



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**COMPUESTOS NATURALES OBTENIDOS DE PLANTAS  
MEDICINALES CON ACTIVIDAD CONTRA  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

**TESINA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**HEIDI ANGÉLICA LUNA VILLAGÓMEZ**

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2022





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: HERNÁNDEZ GÓMEZ LUCIANO

**VOCAL:** Profesor: PLETT TORRES TANYA

**SECRETARIO:** Profesor: GUZMÁN BELTRÁN SILVIA

**1er. SUPLENTE:** Profesor: CAMACHO CRUZ ALEJANDRO

**2° SUPLENTE:** Profesor: FRAGOSO SERRANO MABEL CLARA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”**

**ASESOR DEL TEMA: SILVIA GUZMÁN BELTRÁN**

(nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):**

(nombre y firma)

**SUSTENTANTE (S): HEIDI ANGÉLICA LUNA VILLAGÓMEZ**

(nombre (s) y firma)

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>3</b>
2.1. Objetivo general .....	3
2.2. Objetivos particulares.....	3
<b>3. Generalidades.....</b>	<b>4</b>
3.1. Etiología de la tuberculosis.....	4
3.1.1. Macrófagos.....	5
3.1.2. Células dendríticas.....	5
3.1.3. Linfocitos T CD4.....	5
3.1.4. El granuloma.....	6
3.2. Género <i>Mycobacterium</i> .....	7
3.2.1. Condiciones de cultivo.....	7
3.2.2. Características coloniales.....	7
3.2.3. Características de la célula.....	8
3.2.4. Envoltura celular de <i>Mycobacterium</i> .....	8
3.2.5. Estrategias de evasión inmunológica.....	14
3.2.6. <i>M. tuberculosis</i> forma biopelículas.....	15
3.2.7. Diagnóstico.....	16
3.2.8. Tratamiento.....	18
3.2.9. Vacuna Bacilo de Calmette-Guérin (BCG).....	20
3.2.10. Nuevas alternativas.....	20
3.3. Plantas como una alternativa antimicrobiana.....	21
3.3.1. Uso de las plantas en la medicina tradicional.....	21
<b>4. Procedimiento.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>23</b>
5.1. <i>Chenopodium ambrosioides</i> .....	23
5.1.2. Ensayos <i>in vitro</i> de actividad antimicobacteriana de los extractos de <i>Chenopodium ambrosioides</i> .....	24
5.1.3. Quercetina y rutina.....	25

5.1.4. Ensayo <i>in vitro</i> de actividad antimicrobiana de los compuestos puros obtenidos de <i>C. ambrosioides</i> .....	25
5.1.5. Mecanismo de acción de la rutina y quercetina .....	27
5.2. <i>Lantana hispida</i> .....	28
5.2.1. Ensayos de actividad antimicobacteriana de compuestos puros obtenidos de <i>L. hispida</i> .....	29
5.2.2. Ácido oleanólico (AO) y ácido ursólico (AU).....	31
5.2.3. Mecanismo de acción del ácido ursólico y el ácido oleanólico.....	31
5.3. Estudios <i>in vivo</i> , farmacocinética y toxicidad de los compuestos naturales con actividad antimicobacteriana.....	33
<b>6. Conclusión .....</b>	<b>38</b>
<b>7. Referencias .....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Incidencia estimada de tuberculosis en el 2019.....	<b>1</b>
<b>Figura 2.</b> Infección por tuberculosis activa, latente o granulomas infectados que brindan refugio a las bacterias.....	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b> Características coloniales de <i>M. tuberculosis</i> .....	<b>8</b>
<b>Figura 4.</b> Representación de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> ..	<b>10</b>
<b>Figura 5.</b> Inyección de tuberculina y medición de la induración. ....	<b>17</b>
<b>Figura 6.</b> Frecuencia de uso de plantas medicinales de acuerdo con las entrevistas aplicadas en San Francisco Tlaltenco, Tláhuac, Ciudad de México.....	<b>22</b>
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de plantas medicinales utilizadas en San Francisco Tlaltenco para la atención de enfermedades. ....	<b>23</b>
<b>Figura 8.</b> <i>Chenopodium ambrosioides</i> .....	<b>24</b>
<b>Figura 9.</b> Estructura química de los compuestos rutina y quercetina. ....	<b>28</b>
<b>Figura 10.</b> <i>Lantana hispida</i> . ....	<b>28</b>
<b>Figura 11.</b> Actividad bactericida de AU, AO y su combinación sobre cepas de <i>Mycobacterium</i> en un modelo de infección en macrófagos de ratón.....	<b>30</b>
<b>Figura 12.</b> Microscopía electrónica de transmisión de <i>M. tuberculosis H37Rv</i> no tratada (a,b), tratada con INH (c,d) y tratada con AU (e,f). ....	<b>32</b>
<b>Figura 13.</b> Estructura química del ácido ursólico y el ácido oleanólico. ....	<b>32</b>
<b>Figura 14.</b> Efecto del tratamiento combinado con AU y AO en ratones infectados con TB. ....	<b>37</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Países con mayor carga epidemiológica de TB en 2019.....	<b>2</b>
<b>Tabla 2.</b> Incidencia de TB pulmonar por estado en México en 2017 .....	<b>2</b>
<b>Tabla 3.</b> Rol que desempeña el TDM en las diferentes formas de TB .....	<b>12</b>
<b>Tabla 4.</b> Lípidos de pared celular de <i>Mycobacterium</i> y sus funciones.....	<b>13</b>
<b>Tabla 5.</b> Clasificación de fármacos antituberculosos y sus efectos adversos.....	<b>19</b>
<b>Tabla 6.</b> CMI de los extractos sobre cepas de <i>Mycobacterium</i> .....	<b>25</b>
<b>Tabla 7.</b> Actividad antimicobacteriana de la quercetina y rutina.....	<b>26</b>
<b>Tabla 8.</b> Actividad bactericida de rutina y quercetina sobre <i>M. tuberculosis H37Rv</i> .....	<b>27</b>
<b>Tabla 9.</b> Actividad antimicobacteriana de AU y AO.....	<b>30</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AG: arabinogalactano

AMK: amikacina

AMX/CLV: amoxicilina/ácido clavulánico

AO: ácido oleanólico

AU: ácido ursólico

BAAR: bacilos ácido-alcohol resistentes

BGC: bacilo de Calmette-Guérin

BMD: método de microdilución en caldo

*C. ambrosioides*: *Chenopodium ambrosioides*

CCL19: ligando 19 de la quimiocina CC

CCR7: receptor 7 de quimiocinas CC

CD: células dendríticas

CFLAOHA: complejo fosfolípido-ácido oleanólico-hidroxiapatita

CLR: claritromicina

CM: capreomicina

cMAP: complejo MA-AG-PG

CMI: concentración mínima inhibitoria

DLT: dosis límite tóxica

DMSO: dimetil sulfóxido

DMT: dosis máxima tolerada

DNA: ácido desoxirribonucleico

*E. coli*: *Escherichia Coli*

EMB: etambutol

ERN: especies reactivas de nitrógeno

ERO: especies reactivas de oxígeno

ETO: etionamida

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos



FL: fosfolípidos  
FL-AO: fosfolípido-ácido oleanólico  
GlcNac: N-acetil glucosamina  
*H. pylori: Helicobacter pylori*  
HA: hidroxapatita  
IGRA: ensayo de liberación de interferón gamma  
IL-1: interleucina 1  
IL-10: interleucina 10  
IL-12: interleucina 12  
IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta  
IL-6: interleucina 6  
INF- $\alpha$ : interferón alfa  
INF- $\gamma$ : interferón gamma  
INH: isoniazida  
INLPs: lipopéptidos de isonitrilo  
IPM/CLN: meropenem  
KM: kanamicina  
*L. hispida: Lantana hispida*  
LAM: lipoarabinomanano  
LAMs: liporabinomananos  
LAU: liposomas de ácido ursólico  
LFX: levofloxacinó  
LJ: Löwestein Jensen  
LM: lipomanano  
LMs: lipomananos  
LRP: fagos reporteros de luciferasa  
LZD: linezolid  
*M. africanum: Mycobacterium africanum*

*M. bovis: Mycobacterium bovis*  
*M. caprae: Mycobacterium caprae*  
*M. microti: Mycobacterium microti*  
*M. mungii: Mycobacterium mungii*  
*M. orygis: Mycobacterium orygis*  
*M. pinnipeddi: Mycobacterium pinnipeddi*  
*M. tuberculosis: Mycobacterium tuberculosis*  
MA: ácido micólico  
MFX: moxifloxacino  
Mg: miligramos  
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad  
mL: mililitros  
µg: microgramos  
MurNac: N-acetil murámico  
MurNGlyc: N-glicolilmurámico  
NAD: dinucleótido de adenina y nicotinamida  
NF- κB: factor nuclear kappa B  
OADC: ácido oleanólico, dextrosa y catalasa  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos  
PG: peptidoglucano  
PI3P: fosfatidil inositol-3-fosfato  
PIM: fosfatidil inositol manósido  
PIMs: fosfatidil inositol manósidos  
PPD: derivado proteico purificado  
PRR: receptores de reconocimiento de patrones  
PTO: protionamida  
PZA: pirazinamida

RIF: rifampicina

RLU: unidades de luz relativas

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

*S. xylosus*: *Staphylococcus xylosus*

SEPAR: Sociedad de Neumonología y Cirugía Torácica

STM: estreptomicina

TB: tuberculosis

TBA: tuberculosis activa

TBL: tuberculosis latente

TDM: 6-6'-dimetiltrehalosa

TGI: tracto gastrointestinal

TLR: receptores tipo toll

TNF: factor de necrosis tumoral

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

TST: prueba cutánea de la tuberculina

UFC: unidades formadoras de colonias

V-ATPasas: ATPasa de tipo vacuolar

VIH: Virus de Inmunodeficiencia adquirida

ZLC: clofazimida

## 1. Introducción

La tuberculosis (TB) es una de las 10 causas principales de mortalidad y la primera ocasionada por un agente infeccioso específico<sup>1</sup>. Es una de las enfermedades infecciosas más antiguas conocidas, se cree que el género *Mycobacterium* apareció hace 150 millones de años. En estudios genéticos se documenta que *Mycobacterium tuberculosis* ha estado presente en los últimos 15,000 a 20,000 años<sup>2</sup>. Es probable que sea el microorganismo que ha matado a más personas en la historia de la humanidad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declara a la TB como una enfermedad reemergente debido a su asociación con el VIH/SIDA y a la aparición de cepas multirresistentes a fármacos de primera línea. Así mismo, la OMS, destaca que las personas con sistema inmunológico débil como resultado de enfermedades crónicas como la diabetes tienen un mayor riesgo de pasar de TB latente a TB activa<sup>3</sup>.

Las personas que padecen diabetes tienen el triple de riesgo a desarrollar TB. De hecho, aproximadamente el 15% de los casos de TB a nivel mundial pueden estar relacionados con la diabetes. Además una persona que padece diabetes y TB tiene mayor probabilidad de morir o recaer<sup>3</sup>.

A nivel mundial, se estima que 10 millones de personas enfermaron de TB en 2019, un número que ha ido disminuyendo muy lentamente en los últimos años, la TB ocasionó 1.2 millones de muertes en personas VIH negativas y 208,000 muertes adicionales entre personas VIH positivas<sup>4</sup>. En la figura 1 se muestran los países más afectados por TB

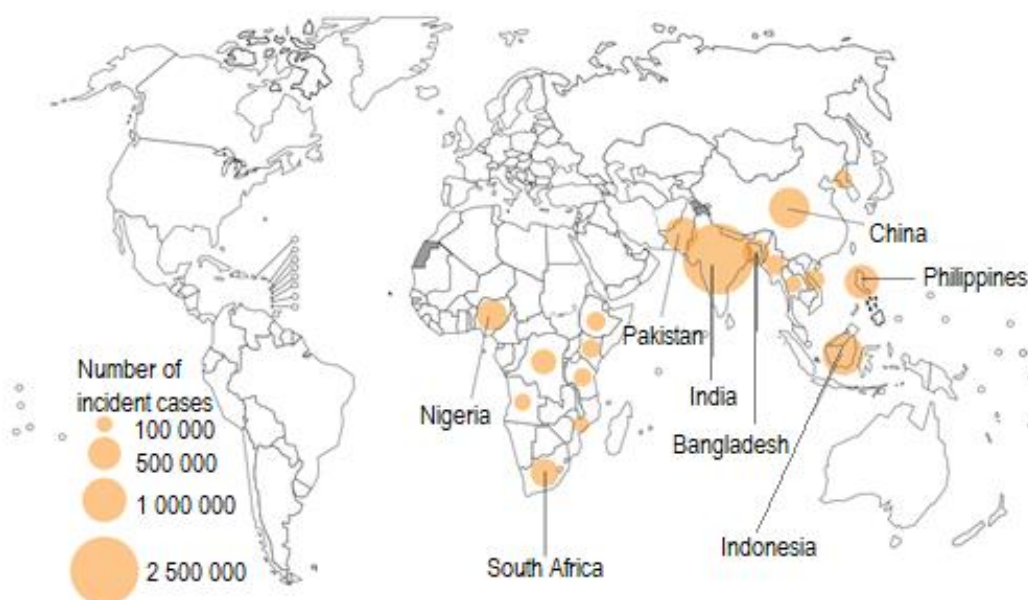


Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis en el 2019. Tomado de Organización Mundial de la salud en su reporte "Global Tuberculosis Report 2020"<sup>3</sup>.

De acuerdo con la OMS, cerca del 67% de los nuevos casos de TB a nivel mundial se concentran en 8 principales países: India (26%), Indonesia (8.5%), China (8.4%), Filipinas (6.0%), Pakistán (5.7%), Nigeria (4.4%), Bangladesh (3.6%) y Sudáfrica (3.6%)<sup>4</sup>. En la tabla 1 se reportan los casos de TB en los países más afectados a nivel mundial.

*Tabla 1. Países con mayor carga epidemiológica de TB en 2019*

<b>País</b>	<b>Casos en miles</b>	<b>Casos por cada 100 mil habitantes</b>
India	2640	193
Indonesia	845	312
China	833	58
Filipinas	599	554
Pakistán	570	263
Nigeria	440	219
Bangladesh	361	221
<b>Sudáfrica</b>	<b>360</b>	<b>615</b>

*Tomado de la Organización Mundial de la Salud en su reporte “Global Tuberculosis Report 2020”<sup>3</sup>.*

Por otro lado, en el continente americano se reportaron 289 mil casos de TB en 2018. Entre el 2017 y el 2018 el número de casos de TB estimados aumentó 2.5%. Los países que tuvieron mayor incidencia fueron Brasil, Perú, México, Haití y Colombia, representando el 69% de los casos<sup>5</sup>.

La tasa de incidencia de TB estimada en México en el 2017 fue de 21,697 casos nuevos, de los cuales 17,104 (el 78.8%) fueron de TB pulmonar, a pesar de los esfuerzos en materia de prevención, la tasa de incidencia se ha mantenido constante desde la última década<sup>6</sup>. En la tabla 2 se reportan los estados con el mayor número de casos, los cuales fueron: Veracruz, Baja California, Chiapas, Nuevo León, Guerrero, Tamaulipas, Sonora y Sinaloa<sup>6</sup>.

*Tabla 2. Incidencia de TB pulmonar por estado en México en 2017*

<b>Estado</b>	<b>Casos</b>
Veracruz	1950
Baja California	1594
Chiapas	1217
Nuevo León	1215
Guerrero	1062
Tamaulipas	1061
Sonora	930
Sinaloa	828

*Tomado de Secretaría de Salud. Dirección de Micobacteriosis. Casos nuevos de TB pulmonar Estados Unidos Mexicanos 1990-2017<sup>6</sup>.*

En los últimos años se ha observado un incremento en casos de TB resistente a fármacos de primera línea. Este fenómeno se atribuye principalmente a fallas operativas entre las que se incluyen: aquellas personas que no toman sus medicamentos de acuerdo con las indicaciones médicas o que no completan su tratamiento, así como médicos que prescriben el tratamiento de forma incorrecta; cuando las dosis y/o duración del tratamiento, aunado a la falta de medicamentos o estos son de mala calidad.

Durante los años de 2010 al 2018 se han registrado en promedio 250 casos al año de TB resistente a fármacos de primera línea (ingresando a tratamiento el 86%) con esquemas de tratamiento específico con fármacos anti-TB de segunda línea, con una conversión bacteriológica de 79% a los seis meses de haber iniciado el tratamiento y un éxito terapéutico del 71%<sup>7</sup>.

El 70% de TB resistente a fármacos de primera línea se concentra en ocho entidades federativas: Nuevo León, Veracruz, Baja California, Guerrero, Tamaulipas, Puebla, Estado de México y Chiapas<sup>7</sup>.

Como se ha descrito, la TB es un problema de salud pública que debe atenderse debido a la fármaco-resistencia y las repercusiones que se derivan de ésta. El uso de sustancias naturales en el tratamiento de diversas patologías, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y las plantas medicinales se ofrecen como una alternativa. Las plantas producen más de cien productos naturales de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios y los cuales son conocidos por su actividad antimicrobiana<sup>8</sup>.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Describir la importancia del estudio de la TB, así como nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad mediante una búsqueda bibliohemerográfica sobre compuestos de origen vegetal que poseen actividad antimicobacteriana.

### **2.2. Objetivos particulares**

- Describir la importancia de la TB en la salud pública.
- Describir las características de *M. tuberculosis* y su relación con el desarrollo de la enfermedad.
- Describir el proceso del desarrollo de la TB, su diagnóstico y tratamiento.

- Describir la información antimicobacteriana del ácido ursólico, el ácido oleanólico, la rutina y la quercetina.
- Describir los mecanismos de acción del ácido ursólico, el ácido oleanólico, la rutina y la quercetina.
- Mencionar la información reciente acerca de la farmacocinética, así como la toxicidad del ácido ursólico, el ácido oleanólico, la rutina y la quercetina.

### 3. Generalidades

#### 3.1. Etiología de la TB

El principal agente causal de la TB es *M. tuberculosis*, perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* conformado además por *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis* y *M. mungi*, caracterizados por tener una divergencia en su genoma del 0.05 %<sup>9</sup>.

La principal fuente de transmisión de TB es por la diseminación aérea del bacilo, los cuales son aerolizados en pequeñas gotas del tamaño de 1-5 µm (denominadas gotitas de *flügge*), generadas al toser o estornudar por personas que padecen la enfermedad. La transmisión ocurre cuando una persona inhala las gotas que contienen a *M. tuberculosis* y éstas, atraviesan la boca o los conductos nasales, el tracto respiratorio superior y los bronquios para llegar a los alvéolos pulmonares.<sup>10</sup>

De los pacientes expuestos, cerca del 70% de los individuos no se infectan, mientras que el 30% desarrollan infección primaria. El hospedero responde inmediatamente a la infección y activa la respuesta inmune innata de los macrófagos y neutrófilos que fagocitan al patógeno e inician la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) para eliminarlo. Seguido de la presentación de antígenos por células dendríticas, luego la inmunidad celular y la infiltración de células inmunes. Todo lo anterior restringe la replicación y la diseminación bacteriana formando un granuloma. Las micobacterias permanecen en el granuloma en un estado de dormancia no replicativo produciendo TB latente (TBL), en la cual el 90% de los casos, las personas son asintomáticas mientras alrededor del 5% desarrolla TB activa (TBA) caracterizada por hemoptisis masiva<sup>11</sup>, respuesta inmune deficiente y descontrolada, ya que existe una dinámica evolutiva de interacciones entre los factores de restricción del huésped y los antagonistas de patógenos durante la infección por micobacterias<sup>12</sup> y daño tisular extenso<sup>11</sup>.

Los principales factores que elevan la tasa de contagio es la alta carga bacilar del paciente, las formas en que las personas viven, trabajan o están en contacto (espacios cerrados y circulación de aire limitada) al igual que el tiempo de exposición con los enfermos. Además de la capacidad de los sistemas de salud para identificar y tratar de

manera efectiva a estas personas<sup>13</sup>. Por ello, una forma efectiva de evitar la transmisión es detectando al paciente y otorgarle el tratamiento adecuado, así como disminuir el contacto estrecho con estos pacientes.

### 3.1.1. Macrófagos

*M. tuberculosis* infecta a los macrófagos y se replica dentro de los fagosomas, la respuesta inmune se activa mediante la señalización de los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés *Toll-like Receptor*), siendo TLR-2 uno de los principales receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de las micobacterias. Los macrófagos infectados responden con una vigorosa respuesta pro-inflamatoria, induciendo la producción de interferón gamma (INF- $\gamma$ ) y la actividad antimicrobiana. La unión de TLR-2 al patrón molecular asociado a patógenos (PAMP, siglas del inglés pathogen-associated molecular pattern) promueve la respuesta inmune innata y adaptativa. Sin embargo, se ha demostrado que la señalización prolongada de TLR-2 inducida por *M. tuberculosis* regula negativamente la respuesta inmune mediante el reclutamiento de células T en el sitio de infección, se aumenta la producción de interleucina 10 (IL-10), que tiene efecto anti-inflamatorio y se disminuye la expresión INF- $\gamma$ . Esto resulta importante durante la fase de infección crónica, ya que la pared celular de *M. tuberculosis* es abundante en ligandos PRR que mantendría un estado inflamatorio continuo, que genera daño celular facilitando la persistencia de los bacilos<sup>14</sup>.

### 3.1.2. Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) se conocen como las células presentadoras de antígenos más eficientes del sistema inmunológico. Esta función de presentación de antígenos es un componente clave para que las CD puedan vincular el sistema inmunológico innato con la respuesta adaptativa<sup>15</sup>. La evidencia demuestra que la infección por *M. tuberculosis* inhibe la migración a través del ligando de la quimiocina 19 (CCL-19) y el receptor de la quimiocina 7 (CCR7) que controlan una serie de eventos migratorios en la inmunidad adaptativa después de la activación de los antígenos<sup>16</sup>. Esta inhibición permite la replicación bacteriana exponencial, produciendo una alta carga bacteriana pulmonar<sup>14</sup>.

### 3.1.3. Linfocitos T CD4

Las células T CD4 son fundamentales para el control de la infección primaria y la contención de los bacilos en los granulomas durante la TBL. Se ha demostrado que la



disminución de células CD4 en pacientes con VIH aumenta significativamente las tasas de reactivación de la TB activa entre un 5% y un 10% por año de vida<sup>14</sup>.

#### 3.1.4. El granuloma

El granuloma evita la diseminación de los bacilos y proporciona un microambiente de comunicación inmune óptima y localizada. Evita el crecimiento activo de los bacilos, activando los mecanismos bactericidas de los macrófagos y creando un entorno privado de oxígeno y nutrientes<sup>17</sup>.

El granuloma inicial consiste en un núcleo de macrófagos infectados rodeados de macrófagos adicionales que muestran una morfología distinta, que incluye células multinucleadas, células epitelioides, macrófagos espumosos enriquecidos con gotitas de lípidos, granulocitos y otros fagocitos mononucleares<sup>18</sup>, tal como se muestra en la figura 2.

El granuloma tiene varias formas morfológicamente distintas: sólido (compuesto de densos agregados de macrófagos y linfocitos infectados y no infectados), neutrófilo (infiltrados granulocíticos) y caseoso (necrosis agrandada y licuefacción de células muertas en el núcleo del granuloma). El granuloma sólido caracteriza la etapa de contención, un periodo de estancamiento en el que la carga bacilar permanece constante y la infección entra en estado latente. A medida que el granuloma progresa de lesiones sólidas no progresivas a lesiones cavitarias activas, hay una disminución en el número de vasos sanguíneos que penetran en el nódulo, lo que facilita la caseificación en el ambiente hipóxico<sup>18,19</sup>.

Los estudios histológicos retrospectivos de pacientes con TB activa muestran una marcada heterogeneidad en los granulomas observados en un solo huésped en diferentes etapas de progresión. Esto indica procesos inmunológicos diferenciales que ocurren por separado en cada sitio, o que sugiere que la progresión de la TB de una infección latente a una infección activa es una evolución dinámica determinada localmente en el sitio del granuloma. Se sabe que antígenos de *Mycobacterium* como: los lipomananos (LM), los lipoarabinomananos (LAM), la 6-6'-dimetiltrehalosa (TDM) y el fosfatidil inositol manósido (PIM) inducen la producción de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias a partir de células mononucleares a través de receptores de reconocimiento de patrones, como TLR-2. Estos efectos granulomatosos proporcionan una acumulación de macrófagos del huésped no infectados con una activación subóptima, lo que permite una persistencia continua de las micobacterias en el núcleo mientras se separa físicamente de la actividad bactericida de los linfocitos<sup>14</sup>.

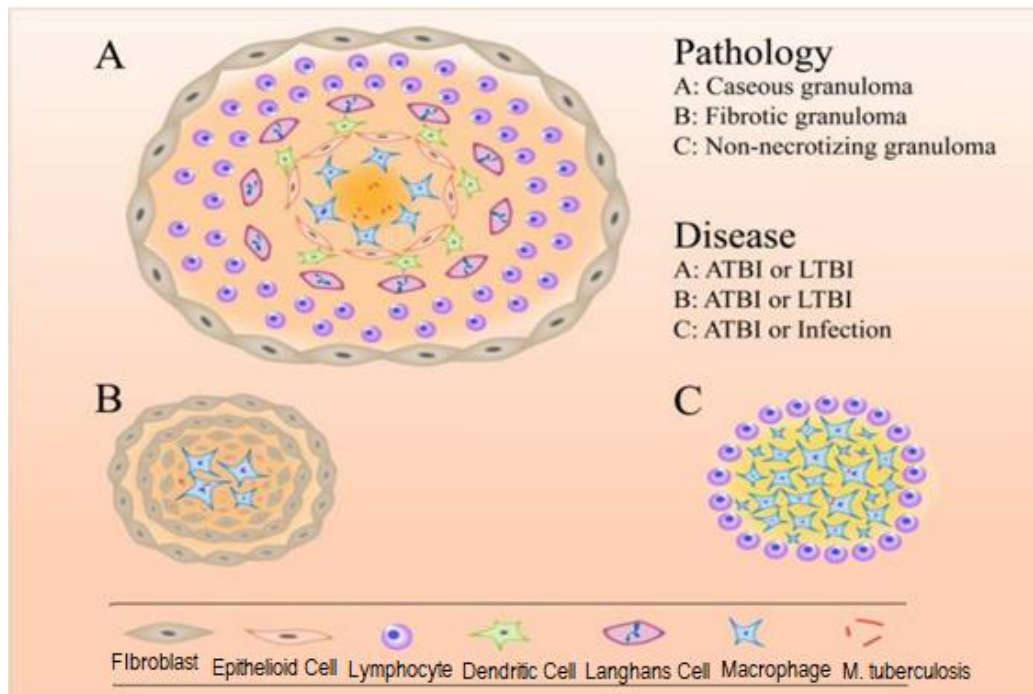


Figura 2. Infección por tuberculosis activa, latente o granulomas infectados que brindan refugio a las bacterias. ATBI (siglas del inglés Active Tuberculosis Infection) = Tuberculosis activa, LTBI (siglas del inglés Latent Tuberculosis Infection) = Tuberculosis latente. Tomado de Zhai, W., Wu, F., Zhang, Y., Fu, Y. & Liu, Z., 2019.<sup>37</sup>

### 3.2. Género *Mycobacterium*

#### 3.2.1. Condiciones de cultivo

Las micobacterias pueden crecer utilizando glicerol como fuente de carbono, exceptuando a *M. bovis* ya que no puede procesar este compuesto o lo hace con dificultad, por lo que es recomendado usar para este microorganismo, medios con piruvato o glutamato de sodio. Como fuente de nitrógeno se utiliza asparagina así como iones de amonio y albúmina que es incorporada en los medios con sero-albúmina bovina<sup>20</sup>. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, el pH óptimo es 7.

#### 3.2.2. Características coloniales

La morfología colonial varía entre las especies, además del medio en el que se cultivan, por ejemplo, en la figura 3 se ilustra el crecimiento de *M. tuberculosis* en medio Middlebrook 7H10, presenta colonias grandes, compactas, secas, ásperas, con un borde comúnmente regular y una coloración blanquecina/crema, mientras que en el medio Löwestein Jensen (LJ) tienen un aspecto rugoso, granular, seco, con una apariencia de "migajas de pan".

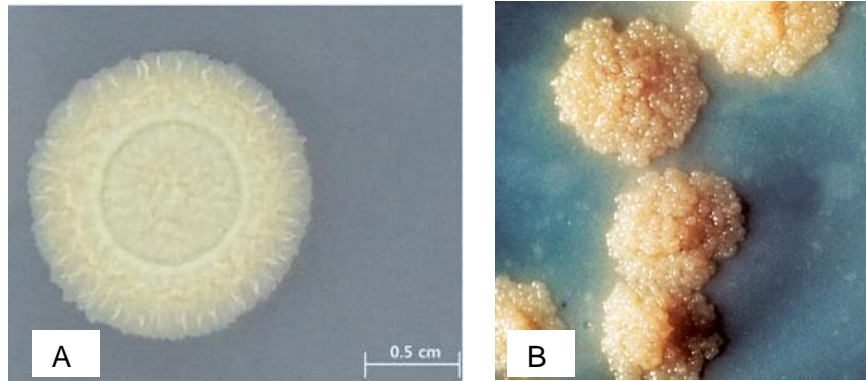


Figura 3. Características coloniales de *M. tuberculosis* (*Mtb*). A) *Mtb* en medio Middlebrook 7H10-OADC, B) *Mtb* en medio Löwestein Jensen, C) *M. smegmatis* en medio Middlebrook 7H10-OADC. Tomada de Han SJ, 2015; George Kubica/CDC; Kumar A, 2017<sup>2</sup>.

### 3.2.3. Características de la célula

Las micobacterias son bacilos delgados rectos o ligeramente curvos, de un tamaño de 1-10  $\mu\text{m}$  de largo por 0.2-0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro. Son bacilos aerobios estrictos, no esporulados, no móviles y se tiñen con dificultad con la tinción de Gram, esto debido a su pared celular tan gruesa y con un alto contenido rico de lípidos, por lo que resisten la decoloración ácido-alcohol otorgándoles el nombre de bacterias ácido-alcohol resistentes<sup>21</sup>.

### 3.2.4. Envoltura celular de *Mycobacterium*

La envoltura de *M. tuberculosis* es una estructura compleja, constituida por una cápsula (formada de polisacáridos unidos a lípidos y proteínas), pared celular y membrana plasmática<sup>22</sup>. En la figura 4 se ilustra la complejidad de la pared de las micobacterias.

Los componentes principales de la pared celular micobacteriana es la capa de peptidoglicanos (PG), ácido micólicos (MA) y arabinogalactanos (AG). La pared celular micobacteriana se asemeja a la de las bacterias Gram positivas por tener una capa de PG casi tan gruesa y a las Gram negativas al tener una capa cerosa externa que imita una “membrana externa”.

La pared celular de las micobacterias juega un papel clave en la resistencia intrínseca a los antibióticos y la virulencia<sup>23</sup>. El porcentaje alto de lípidos le otorga las características ácido-alcohol resistente, que le permite sobrevivir durante la desecación y a la acción de los descontaminantes ácidos y alcalinos.

En su lado interno contiene una capa de PG (siendo un polímero de gran tamaño cuyo papel principal es mantener la estabilidad osmótica), la cual se une covalentemente a AG que a su vez sirve como sitio de fijación para AM de cadena larga. A esto se le conoce como el núcleo de la pared celular “core” o como el complejo MA-AG-PG (cMAP). Más allá del cMAP en la parte exterior de la pared, hay lípidos libres, PIMs, I LMs y (LAMs)<sup>23</sup>.

El glucolípido más abundante de *M. tuberculosis* es la 6-6'-dimetilrehalosa (TDM), conocido como factor cordón debido a que provoca que los bacilos se dispongan de manera paralela y en forma de cadenas observándose microscópicamente como un cordón y como una red de filamentos en medio líquido. Este compuesto es tóxico para los leucocitos inhibiendo la función de la succinato deshidrogenasa, actuando específicamente en el segmento entre el complejo II y el complejo III de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, provocando inflamación y disminuyendo la actividad respiratoria y fosforilativa<sup>24,25</sup>. El TDM además está relacionado con la capacidad de producir granulomas caseosos<sup>26</sup>.

Los lípidos de la pared celular vuelven hidrófoba a las micobacterias, esta capacidad hace que estos microorganismos sean resistentes a la coloración con tinciones básicas de anilina, a menos que éstas se apliquen durante periodos prolongados o con la presencia de calor o detergentes<sup>27</sup>.

Si bien la estructura básica de PG se conserva, es importante notar que la PG en micobacterias sufre algunas modificaciones. El PG aislado de *M. tuberculosis* contiene además del N-acetil glucosamina (GlcNaC), ácido N- acetil murámico (MurNaC) como ácido N-glicolilmurámico (MurNGlyc), mientras que en otras bacterias solo contiene MurNaC (como es el caso de *M. leprae*), la presencia de MurNGlyc aumenta la resistencia de las micobacterias a la lisozima<sup>23</sup>. La lisozima es esencial en la inmunidad innata, ya que se encuentra en las secreciones corporales como las lágrimas y la saliva. Esta enzima funciona como un agente antimicrobiano al escindir los peptidoglicanos de la pared de las bacterias, lo que conduce a la muerte celular. Sin embargo, bacterias Gram positivas y negativas han desarrollado mecanismos para evitar la muerte por lisozima<sup>28,29</sup>, tal es el caso de *M. tuberculosis*.

La membrana celular presenta las mismas características que cualquier otra membrana, sin embargo, en micobacterias los derivados de fosfolípidos son altamente glucosilados formando moléculas como LAM.<sup>22</sup>

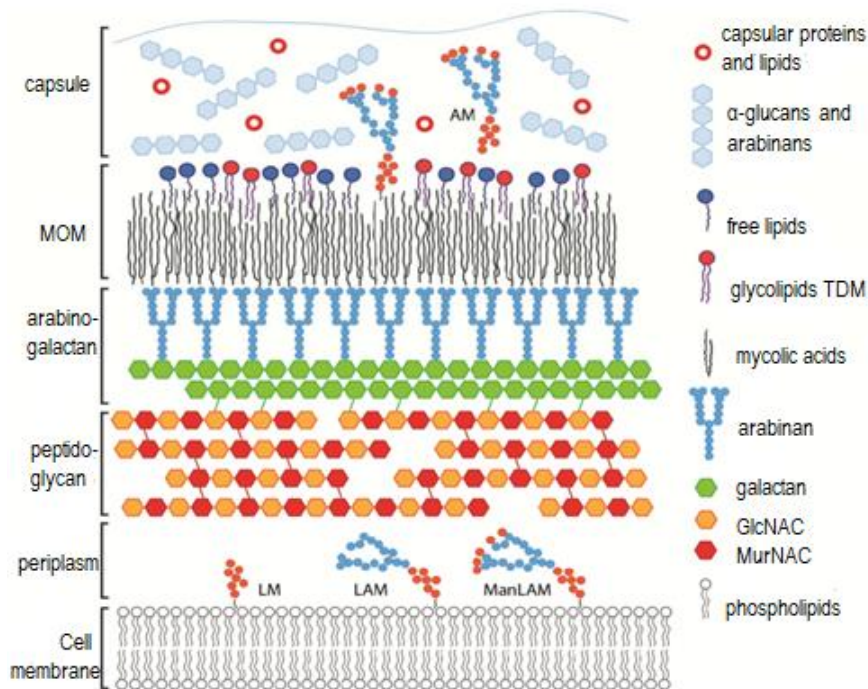


Figura 4. Representación de la pared celular de *M. tuberculosis*. MOM (siglas del inglés *mycobacterial outer membrane*) = membrana externa de la micobacteria, LM (siglas del inglés *lipomannan*) = lipomannano, AM (siglas del inglés *arabinomannan*) = arabinomannano, LAM ( siglas del inglés *lipoarabinomannan*) = lipoarabinomannano, ManLaM (siglas del inglés *mannose-capped*) = manosa-LAM, GlcNac (siglas del inglés *N-acetyl-glucosamine*) = N-acetilglucosamina, MurNA (siglas del inglés *N-acetyl-muramic acid*) = ácido N-acetil murámico, TDM = 6-6'-dimetiltehalosa. Tomada de Raffetseder J. 2016<sup>81</sup>.

#### 3.2.4.1. LAM Y LM

LM es importante para la biogénesis de la pared celular y para la supervivencia del bacilo en la célula hospedera. Es considerado como la base estructural de LAM. LM inhibe la biosíntesis del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) en macrófagos humanos induciendo miARN y miR-125b que se dirigen a la región 3-UTR del ARNm de TNF evitando la expresión de TNF<sup>30</sup>.

LAM es un componente importante de la pared celular que le permite a *M. tuberculosis* sobrevivir en el contexto de infección inhibiendo la activación de la respuesta inmune persistiendo en el hospedero. LAM es un factor de virulencia, ya que inhibe la actividad bactericida de los macrófagos y otras respuestas efectoras innatas. También induce la formación de granulomas junto con PIM y LM<sup>30</sup> y evita la maduración fagosomal al bloquear las vías de Ca<sup>2+</sup>/ Calmodulina, lo que da como resultado la supervivencia a largo plazo de *M. tuberculosis* en el entorno de la célula huésped<sup>31</sup>.

#### 3.2.4.2. TDM

Como ya se ha mencionado, el TDM es el glicolípido más abundante en la pared celular de *Mycobacterium* y es conocido como factor cordón, es tóxico para las células de mamíferos y afecta al sistema inmunológico del huésped al inhibir la migración de neutrófilos polimorfonucleares<sup>32</sup>.

Tiene lípidos de cadena larga como componentes estructurales cruciales para la supervivencia de las micobacterias dentro de los fagosomas del hospedero. Además, el factor cordón estimula la actividad NADasa en la célula huésped, reduciendo así el nivel de dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD), especialmente en hígado, pulmón y bazo. Como resultado, reduce la actividad de las enzimas dependientes de NAD. La fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones en las mitocondria también se ven afectadas por la alteración de las membranas mitocondriales mediada por el factor cordón<sup>31</sup>.

Por otra parte, TDM induce al sistema inmunológico para la producción de citocinas en el hospedero. Después de la fagocitosis de *M. tuberculosis*, los macrófagos actúan como células presentadoras de antígenos e interactúan con las células T CD4. Las células T CD4 liberan IFN- $\gamma$  y después de esta interacción, estimula a los macrófagos para la liberación de citocinas como TNF- $\alpha$ , Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 1 $\beta$  (IL -1 $\beta$ ), Interleucina 12 (IL12) e Interleucina (IL-6). Los macrófagos infectados producen una mayor cantidad de citocinas proinflamatorias cuando se exponen a TDM. Estas citocinas son esenciales para la formación de granulomas para tratar de contener la infección<sup>33</sup>.

Además, el TDM está relacionado con la progresión de la TB primaria o secundaria. En la TB primaria el sistema inmune suele controlar el crecimiento bacilar y no se desarrolla la enfermedad tuberculosa activa. Si ésta llega a producirse, lo más frecuente es que lo haga dentro los dos primeros años tras la primoinfección. La TB secundaria se produce como consecuencia de la reactivación de una infección latente por susceptibilidad del sistema inmunológico, en sujetos con enfermedades crónicas o envejecimiento<sup>34</sup>. En la tabla 3 se muestra la función que desempeña el TDM en las diferentes formas de TB.

Tabla 3. Rol que desempeña el TDM en las diferentes formas de TB

Tipo de TB	Rol del TDM
<b>Primaria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(1) Para la supervivencia de <i>M. tuberculosis</i> en el entorno de la célula huésped principalmente en macrófagos mediante la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma.</li> <li>(2) En el momento de la formación de granulomas, una concentración pequeña de TDM es requerido.</li> </ul>
<b>Secundaria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(1) La etapa preliminar de la TB secundaria se denomina neumonía lipídica, que es causada por el material infectado derramado de las cavidades del granuloma.</li> <li>(2) Debido a la presencia de TDM, <i>M. tuberculosis</i> puede sobrevivir en macrófagos alveolares espumosos.</li> <li>(3) La obstrucción bronquial se produce debido al granuloma o al contenido de lípidos presente en la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>.</li> </ul>
<b>Necrosis caseosa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(1) La monocapa TDM desencadena necrosis por caseificación en <i>M. tuberculosis</i>.</li> <li>(2) Los efectos tóxicos del TDM contribuyen al mantenimiento de las lesiones.</li> </ul>

Tomado y editado de Rao, N. & Meena, L. S., 2011.<sup>31</sup>

#### 3.2.4.3. MA

Los ácidos micólicos inducen la acumulación de colesterol en el interior de los macrófagos peritoneales y alveolares. Los macrófagos que contiene colesterol y gotitas de lípidos se asemejan a los derivaros de macrófagos espumosos observados en los granulomas tuberculosos<sup>35</sup>.

#### 3.2.4.4. PIM

Constituyen un componente sustancial de la envoltura celular, precursor de LAM y LM. Contribuye a la captación de macrófagos por el receptor de manosa. El estado de

acilación de PIM puede inducir la formación de granulomas y el reclutamiento de células en la infección causada por *M. tuberculosis*<sup>36</sup>.

En la tabla 4 se enlistan los lípidos que constituyen la pared celular de *M. tuberculosis*, que le confieren diversas funciones.

Tabla 4. Lípidos de pared celular de *Mycobacterium* y sus funciones

Lípidos de pared celular	Bacteria	Hospedero
<b>DAT</b>	Mantenimiento de la envoltura celular.	Inhibe la proliferación de linfocitos CD4 y CD8; produce citocinas proinflamatorias y ON; inhibe la acidificación del fagosoma.
<b>MA</b>	Participa en la integridad estructural de la pared celular; esencial para la viabilidad micobacteriana; protección contra estrés oxidante.	Desencadenan la diferenciación de macrófagos en macrófagos espumosos.
<b>TDM</b>	Esencial para la rigidez y estabilidad de la pared celular.	Deterioro de la maduración del fagosoma; induce la producción de ON y citocinas proinflamatorias; induce respuesta de tipo TH1 (síntesis de IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF e IFN- $\gamma$ ).
<b>PIMs</b>	Precusores de LM, LAM. Esenciales para la viabilidad de la micobacteria; actúa como barrera de permeabilidad.	Modula la respuesta inflamatoria; reclutamiento de células NK (natural killer).
<b>LM</b>	Base estructural de LAM.	Inhibe la síntesis de macrófagos humanos.
<b>LAM</b>	Uno de los componentes clave de la envoltura celular de <i>Mycobacterium</i> .	Inhibe la actividad bactericida de los macrófagos; inhibe la proliferación de la respuesta tipo TH1; activa IL-10; inhibe la apoptosis de células dendríticas y macrófagos.
<b>PGLs</b>	Mantenimiento de la envoltura celular.	Inhibe TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y ON.

Tomado y editado de Singh, P., Rameshwaram, N. R., Ghosh, S. & Mukhopadhyay., 2018.<sup>30</sup>



### 3.2.5. Estrategias de evasión inmunológica

#### 3.2.5.1. *M. tuberculosis* inhibe la maduración de los fagolisosomas

La proteína coronina 1, inicialmente conocida como proteína de cubierta rica en triptófano y aspartato, se recluta en los fagosomas que contienen bacilos activos, pero se libera más rápidamente de los fagosomas que contienen micobacterias inactivas. *M. tuberculosis* inhibe la formación de lisosomas aumentando la expresión de coronina 1 en la membrana del fagocito. Además, el interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) inhibe la maduración al inducir la producción de IL-10. IL-10 actúa para reducir el exceso de IL-1 $\beta$ , y por lo tanto, suprime la maduración de IL-1 $\beta$  dependiente de caspasa 1 de las células mononucleares del líquido pleural<sup>37</sup>.

La inhibición de la fusión de fagosomas con lisosomas también es un mecanismo importante. Estudios han demostrado que el factor transcripcional proinflamatorio NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) regula la liberación de enzimas lisosomales en los fagosomas, regulando así la destrucción de patógenos. El fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) es un componente importante de la membrana celular de los macrófagos ubicada en el endosoma y la superficie del fagosoma. Después de la infección por *M. tuberculosis*, se libera LAM e induce la expresión de PI3P suprimiendo el proceso de fusión entre fagosoma y lisosomas<sup>37</sup>.

#### 3.2.5.2. *M. tuberculosis* inhibe la acidificación de los fagolisosomas

Una característica de la maduración del fagosoma es la acidificación (pH 5.0 o menor) del fagosoma. El ambiente ácido inhibe la actividad bacteriana, optimiza la actividad de las proteasas y los eventos de fusión fagosoma-lisosoma y la degradación del patógeno en componentes para el procesamiento y presentación de antígeno, con la finalidad de activar la respuesta inmunitaria. La acidificación se lleva a cabo mediante el reclutamiento de V-ATPasas (ATPasa de tipo vacuolar) al fagosoma, que bombea activamente iones de hidrógeno a través de la membrana del fagosoma<sup>14</sup>.

Los fagosomas que contienen a *M. tuberculosis* se acidifican a un mínimo de pH 6.4 y posteriormente no se fusionan con los lisosomas. Se ha demostrado que *M. tuberculosis* excluye las V-ATPasas de la membrana del fagosoma, evitando la acidificación<sup>14</sup>.

Los lisosomas de los macrófagos son el paso convergente entre la vía fagocítica y la vía biosintética, donde los antígenos se procesan y forman complejos con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para su presentación a las células T. La acumulación de componentes de *M. tuberculosis* en compartimientos endosomales tardíos ácidos, optimiza el procedimiento de presentación antigénica. El fagosoma con *M. tuberculosis* tienen una acidificación y actividad hidrolítica limitada, por lo tanto, una capacidad subóptima para procesar antígenos. La inhibición de la biogénesis del

fagolisosoma evita la destrucción de *M. tuberculosis* por las proteasas hidrolíticas e inhibe la presentación y el reconocimiento por las células T<sup>14</sup>.

### 3.2.6. *M. tuberculosis* forma biopelículas

Las biopelículas formadas por micobacterias se pueden definir de la misma manera que cualquiera otro. El desarrollo de la biopelícula comienza con la adhesión bacteriana y luego pasa por las diferentes etapas de adhesión a la superficie, crecimiento, síntesis de matriz y dispersión. Una vez que las bacterias se adhieren a la superficie, éstas inician la síntesis de una matriz extracelular, generalmente compuesta de glicopéptidos, ácido desoxirribonucleico (DNA) y otras moléculas. A pesar de que las micobacterias carecen de fimbrias o apéndices superficiales, se han descrito diversas proteínas como posibles factores potenciales para la agregación de micobacterias y la unión a otras células<sup>38</sup>.

Uno de los hallazgos más importantes de los últimos años en el campo de la investigación es la capacidad de *M. tuberculosis* a desarrollar biopelículas. Las observaciones clínicas evidencian que la eliminación del biomaterial es esencial para erradicar las infecciones, sin embargo, este es un mecanismo de resistencia a los antibióticos. Hasta el momento el papel de las biopelículas en la patogenia de la TB sigue sin estar claro. Se ha sugerido que la importancia de las biopelículas en esta enfermedad se debe a su participación en el proceso de necrosis caseosa y formación de cavitación en el tejido pulmonar, sitio en el que *M. tuberculosis* podría formar biopelículas<sup>38</sup>.

La localización de ácidos micólicos difundidos y la resistencia a fármacos de las micobacterias en el área de las lesiones necrotizantes apoyan la hipótesis de que las bacterias crecen como biopelículas en dichos nichos del hospedero. También se ha descrito que *M. tuberculosis* produce señales a través de la vía ESX-1 para inducir la lisis de los macrófagos. La liberación posterior de DNA del hospedero en el compartimento extracelular parece facilitar el crecimiento agregado del patógeno. Dado que el DNA es un componente clave de la matriz extracelular en las biopelículas producidas por muchas bacterias patógenas, es razonable argumentar que el DNA derivado del hospedero contribuye significativamente a la matriz extracelular de los biofilms de *M. tuberculosis*, especialmente en las lesiones necróticas<sup>39</sup>.

Se ha demostrado que las biopelículas *in vitro* de *M. tuberculosis* representan un modelo adecuado para investigar las características persistentes del patógenos. En un estudio realizado se informa que los genes que confieren aptitud de *M. tuberculosis* dentro las biopelículas también están involucradas en el mantenimiento de la resistencia a los antibióticos, lo que sugiere que el entorno de crecimiento en las biopelículas selecciona las células que mantienen la tolerancia intrínseca al estrés exógeno, incluidos los antibióticos. Además, también se mostró que la resistencia intrínseca a los fármacos de las bacterias que forman las biopelículas es un factor determinante de la persistencia. Finalmente, se ha demostrado que la síntesis inducida de lipopéptidos de isonitrilo

(INLPs, siglas del inglés isonitrile lipopeptides) es específica del crecimiento de *M. tuberculosis* en las biopelículas, lo que demuestra el entorno único generado. Estos hallazgos comienzan a explicar la base de la tolerancia a los antibióticos asociada a las biopelículas en *M. tuberculosis*<sup>40</sup>.

### 3.2.7. Diagnóstico

La elección de una herramienta de diagnóstico para la TB depende del propósito de la prueba: detectar TBL, enfermedad activa o resistencia a los medicamentos.

#### 3.2.7.1. TB latente

El diagnóstico de TBL es indirecto y depende de la detección de la respuesta inmune contra antígenos de *Mycobacterium*<sup>41</sup>. Las principales pruebas son: la prueba cutánea de la tuberculina (TST, siglas del inglés tuberculin skin test) y los ensayos de liberación de interferón gamma (IGRA, siglas del inglés Interferon-Gamma Release Assay).

La TST consiste en una inyección intradérmica de 5 unidades de tuberculina (5UT), es un derivado proteico purificado (PPD, siglas del inglés purified protein derivate). La intensidad de la reacción inflamatoria local debido a la liberación de citocinas por los linfocitos sensibilizados se mide después de 72 horas. La interpretación tiene en cuenta el tamaño de la induración, la posibilidad previa a la infección por *M. tuberculosis* y el riesgo de desarrollar la TB activa. En la lectura diagnóstica se tendrá en cuenta, no sólo el tamaño, sino también la situación clínica del individuo. De acuerdo con la Sociedad de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) se considera positiva una induración<sup>42</sup>:

- En personas no vacunadas  $\geq 5$  mm.
- En personas vacunadas con el Bacilo Calmette-Guérin (BCG) se plantea el problema de discernir ante una induración tuberculínica, el que se trate de una infección tuberculosa, o bien una respuesta a antígenos compartidos entre la vacuna de BCG y PPD.
- En el resto de vacunados con BCG si el tamaño de la induración es  $> 15$  mm.

En la figura 5 se muestra un ejemplo de lectura de la induración. La prueba puede estar sujeta a diversos factores que pueden disminuir la reactividad de la piel, como enfermedades virales, inmunodepresión e incluso la edad<sup>41,43</sup>. Otra de las limitaciones es que la mayoría de las personas positivas en la prueba de TST no progresan a TB activa.

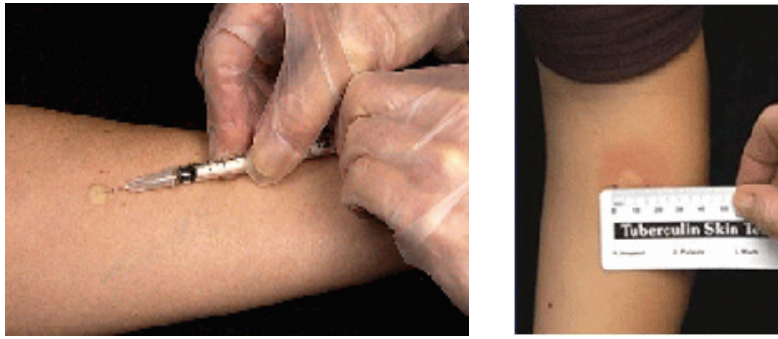


Figura 5. Inyección de tuberculina y medición de la induración. Tomado de Minnesota Dept. of Health. Tuberculin Skin Test (TST). [Internet]. 2021. [Consultado: 01 nov 21]. Disponible en: <https://www.health.state.mn.us/diseases/tb/tst.html>.<sup>82</sup>

Por otra parte, se encuentra el IGRA, que se basa en la medición *in vitro* de la liberación de interferón gamma por los linfocitos sensibilizados después de la estimulación con antígenos de *Mycobacterium*. Actualmente, existen dos pruebas comerciales que varían en procedimiento, pero siguen el mismo principio y son: T-SPOT®.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Reino Unido) y QFT-GIT (Qiagen, Hilden, Alemania). Los antígenos específicos contenidos en la prueba SPOT®.TB son ESAT-6 y CFP-10, mientras que en la prueba QFT-GIT además de los antígenos ya mencionados utiliza TB 7.7<sup>44</sup>.

El ensayo IGRA tiene mayor especificidad y objetividad debido a que no se presenta el sesgo de lectura de la reacción cutánea. Además, la prueba se realiza con un control negativo y positivo, disminuyendo el riesgo de error<sup>43</sup>.

### 3.2.7.2. TB activa

Se utilizan cuatro tecnologías principales para la detección y el diagnóstico: técnicas de imagen (radiografías de tórax), microscopía (frotis de esputo), métodos basados en cultivos y pruebas moleculares<sup>41</sup>.

En principio la detección por radiografía de tórax detecta rápidamente el daño pulmonar, luego deben realizarse las pruebas microbiológicas para corroborar la infección por *M. tuberculosis*. Dependiendo de la manifestación clínica de la enfermedad, prácticamente cualquier tipo de muestra puede procesarse para detectar la presencia de micobacterias. Las más comunes son muestras respiratorias que incluyen esputo, broncoaspirado y líquido de lavado broncoalveolar. Posterior a la toma de muestra, la evaluación microscópica de frotis sanguíneo es un método de detección rápido y económico de micobacterias, para este caso, se utiliza la técnica de ácido-alcohol resistencia, que es la propiedad que tienen las micobacterias de unir en su pared celular fucsina fenicada frente a la acción de decolorantes como la mezcla de ácido y alcohol. Esta característica se debe al alto contenido en lípidos, particularmente a los ácidos micólicos, que poseen las micobacterias. Así, utilizando una técnica adecuada es posible reconocer a los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en la muestra del paciente. La tinción sola no

debe utilizarse para el diagnóstico definitivo de infección por micobacterias y debe combinarse con cultivo para la identificación de especies y las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos<sup>45</sup>.

Históricamente, los cultivos de micobacterias positivas se identifican con base en la morfología de la colonia y reacciones bioquímicas, sin embargo, se deben realizar métodos moleculares para la identificación definitiva en la mayoría de los cultivos aislados. Existen varias tecnologías moleculares empleadas actualmente por los laboratorios de diagnóstico clínico para identificar aislamientos, los cuales incluyen sondas de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos de hibridación de sonda de línea, espectroscopía de masas y secuenciación de DNA<sup>45</sup>.

### 3.2.8. Tratamiento

La enfermedad se puede tratar tomando varios medicamentos durante un periodo mínimo de 6 meses, el cual corresponde al tratamiento de antifímicos de primera línea, se utiliza una combinación de 4 fármacos: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB) tal como se indica en la tabla 5. Después de 2 meses de este tratamiento, se continúa con isoniazida y rifampicina por un periodo adicional de 4 meses.

Debido a esta larga terapia los pacientes se sienten incómodos por la carga de fármacos o sufren diversos efectos secundarios que provoca que abandonen el tratamiento antes de que culmine, produciendo la recaída de la infección y la aparición de micobacterias resistentes a estos fármacos, lo que resulta en un tratamiento más extenso (18-24 meses) utilizando otra clase de medicamentos menos efectivos y más tóxicos<sup>46</sup>.

Para pacientes con TB que hayan causado resistencia a los fármacos utilizados, se recomiendan antifímicos de tercera línea, los cuales presentan una mayor toxicidad y el tratamiento es más largo que para uno con multi-drogo resistente<sup>47</sup>. En la tabla 5 se enlistan los fármacos utilizados para tratar la TB, el mecanismo de acción y los efectos adversos.

Tabla 5. Clasificación de fármacos antituberculosos y sus efectos adversos

Clasificación	Fármacos	Mecanismo de acción	Reacciones Adversas	Características
<b>Primera línea</b>	Isoniazida (INH)	Inhibe la síntesis de ácidos micólicos	Hepatitis, hipersensibilidad	Se recomienda la combinación de 4 fármacos. Administración por 6 meses.
	Rifampicina (RIF)	Inhibe a la RNA polimerasa bacteriana	Hepatitis, neuritis periférica, insomnio	
	Pirazinamida (PZA)	Acidifica el citoplasma; inhibe la traducción	Hepatitis, hiperuricemia	
	Etambutol (EMB)	Inhibe la síntesis de arabinogalactanos	Neuritis óptica	
<b>Segunda línea</b>	Estreptomina (STM)	Inhibe síntesis de proteínas	Nefrotoxicidad	Constituida por aminoglucósido, fluoroquinolonas orales e inyectables. Tratamiento de 18-24 meses, consiste en una combinación de 4-6 fármacos.
	Kanamicina (KM)	Inhibe síntesis de proteínas	Ototoxicidad, nefrotoxicidad	
	Amikacina (AMK)	Inhibe síntesis de proteínas	Ototoxicidad, nefrotoxicidad	
	Capreomicina (CM)	Inhibe síntesis de proteínas	Ototoxicidad, nefrotoxicidad	
	Levofloxacino (LFX)	Inhibe la subunidad A de la DN-girasa	Tenosinovitis	
	Moxifloxacino (MFX)	Inhibe la replicación del DNA	Tenosinovitis	
	Etionamida (ETO)	Inhibe síntesis de ácidos micólicos	Gastroenteritis	
	Protionamida (PTO)	Inhibe síntesis de ácidos micólicos	Hepatitis	
	Linezolid (LZD)	Inhibe la síntesis de proteínas	Pancitopenia, polineuritis	
<b>Tercera línea</b>	Clofazimida (ZLC)	Inhibe el metabolismo energético	Enteritis, eosinofilia	Recomendados en pacientes XMDR-TB, tiempo de administración superior a los 24 meses
	Amoxicilina/Ácido Clavulánico (AMX/CLV)	Inhibe síntesis de peptidoglucano	Diarrea, vómito	
	Meropenem (IPM/CLN)	Interfiere en la síntesis de la pared celular	Alteraciones hematológicas	
	Claritromicina (CLR)	Inhibe la síntesis de proteínas	Insomnio, dolor de cabeza	

Tomada y editada de Chiu Chang<sup>47</sup>, Caminero<sup>48</sup> y Shanib.<sup>49</sup>

Es importante mencionar que, para tratar la TBL, se encuentran 4 principales antimicrobianos que consisten en monoterapia con isoniazida o rifampicina, isoniazida más rifampicina o isoniazida con rifapentina. La monoterapia con isoniazida durante 6 a 12 meses ha sido utilizada por décadas y su eficacia en prevenir la progresión a TB activa es aproximadamente del 90%. Sin embargo, su eficacia se ha visto obstaculizada por las bajas tasas de cumplimiento y finalización del tratamiento debido a su duración prolongada y al riesgo de hepatotoxicidad. Los regímenes más cortos basados en rifampicina tienen una eficacia similar y se utilizan cada vez más, ya que presentan mejores tasas de finalización del tratamiento y menor riesgo de hepatotoxicidad en comparación con la monoterapia con isoniazida. Es importante destacar que los estudios no han mostrado un mayor riesgo de desarrollar TB resistente a isoniazida o rifampicina después de recibir esquemas posológicos para TBL que contienen estos fármacos<sup>50</sup>.

### 3.2.9. Vacuna Bacilo de Calmette-Guérin (BCG)

Esta vacuna se utiliza ampliamente para prevenir formas graves de TB extrapulmonar. Sin embargo, la BCG no previene la TB pulmonar que es la forma más común de la enfermedad a cualquier edad. BCG es una cepa atenuada de *M. bovis*, el agente etiológico de la TB en ganado. Aunque se tolera bien, puede diseminarse en individuos inmunocomprometidos, especialmente en persona infectadas por el VIH<sup>51</sup>.

Múltiples estudios han demostrado que la vacunación de lactantes con BCG es eficaz para prevenir formas graves de TB en niños. Se ha demostrado que la BCG protege a los lactantes y niños pequeños, hasta aproximadamente los 10 años, del desarrollo de TB pulmonar y extrapulmonar. Sin embargo, la mayoría de los casos de TBA pulmonar transmisible ocurren en adolescentes y adultos, en quienes la eficacia de la vacuna BCG es incierta<sup>41,52</sup>.

### 3.2.10. Nuevas alternativas

El surgimiento de cepas resistentes a uno o varios antibióticos, aunado a su toxicidad, ha propiciado que las investigaciones estén enfocadas a desarrollar nuevos compuestos de origen natural, semisintéticos o sintéticos.

Los productos naturales son los más ampliamente explotados en la industria farmacéutica ya que son una fuente valiosa de compuestos bioactivos. La gran biodiversidad de plantas sigue siendo una de las fuentes principales de productos naturales debido a un abundante contenido de metabolitos y vías comunes que pueden ser fácilmente manipuladas<sup>53</sup>.

### 3.3. Plantas como una alternativa antimicrobiana

#### 3.3.1. Uso de las plantas en la medicina tradicional

El uso de sustancias naturales de origen natural o vegetal en el tratamiento de diversas patologías, incluidas las de etiología infecciosa, constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, las plantas medicinales, como una alternativa para los casos de TB resistente, ya que el tratamiento es poco efectivo y muestra diversos efectos adversos<sup>8</sup>.

Globalmente las plantas producen más de cien productos naturales de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios, que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Esta diversidad tan rica resulta como parte de un proceso evolutivo para adquirir una mejor defensa frente a los ataques de microorganismos, insectos y animales<sup>8</sup>.

Estas sustancias se pueden dividir, básicamente, en dos grandes grupos: fitoanticipinas, que están presentes de forma constitutiva en las plantas y las fitoalexinas cuya presencia aumenta de forma considerable en respuesta a la invasión microbiana. La diferencia entre fitoalexinas y fitoanticipinas no está bien definida, ya que algunos compuestos pueden ser fitoanticipinas en unas plantas y fitoalexinas en otras. En el caso de que un metabolito constitutivo se produzca en grandes cantidades tras un ataque microbiano, su condición fitoalexina dependería de las concentraciones constitutivas fueran o no capaces de eliminar el agente infeccioso. La definición de fitoalexina y fitoanticipina se refiere a la actividad antimicrobiana *in vivo* de los compuestos evaluados<sup>54</sup>.

Otro acervo para la obtención de compuestos antimicrobianos son los productos semisintéticos, los cuales son fabricados por síntesis química utilizando como material de partida un producto natural, algunos ejemplos de antimicrobianos que se obtienen por semisíntesis son los macrólidos y las tetraciclinas. Otros compuestos son los sintéticos, los cuales se fabrican por rutas totalmente sintéticas por ejemplo los anfenicoles, la trimetoprima y los nitroimidazoles<sup>8</sup>.

El acervo natural de compuestos naturales es innumerable, hasta ahora se han aislado alrededor de 12,000 compuestos procedentes de plantas y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios.<sup>55</sup>

La OMS define a la medicina tradicional como la suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, sean explicables o no, utilizadas tanto en el mantener la salud como en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades físicas y mentales.

Históricamente la medicina tradicional es una parte importante y con frecuencia subestimada de los servicios de salud. La medicina tradicional se ha enfocado principalmente en mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades, en particular



enfermedades crónicas. En la mayoría de la población indígena con bajos recursos ha representado la única opción de prevención y curación de enfermedades. Esto debido principalmente al difícil acceso a las mismas y a la pobreza extrema en la que viven<sup>54</sup>.

En un estudio etnobotánico en San Francisco Tlaltenco, Tláhuac en la Ciudad de México se evidenció que la población usa frecuente las plantas medicinales para curar diversos padecimientos. Mostró que la *Artemisia ludoviciana* (estafiate), *Gnaphalium chartaceum* (gordolobo), *Cissus sicyoides* (tripa de judas), *Datura ferox* (chamico), *Heterotheca inuloides* (árnica) y el *Schinus molle* (pirul) son las más utilizadas<sup>56</sup>, tal como se indica en la figura 6.

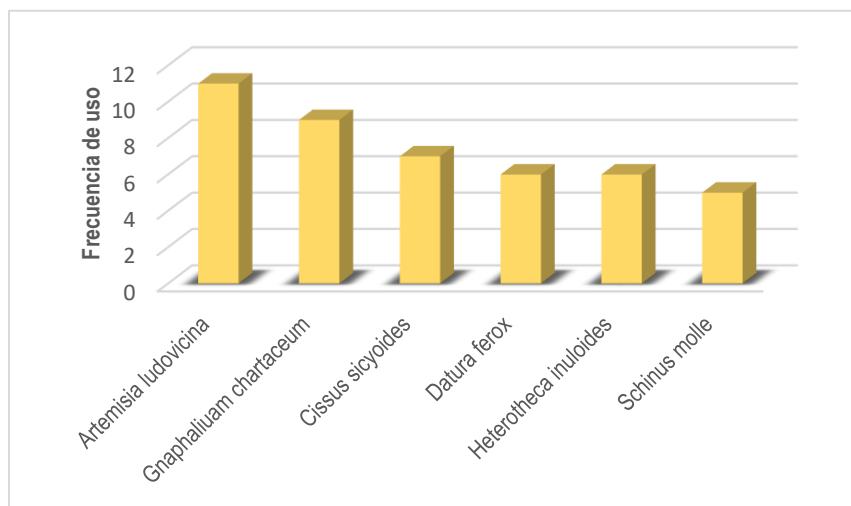


Figura 6. Frecuencia de uso de plantas medicinales de acuerdo con las entrevistas aplicadas en San Francisco Tlaltenco, Tláhuac, Ciudad de México. Modificado de Ortiz, P. et al. (2017). Plantas Medicinales de San Francisco Tlaltenco, Tláhuac, Ciudad de México. Universidad Autónoma Metropolitana<sup>83</sup>.

Es importante señalar que los síntomas más frecuentes que recurrentemente se tratan con plantas medicinales, es el dolor de estómago, inflamación, ojos irritados, tos, entre otros. De acuerdo con la clasificación de aparatos y sistemas propuestos por Aguilar et al. (1994), en la figura 7 se muestran los padecimientos en las que se utilizan un mayor número de especies de plantas: aparato digestivo (21%), traumatismos (14%), signos y síntomas (11%) y enfermedades oftalmológicas (10%)<sup>56</sup>.

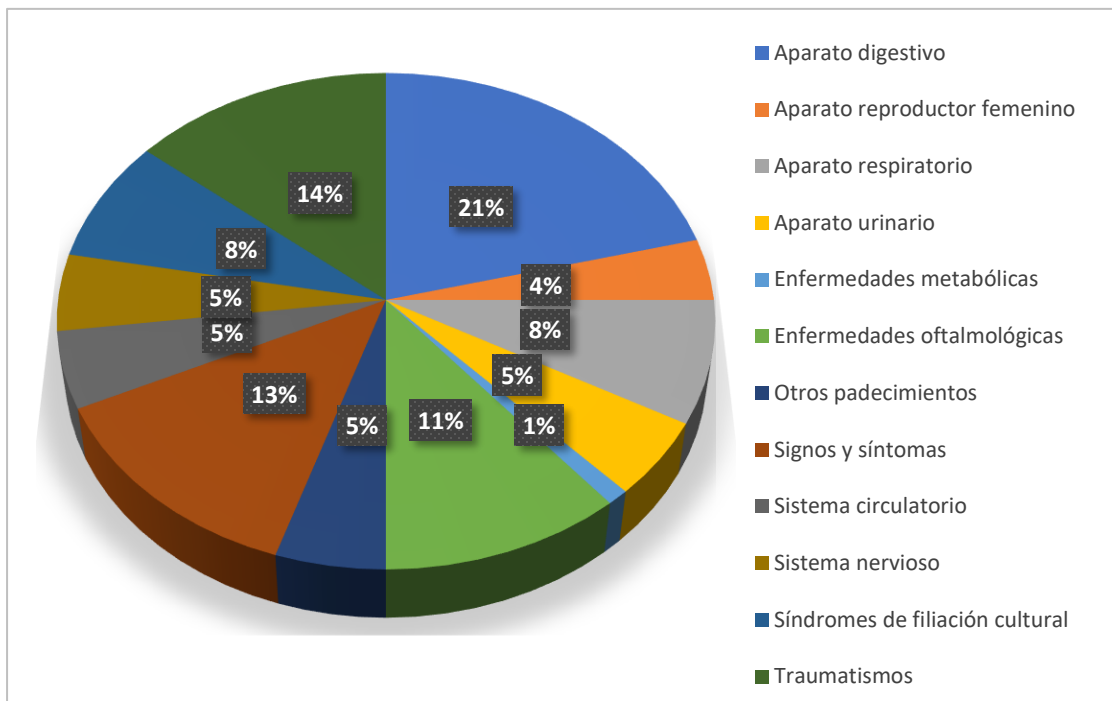


Figura 7. Porcentaje de plantas medicinales utilizadas en San Francisco Tlaltenco para la atención de enfermedades, esto de acuerdo con la clasificación de aparatos y sistemas. Modificado de Ortiz, P. et al. (2017). *Plantas Medicinales de San Francisco Tlaltenco*. *Plantas Medicinales de San Francisco Tlaltenco, Tláhuac, Ciudad de México. Universidad Autónoma Metropolitana*<sup>83</sup>.

#### 4. Procedimiento

Para describir la información antimicrobacteriana del ácido ursólico, el ácido oleanólico, la rutina y la quercetina, los mecanismos de acción y la farmacocinética y toxicidad de estas moléculas se realizó lo siguiente:

- Consulta en las bases de datos PubMed y Google académico para la búsqueda de artículos recientes relacionados al uso de plantas medicinales para tratar la TB.
- Consulta en las bases de datos PubMed y Google académico para la búsqueda de artículos recientes en los cuales se describa la actividad de compuestos puros obtenidos de plantas medicinales contra *M. tuberculosis*.

#### 5. Resultados y discusión

##### 5.1. *Chenopodium ambrosioides*

Es una planta herbácea, natural de América Central que crece hasta una altura alrededor de 100 cm. Las hojas son ovales y dentadas. Pertenece a la Familia Amaranthaceae. Su nombre común es epazote, es una planta empleada en la medicina tradicional, generalmente se utilizan las hojas en infusión (200g de hojas frescas en 500 mL de agua).<sup>54</sup> Se administra como remedio contra bronquitis, curar heridas, dolor muscular,

flujo vaginal, dolores estomacales y antiparasitario. El aceite posee actividad antibacteriana, antihelmíntica y antifúngica, además disminuye la motilidad gástrica y tiene actividades pasmolíticas<sup>57</sup>.



Figura 8. *Chenopodium ambrosioides*. Tomada de Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana<sup>84</sup>.

#### 5.1.2. Ensayos *in vitro* de actividad antimicobacteriana de los extractos de *C. ambrosioides*

De acuerdo con Jesús, R., 2018, se evaluó la actividad antimicobacteriana frente a *Mycobacterium avium* LR541CDC, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) y *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 700084). Para determinar la actividad bactericida de *C. ambrosioides*, se preparó el extracto crudo a una concentración de 275 mg/mL y se mezcló con un inóculo a una densidad ajustada de 0.5 en la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), se incubaron a 31°C y después de 24 horas se registró la CMI, la cual se definió como la concentración más baja de extracto que inhibió el crecimiento bacteriano.

Las suspensiones bacterianas se diluyeron con Middlebrook 7H9 (7H9), suplementado con 10% de ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa y 0.2% de glicerol, hasta la concentración de  $10^5$  UFC/mL. Los extractos y fracciones obtenidos se diluyeron con Dimetil Sulfoxido (DMSO) a una concentración de 500 mg/mL y el resto de las diluciones se realizaron en 7H9 hasta una concentración de 2500 µg/mL. Las cepas micobacterianas se incubaron con los extractos durante un periodo específico para: *M. smegmatis* se incubó durante 48 h, *M. avium* durante 5 días y *M. tuberculosis* durante 7 días a 37°C<sup>58</sup>. En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos, se observó que las CMI más bajas para todas las micobacterias, se obtuvieron en la fracción obtenida a

partir de cloroformo. Es importante resaltar que la fracción de cloroformo que presenta la mejor actividad contra *M. tuberculosis* permite identificar más fácilmente los compuestos químicos que le confieren dicha actividad.

Tabla 6. CMI de los extractos sobre cepas de *Mycobacterium*

Extracto y fracciones	<i>M. smegmatis</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>M. avium</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>M. tuberculosis</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Cloroformo</b>	312.50	625.00	156.25
<b>Acetato de etilo</b>	312.50	>2500.00	1250.00
<b>n-butanol</b>	625.00	>2500.00	1250.00
<b>Isoniazida</b>	0.78	0.78	<0.25
<b>DMSO</b>	0	0	0

Tomado de Jesus, R. S. et al. *In vitro* antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *C. ambrosioides* L. *Brazilian J. Microbiol.* **49**, 296–302 (2018)<sup>58</sup>.

### 5.1.3. Quercetina y rutina

La quercetina y la rutina son flavonoides que comúnmente se encuentran en vegetales y frutas como las cebollas, las manzanas y las bayas, hierbas, hojas, vino rojo, té, café, cerveza<sup>59</sup>. El extracto crudo y las fracciones de las hojas de *C. ambrosioides* poseen importantes compuestos como la rutina y la quercetina<sup>58</sup>.

### 5.1.4. Ensayo *in vitro* de actividad antimicrobiana de los compuestos puros obtenidos de *C. ambrosioides*.

De acuerdo con Sasikumar, K., 2018, se utilizó la cepa *M. tuberculosis* H37Rv para determinar la susceptibilidad, se utilizó PZA, el ciprofloxacino y la estreptomina (STM) como controles bactericidas<sup>59</sup>. La actividad antimicrobiana de la rutina y la quercetina sobre *M. tuberculosis* se determinó en medio líquido Middlebrook 7H9. Para ello, se diluyeron 50  $\mu\text{L}$  de quercetina, rutina, el PZA, ciprofloxacino y STM en DMSO y se realizaron varias diluciones hasta llegar a una concentración de 0.2  $\mu\text{g/mL}$ . Se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de reactivo Azul Alamar, se incubó por 24 horas a 37°C. La coloración azul en el medio se interpretó como no crecimiento, mientras que la coloración rosa se identificó como crecimiento. La CMI se definió como la concentración más baja del compuesto donde no se observó ningún cambio de color de azul a rosa, lo cual se interpretó como 100% de inhibición del crecimiento microbiano<sup>59</sup>. Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 7, y se observa que la CMI de la quercetina es similar a la STM, lo cual brinda indicios de que podría suplir a este antibiótico, ya que muestra actividad contra *M. tuberculosis*.

Tabla 7. Actividad antimicobacteriana de la quercetina y rutina

Cepa	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) µg/mL				
	Quercetina	Rutina	Pirazinamida	Ciprofloxacino	Estreptomina
<b><i>M. tuberculosis</i> H37Rv</b>	6.25	25	3.125	3.125	6.25

Tomado de Sasikumar, K., Ghosh, A. R. & Dusthacker, A. Antimycobacterial potentials of quercetin and rutin against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *3 Biotech* **8**, (2018)<sup>59</sup>.

También se determinó la actividad antimicrobiana de la quercetina y la rutina utilizando el ensayo de fagos reporteros de luciferasa (LRP, del inglés *Luciferase Reporter Phage*). Es un método basado en la identificación de micobacterias mediante la emisión de luz por luciferina, como respuesta a la infección de bacilos con fagos que tienen insertado el gen *flux*<sup>60</sup>. Los cultivos que mostraron más del 50% de reducción en las unidades de luz relativas (RLU, del inglés *Relative Light Units*) en comparación el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa control), se clasificaron como sensibles y los que mostraron menos del 50% se consideraron no sensibles; mientras que el potencial antimicobacteriano se determinó con el método de microdilución en medio de cultivo (BMD, del inglés *Broth-Micro-Dilution Method*).<sup>59</sup>

Para determinar el % de reducción de RLU se utilizó la siguiente expresión<sup>59</sup>:

$$\%Reducción\ de\ RLU = \frac{Control\ RLU - Prueba\ RLU}{Control\ RLU}$$

Para determinar el % de inhibición por BMD, se utilizó la siguiente expresión<sup>59</sup>:

$$\%Inhibición = 1 - \left[ \frac{Recuento\ de\ colonias\ de\ la\ muestra}{Recuento\ de\ colonias\ del\ control\ sin\ muestra} \right]$$

Los resultados se muestran en la tabla 8. En cuanto al ensayo LRP, se observa que tanto la rutina como la quercetina poseen un porcentaje superior a 50 en todas las concentraciones que se probaron (50, 100, 200 µg/mL). Se encontró que la inhibición máxima por quercetina es de 99.30±0.26%, mientras que la rutina mostró 90.40±0.685%, a 200 µg/mL de concentración.

En cuanto al BMD, ambos compuestos mostraron un porcentaje similar de inhibición alrededor de 56.21±0.97 para la quercetina, mientras que para la rutina fue de 56.10±0.67. Cabe mencionar que los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se expresaron como la media ± la desviación estándar.

Tabla 8. Actividad bactericida de rutina y quercetina sobre *M. tuberculosis* H37Rv

Flavonoides	% Inhibición de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv					
	Rutina			Quercetina		
Concentración (µg/mL)	50	100	200	50	100	200
Ensayo LRP	77.70±0.78	84.12±0.93	90.40±0.68	91.87±0.21	98.78±0.90	99.30±0.26
Método BMD	56.10±0.67	N. D	N. D	56.21±0.97	N. D	N. D

Tomado de Sasikumar, K., Ghosh, A. R. & Dusthacker, A. Antimycobacterial potentials of quercetin and rutin against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *3 Biotech* **8**, (2018)<sup>59</sup>. N.D = No determinado.

#### 5.1.5. Mecanismo de acción de la rutina y quercetina

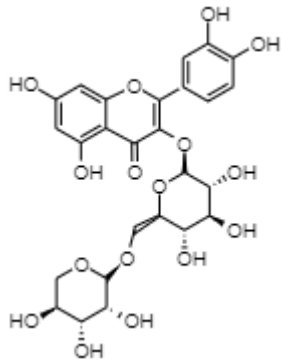
Los flavonoides son un grupo de sustancias polifenólicas de bajo peso molecular, su estructura química se basa en el esqueleto del C6-C3-C6. La quercetina<sup>61</sup> y la rutina<sup>62</sup> pertenecen al subgrupo de los flavonoles (figura 9).<sup>63</sup>

Se ha investigado la correlación entre las propiedades antimicrobianas y la interacción de los liposomas de diferentes flavonoides. Se han utilizado modelos liposomales para investigar el mecanismo antibacteriano de los flavonoides contra *Escherichia coli*. Se ha demostrado que existe alteración de las células bacterianas por la interacción del grupo de la cabeza polar de la membrana modelo.<sup>63</sup>

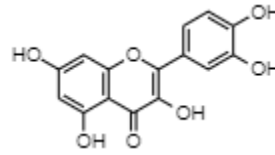
En otro estudio se demostró que las plantas que poseen niveles altos de flavonoides pueden alterar la superficie bacteriana.<sup>63</sup> Se ha reportado que el modo de acción antimicrobiano de los compuestos fenólicos como la rutina y la quercetina aumentan la permeabilidad y desestabilizan la membrana bacteriana, lo que resulta en la alteración de la fuerza protón-motriz, el flujo de electrones y la fuga del contenido celular lo que provoca lisis bacteriana.<sup>58</sup> Los fenoles actúan desnaturalizando proteínas y alterando las membranas celulares, por lo tanto, son agentes micobactericidas.<sup>57</sup>

También se ha demostrado que ambos compuestos inhiben la actividad de la enzima glutamato racemasa, que está involucrada en la síntesis de PG, afectando la síntesis de la pared celular de *M. tuberculosis*<sup>64</sup>.

Además, se ha demostrado que la rutina disminuye la formación de biopelículas generadas por *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Esto es un hallazgo importante, ya que se ha demostrado que *M. tuberculosis* forma biopelículas y está aparentemente relacionado con la resistencia a los antibióticos y el desarrollo de la enfermedad.



Rutina



Quercetina

Figura 9. Estructura química de los compuestos rutina y quercetina.

## 5.2. *Lantana hispida*

Su nombre común es morita negra u orégano de monte; es un arbusto de 100 a 200 cm de altura, posee hojas arrugadas y redondas. Originaria de México, presente en clima cálido y semicálido. Asociada a vegetación perturbada de bosque tropical subperennifolio, matorral xerófilo, bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino. Se ha indicado su uso para aliviar el dolor de estómago, otros trastornos digestivos como diarrea, disentería, vómito por indigestión; a su vez está asociada para tratamiento de problemas respiratorios, dolor de riñones o de muelas e inclusive dolor por torceduras<sup>65</sup>.



Figura 10. *Lantana hispida*. Tomada de Biblioteca Digital de Medicina Tradicional<sup>85</sup>

### 5.2.1. Ensayos de actividad antimicobacteriana de compuestos puros obtenidos de *L. hispida*

Dentro de los compuestos activos más abundantes de *L. hispida* se encuentran el ácido oleanólico (AO) y su isómero, el ácido ursólico (AU). Para evidenciar su efecto contra la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y contra cepas resistentes INH, EM, RIF o STR. Las cepas se cultivaron en medio 7H9 suplementado con 0.2% glicerol con 10% ácido oleico, dextrosa y catalasa (OADC) y se incubaron por 7 días a 37 C. Se demostró que AU y AO tienen actividad micobactericida y además presentan actividad sinérgica. Esto se determinó utilizando el ensayo de la resazurina en microplaca y se reportó como CMI, definida como la concentración más baja que evita el cambio de color (azul a rosa)<sup>65</sup>. En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos.

El AU mostró una CMI de 25 µg/mL y el AO de 50 µg/mL para *M. tuberculosis* H37Ra, mientras que la cepa STR-resistente mostró una CMI de 12.5 µg/mL. La mezcla de ambos compuestos también muestra efecto bactericida sobre todas las cepas<sup>65</sup>.

Por otro lado, se determinó la citotoxicidad de AU y AO sobre la línea celular de macrófagos de ratón (J774A.1) y se mostró que estos compuestos son tóxicos a concentraciones superiores a 20 µg/mL<sup>65</sup>.

Con base en los resultados obtenidos, se evaluó la actividad bactericida de ambos compuestos en un modelo de infección en macrófagos (J774A.1) infectados con sobre *Mycobacterium* /H37Rv y las cepas resistentes a los fármacos. Se utilizaron dos concentraciones por debajo de esta concentración para el tratamiento de macrófagos: la primera fue 1/4 de la CMI y la segunda 1/40 de la CMI de cada compuesto. En la figura 11 se observa que a una concentración alta (1/4 de la CMI) con ambas cepas de *Mycobacterium* hubo una reducción de las unidades formadoras de colonias UFC, estadísticamente significativas después del tratamiento con AU y AO, pero cuando se agregaron ambos compuestos se observó una mayor eliminación de bacilos, inclusive, con una concentración más baja (1/40 de la CMI) hubo un efecto sinérgico antimicobacteriano tanto para el AO como para el AU (ver figura 11).



Tabla 9. Actividad antimicobacteriana de AU y AO

Cepa de <i>M. tuberculosis</i>	Concentración Mínima Inhibitoria ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	AU	AO	AU/AO
H37Rv	25	50	12.5
INH-Resistente	25	25	25
RIF-Resistente	25	25	25
EMB-Resistente	25	25	25
STR-Resistente	12.5	50	25

H37Rv: sensible a INH (isoniazida), RIF (rifamicina), EMB (embutamol), STR (estreptomina). Tomado y modificado de Jiménez-Arellanes, A. et al. 2013. Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Complement. Altern. Med.* **13**, (2013)<sup>65</sup>.

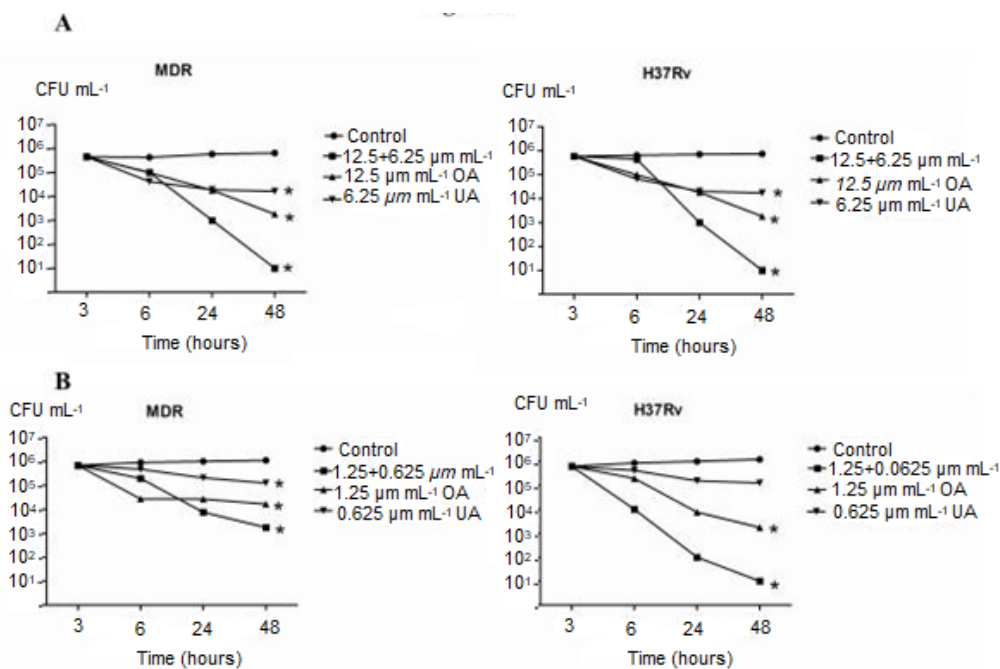


Figura 11. Actividad bactericida de AU, AO y su combinación sobre cepas de *Mycobacterium* en un modelo de infección en macrófagos de ratón. Los macrófagos (J774A.1) se infectaron con la cepa H37Rv o MDR y se adicionaron los compuestos a una concentración superior (A) e inferior (B). Después de 3, 6, 24 y 48 h de incubación, los macrófagos se lisaron y se determinaron las UFC. Se hizo una comparación de las UFC con las células control (no tratadas), y con las células con los compuestos juntos o por separado. \* $P < 0,001$ . H37Rv (*M. tuberculosis* H37Rv) MDR (aislado clínico MDR por sus siglas del inglés Multidrug Resistance= multifarmacorresistente). Tomado de Jiménez-Arellanes, A. et al. 2013<sup>65</sup>.

### 5.2.2. Ácido oleanólico (AO) y ácido ursólico (AU)

El AO y su isómero, el AU, son compuestos triterpenoides que se encuentran ampliamente en la naturaleza en forma de ácido libre o como precursores de aglicona para las saponinas triterpenoides. Han mostrado actividades farmacológicas similares, como efectos hepatoprotectores, antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenos<sup>65</sup>.

El AO (ácido-3- $\beta$ -hidroxioleano-12-en-28-oico) es un triterpenoide pentacíclico con una presencia generalizadas en todo el reino vegetal. El AO extraído de *L. hispida* presenta actividad antimicobacteriana, que se registra en la tabla 9<sup>65</sup>.

El AU (ácido-3- $\beta$ -hidroxiurs-12-en-28-oico) es un compuesto triterpenoide pentacíclico que presenta una distribución más restringida en comparación el AO. Este compuesto se ha encontrado en grandes cantidades en las bayas (como los arándanos) y principalmente en la piel<sup>65</sup>.

### 5.2.3. Mecanismo de acción de AO y AU.

La pared celular de las micobacterias está conformada por una bicapa rica en lípidos compuesta de ácidos micólicos. Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga de alto peso molecular. En general, esta molécula es blanco para el desarrollo de nuevos fármacos anti-TB. Se ha propuesto que los triterpenos pueden inhibir el crecimiento de las micobacterias, su capacidad hidrofóbica les permite penetrar la pared bacteriana<sup>66</sup>. El AU es insoluble en agua, tiene gran lipofilidad. Se ha propuesto que la lipofilidad del AU aumenta su biodisponibilidad en las micobacterias por el contenido rico en lípidos de su pared. Por lo tanto, es posible que el AU interactúe con los ácidos micólicos rompiendo sus enlaces y así penetrar hasta el citoplasma micobacteriano e inhibir la biosíntesis de macromoléculas necesarias para su supervivencia<sup>66</sup>.

En un estudio realizado para determinar la acción bactericida del AU sobre *M. tuberculosis*, se mostro en un análisis de microscopía electrónica de transmisión que dicho compuesto actúa sobre los PG de la pared celular. Se comparó con el control no tratado y uno tratado con INH. En la figura 12 se muestra que el tratamiento con INH altera la pared celular a intervalos regulares, mientras que el tratamiento con AU induce la separación de la pared celular del cuerpo bacilar, también se pueden observar varias partes oscurecidas, que se consideraron como la condensación de los ácidos nucleicos y materiales proteicos debido a la salida del AU del citoplasma. Con base en lo anterior se espera un mecanismo de acción similar para al AO ya que es el isómero del AU <sup>66</sup>.

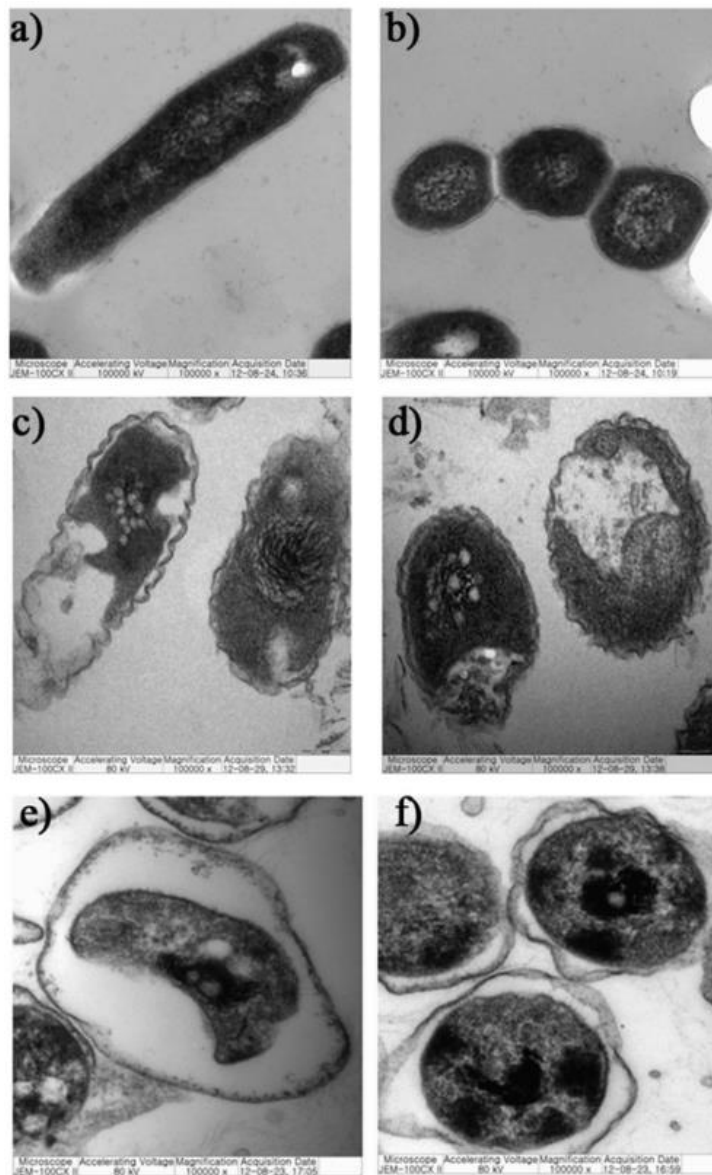


Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión de *M. tuberculosis* H37Rv no tratada (a,b), tratada con INH (c,d) y tratada con AU (e,f). Tomado de Jyoti, M. A. et al. *In vitro* effect of ursolic acid on the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* and its cell wall mycolic acid. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **33**, 17–24 (2015)<sup>66</sup>.

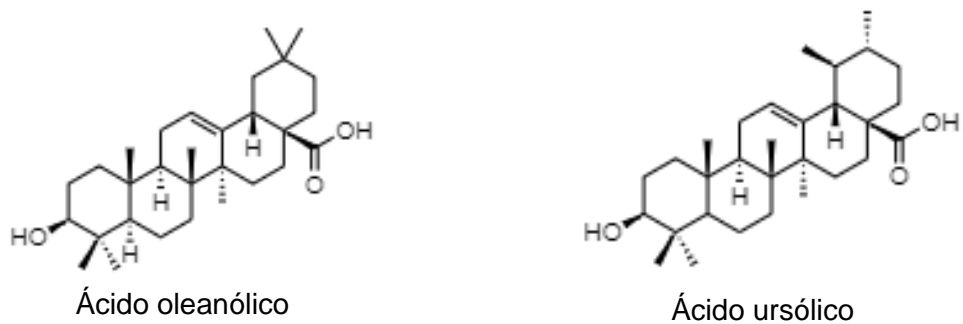


Figura 13. Estructura química del ácido ursólico y el ácido oleanólico.

### 5.3. Estudios *in vivo*, farmacocinética y toxicidad de los compuestos naturales con actividad antimicobacteriana

Para determinar el potencial de los compuestos descritos contra la TB, se deben discutir los aspectos relacionados con la toxicidad la farmacocinética y los estudios *in vivo* que se han realizado, de tal manera que se pueda elucidar la viabilidad del desarrollo de fármacos utilizando compuestos obtenidos de plantas medicinales para poder tratar esta enfermedad.

En cuanto a los compuestos presentes en *C. ambrosioides*, un estudio *in vivo* en cobayos demostró que el tratamiento con quercetina disminuye significativamente el número de *Helicobacter pylori* en el antro y mucosa del estómago (89% y 92% respectivamente). Los cobayos infectados con *H. pylori* se les administró 100 mg/kg de quercetina vía oral cada 12 horas por 15 días y se comparó con un control sin tratamiento. También se reportó que la terapia triple con omeprazol, metronidazol y claritromicina resulta en la erradicación completa de *H. pylori* en la mucosa gástrica en ratones. La comparación de esta terapia triple con quercetina en cobayos infectados con *H. pylori* sugiere actividad similar contra este patógeno<sup>67</sup>. Aunque actualmente no se tiene mucha información con respecto a estudios *in vivo* sobre la efectividad de la quercetina para el tratamiento de la TB, los ensayos *in vitro* y la información presentada, brindan indicios de que la quercetina tiene potencial para su uso como fármaco antimicrobiano.

La quercetina es un compuesto lipofílico, por lo que puede atravesar las membranas intestinales por difusión simple, y, teóricamente, puede llegar al intestino sin degradarse.<sup>68</sup> Sin embargo, se ha demostrado que la quercetina es escasamente utilizada en la industria farmacéutica debido a su baja biodisponibilidad, poca solubilidad en agua e inestabilidad, por lo que se han realizado varios estudios con la finalidad de modificar la estructura del compuesto para aumentar la solubilidad y la biodisponibilidad, y así aumentar su actividad antimicrobiana en humanos<sup>69</sup>.

En los últimos años, han aparecido nuevas preparaciones de quercetina, que incluyen gel cargado de quercetina, nanoemulsión mucoadhesiva cargada de quercetina, nanopartículas cargadas de quercetina y micelas poliméricas cargadas con quercetina, las cuales pueden proporcionar nuevas formulaciones de fármacos para la investigación y desarrollo. La biodisponibilidad de la quercetina se ha aumentado mediante la modificación estructural con conjugados glucósido-sulfato y la preparación de algunos complejos iónicos como las nanopartículas de quercetina-germanio, el nanocomplejo de fosfato cálcico-quercetina.<sup>69</sup>

En cuanto a la toxicidad de la quercetina, se sabe que es un agente mutagénico en bacterias según la prueba de Ames, la cual consiste en evaluar la mutagenicidad en cepas de *Salmonella*, es un procedimiento rápido y sencillo<sup>70</sup>. También existen varios

estudios en animales que han demostrado que la quercetina es un compuesto seguro sin efectos cancerígenos.

En un ensayo clínico fase 3 que se realizó para determinar si la suplementación con quercetina ayuda a disminuir la presión arterial, se evidenció que 1000 mg de este compuesto administrado por 28 días es seguro y bien tolerado en humanos y hasta ahora no se ha encontrado evidencia de toxicidad.<sup>69,71</sup>

Por otro lado, la rutina posee actividades farmacológicas significativas, que incluyen actividad antioxidante, anti-inflamatorio, anti-diabético, anti-adipogénico y neuroprotector. En un modelo de mastitis por infección de *Staphylococcus xylosus* en ratones, se mostró que una dosis de 2 mg/kg atenúa el efecto dañino de *S. xylosus* en el tejido mamario. La estructura y la morfología de las células epiteliales afectadas se restauraron por completo y la inflamación y el sangrado se redujeron. Además se demostró que 0.8 mg/mL de rutina disminuye la formación de biopelículas, reduciendo eficazmente el daño del tejido mamario causado por la infección por *S. xylosus*, lo que sugiere la actividad antimicrobiana *in vivo* de la rutina<sup>72</sup>.

Se han registrado el uso terapéutico de 130 preparados medicinales que contienen rutina en sus formulaciones<sup>73</sup>. A pesar de ello, el metabolismo de la rutina no es completamente conocido. La rutina es un flavonol glucósido, que puede hidrolizarse por la microbiota del aparato digestivo antes de ser absorbido. Se ha descrito que la rutina se absorbe más lentamente que la quercetina.<sup>73</sup>

Como ya se mencionó anteriormente, la biodisponibilidad de la rutina es baja, alrededor del 20%, la principal razón es la baja solubilidad en agua (0.8 mg/mL), otra posible razón es que se absorbe después de que se hidroliza en quercetina. Los enfoques comunes utilizados para aumentar la biodisponibilidad de la rutina son la disminución de partículas al rango de la submicrónico y acomplejar la rutina con ciclodextrinas y varios metales pesados. Además, se han desarrollado varios sistemas portadores para el suministro de rutina, tales como microemulsiones, nanoemulsiones, nanocristales y nanosuspensiones<sup>74</sup>.

Las ciclodextrinas son conocidas por su capacidad para formar complejos de inclusión con muchas moléculas huésped de tamaño adecuado debido a la estructura molecular única con cavidad hidrófoba y caras externas hidrófilas, que aumenta la biodisponibilidad de fármacos poco solubles al mejorar su solubilidad en agua y actúa como fuerza impulsora para su difusión a través de la membrana biológica. El complejo de rutina con ciclodextrina aumenta la biodisponibilidad oral de rutina en el Tracto Gastrointestinal (TGI), esto debido a que aumenta la solubilidad, el rango de disolución es más rápido y aumenta la estabilidad.<sup>74</sup>

Otra opción para su biodisponibilidad son los fitosomas, que son complejos moleculares anfifílicos, en el que las moléculas bioactivas se complejan con fosfolípidos, dando como resultado la formación de aductos supramoleculares que tienen una estequiometría definida. La ventaja de los fitosomas sobre otras formulaciones es que aumenta la absorción gastrointestinal tras la administración oral, al incrementar la velocidad y el grado de solubilización de bioactivos en fluidos intestinales acuosos, aumentando así la capacidad de cruzar las membranas ricas en lípidos y la solubilidad de la rutina de 2.88 a 45.71  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>74</sup>

En cuanto a los compuestos que se obtienen a partir de *L. hispidus*, se tiene al AO, el cual se encuentra disponible comercialmente y se ha utilizado en la práctica clínica como terapia para la hepatitis. A pesar de sus prometedoras propiedades biológicas, el AO se absorbe muy poco en el TGI después de la administración oral. Se ha reportado que la biodisponibilidad absoluta es sólo del 0.7%, esto se debe a baja solubilidad en agua (4.61 mg/L a 20°C) y la permeabilidad que presenta es de 1.1-1.3x10<sup>-6</sup> cm/s<sup>75</sup>.

Por lo anterior, se buscan alternativas para incrementar la solubilidad del AO en agua, algunos de los métodos propuestos son la preparación de una dispersión sólida, el uso de ciclodextrinas, así como diferentes formas cristalinas de AO obtenidas por secado por atomización. Aunque la solubilidad se ha logrado aumentar utilizando los métodos que se mencionan, la permeabilidad es baja<sup>75</sup>.

A fin de aumentar la solubilidad y la permeabilidad, se han utilizado fosfolípidos (FL) y acarreadores<sup>75</sup>. Los FL son surfactantes biocompatibles con alta solubilidad en agua y en medio oleoso, además son componentes importantes de las membranas celulares, lo cual los hace altamente compatibles con la fisiología humana y también pueden penetrar las membranas celulares<sup>75</sup>.

Debido a que el complejo FL-AO resulta ser viscoso, ocasiona una desventaja, por lo que se necesita de un acarreador para solidificar al FL, esto, para disminuir la viscosidad y así favorecer los procesos de disolución e industrialización. Debido a lo anterior la elección óptima es la hidroxiapatita (HA) ya que muestra varias ventajas, tales como buena fluidez, una gran superficie de contacto, químicamente inerte y altamente biocompatible. Se demostró que el complejo FL-AO aumenta la biodisponibilidad a un valor de 139.1% y el complejo CFLAOHA (complejo fosfolípido-ácido oleanólico-hidroxiapatita) aumenta la viscosidad.<sup>75</sup>

En cuanto a la toxicidad del AO, es relativamente no tóxico. Una dosis de AO por vía subcutánea (1.0 g/kg) en ratón y rata no mostró mortalidad en un periodo de 5 días. Durante la administración múltiple de AO (189 mg/kg) por 10 días, no se registraron anomalías en cerebro, corazón, pulmón, hígado, riñón, tiroides, estómago e intestino. Debido a su eficacia y aparentemente bajos efectos adversos, OA ha sido patentado en países para el uso en aditivos para bebidas, ya que el AO ha demostrado

ser benéfico para la salud, ya que inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans* en la cavidad bucal y también se ha encontrado que su ingesta puede promover la curación de lesiones gástricas crónicas inducidas por ácido acético en ratas<sup>76,77</sup>. Por último, se menciona otro compuesto obtenido de *L. hispida* que es el AU. Este compuesto presenta problemas debido a su baja solubilidad en agua. Algunos estudios han mostrado que los liposomas son sistemas de administración de fármacos biodegradables y pueden superar eficazmente la escasa solubilidad de un fármaco, aumentar la eficacia terapéutica y reducir los efectos adversos. Actualmente, varias formulaciones liposomales han sido aprobadas por la administración de medicamentos y alimentos (FDA, siglas del inglés *Food and Drug Administration*). Por lo que, liposomas de AU (LAU) se han desarrollado exitosamente para superar la baja solubilidad en agua. El AU se ha considerado por mucho tiempo como un fármaco potencialmente valioso. Sin embargo, LAU tiene más ventajas en comparación con AU debido a sus características que incluyen una solubilidad y biodisponibilidad en agua, características de focalización pasiva y baja toxicidad<sup>78</sup>.

En un estudio encargado de dilucidar la dosis máxima tolerada (DMT), la dosis límite tóxica (DLT), y otras toxicidades, en voluntarios sanos y pacientes con tumores sólidos avanzados. Se ha reportado que el AU puede inhibir la invasión y metástasis de los tumores, también puede inhibir la angiogénesis, inducir la diferenciación de células tumorales e inducir la apoptosis de células tumorales. También se demostró que la administración de LAU durante 3 años es segura para sujetos con una infusión intravenosa a 4 horas. La DMT fue de 98 mg/m<sup>2</sup> y la DLT mostró hepatotoxicidad y diarrea. La administración de dosis múltiple de LAU se recomienda a una concentración de 56.74 y 98 mg/m<sup>2</sup>. Existe una relación lineal entre la concentración máxima ( $C_{max}$ ), y el área bajo la curva, sugiriendo que LAU sigue un perfil farmacocinético lineal<sup>78</sup>.

Otro estudio realizado en ratas, brinda información acerca de que la administración diaria vía oral del AU por 13 semanas consecutivas es bien tolerado y no produce efectos en el peso, ingesta de comida, condiciones clínicas (incluyendo neurotoxicidad), hematología, coagulación, química sanguínea hasta niveles de 1000 mg/kg al día de AU.<sup>79</sup>

Aunado a lo anterior, de acuerdo con un estudio realizado, los triterpéneos AU y AO son potentes inmunomoduladores de macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. Estos compuestos activan a los macrófagos infectados exhibiendo un fenotipo similar a M2 (macrófagos activados alternativamente) caracterizado por baja expresión de TNF- $\alpha$ , alta expresión de TGF- $\beta$  y baja producción de ERO y ERN. Después del tratamiento con AU y AO, los macrófagos infectados exhibieron un fenotipo similar a M1 (macrófagos activados clásicamente) caracterizado por una producción alta y sostenida de TNF- $\alpha$ , baja producción de TGF- $\beta$ , alta producción de ERO y ON y fueron capaces de controlar y eliminar las micobacterias intracelulares<sup>80</sup>.

Así también, un estudio conducido en ratones siguiendo un modelo experimental de TB pulmonar progresiva, los ratones fueron infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. Como tratamiento, se administraron 5 mg/kg de AU y AO durante 60 días, disuelto en 100  $\mu$ L de aceite de olivo como vehículo. El grupo control correspondió a animales infectados con TB que recibieron únicamente el vehículo. Los resultados mostraron que los ratones tratados con AU y AO disminuyeron significativamente el número de bacilos vivos en los pulmones después de uno y dos meses<sup>65</sup>. En la figura 14 se puede observar que la letra A indica que a partir de 60 días de la administración de AU/AO la infección disminuyó la carga bacteriana pulmonar en comparación con el control (barras negras). En la letra B, los ratones tratados con AU/AO en los días 30 y 60 después del tratamiento mostraron una menor área de neumonía que el grupo control.

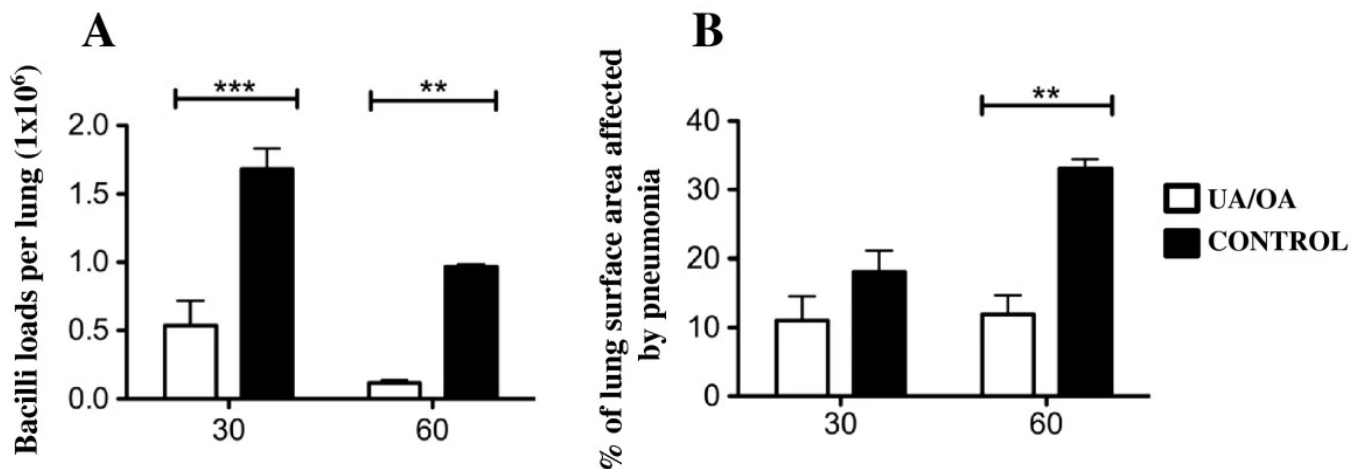


Figura 14. Efecto del tratamiento combinado con AU y AO en ratones infectados con TB. Tomado de Jiménez-Arellanes, A. et al. Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, (2013)<sup>65</sup>



## 6. Conclusión

Como se mencionó, todos los compuestos que se han propuesto como tratamientos para la TB, presentan problemas relacionados con la biodisponibilidad, esto debido a la baja solubilidad en agua que poseen; sin embargo, también se han expuesto las posibilidades en cuanto a las formas farmacéuticas para solucionar dichas problemáticas, de tal manera que estos compuestos presentan potencial para tratar la tuberculosis. En cuanto a la toxicidad, los compuestos son viables, ya que la mayoría de estos, se encuentran en el mercado actualmente lo que brinda indicios de la seguridad.

La TB es una enfermedad que debe seguir en investigación, debido a que es un problema de salud pública que afecta a millones de personas a nivel mundial. Los compuestos obtenidos de plantas medicinales muestran un futuro prometedor para el tratamiento de la TB y su erradicación. Basados en la información desarrollada, se puede decir que el AU, el AO, la rutina y la quercetina, tienen potencial terapéutico para tratar la TB, ya que muestran efecto bactericida contra *M. tuberculosis in vitro* e *in vivo*, e incluso se han llegado a describir los mecanismos por los cuales actúan, dejando evidencia suficiente para explotar su factibilidad farmacéutica como antibiótico.

Por otra parte, se encuentran los compuestos que presentan actividad antibacteriana contra *S.aureus*, *E.coli*, *S. xylosus* y *H. pylori*. Estos compuestos deben ser estudiados sobre cepas de *M. tuberculosis* para poder establecer su potencial para el tratamiento de TB y de ser posible, establecer un mecanismo de acción.

## 7. Referencias

1. World Health Organization. Tuberculosis. [Internet]. 2021. [Consultado: 20 ago 21]. Disponible en: <https://www.bibguru.com/es/g/cita-vancouver-pagina-web/>
2. Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., Martini, M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J. Prev. Med. Hyg.* **58**, E9–E12 (2017).
3. World Health Organization. Tuberculosis and Diabetes. [Internet]. 2016. [Consultado: 20 oct 21]. Disponible en <http://www.who.int/tb/publications/tb-diabetes-framework/en/>.
4. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. (2020).
5. Organización Panamericana de la Salud. Tuberculosis en las Américas. Informe Regional 2019. [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52815/9789275322741\\_spa.pdf?sequence=8&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52815/9789275322741_spa.pdf?sequence=8&isAllowed=y) (2020).
6. Secretaría de Salud. Dirección de Micobacteriosis. Casos nuevos de Tuberculosis Pulmonar Estados Unidos Mexicanos 1990-2017. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/331814/Casos\\_nuevos\\_de\\_Tuberculosis\\_Pulmonar\\_Estados\\_Unidos\\_Mexicanos\\_1990-2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/331814/Casos_nuevos_de_Tuberculosis_Pulmonar_Estados_Unidos_Mexicanos_1990-2017.pdf) (2018).
7. Secretaría de Salud. Micobacteriosis: Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las (Tuberculosis y Lepra). [https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/18\\_Manual\\_Micobacteriosis.pdf](https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/18_Manual_Micobacteriosis.pdf) (2019).
8. Fabricant, D. S. & Farnsworth, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* **109**, 69–75 (2001).
9. Yruela, I., Contreras, B., Magalhaes, C., Osorio, N., Gonzalo-Asensio, J. Mycobacterium tuberculosis Complex Exhibits Lineage-Specific Variations Affecting Protein Ductility and Epitope Recognition. *Genome Biol. Evol.* **8**, 3751–3764 (2016).
10. CDC. *Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinical Should Know.* (2013).
11. Chinta, K. C. *et al.* The Emerging Role of Gasotransmitters in the Pathogenesis of Tuberculosis. *Nitric Oxide* **59**, 28 (2016).
12. Chai, Q., Zhang, Y. & Liu, C. H. Mycobacterium tuberculosis: An Adaptable Pathogen Associated With Multiple Human Diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **0**, 158 (2018).
13. Mathema, B., Andrews, J., Cohen, T., *et al.* Drivers of Tuberculosis Transmission. *J. Infect. Dis.* **216**, S644–S653 (2017).
14. Korb, V. C., Chuturgoon, A. A. & Moodley, D. Mycobacterium tuberculosis:

- Manipulator of Protective Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
15. Abraham, R. *et al.* The Role of Dendritic Cells in TB and HIV Infection. *J. Clin. Med.* **2020**, Vol. **9**, Page **2661** **9**, 2661 (2020).
  16. Yan, Y. *et al.* CCL19 and CCR7 Expression, Signaling Pathways, and Adjuvant Functions in Viral Infection and Prevention. *Front. Cell Dev. Biol.* **0**, 212 (2019).
  17. Scott, H., Chan, J., Flynn, J. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 467–477 (2003).
  18. Russell, D. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 39–47 (2007).
  19. Tsai, M., Chakravarty, S., Zhu, G., *et al.* Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell. Microbiol.* **8**, 218–232 (2006).
  20. Barrera, L. & Malbran, C. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Parte II Cultivo. *Organ. Panam. la Salud* (2008).
  21. Pfyffer, G. E. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. *Man. Clin. Microbiol.* 536–569 (2015)  
doi:10.1128/9781555817381.CH30.
  22. Brennan, J. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infect. Dis.* **11 Suppl 2**, S420–S430 (1989).
  23. Maitra, A., Munshi, T., Healy, J., *et al.* Cell wall peptidoglycan in Mycobacterium tuberculosis: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiol. Rev.* **43**, 548–575 (2019).
  24. Kato, M. Mechanism of action of cord factor (trehalose-6, 6'-dimycolate) of mycobacterium tuberculosis. *Kekkaku(Tuberculosis)* **47**, 93–101 (1972).
  25. Thoen, C. O., Steele, J. H. & Gilsdorf, M. J. *Mycobacterium Bovis Infection in Animals and Humans: Second Edition. Mycobacterium Bovis Infection in Animals and Humans: Second Edition* (Blackwell Publishing Ltd, 2008).  
doi:10.1002/9780470344538.
  26. Hunter, R., Olsen, M., Jagannath, C. & Actor, J. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17127724/> (2006).
  27. Facultad de Ciencias Químicas. Biología de las micobacterias. [Internet]. [Consultado: 20 oct 21]. Disponible en:  
[http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/DOCENCIA/MATERIAL-DE-ESTUDIO/micobacterias/biologia/biologia de las micobacterias.html](http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/DOCENCIA/MATERIAL-DE-ESTUDIO/micobacterias/biologia/biologia%20de%20las%20micobacterias.html).
  28. Oliver, W. T. & Wells, J. E. Lysozyme as an alternative to growth promoting

- antibiotics in swine production. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2015 61 **6**, 1–7 (2015).
29. Regland, S., Criss, A. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog.* **13**, (2017).
  30. Singh, P., Rameshwaram, N. R., Ghosh, S. & Mukhopadhyay, S. Cell envelope lipids in the pathophysiology of Mycobacterium tuberculosis. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0135> **13**, 689–710 (2018).
  31. Rao, N. & Meena, L. S. Biosynthesis and Virulent Behavior of Lipids Produced by Mycobacterium tuberculosis: LAM and Cord Factor: An Overview. *Res. Biotechnol. Res. Int.* **2011**, (2011).
  32. Asano, M., Nakane, A. & Minagawa, T. Endogenous gamma interferon is essential in granuloma formation induced by glycolipid-containing mycolic acid in mice. *Infect. Immun.* **61**, 2872–2878 (1993).
  33. Actor, J. K. *et al.* Cytokine mRNA expression and serum cortisol evaluation during murine lung inflammation induced by Mycobacterium tuberculosis. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **3**, 343–351 (2000).
  34. Caracena, R., Gordo MI, P., Rey N, M., Ruiz, V. & Carballo, B. Tuberculosis pulmonar. *Hosp. Univ. Madrid* (2010).
  35. Queiroz, A., Riley, L. Bacterial immunostat: Mycobacterium tuberculosis lipids and their role in the host immune response. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **50**, 9–18 (2017).
  36. Echeverria-Valencia, G., Flores-Villalva, S. & I.Espitia, C. Virulence Factors and Pathogenicity of Mycobacterium. *Mycobacterium - Res. Dev.* (2017) doi:10.5772/INTECHOPEN.72027.
  37. Zhai, W., Wu, F., Zhang, Y., Fu, Y. & Liu, Z. The Immune Escape Mechanisms of Mycobacterium Tuberculosis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
  38. Esteban, J. & García-Coca, M. Mycobacterium Biofilms. *Front. Microbiol.* **0**, 2651 (2018).
  39. Basaraba, R. J. & Ojha, A. K. Mycobacterial Biofilms: Revisiting Tuberculosis Bacilli in Extracellular Necrotizing Lesions. *Microbiol. Spectr.* **5**, (2017).
  40. Richards, J. P., Cai, W., Zill, N. A., Zhang, W. & Ojha, A. K. Adaptation of mycobacterium tuberculosis to biofilm growth is genetically linked to drug tolerance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, (2019).
  41. Pai, M. *et al.* Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2016 21 **2**, 1–23 (2016).
  42. Cascante, J. A., Pascal, I., Eguía, V. M. & Hueto, J. Diagnóstico de la infección tuberculosa. *Pamplona. An. Sist. Sanit. Navar* **30**, 49–65 (2007).
  43. Zellweger, J.-P., Sotgiu, G., Corradi, M. & Durando, P. The diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI): currently available tests, future developments, and perspectives to eliminate tuberculosis (TB). *Med. Lav.* **111**, 170 (2020).

44. Machado-Villarroel, L., Aníbal Acosta-Loya, J., Orozco-Andrade, I., Bravo-Rodríguez, G. & Abraham Dimakis-Ramírez, D. Determinación del interferón-gamma en tuberculosis: Principios básicos y utilidad. *Revisión Neumol Cir Torax* **74**, 197–206 (2015).
45. Caulfield, A. J. & Wengenack, N. L. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis.* **4**, 33–43 (2016).
46. Dartois, V. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 159–167 (2014).
47. Chang, K., Yew, W., Tam, C., Leung, C. WHO group 5 drugs and difficult multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review with cohort analysis and meta-analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4097–4104 (2013).
48. JA, C. *et al.* Update of SEPAR guideline «Diagnosis and Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis». *Arch. Bronconeumol.* **56**, 514–521 (2020).
49. Bhat, Z. S., Rather, M. A., Maqbool, M. & Ahmad, Z. Drug targets exploited in Mycobacterium tuberculosis: Pitfalls and promises on the horizon. *Biomed. Pharmacother.* **103**, 1733–1747 (2018).
50. Huaman, M. A. & Sterling, T. R. Treatment of Latent Tuberculosis Infection—An Update. *Clin. Chest Med.* **40**, 839–848 (2019).
51. Kaufmann, S. H. E., Weiner, J. & von Reyn, C. F. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int. J. Infect. Dis.* **56**, 263–267 (2017).
52. Schragar, L. K., Vekemens, J., Drager, N., Lewinsohn, D. M. & Olesen, O. F. The status of tuberculosis vaccine development. *Lancet Infect. Dis.* **20**, e28–e37 (2020).
53. Sarojini, R., Suriyanarayanan, B. Plants: a source for new antimycobacterial drugs. *Planta Med.* **80**, 9–21 (2014).
54. Sharifi-Rad, J. *et al.* Medicinal plants used in the treatment of tuberculosis - Ethnobotanical and ethnopharmacological approaches. *Biotechnology Advances* vol. 44 (2020).
55. Domingo, D. & López-Brea, M. *Revisión Plantas con acción antimicrobiana. Diciembre* vol. 16 (2003).
56. Ortiz, L., Cervantes, V. & Chimal, A. *Plantas Medicinales de San Francisco Tlaltenco Tláhuac, Ciudad de México.* (2017).
57. Moreno, M., Parada, E., Mejía, G. & Espinoza, P. Toxicología subcrónica de infusión de *Chenopodium ambrosioides* (epazote) por administración oral en ratones NIH. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962013000100017](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000100017) (2013).

58. Jesus, R. S. *et al.* In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. *Brazilian J. Microbiol.* **49**, 296–302 (2018).
59. Sasikumar, K., Ghosh, A. R. & Dusthacker, A. Antimycobacterial potentials of quercetin and rutin against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *3 Biotech* **8**, (2018).
60. Cuevas, B. & Zenteno-Cuevas, R. Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. *ELSEVIER* (2010) doi:10.1016/j.eimc.2009.12.005.
61. National Center for Biotechnology Information. Quercetin [Internet]. 2021. [Consultado: 15 jun 21]. Disponible en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343>
62. National Center for Biotechnology Information. Rutin [Internet]. 2021. [Consultado: 15 jun 21]. Disponible en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805>
63. Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M. & Iranshahy, M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phyther. Res.* **33**, 13–40 (2019).
64. Pawar, A., Jha, P., Chopra, M., Chaudhry, U. & Saluja, D. Screening of natural compounds that targets glutamate racemase of *Mycobacterium tuberculosis* reveals the anti-tubercular potential of flavonoids. *Sci. Reports 2020 101* **10**, 1–12 (2020).
65. Jiménez-Arellanes, A. *et al.* Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Complement. Altern. Med.* **13**, (2013).
66. Jyoti, M. A. *et al.* In vitro effect of ursolic acid on the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* and its cell wall mycolic acid. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **33**, 17–24 (2015).
67. González-Segovia, R. *et al.* Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of guinea pig. *J. Gastroenterol.* **43**, 441–447 (2008).
68. El-Saber Batiha, G. *et al.* The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: Quercetin. *Foods* vol. 9 374 (2020).
69. El-Saber Batiha, G. *et al.* The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: Quercetin. *Foods* vol. 9 374 (2020).
70. Zeiger, E. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* vol. 841 43–48 (2019).

71. Edwards, R. L. *et al.* Quercetin Reduces Blood Pressure in Hypertensive Subjects. *J. Nutr.* **137**, 2405–2411 (2007).
72. Qu, Q. *et al.* Rutin, A Natural Inhibitor of IGPD Protein, Partially Inhibits Biofilm Formation in *Staphylococcus xylosus* ATCC700404 in vitro and in vivo. *Front. Pharmacol.* **12**, 2087 (2021).
73. Chua, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 150 805–817 (2013).
74. Sharma, S., Ali, A., Ali, J., Sahni, J. K. & Baboota, S. Rutin: Therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin. Investig. Drugs* **22**, 1063–1079 (2013).
75. Jiang, Q., Yang, X., Du, P., Zhang, H. & Zhang, T. Dual strategies to improve oral bioavailability of oleanolic acid: Enhancing water-solubility, permeability and inhibiting cytochrome P450 isozymes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **99**, 65–72 (2016).
76. Liú, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* vol. 49 57–68 (1995).
77. Zhang, F., Daimaru, E., Ohnishi, M., Kinoshita, M. & Tokuji, Y. Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Commercial Dried Fruits. *Food Sci. Technol. Res.* **19**, 113–116 (2013).
78. Wang, X. H. *et al.* Evaluation of toxicity and single-dose pharmacokinetics of intravenous ursolic acid liposomes in healthy adult volunteers and patients with advanced solid tumors. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **9**, 117–125 (2013).
79. Geerlofs, L., He, Z., Xiao, S. & Xiao, Z. C. Repeated dose (90 days) oral toxicity study of ursolic acid in Han-Wistar rats. *Toxicol. Reports* **7**, 610–623 (2020).
80. López-García, S. *et al.* Macrophage Activation by Ursolic and Oleanolic Acids during Mycobacterial Infection. *Molecules* **20**, 14348 (2015).
81. Raffetseder, J. Interplay of human macrophages and Mycobacterium tuberculosis phenotypes | Semantic Scholar. <https://www.semanticscholar.org/paper/Interplay-of-human-macrophages-and-Mycobacterium-Raffetseder/08595519df211e97ad49632534d1f528733761> (2016).
82. Minnesota Dept. of Health. Tuberculin Skin Test (TST). <https://www.health.state.mn.us/diseases/tb/tst.html>.
83. Palacios, L. O., Gutiérrez, V. C. & Hernández, A. C. *Plantas Medicinales de San Francisco Tlaltenco Tláhuac, Ciudad de México.* (2017).
84. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional. Epazote. [Internet]. 2009. [Consultado: 15 jun 21]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=epazote>

85. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional. Salve real. [Internet]. 2009. [Consultado: 15 jun 21]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=lantana-hispida>