume H, Oba Y, Tomishige T, Inagawa H, *et al.*, 2006. Selective delivery of rifampicin incorporated into poly(dl-lactic-co-glycolic) acid microspheres after phagocytotic uptake by alveolar macrophages, and the killing effect against intracellular *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin. *Microbes. Infect.* 8: 2484–2491.

207. Younossian AB, Rochat T, Ketterer JP, Wacker J, Janssens JP. 2005. High hepatotoxicity of pyrazinamide and ethambutol for treatment of latent tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 26:462–464.
208. Zeth K, Sancho-Vaello E. 2017. The Human antimicrobial peptides dermcidin and ll37 show novel distinct pathways in membrane interactions. *Front. Chem.* 5: 86.
209. Zhang BY, Li SM, Gao ZH, Shen JH. 2013. Protective effects of snake venom antimicrobial peptide OH-CATH on *E. coli* induced rabbit urinary tract infection models, *Dongwuxue Yanjiu.* 34: 27–32.
210. Zlotta AR, van Vooren JP, Denis O, Drowart A, Daffé M, Lefevre P, *et al.* 2000. What are the immunologically active components of bacille Calmette-Guérin in therapy of superficial bladder cancer? *Int. J. Cancer.* 87: 844–852.
211. WGNTD (2016). *The Working Group on New TB Drugs.* Available online at: <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical>

#### PATENTES

212. Terada H, Makino K, Soma GI. US2010/0178354A1.
213. Rodríguez-Sanoja R, Guillén-Santos D, Sánchez-Esquivel S. Patente MX/2017/14206. Denominación: Dominio de fijación al almidón derivado y uso en inmovilización de proteínas recombinantes sobre almidón para la purificación estabilización y acarreador de antígenos y proteínas terapéuticas para inmunización en mucosas. Expedición 4 de abril 2017.
214. Solicitud de patente Rodríguez-Sanoja R, Moreno-Mendieta S, Sánchez-Esquivel S, Guillén-Santos D, Hernández-Pando R. Denominación: Micropartículas de almidón crudo como adyuvante en vacunas. Folio MX/a/2016/005434. Expedición de solicitud 27 de abril 2016.