



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO TERAPÉUTICO DE LA BENZOQUINONA AZUL EN UN MODELO DE
TUBERCULOSIS EXPERIMENTAL PULMONAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA
ILSE MONSERRAT MENDOZA TRUJILLO

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Lourival Domingos Possani Postay
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Rogelio Hernández Pando
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", INCMNSZ](#)

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillan
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos, Marzo, 2021



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.

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Lourival Domingos Possani Postay del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con financiamiento por parte de CONACyT, donativo FORDECYT-PRONACES 303045.

Todos los ensayos con *Mycobacterium tuberculosis* se llevaron a cabo en la Unidad de Patología Experimental, del INCMNSZ a cargo del Dr. Rogelio Hernández Pando. Las metodologías relacionadas con el cultivo y mantenimiento de las cepas de Mtb fueron asesoradas por la Dra. Dulce Adriana Mata Espinosa y los procedimientos que incluyeron la manipulación de ratones por el Dr. Jorge Alberto Barrios Payán.

El aislamiento y la posterior caracterización química y biológica de la benzoquinona azul se llevaron a cabo por el Dr. Edson Cárcamo Noriega en el laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay. La síntesis química se realizó en el Laboratorio del Dr. Richard Zare, de la Universidad Stanford, California, con la participación del Dr. Edson Cárcamo Noriega.

Este proyecto se desarrolló en el Programa en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y apoyada con una beca de posgrado CONACyT, numero de becario: 956675.

A mis papás, Nany y mi Abue por apoyarme siempre en todo lo que me he propuesto. Sin sus consejos, apoyo y cariño no hubiera podido lograrlo. Los amo.

Agradecimientos

Al Dr. Rogelio Hernández, Dr. Lourival Possani y Dr. Edson Carcamo por guiarme y brindarme las herramientas para desarrollar este proyecto.

A la Dra. Dulce Mata y el Dr. Jorge Barrios por ser mis mentores en el laboratorio. Gracias por sus enseñanzas, consejos, apoyo y por brindarme su confianza.

A todos los miembros de mi jurado por tomarse el tiempo de hacer comentarios y sugerencias para esta tesis.

A Laura y David por siempre escucharme y estar para mí cuando lo necesitaba.

A Octa y Manu por ser los mejores compañeros y amigos que pude encontrar en el laboratorio. Gracias por todo.

A Mile e Iris por siempre escucharme y brindarme sus consejos. Las quiero.

A todos los amigos que hice en el laboratorio de Patología experimental por siempre estar en la disposición de enseñarme y ayudarme cuando lo necesité.

A mi familia que desde siempre me ha apoyado en todo y brindado su cariño. Angelito y Alana, son mi mayor motivación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad pulmonar causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que es de acuerdo con la OMS, la principal causa de muerte a nivel mundial por un solo agente infeccioso. La aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR) ha creado la necesidad de encontrar nuevas moléculas quimioterapéuticas y recientemente los venenos de animales peligrosos (serpientes, arañas, escorpiones) han demostrado ser una buena fuente. Un nuevo compuesto aislado del veneno del escorpión *Diplocentrus melici*, el "Compuesto azul" (5-metoxi-2,3-bis(metil)tiociclohexa-2,5-dieno-1,4-diona), demostró ser citotóxico para ciertas líneas celulares neoplásicas y tener propiedades antibacterianas contra Mtb (MIC = 8 µg/mL) comparable a los antibióticos utilizados actualmente. Además, la exposición al compuesto demostró generar una ruptura de la pared celular de la micobacteria y en células MH-S infectadas una disminución significativa en la carga bacilar intracelular (> 5 µg/mL) por lo que en este proyecto se planteó probar su actividad terapéutica *in vivo* frente a una cepa susceptible y MDR de Mtb en ratones. Para evaluar esto, la benzoquinona azul se utilizó como terapia en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva con ratones infectados con ambas cepas. Los ratones infectados con la cepa MDR que fueron tratados con 8 µg durante dos meses, tres días a la semana (lunes miércoles y viernes) tuvieron una mayor disminución en la carga bacilar pulmonar en comparación con los infectados con la cepa H37Rv además de que en ratones no infectados el compuesto no causó daño al tejido pulmonar ni efectos adversos. Por otra parte, se encontró que la combinación de la benzoquinona azul ya sea con isoniazida o moxifloxacino *in vitro* aumenta el efecto bactericida de ambos al eliminar a Mtb H37Rv y MDR respectivamente. Sin embargo, al probar la combinación de la benzoquinona azul y los antibióticos de primera línea en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva no se observó este efecto aditivo. Por último, se determinó uno de los posibles mecanismos de acción del compuesto demostrando que en Mtb genera un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno lo cual a su vez promueve su eliminación.

Palabras clave: antimicrobiano, apoptosis, benzoquinona, *Mycobacterium tuberculosis*, ROS, terapia, tuberculosis, veneno de alacrán.

Abstract

Tuberculosis is a lung disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and according to WHO, the leading cause of death worldwide from a single infectious agent. The emergence of multidrug-resistant (MDR) strains has created the need to find new chemotherapeutic molecules and the venoms of dangerous animals (snakes, spiders, scorpions) have proven to be a good source. A new compound isolated from the venom of *Diplocentrus melici* scorpion, the “Blue Compound” (5-methoxy-2,3-bis(methylthio)cyclohexa-2,5-diene- 1,4-dione), demonstrated to be cytotoxic to neoplastic cell lines and to have antibacterial activity against Mtb (MIC = 8 µg/mL) comparable to currently used antibiotics. Also, after exposure to this compound a disruption of the cell wall in bacilli was observed and a significant decrease in intracellular bacillary load in infected MH-S cells (>5 µg/mL). Therefore, in this project its therapeutic activity *in vivo* is tested against susceptible and MDR Mtb strains in mice. To assess this, blue compound was used as a therapy in an experimental model of progressive pulmonary tuberculosis with mice infected with both strains. Mice treated with 8 µg during two months, three days a week (Monday, Wednesday, Friday) had a significant decrease in lung bacillary load and lung tissue damage without adverse effects. Moreover, the combination of blue benzoquinone with either isoniazid or moxifloxacin showed an increase of the bactericidal effect *in vitro* of both while eliminating Mtb H37Rv and MDR respectively. However, when testing the combination of blue benzoquinone and first-line antibiotics in the murine model of progressive pulmonary tuberculosis this additive effect was not seen. Finally, one of the possible mechanisms of action of the compound was established, showing that in Mtb it generates an increase in the production of reactive oxygen species, which in turn promotes their elimination.

Keywords: antimicrobial, apoptosis, benzoquinone, drug therapy, *Mycobacterium tuberculosis*, ROS, scorpion venom.

Índice

	<u>Pág.</u>
Resumen	I
Abstract.....	II
Lista de figuras.....	V
Lista de tablas	VI
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	VII
Introducción	1
Capítulo 1	3
Antecedentes.....	3
1.1 Tuberculosis.....	3
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb).....	4
1.3 Patogénesis.....	5
1.4 Infección: Macrófagos alveolares.....	6
1.4.1. Especies reactivas de oxígeno	8
1.4.2. Apoptosis.....	9
1.5 Tratamiento por quimioterapia	12
1.6 Nuevas fuentes de antibioticos	16
1.6.1. Veneno de alacrán.....	19
1.7 Benzoquinonas.....	21
1.7.1. Benzoquinona azul.....	23
1.8 Modelo murino de tuberculosis pulmonar.....	26
Capítulo 2.....	27
Justificación y planteamiento del problema	27
Capítulo 3.....	28
Hipótesis	28
Objetivos	28

Capítulo 4	29
Material y Métodos	29
4.1 Modelo de tuberculosis experimental pulmonar murino.....	29
4.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno en un cultivo de Mtb en presencia de la benzoquinona azul usando D2FCDA.....	34
4.3 Determinación de la MIC de los antibióticos de primera y segunda línea en Mtb usando resazurina	34
4.4 Determinación de sinergia entre la benzoquinona azul y los antibióticos de primera y segunda línea usando resazurina ⁶⁶ mediante un ensayo tipo “tablero de damas chinas” (checkerboard)	36
4.5 Análisis estadístico	38
Capítulo 5	39
Resultados	39
5.1 La administración intratraqueal de la benzoquinona azul a una dosis de 8 µg/ratón en ratones Balb/c sin infectar no genera daño en el epitelio pulmonar	39
5.2 La administración de la benzoquinona azul a una dosis de 0.47 y 4.7 µg/ratón en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva (cepa H37Rv) no genera una disminución en la carga bacilar pulmonar	41
5.3 La administración de la benzoquinona azul a una dosis de 8 µg/ratón en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva (cepa MDR) genera una disminución en la carga bacilar pulmonar y en el porcentaje de neumonía	42
5.4 La combinación <i>in vitro</i> de la benzoquinona azul y el antibiótico de primera línea isoniazida aumenta el efecto antimicobacteriano de ambos fármacos contra la cepa H37Rv	44
5.5 La combinación <i>in vitro</i> de la benzoquinona azul y el antibiótico de segunda línea moxifloxacino aumenta el efecto antimicobacteriano de ambos fármacos contra la cepa MDR.....	47
5.6 La administración de la benzoquinona azul en conjunto con el tratamiento de primera línea en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva (cepa H37Rv) no genera una disminución en la carga bacilar pulmonar mayor a la generada por los antibióticos solos.....	50
5.7 La benzoquinona azul genera un aumento en la producción de ROS, lo que propicia una disminución en la viabilidad de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv y MDR.....	53
Capítulo 6	57
Discusión	57
Conclusiones y perspectivas	64
Conclusiones	64
Perspectivas	65

Anexo: Ensayo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los antibióticos de primera y segunda línea en Mtb	66
Referencias bibliográficas	68

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1. Representación de la estructura membranal de <i>M. tuberculosis</i>	4
Figura 2. Posibles escenarios al ocurrir la infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
Figura 3. Infección de <i>M. tuberculosis</i> en macrófagos alveolares.....	7
Figura 4. Reducción univalente del oxígeno molecular.....	8
Figura 5. Reducción del oxígeno mediante la enzima NADPH oxidasa durante el proceso de estallido respiratorio en células fagocíticas.....	8
Figura 6. Promoción de la apoptosis vía extrínseca e intrínseca en macrófagos alveolares durante la infección con Mtb.	11
Figura 7. Estructura química de las benzoquinonas.	21
Figura 8. Formación de especies reactivas de oxígeno mediante la oxidación y reducción de las benzoquinonas.....	22
Figura 9. Mecanismo de acción de las especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos.	22
Figura 10. Estructura química del ATD-3169.....	23
Figura 11. Estructura química de la benzoquinona azul (izquierda) y roja (derecha).....	23
Figura 12. Anormalidades producidas por la exposición de la micobacteria a la benzoquinona azul.....	25
Figura 13. Carga bacteriana dentro de macrófagos MH-S infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC (MOI 1:5) y estimulados post infección con diferentes concentraciones del compuesto azul (5, 25 y 50µg/mL)	25
Figura 14. Modelo de tuberculosis pulmonar progresiva.....	31
Figura 15. Esquema usado para la determinación de la MIC de la benzoquinona azul y los antibióticos de primera y segunda línea: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida,	

Etionamida, Amikacina y Moxifloxacino usando Mtb H37Rv o MDR.....	35
---	----

Figura 16. Esquema usado en el ensayo de tablero damas chinas para la determinación de la MIC de la benzoquinona azul en conjunto de los antibióticos de primera y segunda línea: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Etionamida, Amikacina y Moxifloxacino usando Mtb H37Rv o MDR.....37

Figura 17. Sobrevida de ratones BALB/c sin infectar tratados con Benzoquinona azul [8 µg /ratón] o con vehículo [Etanol al 10% en agua inyectable] por vía intratraqueal, tres veces a la semana durante dos meses.39

Figura 18. Histología de pulmones de ratones sin infectar al administrarles por vía intratraqueal la Benzoquinona azul durante 2 meses, 3 veces por semana.....40

Figura 19. Efecto terapéutico de la Benzoquinona azul en ratones BALB/c infectados con Mtb H37Rv al administrarse por vía intratraqueal durante 2 meses, 3 veces por semana.....41

Figura 20. Efecto terapéutico de la Benzoquinona azul sobre ratones BALB/c infectados con Mtb MDR al administrarse por vía intratraqueal durante 2 meses, 3 veces por semana.....42

Figura 21. Histología representativa de pulmones de ratones infectados con Mtb MDR y tratados con benzoquinona azul por vía intratraqueal durante 2 meses, 3 veces por semana.....43

Figura 22. Efecto antimicrobiano sobre Mtb H37Rv al combinar la Benzoquinona azul y antibióticos de primera línea.....45

Figura 23. Fórmula para determinar el FICI de la combinación de la Benzoquinona azul con los antibióticos de primera línea46

Figura 24. Efecto antimicrobiano sobre Mtb MDR al combinar la Benzoquinona azul y antibióticos de segunda línea.....48

Figura 25. Fórmula para determinar el FICI de la combinación de la Benzoquinona azul con los antibióticos de segunda línea49

Figura 26. Efecto terapéutico de la benzoquinona azul en conjunto con los antibióticos de primera línea sobre la carga bacilar pulmonar de ratones BALB/c infectados con Mtb H37Rv al administrarse por vía intratraqueal durante 2 meses.....51

Figura 27. Histología representativa de pulmones de ratones infectados con Mtb H37Rv y tratados con la Benzoquinona azul en conjunto con antibióticos de primera línea.52

Figura 28. Producción de especies reactivas de oxígeno en un cultivo de Mtb H37Rv y MDR puesto en contacto con la Benzoquinona azul durante 1 hora.....54

Figura 29. Relación entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la cantidad de unidades formadores de colonias (UFCs/mL) en un cultivo de Mtb puesto en contacto durante 12 horas con diferentes concentraciones de Benzoquinona azul.....	56
Figura 30. Determinación de la MIC para los antibióticos de primera línea: Isoniazida, Rifampicina y Pirazinamida con la cepa Mtb H37Rv.....	66
Figura 31. Determinación de la MIC de los antibióticos de segunda línea: Etionamida, Amikacina y Moxifloxacino con la cepa Mtb MDR.....	67

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 1. Mecanismo de acción y estructura de los fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis sensible (primera línea) y multidrogorresistente (segunda línea).....	13
Tabla 2. Clasificación de los fármacos anti-Tb de acuerdo con su eficacia y seguridad...	14
Tabla 3. Compuestos extraídos de fuentes naturales con actividad antimicobacteriana..	18
Tabla 4. Actividad biológica de la benzoquinona azul.....	24
Tabla 5. Distribución de ratones en los ensayos realizados con el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva.	32

Lista de abreviaturas

µg	microgramos
µL	microlitros
µm	micrómetros
°C	grados centígrados
cm ²	centímetros cuadrados
g	gramos
L	litro
min	minutos
mL	mililitro
mM	micromolar
mm	milímetro
ng	nanogramos
nm	nanómetro
rpm	revoluciones por minuto
ACP	enzima, <i>M. tuberculosis</i> proteína portadora de acilo
AG	Arabinogalactano
AMK	Amikacina
ANOVA	análisis de varianza clásica
AP	ácido pirazinoico
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	albúmina de suero bovino
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
D2CFDA	Acetato de diclorofluoresceína
DC-SIGN	receptor membranal, Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DE	desviación estándar
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMB	etambutol
ERO	especies reactivas de oxígeno
ETI	Etionamida
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GPI	glicofosfatidilinositol
H37Rv	cepa tipo de laboratorio de <i>M. tuberculosis</i> , susceptible a fármacos de primera línea

IT	intratraqueal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INH	isoniazida
InhA	enzima, <i>M. tuberculosis</i> reductasa transportadora de enoil-acil
katG	enzima, <i>M. tuberculosis</i> catalasa peroxidasa
LAM	lipoarabinomanano
LDH	enzima, Lactato deshidrogenasa
mAGP	complejo Arabinogalactano y Peptidoglicano
MDR	tuberculosis multidrogoresistente
MH-S	línea celular, macrófagos alveolares de ratones BALB/c
MIC	concentración mínima inhibitoria
MOX	Moxifloxacino
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	Mycobacterium tuberculosis complex
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	solución buffer, phosphate buffered saline
pH	potencial de hidrógeno, logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno
PZA	pirazinamida
Rab	proteína membranal, guanosin trifosfatasas
RIF	rifampicina
ROS	especies reactivas de oxígeno
RPMI	medio de cultivo, Roswell Park Memorial Institute
RFU	Relative Fluorescence Unit
RpsA	proteína ribosomal S1 de la subunidad 30S
SDS	duodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
Sx	Sacrificio
TLRs	receptor membranal, Toll like receptors
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling
Tx	Tratamiento
UFCs	unidades formadoras de colonias
UV	luz ultravioleta
XDR	tuberculosis extremadamente resistente a medicamentos

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad considerada como una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial por un solo agente infeccioso. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 2018 cerca de 10 millones de casos con aproximadamente 1.5 millones de muertes con una incidencia promedio de 130 nuevos casos por 100 mil habitantes¹. A pesar de que las investigaciones en los últimos años han generado más conocimiento sobre la transmisión, diagnóstico y tratamiento de la Tb en humanos; la incidencia de casos está bajando a un ritmo muy lento (1.6% por año) en contraste con los objetivos del plan estratégico End TB de la OMS (4-5% por año)² que plantea la disminución del 90% de los casos y del 95% en las muertes para el año 2035.

El microorganismo causante de esta enfermedad es el bacilo de lento crecimiento *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Debido a que es una bacteria con una pared celular muy compleja y difícil de penetrar, el esquema terapéutico establecido para su eliminación es de larga duración (mínimo seis meses) y consiste en un cóctel de fármacos que se sabe producen diversos efectos secundarios siendo los más relevantes el daño hepático y renal³. Gran parte de los pacientes deja inconcluso el tratamiento contribuyendo al aumento en la resistencia de algunas cepas de Mtb contra la isoniazida (INH) y la rifampicina (RIF), definidas como cepas multidrogorresistentes (MDR). En la actualidad la presencia de estas cepas es considerada un problema de salud pública a nivel mundial creando la necesidad de continuar la búsqueda de nuevos agentes anti-tuberculosos.

Los venenos de animales ponzoñosos como los escorpiones han demostrado contener ciertos compuestos con propiedades antiinflamatorias, antihipertensivas, antineoplásicas y antimicrobianas⁴ por lo que hoy en día representan una fuente de nuevas moléculas para el desarrollo de fármacos. Específicamente, un nuevo compuesto aislado del veneno del escorpión *Diplocentrus melici*, el "compuesto o benzoquinona azul" (5-metoxi-2,3-bis (metiltio) ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona), ha demostrado una interesante actividad antibacteriana *in vitro* contra Mtb susceptible y multidrogorresistente (Carcamo *et al*, 2019).

El mecanismo de acción no se ha dilucidado por completo, pero algunos experimentos sugieren que induce una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que generan daños en la pared celular de las bacterias⁵.

Dado que los resultados *in vitro* han demostrado ser prometedores, en este proyecto se propone continuar evaluando su posible actividad terapéutica en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar murino utilizando una cepa sensible y multidrogorresistente; enfocándose también en la posible sinergia de este compuesto con los fármacos antituberculosos de primera y segunda línea en condiciones *in vitro* y en el modelo murino. Por último, se comenzó a estudiar el posible mecanismo de acción sobre la micobacteria determinando si el compuesto generaba un aumento en la producción de ROS.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 TUBERCULOSIS

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infecciosa causada por el microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) descrito por primera vez por el médico alemán Robert Koch en 1882⁶. Actualmente la OMS estima que un tercio de la población mundial está infectada con esta bacteria sin embargo más del 95% de los casos reportados como enfermedad activa se dan en países en vías de desarrollo.

En el último reporte de la OMS se detalló que 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis solo en 2018 siendo: 5.7 millones hombres, 3.2 millones mujeres y 1.1 millones niños. Se reportaron a su vez 1.5 millones de muertes (incluyendo 251 000 personas con VIH), colocándola en la lista de las 10 causas de muerte a nivel mundial y la primera por un solo agente infeccioso.

Poblaciones de todas las edades pueden verse afectadas por esta enfermedad, pero las personas con mayor riesgo son aquellas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que tengan alguna condición que afecte el sistema inmunológico o presenten un cuadro de desnutrición⁷. Otras condiciones que aumentan el riesgo son: la diabetes, la vejez, el uso prolongado de corticosteroides o bloqueadores de TNF- α , polimorfismos en los receptores de la vitamina D y polimorfismos en los genes de IL-12 e INF- γ . Se sabe también que hábitos como el consumo de alcohol y fumar aumentan el riesgo 3.3 y 1.6 veces respectivamente⁷.

1.2 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (Mtb)

Mtb es una micobacteria con forma de bacilo, inmóvil, no esporulada con crecimiento lento (tiempo de duplicación de entre 12 y 24 h en condiciones óptimas) y con un tamaño de 0.2 - 0.6 x 1 - 10 µm. Su pared celular está formada por una gran cantidad de lípidos (hasta el 40% del peso seco de la bacteria) que proporciona una barrera impermeable a compuestos nocivos y fármacos contribuyendo así en su virulencia⁸.

La estructura externa de la micobacteria se divide en tres partes: una capa externa llamada cápsula, una pared celular y una membrana plasmática interna⁹ (Figura 1). La cápsula se compone de glucano, proteínas y en menor medida lípidos. En la pared celular se engloba la “micomembrana” o membrana externa que presenta una organización de bicapa no convencional en donde la parte más interna está constituida por ácidos micólicos de cadena larga unidos a arabinogalactano y a peptidoglicano (complejo mAGP), y la parte más externa de fosfolípidos, glicopéptidos y lipoglicanos. Por último, un espacio periplásmico que separa la pared celular de la bicapa lipídica¹⁰.

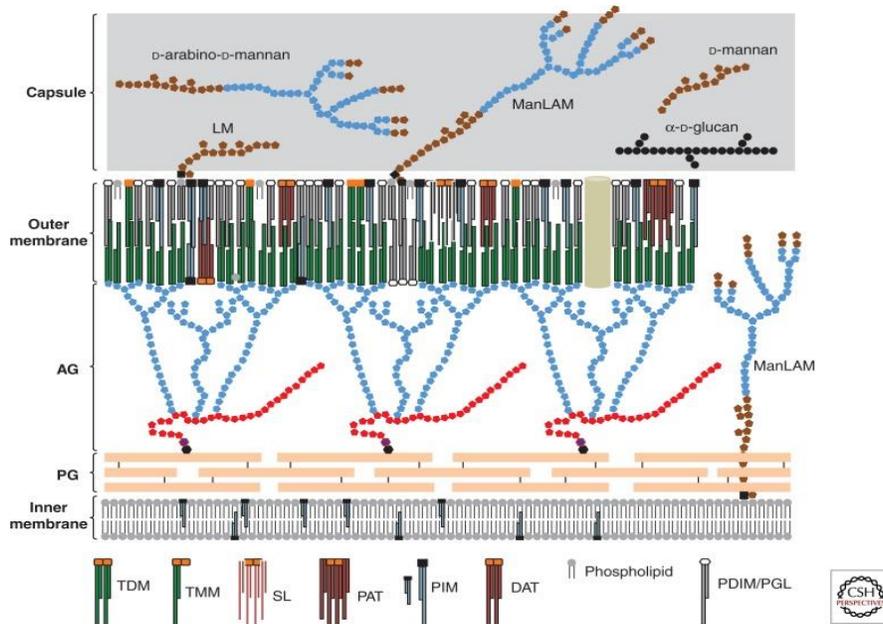


Figura 1. Representación de la estructura membranar de *M. tuberculosis*. Las figuras representan residuos de arabinosa (azul), galactosa (rojo), manosa (café) y glucosa (negro). El D-arabino-D-manano, D-glucano y D-manano, Lipomano (LM) son polisacáridos y lípidos glicosilados capsulares. Entre los ácidos micólicos se encuentran la trehalosa dimicolato (TDM) o factor cuerda, los sulfolípidos de trehalosa (SL), fosfatidilinositolmanósidos (PIM). Lipoarabinomano manosilado (ManLAM), Arabinogalactano (AG), Peptidoglicano (PG) [Tomado de Mary Jackson (2014)].

1.3 PATOGENESIS

Un paciente con tuberculosis activa cuando tose o estornuda expulsa gotas (en forma de aerosol) con micobacterias, las cuales pueden permanecer en el aire durante muchas horas¹¹ y ser respiradas por una persona no infectada.

Al inhalar el bacilo pueden desarrollarse cuatro escenarios diferentes: que no se desarrolle la infección, que se genere la infección, pero pueda resolverse, que se contenga la infección mientras el bacilo sigue replicándose en una menor tasa sin generar ningún tipo de síntoma (infección latente) o que se desarrolle la enfermedad activa¹² (Figura 2).

Durante la infección, la micobacteria recorre el tracto aéreo y llega a la parte más interna del pulmón (espacio alveolar) en donde las células del sistema inmune, en mayor medida los macrófagos alveolares, la reconoce y fagocita. Después de tres o cuatro semanas del contacto, en individuos sanos aparece la inmunidad mediada por células T promoviendo la muerte de las bacterias que se encuentran dentro de los macrófagos; dentro de estas células las micobacterias son encapsuladas en los fagosomas para ser destruidas, pero en algunas circunstancias los bacilos pueden inhibir la formación y acidificación del fagolisosoma y por consiguiente sobrevivir dentro del macrófago. Las células infectadas pueden quedarse en los pulmones promoviendo la duplicación de la bacteria y el desarrollo de la enfermedad (infección activa)¹³.

Sin embargo, en la mayoría de los individuos sanos (90%), los demás componentes del sistema inmune se encargan de contener (infección latente) o eliminar por completo a Mtb. El desarrollo de la enfermedad o la infección activa depende de factores como la frecuencia y duración del contacto con la persona infectada, la cantidad y la virulencia del patógeno al igual que la susceptibilidad de la persona expuesta¹².

Los síntomas característicos son: tos crónica (tres semanas o más), dolor en el pecho, toser con sangre, fatiga, fiebre, pérdida de peso y sudoraciones nocturnas. Es en este punto cuando la enfermedad es altamente contagiosa¹⁴.

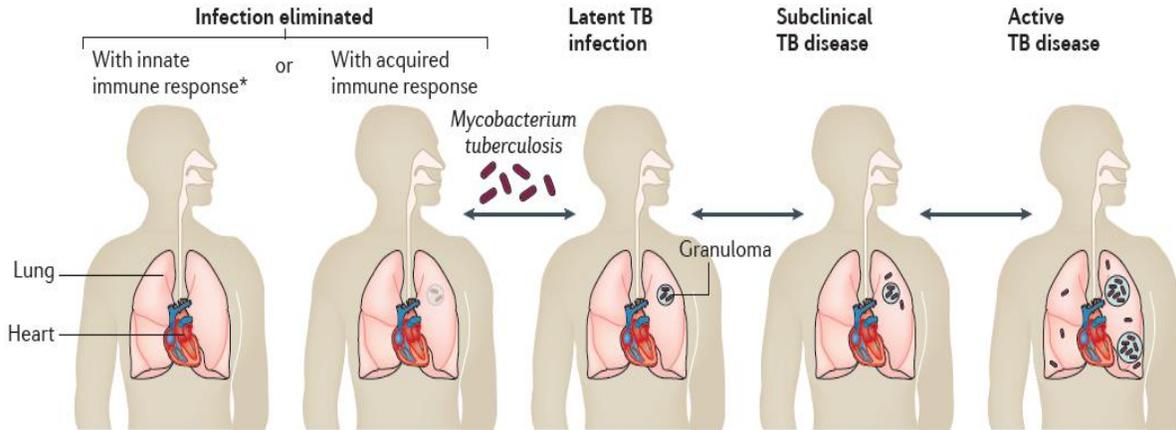


Figura 2. Posibles escenarios al ocurrir la infección con *Mycobacterium tuberculosis*. Eliminación de la infección, contención del bacilo en estructuras denominadas granulomas (infección latente) o desarrollo de la enfermedad activa [Tomado de Madhukar Pai et al (2016)].

1.4 INFECCIÓN: MACRÓFAGOS ALVEOLARES

La interacción de los macrófagos con la bacteria se lleva a cabo a través de receptores de superficie e intracelulares. El primer tipo de receptores involucra a los Toll Like Receptors (TLR) en específico el TLR2, que se encarga de reconocer moléculas presentes en la pared celular de la micobacteria como: el lipoarabinomano (LAM), lipomano (LM), manósidos de fosfatidilinositol (manPI) y lipopolisacárido (LP)¹⁵. Por otra parte, TLR4 y TLR9 participan activando la vía de señalización MyD88 que juega un papel importante en la promoción de la fagocitosis y el montaje de una respuesta inmunológica adecuada para contener y eliminar a la micobacteria mediante la fusión y acidificación del fagolisosoma, generando H_2O_2 y otras especies intermediarias de oxígeno¹⁶.

Una vez dentro, la micobacteria libera moléculas como micolilarabinogalactanopeptidoglicano (manLAM) que pueden ser reconocidas por los receptores de dominio de oligomerización por unión de nucleótidos (NOD2). Tanto TLR2 como NOD2 activan la vía NF-KB que resulta en la producción de genes proinflamatorios como lo es el $TNF-\alpha$ que induce la activación de los macrófagos para matar más eficientemente a la micobacteria¹⁷.

También dentro del fagosoma, la micobacteria secreta la fosfatasa SapM y la cinasa de serina/treonina PknG que inhibe la fusión del fagolisosoma mediante la interferencia en el metabolismo del fosfatidilinositol 3 fosfato (PI3P).

Además de interferir con el tráfico de Rab GTPasas y de otras moléculas como Coronina 1/TACO necesarias para la maduración del fagolisosoma inhibiendo así la disminución del pH y producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno¹⁸ (Figura 3).

En general la respuesta inmune innata mediada por macrófagos puede generar tres escenarios diferentes: necrosis, apoptosis y supervivencia de macrófagos infectados. En el caso de generarse necrosis celular, la micobacteria es liberada al espacio extracelular y puede infectar a otros macrófagos o diseminarse a otros lugares mientras que en células que van a apoptosis, su membrana queda intacta sin liberar a las micobacterias favoreciendo así su muerte al mismo tiempo que los macrófagos infectados son eliminados.

La supervivencia de los macrófagos permite que la micobacteria persista y prolifere antes de que la respuesta inmune adaptativa se active mediante la presencia de células T específicas que han sido seleccionadas en los nódulos linfáticos regionales, generalmente dos o tres semanas después de la infección primaria¹².

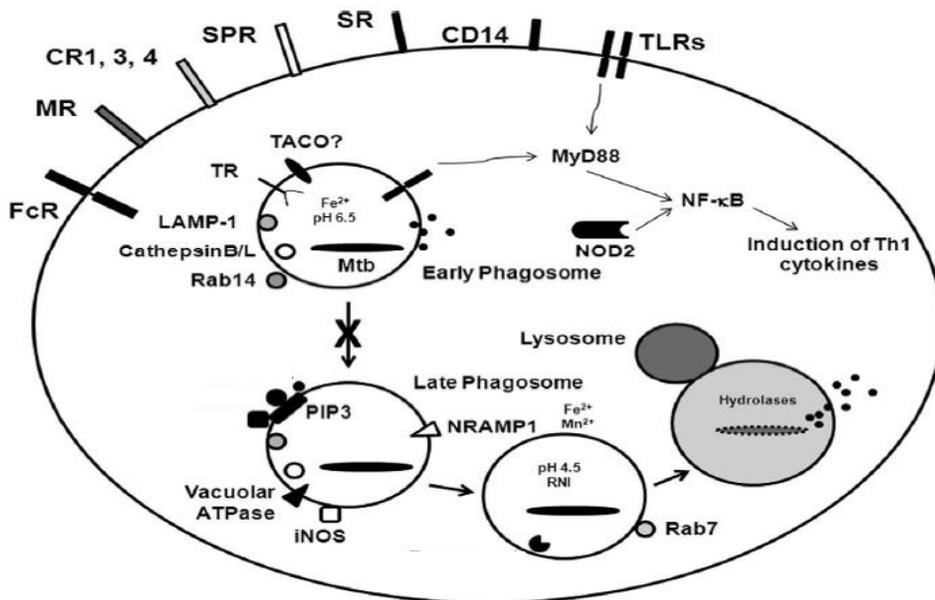


Figura 3. Infección de *M. tuberculosis* en macrófagos alveolares. El reconocimiento del bacilo por macrófagos alveolares se da a través de receptores membranales para Fc (FcR), manosa (MR), componentes del complemento (CR1, CR3, CR4), proteínas surfactantes (SPR), y scavengers (SR). Otros receptores como los Toll Like expresados en la membrana celular y de los fagosomas, y los NOD expresados en el citosol, actúan a través de la vía de MyD88, la cual induce la transcripción de genes de citocinas de tipo proinflamatorio mediante la traslocación del factor nuclear NF-κB. Una vez dentro del fagosoma la micobacteria retiene ciertas moléculas como TACO en la membrana para evitar su maduración a fagolisosoma al igual que evita la asociación de la ATPasa dependiente de protones, la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y de la proteína natural resistance-associated membrane protein 1 (NRAMP1) evitando así la reducción del pH, la formación de intermediarios reactivos de nitrógeno (RNIs) y la privación de Fe²⁺/Mn²⁺ [Adaptada de Sakamoto, K (2012)].

1.4.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

En el combate contra la infección por Mtb, una consecuencia de la activación de macrófagos por citocinas proinflamatorias como INF- γ es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno¹⁸.

Las ROS son moléculas que contienen oxígeno incompletamente reducido o con una distribución electrónica diferente, lo cual las hace más reactivas que el oxígeno molecular (Figura 4). En células aeróbicas son generadas en mitocondria como productos secundarios de la cadena transportadora de electrones, por enzimas oxidorreductasas o por la oxidación catalizada por metales de metabolitos.

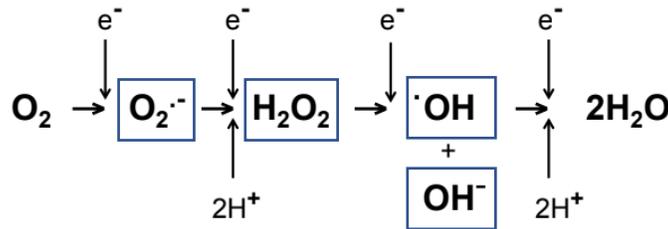


Figura 4. Reducción univalente del oxígeno molecular generando la formación de especies reactivas de oxígeno como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión y radical hidroxilo (OH^- y OH^{\cdot}).

Específicamente, en células fagocíticas como los macrófagos, los ROS contribuyen a su actividad bactericida mediante el proceso llamado estallido respiratorio. Este proceso es mediado por la enzima NADPH oxidasa la cual reduce el oxígeno extracelular de oxígeno molecular (O_2) a anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Figura 5). En condiciones normales esta enzima se encuentra desactivada, es decir sus componentes están separados físicamente. Al haber un estímulo las subunidades citosólicas $p47^{phox}/p67^{phox}/p40^{phox}$ y la GTPasa Rac1/Rac2 migran hacia la membrana plasmática e interactúan con las subunidades unidas a membrana, los citocromos $gp91^{phox}$ y $p22^{phox}$, provocando su activación. Una vez que se produce el radical superóxido puede dismutar rápidamente a H_2O_2 afuera de la célula o mediante la enzima superóxido dismutasa¹⁹.

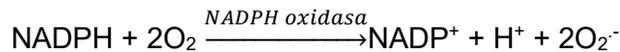


Figura 5. Reducción del oxígeno mediante la enzima NADPH oxidasa durante el proceso de estallido respiratorio en células fagocíticas.

La producción de estas especies a su vez se ha relacionado con la activación de vías de señalización proinflamatorias en macrófagos alveolares^{20,21} murinos como NF- κ B que se sabe es importante para la erradicación de la micobacteria y en la promoción de muerte celular programada²².

Aunado a este mecanismo indirecto, las especies reactivas de oxígeno poseen actividad microbicida directa ya que pueden reaccionar fácilmente con residuos de proteínas como la arginina, treonina, lisinas o tirosinas generando un cambio conformacional en las proteínas, la peroxidación de lípidos de la pared y daño directo al ADN²³. También se sabe que pueden reaccionar con óxido nitroso (NO) para formar especies reactivas de nitrógeno (RNS) produciendo peroxinitrito (ONOO⁻) dentro de macrófagos infectados jugando un papel importante en la muerte de *M. tuberculosis*²⁴.

A pesar de esto, la mayoría de bacterias incluyendo Mtb están equipadas con mecanismos de defensa en contra de las especies reactivas de oxígeno como enzimas detoxificantes como: dismutasas, peroxidasas y catalasas, proteínas redox (tioredoxina y peroxiredoxina) y moléculas que ayudan a mantener un ambiente intracelular reductor reaccionando con las ROS (glutación, micotiol y NADPH)²⁵. Además de que poseen mecanismos para contrarrestar el daño por oxidación incluyendo enzimas proteolíticas, lipolíticas y reparadoras del ADN.

1.4.2 APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada causada por diferentes estímulos microambientales como lo son el secuestro de factores de crecimiento, daño al ADN, incremento en las especies reactivas de oxígeno, estrés en retículo endoplásmico, entre otros²².

Este proceso celular es iniciado a través de dos vías: la extrínseca y la intrínseca. La primera es mediada vía receptores membranales de muerte como Fas/CD95 o TNF- α receptor 1 (TNFR1) y la segunda es iniciada cuando la mitocondria sensa un incremento en el estrés intracelular. Ambas generan la activación de caspasas (proteasas cistein-aspartil específicas) que escinden a una gran variedad de proteínas blanco²⁶. Para el caso específico de la vía intrínseca las caspasas están controladas por una familia de proteínas llamadas BCL-2 (B-cell-lymphoma-2) que contienen moléculas anti y pro-apoptóticas²⁶.

A nivel macroscópico se pueden observar cambios morfológicos en la célula como la constricción del citoplasma, condensación de la cromatina (pyknosis), fragmentación del núcleo (karyorrhexis) y formación de protrusiones en la membrana plasmática que culminan en la formación de vesículas pequeñas o cuerpos apoptóticos²² que pueden expresar en su superficie moléculas para atraer a otras células y promover su fagocitosis sin iniciar un proceso inflamatorio.

En el caso de infecciones por microorganismos intracelulares como virus se sabe que la apoptosis sirve como un mecanismo de defensa del hospedero para limitar los recursos para su replicación y disminuir el daño generado por necrosis²⁷.

Para *M. tuberculosis* se ha comprobado que tanto *in vitro* e *in vivo* cepas hipervirulentas inducen menos apoptosis en macrófagos que otras de virulencia baja o media por lo que se cree que la inhibición de la apoptosis es una estrategia que usa la micobacteria para sobrevivir durante más tiempo en la célula²⁸. La forma en la cual se ha demostrado que el bacilo inhibe la apoptosis es mediante la promoción de la expresión de moléculas anti-apoptóticas, la disminución de moléculas pro-apoptóticas o del receptor FasL y la secreción del receptor de TNF soluble, es decir puede actuar en ambas vías²⁹ (Figura 6).

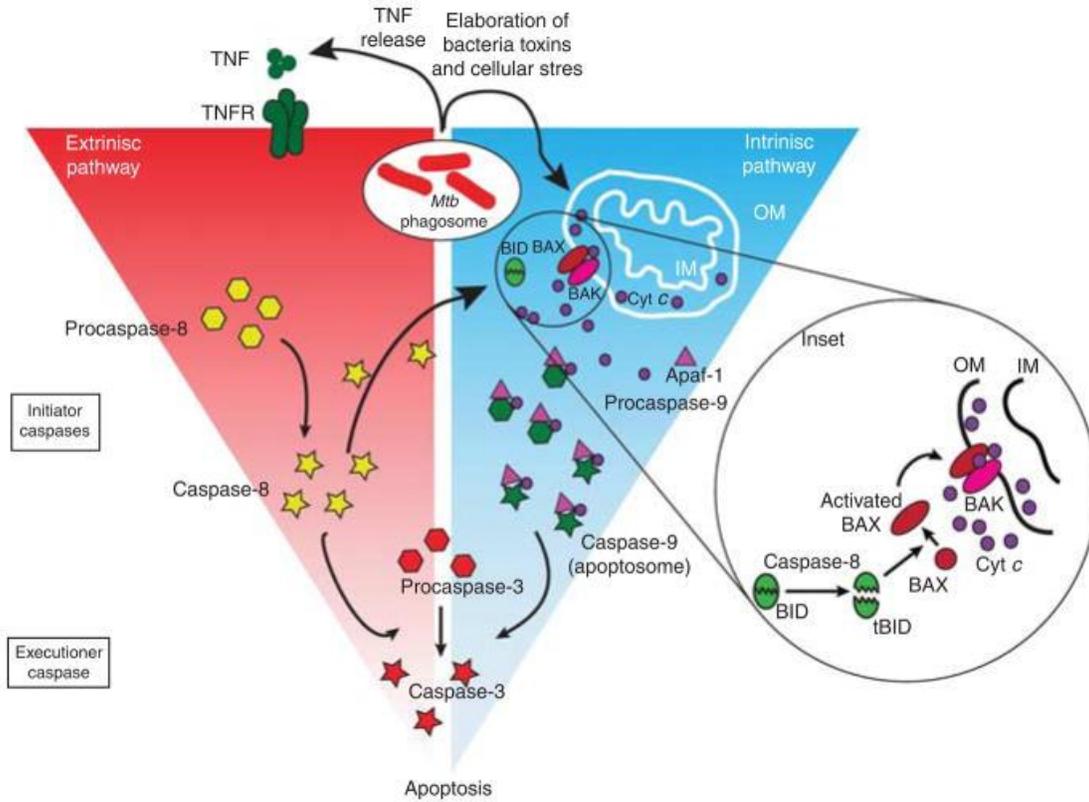


Figura 6. Promoción de la apoptosis vía extrínseca e intrínseca en macrófagos alveolares durante la infección con Mtb. La producción de TNF puede activar la vía extrínseca resultando en la activación de la caspasa 8. No se sabe con certeza que estímulo activa la vía intrínseca. El estrés o la activación de la caspasa-8 resulta en la hidrólisis de BID y por consiguiente la activación de BAX (moléculas proapoptóticas) que promueve la salida del citocromo c del espacio intermembranal mitocondrial al citosol donde activa la caspasa-9. Cyt c, citocromo c; IM, membrana interna mitocondrial; Mtb, Mycobacterium tuberculosis; OM, membrana externa mitocondrial; TNF, factor de necrosis tumoral; TNFR, receptor de TNF [Tomado de Behar, SM *et al* (2011)].

1.5 TRATAMIENTO POR QUIMIOTERAPIA

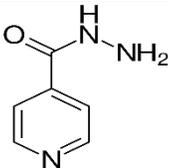
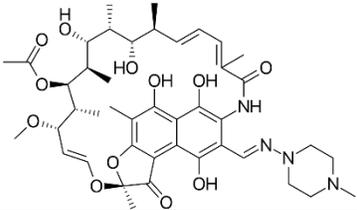
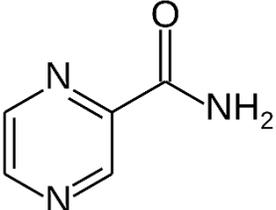
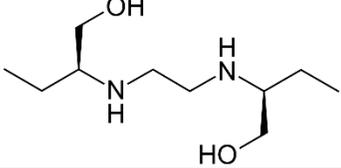
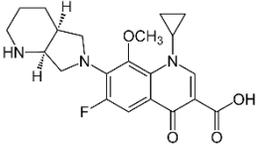
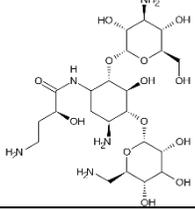
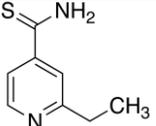
Para el tratamiento de los nuevos casos de tuberculosis la OMS recomienda la implementación de un régimen de seis meses con fármacos denominados de primera línea entre los que se encuentran la isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Durante los primeros dos meses (fase intensiva) se deberán tomar diariamente los cuatro fármacos seguido de la toma de solamente isoniazida y rifampicina por los cuatro meses restantes (fase de sostén).

Hoy en día existen cepas resistentes a estos fármacos, para el caso en particular de la tuberculosis multidrogoresistente (MDR) la resistencia es a la isoniazida y rifampicina que son los fármacos más potentes para eliminar a Mtb. La tuberculosis extremadamente resistente a los medicamentos (XDR Tb, por sus siglas en inglés) es menos común e incluye resistencia a la isoniazida y a la rifampicina, así como a todas las fluoroquinolonas y a por lo menos uno de tres medicamentos inyectables de segunda línea (amikacina, kanamicina o capreomicina).

El régimen empírico para tratar la tuberculosis MDR debe incluir al menos cuatro medicamentos potencialmente activos denominados de segunda línea como: fluoroquinolonas de última generación (moxifloxacino, gatifloxacino, olevofloxacino), un aminoglucósido inyectable (amikacina, capreomicina o kanamicina), cualquier medicamento de primera línea para el cual el aislado sea susceptible (como pirazinamida), más la adición de un medicamento como cicloserina, ácido paraaminosalicílico, terizidona, protionamida, o etionamida (Tabla 1).

Este tratamiento tiene una duración de entre 18 meses a dos años y en un 45 % de los pacientes se ha registrado la aparición de efectos adversos de moderados a severos. Para la tuberculosis XDR no existe un tratamiento estándar y hay menos opciones de fármacos³⁰.

Tabla 1. Mecanismo de acción y estructura de los fármacos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis sensible (primera línea) y multidrogorresistente (segunda línea). [Tomado de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00218>]

Fármacos	Mecanismo de acción	Estructura
PRIMERA LÍNEA		
Isoniazida	Inhibición de la enzima enoyl-ACP (síntesis de ácidos micólicos)	
Rifampicina	Inhibición de la ARN polimerasa (Transcripción)	
Pirazinamida	Genera la acidificación del citoplasma de la micobacteria	
Etambutol	Inhibición de la síntesis de arabinogalactano.	
SEGUNDA LÍNEA		
Moxifloxacino	Inhibición de la ADN girasa	
Amikacina	Inhibición de la subunidad 30S ribosomal (traducción)	
Etionamida	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	

Los fármacos anti-Tb pueden ser agrupados de acuerdo con ciertas características. En 2011 la OMS clasificó a los antibióticos en cinco grupos en donde los fármacos de primera línea pertenecían al grupo 1 y los de segunda línea a los grupos 2 al 5. Para 2016 se hace una nueva clasificación (Grupos A-D) basándose en su eficacia y seguridad³¹.

Tabla 2. Clasificación de los fármacos anti-Tb de acuerdo con su eficacia y seguridad [Tomado de Tiberi, S *et al* (2017)].

GRUPOS	FÁRMACOS	EFICACIA	SEGURIDAD
Grupo 1 Primera línea	<ul style="list-style-type: none"> • Isoniazida • Pirazinamida • Etambutol • Rifampicina 	Muy eficaz	Baja toxicidad
Grupo A Fluoroquinolonas	<ul style="list-style-type: none"> • Levofloxacin • Moxifloxacin • Gatifloxacin • Ofloxacin 	Muy eficaz	Baja toxicidad
Grupo B Agentes inyectables	<ul style="list-style-type: none"> • Kanamicina • Amikacina • Capreomicina • Estreptomicina 	Solo poseen actividad bactericida	Toxicidad media
Grupo C Otros agentes centrales en el tratamiento de Mtb MDR	<ul style="list-style-type: none"> • Cicloserina/Terizidona • Proteonamida/Etionamida • Linezolid/Clofazimina 	Actividad bactericida y esterilizante	Alta toxicidad
Grupo D Agentes agregados (no centrales en el tratamiento de Mtb MDR)	<p style="text-align: right;">D1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pirazinamida • Etambutol • Altas dosis de isoniazida <p style="text-align: right;">D2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bedaquilina • Delamanida <p style="text-align: right;">D3</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acido para-aminosalicilico • Imipenem/Cilastatina • Amoxicilina/Clavulanato • Tioacetazona 	Solo poseen actividad bactericida	Se sigue estudiando su toxicidad

Grupo A: incluye a las fluoroquinolonas (particularmente de última generación), las cuales son centrales en el tratamiento contra Mtb MDR demostrando actividades bactericidas y esterilizantes al igual que un grado de toxicidad bajo. Son los mejores agentes para el tratamiento.

Grupo B: Solo tienen actividad bactericida y su toxicidad es mayor que el de las fluoroquinolonas.

Grupo C: Linezolid es un fármaco central en el tratamiento con actividad bactericida y esterilizante, pero es altamente tóxico. Etionamida/Protionamida poseen una actividad bactericida moderada, pero menos dañino. Clofazimina tiene actividad esterilizante y es más tolerable. Cicloserina tiene una baja actividad bactericida y un pésimo perfil de toxicidad.

Grupo D: Específicamente el grupo D2 (que incluye a bedaquilina/delamanida) tiene una efectividad para ser considerados del grupo B sin embargo se sigue estudiando su perfil de toxicidad a lo largo de los 6 meses que dura el tratamiento.

De entre los fármacos de primera y segunda línea los más eficaces son la isoniazida y el moxifloxacino respectivamente por lo que su mecanismo de acción se explica con mayor detalle:

La isoniazida es un profármaco que atraviesa la membrana de la micobacteria por difusión simple. Una vez dentro es activado por una enzima denominada katG, una catalasa-peroxidasa, que lo oxida generando especies reactivas como lo son el radical isonicotinoil que se une al NAD⁺ o NADP⁺ para formar aductos. Estas moléculas funcionan como inhibidores de la enzima enoyl-ACP reductasa dependiente de NADH (InhA) que es de gran importancia en el proceso de síntesis de ácidos micólicos. La inhibición de la enoyl-ACP reductasa causa la acumulación de ácidos grasos de cadena larga y la muerte celular³².

El moxifloxacino es una molécula perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas con actividad bactericida considerado un antibiótico de amplio espectro cuyo mecanismo de acción se basa en la unión directa e inhibición de la enzima ADN girasa. Esta enzima se encarga de desenrollar la doble cadena de ADN para permitir la replicación, transcripción y reparación del material genético de la micobacteria³³.

Una parte importante en el tratamiento de la tuberculosis es la utilización de múltiples fármacos por lo que conceptos como sinergia y antagonismo deben ser abordados al estudiar un posible nuevo agente terapéutico. Si la combinación es mayor, igual o menor a la suma de los efectos individuales, la combinación es de tipo sinérgica, aditiva o antagonista respectivamente. Las ventajas de la sinergia es que permite disminuir la dosis de los fármacos usados disminuyendo así su toxicidad³⁴ además que contribuiría a disminuir la aparición de cepas resistentes a algunos de los fármacos usados.

En el caso de la tuberculosis se sabe que la isoniazida y la rifampicina inducen fácilmente resistencia en cepas de ahí la necesidad de combinarlos con otros fármacos que tengan diferentes mecanismos de acción³⁵.

1.6 NUEVAS FUENTES DE ANTIBIOTICOS

Desde hace siglos culturas antiguas han utilizado plantas, hongos o insectos para curar heridas infectadas sin embargo no es hasta el descubrimiento de la penicilina a partir de un hongo que se comienzan a utilizar masivamente antibióticos aislados de fuentes naturales para erradicar infecciones³⁶. Este hecho histórico en el siglo XX fue un gran avance en la medicina terapéutica ya que permitió combatir enfermedades infecciosas que inclusive eran consideradas mortales.

En años recientes el interés por descubrir nuevos antibióticos ha aumentado debido a la aparición de cepas de bacterias farmacorresistentes y al redescubrimiento de las mismas moléculas a partir de microorganismos y de los métodos de aislamiento convencionales. Por lo tanto, la estrategia ha sido regresar al estudio de productos naturales como lo son los extractos de plantas, venenos de animales ponzoñosos y metabolitos de microorganismos conocidos por poseer actividad terapéutica y que pueden servir como fuentes de nuevas moléculas para el desarrollo de fármacos³⁷.

Se sabe que los compuestos derivados de productos naturales ejercen un papel biológico ya que han evolucionado para interactuar con enzimas, receptores y canales iónicos. Muchos de estos son activos y pueden atravesar las membranas, interferir con enzimas y debido a que algunos son productos de defensa también pueden intervenir en procesos vitales y universales de otros organismos³⁸. Es decir, su gran potencial radica en su diversidad en cuanto a composición química, los efectos de la presión evolutiva para crear moléculas biológicamente

activas, la similitud en la estructura de los blancos proteicos a lo largo de diferentes especies, entre otros³⁹.

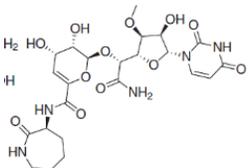
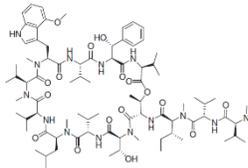
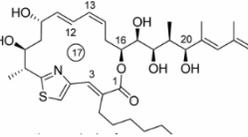
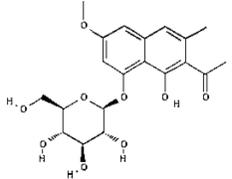
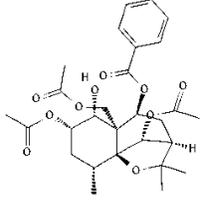
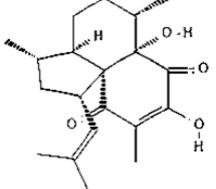
El aislamiento de una nueva molécula derivada de productos naturales se rige por una serie de pasos que comienzan con la obtención del extracto material seco o fresco, su concentración y fraccionamiento para obtener los diferentes componentes en la mayor cantidad posible y la purificación de éstos. Los compuestos puros son los que se utilizan en los ensayos para determinar si poseen alguna actividad biológica entre los que se encuentran la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), su citotoxicidad en líneas celulares de mamíferos (IC_{50}) y el índice de selectividad. Para el caso de tuberculosis el Instituto de estándares para el laboratorio clínico (CLSI) recomienda un valor de MIC menor a $25 \mu M$ ⁴⁰ para compuestos purificados con un índice de selectividad (IC_{50}/MIC) > 10 , es decir deben poseer un valor muy bajo de MIC y uno muy alto de IC_{50} .

Gracias a la disponibilidad de nuevas herramientas y tecnologías de alto rendimiento para la identificación, caracterización y evaluación de estas moléculas³⁸, las farmacéuticas están volviendo a considerar a los productos naturales como una buena fuente para el descubrimiento de fármacos siendo su uso cada vez más racional y el camino para su aprobación y comercialización más rápido⁴¹.

Entre 1981 y 2019 se han aprobado por la FDA 1881 medicamentos de los cuales 18.4 % son macromoléculas aisladas de organismos biológicos, 3.8% son productos naturales, 0.8% son medicamentos herbolarios y 18.4% son derivados de productos naturales con modificaciones químicas⁴². Para el tratamiento de la tuberculosis en específico, existen medicamentos derivados de moléculas producidas por microorganismos como bacterias, como ejemplo: la Estreptomina (*Streptomyces griseus*), la Rifampicina (*Amycolatopsis mediterranei*) y la Capreomicina (*Streptomyces capreolus*)⁴³.

Hoy en día se están estudiando moléculas con actividad antimicrobiana derivadas principalmente de bacterias, plantas y organismos marinos que han demostrado ser fuente de estructuras completamente nuevas con mecanismos de acción diferentes que pueden proveer una nueva dirección en la búsqueda y el descubrimiento de moléculas^{44,45} (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos extraídos de fuentes naturales con actividad antimicobacteriana [Adaptado de Masayuki Igarashi, 2017 y Abraham García, 2012]

Compuesto	Fuente	Actividad contra Mtb H37Rv	Mecanismo de acción	Estructura
Capuramycin	<i>Streptomyces griseus</i> (Bacteria)	MIC= 12.5 µg/mL	Inhibidor de la Translocasa I (MraY)	
Ecumicin	<i>Nonomuraea sp.</i> (Bacteria)	MIC= 0.6 µM *MDR/XDR-TB	Inhibidor de la actividad de proteasa de la enzima Clp1	
Thuggacin A	<i>Sorangium cellulosum</i> (Bacteria)	MIC= 8.0 µg/mL	Inhibidor de la cadena transportadora de electrones	
Naphthalene torachryson	<i>Rumex sp.</i> (Planta)	MIC= 12.6 µM	Inhibir la biosíntesis de p-ácido aminobenzoico (PABA)	
Celahin C	<i>Microtropis japonica</i> (Planta)	MIC= 30.6 µM	No hay información	
Elisabethin H	<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> (Coral)	MIC ₅₁ = 6.25 µg/mL	No hay información	

Para muchas moléculas antituberculosas se conocen los datos relacionados con su eficacia *in vitro* (IC₅₀ o MIC) sin embargo, el potencial para desarrollarse como un nuevo fármaco depende de su capacidad para inhibir los mecanismos de supervivencia de la micobacteria en humanos³⁹ haciendo necesario la determinación de su eficacia en modelos animales para su posible migración a estudios clínicos.

1.6.1 VENENO DE ALACRAN

A lo largo de la evolución ciertos animales pertenecientes a los filos: Cnidaria, Annelida, Echinodermata, Mollusca y Arthropoda, han utilizado sustancias tóxicas o venenos como mecanismos de supervivencia. La finalidad del veneno es inyectarlo al depredador o a la presa mediante una picadura o mordida con el fin de inmovilizarlo o matarlo⁴⁶.

Cabe mencionar que desde hace miles de años los venenos han sido utilizados en la medicina tradicional para curar ciertas enfermedades, pero es hasta finales del siglo pasado que se han utilizado y estudiado de manera más rigurosa para curar enfermedades⁴⁶. En específico, el veneno de alacrán ha sido utilizado para tratar diversas enfermedades como la artritis, el cáncer, problemas gastrointestinales, entre otros⁴⁶.

Su composición química es muy variada y consta de péptidos, enzimas, mucoproteínas, aminoácidos libres, nucleótidos, lípidos, aminos, componentes heterocíclicos, sales inorgánicas entre otros compuestos⁴⁷. México es uno de los países con mayor biodiversidad de especies de alacranes, coexisten al menos 281 de las 2300 especies diferentes, lo cual implica también una gran variedad de compuestos presentes en los venenos.

Para el caso específico de los péptidos⁴⁸ se ha demostrado que tienen propiedades antibacterianas^{49,50}, antifúngicas⁵¹, antivirales⁵², anticancerígenas⁵³, antihipertensivas⁵⁴, e inmunomoduladoras⁵⁵ siendo el mejor ejemplo la clorotoxina. Esta molécula ha demostrado tener una unión específica a canales de cloro en células de glioma evitando su migración e invasión a otros sitios; actualmente se encuentran registrados siete protocolos de ensayos clínicos, de los cuales la mayoría se encuentran en fase dos de experimentación⁵⁶.

Entre todos, los polipéptidos que se unen a canales de Na^+ y K^+ son de los que se tiene más información. Se sabe que los moduladores de canales de Na^+ poseen entre 60 y 76 aminoácidos y están estabilizados por cuatro puentes disulfuro mientras que los de K^+ tienen entre 31 y 39 aminoácidos y están estabilizados por tres o cuatro puentes disulfuro. Estos péptidos también denominados toxinas poseen un dominio de unión que es altamente conservado conformado por un motivo de alfa hélice y dos o tres de hoja β plegada mantenidas por puentes disulfuros⁵⁷.

En México, el laboratorio del Dr. Lourival Possani Postay del Instituto de Biotecnología, UNAM es uno de los grupos de investigación más consolidados en el estudio y caracterización de los componentes del veneno de alacrán. Entre los trabajos más recientes llevados a cabo está la caracterización del transcriptoma de la glándula de veneno y el proteoma del veneno de una de las especies más comunes del país como lo es *Centruroides limpidus* encontrando que los péptidos que interfieren con el funcionamiento de los canales iónicos de Na^+ (NaScTx) y K^+ (KScTx) están presentes en mayor abundancia y tienen más diversidad⁵⁸.

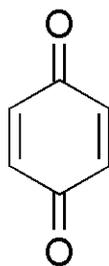
Péptidos con actividad antimicrobiana también han sido estudiados como el aislado del escorpión australiano UyCT que presentó MICs muy bajas contra *S. aureus* y bacterias gram negativas farmacoresistentes⁴⁹ o VpAmp del escorpión *Vaejovis punctatus* efectivo contra bacterias gram negativas especialmente *Acinetobacter baumannii*⁵⁰. Otros componentes como la toxina de Ts1 del escorpión *Tityus serrulatus* han sido analizados demostrando efectos inmunomoduladores como la estimulación de macrófagos para la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF, INF e IL-6⁵⁵.

Del veneno del alacrán *Vaejovis mexicanus* un potente péptido inmunomodular (Vm24) fue aislado y descrito como efectivo bloqueador de canales de potasio Kv1.3, importantes en enfermedades autoinmunes^{59,60}.

La gran mayoría de los componentes del veneno de los alacranes que se conocían hasta ahora son todos de origen proteico, esto es, compuestos de aminoácidos. Solamente en los últimos años el grupo se ha interesado en estudiar componentes heterocíclicos, como se describirá en la sección siguiente.

1.7 BENZOQUINONAS

Las quinonas o benzoquinonas son un amplio grupo de moléculas cuya estructura base es la 1,4-benzoquinona o *p*-benzoquinona (Figura 7) y se encuentran presentes en bacterias, plantas, artrópodos teniendo roles en la fosforilación oxidativa y en la cadena transportadora de electrones haciéndolos primordiales para procesos como la fotosíntesis o la respiración⁶¹. Debido a que su presencia es común en sistemas biológicos se considera una molécula inocua pero algunos derivados han demostrado tener aplicaciones farmacológicas como: antibióticos, antitumorales, antimaláricos y herbicidas, además de utilizarse como pigmentos naturales⁶².



p-Benzoquinone

Figura 7. Estructura química de las benzoquinonas.

Desde hace miles de años, extractos crudos de plantas que tenían quinonas entre sus componentes han sido utilizadas como remedios medicinales y a través de los años se les han descubierto más propiedades. Uno de los ejemplos más conocidos es la estreptonigrina, compuesto producido por *Streptomyces flocculus* que tiene propiedades antitumorales y antibióticas⁶³. Su mecanismo de acción se basa en la producción de O_2^- o H_2O_2 asociado con la presencia de metales como hierro y cobre generando así una inhibición en la síntesis de ADN²⁵. Entre los demás grupos de fármacos con esta estructura se encuentran las antraciclinas, mitomicinas y saframocinas cuyo mecanismo de acción varía, pero en todos los casos se observa un aumento en las especies reactivas de oxígeno y un daño directo a la estructura del ADN.

Debido a su capacidad de participar en reacciones redox mediante la ganancia de electrones, se cree juegan un papel primordial en el movimiento de electrones en la cadena transportadora en membrana (Coenzima Q). En estas situaciones las moléculas funcionan como puentes entre los diversos citocromos o flavoproteínas⁶⁴.

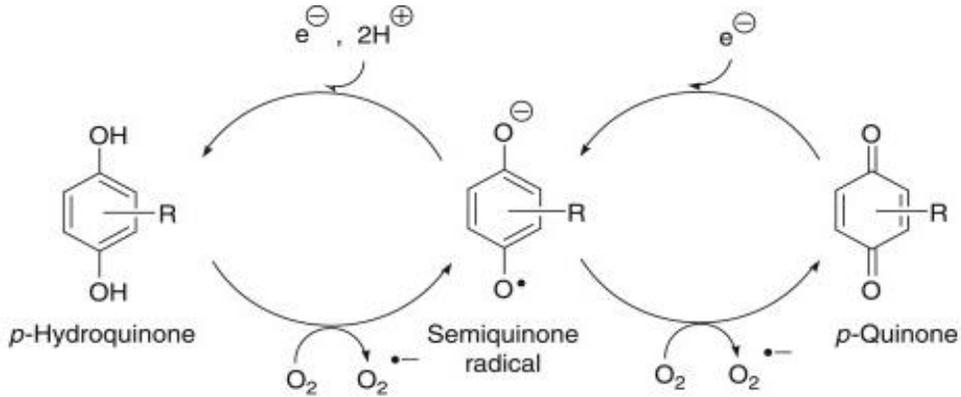


Figura 8. Formación de especies reactivas de oxígeno mediante la oxidación y reducción de las benzoquinonas [Tomado de Nelson, D. (2017)]

Las benzoquinonas al estar en su forma reducida pueden reaccionar con el oxígeno molecular propiciando la formación de especies reactivas de oxígeno como ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 8). El $O_2^{\cdot-}$ puede dañar proteínas con centros de hierro azufre desestabilizando el ion ferroso Fe^{2+} . Este metal puede reaccionar a su vez con el H_2O_2 mediante la reacción de Fenton (Figura 9) produciendo radicales hidroxilo (OH^{\cdot}). Estos radicales pueden dañar directamente el ADN, lípidos y proteínas²⁵.

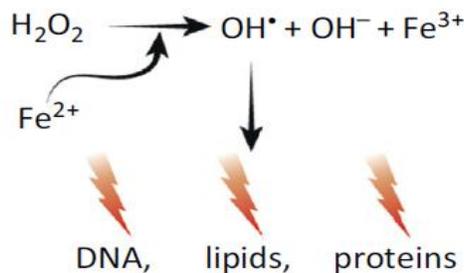


Figura 9. Mecanismo de acción de las especies reactivas de oxígeno en sistemas biológicos.

Hasta ahora se ha evaluado la actividad antimicrobiana de muy pocas moléculas que tienen una benzoquinona en su estructura. La que ha sido más caracterizada fue el ATD-3169 (Figura 10) que presentó una MIC de 3.125 μM para las cepas H37Rv y MDR; y de 6.25 μM para una cepa extremadamente resistente (XDR) además de que al combinarse con el antibiótico clofazimina generaba un efecto sinérgico. En cuanto al mecanismo de acción, se determinó que causaba un incremento en la cantidad de anión superóxido y esto promovía la expresión de genes relacionados con la disminución de especies reactivas de oxígeno como *katG* y la reparación del ADN como *RecA*⁶⁵.

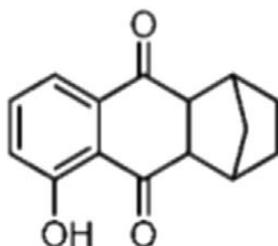


Figura 10. Estructura química del ATD-3169

1.7.1 BENZOQUINONA AZUL

Recientemente se aislaron dos compuestos que no habían sido identificados anteriormente, los cuales fueron encontrados en el veneno del alacrán mexicano *Diplocentrus melici*. En contacto con el aire, estas moléculas precursoras se oxidan, generando dos componentes coloridos cuya estructura después fue determinada mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Las estructuras que se obtuvieron fueron el compuesto rojo o 3,5-dimetoxi-2-(metiltio)ciclohexa-2,5-dien-1,4-diona y el compuesto azul o 5-metoxi-2,3-bis(metiltio)ciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (Figura 11). Ambos presentan actividad bactericida contra *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis* respectivamente⁵.

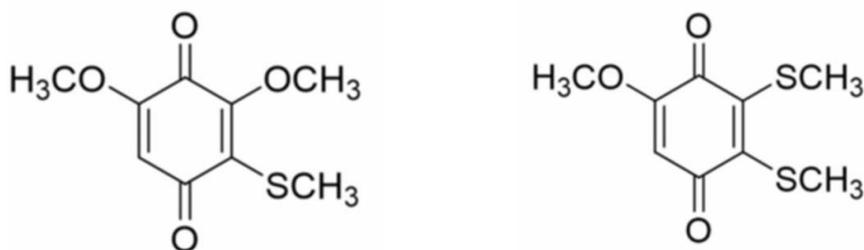


Figura 11. Estructura química de la benzoquinona roja (izquierda) y azul (derecha).

Ambos compuestos fueron patentados en los Estados Unidos en el año 2019⁶⁶:

Para el caso específico de la benzoquinona azul, se demostró que no solo tiene actividad bactericida contra *S. aureus* sino que es capaz de promover ROS en células de meduloblastoma (cáncer primario cerebral) y promueve la apoptosis en células inmortalizadas de linfocitos T (leucemia linfocítica aguda) sin provocar citotoxicidad. A pesar de esto, lo que más llama la atención es su capacidad para matar a *Mtb* sensible a isoniazida y MDR⁵ (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad biológica de la benzoquinona azul *in vitro*
[Tomado de Cárcamo-Noriega, E *et al* (2019)].

	BENZOQUINONA AZUL
MIC <i>S. aureus</i>	6 µg/mL
Citotoxicidad [1, 5 y 25 µM, 12 h] *LDH	Jurkat, TE 671, SH-SY5Y (Hasta 30%) A549 (Hasta 10%)
Producción de ROS [6 h, 25 µM] *DCFH-DA	TE671 (+)
Promoción de apoptosis [0, 4, 8 y 12 h, 25 µM] *Fixable Viability Dye	Jurkat (Hasta 40%)
MIC <i>M. tb</i> H37Rv y MDR	4 y 8 µg/mL

El mecanismo de acción no se ha dilucidado por completo, pero de acuerdo con el análisis de ultraestructura cuando la micobacteria se expone a este compuesto el daño que se genera es principalmente a nivel de pared celular, muy parecido a cuando se expone al medicamento de primera línea isoniazida que funciona inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos (Figura 12).

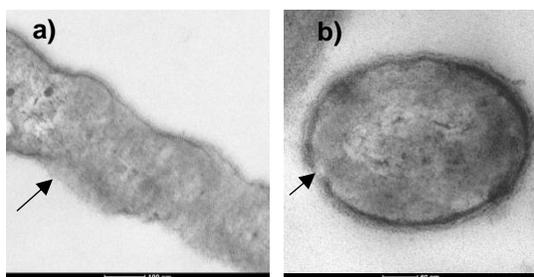


Figura 12. Anormalidades producidas por la exposición de la micobacteria a la benzoquinona azul como la disrupción de la pared celular (b) también observada al exponerse a isoniazida (a).

Por otra parte, se hicieron ensayos usando la línea celular MH-S (macrófagos alveolares de ratones BALB/c machos) para determinar su posible potencial en el tratamiento de la Tb. Macrófagos infectados con Mtb se pusieron en contacto con la benzoquinona azul observándose una disminución en la carga bacteriana intracelular de forma dosis-dependiente (Figura 13). Este resultado se considera favorable porque se sabe que durante la infección el bacilo es capaz de inhibir su destrucción en el fagolisosoma, por lo que exponiendo estas células al compuesto se promovería la apoptosis y por consiguiente la eliminación de la bacteria de manera indirecta⁶⁷.

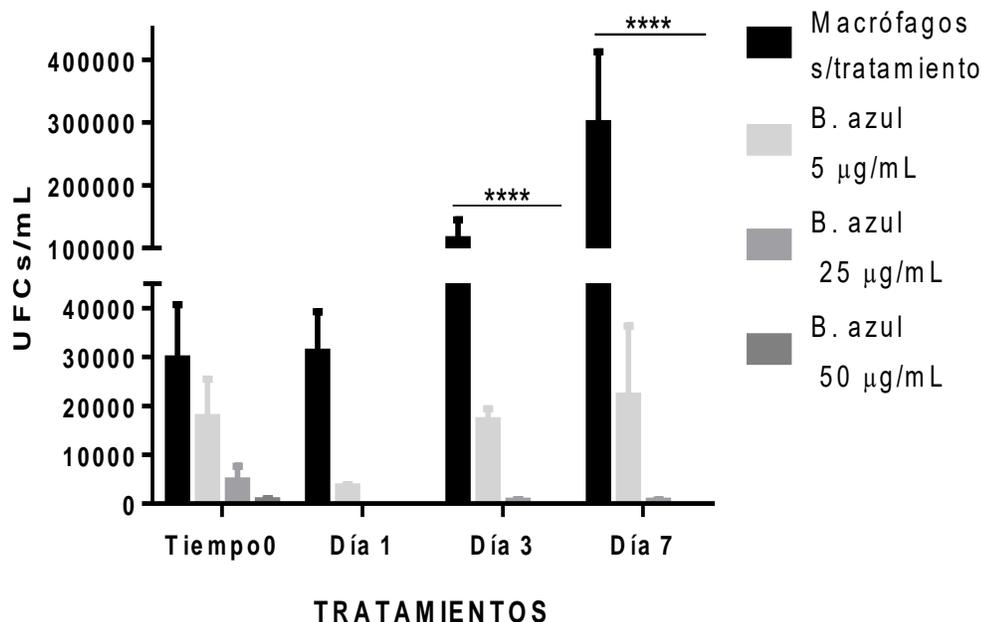


Figura 13. Carga bacteriana dentro de macrófagos MH-S infectados con *M. tuberculosis* H37Rv ATCC (MOI 1:5) y estimulados post infección con diferentes concentraciones del compuesto azul (5, 25 y 50µg/mL). Las barras representan la media de 3 muestras paralelas ± DE. ANOVA (2 vías) ****p<0.0001, Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos [Tomado de Mendoza-Trujillo, IM (2019)].

1.8 MODELO MURINO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA

Existen diferentes modelos experimentales de la tuberculosis establecidos en ratones, monos, conejillo de indias y conejos. Sin embargo, se sabe que los modelos no murinos poseen ciertas desventajas como la obtención de respuestas inmunitarias heterogéneas debido a que son genéticamente abiertos, la falta de reactivos necesarios para su caracterización y la dificultad para mantener las condiciones de bioseguridad requeridas para su manejo⁶⁸.

Por otra parte, también se sabe que en los modelos murinos no se puede imitar la enfermedad a la perfección debido a que requieren de grandes cantidades de micobacterias en pulmón para desarrollar la enfermedad, no se generan manifestaciones clínicas obvias, no se desarrolla necrosis y la estructura de granuloma es diferente, sin embargo este modelo es altamente rentable y conveniente⁶⁹ para evaluar la virulencia y patogenicidad de diversos aislados clínicos de *Mtb*, evaluar diferentes genotipos de micobacterias⁷⁰ al igual que probar estrategias profilácticas y terapéuticas⁷¹ desarrolladas para contrarrestar la enfermedad.

El modelo utilizado en este proyecto fue establecido por el Dr. Rogelio Hernández Pando y se basa en la utilización de ratones de la cepa Balb/c, los cuales son infectados por vía intratraqueal con una alta dosis de *M. tuberculosis*⁷². A grandes rasgos, la evolución de la enfermedad se divide en dos fases, en la primera fase o “fase protectora” se presenta inflamación perivascular y peribronquial en el pulmón con la presencia de macrófagos en el lumen alveolar y la aparición de granulomas a mitad de la fase. En cuanto a la respuesta inmunológica, se aumenta la cantidad de macrófagos y linfocitos CD4 de tipo Th1 alcanzando su pico a las tres semanas, en esta etapa el crecimiento de la bacteria está muy controlado. La segunda fase o fase crónica, que empieza a partir de los 28 días y dura hasta los 4 meses, se caracteriza por neumonía y fibrosis intersticial. Además, se da el incremento en la cantidad de micobacterias y de células CD8 junto con citocinas de tipo Th2 y una disminución en la cantidad de macrófagos activados y de citocinas como: IFN- γ , TNF- α e iNOS; estos cambios también se describen a lo largo de la enfermedad en humanos.

Capítulo 2

Justificación y planteamiento del problema

La tuberculosis es considerada como una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial; la aproximación de la OMS estableció que hubieron cerca de 10 millones de casos con aproximadamente 1.5 millones de muertes en 2018. Además, el 90% de estos casos se presentan en países de bajos o medianos ingresos que tienen infraestructuras de salud frágiles y recursos limitados.

Específicamente en México, de acuerdo con los registros de la dirección general de epidemiología, durante la última década ha habido una tendencia a la alza en el número de casos nuevos por año de tuberculosis pulmonar siendo los estados más afectados: Chihuahua, Sinaloa, Baja California, Ciudad de México, Hidalgo, Morelos, Veracruz y Chiapas⁷³.

Debido a que el tratamiento en pacientes es muy largo y consiste en varios medicamentos que se sabe producen diversos efectos secundarios como daño hepático, hipersensibilidad, entre otros; la mayoría de los pacientes lo abandona prematuramente lo cual ha contribuido al aumento en la resistencia de algunas cepas de Mtb contra la isoniazida (INH) y la rifampicina (RIF), definidas como cepas multidrogoresistentes (MDR). Hoy en día surge la necesidad de apoyar el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antimicobacteriana es por esto que este proyecto se enfoca en la evaluación del efecto terapéutico de la benzoquinona azul aislada del veneno del alacrán mexicano en ratones infectados con cepas sensibles y MDR para determinar su potencial como tratamiento de reemplazo de los fármacos ya existentes, poder disminuir la cantidad de los fármacos usados o reducir el tiempo de medicación con los mismos.

Capítulo 3

Hipótesis

La Benzoquinona azul del alacrán *Diplocentrus melici* ejerce un efecto terapéutico en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva a través de un mecanismo bactericida sobre *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la actividad terapéutica de la Benzoquinona azul en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la eficacia de la Benzoquinona azul como agente terapéutico en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.
2. Determinar si la Benzoquinona azul ejerce un efecto sinérgico al combinarse con antibióticos que forman parte del tratamiento de primera y segunda línea contra la tuberculosis.
3. Determinar el mecanismo de acción de la benzoquinona azul sobre *M. tuberculosis*.

Capítulo 4

Material y métodos

4.1 MODELO MURINO DE TUBERCULOSIS EXPERIMENTAL PULMONAR

Todos los procedimientos para la generación y utilización de micobacterias se realizaron dentro de un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad III en las instalaciones BSL3 del laboratorio de Patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) y siguiendo los lineamientos de la Comisión para Investigación con Animales (CINVA) bajo protocolo aprobado 1825 PAT-1825-16/18-1 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. Al final de cada procedimiento el material que tuvo contacto con micobacterias fue inactivado con Clidox™ 1:18 partes de agua/15min y colocado en bolsa roja resistente al proceso de esterilización (121°C/21lbs/20min) marcada con la leyenda “RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO INFECCIOSOS (RPBI’s)”.

Para la infección se trabajó con la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv donada por la Universidad Stanford y con un aislado clínico MDR proporcionado por el IMSS de Monterrey. En ambos casos la bacteria que se utilizó se encontraba guardada en solución fisiológica a -70 °C y fue previamente recuperada de un cultivo en fase logarítmica media. La concentración de ese lote (UFCs/mL) fue determinada después de congelarse a -70 °C por al menos una semana.

Siguiendo el modelo de tuberculosis progresiva pulmonar establecido por el Dr. Rogelio Hernández Pando (REF), ratones macho de la cepa BALB/c de ocho semanas de edad y 22 g de peso fueron proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del INCMNSZ. Los ratones fueron alojados en microaisladores (Allentown Air Flow System) con flujo constante y filtración de aire, en condiciones controladas de temperatura, humedad, ciclos de luz/oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*.

Al inicio del proceso para la infección, cada ratón fue anestesiado con Sevoflurano (100 μ L por ratón) dentro de una cámara de 20x20x20 cm y sujetado sobre una placa de aluminio utilizando una liga de caucho sobre los incisivos para poder localizar la tráquea y con una cánula de calibre 22Gx1" con punta roma de 1.25 mm se inocularon 100 μ L de 250,000 UFC de Mtb en solución salina isotónica (SSI). Una vez despierto cada ratón fue colocado nuevamente dentro del microaislador y se monitoreó durante su recuperación.

Administración farmacológica del compuesto azul

La benzoquinona azul fue aislada en el laboratorio del Dr. Lourival Possani Postay del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM; la determinación de su estructura y síntesis química se llevó a cabo en la Universidad Stanford. Todos los ensayos *in vivo* se llevaron a cabo a partir de una solución stock de 370 μ g/mL que tenía por disolvente una solución de etanol al 20% en agua, esto debido a la dificultad para disolver por completo los cristales en agua a esa concentración.

El tratamiento de ratones sanos consistió en administrar el compuesto azul diluido en agua inyectable por vía intratraqueal durante dos meses; lunes, miércoles y viernes. A los días 30 y 60 postratamiento se realizaron sacrificios de en promedio tres ratones por tiempo en donde se recolectaron las muestras para su procesamiento. En el caso de los ensayos con ratones infectados, el tratamiento con la benzoquinona azul se inició al día 60 postinfección siguiendo el mismo esquema de administración y sacrificios (Figura 14). La distribución de los ratones por grupo se indica abajo en el esquema que describe el planteamiento experimental (Tabla 5).

En los experimentos con los antibióticos de primera línea, se administró el compuesto azul de acuerdo con el esquema establecido anteriormente mientras que los fármacos de primera línea se administraron diariamente de lunes a viernes por vía intragástrica (isoniazida, pirazinamida, rifampicina) agregando dos tiempos más a la cinética de sacrificios: 7, 14, 28 y 60 días postratamiento. Para la técnica de administración intragástrica se sujetó el ratón de la nuca con los dedos índice y pulgar tomando la cola con el resto de los dedos; una vez en posición vertical se introdujo la cánula de calibre 22Gx1" y punta roma de 1.25 mm con movimientos suaves en el hocico para inyectar 100 μ L.

Las dosis del compuesto azul utilizadas en el primer ensayo con la cepa H37Rv se establecieron basándose en los experimentos *in vitro* en donde se determinó la MIC quedando de la siguiente manera: Dosis alta (4.7 µg/ratón/50µL), Dosis baja (0.47 µg/ratón/50µL) y Vehículo (50 µL de alcohol etílico al 20%). Para los ensayos posteriores se estableció una única dosis de 8 µg/ratón/50µL. En el caso de los antibióticos de primera línea se administró un octavo de la dosis establecida para humanos: rifampicina e isoniazida 0.2 mg/ratón y pirazinamida 0.6 mg/ratón.

Planteamiento experimental

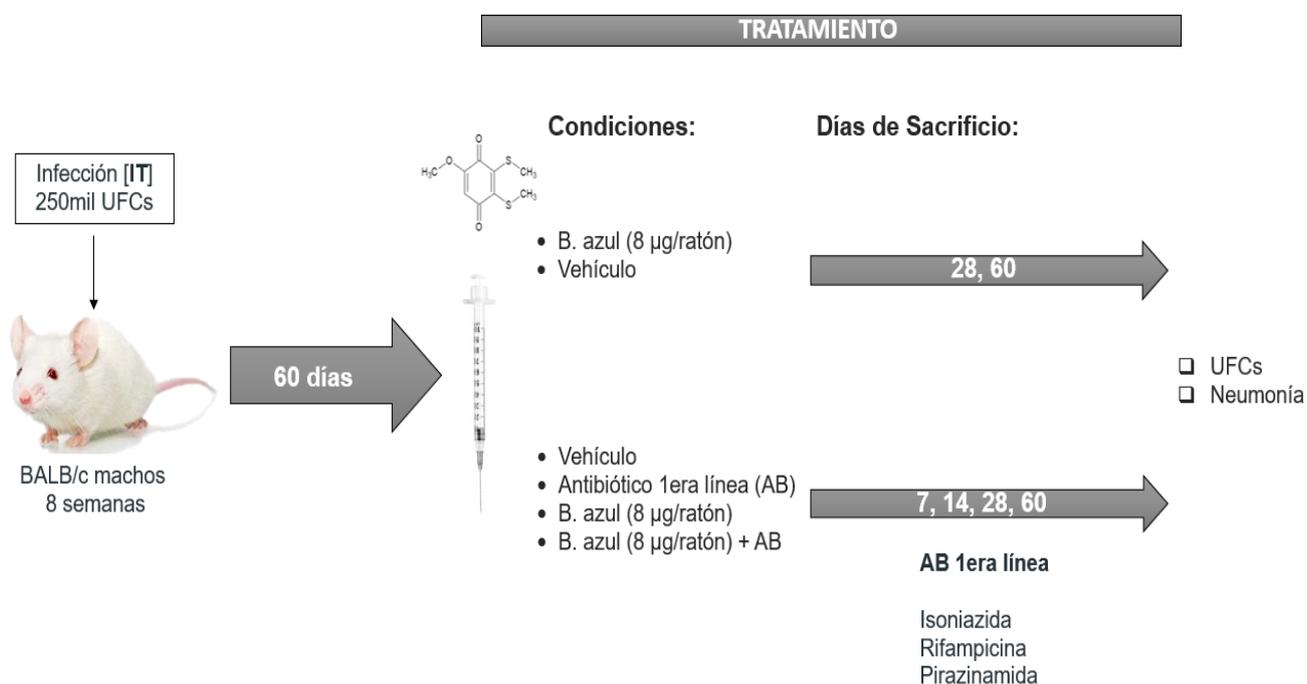


Figura 14. Modelo de tuberculosis pulmonar progresiva. Ratones macho de ocho semanas son infectados vía intratraqueal (IT) con una dosis alta (250, 000 bacterias) de la cepa tipo H37Rv. Al día 60 post-infección, grupos de ratones empiezan a ser tratados con benzoquinona azul sola o en conjunto con antibióticos de primera línea.

Tabla 5. Distribución de ratones en los ensayos realizados con el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva.

Cepa	Condiciones	Cinética de sacrificio (Días postratamiento)	No. De ratones por tiempo
Sin infectar	1. Vehículo	30 y 60	3/3
	2. B. azul (8 µg/ratón)		3/3
H37Rv Stanford	1. Vehículo	30 y 60	3/3
	2. B. azul (0.47 µg/ratón)		3/3
	3. B. azul (4.7 µg/ratón)		3/3
MDR	1. Vehículo	30 y 60	3/3
	2. B. azul (8 µg/ratón)		3/3
H37Rv Stanford	1. Vehículo	7, 15, 30 y 60	3/3/3/3
	2. AB (1era línea)		3/3/3/3
	3. B. azul (8 µg/ratón) + AB		3/3/3/3
	4. B. azul (8 µg/ratón)	30 y 60	3/3

Sacrificio de los ratones y toma de muestras

Los ratones se inyectaron con Pentobarbital sódico a una dosis de 210 mg/kg vía intraperitoneal (IP). Se sacrificaron por exanguinación y se les realizó la dislocación cervical para asegurar su muerte. Después se accedió a la cavidad torácica y se cortó el diafragma y las costillas de ambos costados para poder descubrir por completo los pulmones y la tráquea. Se perfundió con etanol solo el pulmón izquierdo y se colectó el pulmón derecho en un criotubo de 2 mL para congelar. Finalmente, el pulmón perfundido se colocó en un tubo con etanol absoluto para después ser tratado e incluido en parafina.

Determinación de la carga bacilar pulmonar

La carga bacilar se realizó por conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en los pulmones previamente guardados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para esto se descongelaron y se molieron con 1 perla de sílice y zirconia con el equipo FastPrep24 (MP Biomedicals) para después agregar 1 mL de PBS-Tween 80 0.05% y homogeneizar 3 veces más. En una placa de 96 pozos se colocaron 30 μL del concentrado de cada muestra (previamente sonicada por 45 segundos y mezclada) en un volumen de 270 μL de PBS-Tween 0.05% haciendo las siguientes diluciones seriadas: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y mezclando 10 veces al pasar de un pozo a otro. Posteriormente se sembraron 10 μL de cada dilución por duplicado en cajas Petri con medio Middlebrook 7H10 (Laboratorios Difco) enriquecido con medio OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Becton Dickinson), se dejaron incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 5% de dióxido de carbono haciendo una primera lectura a los 12 días y una segunda a los 21.

Análisis histológico y morfométrico

A los pulmones perfundidos vía IT con etanol absoluto y almacenados por al menos 24 horas se les realizaron cortes parasagitales a nivel del hilio pulmonar. Los órganos ya cortados fueron colocados en cassettes de plástico y procesados en un Spin Tissue Processor Microm STP 120 (ThermoFisher Scientific) para después ser embebidos en parafina en la estación de inclusión HistoStar Embedding Workstation (ThermoFisher Scientific). A cada bloque se le hicieron cortes de 4 μm usando un micrótopo (Leica RM2135) que fueron colocados en portaobjetos para desparafinarlos y posteriormente teñirlos en un tren de hematoxilina-eosina o con la tinción de tricrómico de Masson. Finalmente se colocó encima del tejido una gota de resina y un cubreobjetos. Cada corte fue observado al microscopio para después determinar el área de neumonía que fue en micras cuadradas mediante el analizador de imágenes Q Win Leica, Milton Keynes. Los datos fueron reportados como la media y la desviación estándar de 3 ratones diferentes por cada tiempo.

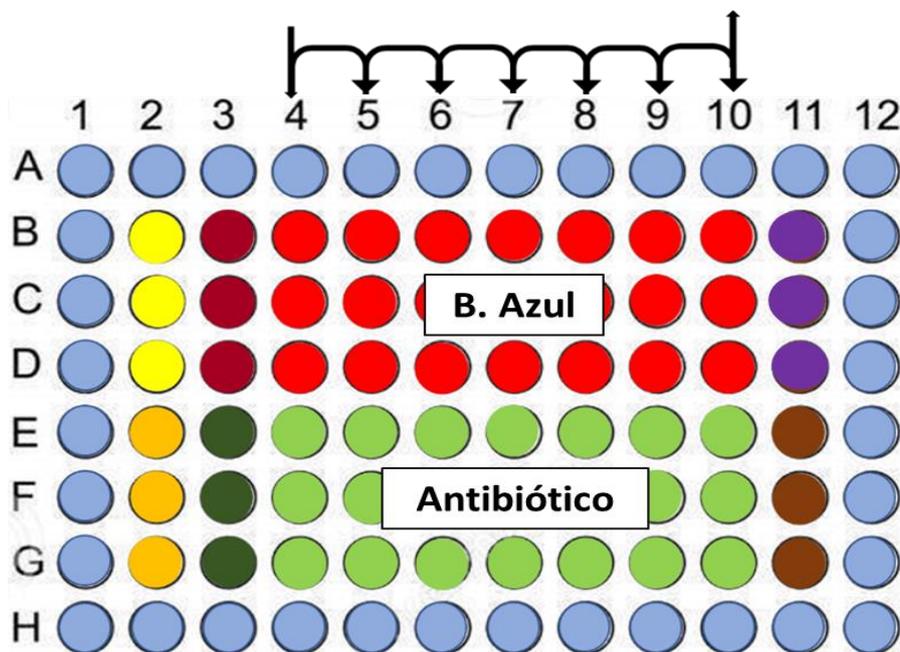
4.2 DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN UN CULTIVO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN PRESENCIA DE LA BENZOQUINONA AZUL USANDO D2CFDA (2', 7'-Diacetato de diclorofluoreseína)

Siguiendo la metodología descrita por Howell Wescott, Heather A. et al (2017)⁷⁴ brevemente un cultivo de Mtb H37Rv y MDR en fase logarítmica se ajustó a una $DO_{600nm} = 0.5$. De esta suspensión se colocó 1 mL por microtubo para después centrifugar 10 min a 3000 rpm y lavar una vez con PBS. Se incubó la bacteria con 500 μ L de medio 7H9, Peróxido de hidrógeno (10 o 100 mM), Benzoquinona azul (2, 4, 8 o 16 μ g/mL) y glutatión (15 mM) en agitación a 35 °C durante 1 y 24 horas. Se retiró el sobrenadante y se hicieron dos lavados más con PBS para después incubar en agitación a 35 °C protegido de la luz con 1.5 mL de una solución de D2CFDA (10 μ M) en PBS durante 10 minutos. Finalmente se retiró el sobrenadante y se colocó 1 mL de D2CFDA (10 μ M). Se incubó en agitación y protegido de la luz a 35 °C durante 2 horas y se transfirieron 200 μ L por pozo a una placa oscura de 96 pozos por cuadruplicado. Se leyó la fluorescencia (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader) a las 12 y 48 horas a $\lambda_{ex} = 488$ nm y $\lambda_{em} = 525$ nm a 37 °C. Se determinó la cantidad de micobacterias de cada muestra haciendo diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) de la muestra y sembrando por duplicado 10 μ L de la muestra en placas petri con medio Middlebrook 7H10. Las placas se leyeron a los 12 y 19 días.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) DE LOS ANTIBIÓTICOS DE PRIMERA Y SEGUNDA LÍNEA EN Mtb

Siguiendo la metodología descrita por Caleffi-Ferracioli, et al (2013)⁷⁵ brevemente un cultivo de Mtb H37Rv Stanford o MDR se ajustó a 1 en la escala de McFarland o a una $DO_{600nm} = 0.212$ para luego hacer una dilución 1:20. En una placa de 96 pozos se colocaron 100 μ L de medio Middlebrook 7H9 (Laboratorios Difco) por pozo dejando una columna sin llenar (columna 3). Se colocaron 100 μ L de una solución con el doble de la concentración máxima a probar de la Benzoquinona azul (16 μ g/mL), Rifampicina (4 μ g/mL), Pirazinamida (128 μ g/mL), Isoniazida (0.25 μ g/mL), Etionamida (32 μ g/mL), Amikacina (16 μ g/mL), Moxifloxacino (0.125 μ g/mL) en la columna 3 y en otra con medio (columna 4), el contenido de la columna 4 fue mezclado apropiadamente para después transferir 100 μ L al siguiente pozo con 100 μ L de medio realizando cinco diluciones seriadas (factor de dilución 1:2). Finalmente, se agitó y se sonicó la suspensión de bacteria durante 45 segundos para colocar 100 μ L por pozo.

Los controles de crecimiento y no crecimiento bacteriano se establecieron colocando 100 μ L de la suspensión de bacteria en 100 μ L de medio 7H9 y 200 μ L de medio 7H9 respectivamente. La placa se dejó en agitación a 35 °C durante 7 días para H37Rv y 10 días para MDR y al término se agregaron 30 μ L de resazurina, sodium salt (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.02% (peso/vol). Se regresó la placa a agitación y a los dos días se observó. La MIC se determinó como la mínima concentración del fármaco en la cual no se observó cambio de color de azul a rosa.



- 200 μ L de agua inyectable estéril
 - **Control de medio:** 200 μ L de 7H9
 - **Control de MIC:** 198 μ L de 7H9 + 2 μ L de bacteria
 - **Control de disolvente:** 100 μ L de disolvente + 100 μ L de bacteria
 - **Control de bacteria:** 100 μ L de 7H9 + 100 μ L de bacteria
 - 100 μ L de B. Azul + 100 μ L de bacteria
 - 100 μ L de Antibiótico + 100 μ L de bacteria
 - 100 μ L de 7H9 + 100 μ L de B. Azul
 - 100 μ L de 7H9 + 100 μ L de Antibiótico
- ➔ Diluciones seriadas ➔ + 100 μ L de bacteria

Figura 15. Esquema usado para la determinación de la MIC de la benzoquinona azul y los antibióticos de primera y segunda línea: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Etionamida, Amikacina y Moxifloxacino usando Mtb H37Rv o MDR.

4.4 DETERMINACIÓN DE SINERGIA ENTRE LA BENZOQUINONA AZUL Y LOS ANTIBIÓTICOS DE PRIMERA Y SEGUNDA LÍNEA USANDO RESAZURINA MEDIANTE UN ENSAYO TIPO “TABLERO DE DAMAS CHINAS” (CHECKERBOARD)

Siguiendo la metodología descrita por Caleffi-Ferracioli, *et al* (2013)⁷⁵ brevemente un cultivo de Mtb H37Rv Stanford o MDR se ajustó a 1 en la escala de McFarland o a una $DO_{600nm} = 0.212$ para luego hacer una dilución 1:20. En una placa de 96 pozos se colocaron 50 μ L de medio Middlebrook 7H9 por pozo dejando una columna sin llenar (columna 3). Se colocaron por triplicado 50 μ L de una solución con el cuádruple de la concentración máxima a probar de la Benzoquinona azul (8 μ g/mL) en la columna vacía (columna 3) y en la columna 4 con 50 μ L de medio, el contenido de la columna 4 fue mezclado apropiadamente para después transferir 50 μ L al siguiente pozo realizando cinco diluciones seriadas (factor de dilución 1:2). Posteriormente a cada dilución se le agregaron 50 μ L de una solución con el cuádruple de la mitad de la MIC (0.5MIC) determinada previamente para Rifampicina (0.0625 μ g/mL), Pirazinamida (64 μ g/mL), Isoniazida (0.03125 μ g/mL), Etionamida (0.25 μ g/mL), Amikacina (0.25 μ g/mL), Moxifloxacino (0.03125 μ g/mL). Finalmente, se agitó y sonicó la suspensión antes preparada de bacteria durante 45 segundos para colocar 100 μ L por pozo. Los controles de crecimiento y no crecimiento bacteriano se establecieron colocando 100 μ L de la suspensión de bacteria en 100 μ L de medio 7H9 y 200 μ L de medio 7H9 respectivamente. Se agregó también un control de antibiótico solo a una concentración de 0.5MIC. La placa se dejó en agitación a 35 °C durante 7 y 10 días para H37Rv y MDR respectivamente, al término se agregaron 30 μ L de resazurina sal sódica (marca) a una concentración de 0.02% (peso/vol). Se regresó la placa a agitación y a los dos días se observó si hubo un cambio de color de azul a rosa.

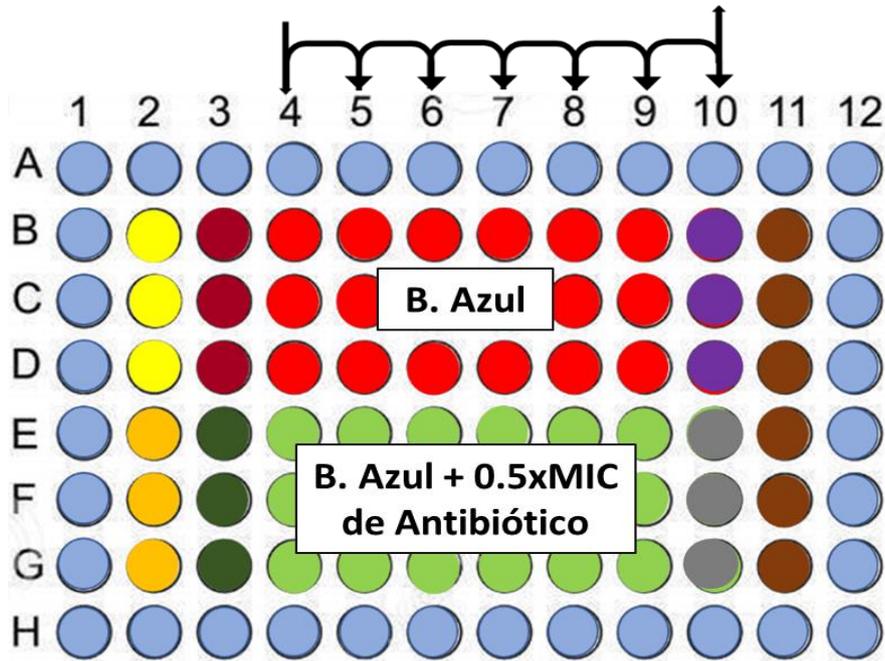
La determinación de sinergia se realizó haciendo uso de la siguiente fórmula⁷⁶:

$$FICI = \frac{A}{MIC A} + \frac{B}{MIC B}$$

donde A y B representa la MIC de los dos fármacos en combinación, mientras MIC A y MIC B se refiere a la MIC de los fármacos solos.

Los resultados de FICI obtenidos se interpretaron de la siguiente manera⁷⁶:

- ≤ 0.5 sinergia
- > 0.5 - 1 sinergia parcial
- 1 aditivo
- > 1 - 4 indiferente
- > 4 antagonismo



- 200 μL de agua inyectable estéril
- **Control de medio:** 200 μL de 7H9
- **Control de MIC:** 198 μL de 7H9 + 2 μL de bacteria
- **Control de disolvente:** 100 μL de disolvente + 100 μL de bacteria
- **Control de bacteria:** 100 μL de 7H9 + 100 μL de bacteria
- **Control de Antibiótico:** 50 μL de 7H9 + 50 μL de Antibiótico + 100 μL de bacteria
- 100 μL de B. Azul + 100 μL de bacteria
- 50 μL de Antibiótico + 50 μL de B. Azul + 100 μL de bacteria
- 100 μL de 7H9 + 100 μL de B. Azul → Diluciones seriadas → + 100 μL de bacteria
- 50 μL de 7H9 + 50 μL de B. Azul → Diluciones seriadas → + 50 μL de Antibiótico → + 100 μL de bacteria

Figura 16. Esquema usado en el ensayo de tablero de damas chinas para la determinación de la MIC de la benzoquinona azul en conjunto de los antibióticos de primera y segunda línea: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida, Etionamida, Amikacina y Moxifloxacino usando Mtb H37Rv o MDR.

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se hizo con el software Graphpad Prism versión 6.01. Para la determinación de carga bacilar y el porcentaje de neumonía se hizo a través del análisis de varianza ANOVA de 2 vías y el test pos hoc de Bonferroni para las comparaciones múltiples entre grupos. La prueba de Kaplan-Meyer y la prueba de rango logarítmico (Log Rank Test) se utilizó para analizar las curvas de supervivencia. Las diferencias se consideran significativas cuando $p < 0.05$.

Capítulo 5

Resultados

5.1 LA ADMINISTRACIÓN INTRATRAQUEAL DE LA BENZOQUINONA AZUL A UNA DOSIS DE 8 μg /RATÓN EN RATONES BALB/C SIN INFECTAR NO GENERA DAÑO EN EL EPITELIO PULMONAR

Seis ratones sanos macho BALB/c de ocho semanas fueron administrados con 50 μL del compuesto azul a una concentración de 8 μg /ratón o 50 μL de vehículo (Etanol al 20% en agua inyectable) tres veces a la semana durante dos meses por vía intratraqueal. Los ratones de cada grupo sobrevivieron a todo el tratamiento sin presentar cambios visibles en peso o comportamiento (Figura 17). Al mes y dos meses de tratamiento se sacrificaron tres ratones por tiempo para analizar si la administración del compuesto generaba daño en el tejido pulmonar puesto que era por donde entraba al organismo.

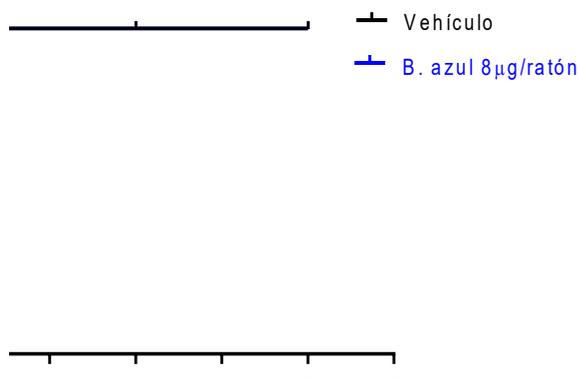


Figura 17. Sobrevivencia de ratones BALB/c sin infectar tratados con Benzoquinona azul [8 μg /ratón] o con vehículo [Etanol al 10% en agua inyectable] por vía intratraqueal, tres veces a la semana durante dos meses. Los resultados son representativos de un experimento con tres ratones por grupo. No se observó diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Kaplan-Meyer, $p < 0.05$)

Al analizar la histología de los pulmones se pudo evidenciar que a los dos meses los tres ratones tratados con la benzoquinona presentaban infiltrados inflamatorios leves y ocasionales alrededor de las vénulas (Figura 18B y C) con respecto a los ratones tratados con vehículo (Fig. 17A). La tinción de tricrómico de Masson, que se sabe tiñe de azul fibras de colágeno tipo I, se realizó para descartar la presencia de un daño severo que implique la reparación de tejido conectivo o fibrosis. En los grupos tratados con la benzoquinona al igual que con el vehículo no se encontró la sustitución de tejido pulmonar por colágeno tipo I (Figura 18D).

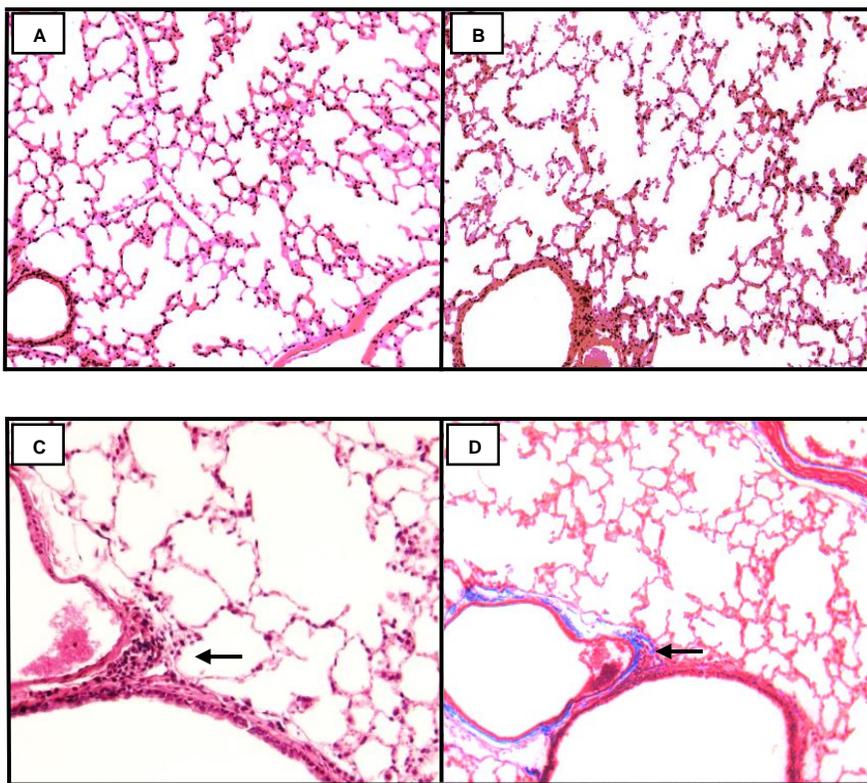


Figura 18. Histología de pulmones de ratones sin infectar al administrarles por vía intratraqueal la Benzoquinona azul durante dos meses, tres veces por semana. Epitelio pulmonar de ratones sanos al finalizar el tratamiento con (A) vehículo o (B) Benzoquinona azul. Epitelio pulmonar de ratones tratados con la Benzoquinona azul, flecha indica: (C) la presencia ocasional de infiltrados inflamatorios leves alrededor de los vasos sanguíneos y (D) la presencia de colágeno tipo I en cantidades normales solamente en la capa adventicia de los vasos sanguíneos o vías aéreas. Tinción de Hematoxilina-Eosina (H y E), imágenes representativas del tejido pulmonar de 3 ratones tomadas a 40x (a y b), y a 100x. (c). Tinción de Tricrómico de Masson, imágenes representativas del tejido pulmonar de 3 ratones tomadas a 100x (d).

5.2 LA ADMINISTRACIÓN DE LA BENZOQUINONA AZUL A UNA DOSIS DE 0.47 Y 4.7 $\mu\text{g}/\text{RATÓN}$ EN EL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA (CEPA H37Rv) NO GENERA UNA DISMINUCIÓN EN LA CARGA BACILAR PULMONAR

Seis ratones macho BALB/c de ocho semanas por grupo fueron infectados con 250,000 UFCs de la cepa de *Mtb* H37Rv Stanford y dos meses post-infección se inició el tratamiento por vía intratraqueal con la benzoquinona azul o con el vehículo (Etanol al 10%) durante dos meses, tres veces a la semana. Las dosis que se establecieron fueron de 0.47 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (dosis baja) y 4.7 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (dosis alta) en 50 μL de agua inyectable. El tratamiento con la dosis alta (4.7 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) aumentó el porcentaje de sobrevida en un 10 % con respecto al control mientras que con la dosis baja hubo una disminución en un 25% (Figura 19A). En cuanto al efecto terapéutico, la benzoquinona generó a dosis baja una pequeña reducción de la carga bacilar pulmonar solo en el primer mes en comparación con el grupo de vehículo. El aumentar la dosis provocó una reducción de la carga bacilar, pero hasta el segundo mes de tratamiento (Figura 19B).

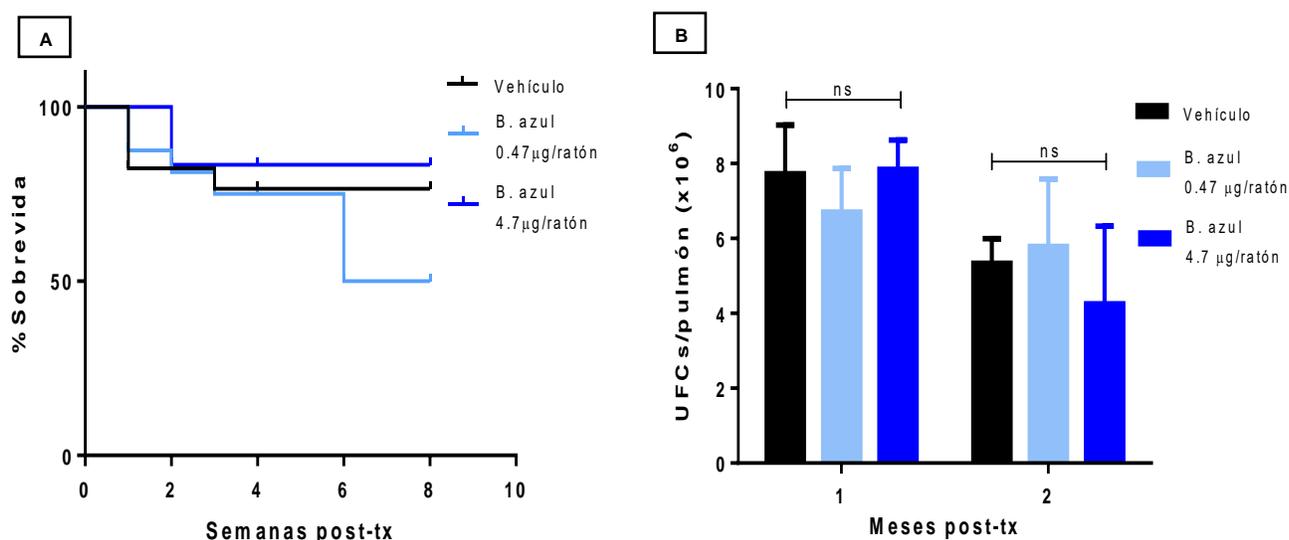


Figura 19. Efecto terapéutico de la Benzoquinona azul en ratones BALB/c infectados con *Mtb* H37Rv al administrarse por vía intratraqueal durante dos meses, tres veces por semana. (A) Sobrevida de los ratones a lo largo del tratamiento con la Benzoquinona azul a las dosis de 0.47 y 4.7 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. No se observó diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Kaplan-Meier, $p > 0.05$). (B) Carga bacilar pulmonar (UFCs/pulmón) de los ratones tratados durante uno y dos meses. La disminución de la carga bacilar pulmonar no fue significativa en ningún caso. (ANOVA de 2 vías, prueba post hoc: Bonferroni, $p > 0.05$). Los resultados son representativos de un experimento con tres ratones por grupo. Los datos se expresan como el promedio de tres valores con su desviación estándar.

5.3 LA ADMINISTRACIÓN DE LA BENZOQUINONA AZUL A UNA DOSIS DE 8 μg /RATÓN EN EL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA (CEPA MDR) GENERA UNA DISMINUCIÓN EN LA CARGA BACILAR PULMONAR Y EN EL PORCENTAJE DE NEUMONÍA

Seis ratones macho BALB/c de 8 semanas por grupo fueron infectados con 250,000 UFCs de la cepa de *Mtb* MDR y tratados bajo el mismo esquema usando la dosis de 8 μg /ratón en 50 μL de agua inyectable o con vehículo (Etanol al 10%). El tratamiento con la benzoquinona azul generó una disminución de la carga bacilar pulmonar desde el primer mes de tratamiento sin embargo esta no fue significativa debido a la variación del grupo control tratado con vehículo. De igual manera la sobrevida de los ratones fue mayor en un 15% con respecto al grupo control en el primer mes (Figura 20A). A los dos meses el efecto terapéutico se observó solo en la reducción de la carga bacilar pulmonar en más del 90% (Figura 20B) sin embargo esto no se ve reflejado en la sobrevida, la cual a pesar de mantenerse en 85% la mayoría del ensayo, una semana antes de acabar el tratamiento disminuyó en un 10% con respecto al grupo tratado con vehículo.

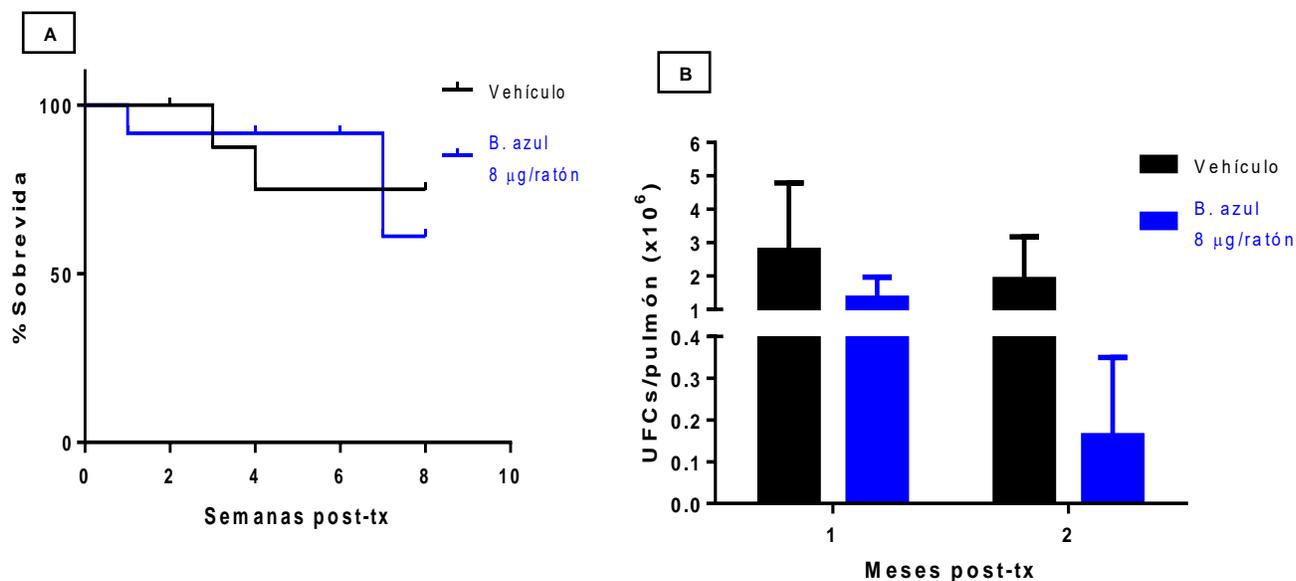


Figura 20. Efecto terapéutico de la Benzoquinona azul sobre ratones BALB/c infectados con *Mtb* MDR al administrarse por vía intratraqueal durante dos meses, tres veces por semana. (A) Sobrevida de los ratones a lo largo del tratamiento con la Benzoquinona azul a una dosis de 8 μg /ratón. No se observó diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Kaplan-Meyer, $p > 0.05$). (B) Carga bacilar pulmonar (UFCs/pulmón) de los ratones tratados durante uno y dos meses. Los resultados son representativos de un experimento con dos ratones por grupo. Los datos se expresan como el promedio de dos valores con su desviación estándar.

A los dos meses de tratamiento los pulmones de dos ratones por grupo fueron procesados para llevar a cabo el análisis histológico y determinar el porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía (LSAP). Este parámetro es evaluado ya que es un indicador de la presencia y replicación de la micobacteria en el pulmón. Los ratones tratados dos meses con la benzoquinona azul presentaron una reducción en casi un 50% de la neumonía causada por la micobacteria durante el desarrollo de la enfermedad demostrando un efecto terapéutico (Figura 21A y B).

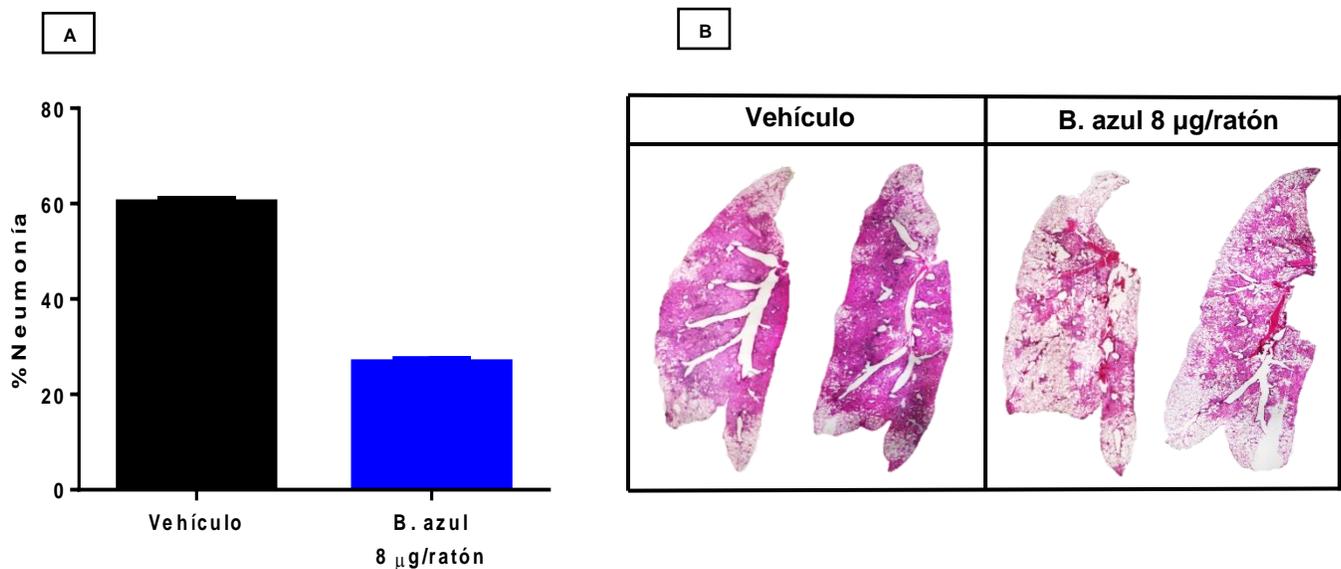


Figura 21. Histología representativa de pulmones de ratones infectados con Mtb MDR y tratados con Benzoquinona azul por vía intratraqueal durante dos meses, tres veces por semana. (A) Porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía (LSAP) en los ratones de cada grupo (B) Micrografía representativa de dos pulmones del grupo tratado con vehículo y con Benzoquinona azul mostrando una menor cantidad de áreas con neumonía en el segundo. Los resultados son representativos de un experimento con dos ratones por grupo. Los datos se expresan como el promedio de dos valores con su desviación estándar. Tinción de Hematoxilina-Eosina (H y E), imágenes representativas del tejido pulmonar tomadas a 2.5x (b).

5.4 LA COMBINACIÓN *IN VITRO* DE LA BENZOQUINONA AZUL Y EL ANTIBIÓTICO DE PRIMERA LÍNEA ISONIAZIDA AUMENTA EL EFECTO ANTIMICOBACTERIANO DE AMBOS FÁRMACOS CONTRA LA CEPA H37Rv

En un ensayo previamente realizado (Anexo, Figura 30) se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los antibióticos de primera línea para la cepa de H37Rv Stanford [Isoniazida 0.0625 µg/mL, Rifampicina: 0.125 µg/mL y Pirazinamida: 128 µg/mL] y con estos datos se llevó a cabo un ensayo de tipo tablero de damas chinas o checkerboard (Figura 22). El objetivo fue combinar concentraciones diferentes de compuesto azul (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) con una concentración fija de antibiótico correspondiente a la mitad de su MIC (0.5INH: 0.03125 µg/mL, 0.5RIF: 0.0625 µg/mL y 0.5PZA: 64 µg/mL) para evaluar si se presentaba un efecto sinérgico. La benzoquinona azul inhibió el crecimiento de la micobacteria (MIC) por si sola a partir de una concentración de 2 µg/mL (Figura 22A) mientras que los antibióticos a la concentración establecida (0.5RIF, 0.5PZA, 0.5INH, MIX) no lo hicieron. Al agregar la rifampicina (Figura 22A) o la pirazinamida (Figura 22B) a una concentración subinhibitoria como lo es 0.5MIC, no se pudo observar algún cambio en la actividad antimicrobiana de la benzoquinona azul. Sin embargo, al agregar la isoniazida (Figura 22B) se disminuyó la MIC de la benzoquinona azul a la mitad (1 µg/mL), es decir hubo un aumento en su capacidad microbicida. Al probar el MIX de todos los antibióticos no se generó el aumento del efecto microbicida de la benzoquinona azul.

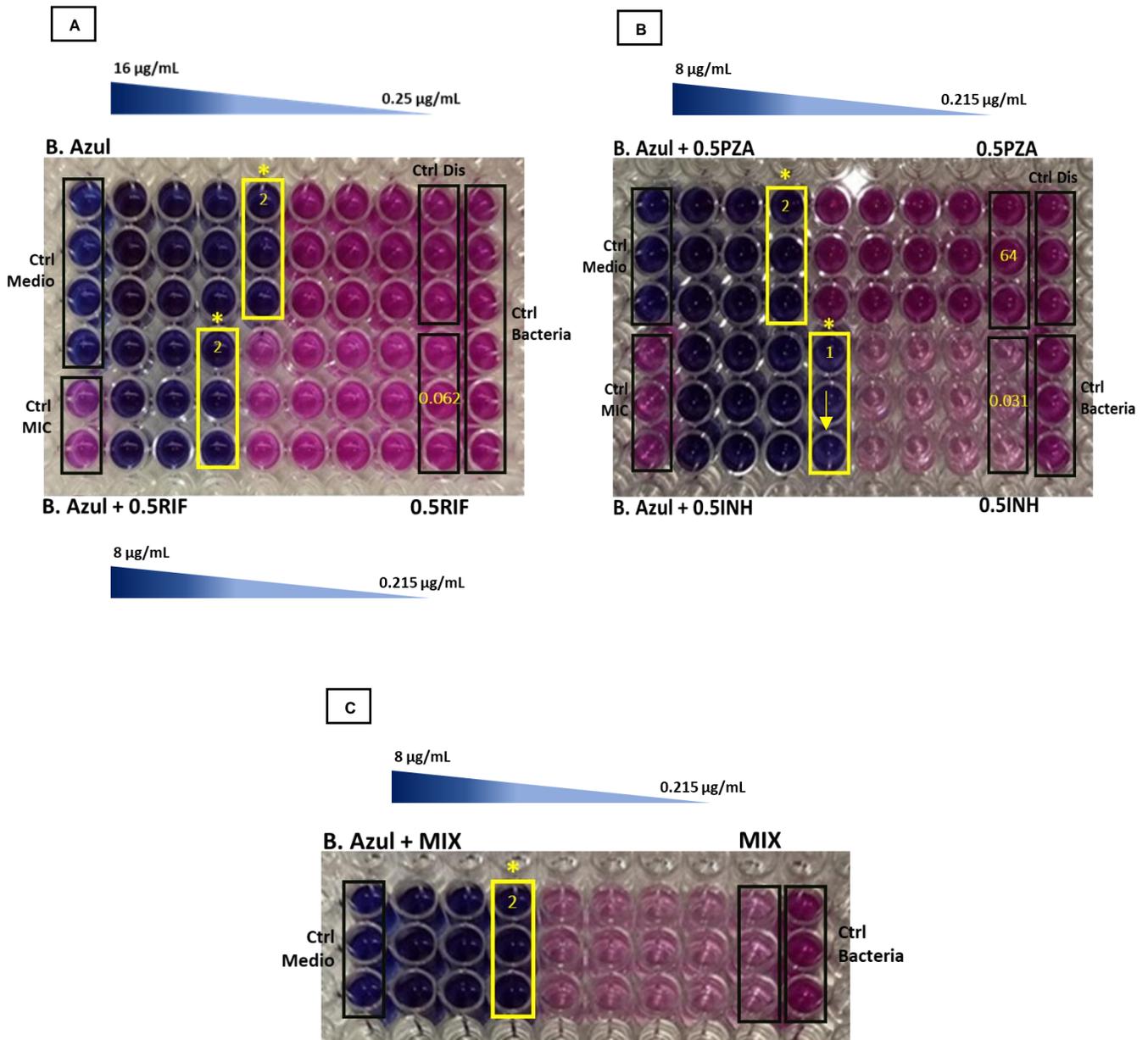


Figura 22. Efecto antimicrobiano sobre Mtb H37Rv al combinar la Benzoquinona azul y antibióticos de primera línea. (A) arriba: Benzoquinona azul (16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 µg/mL), abajo: Benzoquinona azul (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) + 0.5RIF (0.0625 µg/mL) (B) arriba: Benzoquinona azul (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) + 0.5PIR (64 µg/mL), abajo: Benzoquinona azul (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) + 0.5INH (0.03125 µg/mL) (C) : Benzoquinona azul (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) + 0.5INH, 0.5RIF y 0.5PZA. El rectángulo señala la MIC de cada compuesto, la flecha indica donde hubo una disminución en la MIC. Control de MIC: suspensión al 1% de bacteria, Control de bacteria: suspensión al 100% de bacteria, Control de disolvente: EtOH al 20%, Control 0.5xMIC de cada antibiótico. El color rosa indica crecimiento bacteriano. Los resultados son representativos de dos experimentos.

El Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) es un parámetro cuantitativo utilizado para determinar si existe como tal sinergia o no entre dos compuestos. Se determina haciendo una relación entre la MIC de ambos antibióticos probados en combinación y la MIC de los antibióticos estando solos (Figura 23). El índice que se obtiene se puede clasificar en uno de los 5 grupos: ≤ 0.5 sinergismo, $>0.5-1$ sinergismo parcial, $=1$ aditividad, >1 y <4 indiferencia y ≥ 4 antagonismo. Para el caso de Rifampicina y Pirazinamida la combinación con la benzoquinona azul fue indiferente (>1 y <4) mientras que con la isoniazida se presenta un efecto aditivo ($=1$).

Fractional Inhibitory Concentration Index:

$$FICI = \frac{MIC\ C.\ azul_{combinación}}{MIC\ C.\ azul_{solo}} + \frac{MIC\ Antibiotico_{combinación}}{MIC\ Antibiotico_{solo}}$$

$$FICI_{Rifampicina} = \frac{2\ \mu g/mL}{2\ \mu g/mL} + \frac{0.125\ \mu g/mL}{0.0625\ \mu g/mL} = 1.5$$

$$FICI_{Pirazinamida} = \frac{2\ \mu g/mL}{2\ \mu g/mL} + \frac{64\ \mu g/mL}{128\ \mu g/mL} = 1.5$$

$$FICI_{Isoniazida} = \frac{1\ \mu g/mL}{2\ \mu g/mL} + \frac{0.03125\ \mu g/mL}{0.0625\ \mu g/mL} = 1$$

Figura 23. Fórmula para determinar el FICI de la combinación de la Benzoquinona azul con los antibióticos de primera línea. Los valores sustituidos fueron los obtenidos en los ensayos previos del tablero de damas chinas. Para Rifampicina y Pirazinamida se obtuvo un valor de 1.5 considerado como indiferente mientras que para Isoniazida se obtuvo un valor de 1 considerado como aditivo.

5.5 LA COMBINACION *IN VITRO* DE LA BENZOQUINONA AZUL Y EL ANTIBIÓTICO DE SEGUNDA LÍNEA MOXIFLOXACINO AUMENTA EL EFECTO ANTIMICOBACTERIANO DE AMBOS FÁRMACOS CONTRA LA CEPA MDR

De igual manera después de determinar la MIC de los antibióticos de segunda línea usando un aislado clínico de *M. tuberculosis* MDR (Anexo, Figura 31) se realizó otro ensayo de damas chinas (Figura 24) donde se combinaron concentraciones diferentes de compuesto azul (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) con una concentración fija de antibiótico correspondiente a la mitad de su MIC (0.5ETI: 0.25 µg/mL, 0.5AMK: 0.25 µg/mL, 0.5MOX: 0.031 µg/mL). La benzoquinona azul por si sola inhibió el crecimiento de esta cepa (MIC) a partir de una concentración de 4 µg/mL (Figura 24A) mientras que los antibióticos no lo hicieron (0.5ETI, 0.5AMK, 0.5MOX, MIX). Al agregar la amikacina (Figura 24A) o la etionamida (Figura 24B) a una concentración subinhibitoria como lo es 0.5MIC, no se pudo observar algún cambio en la actividad antimicrobiana de la benzoquinona azul. Únicamente el moxifloxacino (Figura 24C) disminuyó la MIC de la benzoquinona azul a la mitad (2 µg/mL) generando el aumento en su capacidad microbicida. El MIX de todos los antibióticos no generó este aumento en el efecto microbicida de la benzoquinona azul (Figura 24B).

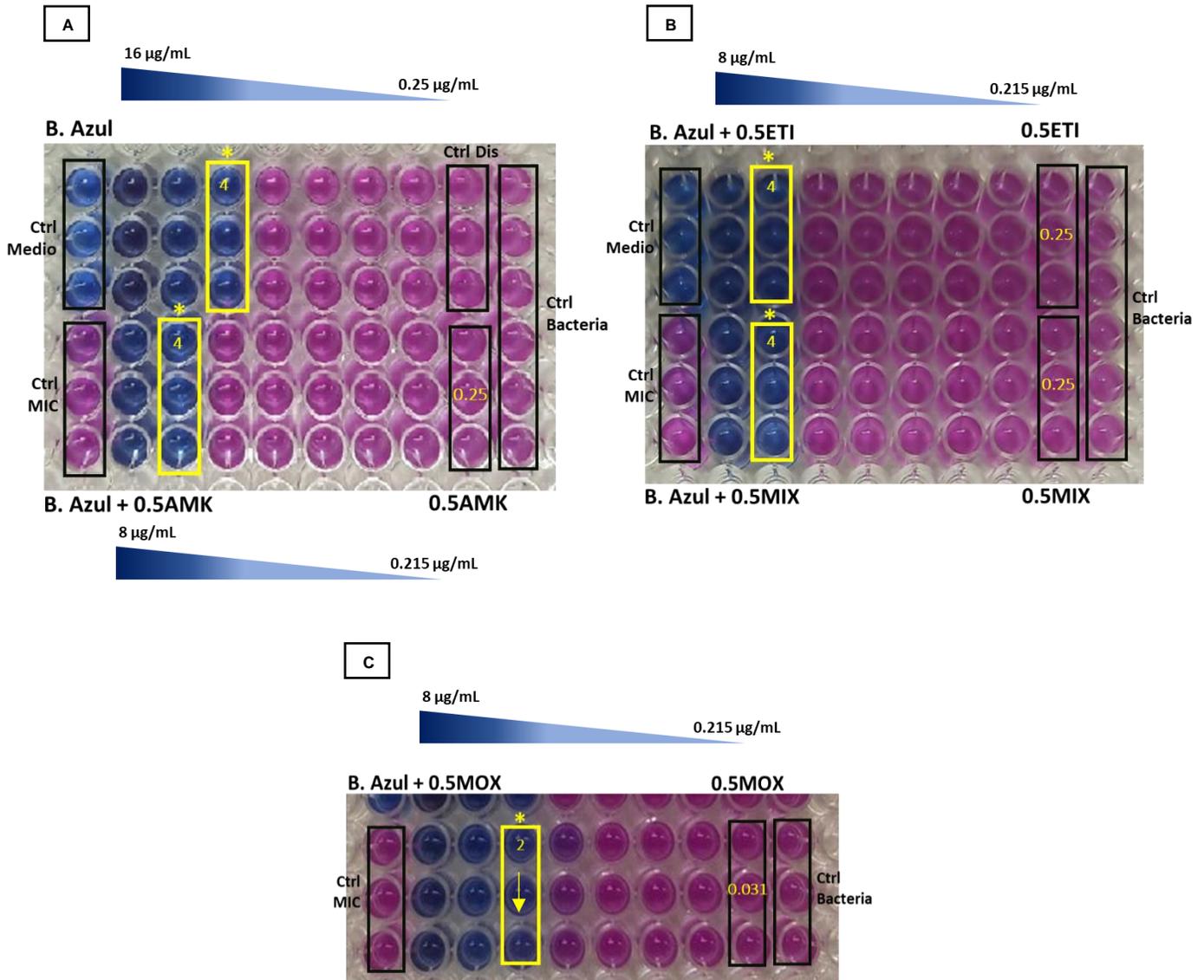


Figura 24. Efecto antimicrobiano sobre Mtb MDR al combinar la Benzoquinona azul y antibióticos de segunda línea. (A) arriba: Benzoquinona azul (16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 µg/mL), abajo: Benzoquinona azul (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) + 0.5AMK (0.25 µg/mL) (B) arriba: Benzoquinona azul (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) + 0.5ETI (0.25 µg/mL), abajo: Benzoquinona azul (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) + 0.5AMK, 0.5ETI y 0.5MOX (C) Benzoquinona azul (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/mL) + 0.5INH (0.0625 µg/mL). El rectángulo señala la MIC de cada compuesto, flecha indica una disminución en la MIC. Control de MIC: suspensión al 1% de bacteria, Control de bacteria: suspensión al 100% de bacteria, Control de disolvente: EtOH al 20%, Control 0.5xMIC de cada antibiótico. El color rosa indica crecimiento bacteriano. Los resultados son representativos de 2 experimentos.

Al determinar el FICI de las combinaciones (Figura 25) se obtuvo que para el caso de Rifampicina y Pirazinamida con la benzoquinona azul el efecto fue indiferente (>1 y <4) mientras que con el moxifloxacino existe un efecto aditivo ($=1$).

$$FICI_{Amikacina} = \frac{4 \mu g/mL}{4 \mu g/mL} + \frac{0.25 \mu g/mL}{0.5 \mu g/mL} = 1.5$$

$$FICI_{Etionamida} = \frac{4 \mu g/mL}{4 \mu g/mL} + \frac{0.25 \mu g/mL}{0.5 \mu g/mL} = 1.5$$

$$FICI_{Moxifloxacino} = \frac{2 \mu g/mL}{4 \mu g/mL} + \frac{0.03125 \mu g/mL}{0.0625 \mu g/mL} = 1$$

Figura 25. Fórmula para determinar el FICI de la combinación de la Benzoquinona azul con los antibióticos de segunda línea. Los valores sustituidos fueron los obtenidos en los ensayos previos del tablero de damas chinas. Para Amikacina y Etionamida se obtuvo un valor de 1.5 considerado como indiferente mientras que para Moxifloxacino se obtuvo un valor de 1 considerado como aditivo.

5.6 LA ADMINISTRACIÓN DE LA BENZOQUINONA AZUL EN CONJUNTO CON EL TRATAMIENTO DE PRIMERA LÍNEA EN EL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA (CEPA H37Rv) NO GENERA UNA DISMINUCIÓN EN LA CARGA BACILAR PULMONAR MAYOR QUE LA GENERADA POR LOS ANTIBIÓTICOS SOLOS

Seis ratones machos BALB/c de 8 semanas por grupo fueron infectados con 250,000 UFCs de la cepa de *Mtb* H37Rv y tratados durante 2 meses con: 1) la benzoquinona azul a una dosis de 8 µg/ratón en 50 µL de agua inyectable, 2) un coctel de 4 antibióticos de primera línea (Rifampicina e Isoniazida 0.2 mg/ratón, Pirazinamida 0.6 mg/ratón), 3) la benzoquinona azul en conjunto con los antibióticos de primera línea o 4) vehículo (Etanol al 10%). La benzoquinona azul se siguió administrando tres veces a la semana al igual que el vehículo mientras que el coctel se administró todos los días. La combinación de la benzoquinona azul con los antibióticos generó una disminución en la carga bacilar pulmonar a los 7 días de tratamiento mayor a la generada con el tratamiento solo con antibióticos, sin embargo, a los 14 días el efecto de los antibióticos fue mayor (Figura 26A). Al mes y dos meses de tratamiento el efecto fue mayor con la combinación (Figura 26B). A su vez se observó que el compuesto azul por si solo si genera una disminución en la carga bacilar pulmonar a partir del primer mes siendo más evidente al final del tratamiento.

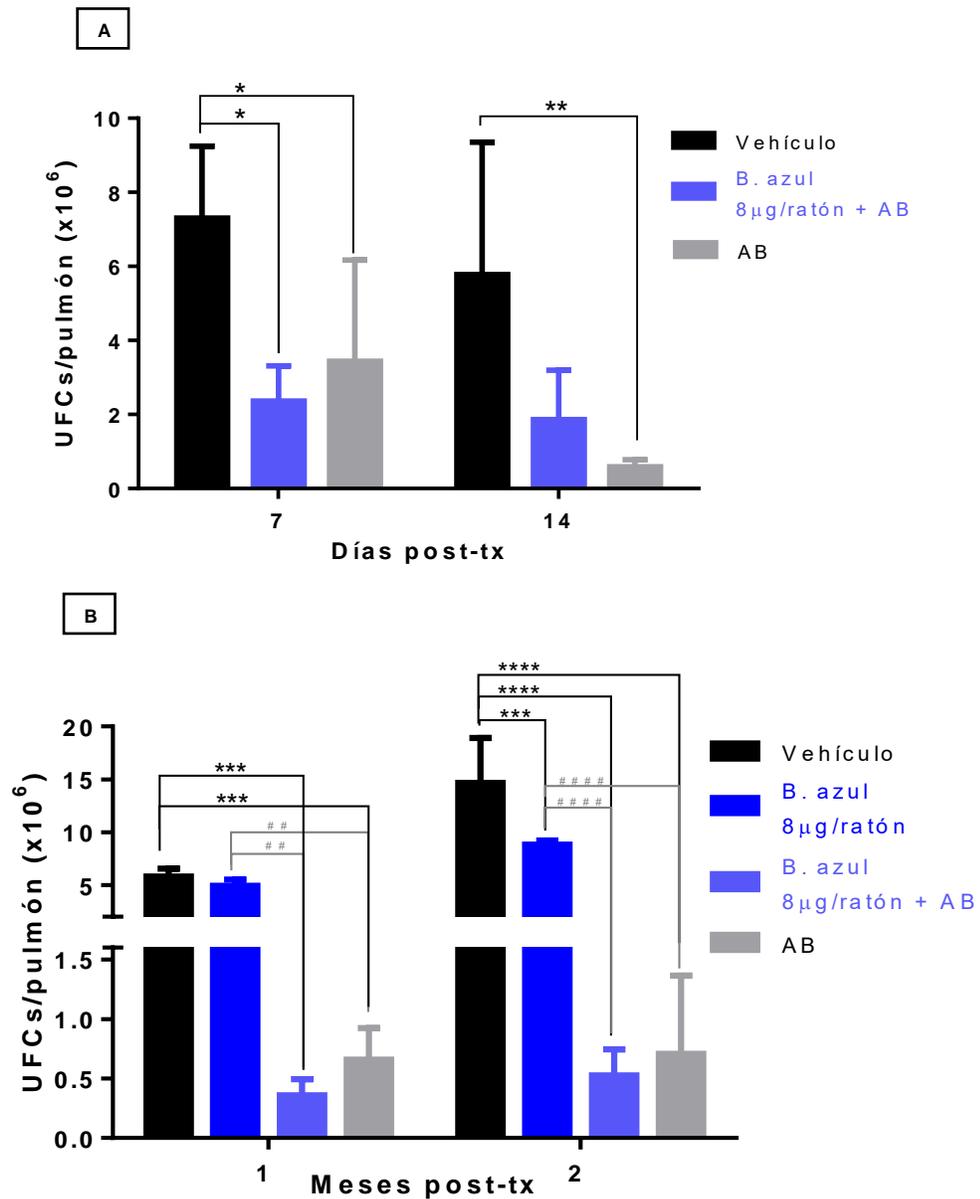


Figura 26. Efecto terapéutico de la benzoquinona azul en conjunto con los antibióticos de primera línea sobre la carga bacilar pulmonar de ratones BALB/c infectados con Mtb H37Rv al administrarse por vía intratraqueal durante 2 meses. Carga bacilar pulmonar (UFCs/pulmón) de ratones tratados con Vehículo (Etanol al 10%), Antibióticos de primera línea (Isoniazida y Rifampicina: 0.2 mg/ratón, Pirazinamida: 0.6 mg/ratón), Benzoquinona azul (8 µg/ratón) y Benzoquinona azul + Antibióticos de primera línea durante (A) 7 y 14 días, (B) 1 y 2 meses. Los resultados son representativos de un experimento con tres ratones por grupo. Los datos se expresan como el promedio de tres valores con su desviación estándar. Los asteriscos * representan significancia estadística, $p < 0.05$. (ANOVA de 2 vías, prueba post hoc: Bonferroni).

Después de un mes de administración se observó que los grupos administrados con la combinación de benzoquinona+antibióticos y solo antibióticos desarrollaron menos neumonía que los animales que recibieron solo el vehículo o la benzoquinona (Figura 27). En los pulmones de ratones sacrificados al segundo mes de tratamiento se pudo observar incluso un menor desarrollo de neumonía en el grupo de benzoquinona (25 %) con respecto al grupo tratado con vehículo (30 %). El grupo de benzoquinona azul junto con antibióticos tuvo un comportamiento similar al del grupo que solo recibió los antibióticos de primera línea.

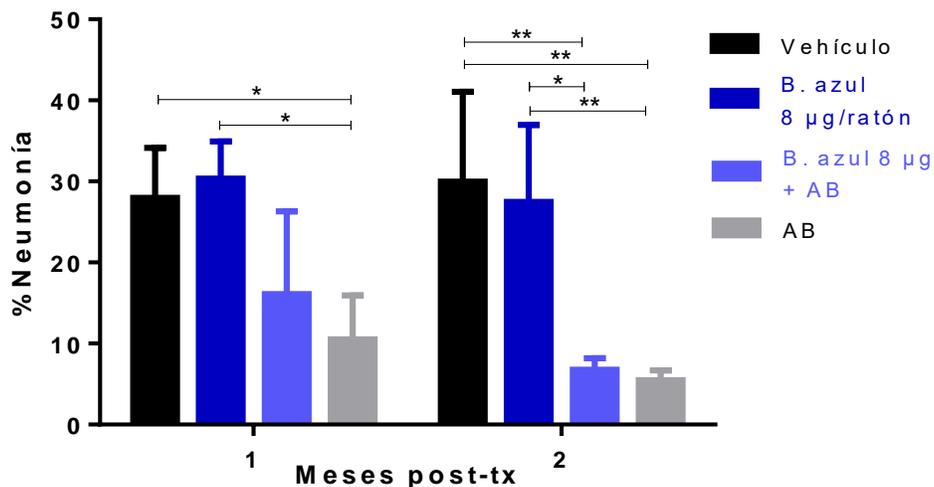


Figura 27. Histología representativa de pulmones de ratones infectados con Mtb H37Rv y tratados con la Benzoquinona azul en conjunto con antibióticos de primera línea. Porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía (LSAP) en los ratones de cada grupo al mes y dos meses de tratamiento. Los resultados son representativos de un experimento con tres ratones por grupo. Los datos se expresan como el promedio de tres valores con su desviación estándar. Los asteriscos * representan significancia estadística, $p < 0.05$. (ANOVA de 2 vías, prueba post hoc: Bonferroni)

5.7. LA BENZOQUINONA AZUL GENERA UN AUMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ROS, LO CUAL PROPICIA UNA DISMINUCIÓN EN LA VIABILIDAD DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37Rv Y MDR

Se puso en contacto un cultivo de Mtb de la cepa H37Rv Stanford o MDR durante una hora con dos concentraciones diferentes de la benzoquinona azul (2 y 8; 4 y 16 $\mu\text{g/mL}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 : 10 y 100 mM), medio 7H9 y benzoquinona azul + glutatión (15 mM). La incubación de Mtb H37Rv con la benzoquinona azul produjo un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en la dosis de 2 $\mu\text{g/mL}$ (correspondiente a la MIC) y de 8 $\mu\text{g/mL}$ siguiendo un efecto de tipo dosis-dependiente. El mismo efecto sucede en la cepa MDR con las dosis de 4 $\mu\text{g/mL}$ (correspondiente a la MIC) y 16 $\mu\text{g/mL}$. Además, al adicionar un antioxidante como el glutatión al cultivo junto con la concentración más alta de compuesto azul se observó una reducción en la cantidad de especies reactivas presentes para ambas cepas (Figura 28). El peróxido de hidrogeno solamente generó un aumento significativo de ROS en la concentración de 100 mM en la cepa MDR.

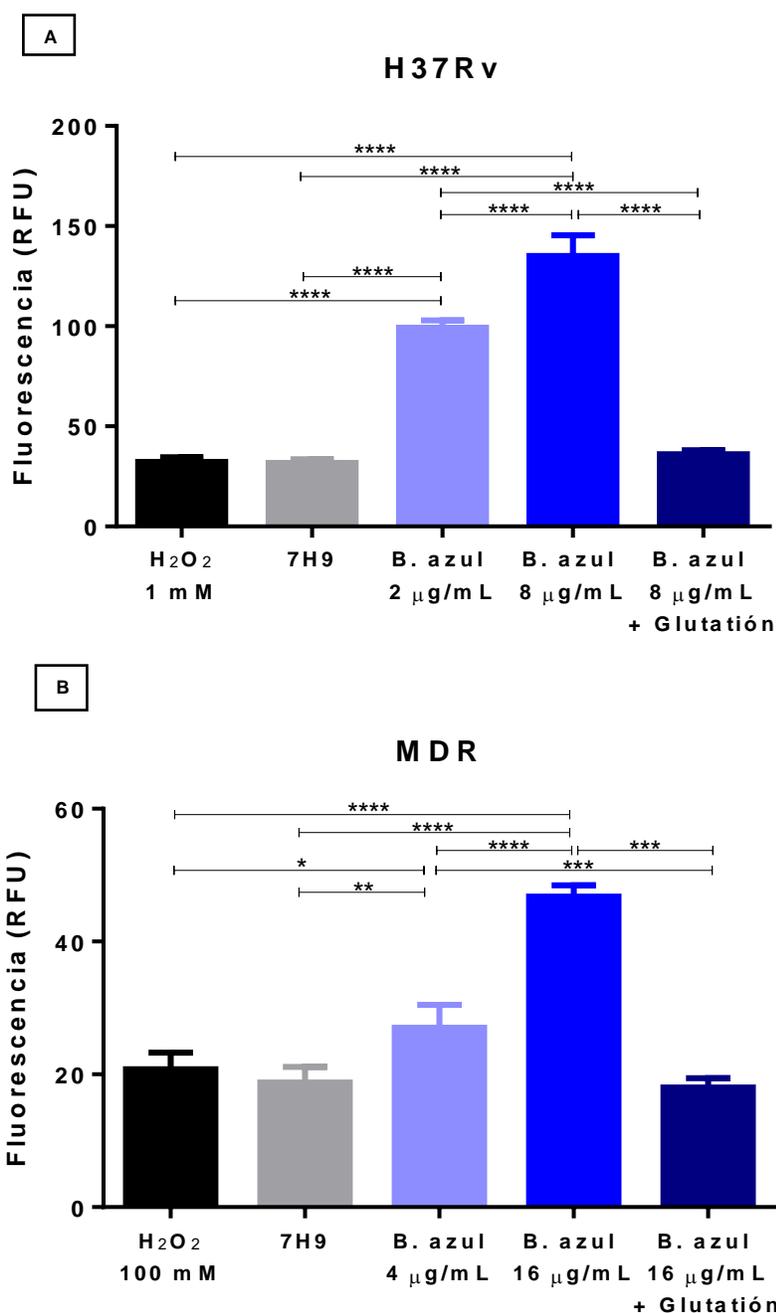


Figura 28. Producción de especies reactivas de oxígeno en un cultivo de Mtb H37Rv (A) y MDR (B) puesto en contacto con la Benzoquinona azul durante una hora. Se probaron las concentraciones de Benzoquinona de 2 y 4 µg/mL para H37Rv y 4 y 8 µg/mL para MDR. H₂O₂ (1 mM para H37Rv y 100 mM para MDR), Antioxidante: Glutathión (15 mM) y Control negativo: medio 7H9. Se midió la fluorescencia a una λ_{ex} = 488 nm y λ_{em} = 525 nm. Los resultados son representativos de dos experimentos. Los datos se expresan como el promedio de cuatro valores con su desviación estándar. Los asteriscos * representan significancia estadística, $p < 0.05$ (ANOVA de 1 vía, prueba post hoc: Tukey)

Un cultivo de Mtb de la cepa H37Rv Stanford o MDR se puso en contacto 12 horas con dos concentraciones diferentes de la benzoquinona azul (2 y 8; 4 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2 : 10 y 100 mM), medio 7H9 y benzoquinona azul + glutatión (15 mM). Después de este tiempo, se determinó si la benzoquinona azul seguía teniendo un efecto en la producción de ROS y si además esto podía afectar directamente la viabilidad de la micobacteria (Figura 29).

Los resultados correspondientes a la medición de ROS fueron muy similares a los obtenidos en la incubación de 1 hora, en donde, la benzoquinona azul generó un aumento en ROS de tipo dosis-dependiente el cual fue abolido con la adición de un antioxidante para ambas cepas.

En cuanto a la determinación de UFCs, para la cepa H37Rv la benzoquinona azul generó una disminución en la cantidad de bacteria siendo mayor en la concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La adición del glutatión generó un aumento en la viabilidad de la micobacteria en comparación al cultivo que solo estuvo en contacto con la benzoquinona azul.

Para la cepa MDR, la benzoquinona azul generó la disminución de la viabilidad a ambas concentraciones siendo más significativa en la de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al agregar el glutatión también hubo un aumento en la viabilidad con respecto al cultivo con solo la benzoquinona azul, teniendo significancia estadística para esta cepa. El peróxido de hidrógeno también presentó un efecto similar sobre la disminución de la viabilidad de la micobacteria.

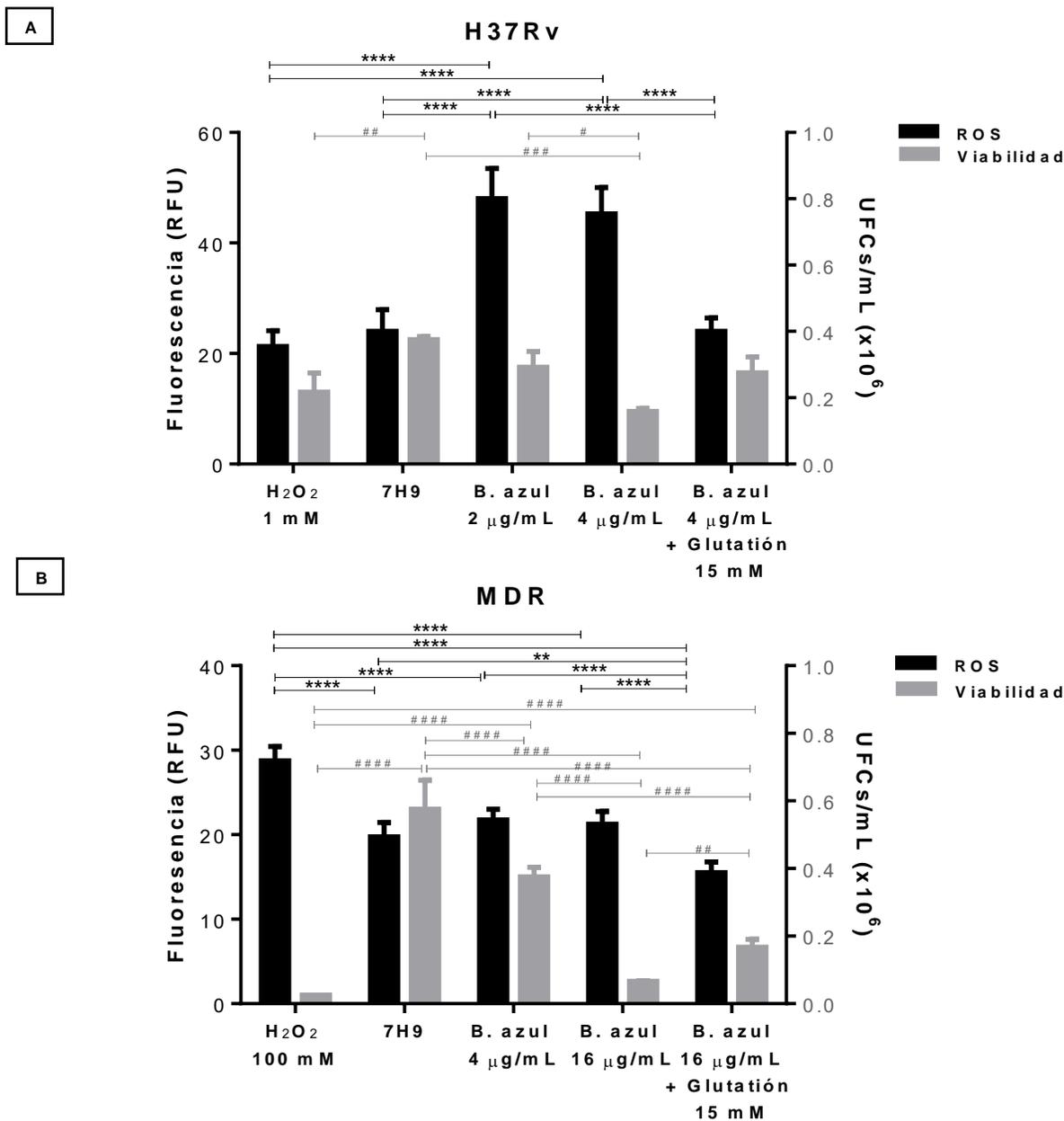


Figura 29. Relación entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFCs/mL) en un cultivo de Mtb puesto en contacto durante 12 horas con diferentes concentraciones de Benzoquinona azul. Con la cepa H37Rv (A) se probaron las concentraciones de 2 y 4 µg/mL y con MDR (B) 4 y 8 µg/mL. H₂O₂ (1 mM para H37Rv y 100 mM para MDR), Antioxidante: Glutación (15 mM) y Control negativo: medio 7H9. Se midió la fluorescencia a una λ_{ex}= 488 nm y λ_{em}= 525 nm. Los resultados son representativos de dos experimentos. Los datos se expresan como el promedio de cuatro valores con su desviación estándar. Los asteriscos *, # representan significancia estadística, p<0.05 (ANOVA de 2 vías, prueba post hoc: Tukey).

Capítulo 6

Discusión

La tuberculosis es una enfermedad que mata a aproximadamente 10 millones de personas al año siendo además la primera causa de muerte a nivel mundial por un solo agente infeccioso¹. En los últimos 40 años, solo tres antibióticos han salido al mercado como una nueva opción para el tratamiento de esta enfermedad⁴¹, de ahí la importancia de seguir incentivando el desarrollo de fármacos. Sin duda los productos naturales son la mejor fuente de moléculas terapéuticas ya que la diversidad que existe en los metabolitos secundarios producidos por organismos vivos no se compara con alguna otra³⁸. Hoy en día se tiene presente que para encontrar nuevos antibióticos contra Mtb se debe tener un enfoque multidisciplinario donde se usen técnicas diversas que van desde la purificación de compuestos de fuentes naturales hasta la realización de ensayos para determinar actividad biológica *in vitro* e *in vivo*³⁹.

Como fuentes naturales se consideran los extractos de plantas, metabolitos de microorganismos y recientemente se han estado estudiado los venenos de animales ponzoñosos. Desde hace miles de años, los alacranes han sido usados por culturas orientales y africanas para el tratamiento de diversas enfermedades⁴⁷. Con ayuda de las nuevas tecnologías para el estudio y la caracterización de los venenos se han encontrado moléculas con actividad biológica principalmente péptidos que funcionan como bloqueadores de canales de Na⁺ y K⁺ o con propiedades antimicrobianas⁷⁶.

En este proyecto se trabajó con una molécula recientemente caracterizada y proveniente del veneno del alacrán *Diplocentrus melici*: 5-metoxi-2,3-bis(metiltio)ciclohexa-2,5-dien-1,4-diona (benzoquinona azul). Su estructura base es la benzoquinona, una molécula pequeña que se encuentra incorporada en el esqueleto de diversos antibióticos y anticancerígenos. Su mecanismo de acción no está dilucidado por completo, pero se ha relacionado con la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y promoción de la apoptosis en líneas celulares cancerígenas⁶². Para el caso específico de la molécula en estudio, su efecto solo se ha estudiado en algunas líneas celulares encontrando que causa un incremento en los ROS y también apoptosis⁵.

Los ensayos *in vitro* realizados previamente con Mtb demostraron que la benzoquinona azul tanto extraída del veneno de alacrán como sintetizada por vía química tienen un efecto directo antimicrobiano^{5,67}. Con la estandarización de la síntesis química fue posible obtener cantidades mayores de compuesto necesarias para poder probar su actividad en un modelo *in vivo* marcando la pauta para su posterior producción a gran escala.

El modelo animal de tuberculosis progresiva experimental utilizado fue establecido por el Dr. Rogelio Hernández Pando, el cual ya ha sido ampliamente caracterizado y en donde se han probado otras moléculas candidatas en el tratamiento de Tb^{70,71,78}. El esquema se inició a los dos meses de infección con la administración del compuesto cada tercer día, esto para simular lo que pasa en el paciente, el cual generalmente inicia su tratamiento una vez que la enfermedad ya está avanzada (sintomática) con la toma diaria de los antibióticos de primera línea.

La administración del compuesto azul a la concentración ya establecida en el esquema de tratamiento generó un discreto grado de inflamación en el tejido pulmonar de ratones sanos (Fig. 16), sin embargo, esto es esperado ya que se trata de un componente del veneno de alacrán, el cual se sabe que es capaz de generar una respuesta por parte del sistema inmunológico^{48,55}. Aunado a esto, la tinción de tricrómico de Masson mostró la presencia de colágeno de tipo I solamente en la capa adventicia de los vasos sanguíneos o vías aéreas que es donde usualmente se encuentra⁷⁹, demostrando que el compuesto no generó un daño mayor en el tejido pulmonar (Figura 18). El colágeno tipo I puede aparecer después de una inflamación crónica o lesión por lo que estos resultados indicarían que no existió un daño significativo en el epitelio pulmonar⁸⁰.

Por otra parte, en el segundo experimento *in vivo* (Figura 19), la administración del compuesto azul en ratones infectados con Mtb H37Rv no generó una disminución significativa de la carga bacilar pulmonar, pero cabe señalar que al segundo si la hubo y fue mayor en el grupo cuya concentración era la más alta; a su vez la sobrevida de este primer grupo también fue mayor que con el vehículo. Contrario a lo esperado, en la concentración 10 veces menor se observa un aumento en la carga bacilar y una disminución en la sobrevida con respecto al control. La concentración baja usada en este ensayo podría considerarse una concentración subinhibitoria, la cual se sabe que para el caso de otros fármacos antituberculosos como la rifampicina e isoniazida⁸¹ genera la aparición de resistencia contribuyendo a que el tratamiento no sea exitoso. Esto significa que el aumento en la carga bacilar pulmonar podría deberse a que el mecanismo de acción de la benzoquinona era contrarrestado por la micobacteria mediante la activación de sistemas de desintoxicación⁶⁵. Estos resultados sugerían que se necesitaba una dosis más alta para poder observar un cambio significativo en la carga bacilar.

En el experimento posterior utilizando una cepa Mtb MDR (Figura 20) el aumentar la dosis del compuesto a casi el doble generó una disminución mayor en las UFCs siendo más evidente en el segundo mes de tratamiento y demostrando también un efecto dosis-respuesta. La sobrevida del grupo tratado con el compuesto fue más alta en la mayor parte del ensayo sin embargo debido a problemas metodológicos a lo último del tratamiento se obtuvo una *n* menor a la necesaria para realizar un análisis estadístico. Desafortunadamente, la administración por vía intratraqueal a pesar de asegurar que toda la dosis del fármaco está siendo depositada en los pulmones, la sedación del animal y la inserción de la cánula puede causar irritación en la tráquea y exacerbar la enfermedad⁸¹. A pesar de esto, el otro parámetro medido, la superficie pulmonar neumónica, correlacionó con lo observado en la carga bacilar, es decir hubo menor daño pulmonar generado por la micobacteria.

Una de las claves por las cuales ha funcionado el tratamiento en existencia es la combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción, lo cual permite atacar a la bacteria a diferentes niveles y en diferentes estados metabólicos³⁴. Además de que se ha comprobado que la combinación de ciertos fármacos puede llevar a cabo un efecto sinérgico como en el caso de los antibióticos de primera línea: isoniazida y etambutol. Este fenómeno permitiría aumentar la efectividad de muestran ambos fármacos por separado disminuyendo la toxicidad y los efectos secundarios tóxicos⁸⁰.

En la última década se ha empezado a probar combinaciones de fármacos ya existentes o utilizados en otras infecciones bacterianas con los ya usados contra Mtb para así poder establecer un nuevo esquema de tratamiento⁸¹. Debido a esto, se consideró conveniente realizar un ensayo tipo “tablero de damas chinas” (“checkerboard”) para determinar si existía sinergia entre la benzoquinona azul y los antibióticos de primera o segunda línea (Figura 22 y 24).

La combinación del compuesto azul con la isoniazida generó una disminución en la MIC de ambos fármacos en aproximadamente un 50%. Esta disminución no fue suficiente para considerarla un efecto sinérgico sino aditivo tomando en cuenta los parámetros establecidos para el FICI (Figura 23). Estos resultados probablemente están asociados a la relación que existe entre los mecanismos de acción de ambos compuestos. La benzoquinona azul al generar especies reactivas de oxígeno en la micobacteria propiciaría la activación de la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa-peroxidasa KatG encargada de degradar moléculas reactivas como peróxido de hidrogeno (H_2O_2)²⁵. Esta enzima a su vez es la encargada de convertir a la isoniazida a su forma activa, la cual va a ser capaz de inhibir la síntesis de ácidos micólicos³² necesarios para la formación de la pared celular de la micobacteria disminuyendo así su viabilidad.

Por otra parte, la rifampicina y la pirazinamida actúan en blancos diferentes como son la inhibición de la síntesis de proteínas y la acidificación del citoplasma (Tabla 1), respectivamente, dando como resultado que no fuera posible observar un incremento directo en sus actividades antibacterianas al combinarse. También cabe resaltar que en estos ensayos se utilizó una sola concentración de los antibióticos de primera línea (0.5MIC).

La combinación anterior de fármacos no resultó en una actividad aditiva al administrarse en ratón, ya que, a pesar de haberse observado una disminución mayor de la carga bacilar con la combinación de los antibióticos y el compuesto azul en comparación con el grupo de antibióticos solos, ésta no fue significativa (Figura 26). Se sabe que la interacción farmacológica se puede ver afectada por la concentración de ambos fármacos y las proporciones⁸³, en este caso solo se probó una proporción, de 1MIC:0.125MIC (compuesto azul: antibióticos).

En cuanto a los tratamientos de segunda línea, se demostró *in vitro* el efecto aditivo en la combinación de la benzoquinona azul y el moxifloxacino (Figura 24) a una proporción de 1xMIC:0.125xMIC (compuesto azul: antibióticos). A pesar de que el mecanismo de acción establecido del moxifloxacino es la inhibición de la ADN girasa³³ se sabe que la presencia de ROS en específico de radicales hidroxilos es determinante para provocar la muerte de las bacterias⁸⁵. Los blancos de acción de la amikacina y la etionamida son la inhibición de la síntesis de proteínas y ácidos micólicos (Tabla 1), respectivamente, lo cual no representa una relación directa con el efecto de la benzoquinona azul.

Cabe resaltar también que la MIC de la benzoquinona azul sola obtenida en estos ensayos fue ligeramente menor al resultado de 8 µg/mL previamente publicado⁵. Para H37Rv el valor disminuyó a 2 µg/mL y para MDR a 4 µg/mL, lo cual puede deberse a que se utilizó una metodología ligeramente diferente que implicaba una cantidad menor de bacterias y el uso de otro reactivo colorido para revelar la viabilidad de la micobacteria⁷⁵.

Para probar que el mecanismo de acción de la benzoquinona azul para eliminar a Mtb es la generación de especies reactivas de oxígeno se realizó un ensayo donde se incubaron las dos cepas del bacilo utilizadas (H37Rv Stanford y MDR) durante una y 12 horas con este compuesto para después determinar si se promovió la generación de ROS dentro de la micobacteria (Figura 28). Como era de esperarse para ambas cepas el H₂O₂ a una concentración alta causó un aumento en las ROS al igual que las concentraciones determinadas como la MIC para la benzoquinona azul (2 µg/mL para H37Rv y 4 µg/mL para MDR). Inclusive se detectó una cantidad aun mayor cuando la concentración se cuadruplicó. El glutatión, al ser un antioxidante capaz de atrapar las ROS pudo disminuir la cantidad detectada en la micobacteria²⁵.

La generación de ROS en Mtb ha sido descrita solamente en ensayos *in vitro* por muy pocos compuestos con benzoquinonas en su estructura. Entre estos, el más relevante para mencionar es la molécula ATD-3169, la cual presentó una MIC muy baja para H37Rv y MDR (3.125 µmol/mL = 0.76 µg/mL) con una estructura similar a la de la benzoquinona azul en cuanto a tamaño y peso molecular⁶⁵. Además de demostrar que la molécula generaba la producción de radicales hidroxilo (\cdot OH) y H₂O₂ y que esto tenía un impacto en la viabilidad de la micobacteria; se

comprobó que también se aumentaba la expresión de genes relacionados con la regulación de ROS y con sistemas de reparación del ADN.

Por otra parte, algunos antibióticos inclusive utilizados en el tratamiento de la tuberculosis (fluoroquinolonas, aminoglucósidos, rifamicinas) se han relacionado con la producción de ROS; esto mediante la activación del metabolismo de ácidos tricarbónicos que genera a su vez la hiperactivación de la cadena transportadora de electrones promoviendo la formación de anión superóxido que afecta principalmente las proteínas con centro de Hierro-Azufre⁸⁷. A pesar de ser adyacente al mecanismo de acción principal se ha comprobado que la presencia de ciertas especies reactivas de oxígeno son necesarias para conseguir una eficacia completa⁸⁵. Aunado a esto, se ha encontrado que moléculas que generan ROS como L-serina al combinarse con ciertos antibióticos (fluoroquinolona) pueden potenciar su actividad microbiana⁸⁷.

La incubación del bacilo durante 12 horas con el compuesto pudo hacer posible observar también un efecto en la viabilidad (Figura 29). Además de corroborar el aumento en las ROS también se observó la disminución de las unidades formadoras de colonias. El atrapamiento de estas especies tóxicas mediada por glutatión, a su vez, promovió el aumento en la viabilidad sugiriendo una relación entre la generación de ROS y la muerte de las micobacterias. En este caso, lo que podría estar pasando es que la cantidad de estas moléculas reactivas dentro de la micobacteria es tan grande que los sistemas antioxidantes como: las enzimas antioxidantes (Sod, KatG), la ergotionina, el micotiol y las tioredoxinas²⁵ se ven rebasados generando un desbalance en la homeostasis redox siendo inevitable el daño al ADN, lípidos y proteínas⁶⁵.

Por último, los resultados sugieren que habría una susceptibilidad mayor en la cepa resistente a los antibióticos de primera línea que en la sensible. Tanto en los ensayos *in vivo* (Figura 20) como en los de la determinación de ROS (Figura 28 y 29) se observa que el compuesto azul tiene un mayor efecto en la viabilidad de la cepa MDR. Se sabe que en estas cepas la mayoría de las resistencias son mediadas por mutaciones; sin embargo, también existen genes relacionados con la resistencia intrínseca a los antibióticos y cuya expresión depende del estado oxidativo de la micobacteria⁸⁸. Específicamente se ha encontrado que las condiciones oxidantes afectan negativamente la expresión del regulador transcripcional WhiB7, encargado de modular la expresión de estos genes⁸⁸.

A pesar de no observar ningún efecto dañino al administrar el compuesto en el modelo *in vivo*, se sabe que los antibióticos que promueven la producción de ROS generan efectos secundarios como: ototoxicidad, nefrotoxicidad y tendinopatía⁸⁷ probablemente por la inespecificidad de su mecanismo de acción. No obstante, la aparición de estos efectos colaterales puede ser contrarrestado con la utilización de nuevos sistemas de administración dirigida de fármacos que permitan aumentar la especificidad de este tipo de moléculas contra patógenos⁸⁶.

Por último, este proyecto se enfocó en estudiar el efecto del compuesto azul contra tuberculosis, sin embargo, se sabe que éste también tiene un efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*⁵ y *Klebsiella pneumoniae* (Datos no publicados). Al igual que para Mtb la aparición de resistencia antimicrobiana en este grupo de bacterias (cepas del grupo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp) hoy en día es considerado un grave problema de salud pública⁸⁹ haciendo relevante probar su posible efecto terapéutico en otros modelos de enfermedades infecciosas aparte de tuberculosis.

Los resultados en su conjunto permiten proponer el uso de este fármaco como una alternativa a los antibióticos marcadamente tóxicos en el tratamiento de la tuberculosis causada por cepas multidrogasresistentes o también para acortar los tiempos de los esquemas de tratamiento ya establecidos. En esta tesis se presenta por primera vez el uso de la benzoquinona azul como tratamiento quimioterapéutico en un modelo *in vivo* de tuberculosis pulmonar y a pesar de mostrar resultados favorables es necesario probar nuevos esquemas terapéuticos y vías de administración más eficientes como los aerosoles⁸² al igual que dirigidas para obtener aun mejores resultados y poder lograr su continuación a la fase clínica.

Capítulo 7

Conclusiones

- La administración de la benzoquinona azul a una dosis de 8 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ durante dos meses (lunes, miércoles y viernes de cada semana), no genera un daño en el epitelio pulmonar en ratones no infectados.
- En ratones infectados con Mtb H37Rv la administración de la benzoquinona azul a concentraciones de 4.7 u 8 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ genera una disminución de la carga bacteriana pulmonar, siendo estadísticamente significativa sólo para la segunda.
- En ratones infectados con Mtb MDR, la benzoquinona azul a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, genera una disminución de la carga bacteriana y del porcentaje de neumonía.
- La combinación de los antibióticos de primera línea con la benzoquinona azul a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, durante dos meses de tratamiento, genera una disminución en la carga bacilar pulmonar la cual no es significativa comparada con la administración de los antibióticos solos.
- La combinación de la benzoquinona azul con la isoniazida o con moxifloxacino genera un “efecto aditivo” resultando en una disminución de sus MIC, probablemente por la relación que existe en sus mecanismos de acción.
- La aplicación de la benzoquinona azul trae como consecuencia un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo cual propicia la muerte de las micobacterias.

Perspectivas

- Medir la expresión de genes relacionados con el control de ROS: enzimas antioxidantes y con centro de Fe-S, proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro; y de sistemas de reparación del ADN en Mtb después de exponerse a la benzoquinona azul.
- Determinar si existe daño oxidante en la micobacteria al exponerla a la benzoquinona azul (peroxidación de lípidos, nitración de proteínas y modificación del ADN).
- Evaluar si la benzoquinona azul tiene un efecto de activación sobre macrófagos infectados con Mtb midiendo la presencia de citocinas proinflamatorias (ELISA) y la producción de ROS.
- Identificar si existen procesos apoptóticos en células infectadas y no infectadas con Mtb expuestas a la benzoquinona azul por medio de un ensayo de TUNEL y de microscopía electrónica.
- Probar la eficacia de esquemas terapéuticos donde se combinen solamente la benzoquinona azul con Isoniazida o con Moxifloxacino.
- Desarrollar una formulación farmacéutica que permita la administración de la benzoquinona azul en aerosol por vía inhalatoria.

Anexo

Ensayo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los antibióticos de primera y segunda línea en Mtb

Ensayo de MIC para los antibióticos de primera línea usando la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. En el ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria (método realizado con resazurina y ~24,000 bacterias) para un aislado clínico de *M. tuberculosis* H37Rv se obtuvo que la MIC para la isoniazida fue de 0.0625 $\mu\text{g/mL}$, rifampicina de 0.125 $\mu\text{g/mL}$ y pirazinamida de 128 $\mu\text{g/mL}$.

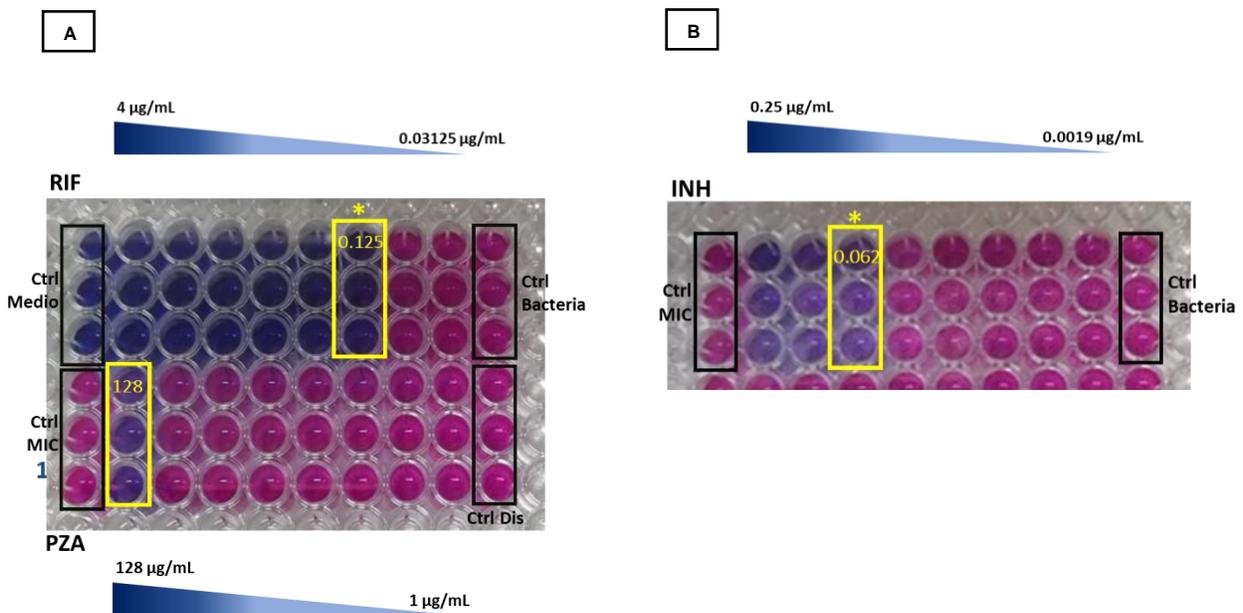


Figura 30. Determinación de la MIC para los antibióticos de primera línea: Isoniazida, Rifampicina y Pirazinamida con la cepa Mtb H37Rv. (A) arriba: Rifampicina (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 $\mu\text{g/mL}$), abajo: Pirazinamida (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 $\mu\text{g/mL}$) (B) Isoniazida (0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.0078125, 0.003906, 0.001953 $\mu\text{g/mL}$). El rectángulo señala la MIC de cada compuesto. Control de MIC: suspensión al 1% de bacteria, Control de bacteria: suspensión al 100% de bacteria, Control de disolvente: DMSO al 30%. El color rosa indica crecimiento bacteriano.

Ensayo de MIC para los antibióticos de segunda línea usando la cepa de *M. tuberculosis* MDR. En el ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria (método realizado con resazurina y ~24,000 bacterias) para un aislado clínico de *M. tuberculosis* MDR se obtuvo que la MIC para etionamida fue de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para amikacina de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y moxifloxacino de 0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

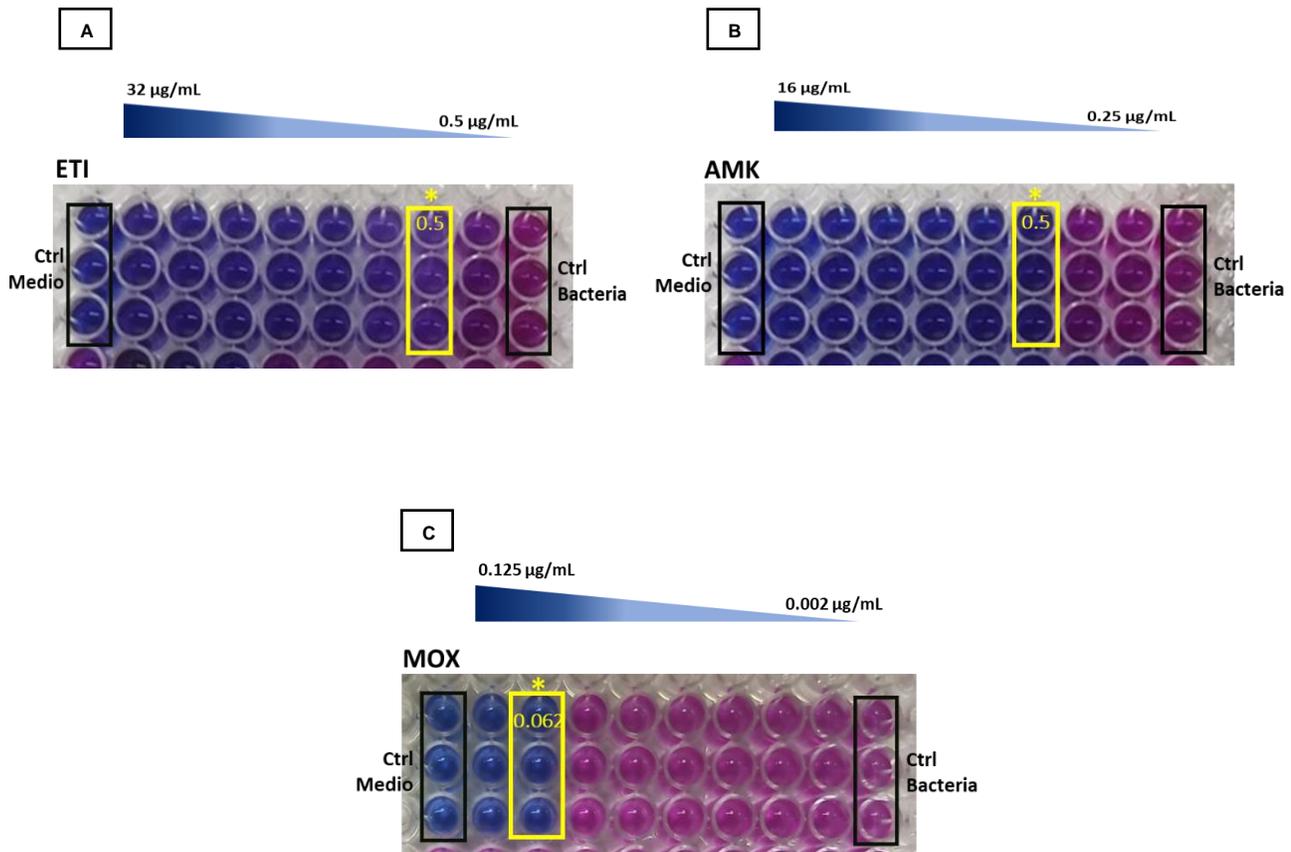


Figura 31. Determinación de la MIC de los antibióticos de segunda línea: Etionamida, Amikacina y Moxifloxacino con la cepa Mtb MDR. (A) Etionamida (32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (B) Amikacina (16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C) Moxifloxacino (0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.0078125, 0.003906, 0.001953, 0.000976 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El rectángulo señala la MIC de cada compuesto. Control de MIC: suspensión al 1% de bacteria, Control de bacteria: suspensión al 100% de bacteria. El color rosa indica crecimiento bacteriano.

Referencias bibliográficas

1. WHO, 2018. WHO Global tuberculosis report 2018.
2. <https://www.who.int/tb/strategy/end-tb/en/>
3. Awofeso N. (2008). Anti-tuberculosis medication side-effects constitute major factor for poor adherence to tuberculosis treatment. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(3), B–D. DOI: 10.2471/blt.07.043802
4. Ghosh, Arijit et al (2018). Scorpion Venom–Toxins that Aid in Drug Development: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 25, 27–37 DOI: 10.1007/s10989-018-9721-x
5. Carcamo-Noriega et al (2019). 1,4-Benzoquinone antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis* derived from scorpion venom. *PNAS*, 116 (26) 12642-12647; DOI: 10.1073/pnas.1812334116
6. <https://www.cdc.gov/tb/worldtbdays/history.htm>
7. Fogel N. (2015). Tuberculosis: a disease without boundaries. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 95(5), 527–531. DOI: 10.1016/j.tube.2015.05.017
8. Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 5(1), e2013070. DOI: 10.4084/MJHID.2013.070
9. Mary Jackson (2014). The Mycobacterial Cell Envelope—Lipids. *Cold Spring Harbor Perspect Med*; 4:a021105; DOI: 10.1101/cshperspect.a021105.
10. Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Odile, B., Etienne, G., Tropis, M. & Dafé M. (2017). Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Scientific Reports* 7: 12807, 1-12, DOI:10.1038/S41598-017-12718-4
11. https://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/chapter2.pdf?fbclid=IwAR19bm5y05bWwGwo-R-v2GHE8AXgkaQWfnpoO0HxqjwHt5ipbC_2iEBwAC

12. Heemskerk D, Caws M, Marais B, et al. Tuberculosis in Adults and Children. London: Springer; 2015. Chapter 2, Pathogenesis. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK344406/?fbclid=IwAR1WrNyeI4op3NgwB SO3cSxDSn5QhwlvTLZVybo-GqSxQqnsqN8rblisT4>
13. Cardona P. J. (2018). Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 36(1), 38–46. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.10.015
14. <https://www.cdc.gov/tb/topic/basics/tbinfectiondisease.htm>
15. Hussain Bhat, K., & Mukhopadhyay, S. (2015). Macrophage takeover and the host-bacilli interplay during tuberculosis. *Future microbiology*, 10(5), 853–872. DOI: 10.2217/fmb.15.11
16. Cervantes, J.L. (2017). MyD88 in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Med Microbiol Immunol* 206, 187–193 DOI: 10.1007/s00430-017-0495-0
17. Fallahi-Sichani Mohammad, Kirschner Denise, Linderman Jennifer (2012). NF- κ B Signaling Dynamics Play a Key Role in Infection Control in Tuberculosis. *Frontiers in Physiology* 3 170, 1-25. DOI=10.3389/fphys.2012.00170
18. Pieters J. (2008). Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. *Cell host & microbe*, 3(6), 399–407. DOI: 10.1016/j.chom.2008.05.006
19. Forman, H. J., & Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166(12 Pt 2), S4–S8. DOI: 10.1164/rccm.2206007
20. Koay, M. A., Christman, J. W., Segal, B. H., Venkatakrishnan, A., Blackwell, T. R., Holland, S. M., & Blackwell, T. S. (2001). Impaired pulmonary NF-kappaB activation in response to lipopolysaccharide in NADPH oxidase-deficient mice. *Infection and immunity*, 69(10), 5991–5996. DOI: 10.1128/IAI.69.10.5991-5996.2001
21. Kaul, N., & Forman, H. J. (1996). Activation of NF kappa B by the respiratory burst of macrophages. *Free radical biology & medicine*, 21(3), 401–405. DOI: 10.1016/0891-5849(96)00178-

22. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
23. Shastri, M. D., Shukla, S. D., Chong, W. C., Dua, K., Peterson, G. M., Patel, R. P., Hansbro, P. M., Eri, R., y O'Toole R. F. (2018) Role of Oxidative Stress in the Pathology and Management of Human Tuberculosis. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2018, Article ID 7695364, 10 pages, DOI: 10.1155/2018/7695364
24. Jamaati, H., Mortaz, E., Pajouhi, Z., Folkerts, G., Movassaghi, M., Moloudizargari, M., Adcock, I. M., & Garssen, J. (2017). Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis. *Frontiers in microbiology*, 8, 2008. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02008
25. Lown, J.W. (1983). The mechanism of action of quinone antibiotics. *Mol Cell Biochem* 55, 17–40. DOI: 10.1007/BF002292
26. Pfeffer, C. M., & Singh, A. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448. DOI: 10.3390/ijms19020448
27. Kornfeld, H., Mancino, G. y Colizzi, V. (1999). The role of macrophage cell death in tuberculosis. *Cell Death and Differentiation* 6, 71-78
28. Ríos-Barrera, V. A., Campos-Peña, V., Aguilar-León, D., Lascrain, L. R., Meraz-Ríos, M. A., Moreno, J., Figueroa-Granados, V., & Hernández-Pando, R. (2006). Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence. *European journal of immunology*, 36(2), 345–353. DOI: 10.1002/eji.200535202
29. Briken, V., & Miller, J. L. (2008). Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Future microbiology*, 3(4), 415–422. DOI: 10.2217/17460913.3.4.415
30. Conradie F. *et al* (2020) Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis. *N Engl J Med*; 382:893-902, DOI: 10.1056/NEJMoa1901

31. Tiberi, S., Scardigli, A., Centis, R., D'Ambrosio, L., Muñoz-Torrico, M., Salazar-Lezama, M. Á., Spanevello, A., Visca, D., Zumla, A., Migliori, G. B., & Caminero Luna, J. A. (2017). Classifying new anti-tuberculosis drugs: rationale and future perspectives. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 56, 181–184. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.10.026
32. Timmins, G. S. Y Deretic V. (2006) Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1220–1222, DOI:10.1111/j.1365-2958.2006.05467.x
33. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00218>
34. Yilancioglu, K., & Cokol, M. (2019). Design of high-order antibiotic combinations against *M. tuberculosis* by ranking and exclusion. *Scientific reports*, 9(1), 11876. DOI: 10.1038/s41598-019-48410-y
35. Eliopoulos, G. M. Y Eliopoulos, C. T. (1988) Antibiotic Combinations: Should They Be Tested?. *Clinical Microbiology Reviews* 1 (2) 139-156
36. <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html>.
37. Ghosh, A., Roy, R., Nandi, M., & Mukhopadhyay, A. (2019). Scorpion Venom-Toxins that Aid in Drug Development: A Review. *International journal of peptide research and therapeutics*, 25(1), 27–37. DOI: 10.1007/s10989-018-9721-x
38. Jean-Luc Wolfender, Jean-Marc Nuzillard, Justin J. J. van der Hooft, Jean-Hugues Renault, and Samuel Bertrand (2019). Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography–High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. *Analytical Chemistry*, 91 (1), 704-742, DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05112
39. Bueno, J., Coy, E. D. y Stashenko, E (2011). Antimycobacterial natural products – an opportunity for the Colombian biodiversity. *Rev Esp Quimioter* 24 (4): 175-183
40. Nguta, J. M., Appiah-Opong, R., Nyarko, A. K., Yeboah-Manu, D., & Addo, P. G. (2015). Current perspectives in drug discovery against tuberculosis from natural products. *International Journal of Mycobacteriology*, 4(3), 165–183. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2015.05.004

41. David, B., Wolfender, J.L. & Dias, D.A (2015). The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem Rev* **14**, 299–315. DOI: 10.1007/s11101-014-9367-z
42. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*, *83*(3), 770–803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285
43. Gutierrez-Lugo, M. T., & Bewley, C. A. (2008). Natural products, small molecules, and genetics in tuberculosis drug development. *Journal of medicinal chemistry*, *51*(9), 2606–2612. DOI: 10.1021/jm070719i
44. Igarashi, M., Ishizaki, Y., & Takahashi, Y. (2017). New antituberculous drugs derived from natural products: current perspectives and issues in antituberculous drug development. *The Journal of antibiotics*, 10.1038/ja.2017.126. Advance online publication. DOI: 10.1038/ja.2017.126
45. García, A., Bocanegra-García, V., Palma-Nicolás, J. P., & Rivera, G. (2012). Recent advances in antitubercular natural products. *European Journal of medicinal chemistry*, *49*, 1–23. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.12.029
46. Pennington, M. W., Czerwinski, A. y Norton, R. S. (2017). Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* *26*, 2738–275
47. Ortiz, E., Gurrola, G. B., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, *93*, 125–135. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.11.233
48. Ahmadi, S., Knerr, J. M., Argemi, L., Bordon, K., Pucca, M. B., Cerni, F. A., Arantes, E. C., Çalışkan, F., & Laustsen, A. H. (2020). Scorpion Venom: Detriments and Benefits. *Biomedicines*, *8*(5), 118. DOI: 10.3390/biomedicines8050118
49. Luna-Ramírez, K., Sani, M., Silva-Sanchez, J., Jiménez-Vargas, J.M., Reyna-Flores, F., Winkel, F. D., Wright, E., Possani, L. D. y Separovic, F. (2014). Membrane interactions and biological activity of antimicrobial peptides from Australian scorpion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, *1838* (9), DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.10.022

50. Ramírez-Carretero, S., Jiménez-Vargas, J. M., Rivas-Santiago, B., Corzo, G., Possani, L. D., Becerril, B., & Ortiz, E. (2015). Peptides from the scorpion *Vaejovis punctatus* with broad antimicrobial activity. *Peptides*, 73, 51–59. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.08.014
51. De Jesus Oliveira T., de Oliveira U.C., da Silva P.I., Jr. Serrulin: A Glycine-Rich Bioactive Peptide from the Hemolymph of the Yellow *Tityus serrulatus* Scorpion. *Toxins*. 2019;11:517. DOI: 10.3390/toxins11090517.
52. Zhao Z., Hong W., Zeng Z., Wu Y., Hu K., Tian X., Li W., Cao Z. Mucroporin-M1 Inhibits Hepatitis B Virus Replication by Activating the Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Pathway and Down-regulating HNF4 α in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* 31;287(36):30181-90. DOI: 10.1074/jbc.M112.370312.
53. Bernardes-Oliveira E., Farias K.J.S., Gomes D.L., de Araújo J.M.G., da Silva W.D., Rocha H.A.O., Donadi E.A., de Fernandes-Pedrosa M.F., de Crispim J.C.O. *Tityus serrulatus* Scorpion Venom Induces Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2019;2019:1–8. DOI: 10.1155/2019/5131042.
54. Verano-Braga T., Figueiredo-Rezende F., Melo M.N., Lautner R.Q., Gomes E.R.M., Mata-Machado L.T., Murari A., Rocha-Resende C., Elena de Lima M., Guatimosim S., et al. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B(2) kinin receptor. *Toxicon*. 2010;56:1162–1171. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.04.006.
55. Petricevich, Vera L., Hernández Cruz, A., Coronas, F. I.V. y Possani, L. D. (2007). Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages, *Toxicon*, 50 (5), DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.06.001.
56. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=chlorotoxin&cond=Cancer>
57. Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M. y Tytgat (1999)., J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur. J. Biochem.* 264:287-30

58. Cid-Uribe, J.I., Meneses, E.P., Batista, C.V.F., Ortiz, E., Possani, L.D (2019). "Dissecting toxicity: the venom gland transcriptome and the venom proteome of the highly venomous scorpion *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879). *Toxins (Basel)*, 11
59. Gurrola, G. B., Hernández-López, R. A., Rodríguez de la Vega, R. C., Varga, Z., Batista, C. V., Salas-Castillo, S. P., Panyi, G., del Río-Portilla, F., & Possani, L. D. (2012). Structure, function, and chemical synthesis of *Vaejovis mexicanus* peptide 24: a novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes. *Biochemistry*, 51(19), 4049–4061. DOI: 10.1021/bi300060n.
60. Varga, Z., Gurrola-Briones, G., Papp, F., Rodríguez de la Vega, R. C., Pedraza-Alva, G., Tajhya, R. B., Gaspar, R., Cardenas, L., Rosenstein, Y., Beeton, C., Possani, L. D., & Panyi, G. (2012). Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Molecular pharmacology*, 82(3), 372–382. DOI: 10.1124/mol.112.078006
61. Dandawate, P. R., Vyas, A. C., Padhye, S. B., Singh, M. W., & Baruah, J. B. (2010). Perspectives on medicinal properties of benzoquinone compounds. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 10(5), 436–454. DOI: 10.2174/138955710791330909
62. Steven J. Gould and Chiu Chin Chang (1977). Streptonigrin biosynthesis. 1. Origin of the 4-phenylpicolinic acid moiety. *Journal of the American Chemical Society* 99 (16), 5496-5497 DOI: 10.1021/ja00458a052
63. Kenneth Lo (2017). Inorganic and Organometallic Transition Metal Complexes with Biological Molecules and Living Cells, *Academic Press* p.406. ISBN: 9780128038147
64. Johnson, L. A., Hug, L. A. (2019). Distribution of reactive oxygen species defense mechanisms across domain bacteria. *Free Radical Biology and Medicine*, 140 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.032.
65. Tyagi, P., Dharmaraja, A. T., Bhaskar, A., Chakrapani, H., & Singh, A. (2015). Mycobacterium tuberculosis has diminished capacity to counteract redox stress induced by elevated levels of endogenous superoxide. *Free radical biology & medicine*, 84, 344–354. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.008
66. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2019231735&tab=PCTBIBLIO>

67. Mendoza Trujillo, I. M. (2019). Efecto de los compuestos rojo y azul (benzoquinonas) en la actividad citotóxica y bactericida de las células MH-S infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*. (Tesis de licenciatura). Facultad de química, UNAM. CDMX, México.
68. Zhan, L., Tang, J., Sun, M., & Qin, C. (2017). Animal Models for Tuberculosis in Translational and Precision Medicine. *Frontiers in microbiology*, 8, 717. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00717
69. Ashish S. Verma, Anchal Singh. Chapter 2 - Animal Models of Tuberculosis (2014). *Animal Biotechnology*. Academic Press. P. 21-37, ISBN 9780124160026, DOI: 10.1016/B978-0-12-416002-6.00002-X
70. Hernández-Pando, R., Marquina-Castillo, B., Barrios-Payán, J., & Mata-Espinosa, D. (2012). Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, genetics and evolution*, 12(4), 725–731. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.02.013
71. Mata-Espinosa, D. A., Mendoza-Rodríguez, V., Aguilar-León, D., Rosales, R., López-Casillas, F., & Hernández-Pando, R. (2008). Therapeutic effect of recombinant adenovirus encoding interferon-gamma in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Molecular therapy*, 16(6), 1065–1072. DOI: 10.1038/mt.2008.69
72. Hernandez-Pando, R. Orozcoe, H., Sampieri, A., Pavon, L., Velasquillo, C., Larrivasahd, J. Alcocer, J. M. y Madrid, M. V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89 26-33
73. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>
74. Howell Wescott, Heather A. et al (2017). Imidazoles Induce Reactive Oxygen Species in *Mycobacterium tuberculosis* Which Is Not Associated with Cell Death. *American Chemical Society Omega* 2, 41–5
75. Caleffi-Ferracioli, K. R., Maltempe, F. G., Siqueira, V. L., & Cardoso, R. F. (2013). Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. *Tuberculosis*, 93(6), 660–663. DOI: 10.1016/j.tube.2013.09.001
76. Mahmud, H. A., Seo, H., Kim, S., Islam, M. I., Sultana, O. F., Nam, K. W., Lee, B. E., Sadu, V. S., Lee, K. I., & Song, H. Y. (2021). Synthesis and activity of BNF15 against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Future medicinal chemistry*, 13(3), 251–267. DOI: 10.4155/fmc-2019-015

-
77. Ortiz, E., Gurrola, G. B., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, 93, 125–135. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.11.233
 78. Ramos-Espinosa, O., Hernández-Bazán, S., Francisco-Cruz, A., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payán, J., Marquina-Castillo, B., López-Casillas, F., Carretero, M., Del Río, M., & Hernández-Pando, R. (2016). Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis. *Pathogens and disease*, 74(7), ftw075. DOI: 10.1093/femspd/ftw075
 79. Zhou, X., & Moore, B. B. (2017). Lung Section Staining and Microscopy. *Bio-protocol*, 7(10), e2286. DOI: 10.21769/BioProtoc.2286
 80. Snijder, J., Peraza, J., Padilla, M., Capaccione, K., & Salvatore, M. M. (2019). Pulmonary fibrosis: a disease of alveolar collapse and collagen deposition. *Expert review of respiratory medicine*, 13(7), 615–619. <https://doi.org/10.1080/17476348.2019.1623028>
 81. Weinstein, Z. B., & Zaman, M. H. (2018). Evolution of Rifampin Resistance in *Escherichia coli* and *Mycobacterium smegmatis* Due to Substandard Drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(1), e01243-18. DOI: 10.1128/AAC.01243-18
 82. Misra, A., Hickey, A. J., Rossi, C., Borchard, G., Terada, H., Makino, K., Fourie, P. B., & Colombo, P. (2011). Inhaled drug therapy for treatment of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 91(1), 71–81. DOI: 10.1016/j.tube.2010.08.009
 83. Zhu, C., Liu, Y., Hu, L., Yang, M., & He, Z. G. (2018). Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry*, 293(43), 16741–16750. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002693
 84. Ramón-García, S., Ng, C., Anderson, H., Chao, J. D., Zheng, X., Pfeifer, T., Av-Gay, Y., Roberge, M., & Thompson, C. J. (2011). Synergistic drug combinations for tuberculosis therapy identified by a novel high-throughput screen. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(8), 3861–3869. DOI: 10.1128/AAC.00474-11
 85. Wang, X., Zhao, X., Malik, M., & Drlica, K. (2010). Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(3), 520–524. DOI: 10.1093/jac/dkp4

86. Vatansever, F., de Melo, W. C., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., Chandran, R., Karimi, M., Parizotto, N. A., Yin, R., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2013). Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS microbiology reviews*, 37(6), 955–989. DOI:10.1111/1574-6976.12026
87. Van Acker, H., & Coenye, T. (2017). The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends in microbiology*, 25(6), 456–466. DOI: 10.1016/j.tim.2016.12.008
88. Burian, J., Yim, G., Hsing, M., Axerio-Cilies, P., Cherkasov, A., Spiegelman, G. B., & Thompson, C. J. (2013). The mycobacterial antibiotic resistance determinant WhiB7 acts as a transcriptional activator by binding the primary sigma factor SigA (RpoV). *Nucleic acids research*, 41(22), 10062–10076. DOI: 10.1093/nar/gkt751
89. Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed research international*, 2016, 2475067. DOI:10.1155/2016/2475067
90. Sakamoto K. (2012). The pathology of Mycobacterium tuberculosis infection. *Veterinary pathology*, 49(3), 423–439. DOI: 10.1177/0300985811429313
91. Behar, S. M., Martin, C. J., Booty, M. G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H. X., Divangahi, M., & Remold, H. G. (2011). Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal immunology*, 4(3), 279–287. DOI: 10.1038/mi.2011.3