



Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza  
Área Químico-Biológicas

**Evaluación *in vivo* de la actividad antifúngica de los compuestos  
UCI-05 y UCI-14 en un modelo de tuberculosis murino.**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

BRICEÑO CARDENAS OLIVIA YASMIN

Director de Tesis:

Dr. Rogelio Hernández Pando

Enero 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Dedicada con todo mi amor a mis abuelos, padres y hermanos  
que me han apoyado y amado incondicionalmente.

Gracias a mi jurando: Dr. Rogelio Hernández Pando, Dra. Leticia Cruz Antonio, Dr. Rubén Marroquín Segura, Q.F.B. Maria de las Mercedes Zamudio Duran y Q.F.B. Oscar Gonzáles Moreno por leer y corregir mi tesis.

Agradezco al Dr. Héctor Orozco y la Dra. Diana Aguilar por enseñarme y ayudarme.

También agradezco al Dr. Gustavo Reyes Terán y al Dr. Enrique Espinosa por creer en mí.

Especialmente, gracias al Dr. Bruno T. Rivas Santiago por su apoyo incondicional y por ser una importante influencia en mi vida.

Gracias César por tu paciencia y amor.

**Evaluación *in vivo* de la actividad  
antifúngica de los compuestos UCI-05 y  
UCI-14 en un modelo de tuberculosis  
murino.**

# ÍNDICE

**INTRODUCCIÓN.....;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**ANTECEDENTES .....;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**CARACTERÍSTICAS GENERALES ..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**MANIFESTACIONES CLÍNICAS ..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS Y DE SUS TRATAMIENTOS ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

***MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ;ERROR!**

***MARCADOR NO DEFINIDO.***

**MODELOS ANIMALES: VENTAJAS Y DESVENTAJAS ..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

***TRATAMIENTOS CONTRA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**FASES DE PRUEBAS DE NUEVOS FÁRMACOS ..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**ESQUEMAS CONVENCIONALES ..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**SITIOS DE ACCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS ANTITUBERCULOSOS ..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**ISONIAZIDA..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**RIFAMPICINA ..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**ETAMBUTOL ..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**PIRAZINAMIDA ..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**TRATAMIENTO DE MULTIFÁRMACO-RESISTENCIA ..... ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

***NUEVOS FÁRMACOS* ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

***MULTIFÁRMACO-RESISTENCIA* ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

***UCI-05 Y UCI-14* ;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**OBJETIVO GENERAL .....**;**ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**OBJETIVOS PARTICULARES .....**;**ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**HIPÓTESIS .....**;**ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**MATERIALES Y MÉTODOS.....**;**ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

*CRECIMIENTO DE LAS MYCOBACTERIAS Y PREPARACIÓN PARA LA INOCULACIÓN EN RATONES*

*;***ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

*PROCEDIMIENTO DE INFECCIÓN INTRATRAQUEAL Y ALMACENAMIENTO DE RATONES* *;***ERROR!**

*MARCADOR NO DEFINIDO.*

*PREPARACIÓN DEL TEJIDO PULMONAR PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO.*

*;***ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

*CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS VIVAS EN EL PULMÓN POR DETERMINACIÓN DE UNIDADES*

*FORMADORAS DE COLONIA (UFC)*

*;***ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

*ANÁLISIS ESTADÍSTICO*

*;***ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**RESULTADOS.....**;**ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....**;**ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**CONCLUSIONES.....**;**ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

**REFERENCIAS.....**;**ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo, y, aunque ya no es la “peste blanca” de los siglos previos, se estima que más de 8 millones de personas contraen tuberculosis cada año; la Organización Mundial de la Salud la ha declarado como un problema de salud mundial y se sabe que un tercio de la población mundial tiene tuberculosis latente causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Existen reportados 9 millones de casos de tuberculosis activa que resultan en 2-3 millones de muertes anuales. La mayoría de los nuevos casos ocurren en las naciones más pobladas – India y China- pero los mayores brotes de la enfermedad están en África, Indonesia, Archipiélago de las Filipinas, Afganistán, Bolivia, y Perú. Esta enfermedad tiene implicaciones económicas importantes ya que en los países más afectados, el costo por pérdida de productividad representa entre el 4 - 7 % del producto interno bruto anualmente. (1)

El aumento de la pobreza en países en desarrollo, los crecientes niveles de desnutrición, la falta de apego a los tratamientos, el surgimiento del SIDA y de cepas multifármaco-resistentes, han favorecido el resurgimiento de la tuberculosis en el mundo (2).

Por todo lo anterior es que resulta sumamente importante el desarrollo de medicamentos que reduzcan el tiempo de tratamiento (que usualmente es de 6 meses mínimo), sean activos contra las nuevas cepas multifármaco-resistentes y puedan ser eficaces administrándose como monofármacos ya que el

esquema convencional de tratamiento consiste de 3 diferentes fármacos (isoniazida, rifampicina y pirazinamida).(3)

Los antifímicos de uso primario fueron desarrollados hace 50 años, sin embargo, ha sido necesario desarrollar otros que satisfagan las necesidades actuales para el tratamiento de dicha enfermedad. (4)

Los compuestos que se prueban en este ensayo son totalmente novedosos; las pruebas de toxicidad *in vitro*, demuestran su alta actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) teniendo poca toxicidad en ratón.

La finalidad de este trabajo es la evaluación de un nuevo compuesto antituberculoso que podría ser efectivo contra cepas multifármaco-resistentes y tener mejores resultados bactericidas que el esquema convencional (isoniazida, rifampicina y pirazinamida).

## ***Mycobacterium tuberculosis***

### ***Características Generales***

Los bacilos tuberculosos son bacilos ligeramente curvados que miden alrededor de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo por 0.2 a 0.5 $\mu\text{m}$  de ancho. Los bacilos pueden mostrar un contorno uniforme, con vacuolas irregularmente distribuidas. En el medio de cultivo, las células pueden variar desde cocoides a filamentosas. Las cepas difieren en su tendencia para crecer como bacilos aislados o como largas hebras llamadas cordones. Los bacilos son inmóviles, se identifican por su característica propiedad tintoral: son relativamente impermeables a diversos colorantes básicos, pero una vez teñidos retienen el colorante con tenacidad. Resisten de forma específica la decoloración con solventes orgánicos acidificados y se llaman por eso ácido-alcohol resistentes. Esta propiedad, y su crecimiento relativamente lento, son atribuibles a la presencia de una pared celular rica en lípidos. (5)

Puede crecer en medios sintéticos simples, con glicerol u otros componentes como única fuente de carbono y con sales de amonio como fuente de nitrógeno. En los medios líquidos sintéticos ordinarios, el bacilo crece como agregados adherentes. Las micobacterias muestran por lo general una marcada preferencia nutritiva hacia los lípidos. En medios ricos, el periodo más corto de multiplicación observado es de alrededor de 12 horas. (5)

Las cepas virulentas de bacilos de la tuberculosis no pueden distinguirse con seguridad de las cepas avirulentas por su morfología celular o la de sus colonias; las cepas virulentas crecen como cordones serpenteantes, mientras que la mayoría de las cepas avirulentas crecen de forma más desordenada. (5)

Se creía que *M. tuberculosis* originalmente era aerobio obligado, pero se ha observado su crecimiento en muchos ambientes microaerófilos en los granulomas durante los estadios avanzados de la infección. (4) El bacilo de la tuberculosis es capaz de crecer intracelular y extracelularmente. Este organismo tiene un tiempo de replicación prolongado, aproximadamente 20 horas. (3)

La característica química más llamativa de las micobacterias es la abundancia de lípidos en la pared celular. Esta propiedad da cuenta del carácter hidrófobo de estos organismos. Entre los lípidos extraídos con disolventes orgánicos neutros están ciertas ceras y glucolípidos. (5)

La membrana celular de las micobacterias es una compleja estructura que contiene muchas proteínas, lípidos y carbohidratos, muchos de los cuales se encuentran sólo en esta bacteria (4). Las paredes tienen un contenido muy elevado de lípidos (de hasta 60%), los cuales, están adheridos a los polisacáridos; los polisacáridos, que incluyen el glucano, manano, arabinogalactano y arabinomanano, se encuentran también en los filtrados de

los cultivos. Los glucolípidos y las proteínas se ubican en una capa externa firmemente adherida a la pared y esta ubicación externa del lípido es la responsable del carácter hidrófobo de las células. La microscopia electrónica revela una pared más bien gruesa. Se observan también gránulos de glicógeno y cuerpos de volutina. Estos cuerpos de inclusión contribuyen a la frecuente tinción irregular arrosariada de los bacilos tuberculosos. (5)

Los ácidos micólicos parecen existir sólo en las paredes celulares de estos organismos. Enormes ácidos grasos saturados se encuentran tanto en las ceras como en los glucolípidos de gran tamaño, unidos en forma covalente a peptidoglucanos y a unos 30 residuos de ácidos micólicos que forman un puente entre la capa rígida y las capas externas lipofílicas de la pared celular. Otro micosido de interés es la cera D, de elevado peso molecular, que no es una cera verdadera, sino que contiene ácidos micólicos y un glucopéptido. Esta estimula la inmunogenicidad de diversos antígenos añadidos; una mezcla de cera D y de proteína del bacilo de la tuberculosis induce una hipersensibilidad retardada. (5)

*M. tuberculosis* cambia de un metabolismo que preferentemente usa carbohidratos cuando se crece *in vitro* a uno que utiliza lípidos cuando crece en un huésped infectado. (6) Se sabe que cerca de 200 genes parecen estar envueltos en el metabolismo de ácidos grasos en esta micobacteria. (7)

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv consiste en  $4.4 \times 10^6$  pares de bases (pb) y contiene aproximadamente 4000 genes. (4)

Este organismo tiene capacidad de latencia, es por ello que, cuando tiene baja actividad metabólica se dificulta como blanco terapéutico. *M. tuberculosis* puede ser localizada en cavidades pulmonares, pus de enfisema, o material sólido a donde la penetración de los antibióticos es difícil o el pH es suficientemente bajo para inhibir la actividad de la mayoría de los antibióticos.

(8)

Las respuestas del huésped, como puede ser, activación de macrófagos, mantenimiento de la estructura del granuloma, activación de células T CD<sup>4+</sup>, células TCD<sup>8+</sup> y TNF- $\alpha$ , son importantes para controlar la infección latente.

(9).

*M. tuberculosis* es capaz de modular la respuesta inmune a través de los ácidos micólicos de su membrana celular evitando así, la eliminación intracelular del bacilo. (9).

Las micobacterias vivas son inherentemente tóxicas para las células. Entonces, los macrófagos murinos y humanos que fagociten más de 5 organismos usualmente mueren. La razón del porqué esto ocurre es desconocida. Sin embargo, se ha notado que *M. tuberculosis* libera un factor que incrementa la sensibilidad de las células infectadas a la toxicidad por TNF $\alpha$ . Aunque *M. tuberculosis* tiene claramente toxicidad inherente, esto no explica del todo la patología de la enfermedad. (10)

## Manifestaciones Clínicas

La historia natural de la tuberculosis comienza con la exposición a *M. tuberculosis* que es transmitido primariamente por la vía respiratoria. Las gotitas producidas al toser son probablemente el vehiculo mas efectivo, ya que se secan rápidamente en el aire y dejan unos núcleos de menos de 5 $\mu$ m de diámetro, que pueden alcanzar los alvéolos. El organismo puede sobrevivir en el esputo seco o húmedo hasta 6 semanas, pero muere al cabo de unas pocas horas de exposición a la luz solar directa. (5)

La infección ocurre en los pulmones, pero el organismo puede migrar a cualquier órgano vía hematogena. (9)

Aunque la respuesta inmune humana generalmente controla esta infección, éste no erradica al patógeno, resultando en una infección asintomática. En este punto, la persona es no infecciosa, y la única evidencia de infección es la reactividad a la prueba en piel de la tuberculina. Ha sido comprobado que la tuberculosis activa puede presentarse en sólo 10% de estas personas con infección latente durante toda su vida. El organismo puede persistir en lesiones granulomatosas por muchos años. (11)

Con fines prácticos se dividió la progresión de la enfermedad en fases (10). En la primera fase, que abarca de 3-8 semanas después de que *M. tuberculosis* contenida en los aerosoles inhalados se implanta en los alvéolos se produce una lesión inicial que aparece como un área de neumonitis inespecífica situada generalmente en una zona periférica bien ventilada, después de lo cual se

disemina a la circulación linfática de los nódulos linfáticos regionales del pulmón. La inflamación granulomatosa se inicia, tras 2 a 4 semanas. En las lesiones precoces, los bacilos de la tuberculosis se localizan principalmente dentro de los macrófagos, en donde se multiplican (5). En este tiempo ocurre la conversión a tuberculina positiva. La segunda fase, que abarca 3 meses, está marcada por la circulación hematogena de la bacteria a varios órganos incluyendo otras partes del pulmón; en este tiempo la enfermedad fatal puede ocurrir en forma de tuberculosis meníngea o miliar. Durante esta etapa la bacteria libre interactúa con linfocitos TCD<sup>4+</sup> sensibilizados que son atraídos y luego proliferados liberando citocinas de inflamación (4), inflamándose las superficies pleurales causando severo dolor del pecho hasta los siguientes 3-7 meses, aunque esta etapa puede permanecer hasta 2 años. Se sabe que esta condición es causada también por la diseminación hematogena de la bacteria en el espacio pleural. (4)

La última etapa puede durar más de 3 años. En esta etapa, se producen más lentamente las lesiones extrapulmonares que se presentan frecuentemente como dolor crónico. En las lesiones más avanzadas, sólo son prevalentes los bacilos extracelulares. Durante esta etapa de la respuesta inflamatoria se presenta necrosis por caseificación, en la que el centro necrótico de los tubérculos permanece semisólido. Las lesiones caseosas se resuelven por fibrosis y calcificación, lo que puede originar la formación de una extensa cicatriz y reducción del parénquima. En una pequeña proporción de individuos, la infección no llega a controlarse y las lesiones primarias se hacen progresivamente mayores, se unen y se licúan. Cuando se libera este material,

se forma una cavidad en el pulmón y puede producirse la extensión de la enfermedad a través de los bronquios. (5)

Sin embargo, muchos humanos que han estado infectados con tuberculosis no presentan progresión de la enfermedad. Es conocido que en muchos adultos, no infectados con Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), la tuberculosis es causada por una reactivación de una infección preexistente. Los focos infecciosos se localizan principalmente en las porciones apicales posteriores, o subapicales, del pulmón, cuya infección persiste, tras la diseminación hematológica. (5). En estos individuos y otros que están inmunosuprimidos se puede reactivar la infección con *M. tuberculosis* y en muchos casos pueden mostrar rápida progresión a la enfermedad activa. (4)

Para el momento en que se diagnostica la enfermedad, generalmente ya hay licuefacción de la lesión caseosa, y la cavidad proporciona un nicho favorable para la rápida proliferación de los bacilos. Estos pueden entonces transmitirse a otros individuos a través de las gotitas producidas por los aerosoles de los esputos infectados y a otras partes de los pulmones por diseminación bronco génica. Los sitios de infección más frecuentes son el sistema genitourinario, las articulaciones, los huesos, los ganglios linfáticos, la pleura y el peritoneo. Tras la ruptura de una lesión caseosa en una vena pulmonar, puede producirse una tuberculosis diseminada o miliar. (5)

Histológicamente, el bacilo de la tuberculosis induce dos tipos de lesiones. Las lesiones exudativas se observan en la infección inicial. Se produce una inflamación aguda, con exudado de líquido y acumulación de leucocitos polimorfonucleares alrededor de las bacterias. Las lesiones productivas (granulomatosas) se producen cuando el individuo se hace hipersensible a la proteína tuberculosa. Los macrófagos experimentan entonces una dramática modificación al contacto con los bacilos de la tuberculosis o de sus productos, organizándose concéntricamente en forma de células epitelioides alongadas. En el centro de los tubérculos, algunas de estas células pueden fusionarse para formar una o más células gigantes, con docenas de núcleos dispuestos en su periferia y con bacilos viables visibles. Por fuera de las múltiples capas de células epitelioides existe un manto de linfocitos y de fibroblastos que proliferan activamente lo que conduce eventualmente a una extensa fibrosis. (5)

La mejoría clínica se nota fácilmente en la mayoría de los sujetos con tuberculosis pulmonar si el tratamiento es apropiado. La eficacia por lo común se manifiesta luego de las primeras 2 semanas de terapéutica y se identifica por disminución de la fiebre y tos, aumento de peso y mejoría en la sensación de bienestar. Más de 90% de tuberculosos que reciben tratamiento óptimo mostrará negatividad en los cultivos después de 3 a 6 meses. Los cultivos que siguen siendo positivos después de 6 meses a menudo presentan microorganismos resistentes. (12)

La evidencia epidemiológica de la frecuencia de tuberculosis en diversas poblaciones ha sugerido que la malnutrición, el hacinamiento y el estrés disminuyen la resistencia a la enfermedad; se han realizado estudios que demuestran que el consumo reducido de proteínas aumenta la susceptibilidad a la infección. La importancia de los factores hormonales viene sugerida por las llamadas variaciones de resistencia en función de la edad y, en menor medida, del sexo; según algunos estudios la tuberculosis es más frecuente en mujeres.(5) Pacientes menores de 60 años, Africanos americanos o hispanos o aquellos con SIDA son más susceptibles a infectarse con *M. tuberculosis*. (13)

Otro factor que aumenta la susceptibilidad a la tuberculosis es la administración de cortisona. También se sabe que la tuberculosis es mucho más frecuente entre los mineros y otros trabajadores expuestos al polvo de sílice debido a que estas partículas dañan a los macrófagos que son los encargados de controlar la infección inicial. (5)

El diagnóstico provisional de tuberculosis se realiza habitualmente por la demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes en preparaciones teñidas de esputo o de lavado gástrico. Para el aislamiento primario son preferibles los medios de cultivo sólidos; habitualmente un cultivo positivo crece de 2 a 4 semanas. (5)

## **Historia de la Tuberculosis y de sus tratamientos**

Se ha hipotetizado que *M. bovis*, que causa una enfermedad parecida a la tuberculosis en el gato, fue la precursora evolutiva de *M. tuberculosis*. (14)

La domesticación del gato, debió de haber ocurrido entre 10000-25000 años antes de Cristo, lo cual permitió el paso de la micobacteria patógena de los animales domesticados al humano (14).

La frecuencia con la que se han encontrado esqueletos con aparentes deformaciones debidas a tuberculosis en el antiguo Egipto sugiere que la enfermedad era común entre la población. El descubrimiento de deformaciones similares en huesos en varios sitios en Italia, Denmark, y países en el medio Este, también indica que la tuberculosis fue encontrada por todo el mundo 4000 años antes de Cristo. (4)

Los asirios describen pacientes tosiendo sangre en el siglo VII e Hipócrates describió a un paciente con tisis asociada con dolor de pecho y tos con sangre en el esputo. (4)

Se cree que indo-europeos esparcieron la enfermedad a Europa y Asia durante sus migraciones en esas regiones. Europa, con una gran explosión demográfica y el crecimiento de los centros urbanos, se convirtió en el centro de muchas epidemias de tuberculosis en el siglo XVI y XVII. Se estima que un cuarto de los europeos murieron de tuberculosis. (4)

En la última mitad del siglo XIX, la mortalidad debida a tuberculosis decreció debido al aumento de la sanitización. (4)

Los inmigrantes Europeos del nuevo mundo llevaron la enfermedad con ellos, y, grandes centros urbanos como Boston y Nueva York, tuvieron casos de muertes por tuberculosis de 6-7 por 1000 en 1800, declinando a 4 por 1000 en 1860. Probablemente las medidas de salud pública jugaron un rol importante en esta disminución de la mortalidad. (4)

En 1865, Jean-Antonie Villemin reportó haber podido producir tuberculosis a conejos de laboratorio inoculándolos con tejido de tuberculosis de un cadáver. (4)

Robert Koch reportó 17 años después que la tuberculosis es causada por una bacteria. Sin embargo, creer en las causas sociales de la tuberculosis aun continua en el siglo XX. (4)

Eduard Trudeau's mostró que la TB puede ser inducida en conejos con un cultivo virulento purificado de *M. tuberculosis* pero que las condiciones ambientales en las que los animales fueron mantenidos influencia fuertemente el curso de la enfermedad (4).

El número de nuevos casos comenzó a incrementarse nuevamente. La mayoría de las causas fue el incremento de la hacinación y la pobreza así como el surgimiento del SIDA. (15)

El problema de la tuberculosis creció notablemente: su pared celular rica en lípidos hizo creer que una terapia efectiva era imposible. Esta devastadora visión fue confirmada cuando fueron descubiertos los primeros antibióticos, sulfonamidas y penicilina, que no tenían ninguna actividad en contra de *M. tuberculosis*. Con esto en mente es fácil entender la euforia que levantaron Albert Schatz y Selman Waksman`s en 1940 al descubrir la estreptomicina mientras trabajaban en la universidad Rutgers en New Jersey y Harold Lehmann`s quien descubrió el ácido para-amino salicílico (PAS) poco tiempo después. (16)

Administrando estreptomicina y PAS se observó que la combinación de terapia prevenía la aparición de resistencia. La subsecuente descripción de isoniazida, pirazinamida, rifampicina, etambutol y otros fármacos, así como el uso de BCG, una vacuna de una cepa atenuada de *M. bovis* hecha por Calmette y Guerin en París en 1920, dieron a la comunidad médica las herramientas básicas para el control de la tuberculosis.(16)

Usando estas herramientas muchos países han logrado la virtual erradicación de la tuberculosis, y otros, incluyendo algunos de los más pobres, han disminuido la cantidad de casos. (16)

En años recientes las bases moleculares del mecanismo de acción de los agentes antituberculosos y la forma en que los organismos se vuelven resistentes ha comenzado a ser revelada, y con ello se espera poder mejorar los tratamientos actuales y en un futuro erradicar la tuberculosis. (16)

## ***Modelos Animales para el estudio de Mycobacterium tuberculosis***

### **Modelos Animales: ventajas y desventajas**

El uso de animales de experimentación para el ensayo preclínico de la eficiencia de nuevos productos antimicrobianos es de gran importancia, pues en ellos se puede evaluar la actividad esterilizante de los nuevos antibióticos con capacidad antituberculosa, estos idealmente, deberán eliminar la carga bacteriana mejorando el estado histofuncional de los tejidos afectados o deberán reducir la duración de la terapia sin sacrificar su eficacia, lo cual incrementará la culminación exitosa del tratamiento ahorrando recursos, previniendo recaídas y la emergencia de cepas multifármaco-resistentes. (14)

Debido a que la vía de infección aérea es la más importante en la enfermedad humana, se considera que ésta es la idónea en los modelos animales de tuberculosis. Ésta es más específica para evaluar la enfermedad pulmonar y hay una mejor correlación entre la dosis empleada del medicamento y la eliminación de la carga bacteriana evaluada por la determinación de unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC). (14)

La virulencia de *M.tuberculosis* es estudiada en cultivo de tejidos, comúnmente usando macrófagos, o recientemente, células dendríticas, neumocitos y en modelos animales. Estos son mejores porque en ellos pueden estudiarse todas las etapas de la enfermedad. (4)

Los tres mejores modelos son el ratón, cerdos de Guinea y conejos, cada uno tiene sus ventajas y desventajas. El ratón es el más frecuentemente usado debido a que su genoma se encuentra bien estudiado, existe gran disponibilidad de reactivos para medir niveles de citocinas, y su bajo costo de mantenimiento relativo a otros animales. Otra gran ventaja para los experimentos en ratón es que hay cepas híbridas que muestran diferentes niveles de resistencia a *M. tuberculosis*, también, que cuando es empleada una dosis adecuada, la micobacteria crece relativamente sin ningún impedimento en los pulmones del ratón en un lapso de 2-4 semanas. (9). Una desventaja es que la progresión de tuberculosis en ratón es diferente que en humano, debido a que el ratón, en general, no es tan sensible a la enfermedad como otros modelos animales en los que se pueden estudiar infecciones crónicas más parecidas a las humanas. Los cerdos de Guinea son muy sensibles a *M. tuberculosis*, y las fases de la enfermedad, incluyendo los estadios tempranos con formación de granulomas, en este animal, son similares a los humanos, las desventajas son la carencia de cepas y reactivos así como el alto costo de mantenimiento.(18)

El modelo de conejo tiene una gran ventaja sobre los otros modelos animales, los granulomas pulmonares formados durante la enfermedad muestran la misma progresión observada en casos avanzados de tuberculosis humana, las desventajas del conejo son similares a las del cerdo de guinea. (18)

## ***Tratamientos contra Mycobacterium tuberculosis***

### **Fases de pruebas de nuevos fármacos**

Aproximadamente 50,000 compuestos han sido probados anualmente. La primera fase de prueba es su actividad *in vitro* contra cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv. Los compuestos que son activos en este ensayo son reconfirmados usando el sistema radiométrico BACTER 460. La siguiente fase del procedimiento es determinar el MIC (concentración mínima inhibitoria) del compuesto. Además el compuesto debe de ser evaluado en su citotoxicidad en cultivos para determinar la concentración inhibitoria 50%. La siguiente fase de pruebas consiste en realizar un ensayo en macrófagos infectados para determinar si el compuesto puede inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* en un ambiente intracelular. (13)

Los compuestos que funcionan bien en el ensayo de macrófagos infectados son probados en un modelo animal, si se cuenta con cantidades suficientes del compuesto. Después de que la dosis máxima tolerada es determinada, el ratón es expuesto a bajas dosis de *M. tuberculosis* en aerosol. Veinte días después el compuesto a prueba es administrado diariamente a dosis apropiadas por 45 días. A 15, 30 y 45 días de terapia, grupos de 5 ratones son sacrificados.(19)

Los pulmones y bazo son homogenizados y sembrados en agar para determinar la carga bacteriana. Bajo estas condiciones una reducción de 0.7 log o mayor se considera estadísticamente significativa. Los compuestos que tienen este nivel de reducción son definidos como activos en un modelo *in vivo*.

La siguiente fase consiste en la determinación del mecanismo de acción, farmacocinética y farmacodinámica del fármaco para finalmente realizar pruebas clínicas en primates y humanos (19).

El 11% de los compuestos probados (5,251 compuestos totales) han resultado altamente activos *in vitro* (453), de estos, 340 tienen efecto en el modelo de macrófagos infectados y 53 han sido probados *in vivo*. De esos, 9, de varias clases de compuestos, han demostrado reducir significativamente la carga bacteriana en los pulmones de los ratones infectados. (13)

La evaluación de la actividad bactericida de los fármacos antituberculosos *in vivo*, en contraste con los ensayos *in vitro*, se refieren al grado de muerte de los organismos que se mide después de los dos primeros días de tratamiento, en un modelo animal o en la enfermedad en humanos. La actividad bactericida del fármaco se distingue de otra característica llamada actividad esterilizante del fármaco, que es definida como la habilidad del fármaco para matar los bacilos tuberculosis tan rápido como sea posible. Esta es la característica del fármaco que es responsable de la cura de la enfermedad. La capacidad esterilizante del fármaco es medida por la evaluación de la conversión a baciloscopia negativa después de dos meses de terapia. (3)

### **Esquemas convencionales**

Hasta el descubrimiento de la estreptomycin en 1945, el tratamiento de la tuberculosis se limitó al reposo, a la buena alimentación y al colapso artificial del pulmón (3).

Los medicamentos para tratar tuberculosis se dividen en dos grandes categorías. Los compuestos de primera elección combinan el máximo nivel de eficacia con un grado aceptable de toxicidad; incluyen isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida. A veces se necesita recurrir a fármacos de “segunda elección” como ofloxacina, ciprofloxacina, etionamida, ácido amino salicílico, cicloserina, amikacina, kanamicina y capreomicina que pueden causar mayor grado de toxicidad que los de primera elección y resultan menos eficientes (12).

México, en 1982 introdujo el esquema de tratamiento primario de corta duración con la administración de tres fármacos: isoniazida, rifampicina y pirazinamida, con reducción del período de tratamiento de 12 a 6 meses. A partir de 1986 se inició el tratamiento con fármacos combinados en una sola tableta (isoniazida, rifampicina y pirazinamida), que comprobó una eficacia mayor al 90% de curación, lo que previene la fármaco resistencia al evitar la monoterapia. En 1996, la OPS/OMS recomendó la instrumentación de la Estrategia de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES) para mejorar las tasas de curación, reducir la morbilidad, la mortalidad y la

transmisión del padecimiento, la cual se realizó en 6 áreas demostrativas, localizadas en los estados de Chiapas, Jalisco, Nayarit, Sonora, Tamaulipas y Veracruz. Actualmente todos los casos de Tuberculosis deben ingresar a tratamiento bajo la estrategia TAES, el medicamento debe ser estrictamente

supervisado por el personal de salud o personal debidamente capacitado, quien verificará la ingesta y deglución del medicamento. (30)

### Tratamiento Acortado

FASE INTENSIVA:	Diario, de lunes a sábado, hasta completar 60 dosis. Administración en una toma.	
Medicamentos	SEPARADOS (DOSIS)	COMBINACION FIJA (4 GRAJEAS)
RIFAMPICINA ISONIAZIDA PIRAZINAMIDA ETAMBUTOL	600mg 300mg 1500-2000mg 1200mg	150mg 75mg 400mg 400mg
FASE DE SOSTEN	Intermitente, 3 veces por semana, Lunes, Miércoles y Viernes, hasta completar 45 dosis. Administración en 1 toma.	
MEDICAMENTOS	SEPARADOS (DOSIS)	COMBINACION FIJA (4 CAPSULAS)
ISONIAZIDA RIFAMPICINA	800mg 600mg	200mg 150mg

Fuente: Secretaría de Salud, México. Instituto de Salud del Estado de Chiapas.

[www.insp.mx/](http://www.insp.mx/)

En zonas en que ha surgido resistencia primaria a isoniazida, por lo común se emprende el tratamiento con cuatro fármacos que son rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol. (13)

La prevención de la aparición de organismos multifármaco-resistentes es una de las razones del porqué la terapia antituberculosa, sólo con algunas excepciones, se ha basado en el uso de más de una droga. (3)

Tratamientos que utilizan una combinación de drogas han mostrado acelerar la respuesta a la enfermedad y acortar el tiempo requerido para curarla.

Rifampicina e Isoniazida son los fármacos más empleados en la actualidad.  
(20)

La terapia frecuentemente toma un tiempo considerable, y se espera que nuevos compuestos puedan ser descubiertos y reduzcan la duración del tratamiento. Aun son necesarios fármacos que puedan ser efectivos contra el creciente número de cepas fármaco-resistentes y contra de bacilos que pueden permanecer en estado de latencia. (3)

Claramente debe realizarse mucho más trabajo, incluyendo la adquisición y prueba de más compuestos, si quieren encontrarse mejores alternativas para el tratamiento. (13)

### **Sitios de acción de los tratamientos antituberculosos**

Tánger B. y colaboradores dividen a las zonas de infección en compartimentos con la finalidad de explicar en que población específica de micobacterias actúa cada fármaco. Un componente son los granulomas, caracterizados por una gran población bacteriana, generalmente en el rango de  $10^7 - 10^9$  organismos por granuloma; estas lesiones, sin embargo, representan la población donde naturalmente ocurre la resistencia a fármacos. Los organismos de esta población tienden a ser multiplicadores rápidos. El pH del ambiente tiende a ser neutro o alcalino. Sobre esta población actúan la isoniazida, rifampicina y estreptomycin. Un segundo elemento de este modelo es la lesión tisular, que se cree tiene una población de entre  $10^4 - 10^5$  organismos por  $\text{cm}^2$  de

superficie infectada. Metabólicamente, estos organismos son lentos o intermedios multiplicadores y en algunos casos, pueden permanecer vivos mucho tiempo sin multiplicarse. Aquí se tiene un ambiente uniforme con pH neutro. Sobre esta población actúan la rifampicina y la isoniazida. La parte final es el componente intracelular, la población de macrófagos pulmonares, compuesta de aproximadamente  $10^4$ – $10^5$  organismos que son multiplicadores lentos y se encuentran en un pH ácido. (3)

Debido a que la actividad de la Pirazinamida y los aminoglucósidos, fármacos utilizados en los regimenes modernos, son dependientes del pH (21), estos actúan en determinados compartimientos del modelo planteado. Ya que las poblaciones de bacterias en macrófagos se encuentran en un ambiente ácido, la Pirazinamida y los aminoglucósidos actúan en estas poblaciones al igual que la rifampicina y la isoniazida. La pirazinamida y la rifampicina actúan en diferentes poblaciones de bacterias que están hibernando o son de crecimiento lento sin embargo, no actúan como dos drogas aisladas. (3)

La única razón del porqué la terapia antituberculosa antes de la aparición de la rifampicina requería de 18 meses en vez de los 6-9 meses empleados actualmente, es que la isoniazida era la única droga disponible que era capaz, después de mucho tiempo, de matar organismos relativamente metabólicamente inactivos (dentro de macrófagos), Debido a que su efecto es lento, ha tenido que ser administrado por un largo periodo de tiempo. Los

régimenes para tratar la tuberculosis deben incluir agentes que son bactericidas en contra de las bacterias de multiplicación rápida y lenta y que puedan prevenir la aparición de bacilos fármaco-resistentes. El fracaso de la terapia radica en dos diferentes problemas. Un problema es la selección de los organismos multifármaco-resistentes que ocurre naturalmente en el ambiente, de manera gradual y en una gran población de organismos multiplicadores rápidos. El segundo, y más común de los fracasos, es en la persistencia de los organismos de los otros compartimientos. (3)

### **Isoniazida**

Después de ingestión o aplicación parenteral, la isoniazida se absorbe fácilmente. La isoniazida se difunde fácilmente en todos los líquidos y células corporales. Se sabe que 75 a 95% de la dosis de isoniazida se excreta en la orina. La isoniazida sigue siendo el fármaco más importante a nivel mundial para tratar todos los tipos de tuberculosis. La dosis diaria recomendada es de 5 mg/kg de peso vía oral hasta un máximo de 300mg. Se ha calculado que la incidencia de reacciones adversas a la isoniazida es de 5.4%, en más de 2000 individuos; las más notables fueron erupciones, fiebre, ictericia y neuritis periférica. (12)

La isoniazida es bacteriostática de los bacilos “en etapa de reposo”, pero es bactericida si están en fase de división rápida. El fármaco muestra selectividad extraordinaria por las micobacterias. La isoniazida penetra en las células fácilmente y tiene la misma eficacia contra los bacilos intracelulares en fase de crecimiento, que contra los que se multiplican en medios de cultivo. Se desconoce el mecanismo de acción de la isoniazida, pero se han planteado

algunas hipótesis que incluyen los efectos que ejerce en lípidos, biosíntesis de ácido nucleico y glucólisis. (12)

En pacientes tratados con una droga simple como parte de su terapia inicial, el uso de isoniazida produce aproximadamente una tercera parte de logaritmo por día de la reducción en la carga bacteriana después de los primeros dos días de tratamiento (22)

No se ha sabido de resistencia cruzada entre la isoniazida y otros medicamentos sin embargo, se conoce que el mecanismo de resistencia se encuentra dentro del gen *inhA* de la micobacteria que interviene en la biosíntesis del ácido micólico.(12) En promedio, uno de cada  $10^6$  de bacilos de la tuberculosis mostrarán resistencia genética a la isoniazida cuya mutación que confiere dicha resistencia es AGC315ACC (Ser-Thr) en el gen *katG*. (23)

La isoniazida es crítica en la terapia temprana; su actividad bactericida reduce rápidamente las cuentas viables en esputo porque es altamente activa en contra de los organismos que crecen aeróbicamente en las cavidades pulmonares. (13)

## **Rifampicina**

Una vez absorbido el fármaco, en las vías gastrointestinales, ésta es eliminada rápidamente por la bilis. Por la orina se excreta incluso 30% y por las heces 60 al 65%. La vida media de la rifampicina varia de 1.5 a 5 h. La rifampicina se distribuye por todo el organismo y aparece en cifras eficaces en muchos

órganos y líquidos corporales. Es uno de los antifímicos más eficaces de los que se dispone. La rifampicina, tiene la capacidad de esterilizar rápidamente las lesiones tuberculosas en sistemas biológicos. (24)

La dosis de rifampicina para tratar la tuberculosis en adultos es de 600mg una vez al día. Nunca debe utilizarse sola la rifampicina contra dicha enfermedad por la rapidez con que puede surgir resistencia de las micobacterias. Las reacciones adversas más comunes son erupciones, fiebre, náusea y vómito así como la aparición de ictericia. (12)

La rifampicina es un antibiótico macro cíclico producidos por *Streptomyces mediterranei*. La rifampicina bloquea la proliferación de casi todas las bacterias grampositivas y también otras gramnegativas como *Escherichia coli*. (12)

Tres meses después de que la terapia con rifampicina se ha detenido, hay una reducción en el número de organismos persistentes en los ratones tratados con este fármaco. (3)

Esta observación soporta el hecho de que la rifampicina está actuando rápidamente en la población de multiplicadores lentos en los macrófagos. (3)

La rifampicina inhibe a la RNA polimerasa dependiente de DNA de la micobacteria para formar un complejo enzima-fármaco estable que suprime el comienzo de la formación catenaria en la síntesis de RNA. El sitio de acción de la rifampicina es la sub unidad beta de este complejo enzimático. La rifampicina es bactericida en microorganismos intracelulares y extracelulares. (12)

Las micobacterias, pueden presentar resistencia a la rifampicina a muy breve plazo *in vitro* y uno de cada  $10^7$  a  $10^8$  bacilos de la tuberculosis es resistente al fármaco. La mutación que confiere resistencia a rifampicina es TCG531TTG (Ser-Leu) en el gene *rpoB* (23). La resistencia microbiana a la rifampicina se debe a una alteración de la enzima objetivo de acción del fármaco, que es la RNA polimerasa que depende de DNA.(12)

## **Etambutol**

Se sabe que 75 a 80% de una dosis oral de etambutol se absorbe en tubo digestivo. La vida media del medicamento es de tres a cuatro horas. En término de 24 horas, 75% de una dosis oral de etambutol se excreta sin modificaciones por la orina. (12)

Prácticamente todas las cepas de *M. tuberculosis* son sensibles al etambutol. Suprime la proliferación de casi todos los bacilos de tuberculosis resistentes a isoniazida y a estreptomycin. La resistencia al etambutol surge con gran lentitud *in vitro*. El fármaco es tuberculostático. Se desconoce el mecanismo exacto de la acción del etambutol, pero se ha demostrado que afecta el metabolismo de los ácidos nucleicos e inhibe específicamente la arabinosil transferasa de la micobacteria, impidiendo o perturbando la formación de arabinogalactosa y del lipoarabinomano, que son elementos básicos y forman parte de los glicolípidos dominantes de la envoltura de *M. tuberculosis*.

La resistencia bacteriana al fármaco surge *in vivo* cuando se administra sin que se use de modo concomitante otro compuesto eficaz. (12)

El etambutol se ha utilizado con notables resultados en el tratamiento de diversas formas de tuberculosis. El etambutol ha sustituido esencialmente al ácido paramino salicílico. La dosis habitual para adultos es de 15 mg/kg de peso. El etambutol produce muy pocas reacciones adversas algunas de ellas son: disminución de la agudeza visual, erupciones y fiebre. (12)

## **Pirazinamida**

La pirazinamida se absorbe satisfactoriamente en vías gastrointestinales y se distribuye en todo el cuerpo. Se excreta en orina. Se desconoce el mecanismo de acción de este producto. (12)

La pirazinamida muestra actividad bactericida *in vitro* sólo en un medio levemente ácido. Los bacilos tuberculosos dentro de los monocitos *in vitro* son destruidos. Si se usa el medicamento solo, surge rápidamente resistencia (12), sin embargo, es capaz de matar al 97% de las bacterias iniciales en el transcurso de las primeras dos semanas de tratamiento cuando es así. (25)

En animales tratados con Pirazinamida, virtualmente todos los pulmones están esterilizados en 6 meses, y en 12 meses esencialmente todos los animales tienen cultivos negativos en sus pulmones. (24)

La pirazinamida se ha vuelto un componente importante de la terapéutica antifúngica a base de varios fármacos y por lapsos breves. La dosis diaria para adultos es de 15 a 30 mg/kg de peso. El efecto adverso más frecuente de la pirazinamida es el daño al hígado. (12)

### **Tratamiento de multifármaco-resistencia**

Tener multifármaco-resistencia substancialmente incrementa el riesgo de que los tratamientos fracasen y por tanto aumenten las probabilidades de muerte. Personas que están particularmente en alto riesgo incluye aquellos con historia de tratamientos previos antituberculosos, aquellos que vivan en áreas de alto riesgo y pacientes o trabajadores de la salud en donde ha habido transmisión epidémica de cepas resistentes. (20)

Para pacientes con estas características es importante administrar al menos 4 fármacos a los que la micobacteria sea sensible- usualmente tres fármacos orales y uno inyectable. Generalmente, un fármaco inyectable como un aminoglucósido, es administrado por 3-6 meses después de la conversión inicial de los cultivos de esputo de positivo a negativo, y el paciente continúa tomando aminoglucósidos orales de 15-18 meses después de la última baciloscopia positiva. La combinación de pirazinamida y ofloxacin ha mostrado tener un efecto antibacterial intramacrofágico eficiente. (20)

## ***Nuevos Fármacos***

El principio Darwiniano de la selección natural predice que las cepas de tuberculosis resistentes a fármacos continuarán aumentando. Es por ello que la Investigación en nuevas formas de tratamiento es de suma importancia. Las fluoroquinonas son los nuevos agentes más promisorios para el tratamiento de la tuberculosis. Otros agentes terapéuticos incluyen otras clases de fármacos como las oxaolidinonas, tratamientos que afectan al sistema inmune, vacunas, etc. (26)

Los cambios inmediatos para el control de la tuberculosis incluyen el uso de regímenes que sean más cortos o que requieran que los pacientes tomen los fármacos menos frecuentemente. Idealmente, futuros regímenes tendrán ambas características - esto es, un régimen de una toma semanal que solamente dure 4 meses. (19)

Es crucial que fármacos nuevos, más eficientes y menos tóxicos sean descubiertos para reemplazar aquellos que ya no resultan eficientes debido a la fármaco-resistencia. (19)

## **Multifármaco-resistencia**

La resistencia ocurre en virtualmente todas las poblaciones de bacilos de tuberculosis que no han sido expuestos a drogas antituberculosas. (3) *M. tuberculosis* crece bajo condiciones de estrés dentro de las células, y estas condiciones pueden proveer un trasfondo hipermutable, que permite la resistencia más fácilmente. (16)

El bacilo de la tuberculosis adquiere mutaciones cromosomales al azar que lo han hecho resistente a cada droga usada para tratar la tuberculosis. Afortunadamente estas mutaciones son infrecuentes. (8) La frecuencia de mutación de genes individuales varía significativamente entre genes. La razón de estas variaciones no es conocida, pero podría estar relacionada con la influencia de de las secuencias locales de DNA. (16)

Algunos organismos de *M. tuberculosis* resistentes debieron preexistir. La heterorresistencia puede representar variaciones naturales en la población y puede ser un importante mecanismo para la emergencia de resistencia. Lo que aun no es claro es porque cada paciente tiene una población heterorresistente o es sólo encontrada una cepa con un incremento a la resistencia. (16)

La presencia de cavidades pulmonares, que permiten el crecimiento de bacteria en sitios que están protegidos de la penetración de los agentes antituberculosos en concentración adecuada, también favorece la aparición de resistencia bacteriana. (16)

Pacientes con tuberculosis sin complicaciones, que reciben tratamiento inadecuado, proveen una selección que resulta ventajosa para los mutantes resistentes porque la bacteria puede estar expuesta a monoterapia, permitiendo la aparición de resistencia a agentes simples, por lo que la terapia combinada es necesaria como protección. Las complicaciones clínicas como el enfisema y la departamentización extensiva permiten que una gran población permanezca en un compartimiento en donde los fármacos no pueden penetrar. (16)

Adquirir resistencia a las drogas es casi siempre causado por un tratamiento inadecuado. Esto puede incluir la suspensión del paciente para tomar sus drogas, errores al prescribir, ineficiencia de los sistemas de salud para suministrar las drogas de forma efectiva o, raramente, una mala absorción de las drogas. (20)

Se ha asumido que el riesgo de que un organismo adquiriera resistencia a dos agentes, es el producto del riesgo de adquirir resistencia a cada uno por separado. El riesgo de que emerjan mutantes en pacientes, depende en parte a este riesgo y a la carga de la población bacteriana en los diferentes compartimentos. (16)

El tipo de mutación que surge, depende de la concentración de antibiótico. Se ha mostrado que a diferentes concentraciones de antibióticos, diferentes espectros de mutantes son seleccionadas. La proporción en que surge la resistencia difiere entre todos los agentes antituberculosos, siendo mayor para etambutol y menor para rifampicina y quinolonas. (16)

En pacientes infectados con un organismo que ha adquirido resistencia a un agente, es más probable que este adquiera resistencia a otro antibiótico. Una vez que un determinante de resistencia se ha adquirido, un segundo, es más fácil de adquirir, y si el paciente continúa interrumpiendo su terapia y hay poca concentración de fármaco activo disponible para suprimir la aparición de mutantes resistentes, estos emergerán. (16)

A pesar del gran número de diferentes mutaciones posibles, tres son encontradas en más del 70% de los aislados clínicos. Algunas cepas resistentes pueden permanecer en un paciente siendo tratado, ya que la cepa más capacitada para sobrevivir y dominar en el cultivo clínico, es determinada por el déficit fisiológico impuesto en la cepa por la mutación. Algunos autores concluyen que el grado de resistencia es relativo a la virulencia de las cepas, pero se ha encontrado que cepas con un alto grado de resistencia fueron menos virulentas. (16)

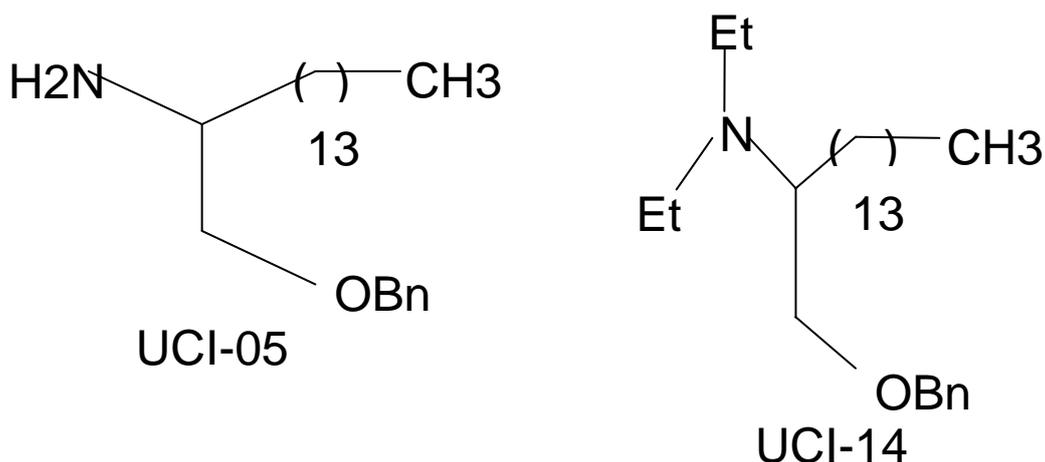
La aparición de cepas multifármaco-resistentes de *M. tuberculosis*, por ejemplo, resistentes al menos a isoniazida y rifampicina, ocasiona serios problemas al control de la tuberculosis e incrementa la demanda de nuevas quimioterapias. Fluoroquinonas, agentes como la ciprofloxacina y la ofloxacina son eficientes en contra de *M. tuberculosis*, incluyendo las infecciones causadas por cepas multifármaco-resistentes. (28)

La fármaco resistencia en tuberculosis posee un significado importante para la salud humana, es importante entender como emerge, para poder revertirla. (19)

La base genética de la resistencia a algunos agentes antituberculosos no es completamente conocida por lo que hay una considerable cantidad de investigación que realizar con respecto a los mecanismos mediante los cuales la resistencia es adquirida. (16)

## UCI-05 Y UCI-14

Estos son unos agentes lipídicos antituberculosos sintéticos seleccionados de una serie de 16 aminoalcoholes y diaminas lipídicas.



Todas las investigaciones de los compuestos y la síntesis fueron realizadas en la Universidad de Salamanca, España. Aunque aun no se han realizado suficientes estudios, se cree que el efecto antimicrobiano de estos compuestos podría radicar en la interacción con los lípidos de la membrana de *M. tuberculosis* principalmente con los ácidos micólicos, fosfolípidos exteriores y fosfolípidos de la membrana. También se ha observado que tienen efecto sobre la inhibición de la fosfolipasa A2 por lo cual podrían actuar como inmunomoduladores. Se realizaron las pruebas de actividad antimicrobiana *in vitro* y la determinación de la toxicidad aguda en ratón en el Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste- IMSS.

Los resultados arrojados por las pruebas de actividad *in vitro* demuestran actividad contra la cepa virulenta H37Rv y contra una cepa multifármaco-resistente (resistente a estreptomina, isoniazida, rifampicina, etambutol y

pirazinamida) siendo la concentración mínima inhibitoria (MIC) de 1.25 $\mu$ g/mL para ambas cepas. También fueron realizadas pruebas de solubilidad del compuesto, siendo el mejor vehiculo el aceite de maíz, mediante el cual, se realizaron las pruebas de toxicidad aguda en ratón de la que se obtuvo que utilizando dosis de hasta 2g/kg de los compuestos no se observó toxicidad aguda. Las perspectivas para realizar más investigaciones abarcan la realización de las pruebas de toxicidad crónica, actividad anti tuberculosa en macrófagos, realizar la farmacocinética, genotoxicidad, mecanismo de acción y finalmente los ensayos clínicos. (29)

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya que la tuberculosis es una enfermedad ampliamente distribuida y que han surgido cepas mutantes multifármaco-resistentes se ha convertido en una necesidad primordial, el desarrollo de nuevos fármacos que puedan ser más eficientes que los actuales para combatir esta enfermedad.

El fármaco probado en este estudio resultó ser activo *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv y una cepa multifármaco-resistente, con una MIC baja y presentó una toxicidad en ratón muy baja. Es por todo ello que resulta promisorio el realizar pruebas *in vivo* del fármaco que pudiera fungir como un adyuvante en el tratamiento convencional y una opción muy valiosa para el tratamiento de infecciones con cepas multifármaco-resistentes.

## OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad *in vivo* de los compuestos UCI-05 y UCI-14 mediante la medición del porcentaje de las áreas neumónicas y la cuantificación de unidades formadoras de colonias en un modelo murino de tuberculosis.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar si los compuestos UCI-14 y UCI-05 son capaces de reducir el daño tisular provocado por la enfermedad.
- Evaluar si los compuestos UCI-05 y UCI-14 tienen un efecto bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo murino.
- Evaluar si los compuestos UCI-05 y UCI-14 tienen actividad bactericida contra una cepa multifármaco-resistente en un modelo murino.
- Evaluar si los compuestos UCI-05 y UCI-14 tienen respuesta en combinación con los fármacos convencionales.

## HIPÓTESIS

- Los compuestos UCI-14 y UCI-05 son capaces de reducir el daño tisular provocado por la enfermedad.
- Los compuestos UCI-05 y UCI-14 tienen un efecto bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis*.
- Los compuestos UCI-05 y UCI-14 tienen actividad bactericida contra una cepa multifármaco-resistente.
- Los compuestos UCI-05 y UCI-14 tienen respuesta en combinación con los fármacos convencionales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Crecimiento de las Mycobacterias y preparación para la inoculación en ratones***

Se tomó una colonia de micobacterias del medio Lowestein-Jensen y se colocó en un tubo con perlas de vidrio estériles y medio estéril que se preparó según las indicaciones del fabricante. Se homogenizó, se vertió a botellas de cultivo y se agitó con vórtex. Se tomó el sobrenadante y se colocó en medio 7H9 que se puso en agitación a 37°C. Se detuvo la incubación cuando los cultivos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento. Se transvasaron los cultivos de micobacterias a tubos de 50 ml que se centrifugaron. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en PBS -Tween 80 0.05% y se dejaron en agitación a 37 °C toda la noche. Se agitaron los tubos con vórtex 1 min. y se dejaron reposar 1 min. Se repitió esto 10 veces y se centrifugó a 2500 rpm por 15 min después de lo cual se lavó el botón con PBS estéril y se resuspendió. Se tomó una alícuota y se diluyó 1:100. De esta dilución se tiñó con Zielh-Neelsen para contar. Se ajustó a  $10^7$  con PBS estéril, se dividió en alícuotas y se guardó a -70 °C hasta su uso.

## ***Procedimiento de infección intratraqueal y almacenamiento de ratones***

La cepa virulenta de referencia *M. tuberculosis* H37Rv fue adquirida de la ATCC, mientras que la cepa MDR fue donada por el Dr. Salvador Said del Instituto de Investigaciones Biomédicas del Noreste del IMSS. Antes de usarlas las bacterias fueron recontadas y su viabilidad fue corroborada como se mencionó antes.

Ratones machos BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron anestesiados con 56 mg/Kg. de pentotal sódico administrado por vía peritoneal, la tráquea se expuso quirúrgicamente y a través de ella se inyectaron con jeringa de insulina  $2.5 \times 10^5$  bacterias viables suspendidas en 100  $\mu$ l de PBS. Posteriormente la incisión quirúrgica se suturó con seda estéril. Los ratones infectados se almacenaron en cajas con microaisladores conectados a un sistema de presión negativa. Todo este procedimiento y los sacrificios posteriores se realizaron siempre en campanas de seguridad biológica P3.

Después de dos meses de infección los animales fueron distribuidos al azar en grupos de 10 animales. Los grupos experimentales fueron:

- 1.- Grupo control que sólo recibió el diluyente (PBS estéril).
- 2.- Grupo infectado con cepa H37Rv tratado con el nuevo producto con actividad antimicrobiana (por separado UCI-05 y UCI-14 a una dosis de 10mg/kg).

- 3.- Grupo infectado con cepa H37Rv tratado con antibióticos convencionales antituberculosos: rifampicina (10 mg/Kg.), isoniazida (10 mg/Kg.), y pirazinamida (30 mg/Kg.), administrados diariamente por sonda intragástrica,
- 4.- Grupo infectado con cepa H37Rv tratado con el nuevo producto con actividad antimicrobiana más antibióticos convencionales anti-tuberculosos.
- 5.- Grupo infectado con la cepa MDR tratado con el nuevo producto con actividad antimicrobiana (UCI-05 a una dosis de 10mg/kg).
- 6.- Grupo control infectado con la cepa MDR que solo recibe el diluyente (PBS estéril).

### ***Preparación del tejido pulmonar para estudio histológico y morfométrico.***

Para estudio histológico, los pulmones de cuatro ratones en dos meses de tratamiento fueron fijados por perfusión intratraqueal con formaldehído al 10% disuelto en amortiguador de fosfatos salino (PBS), el tejido fue deshidratado con alcoholes de concentración creciente, se incluyeron en parafina, se cortaron a 5  $\mu$ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina. En estas laminillas histológicas se determinó la superficie pulmonar afectada por neumonía, utilizando un equipo automatizado de análisis de imagen Zidas Zeiss (Carl Zeiss Ltd, Herts, UK) y Q500IW Leica.

## ***Cuantificación de bacterias vivas en el pulmón por determinación de unidades formadoras de colonia (UFC)***

Se preparó medio Middlebrook 7H11 (Difco Labs, Detroit, MI, USA) según las indicaciones del fabricante, se adicionó glicerol, se esterilizó y se adicionó enriquecimiento OADC. Se vertió en cajas petri (13 mL aprox.), se dejó gelificar y se pusieron a prueba de esterilidad a 37°C por 24 horas. Se guardaron en refrigeración hasta su uso (no más de una semana).

El pulmón derecho o izquierdo de cuatro ratones a 2 meses de tratamiento se usarón para cuantificar el número de bacterias viables. Los pulmones se homogenizaron con un poltrón (Kinematica, Luzern, Switzerland) en tubos Falcon estériles con solución salina. Se lavó la punta del politrón antes y después de homogeneizar cada muestra.

Una vez homogenizados los tejidos se tomaron alícuotas de 450 µL, diluyendo 1:10 en forma seriada en tubos Eppendorf ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  etc.) y se sembraron 20 µL de las diluciones preparadas así como del concentrado, todo por duplicado. Una vez absorbida la gota, se invierten las cajas y se incuban a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y se leen a los días 15 y 21.

Se contó el número de colonias con las siguientes características:

Blancas, secas, planas y de bordes irregulares.

## ***Análisis Estadístico***

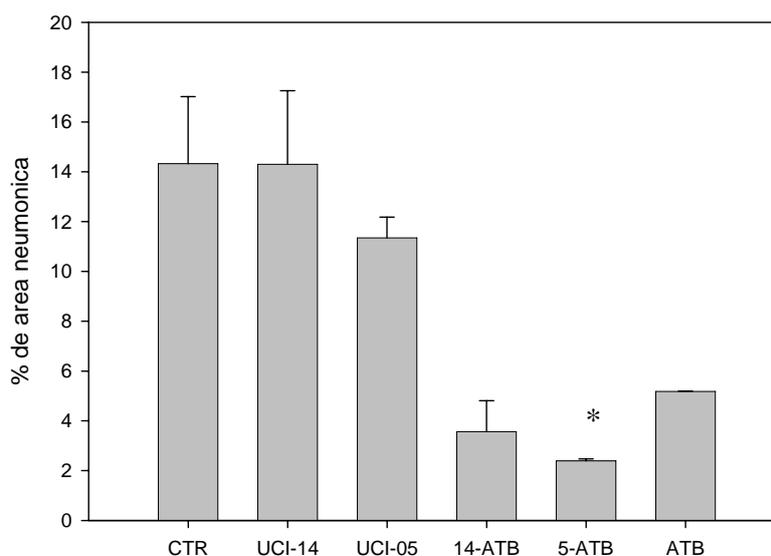
El análisis de los datos se realizó con la ayuda del software Sigma Stat Versión 2.0 1992/ 1997 SPSS. Se realizó un análisis de ANOVA por una vía para el análisis de la morfometría y las Unidades Formadoras De Colonias para apreciar las diferencias entre grupos experimentales y se realizó la prueba de Dunnett para comparar los grupos con un control experimental. En el caso de las cepas MDR se realizó una prueba de T de student para comparar los dos grupos experimentales disponibles.

## RESULTADOS

Nombre del Grupo	Media	Desviación Estándar	ANOVA Por una vía (P)	Prueba de Dunnett (P)
Control	14.38	2.685	0.009	-----
UCI-14	14.30	2.955	0.009	>0.05
UCI-05	11.41	0.826	0.009	>0.05
14-ATB	3.27	1.241	0.009	>0.05
5-ATB	2.36	0.079	0.009	<0.05
ATB	5.18	0.015	0.009	>0.05

**Tabla A.** Grupos experimentales evaluados y las pruebas estadísticas realizadas.

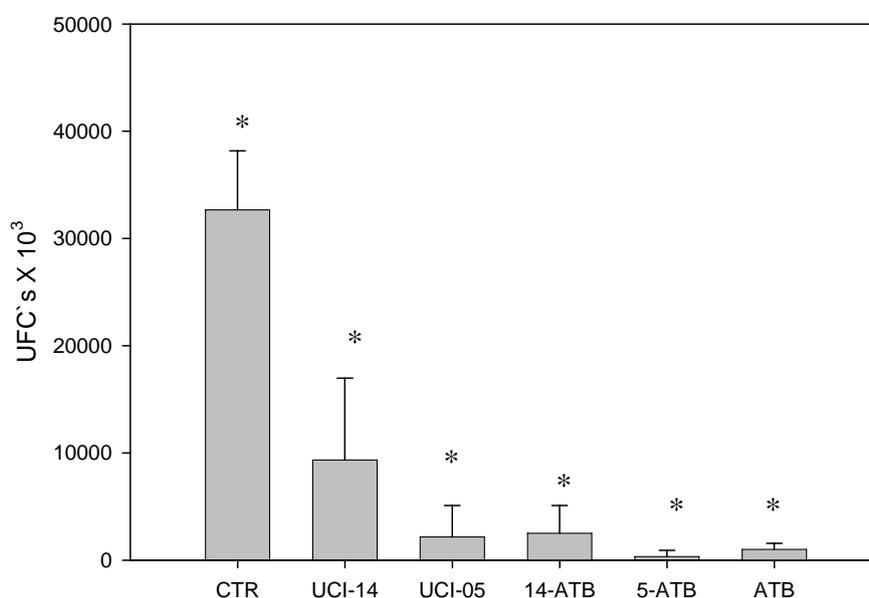
Actividad *in vivo* de los compuestos UCI-05 Y UCI-14  
Infección con la cepa H37Rv



**Gráfico 1.** Compuestos UCI-05 y UCI-14 administrados a una dosis de 10mg/kg . El porcentaje de neumonía fue medido por un equipo automatizado de análisis de imagen Zidas Zeiss (Carl Zeiss Ltd, Herts, UK) y Q500IW Leica. Las barras representan los grupos experimentales con su desviación estándar. Las barras que tienen \* presentan diferencia significativa entre grupos.

Nombre del Grupo	Media	Desviación Estándar	ANOVA Por una vía (P)	Prueba de Dunnett (P)
Control	32666.66	5507.57	<0.001	-----
UCI-14	9333.33	7637.62	<0.001	<0.050
UCI-05	2166.66	2929.36	<0.001	<0.050
14-ATB	2500	2598.07	<0.001	<0.050
5-ATB	333.33	576.77	<0.001	<0.050
ATB	1000	576.77	<0.001	<0.050

Actividad *in vivo* de los compuestos UCI-05 y UCI-14  
Infección con cepa H37Rv

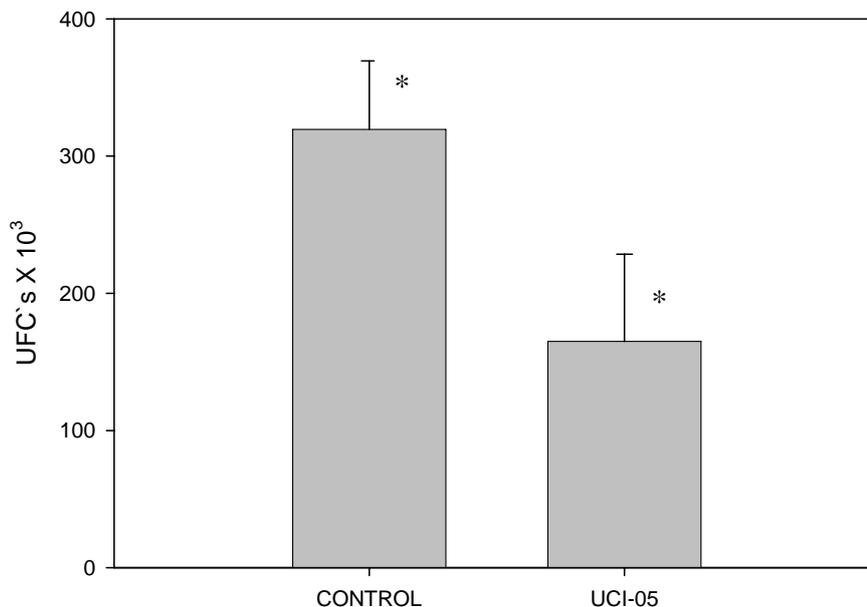


**Gráfico 2.** Compuestos UCI-05 y UCI-14 administrados a una dosis de 10mg/kg. Las barras representan los grupos experimentales con su desviación estándar. Las barras que tienen \* presentan diferencia significativa entre grupos.

Nombre del Grupo	Media	Desviación Estándar	Prueba T de student
Control	319.5	49.80	0.009
UCI-05	165	63.45	0.009

**Tabla C.** Grupos experimentales evaluados y las pruebas estadísticas realizadas.

Efecto del compuesto UCI-05.  
Infección con cepa MDR.  
1 mes de tratamiento



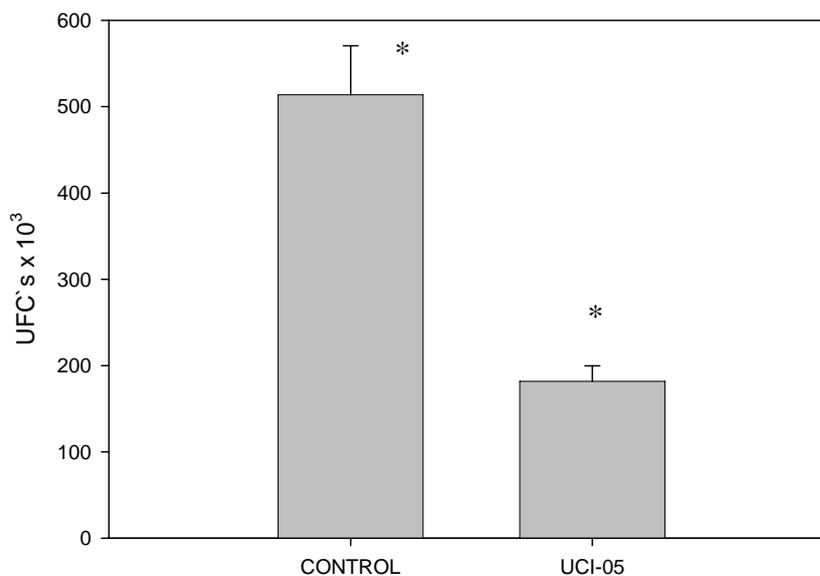
**Grafico 3.** Compuesto UCI-05 administrado a una dosis de 10mg/kg. Las barras representan los grupos experimentales con su desviación estándar.

Las barras que tienen \* presentan diferencia significativa entre grupos.

Nombre del Grupo	Media	Desviación Estándar	Prueba T de student
Control	513.75	56.62	<0.001
UCI-05	181.75	17.95	<0.001

**Tabla D.** Grupos experimentales evaluados y las pruebas estadísticas realizadas.

Efecto del compuesto UCI-05.  
Infección con cepa MDR.  
2 meses de tratamiento



**Gráfico 4.** Compuesto UCI-05 administrado a una dosis de 10mg/kg. Las barras representan los grupos experimentales con su desviación estándar. Las barras que tienen \* presentan diferencia significativa entre grupos.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa y contagiosa, que ataca principalmente a los pulmones, pero puede comprometer a cualquier otra parte del cuerpo. (30)

Esta enfermedad es causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Este organismo tiene un tiempo de replicación prolongado, aproximadamente 20 horas (3). La característica química más llamativa de las micobacterias es la abundancia de lípidos en la pared celular. (5)

Se estima que, aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, ocurriendo más de 10 millones de casos nuevos y 3.5 millones de muertes por esta causa. Para América Latina, los casos nuevos son de alrededor de 650 mil por año y 50 mil defunciones.(1) En México se observa una incidencia que se ha incrementado en los últimos 5 años, apreciándose un aumento del 24% en el número de casos y las tasas de morbilidad se modificaron de 14 a 18.7 casos por cada 100,000 habitantes.(30)

México introdujo el esquema de tratamiento primario de corta duración con la administración de tres fármacos: isoniazida, rifampicina y pirazinamida, con reducción del periodo de tratamiento de 12 a 6 meses, que comprobó una eficacia mayor al 90% de curación, lo que previene la fármaco resistencia al evitar la monoterapia.(30)

Debido a todo el preámbulo anterior es que es necesaria la investigación en nuevos fármacos que sean más eficaces contra esta enfermedad en menos tiempo. Los compuestos que se prueban en este ensayo son totalmente novedosos; las pruebas de toxicidad *in vitro*, demuestran su alta actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* teniendo poca toxicidad en ratón. (29)

La finalidad de este trabajo es la evaluación de dos nuevos compuestos antituberculoso (UCI-O5 y UCI-14) que podrían ser efectivos contra cepas multifármaco-resistentes y tener mejores resultados bactericidas que el esquema convencional (isoniazida, rifampicina y pirazinamida).

Para la realización de este experimento se empleó un modelo animal murino debido a que proporciona una gran cantidad de ventajas con respecto a otros modelos animales existentes para estudiar la tuberculosis. (4) El modelo empleado ha sido finamente estandarizado de tal manera que se han podido identificar las fases de la enfermedad con sus características inmunopatológicas y se ha probado su efectividad en múltiples estudios, no sólo en la búsqueda de nuevos fármacos con actividad antimicrobiana sino para ampliar los conocimientos existentes sobre la tuberculosis (31, 32,33)

Las mediciones de la efectividad del fármaco se realizaron a través de la carga bacteriana viable existente en los pulmones de los ratones después de la administración del fármaco y la medición del porcentaje de neumonía presente

también bajo las mismas condiciones. Esto es debido a que se considera que un fármaco efectivo debe de ser capaz de matar la mayor cantidad de bacterias posible y, como consecuencia, reducir el daño que estas provocan en el pulmón que principalmente se aprecia como una neumonía generalizada y la aparición de granulomas. (31) Se decidió no medir la cantidad de granulomas debido a que este modelo animal no reproduce los granulomas como los de la enfermedad humana (4).

El tiempo al cual se realizaron dichas mediciones fue a los 2 meses después de la infección debido a que en este tiempo se ha logrado consolidar un infección crónica en el animal que es la etapa en la que por lo regular se diagnostica a los pacientes y por ello es que resulta importante que el fármaco sea efectivo bajo estas condiciones (31).

Los fármacos probados en este estudio ya habían sido estudiados en su capacidad bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis in vitro* y en su toxicidad por lo que ya se sabía que estos eran eficientes (29) y podría resultar prometedores *in vivo* lo cual resultó gratamente comprobado mediante este estudio.

Por el momento no se han realizado estudios sobre el posible daño histopatológico que los fármacos por si mismos pueden producir, sin embargo, las pruebas de toxicidad realizadas en ratón arrojaron que estos fármacos no

presentaron toxicidad aguda hasta a dosis de 2g/kg con una MIC de 1.25 $\mu$ g/mL (29)

Los resultados obtenidos indican una disminución significativa estadísticamente de la carga bacteriana viable en los pulmones con respecto a un control siendo el fármaco más eficaz el UCI-05 ya que éste disminuye la carga bacteriana de aproximadamente 35 a 2 millones de unidades formadoras de colonias (UFC's). El fármaco UCI-14 también logró disminuir las UFC's de forma estadísticamente significativa de aproximadamente 35 a 9 millones de UFC's. Lo que esto nos indica es su alta capacidad bactericida, que aunque ya había sido probada *in vitro*, en este ensayo *in vivo*, corrobora su efectividad matando una gran cantidad de bacterias alojadas en los pulmones de los ratones. No se sabe exactamente a que poblaciones bacterianas afecta el fármaco, si son las tisulares, las que están dentro de los granulomas o las de los macrófagos, sin embargo, dentro de las perspectivas de este trabajo se encuentra la determinación de la capacidad del fármaco para actuar sobre macrófagos infectados para observar su capacidad de actuar intracelularmente.

Otro objetivo que se planteó fue el estudiar si estos fármacos podrían funcionar como adyuvantes al tratamiento convencional (isoniazida, rifampicina, pirazinamida) siendo efectivos en combinación con éstos; esto se realizó administrando el fármaco de estudio más el tratamiento convencional a la par de un control de antibióticos para poder realizar la comparación. Los resultados indican una diferencia significativa estadísticamente entre los grupos estudiados siendo nuevamente el fármaco UCI-05 más antibióticos

convencionales los que lograron disminuir en mayor cantidad las UFC's de  $6.6 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  aproximadamente. En este caso el fármaco UCI-14 no fue capaz de disminuir la carga bacteriana más que el esquema de fármacos convencionales. Nos pareció muy interesante adicionar este grupo de estudio a nuestro trabajo ya que, aunque el esquema convencional ha mostrado una efectividad de hasta el 90% de cura, éste sigue necesitando al menos 6 meses de tratamiento, que en ocasiones dificulta el apego y la consistencia provocando con ello, que éste fracase y pueda presentarse la aparición de cepas multifármaco- resistentes. A lo que nosotros apostamos es a aumentar la potencia y efectividad del esquema convencional con el fármaco UCI-05 y con ello reducir el tiempo de tratamiento que comúnmente es necesario para curar esta enfermedad.

Otro parámetro estudiado fue la morfometría para la cual se obtuvo que sólo el tratamiento de UCI-05 más antibióticos convencionales resulto estadísticamente significativo con respecto a un control no tratado. Los gráficos muestran una tendencia a la disminución del porcentaje de áreas neumónicas en todos los demás grupos experimentales, especialmente en aquellos en los que se emplean los fármacos de estudio más el esquema convencional, sin embargo, no fue posible realizar la comparación estadística de estos grupos debido a la pequeña cantidad de datos obtenidos del experimento por lo que se sugiere realizar nuevas mediciones con la finalidad de poder ser concluyente con la ayuda de la estadística. Una desventaja de este método de medir la efectividad de un fármaco es la subjetividad que se tiene al realizarla ya que la experiencia juega un papel fundamental para poder discernir morfológicamente

las áreas neumónicas de otros daños titulares que pueden estar presentes en una preparación. Este parámetro se emplea para observar la mejoría que conlleva la disminución de la carga bacilar viable en los pulmones, sin embargo, con fines de la evaluación de la efectividad del fármaco podría no ser un indicador directo de ello, ya que las lesiones pueden no sanar inmediatamente después de que las bacterias han sido eliminadas y también pueden deberse a la respuesta del propio organismo a la enfermedad, lo cual puede variar significativamente entre cada individuo.

Otro de los objetivos fue probar los fármacos contra una cepa MDR, cabe mencionar que para la realización de este experimento se eligió solamente el fármaco que mostró mayor efectividad en las pruebas anteriores, siendo el elegido UCI-05, también se decidió probar al fármaco a 1 y 2 meses de tratamiento debido a que la progresión de la enfermedad es distinta con este tipo de cepas y que se requiere saber a que tiempo es que el fármaco es más efectivo o si es capaz de reducir las cuentas viables de bacterias en un menor tiempo.

Los resultados observados muestran una disminución estadísticamente significativa de las cuentas viables de bacterias resistentes a los fármacos convencionales a 1 y 2 meses de tratamiento con el fármaco UCI-05 lo cual tiene una implicación importantísima para el tratamiento de este tipo de cepas que hasta ahora han causado una gran cantidad de muertes debido a las pocas alternativas para su erradicación.

Si bien es cierto que en conjunto los resultados mostrados en este ensayo son muy prometedores para acortar el tratamiento de *M. tuberculosis* y tratar cepas resistentes, aun es necesario realizar una gran cantidad de estudios que nos revelen muchas otras preguntas que surgieron durante la realización del presente experimento ¿Cuál es el mecanismo de acción mediante el cual actúa este fármaco? ¿Es capaz de actuar sobre las bacterias que se encuentren dentro de los macrófagos? ¿Su toxicidad crónica será igual de efectiva que la aguda? ¿Cuáles serán algunos de sus efectos adversos? entre otras.

## CONCLUSIONES

Los compuestos UCI-05 y UCI-14 no redujeron significativamente el daño tisular representado por áreas neumónicas por si solos, sin embargo, cuando fueron administrados en conjunto con el esquema convencional de antibióticos, UCI-05 mostró diferencias significativamente estadísticas con respecto a un control.

Los compuestos UCI-05 y UCI-14 por si solos mostraron un efecto bactericida contra *M. tuberculosis* al poder reducir significativamente las cuentas de bacterias viables en los pulmones de los animales. Al administrarse en combinación con el esquema convencional el compuesto UCI-05 fue capaz de reducir significativamente las cuentas de bacterias vivas en pulmón con respecto a un control de antibióticos, no obstante, el compuesto UCI-14 también logró un decremento en las cuentas, éste no resultó significativamente diferente con respecto a su control.

Al probar el fármaco UCI-05 contra una cepa multifármaco resistente resultó eficiente al reducir significativamente las cuentas de bacterias vivas en los pulmones de los ratones infectados con respecto a su control tanto a 1 como a 2 meses de tratamiento.

## REFERENCIAS

1. WHO report 2002; Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing, Génova: World Health Organization, 2002.
2. Burwen DR, Bloch AB, Griffin LD. National trends in the concurrence of tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 1995; 155: 1281-1286.
3. Tanger IB. Current concepts in the treatment of tuberculosis. *West J Med* 1997; 146:461-465.
4. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microb Rev* 2003; 16:463-496.
5. Bernard D. Tratado de microbiología. 4ª ed. Barcelona, España: Masson; 1996: 619- 643.
6. Segal W. Pathogenic and immunogenic differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown *in vivo* and *in vitro*. *Am Rev Tuberc Pulm Dis* 1997; 75:495-500.
7. Cole ST. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*; 1998; 393: 537-544.
8. David HI. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol* 1990; 20:810-814.
9. Flynn A. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect and Immun* 2001; 69:4195-4201.

10. G. A. Rook-Hernandez-Pando. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 1996; 50:259-284.
11. Peter M. Small. How molecular epidemiology has changed what we know about tuberculosis. *Antimicrob Agen And Chem* 2000; 179: 256-259.
12. Goodman&Guilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9<sup>a</sup> ed. Mexico, D.F: Mc Graw - Hill; 1996: 1225-1245.
13. Andrew DM. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. *Antimicrob Agen and Chem* 2001; 45:1943-1946.
14. Stead W. The origin and erratic global spread of tuberculosis, How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med* 1997; 18: 65-77.
15. Kaye K. Tuberculosis control: relevance of classic principles in an era of acquired immunodeficiency syndrome and multidrug resistance. *Epidemiol Rev* 1996; 18: 52-63.
16. Stephen HG. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob Agent And Chem* 2002; 46:267-274.
17. Dye C. and MA. Espinal. Will tuberculosis become resistant to all antibiotics? *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2000; 267: 1-9.
18. Orme LM. The immune response to tuberculosis in animal models. In W. N. Rom. and S. Garay, *Tuberculosis*. Little, Brown and Co., Boston Mass. 1996; 269-280.
19. Coker RJ. *From chaos to coercion: detention and control of tuberculosis*. New York: St Martin's Press, 2000.

20. Edward DC. Current medical treatment for tuberculosis. *BMJ*. 2002; 323:1282-1286.
21. Mc. Dermott W, Tompsett R. Activation of pyrazinamide in acidic environments in vitro. *Am Rev Tuberc* 1994; 70: 748-754.
22. Mitchison DA. Basis mechanisms of chemotherapy. *Chest* 1999; 79:771-781.
23. Lanfranco F. Activities of Moxifloxacin alone and in combination with other antimicrobial agents against Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection in BALB/c Mice. *Antimicrob Agents and chemother* 2003; 47: 360-362.
24. Fox W. The chemotherapy of pulmonary tuberculosis. A review. *Chest* 1999; 76: 785-796.
25. Jindani A. Aber VR, Edwards EA, The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 121: 939-949.
26. Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. *Eur Respir J* 2002; (in press)
27. Edwards PQ. Tuberculosis, now and the future: short-term therapy, preventive therapy, and bacillus Calmette-Guérin. *Bull NY Acad Med* 1997; 53: 526-531.
28. Iseman M. Drug-resistant tuberculosis, a clinical guide to tuberculosis. Baltimore: Lippincott William & Wilkins; 2002.

29. Hernández Pando R. Descripción de nuevos agentes antituberculosos, su aplicación, terapéutica combinada, sus propiedades farmacotoxicológicas y su preparación. Reporte técnico ante laboratorios Silanes S.A. 2006.

30. Secretaría de Salud, México. Instituto de Salud del Estado de Chiapas.

[www.insp.mx/](http://www.insp.mx/)

31. Hernández Pando R. Determinación de la actividad antituberculosa de compuestos puros en un modelo murino. Reporte técnico. 2005

32. Hernández Pando R. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary pathology. Immunology. 1996; 89:22-33.

33. Hernández Pando R. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. Infect and Immun 1997; 6: 84-90.