



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS COMO
INMUNOTERAPIA EN EL
TRATAMIENTO CONTRA LA
TUBERCULOSIS EN MODELO ANIMAL**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A
CÉSAR E. RIVAS SANTIAGO

Tutor: Dr. Rogelio Hernández Pando



MÉXICO, D. F.

Noviembre 2011



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.

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS COMO INMUNOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO CONTRA LA TUBERCULOSIS EN MODELO ANIMAL

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Rogelio Hernández Pando en el laboratorio de Patología experimental, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y la Nutrición Salvador Zubirán.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Rogelio Hernández Pando	Instituto Nacional de Nutrición
Dr. Fernando López Casillas.	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Bruno Rivas Santiago, de la Unidad de Ciencias Médicas del IMSS, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos *in vitro*.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Diana Aguilar León en los experimentos *in vivo*.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (84456). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 26-enero-2012

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM.
Vocal	Dr. Clara Ines Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Vocal	Dr. Fernando Esquivel Guadarrama	Facultad de Medicina, UAEM.
Vocal	Dr. Manuel Jimenez Estrada	Instituto de Química, UNAM.
Secretario	Dra. Gloria Soldevila Melgarejo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

RELACIÓN DE TABLAS y FIGURAS..

		Pág.
Figura 1	Representación esquemática de la pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
Figura 2	Representación de la estructura de α -defensinas	19
Figura 3	Esquema de la estructura de β -defensinas.	19
Figura 4	Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.	22
Tabla 1	Propiedades de las defensinas murinas	26
Figura 5	Inducción de beta-defensinas en neumocitos tipo 2 por L-Isoleucina.	31
Figura 6	Diseño esquemático para la producción de los diferentes péptidos antimicrobianos sintéticos.	34
Figura 7	Efecto <i>in vivo</i> de la inducción de defensinas sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47
Figura 8	Inducción de beta-defensinas por L-Isoleucina en ratones sanos.	48
Figura 9	Efecto terapéutico del tratamiento con L-Isoleucina en ratones infectados con cepas drogo-sensibles.	50
Figura 10	Efecto de la L-Isoleucina al administrarse con el tratamiento convencional en ratones infectados con cepas drogo-sensibles	52
Figura 11	Comparación del daño neumónico en los diferentes tratamientos.	53
Figura 12	Comparación de la expresión génica de las beta-defensinas con los diferentes tratamientos.	54
Figura 13	Expresión génica de citocinas pro-inflamatorias en los diferentes tratamientos.	55
Figura 14	Unidades Formadoras de Colonias en ratones tratados con L-Isoleucina e infectados con cepas multidrogo-resistentes	56
Figura 15	Expresión génica de defensinas y citocinas en ratones tratados con L-Isoleucina e infectados con cepas multidrogo-resistentes	57
Figura 16	Concentración mínima inhibitoria de los péptidos sintéticos en contra de <i>M. tuberculosis</i> .	58
Figura 17	Micrografía electrónica de bacterias expuestas a los péptidos antimicrobianos sintéticos.	59
Figura 18	Citotoxicidad de los péptidos sintéticos en neumocitos tipo 2.	60
Figura 19	Efecto terapéutico de los péptidos sintéticos en cepas drogo-sensibles después de un mes de tratamiento.	61-62
Figura 20	Efecto terapéutico de los péptidos sintéticos en cepas drogo-sensibles después de 2 meses de tratamiento.	63

INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO:	9
TUBERCULOSIS.....	9
INMUNIDAD INNATA.....	12
<i>Macrófagos en la respuesta inmune innata.</i>	14
<i>Células Dendríticas en la respuesta inmune innata.</i>	15
<i>Neutrófilos en la respuesta inmune innata.</i>	16
<i>Péptidos antimicrobianos.</i>	17
<i>α-Defensinas.</i>	18
<i>β-Defensinas.</i>	19
CATELICIDINAS.....	21
MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	22
RESISTENCIA A LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	23
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	24
HOMOLOGÍA DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENTRE EL RATÓN Y EL HUMANO.....	25
IMPORTANCIA DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA TUBERCULOSIS.....	26
L-ISOLEUCINA.....	29
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS.....	32
JUSTIFICACIÓN	36
HIPÓTESIS	36
OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVOS PARTICULARES	37
METODOLOGÍA	38
CULTIVO DE CÉLULAS DEL EPITELIO ALVEOLAR (NEUMOCITOS TIPO 2).....	38
INFECCIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES Y DETERMINACIÓN DE SU CAPACIDAD BACTERICIDA POST ESTIMULACIÓN CON L-ISOLEUCINA.....	38
OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS E2, E6 Y CP26 PARA <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> CEPA H37RV.....	39
PROCEDIMIENTO DE INFECCIÓN INTRATRAQUEAL Y APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS A RATONES.....	40
EXTRACCIÓN DE RNA.....	41
SÍNTESIS DE CDNA.....	42
RT-PCR PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	43
RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE MBD-3, MBD-4 Y CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS.....	43
PREPARACIÓN DEL TEJIDO PULMONAR PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	45
CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS VIVAS EN EL PULMÓN POR DETERMINACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC).....	45
RESULTADOS	46
DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BACTERICIDA POR LA INDUCCIÓN DE DEFENSINAS EN CÉLULAS EPITELIALES INFECTADAS CON <i>M. TUBERCULOSIS</i>	46
DETERMINACIÓN DEL TIEMPO Y CONCENTRACIÓN DE L-ISOLEUCINA A LA CUAL EXISTE UNA MAYOR INDUCCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS <i>IN VIVO</i>	47
TRATAMIENTO CON L-ISOLEUCINA A RATONES INFECTADOS CON <i>M. TUBERCULOSIS</i> CEPA H37 RV.....	49
EFECTOS DE LA L-ISOLEUCINA AL APLICARSE EN COMBINACIÓN CON LA TERAPIA CONVENCIONAL, EN RATONES INFECTADOS CON <i>M. TUBERCULOSIS</i>	51
EFECTOS DE LA L-ISOLEUCINA AL APLICARSE EN RATONES INFECTADOS CON CEPAS MULTIDROGORESISTENTES.....	55
EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS <i>IN VITRO</i>	57

EFFECTO TERAPÉUTICO DE LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS EN RATONES INFECTADOS CON <i>M.</i> <i>TUBERCULOSIS</i> CEPA H37Rv.	61
ANÁLISIS DE RESULTADOS.	65
CONCLUSIÓN.	73
BIBLIOGRAFÍA.	74

Resumen.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de importancia mundial. Existen alrededor de 8 millones de nuevos casos y aproximadamente 1.6 millones de muertes anuales. Además la aparición de cepas MDR y XDR han dificultado el control de esta enfermedad. Este problema nos motivo a la búsqueda de nuevas estrategias para su tratamiento. Una de estas estrategias es la inmunoterapia con péptidos antimicrobianos, los cuales son pequeños péptidos catiónicos con actividad microbicida y propiedades inmunoreguladoras. El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad terapéutica de la inducción de defensinas, así como de 3 péptidos antimicrobianos sintéticos (E2, E6 y CP26) en un modelo bien estandarizado de tuberculosis pulmonar murina. Además, se intentó acortar la quimioterapia convencional utilizando L-isoleucina como adyuvante. Para lograr este objetivo infectamos ratones BALB/c con *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv o con cepas multidrogoresistentes por vía intratraqueal y después de 60 días de infección cuando la enfermedad se encontraba en fase progresiva, los ratones fueron tratados intratraquealmente con 250 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ o con 32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cada uno de los péptidos cada 48h. Se sacrificaron grupos de 6 ratones a los 7, 15, 30 y 60 días después de iniciado el tratamiento, se obtuvieron los pulmones y se determinó la carga bacilar mediante unidades formadoras de colonia, la expresión genética utilizando RT-qPCR y se cuantificó el daño pulmonar por morfometría automatizada. Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que la administración de la L-isoleucina induce un incremento significativo en la expresión de β -defensinas murinas 3 y 4, lo que correlaciona con el decremento en la carga bacilar y el daño pulmonar de los ratones infectados tanto con la cepa H37Rv como con las cepas MDR. Por otra parte pudimos demostrar que el uso péptidos antimicrobianos sintéticos tiene un potente efecto terapéutico en ratones infectados con cepas drogo-sensibles. Concluyendo que la inmunoterapia mediante el uso de péptidos antimicrobianos es una opción latente en el tratamiento de esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis (Tb) es un problema muy importante de salud pública. En el año 2007 se reportó que existían alrededor de 8.8 millones de casos nuevos alrededor del mundo, de los cuales 741,000 se presentan en personas infectadas con VIH. De los nuevos casos el 80% viven en regiones de África, Asia y el Pacífico occidental. Además, se menciona la existencia de 14.6 millones de casos prevalentes y se detectó la muerte de 1.7 millones de pacientes infectados con esta enfermedad [5].

En Latinoamérica en el 2004 el número de casos notificados a la OPS/OMS ha fluctuado en general entre 230,000 y 250,000 casos nuevos de tuberculosis por año. Con base en las notificaciones producidas por los países de la región en 1996, se observó que existen en América latina, países con diferente grado de morbilidad, en la situación de tuberculosis que permite su clasificación. Dentro de los cuales, México se encuentra entre los países con una de las tasas más altas, sólo por debajo de Bolivia y Perú [5].

Actualmente, el tratamiento contra esta enfermedad consta de 5 medicamentos de primera línea [6], los cuales son isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomycin. Desgraciadamente, en los últimos tiempos se han reportado alrededor de 450000 nuevos casos de cepas multidrogo-resistentes (MDR) y cepas extensamente resistentes, lo cual complica el tratamiento y la cura de esta enfermedad [6, 7].

Debido a la aparición de este tipo de cepas, es importante la investigación en nuevos tratamientos los cuales puedan ser de utilidad para contrarrestar esta enfermedad. Una nueva estrategia que puede ser de utilidad para combatir esta

enfermedad es la inmunoterapia, algunos de estos tratamientos que han tenido éxito en modelos animales se han basado en activación de células CD8 [8-10] e inhibición de citocinas asociadas a la latencia [11].

Con los datos mencionados anteriormente en este trabajo nos enfocaremos en los péptidos antimicrobianos los cuales son moléculas de la respuesta inmune innata que tienen características inmuno-moduladoras, así como de efecto bactericida [12-15]. Además, en estudios previos se ha demostrado que tienen un papel importante en el control del crecimiento micobacteriano [16-19], por lo que su inducción podría ser utilizada como una posible inmunoterapia.

MARCO TEÓRICO:

Tuberculosis.

La TB es producida por uno de los cuatro microorganismos que integran el complejo *Mycobacterium tuberculosis* y que son: *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canettii* [20-22] las cuáles son las principales cepas patógenas para el hombre, aunque existen algunas otras cepas causantes de tuberculosis en animales que también pueden afectar al humano tales como *M. bovis* y *M. microti* [23]. Sin lugar a dudas, la TB producida por *M. tuberculosis* es la más importante desde el punto de vista sanitario y la que produce la gran mayoría de los cuadros clínicos de esta enfermedad. La TB por *M. bovis* es menos frecuente en los países industrializados debido al control de la TB animal y a la pasteurización de la leche, aunque constituye todavía un problema importante en los países en vías de desarrollo. *M. africanum* es responsable de un menor número de casos de TB en África, debido a su posible menor virulencia. Finalmente, la infección por *M. microti* (agente causal de TB en roedores) ha sido recientemente descrita en humanos, principalmente en individuos inmunodeprimidos [24].

Los bacilos de *M. tuberculosis* son ligeramente curvados que miden alrededor de 2 a 4 μm de largo por 0.2 a 0.5 μm 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.

La característica anatómica más distintiva del bacilo y por lo tanto ampliamente estudiada es su pared celular. Esta pared celular está compuesta de membrana plasmática, una pared celular y una capa externa parecida a una capsula [25, 26].

La membrana citoplasmática de las micobacterias no presenta muchas particularidades, a excepción que presenta algunos lipopolisacáridos los cuales son compartidos por los actinomicetales. La membrana está rodeada por la pared celular, la cual es la responsable de darle su forma característica al bacilo. La estructura de la pared celular difiere de las bacterias comunes, ya que presentan algunos residuos químicos en particular y un número inusual de entrecruzamientos. De hecho, el grado de entrecruzamientos de péptidoglicanos en la pared celular de *M. tuberculosis* es del 70-80%, mientras que en *E. coli* es de 20-30%. A estos peptidoglicanos se les unen polisacáridos (como lo son: glucano, manano, arabinogalactano y arabinomanano). Algunos glicolípidos como lo son lipomanan y lipoarabinomanan, se encuentran anclados a la membrana plasmática y se extienden hasta la capa externa de la pared celular [27, 28].

Otra molécula muy importante en la estructura de la pared celular de esta bacteria son los ácidos micólicos, los cuales parecen existir sólo en las paredes celulares de estos organismos. Éstos son enormes ácidos grasos saturados que se encuentran tanto en las ceras como en los glucolípidos de gran tamaño, unidos en forma covalente a peptidoglicanos 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 (Fig.1.) [4, 7, 25, 26]

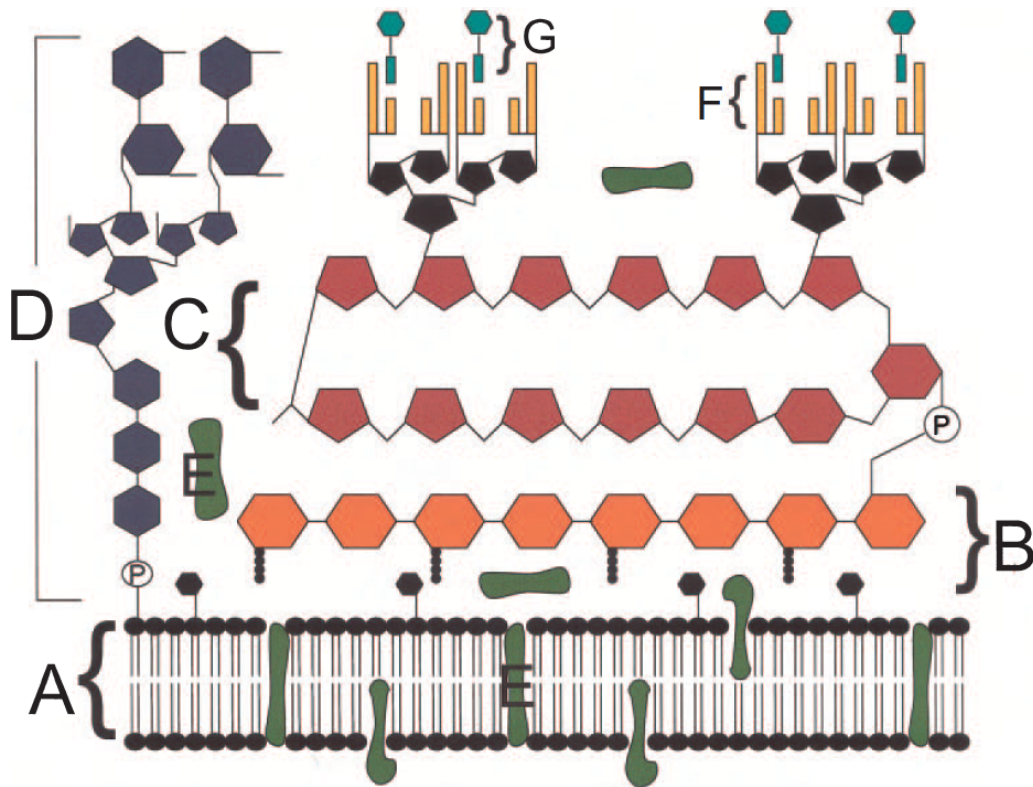


Fig. 1. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. Los componentes incluyen (A) membrana plasmática, (B) peptidoglicanos, (C) arabinogalactano, (D) Manosas cubiertas de lipoarabinomano, (E) proteínas asociadas a la envoltura celular, (F) ácidos micólicos y (G) Glicolípidos de superficie asociados con ácidos micólicos. Tomado de [4].

Otra de las grandes características de *M. tuberculosis* es su exageradamente lenta capacidad de división (60 veces inferior a la de un estafilococo). El crecimiento de *M. tuberculosis* está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Incluso, parece existir una interdependencia entre la disposición anatómica de la enfermedad y la tensión de oxígeno disponible en la zona [24].

En cualquier caso, las condiciones ideales de multiplicación del bacilo las encuentra a un pH de 7.40 y con una presión de oxígeno entre 100 y 140 mmHg. Sin embargo, incluso bajo estas condiciones, su multiplicación es muy lenta, oscilando entre las 14 y 24 horas.

Cuando *M. tuberculosis* no encuentra a su alrededor una situación favorable (baja tensión de oxígeno y pH bajo), entra en un estado latente, pudiendo demorar

su multiplicación desde varios días hasta muchos años. Este estado de latencia es también uno de los condicionantes de la perpetuación de la pandemia [7].

M. tuberculosis y las otras micobacterias productoras de Tb se transmiten de persona a persona por medio de secreciones respiratorias y saliva, ya sea al estornudar, toser o inclusive hablar [29]. Es por eso que una sola gota de estas secreciones puede ser suficiente para contagiar a una persona, aunque son necesarios más factores para que se pueda dar la infección como una exposición prolongada y un mayor número de gotas infecciosas. Daffé y colaboradores demostraron que aquellos pacientes con TB que presentan grandes cantidades de *M. tuberculosis* en su esputo, son más contagiosos que aquellos pacientes que no presentan *M. tuberculosis* en el esputo [30]. Se calcula que aproximadamente el 50 % de las personas que mantienen contacto con pacientes con extendido de esputo positivo son contagiados [30].

La Tb no tratada suele ser mortal, cerca de un tercio de los pacientes muere durante el primer año después del diagnóstico y la mitad durante los cinco primeros años [7].

Inmunidad innata.

La principal función del sistema inmune es proteger al organismo contra microorganismos patógenos, normalmente se ha dividido en dos; inmunidad innata e inmunidad adquirida. Las principales diferencias entre ambas respuestas son los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento antigénico. En la inmunidad adaptativa, los receptores reconocen a los microorganismos infecciosos e identifican antígenos propios y del medio. En cambio, en la inmunidad innata, los receptores reconocen estructuras altamente conservadas presentes en un gran grupo de microorganismos [31]. Estas estructuras son designadas como

patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los receptores involucrados en identificarlos son llamados receptores para el reconocimiento del patrón (PRR's) [32]. Ambas respuestas inmunes son reguladas en gran parte por un grupo de proteínas llamadas citocinas o quimiocinas.

En la inmunidad innata intervienen las barreras físicas y químicas, tales como el epitelio y las sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales. Además, distintos tipos celulares son mediadores de esta respuesta tales como las células asesinas naturales, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, entre otras.

Los fagocitos realizan una labor de gran importancia, ya que son los principales productores de las citocinas: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α . Además estos liberan otras moléculas como: la enzima activadora del plasminógeno y fosfolipasas, radicales de oxígeno, peróxido, óxido nítrico, etc [33].

Otro componente importante en la inmunidad innata son las células epiteliales. Aunque se pensaba que estas células sólo tenían función como barrera física, últimamente se ha reportado que éstas tienen un papel más importante, ya que, al reconocer a los PAMPs, las células epiteliales secretan sustancias que ayudan a la respuesta inmune innata como citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos [34-37].

Además de las células epiteliales también existen otro tipo de células que colaboran con la respuesta inmune innata, los fagocitos mononucleares los cuales además de eliminar a los patógenos mediante fagocitosis, también liberan citocinas tales como: IL-12, IL-1 y TNF- α así como, algunas quimiocinas como IL-8, que inducen la expresión moléculas de adhesión como son ELAM1 e ICAM1 en células endoteliales además de activar linfocitos T CD4 y CD8, que producen interleucinas

como IFN- γ , IL-12, IL-2, que sirven para activar linfocitos y así eliminar al patógeno [33].

Macrófagos en la respuesta inmune innata.

Los macrófagos son células del sistema inmune, que expresan una gran cantidad de receptores en su superficie, que permitirán el reconocimiento de patógenos. El reconocimiento conlleva cambios de superficie, señalización y alteración en la expresión genética, lo cual favorecerá mecanismos de inmunidad innata y la inducción de la inmunidad adquirida. Algunos de los receptores más importantes de los macrófagos son los Receptores basurero (scavengers), Receptores tipo toll, las integrinas y moléculas de la superfamilia de Igs, los cuales van a favorecer la fagocitosis [38].

Una vez fagocitado el patógeno, se forma dentro de la célula el fagolisosoma, el cual por medio de ATPasas se acidifica rápidamente hasta alcanzar un pH de 4-5. Este ambiente es óptimo para el funcionamiento de diferentes proteasas que se encargarán de digerir al patógeno en pequeños fragmentos, para su posterior presentación por medio de MHC clase II [39].

Los macrófagos tienen un papel muy importante en el control de *M. tuberculosis*, ya que dentro de éstos la bacteria puede multiplicarse pero puede ser inhibida o eliminada si el macrófago se encuentra activado. La principal citocina activadora de macrófagos es IFN- γ . El mecanismo más importante para el control de *M. tuberculosis* en macrófagos activados es la inducción de la producción de óxido nítrico y reactivos intermediarios del nitrógeno, producidos por la enzima Oxido Nítrico Sintasa (NOS)[40, 41]. Sin embargo, se ha observado que en macrófagos no activados por IFN- γ , la micobacteria es capaz de inhibir la fusión del lisosoma y del

fagosoma, por diversos mecanismos, como lo es la inhibición de la unión de la ATPasa al fagosoma, lo cual inhibe la acidificación del fagolisosoma lo cual evita el correcto funcionamiento de las enzimas proteolíticas necesarias para la eliminación del patógeno. [40, 42]

V

Células Dendríticas en la respuesta inmune innata.

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno con la habilidad de inducir una respuesta inmune primaria. Para que esta inducción se lleve a cabo las células dendríticas inmaduras deben fagocitar y procesar antígenos, para su maduración. Una vez maduras estas células, migran a órganos linfoides secundarios en donde se llevará a cabo la presentación del antígeno ya sea mediante MHC o bien por CD1 a los diferentes tipos de linfocitos, activando de esta manera la respuesta inmune celular [40, 43].

Durante la tuberculosis la células dendríticas tienen un papel muy importante, ya que, el reconocimiento de *M. tuberculosis* se lleva a cabo a través de sus receptores como son DC-SIGN, TLR-2 y TLR-4. Lo cual produce una respuesta inmune protectora, ya que, las células dendríticas inducen la maduración de células T a un perfil Th1 mediante la secreción de citocinas como; IL-12, IL-18, IL-23, etc [44].

Se han reportado diversas respuestas a diferentes ligandos, por ejemplo, en el año 2003 Geijtenbeek y colaboradores observaron que la asociación de Man-LAM con DC-SIGN induce la producción de IL-10, mientras que la unión de la lipoproteína de 19 KDa con TLR-2 inducirá la producción de IL-12, TNF- α e IL-6 [45].

Existe evidencia *in vivo* que *M. tuberculosis* y BCG son transportadas de los pulmones a los nodos linfáticos dentro de las células dendríticas infectadas. Se ha observado que las células dendríticas infectadas disminuyen su expresión de CD1 lo cual afectará la presentación de antígenos lipídicos [46].

Neutrófilos en la respuesta inmune innata.

Los neutrófilos, son células blancas de las llamadas granulocitos; miden de 12 a 18 μm y son los leucocitos más abundantes en sangre. Se caracterizan por presentar un núcleo con cromatina compacta segmentada en 2 a 5 lóbulos conectados por delgados puentes. Es una célula muy móvil y su consistencia gelatinosa le facilita atravesar las paredes de los vasos sanguíneos y migrar hacia los tejidos para destruir microorganismos en respuesta a estímulos inflamatorios. La principal función de los neutrófilos es la de detener o retardar la acción de agentes infecciosos o materiales extraños. Su propiedad más importante es la fagocitosis, siendo capaces de ingerir bacterias y pequeñas partículas. La actividad antimicrobiana de los neutrófilos principalmente está dada por sus gránulos los cuales contienen una gran cantidad de péptidos antimicrobianos y enzimas.

Los neutrófilos entran al sitio de infección como parte de una respuesta inflamatoria. Estos son atraídos por medio de citocinas como lo es la Interleucina-8, y después de unas horas de llegar al tejido, entran en apoptosis, para evitar la liberación de sus gránulos los cuales podrían ser tóxicos para los tejidos [47].

Se ha observado en modelos experimentales murinos que durante la infección con *M. tuberculosis*, los neutrófilos se encuentran tanto en etapas tempranas de la

infección así como días después de la infección, sugiriendo que estas células tienen un papel muy importante en el control de la enfermedad [48].

En el 2006 Belina H. Tan y colaboradores, observaron que, si se infectan macrófagos con *Mycobacterium tuberculosis*, y se colocan con neutrófilos apoptóticos, la viabilidad intracelular de la bacteria disminuía. Ellos demuestran en este experimento que esta disminución en la viabilidad se debe a que el macrófago infectado fagocita al neutrófilo y absorbe sus gránulos, los cuales contienen una gran cantidad de agentes antimicrobianos como lo son: lactoferrina, catelicidinas, α -defensinas, lisozimas entre otros. Ellos pudieron observar que los gránulos adquiridos por los macrófagos al fagocitar los neutrófilos pueden entrar a los compartimientos que contienen a la micobacteria, lo que sugiere que esto fortalece a los macrófagos, provocando el decremento de la viabilidad de la micobacteria [49].

Péptidos antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) se encuentran ampliamente distribuidos, tanto en el reino animal como en el vegetal, lo cual sugiere que los AMPs han tenido un papel muy importante en el mecanismo de defensa de los organismos multicelulares durante su evolución [12].

Es tan grande la diversidad de AMPs que es difícil de clasificarlos sin tomar en cuenta sus estructuras secundarias. El principio fundamental de la estructura de todos los AMPs es la capacidad que tienen para adaptar la forma en la cual sus partes hidrofóbicas y los aminoácidos catiónicos se organizan espacialmente dando a la molécula un carácter anfipático [12, 50].

En humanos los AMPs se encuentran divididos en 3 familias principales: defensinas, catelicidinas e histaninas, las cuales se organizan de acuerdo a su tamaño, su estructura y la organización de sus aminoácidos [51].

Defensinas.

Las defensinas de los mamíferos son péptidos catiónicos, relativamente ricos en arginina, con un peso molecular de 3-4.5 kDa. Contienen invariablemente seis residuos de cisteínas, los cuales están unidos entre sí por tres puentes de disulfuro, los cuales son característicos de éstas. El número de aminoácidos que conforman estos péptidos pueden variar de 20 a 45 [52].

La familia de las defensinas se divide en defensinas α , β y θ y su clasificación se basa en la posición de los enlaces disulfuro [53]. *In vivo*, las defensinas, en promedio, muestran actividad antimicrobiana a concentraciones de 1-10 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, a concentraciones de 15-30 $\mu\text{g/mL}$ existe toxicidad tanto para el patógeno, como para las células productoras del péptido [54].

α -Defensinas.

Están constituidas por una cadena de 29 a 35 residuos de aminoácidos y contienen tres puentes disulfuro en las posiciones: 1-6, 2-4, 3-5[55]. Se han identificado seis α -defensinas. Los péptidos de neutrófilos humanos 1-4 (HNP-1 al HNP-4) están localizados en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, en donde constituyen la principal proteína (60% del total) y contribuyen eficazmente en el mecanismo oxígeno-independiente para eliminar a las bacterias fagocitadas [56].

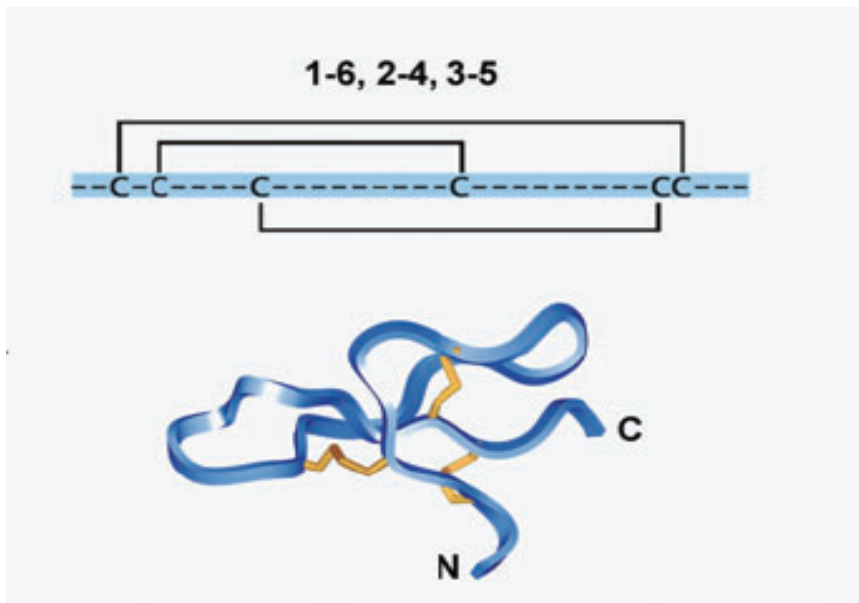


Fig. 2. Representación de la estructura de α -defensinas. Imagen superior se esquematizan los diferentes enlaces disulfuro formados. En la imagen inferior se observa la estructura tridimensional de péptido [2].

β -Defensinas.

Las β -defensinas contienen seis residuos de cisteína conectados entre sí por tres puentes disulfuro, pero con espacios diferentes a los de las α -defensinas, por lo cual los integrantes de esta nueva familia de péptidos antimicrobianos se denominaron β -defensinas. Las β -defensinas tienen de 36 a 42 residuos de aminoácidos, además de poseer puentes bisulfuro en las ubicaciones 1-5, 2-4 y 3-6.

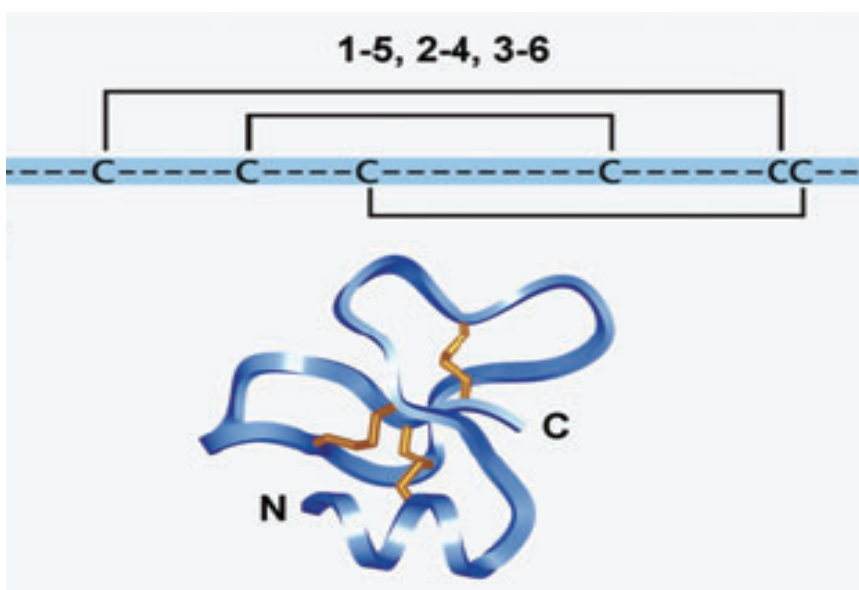


Fig. 3. Esquema de la estructura de β -defensinas. Imagen superior se esquematizan los diferentes enlaces bisulfuro formados. En la imagen inferior se observa la estructura tridimensional de péptido

Las β -defensinas 1 (HBD-1) se expresan en tracto genitourinario y respiratorio, este tipo de defensinas son secretadas de manera constitutiva y no

incrementan su expresión por estímulos infecciosos o citocinas [54], aunque se ha observado que existen algunos casos en los cuales la expresión de las HBD-1 se ha visto aumentado, por ejemplo cuando las células epiteliales expuestas a componentes de la pared celular de BCG [57]. Además, se ha reportado que la arginina, la isoleucina y la albumina aumentan la expresión de HBD-1 en células cancerígenas de colon humano [58].

Las β -defensinas humanas 2 (HBD-2) se encuentran en epitelios, tales como la piel y el tracto respiratorio e intestinal. Estudios han detectado que varias células epiteliales del pulmón son capaces de expresarlas [59, 60]. Se ha observado que existe una expresión basal en las células epiteliales, pero estas aumentan la expresión de HBD-2 al ser estimuladas con patrones moleculares asociadas a patógenos como lo son los lipopolisacáridos, peptidoglicano, lipoarabinomannana y al ser estimuladas con algunas citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β [61].

Las β -defensinas 3 (HBD-3) son más grandes (5 kDa) que las HBD-2, también son inducibles por estímulos inflamatorios y se pueden detectar *in vitro* después de la coestimulación con IL-1 β y TNF [54].

Las β -defensinas 4 (HBD-4) se han encontrado principalmente en tracto respiratorio, se ha observado que son muy efectivas contra hongos y bacterias, son inducibles por PAMPs y citocinas, y al igual que la HBD-2 es inhibida con altas concentraciones de sal [54].

Yang y colaboradores demostraron en 1999 que las β -defensinas humanas, además de tener un potente efecto microbicida, también tienen efectos quimiotácticos sobre células dendríticas inmaduras y células T de memoria que presentan en su superficie el receptor CCR6. Estos datos sugieren que las β -defensinas promueven la inmunidad adaptativa por medio de los receptores CCR6

[14, 62]. Además, en el año 2007 se demostró que las β -defensinas, a más de ser quimiotácticas de células dendríticas, también pueden activar a las células dendríticas inmaduras mediante receptores TLR1, 2 y 4 [63, 64].

Catelicidinas.

Las catelicidinas son otro tipo de péptidos antimicrobianos, el cual, en humano se conoce solo una, que es denominada como LL-37. Estas, al igual que las defensinas son multifuncionales y tienen un papel muy importante en la respuesta inmune. LL-37 se origina a partir de un precursor, una molécula de 18 kDa denominada hCAP-18, la cual existe constitutivamente en los gránulos de los neutrófilos y es secretada por células epiteliales, monocitos, linfocitos T y células cebadas cuando estas células se encuentran en presencia de PAMPs. Se ha observado, que las catelicidinas tienen un efecto antimicrobiano muy alto y que al igual que las defensinas, este tipo de péptidos actúan sobre la membrana de los microorganismos formando poros que llevan a la lisis. Además pueden actuar directamente sobre el DNA, al unirse a los grupos fosfato del DNA por uniones electrostáticas para después insertarse en la cadena de nucleótidos impidiendo la replicación [54]. Además, se observó que este péptido antimicrobiano es capaz de inducir la producción especies reactivas de oxígeno así como también son inductores de las alfa defensinas en neutrófilos [65]. Otra de sus propiedades de esta moléculas, es la quimiotaxis que ejerce sobre células como neutrófilos, monocitos, células T, mastocitos y eosinófilos [66-68].

La expresión de LL-37 se ha reportado que aumenta en tejidos inflamados. El gen que codifica para la producción de LL-37 contiene muchos sitios de unión para

los factores de transcripción, como lo es el factor nuclear para la expresión de IL-6 (NF IL-6), el cual se piensa que tiene un papel importante en la expresión de LL-37 [15].

Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.

Las membranas bacterianas están organizadas de tal manera que la parte más exterior de la bicapa lipídica, contiene una gran proporción de fosfolípidos cargados negativamente. En contraste, las membranas de las células vegetales y animales están compuestas de lípidos sin ninguna carga [12]. Un modelo que explica la actividad de la mayoría de los AMPs es el de Shai-Matsuzaki-Huang. Este modelo propone la interacción de los AMPs con la membrana bacteriana, seguido de un desplazamiento de lípidos, una alteración de la estructura membranal formando poros en la membrana, causando así la lisis del microorganismo [3, 69] .

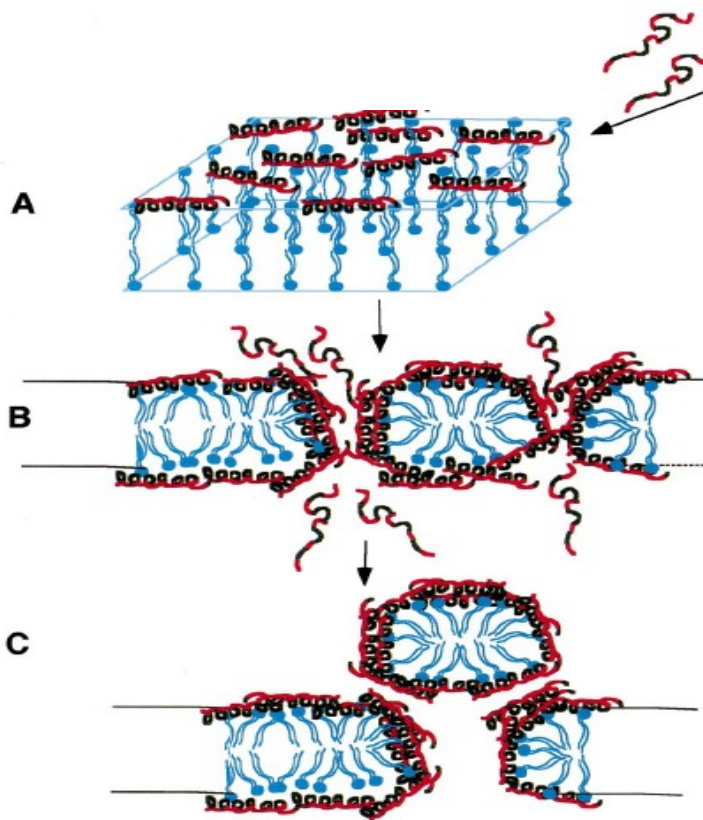


Fig. 4. Modelos que sugieren como interactúan los AMPs con la membrana del microorganismo para lograr su permeabilidad. (a) Atracción por cargas de los AMPs a la membrana del microorganismo. (b) inserción de los AMPs en la membrana del microorganismo. (c) formación de poros y lisis del microorganismo. [3].

Resistencia a los péptidos antimicrobianos.

La obtención de resistencia por cepas bacterianas es poco probable, aunque se conocen algunas bacterias que han obtenido resistencia a los AMPs. Algunos ejemplos de éstas son las especies del género *Morganella* y *Serratia*, las cuales en su membrana exterior contienen lípidos que carecen de las propiedades adecuadas para que exista una unión correcta con los AMPs.

Salmonella es otro microorganismo en el cual han sido detectados genes que disminuyen la afinidad de los péptidos antimicrobianos por la membrana celular, tales como, PmrA y PmrB, la función de los cuales incluye la modificación covalente de los lipopolisacáridos, lo cual disminuye la afinidad de los péptidos antimicrobianos por la membrana celular. Además, estos genes se han asociado con la expresión de proteasas membranales que degradan a los péptidos catiónicos [70, 71].

Otro microorganismo que es resistente a la acción de los AMPs es *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria secreta una proteína llamada estafilocinasa, la cual al unirse a las α -defensinas inhibe la acción bactericida de estas, también se ha observado que *S. aureus* puede inhibir la acción bactericida de la catelicidina LL-37, esto lo logra mediante la secreción de una proteína denominada aureolisina, la cual se une a las posiciones 19–20, 23–24 y 31–32 del péptido eliminando así la acción bactericida de éste [72]. Además, durante los últimos años se ha detectado otro mecanismo de evasión con el que cuenta el género *Staphylococcus*, el cual consiste en dos genes: *dlt* y *MprF*. El gen *dlt* se relaciona con la modificación covalente de los ácidos teitoicos de la pared celular de la bacteria mediante la unión de la alanina. De la misma manera, el gen *MprF* se relaciona con la modificación covalente de

componentes de la pared celular como lo son los fosfatidilgliceroles, los cuales se ven modificados en su carga mediante la adición de L-lisina [73, 74].

Los microorganismos que han adquirido resistencia hacia los péptidos antimicrobianos son muy pocos. Esto se debe a que en blanco de los AMPs es la membrana, por lo tanto para que puedan obtener resistencia, los microorganismos deberían cambiar completamente la estructura de su membrana o como ya se ha mencionado, producir sustancias que inhiban la acción bactericida de éstos. Además, la variedad de péptidos antimicrobianos existentes, hace difícil para los microorganismos, el poder producir suficientes proteasas para inhibir por completo el ataque de los péptidos antimicrobianos [12].

Regulación de la expresión de los péptidos antimicrobianos.

Basado en su localización cromosomal y similitud en su estructura genética se piensa que todas las defensinas de los vertebrados provienen de un mismo gen precursor. En el humano, se han detectado alrededor de 8 genes en el cromosoma 8 relacionados con la expresión de α y β defensinas, aunque mediante la bioinformática ha sido posible la detección de 30 genes más que codifican β -defensinas en el cromosoma 6 y 2 [75]. Los genes que codifican para las α defensinas que se encuentran en los leucocitos se conforman de 3 exones, mientras que los genes que codifican para las demás defensinas se componen solo de dos exones. En contraste, solo se ha encontrado un gen codificante para las catelicidinas el cual se encuentra localizado en cromosoma 3 y se conforma por 4 exones.

Los genes que expresan los péptidos antimicrobianos pueden ser constitutivos o bien inducibles. La inducción de los péptidos antimicrobianos está dada mediante el reconocimiento de algunos estímulos proinflamatorios por medio

de receptores de citocinas como los son los receptores para: IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-17 o bien puede inducirse por algunos patrones moleculares asociados a patógenos reconocidos por receptores como; TLR 2,3,4,5,6 y 9, así como receptores NOD. El reconocimiento de alguno de estos estímulos producirá la activación de diferentes vías de señalización que ocasionará el incremento de la concentración de factores nucleares como; NF- κ B, AP-1y NF-IL-6 [12, 51, 76].

La mayor concentración de estos factores nucleares producirá un incremento en la transcripción que, a su vez, promoverá una mayor síntesis de estos péptidos antimicrobianos, los cuales serán sintetizados como pre-pro-péptidos y dependiendo de la célula que haya sido estimulada se procesará de diferente manera, ya sea para su almacenaje o para su secreción.

Homología de los péptidos antimicrobianos entre el ratón y el humano.

Entre las α -defensinas murinas y humanas, no se ha encontrado relación alguna, ya que, los neutrófilos murinos carecen de defensinas en cualquiera de los gránulos con los que estos cuentan. Sin embargo, existe una relación con las defensinas humanas 5 y 6 que se encuentran en el intestino y tienen homología en ratones, las criptidinas que además de encontrarse en el intestino, también tienen la estructura de α - defensinas.

Con respecto a las β -defensinas, existe una alta similitud entre las humanas y las murinas. En humanos se han encontrado 4 diferentes tipos de β -defensinas, mientras que en ratones se han encontrado 6 diferentes tipos de defensinas, de las cuales las más estudiadas son las β -defensinas murinas 3 y 4 (mBD-3 y mBD-4). Esto se debe a que ambas tienen una gran similitud tanto secuencial como estructural con HBD-2 y HBD-3, respectivamente.

También se ha encontrado que existe homología entre HBD-1 y mBD-1, mientras que para las demás defensinas murinas no se ha encontrado homología con las defensinas humanas [77].

Tabla 1. Propiedades de las defensinas murinas.

Defensina	Homologo	Expresión	Tejido	Actividad de las defensinas
mBD - 6	-----	Inducible	Músculo esquelético, esófago	Antimicrobiana, antiviral. [77, 78]
mBD - 4	HBD - 3	Constitutiva e inducible	Esófago, lengua y tráquea	Antimicrobiana, induce producción de prostanglandinas, quimiotaxis de Dcs [77, 78].
mBD- 3	HBD - 2	Inducible por PAMPs	Tracto respiratorio	Antimicrobiana, induce producción de prostanglandinas, quimiotaxis de DCs, Activación de iDC por TLR4. Induce producción de citocinas y quimiocinas [77, 78]
mBD - 2	HBD - 4	Inducido por LPS	Tracto respiratorio	Actividad antimicrobiana y antifúngica [77, 78].
mBD - 1	HBD - 1	Constitutiva	Varios Tejidos.	Actividad antimicrobiana [77, 78].

En contraste que, en humano sólo se ha detectado una catelicidina, la cual se denomina hCAP-18/LL-37, que ha demostrado tener homología con catelicidinas de otras especies, como por ejemplo CRAMP en raton y rata, las cuales además de su homología han demostrado tener actividades biológicas similares como la actividad antimicrobiana y la quimiotaxis de linfocitos CD4, neutrófilos y monocitos periféricos [13, 79].

Importancia de los péptidos antimicrobianos en la tuberculosis.

El estudio del papel que tienen los péptidos antimicrobianos en la infección con las diferentes especies de micobacterias es un tema poco estudiado. Los

primeros estudios se remontan a 1992, donde se pudo observar por primera vez que la presencia de defensinas en cultivos de *Mycobacterium avium* disminuía la viabilidad de la micobacteria [80].

Siguiendo con esta línea de investigación, en 1996 Miyakawa y colaboradores observaron que las defensinas, tenían la capacidad de eliminar a *M. tuberculosis* demostrando que este péptido antimicrobiano tiene su mayor efecto bactericida a una concentración de 50 µg/µl y obteniendo un mejor efecto bactericida después de 24 horas de incubación. [81]

Sharma y colaboradores en el 2000 observaron que los péptidos antimicrobianos de neutrófilos humanos (HNP-1) tienen un potente efecto bactericida sobre la cepa H37 Rv [82].

Con las propiedades encontradas hasta el momento y sabiendo que los macrófagos no son productores de las β-defensinas, Kisich en el 2001, realizó un experimento en el cual transfectaba a los macrófagos para que éstos fueran productores de defensinas, obteniendo altas cantidades de mRNA de HBD-2. Estos macrófagos capaces de secretar HBD-2, fueron infectados con *M. tuberculosis* (cepa H37 Rv) observando, que los macrófagos transfectados tenían un mejor poder bactericida, así como mejor poder bacteriostático [19].

Otros hallazgos importantes sobre el papel de los péptidos antimicrobianos en la tuberculosis son los encontrados por Rivas-Santiago y nuestro grupo que observaron que las HBD-2 se inducen durante la infección de células epiteliales y macrófagos con Mtb. Ellos pudieron observar que el tiempo al cual la inducción era mayor era a las 18 y 24 h de infección [83]. Continuando con esta línea de investigación Rivas-Santiago y colaboradores, utilizando un modelo animal, encontraron que las defensinas tienen un papel muy importante durante la infección

con Mtb. Ellos encontraron que en la fase temprana de la infección pulmonar progresiva con Mtb existe una gran producción de defensinas, pero al día 21 empieza a disminuir esta concentración y los ratones empiezan a manifestar los síntomas de la infección hasta su muerte. Sin embargo durante la infección latente de tuberculosis pulmonar, los animales mantienen una producción elevada constante de defensinas, sin causar ningún efecto adverso en ellos. Estos datos obtenidos sugieren que las defensinas ayudan al control del crecimiento bacteriano [18].

Con respecto a las catelicidinas en la tuberculosis, se puede mencionar los datos encontrados por Mondlin y colaboradores que en el 2006, observaron que la activación de los TLRs de los macrófagos, causa la sobreexpresión de receptores para vitamina D, induciendo la expresión de LL-37. También pudieron observar que los macrófagos infectados por *M. tuberculosis*, estimulados con vitamina D eliminan de una manera más eficiente a la micobacteria. Estos datos los relacionan con la mayor susceptibilidad reportada en personas afro americanas para enfermar de tuberculosis, debido a que estos presentan una menor cantidad de vitamina D en el suero que los caucásicos, por lo tanto, una menor expresión y producción de LL-37, disminuyendo así la capacidad bactericida de los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* [84].

El único reporte que se tiene hasta el momento de la expresión de LL-37 durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, demuestra que los macrófagos alveolares son los fagocitos que producen una mayor cantidad de LL-37 al ser infectados por este bacilo, aunque la producción de este péptido antimicrobiano por células epiteliales también es muy importante, también demuestran que la inducción de este péptido se da a través de la estimulación de TLR-2, 4 y 9 [17].

Además de estos datos, actualmente no se ha encontrado alguna otra relación entre la catelicidina LL-37 y tuberculosis. Aunque se observó que tiene una gran importancia en el desarrollo de otras enfermedades. En el 2001 Islam N. y colaboradores obtuvieron algunos datos, los cuales sugieren que la shigellosis es causada en gran parte por el decremento de la producción de este péptido antimicrobiano [85]. Por otra parte, en el 2006, Raqib y colaboradores encontraron que al inducir la producción con butirato de sodio de LL-37 en ratones infectados con *Shigella* estos se recuperaban de una mejor manera que aquellos ratones a los cuales no se les inducía [86].

L-Isoleucina.

Es un aminoácido esencial que debe ser incorporado por medio de la dieta, específicamente de alimentos que contengan proteínas, ya que nuestro organismo es incapaz de sintetizarlo. Es un componente necesario para la configuración de nuestra organización estructural y funcional sin que tengamos mecanismos para su síntesis, de ahí su denominación de esencial, puesto que el aporte tiene que ser externo.

Es un aminoácido hidrofóbico de cadena alifática, ramificado con grupo R isopropilo no polar. La isoleucina, junto con la valina, se sintetizan por medio de reacciones que llevan a cabo el mismo grupo de enzimas. Una de sus ramas está formada por un grupo metilo. Este aminoácido, junto con la leucina y la hormona de crecimiento, interviene en la formación y reparación del tejido muscular .

En el 2000, Pascale y colaboradores, mientras estudiaban a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, encontraron que una porción de la levadura lisada, estimulaba la expresión de HBD-2. Haciendo un análisis de las diferentes porciones del lisado de levadura, encontraron que la porción que producía esta estimulación

era la que estaba conformada por el aminoácido L-Isoleucina (L-Ile). Estimulando células epiteliales de riñón bovino con diferentes concentraciones de L-Ile observaron que el mayor estímulo se daban a concentraciones entre 3 – 15 µg de L-Ile [87]. Además, ha sido asociada junto con la albumina de inducir la secreción de HBD-1 en células epiteliales de colon humano [58].

Este aminoácido ha sido ampliamente utilizado a nivel experimental como agente terapéutico. Además, ha sido asociado en el tratamiento contra patógenos intracelulares como la *Chlamydia trachomatis*, en donde al infectar cultivos celulares con esta bacteria y tratarla con L-isoleucina, se observó que la infectividad de esta bacteria disminuye significativamente [88].

Otra característica importante que tiene este aminoácido, es su capacidad para inducir hipoglicemia en ratas normales. Debido a esta propiedad, se ha utilizado este aminoácido como tratamiento en modelo murino de diabetes, observándose que este tratamiento incrementa significativamente la insulina en sangre en aquellos ratones intolerantes a la glucosa, pero no en aquellos modelos con diabetes tipo 2 [89].

Otro tratamiento en el cual se ve involucrado la L-isoleucina es en la prevención de la metástasis en el cáncer de hígado, esto es debido a otra propiedad de este aminoácido, la disminución de la angiogénesis, por medio de la inhibición del factor de crecimiento vascular endotelial [90].

El principal antecedente que tenemos para la realización de este trabajo, es lo encontrado por nuestro grupo, en donde, observamos *in vitro* que al estimular neumocitos tipo II humanos con L-isoleucina, se causa un incremento en la expresión genética de HBD-2 y LL-37, observando que existe un mayor incremento para LL-37 con un estímulo de 25µg de L-Isoleucina después de 18 horas de

estimulación, mientras que se observó la mayor expresión de HBD-2 con una concentración de L-isooleucina de 25 µg después de 18 horas (fig.2).

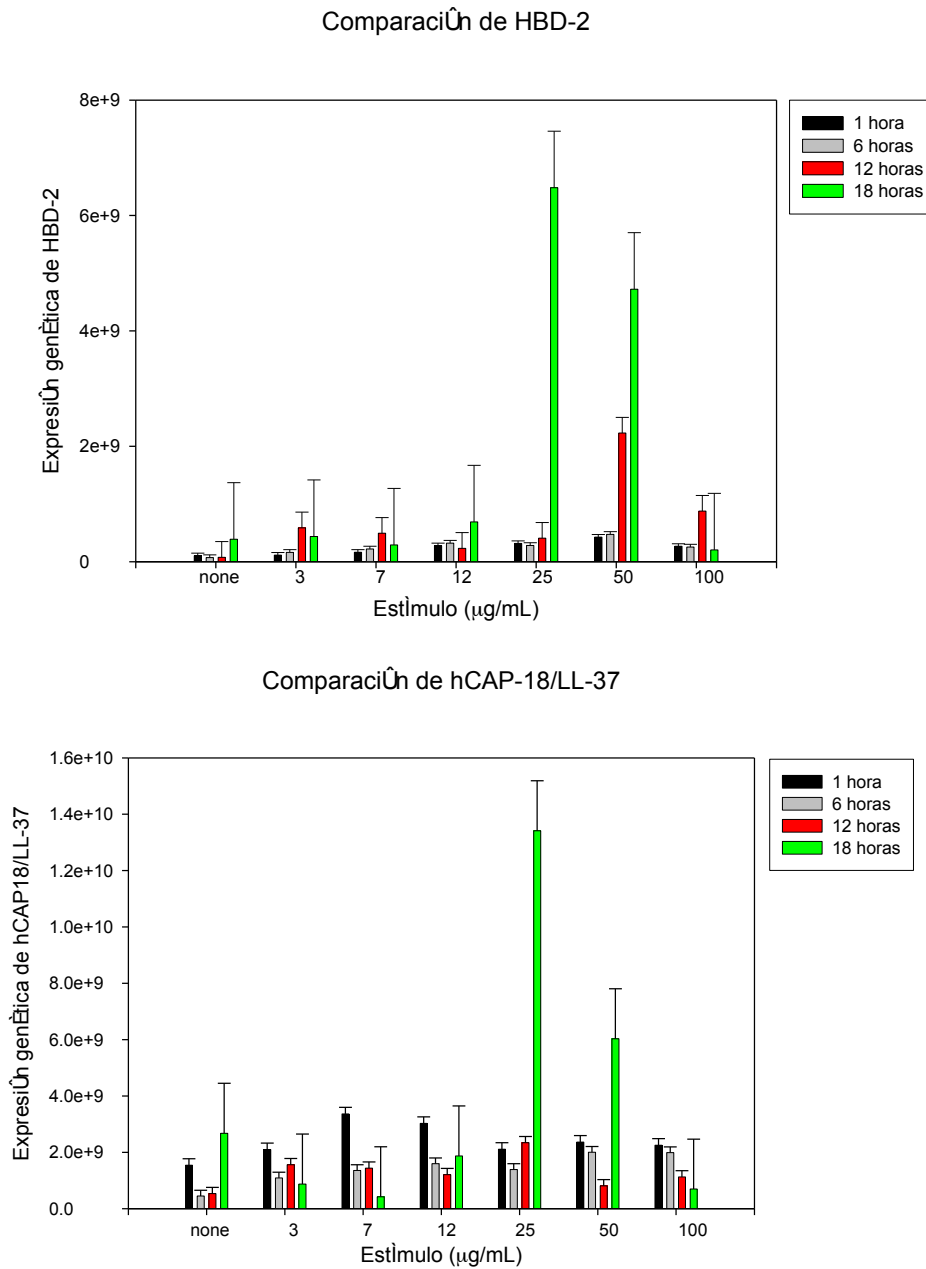


Fig. 5. Expresión de HBD-2 y LL-37 con diferentes concentraciones de L-Isoleucina. Neumocitos tipo II humanos fueron estimuladas con diferentes concentraciones de L-Isoleucina. S observa aumento en la expresión de HBD-2 y LL-37 al utilizar 25 µg de L-Isoleucina después de 18 horas de estimulación.

Péptidos antimicrobianos sintéticos.

Hasta ahora se han descrito más de 600 diferentes péptidos antimicrobianos en bacterias, hongos, insectos, plantas anfibios, crustáceos, aves, peces y mamíferos incluyendo los humanos. Debido a esto durante los últimos años se ha estudiado la capacidad de estos péptidos como posibles tratamientos para diversas enfermedades, sin embargo no ha sido la única línea que se ha seguido, ya que también se ha experimentado la modificación estructural de los diferentes péptidos, ya sea mediante el cambio de algunos aminoácidos cambiando sus propiedades naturales o bien mediante la fusión de diferentes péptidos, buscando potenciar su acción. Una de las maneras más comunes para desarrollar péptidos sintéticos es mediante el uso de QSAR (Relación cuantitativa de la actividad estructural), la cual es una relación matemática entre la actividad biológica de un sistema molecular y sus características químicas y geométricas, cuyos estudios proveen datos conceptuales de su bioactividad [1]. El estudio de estos modelos permiten realizar nuevas modificaciones a los péptidos existentes uno de estos ejemplos es la sustitución de aminoácidos L por D, lo cual aumenta la estabilidad de estos péptidos, haciéndolos atractivos para su uso como terapéuticos [91]. O bien modificando la composición de aminoácidos, haciendo a los péptidos más cationicos o bien con una mayor hidrofobicidad o aumentando la especificidad en contra de cierto tipo de bacterias manteniendo su actividad antifúngica lo cual aumenta sus posibilidades de uso terapéutico [92-94].

Aunque se había observado que los péptidos antimicrobianos sintéticos tenían propiedades muy importantes, su uso terapéutico se vio retrasada un poco, debido a que la síntesis por acoplamiento de estos es muy cara, otro mecanismo utilizado fue la construcción de plásmidos y la transformación bacteriana, la cual

resultaba más económica, sin embargo con este método el rendimiento era muy bajo debido a que los péptidos antimicrobianos producidos montaban respuesta en contra de las bacterias que los producían lisando y con ello terminando la síntesis de péptidos antimicrobianos. Por lo tanto fue necesario la búsqueda de una nueva técnica para la producción de estos péptidos a costos bajos y con alto rendimiento. Una de estas técnicas encontradas constaba de la construcción de un plásmido el cual contenía la secuencia del péptido ligada a la secuencia SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier), con lo cual se obtiene un mayor rendimiento de péptido, ya que esta unión disminuye la toxicidad (Fig.4.) [1]. Debido a los avances descritos la utilización de estos péptidos como terapia en contra de la tuberculosis tenía mayor posibilidad, por lo tanto, decidimos colaborar con el Dr. Robert Hancock de la Universidad de British Columbia, quien previamente había diseñado 3 diferentes péptidos los cuales tenían un potente efecto microbicida en contra de varias cepas patógenas como por ejemplo; *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* entre otras [95, 96] y mediante la técnica que ellos diseñaron se podría producir gran cantidad de péptidos.

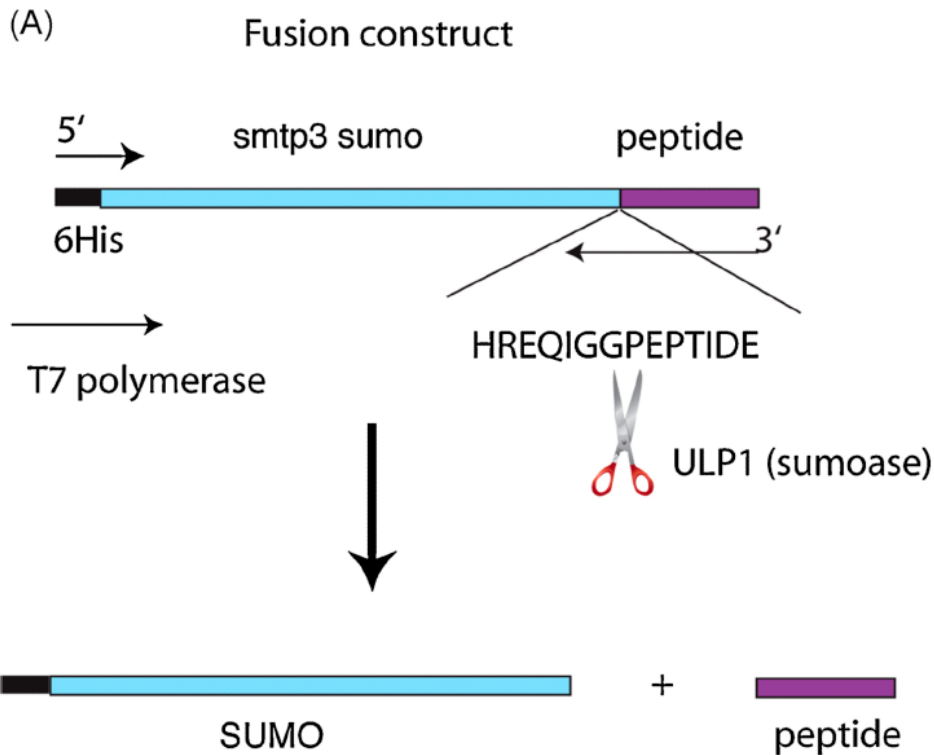


Fig. 6. Diseño esquemático de la estrategia de clonación, para la producción de los diferentes péptidos. En la imagen superior se observa la construcción del plásmido, en el que se puede apreciar la fracción SUMO unida al péptido. En la imagen inferior se observa como mediante el uso de una sumoase, puede aislarse el péptido de la construcción [1]

El primero de estos péptidos en ser diseñado fue el denominado CP26, el cual proviene de la modificación y fusión de la cecropina, el cuál es un péptido encontrado en la hemolinfa del gusano de seda y la melitina, el cuál forma parte del veneno de abeja. CP26 durante sus primeros ensayos *in vitro* mostró una gran eficiencia en contra de bacterias gram positivas así como en contra de bacterias gram negativas. Otra característica importante mostrada por este péptido es su resistencia a altas concentraciones de NaCl, lo cual lo hace un importante candidato

para su uso como terapéutico, ya que, la mayoría de los péptidos antimicrobianos pierden sus propiedades bactericidas en presencia de esta sal [96].

Otros de los péptidos sintetizados mediante este método fueron los denominados E2 y E6, los cuales derivan de la bactenicina y el cual es encontrada en los neutrófilos bovinos. A partir de la bactenicina se realizaron modificaciones de cada uno de sus aminoácidos obteniendo alrededor de 228 nuevos péptidos, los cuales fueron probados *in vivo* en contra de varias bacterias gram positivas, gram negativas y algunos hongos, observando que los péptidos más eficaces eran los denominados E2 y E6 [95].

Debido a estos resultados encontrados por el grupo del Dr. Hancock, decidimos investigar la capacidad micobactericida de estos péptidos así como su posible uso terapéutico.

JUSTIFICACIÓN.

El tratamiento para Tb es demasiado largo, por lo cual muchos pacientes lo abandonan. Debido a la importancia de los péptidos antimicrobianos en la respuesta inmune en contra de la tuberculosis y sabiendo que existen diferentes maneras de inducir su expresión, pensamos que la inducción de estos péptidos disminuirán el tiempo de tratamiento para la tuberculosis.

La reciente aparición de cepas MDR complica el tratamiento de esta enfermedad, por lo cual es necesario buscar un tratamiento alternativo para su control. Una de estas alternativas puede ser la inmunoterapia por inducción de péptidos antimicrobianos o bien la aplicación directa de péptidos antimicrobianos.

HIPÓTESIS.

- La inducción de péptidos antimicrobianos promoverá la eliminación del bacilo y aunado a la terapia convencional existente contra esta enfermedad, reducirá el tiempo de tratamiento en un modelo experimental murino de tuberculosis pulmonar usando cepas drogosensibles así como multidrogo-resistentes.
- El tratamiento con péptidos antimicrobianos sintéticos reducirá significativamente la carga bacilar de ratones infectados con cepas drogosensibles controlando la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL.

- Determinar si la inducción de péptidos antimicrobianos endógenos y el tratamiento con péptidos antimicrobianos sintéticos promueve la eliminación de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv así como en cepas multidrogoresistentes en un modelo de tuberculosis murina.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar si la inducción de β -defensinas por el tratamiento con L-Isoleucina aunado al tratamiento convencional disminuye el tiempo de terapia para la *M. tuberculosis* cepa H37Rv.
- Determinar si la inducción de β -defensinas por el tratamiento con L-Isoleucina disminuye la carga micobacteriana en ratones infectados con *M. tuberculosis* cepa MDR.
- Determinar si la administración de los péptidos antimicrobianos sintéticos E6, E2 y CP26 tienen efecto terapéutico en ratones infectados con *M. tuberculosis* cepa H37Rv.

METODOLOGÍA.

Cultivo de Células del Epitelio Alveolar (Neumocitos tipo 2).

La línea celular A549, perteneciente a neumocitos alveolares humanos tipo II (A549, *American Type Culture Collection* número de referencia CCL185) fue cultivada en botellas de 75 cm² (Costar. Ontario Canadá) con RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado con glutamina, gentamicina y 10% de suero fetal bovino (FCS, Hyclone laboratorios, Logan, Utah), fue incubada a 37°C con 5% de CO₂ y se deja crecer hasta semiconfluencia. Las células A549 fueron colocadas en placas de 24 pozos (Costar. Ontario Canadá) a una concentración de 10⁵ células por mL y se dejaron 24 h a 37°C y 5% CO₂ hasta la infección con *M. tuberculosis*.

Infección de células epiteliales y determinación de su capacidad bactericida post estimulación con L-Isoleucina.

M. tuberculosis cepa H37Rv fue cultivada en medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.), hasta fase estacionaria, las cuales fueron utilizadas posteriormente para la infección de células epiteliales.

Células epiteliales A549 fueron colocadas en una placa de 24 pozos a una concentración de 10⁵ células por pozo y fueron infectadas en multiplicidad de infección de 0.1 bacterias por cada célula, 1 bacteria por cada célula y 5 bacterias por cada célula. Después de realizada la infección se incubaron las placas a 37°C por 24 h. Transcurrido este tiempo se estimuló con 25 µg/mL de L-Isoleucina, se reincubaron por 48 horas y posteriormente se procedió a realizar las unidades

formadoras de colonia, para determinar el efecto micobactericida de la inducción de β -defensinas.

Obtención de la concentración mínima inhibitoria de los péptidos antimicrobianos sintéticos E2, E6 y CP26 para *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv.

La cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv adquirida de la ADCC. Se cultivó en medio Middlebrook 7H9 (Difco Labs, Detroit, MI, USA) hasta llegar al 1 McFarland, una vez llegado a este punto se realizó una dilución 1:25 y se procedió a preparar una placa de 96 pozos de la siguiente manera:

1. Se llenaron los pozos de la periferia con 200 μ L de agua desionizada estéril (línea A del 1 al 12, H del 1 al 12, 1 B al G y 12 del B al G).
2. A los 60 pozos restantes se les adicionó 100 μ L de medio 7H9GC con una pipeta multicanal.
3. A los pozos de la hilera B se le adiciona 100 μ L de una solución de 140 μ g de cada uno de los péptidos realizándose diluciones de la hilera C a la H.
4. Se tomaron 100 μ L de la solución bacteriana y se colocaron en cada uno de los pozos que contenían péptido así como en el pozo de control.
5. Se selló la placa y se incubó por 5 días a 37°C .
6. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 20 μ L de azul alamar y se re-incubó por 24 h. más.
7. Después de este tiempo se realizó la lectura en un transiluminador de luz blanca, tomando como la concentración mínima inhibitoria la correspondiente al último pozo que mantuvo una coloración azul.

Procedimiento de infección intratraqueal y aplicación de tratamientos a ratones.

La cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv adquirida de la ADCC o la cepa multidrogoresistente aislada y donada por el IMSS. Se cultivaron en medio 7H9. Después de cultivarse por un mes, las micobacterias se separaron y ajustaron a 2.5×10^5 bacterias en 100 μL de amortiguador de fosfatos salino (PBS), se dividieron en alícuotas de 1 mL, las cuales se mantuvieron a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Antes de su uso las bacterias fueron recontadas y se midió su viabilidad utilizando diacetato de fluoresceína.

Ratones machos BALB/c de 6 a 8 semanas se introdujeron a una cámara de gases en la cual se anestesiaron utilizando sevorane (sevoflurano) 0.1 mL por ratón, el cual es un anestésico y relajante muscular. Ya que los animales se encuentren anestesiados se colocaron en tabla de disección, se le introdujo cánula vía oral a la traquea y se inyectó la suspensión bacteriana (2.5×10^5 micobacterias/100 μL de solución salina), se retiró la cánula y se colocó al ratón en caja de almacenamiento hasta su recuperación de la anestesia. Los ratones infectados se almacenaron en cajas, con microaisladores conectados a un sistema de presión negativa. Todo este procedimiento es realizado en campana de seguridad biológica P3. Después de mes y medio de infección los animales se distribuyeron al azar en grupos de 10 animales.

Los ratones infectados con *M. tuberculosis* cepa H37Rv se dividieron en los siguientes grupos experimentales:

- 1.- Grupo control que sólo recibió el diluyente (Solución salina).
- 2.- Grupo infectado tratado con L-isoleucina (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.- Grupo infectado 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 tratado con L-Isoleucina más antibióticos convencionales anti-tuberculosos.

Cada uno de estos ratones fueron sacrificados al día 7, 14, 30 y 60 días después de iniciado el tratamiento, debido a que se quería monitorear la expresión de β -defensinas durante el tratamiento. Se obtuvieron los pulmones para su posterior análisis por diversas técnicas.

Los ratones que fueron tratados con los diferentes péptidos sintéticos se dividieron en los siguientes grupos:

1. Grupo control: solo recibieron el diluyente (Solución salina).
2. Grupo tratados con los diferentes péptidos (32 μ g de péptido/100 μ L de solución salina).

Los ratones infectados con *M. tuberculosis* cepa MDR se dividieron en los grupos experimentales:

1. Grupo control que solo recibieron el diluyente (Solución salina).
2. Grupo infectado tratado con L-Isoleucina (250 μ g/100 μ L)

Estos animales fueron sacrificados a los días 14, 30 y 60 después de iniciado el tratamiento, los pulmones obtenidos se utilizaron para su análisis por medio de UFCs, análisis histológico y análisis de la expresión genética.

Extracción de RNA.

Para la extracción de RNA fueron utilizados los pulmones congelados en nitrógeno líquido, los cuales bajo condiciones de congelación del tejido fueron triturados hasta la obtención de polvos finos de tejido. Posteriormente se

procedió a colocar 50 mg de este polvo en tubos de 1.5 mL. Se adicionaron 750 μ L de Trizol (Invitrogen, Calsburg, CA. USA) y se homogenizo hasta eliminarse los grumos formados, se dejó reposar por 5 minutos y se procedió a adicionar 200 μ L de Cloroformo se homogenizó y se dejó reposar durante 10 minutos, se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C, se obtuvo la fase acuosa, se le adicionó 500 μ L de Isopropanol y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 75 %, se centrifugo 5 minutos a 7500 rpm a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejo secar al aire libre. Se disolvió el RNA obtenido con agua estéril libre de RNAsas.

Posteriormente para observar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel desnaturizante, que posteriormente seria revelado con bromuro de etidio.

Síntesis de cDNA.

El mRNA fue transcrito inversamente utilizando el kit Omniscript Reverse transcription de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA fue mezclado con una mezcla de reacción la cual contenía 10X buffer RT, Mezcla de dNTPs (5 mM de cada trifosfato desoxybucleotido), 10 μ M del primer Oligo-dT 10 unidades/ μ L de Inhibidor de RNAsas, Transcriptasa inversa Omniscript y Agua libre de RNasa. La mezcla final fue sintetizada en un termociclador marca Biorad, utilizando un ciclo de 95°C por 15 minutos y 37°C por 50 minutos, transcurrido este ciclo, la mezcla fue recolectada y puesta en refrigeración. La concentración del cDNA fue medido por espectrofotometría, leyéndose cada muestra a una longitud de onda de 280nm y para descartar contaminación a una longitud de onda de 260nm.

Posteriormente para verificar la integridad del cDNA se realizó un PCR para Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GADPH), el cual se corrió por electroforesis en un gel de agarosa al 1.8% obteniendo un producto de 400 pb.

RT-PCR para el análisis de de la expresión de péptidos antimicrobianos.

Los primers utilizados para fragmentos genéticos de 102pb para mBD-3 fueron; 5'- ATC CAT TAC CTT CTG TTT GCA TTT C-3'(forward) y 5'- TGT AGG TGG AGA CAG CAG C-3'(reverse), los primers utilizados para mBD-4 fueron: 5'- CAC ATT TCT CCT GGT GCT GCT-3' y 5'-TGA TAA TTT GGG TAA AGG CTG CA-3' y los primers utilizados para CRAMP fueron: 5'-GAA GAC CCA AAG GAA TGG CC-3' y 5'CAG AGC CCA GAA GCC TGA GC-3. Un microgramo de cDNA fue agregado a la mezcla de reacción, la cual contenía; Buffer 10x PCR, MgCl₂ (10mM), trifosfato desoxynucleotido (25mM), 1 unidad e Taq polimerasa y los primers respectivos para cada caso. Todos los primers fueron diseñados utilizando el programa Primer Express, el cual fue proporcionado por Applied Biosystems y fueron sintetizados por Invitrogen.

Los amplificados obtenidos se corrieron por electroforesis en geles de agarosa al 3 %, los geles fueron revelados con SYBR Green (Invitrogen, Calsbur, CA, USA.), y analizados por densitometría por medio del software Chemiimager (Alpha- Innotech) y como marcador de masa de DNA se utilizaron 2 µL de Low DNA Mass de Invitrogen.

RT-PCR en tiempo real para el análisis de la expresión genética de mBD-3, mBD-4 y citocinas pro-inflamatorias.

La PCR en tiempo real fue desarrollada utilizando el equipo 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, USA). Se utilizaron 100 ng de cDNA, 12.5 µl de la

mezcla Quantitect SYBR Green PCR (Qiagen,USA). (QuantiTect SYBR Green PCR Buffer: (que contiene Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM MgCl_2 , pH 8.7), la mezcla de dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP), SYBR green I y ROX), 50 pmol del primer sentido y 50 pmol del primer antisentido.

La formación de un sólo producto de PCR y el tamaño esperado del amplicón se confirmó por electroforesis del producto de PCR. Las alícuotas de los productos de PCR fueron usadas para la cuantificación en un gel por la medición y la comparación de las intensidades de los fragmentos teñidos con Sybr Green con un marcador de masa de DNA (Invitrogen). Una curva estándar fue generada con una serie de diluciones seriadas de cada una de las citocinas. Las curvas estándar de productos de PCR cuantificados y diluidos así como controles negativos, se incluyeron en cada corrida de PCR.

Los primers utilizados para fragmentos genéticos de 102pb para mBD-3 fueron; 5'- ATC CAT TAC CTT CTG TTT GCA TTT C-3'(forward) y 5'- TGT AGG TGG AGA CAG CAG C-3'(reverse), los primers utilizados para mBD-4 fueron: 5'- CAC ATT TCT CCT GGT GCT GCT-3' y 5'-TGA TAA TTT GGG TAA AGG CTG CA-3', para TNF α : 5'-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3', 5'-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3' y para IFN γ :5'-GGTGACATGAAAATCCTGCAG-3', 5'-CCTCAAACCTTGGCAATACTCATGA-3'. Las condiciones usadas fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguidas por 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C o 58°C por 20 segundo, 72°C por 34 segundos. La cantidades del mRNA específico en la muestra fueron medidas de acuerdo a lo que corresponde el gene específico estándar. El número de copias mRNA de cada citocina estuvieron relacionadas con un millón de copias de mRNA que codifican al gen de G3PDH

Preparación del tejido pulmonar para estudio histológico.

Para estudio histológico, los pulmones de tres ratones de cada tiempo de sacrificio se fijaron por perfusión intratraqueal con etanol absoluto, el tejido se deshidrató con alcoholes de concentración creciente, se incluyeron en parafina, se cortaron a 3 μm 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 7H10 (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 realizó prueba de esterilidad a 37°C por 48 horas. Se guardaron en refrigeración hasta su uso (no más de una semana).

El pulmón derecho o izquierdo de tres ratones de cada tiempo de sacrificio (7 días, 15 días, 1 y 2 meses de tratamiento) se usaron para cuantificar el número de bacterias viables. Los pulmones se homogenizaron con un politrón (Kinematica, Luzern, Switzerland) en tubos Falcon estériles con solución salina. 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 invirtieron las cajas y se incubaron a 37°C, 5% de CO_2 y se leyeron a los 15 días.

RESULTADOS.

Determinación de la capacidad bactericida de células epiteliales infectadas con *M. tuberculosis* mediada por la inducción de defensinas.

Los resultados obtenidos hasta el momento en nuestro laboratorio indican que la L-Isoleucina es capaz de inducir la producción de defensinas *in vitro* en cultivos de neumocitos tipo 2, sin embargo decidimos investigar si la inducción de los péptidos antimicrobianos por si sola era capaz de disminuir la viabilidad micobacteriana, por tal motivo medimos el efecto bactericida de las defensinas en cultivo de neumocitos tipo 2 infectados con *M. tuberculosis* y tratadas con L-Isoleucina. Para dicho fin, realizamos cultivos de neumocitos tipo 2 y los infectamos en multiplicidad de infección con *M. tuberculosis* cepa H37Rv de la siguiente manera, 0.1 bacterias por cada célula, 1 bacteria por cada célula y 5 bacterias por cada célula, para una posterior incubación de 24 horas. Transcurrido este tiempo de incubación se estimularon las células con 25µg/mL de L-Isoleucina y se re-incubaron por 48h, pasado este tiempo se procedió a realizar las unidades formadoras de colonia.

Los resultados obtenidos demostraron que la estimulación de neumocitos tipo 2 con L-Isoleucina, disminuye la viabilidad de las micobacterias, lo cual, lo podemos asociar con la inducción de β -defensinas, ya que, hasta el momento no se conoce otro mecanismo bactericida presente en este tipo de células (Fig.3.).

Capacidad micobactericida de la inducción de β -defensinas *in vitro*.

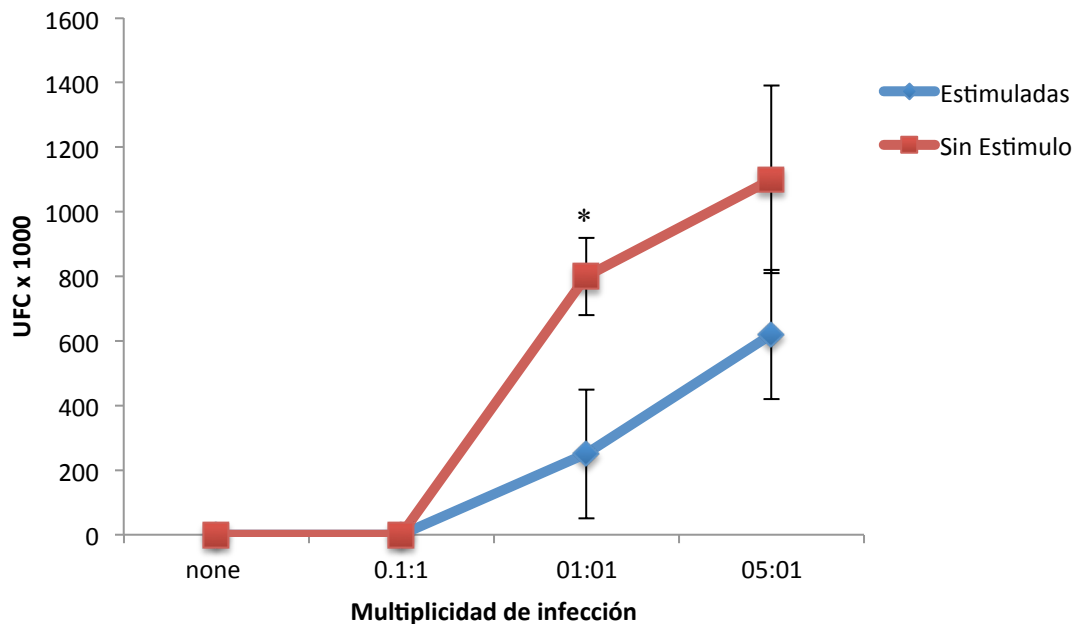


Fig.7. Efecto *in vivo* de la inducción de defensinas sobre *M. tuberculosis*. Neumocitos tipo 2, fueron cultivados e infectados *in vitro* a diferentes multiplicidades de infección con *M. tuberculosis*. Posteriormente, se indujo la producción de defensinas mediante el uso de L-Isoleucina y se midió la viabilidad de la micobacteria.

Con estos resultados pudimos observar *in vitro* que la inducción de β -defensinas por L-isoleucina, incrementa la capacidad bactericida de las células epiteliales en contra de *M. tuberculosis*.

Determinación del tiempo y concentración de L-isoleucina a la cual existe una mayor inducción de péptidos antimicrobianos *in vivo*.

Debido a que en los experimentos *in vitro* anteriores se pudo determinar que en células epiteliales de pulmón la L-Isoleucina es un fuerte inductor de β -defensinas y que éstas, a su vez, tienen efecto antimicrobiano, quisimos observar si este aminoácido inducía la producción de estos péptidos en un modelo *in vivo*. Para ello, decidimos iniciar el experimento tratando a ratones BALB/c sanos con diferentes

dosis de este aminoácido las cuales iban de 50 μ g hasta 1 mg y utilizando como grupo control a ratones lo cuales solo recibieron solución salina. Debido a que queríamos determinar el mayor efecto inductor de cada una de estas dosis, decidimos realizar una cinética de corta duración en la cual se obtuvieron las muestras a las 12, 18, 24 y 48 horas, para el posterior análisis de la expresión génica de mBD-3 y mBD4, mediante RT-PCR (Fig.4.).

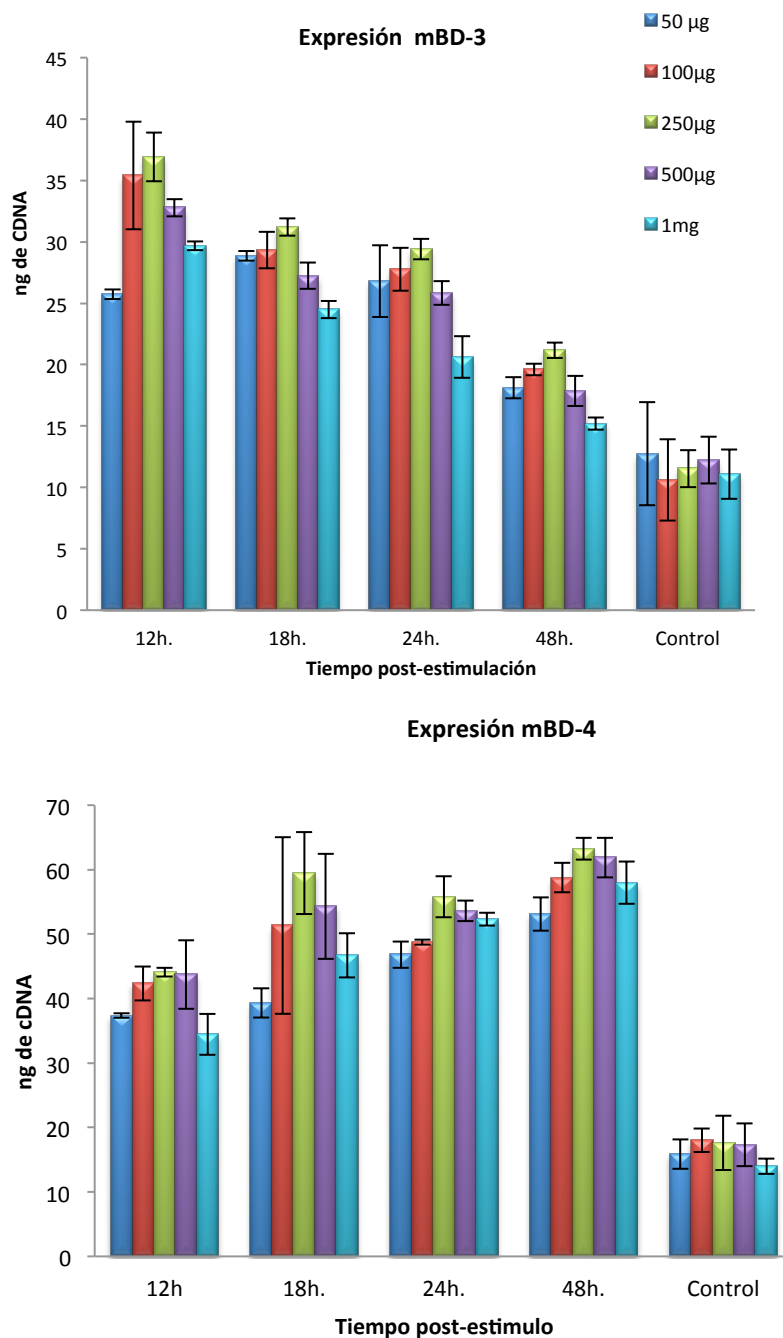


Fig. 8. Expresión de mBDs en ratones sanos tratados con L-Isoleucina. Figura (a) se observa expresión de mBD-3. (b) se observa expresión de mBD-4.

Estos experimentos nos permitieron demostrar que *in vivo*, la L-iso-leucina es un fuerte inductor de β -defensinas, observándose que existía un incremento en la expresión de éstos péptidos antimicrobianos a bajas dosis aminoácido (50 μ g/100 μ L), sin embargo, para realizar nuestro siguiente experimento decidimos utilizar 250 μ g/100 μ L, ya que, se observó que a esta dosis se encontraba un nivel máximo de expresión y que al aumentar la dosis la expresión disminuía. También observamos que el aumento en la expresión se mantenía durante las siguientes 48h, por lo cual, pensamos que la aplicación de este aminoácido como tratamiento, deberíamos aplicar 250 μ g/100 μ L cada 48h.

Tratamiento con L-Isoleucina a ratones infectados con *M. tuberculosis* cepa H37 Rv.

Con los resultados obtenidos hasta el momento pudimos determinar que utilizando 250 μ g/100 μ L de L-iso-leucina y administrándola cada 48h, aún se tiene niveles elevados de expresión de β -defensinas, por lo tanto, decidimos utilizar este tratamiento en ratones infectados con *M. tuberculosis* cepa H37 Rv y determinar si este tratamiento ayuda al control de la enfermedad. Para comprobar esto, infectamos ratones BALB/c por vía intratraqueal con 250000 bacterias y transcurridos 60 días post-infección, iniciamos con el tratamiento de L-iso-leucina y después de 7, 15, 30 y 60 días se sacrificaron a los ratones, obteniendo los pulmones, para su posterior análisis mediante la determinación de la carga bacilar, expresión genética y daño tisular tanto en ratones tratados como el grupo de ratones control (fig. 5).

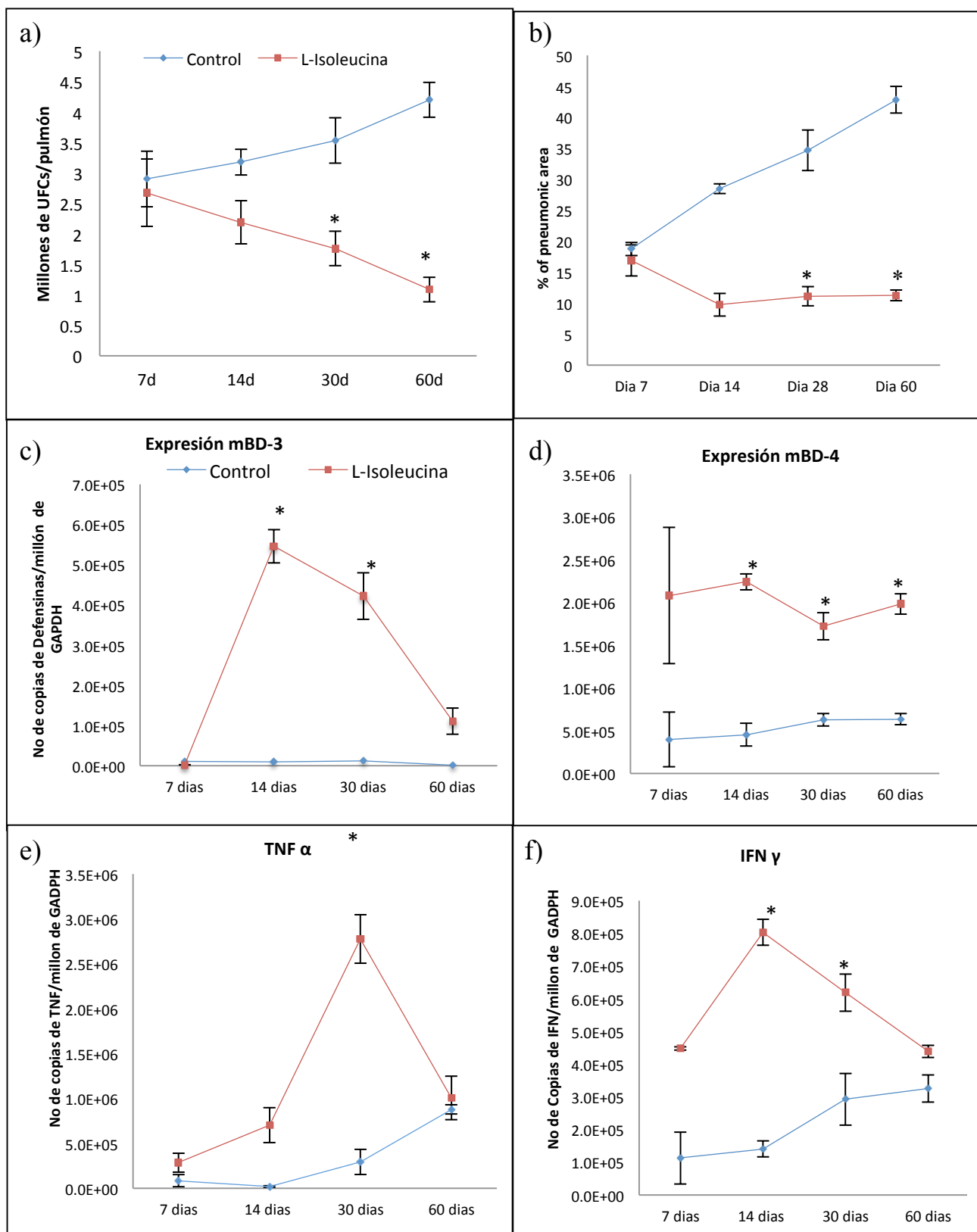


Fig. 9. Los ratones infectados con Tb fueron tratados con L-Isoleucina. a) Disminución de UFC en ratones tratados con L-Ile. b) Áreas neumónicas de ratones tratados y control. c) y d) Expresión genética de mBD-3 y mBD-4 respectivamente, donde se observa una mayor expresión en ratones tratados con L-Ile. e) y f) aumento de citocinas pro-inflamatorias que correlacionan con la mayor expresión de β -defensinas.

Estos datos demuestran que la administración de L-iso-leucina disminuye la viabilidad de la micobacteria así como el daño pulmonar, lo cual correlaciona con un incremento en la expresión de mBD-3 y mBD-4. Además, este aumento en la expresión genética también correlaciona con el incremento en la expresión de IFN γ y TNF α , lo cual nos permite sugerir que la inducción de defensinas, aumenta la producción de estas dos citocinas pro-inflamatorias mediante la activación de algunas células del sistema inmune como células dendríticas, lo cual permitirá una mejor activación de macrófagos y por lo tanto una mayor efectividad en la eliminación de *M. tuberculosis*.

Efectos de la L-Isoleucina al aplicarse en combinación con la terapia convencional, en ratones infectados con *M. tuberculosis*.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, podemos decir que el tratamiento con L-iso-leucina disminuye significativamente la carga micobacteriana y la neumonía después de 30 días de administración. A continuación, nos preguntamos si el tratamiento con L-iso-leucina acorta la duración del tratamiento convencional contra la infección por tuberculosis. Para poder determinar el efecto sinérgico de la L-iso-leucina con el tratamiento convencional, se procedió a infectar ratones y después de 6 semanas de infección se aplicó diariamente el tratamiento convencional y cada 48h el tratamiento de L-iso-leucina, se sacrificaron a los ratones a los días 7, 14, 30 y 60 días después de iniciado el tratamiento y los pulmones obtenidos se utilizaron para determinar la carga bacilar, obteniendo los siguientes resultados (Fig. 6.) e

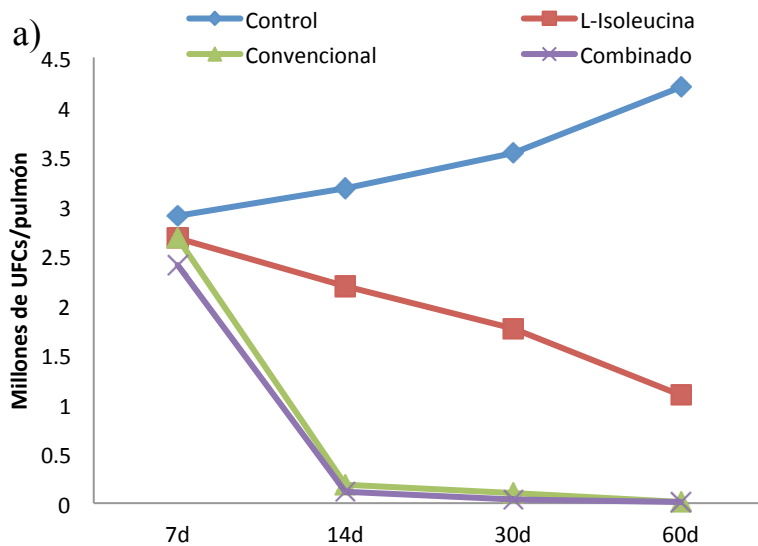
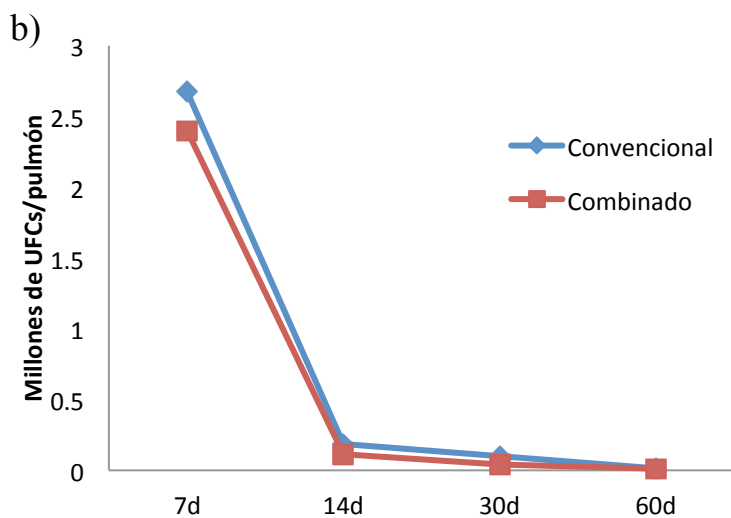
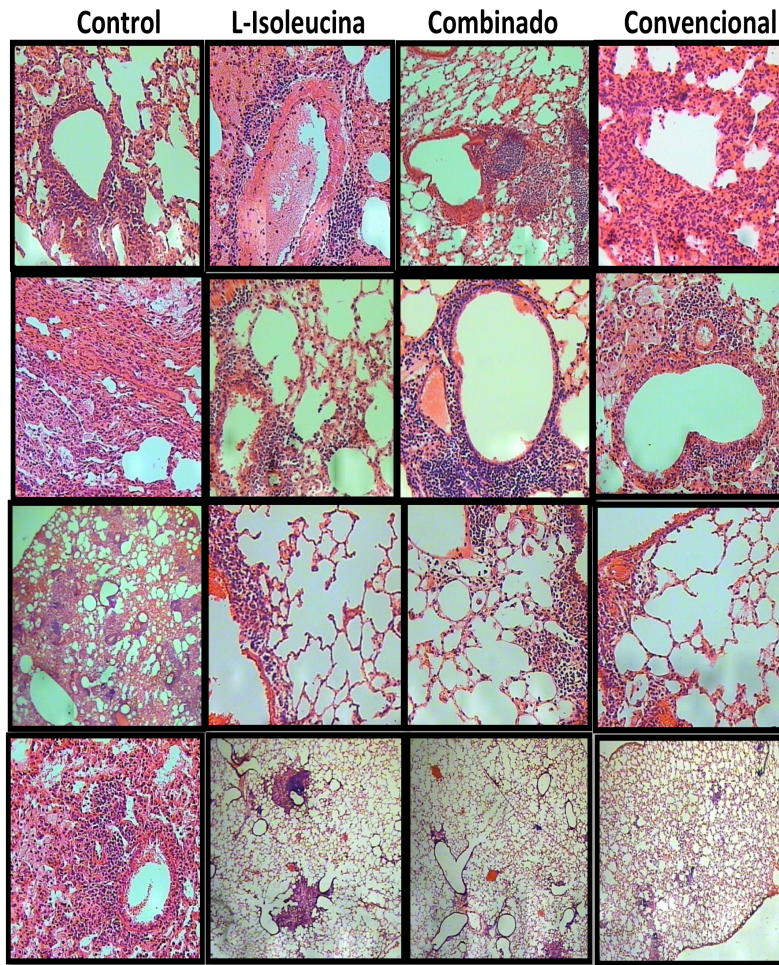


Fig. 10. Comparación entre tratamiento convencional, L-Isoleucina y mezcla entre ambos tratamientos. (a) UFCs después de 60 días con diferentes tratamientos. (b) Comparación entre el tratamiento convencional y el tratamiento combinado (la mezcla del tratamiento convencional y L-Isoleucina).



Estos resultados nos muestran que la administración de la L-Isoleucina junto con el tratamiento convencional, no muestra adyuvancia en comparación de aquellos ratones a los cuales solo se les administro el tratamiento convencional.

Sin embargo se quiso determinar si la disminución de la carga bacilar correlacionaba con el daño en los pulmones de los ratones, por lo tanto, se procedió a realizar análisis morfométricos de los pulmones de los ratones, con lo cual se puede observar que tanto el tratamiento convencional como aquel que se combina con la L-isoleucina tienen efectos muy similares en la disminución en la carga bacilar como en la disminución del daño tisular (Fig. 7.).



Morfometría

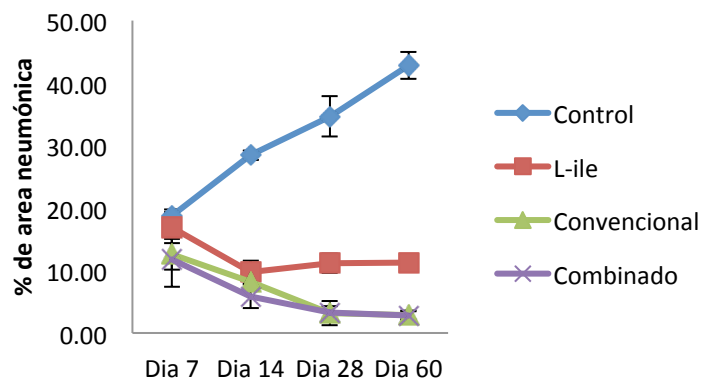


Fig. 11. Comparación de áreas neumónicas en ratones con diferentes tratamientos. a) Panel de fotografías en el que se hace comparación de daños pulmonares entre tratamientos y el grupo control. b) Gráficas del porcentaje de daño pulmonar.

Finalmente y debido a que tanto en la carga bacilar como en el daño pulmonar ambos tratamientos se comportaban de manera similar, quisimos determinar la expresión genética de ambas defensinas y observar el papel que estas tienen durante el tratamiento combinado así como en el tratamiento convencional se realizó PCR en tiempo real para cada una de las defensinas, obteniendo los siguientes resultados (Fig.8.).

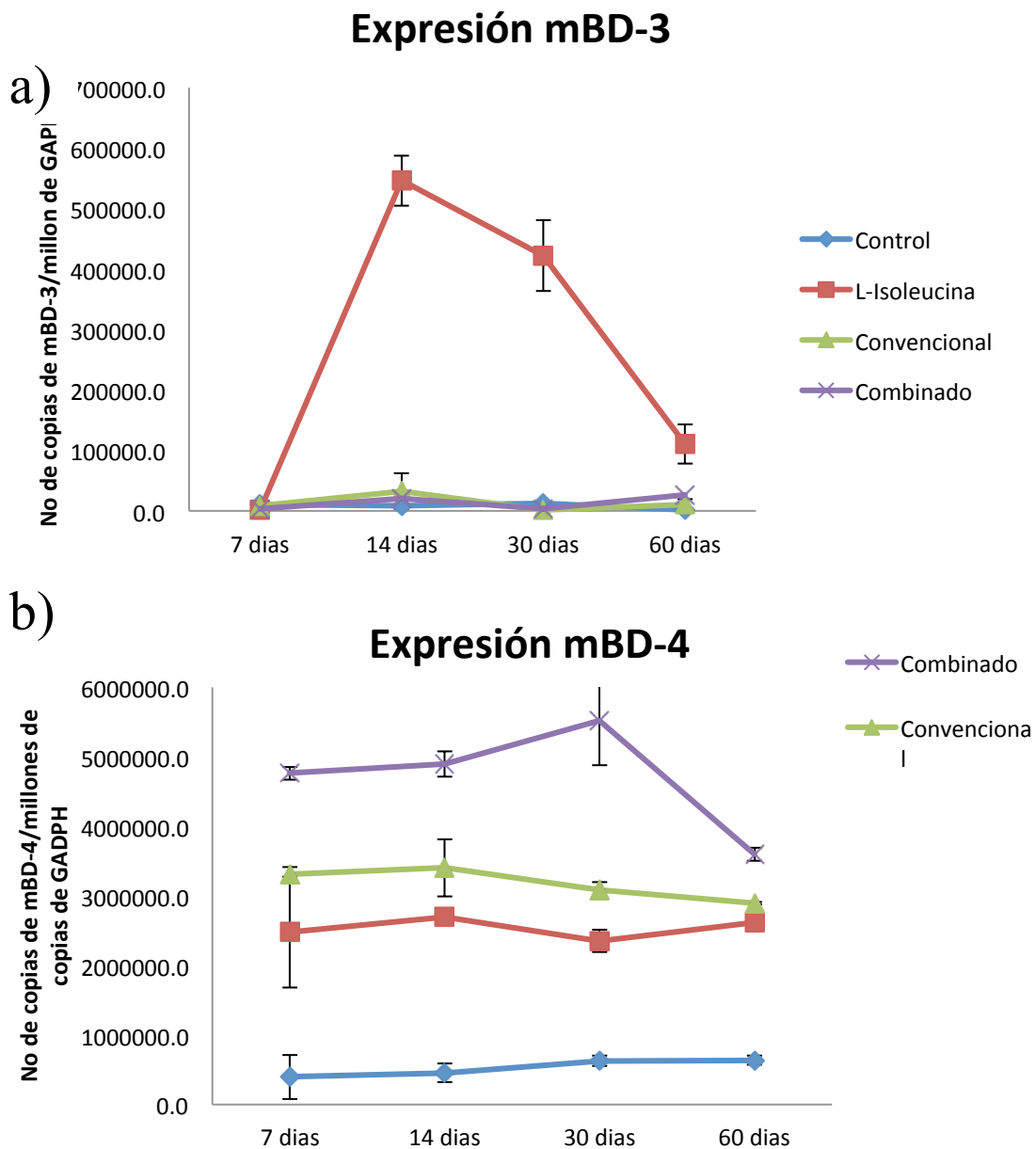


Fig.12. Comparación en la expresión genética de mBD-3 y mBD-4 en ratones con diferentes tratamientos. a) Expresión genética de mBD-3 b) expresión genética de mBD-4

Debido a que se encontró una gran expresión de mBD-4 en aquellos ratones que recibieron el tratamiento convencional procedimos a realizar PCR en tiempo real para citocinas pro-inflamatorias para observar el efecto inmunomodulador de las defensinas (Fig. 9.).

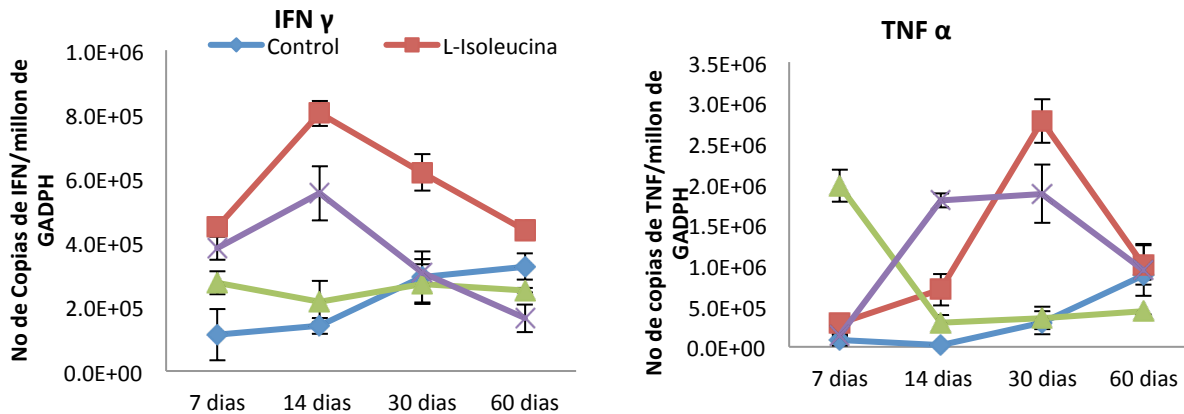


Fig. 13. Expresión genética de citocinas pro-inflamatorias, en ratones con diferentes tratamientos

Con estos resultados pudimos observar que aunque no existe diferencia en la carga bacilar y daño pulmonar de aquellos ratones que solamente recibieron el tratamiento convencional comparado con aquellos a los cuales se les aplicó el tratamiento combinado, si existe una diferencia inmunológica entre ambos tratamientos. Lo cual puede explicarse por las propiedades inmunoregulatoras que presentan las defensinas.

Efectos de la L-Isoleucina al aplicarse en ratones infectados con cepas multidrogoresistentes.

Debido a la aparición de cepas resistentes a los fármacos convencionales es necesario buscar nuevas estrategias que permitan eliminar a este tipo de micobacterias. Con estos antecedentes y los datos obtenidos hasta el momento en el cual se observa que la administración de L-Isoleucina a ratones infectados con cepas drogossensibles muestran un efecto terapéutico pensamos que la

administración de este aminoácido a ratones infectados con cepas multidrogoresistentes tendría un efecto terapéutico similar. Por lo tanto, infectamos ratones BALB/c con cepa MDR y después de 60 días de infección procedimos a aplicarles por vía intratraqueal 250µg/100µL de L-isoleucina cada tercer día durante 60 días sacrificando a los animales a los días 15, 30 y 60, de los cuales obteníamos sus pulmones para su análisis posterior. Pudiendo observar que este tratamiento disminuye la viabilidad de dicha micobacteria (Fig.10.).

UFCs en ratones infectados con cepa MDR y tratados con L-Isoleucina.

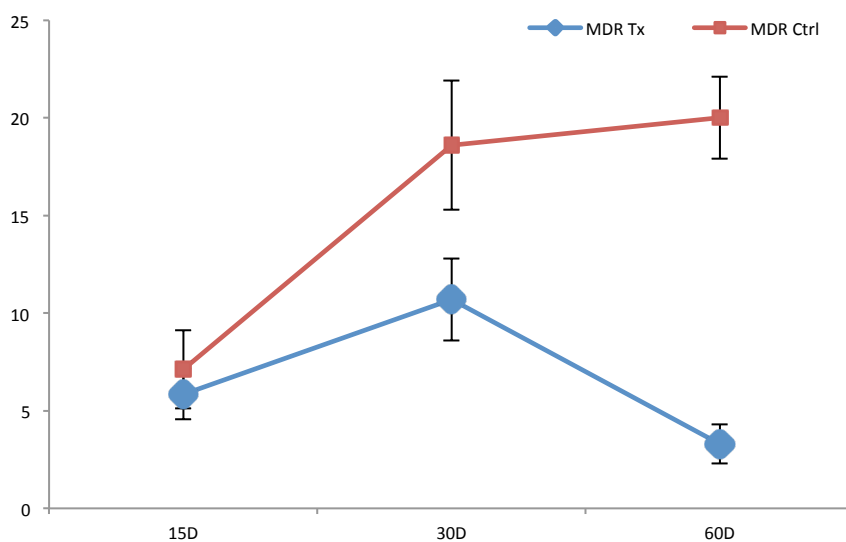


Fig.14. Tratamiento con L-Isoleucina a ratones infectados con *M. tuberculosis* cepa MDR.

Estos resultados nos demuestran que el tratamiento con L-Isoleucina disminuye la viabilidad de cepas drogossensibles así como en cepas multidrogoresistentes, lo cual, de acuerdo a nuestra hipótesis, está dado por el aumento en la expresión de β -defensinas. Por lo tanto, para poder comprobar nuestra hipótesis decidimos determinar la expresión genética de estos péptidos

mediante RT- qPCR, observando que existe un aumento en la expresión de estos péptidos antimicrobianos además de observarse un aumento en la expresión de IFN- γ , la cual es un citocina muy importante en el control del crecimiento micobacteriano. Como se observa en la figura 11, el aumento de estas moléculas correlaciona con la disminución en la carga micobacteriana en pulmón de los ratones infectados.

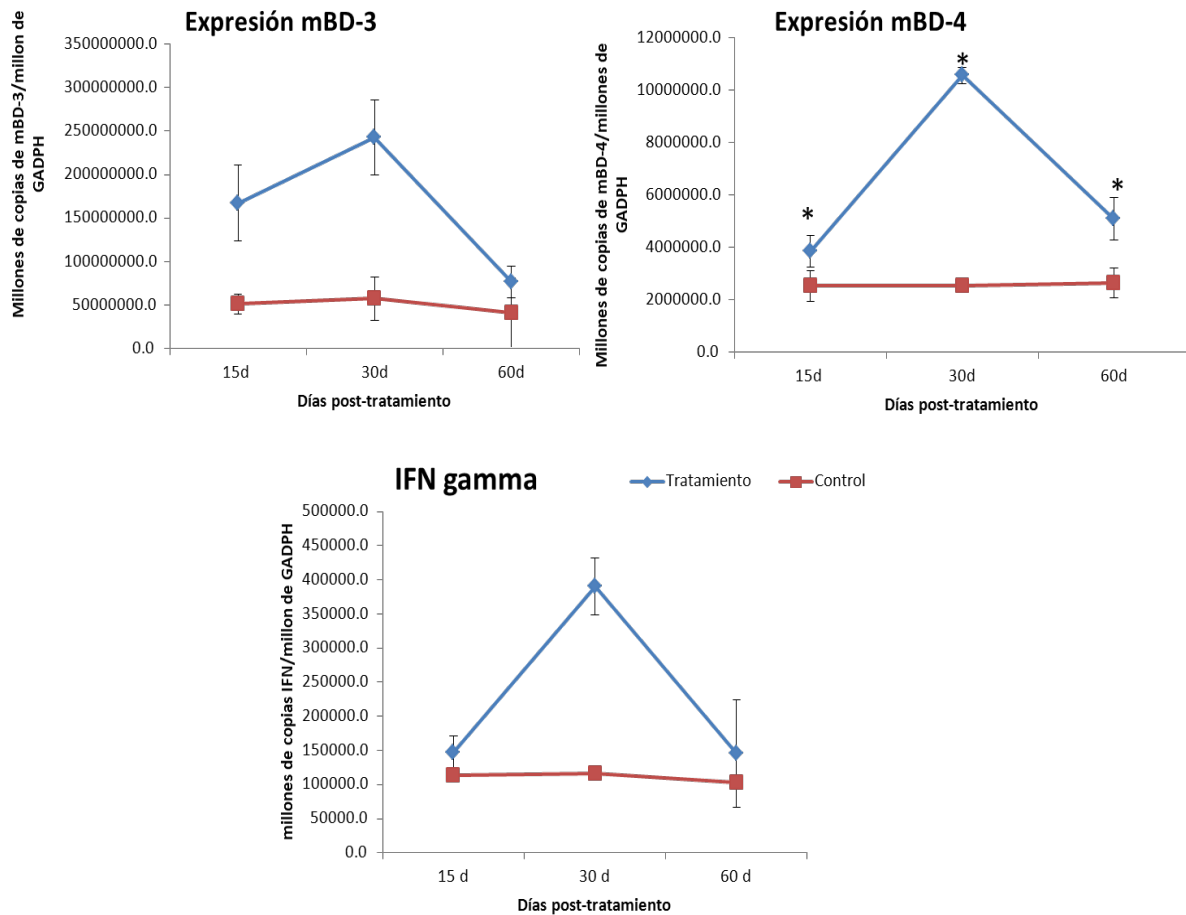


Fig.15. Aumento de la expresión de β -defensinas en ratones infectados con cepas multidrogo-resistentes después de ser tratados con L-Isoleucina.

Evaluación de la citotoxicidad y la Concentración Mínima Inhibitoria de los péptidos antimicrobianos sintéticos *in vitro*.

Con los resultados obtenidos hasta el momento con las β -defensinas decidimos estudiar el efecto de otros péptidos antimicrobianos, los cuales habían sido sintetizados y evaluados previamente con otras bacterias por el Dr. Robert Hancock en la Universidad de Columbia, obteniendo prometedores resultados [88,

93, 94]. Para este fin, decidimos investigar si estos péptidos poseían efectos micobactericidas, por lo tanto, decidimos realizar pruebas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria, mediante la prueba de alamar azul, utilizando como control *Pseudomonas aeruginosa*, ya que, en experimentos previos se había observado una gran eficacia de estos péptidos en contra de esta bacteria [95, 96]. Para poder demostrar esto realizamos cultivos de micobacterias hasta fase estacionaria, se tomaron 100µL de este cultivo y se incubaron por 8 días con diferentes concentraciones del péptido a evaluar. Transcurrido este tiempo se adicionó alamar azul y se incubó durante 24 hrs para su lectura posterior, obteniendo los siguientes resultados (Fig. 12).

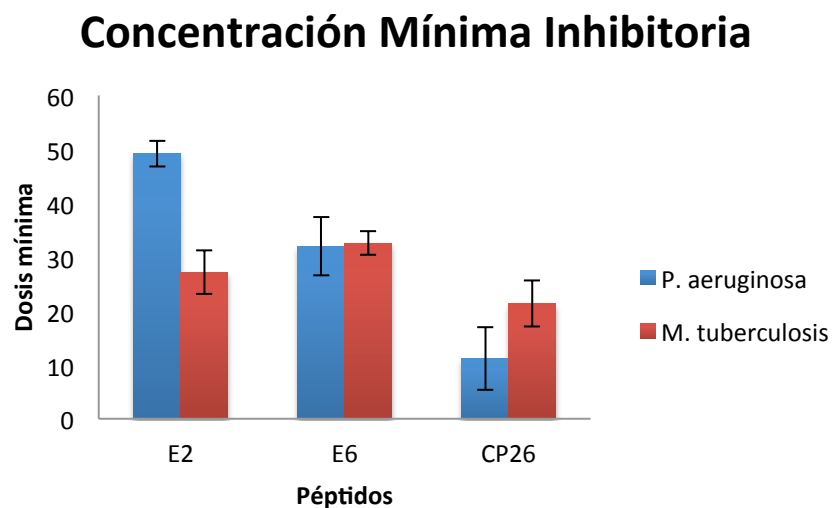


Fig.16. Concentración mínima inhibitoria de los péptidos sintéticos en contra de *M. tuberculosis*. Prueba realizada a bacterias en fase estacionaria e incubada con los diferentes péptidos, utilizando alamar azul como indicador de viabilidad celular.

Los datos obtenidos en este experimento nos permiten observar que todos los péptidos evaluados tienen efecto micobacteriano a bajas dosis, observando que el péptido que tenía un mejor efecto es el CP26.

Los datos obtenidos hasta el momento nos mostraban la dosis micobactericida de cada uno de estos péptidos, posteriormente, para demostrar la

manera en que interaccionan estos péptidos con las bacterias, decidimos realizar micrográficas electrónicas para observar el posible daño que podrían tener las bacterias al exponerlos con estos péptidos obteniendo las siguientes imágenes (Fig. 13).

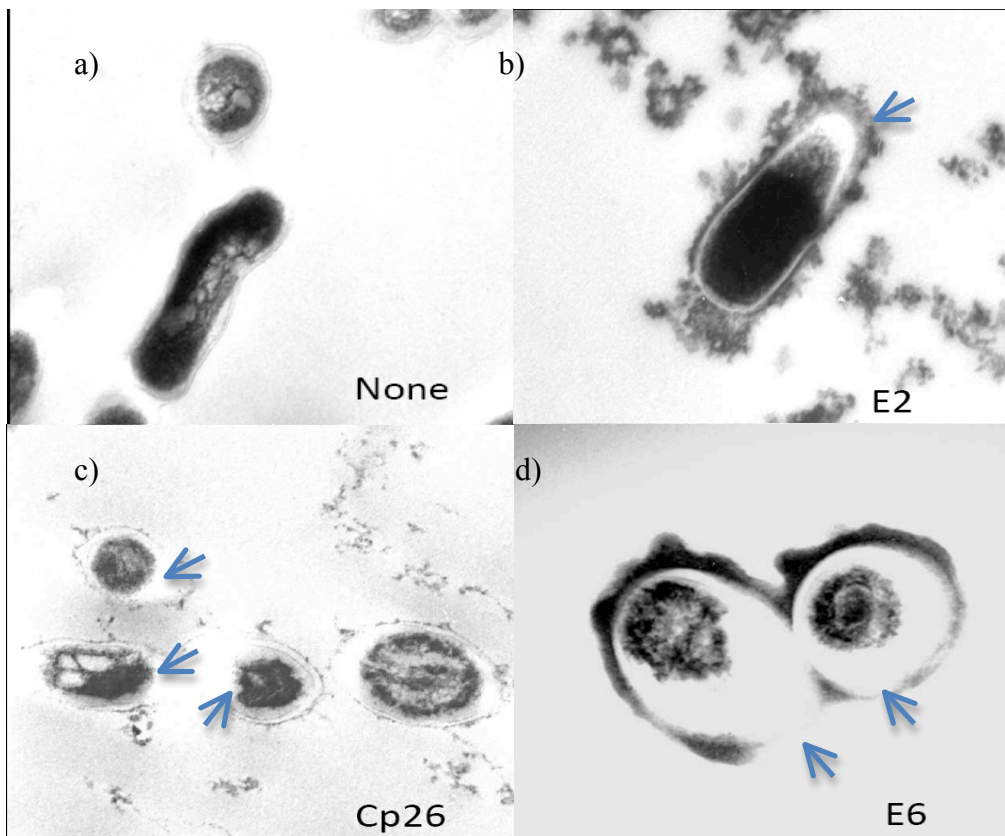


Fig. 17. Micrografía electrónica de bacterias expuestas a péptidos antimicrobianos sintéticos. a) se observa *M. Tuberculosis*, sin exposición a péptidos. b), c) y d) Bacilos expuestos a los diferentes péptidos antimicrobianos, observándose daño celular asociado con la discontinuidad en la pared celular (flecha).

En las cuales podemos observar que todos los péptido interactúan directamente con la pared micobacteriana, causando una discontinuidad en esta (la cual se señala con las flechas), lo cual produce lisis bacteriana.

Debido a la capacidad micobactericida demostrada por estos péptidos pensamos que podría ser un tratamiento prometedor para esta enfermedad, sin embargo antes de pasar a esta fase debíamos de demostrar que a bajas dosis no existiera citotoxicidad para las células del pulmón, por lo tanto, decidimos realizar experimento *in vitro* con el fin de demostrarlo. Para dicho fin, realizamos cultivos celulares de neumocitos y los expusimos a estos péptidos, para después observar la viabilidad de las células, mediante el uso de azul de metileno como colorante vital encontrando los siguientes resultados (fig. 14):

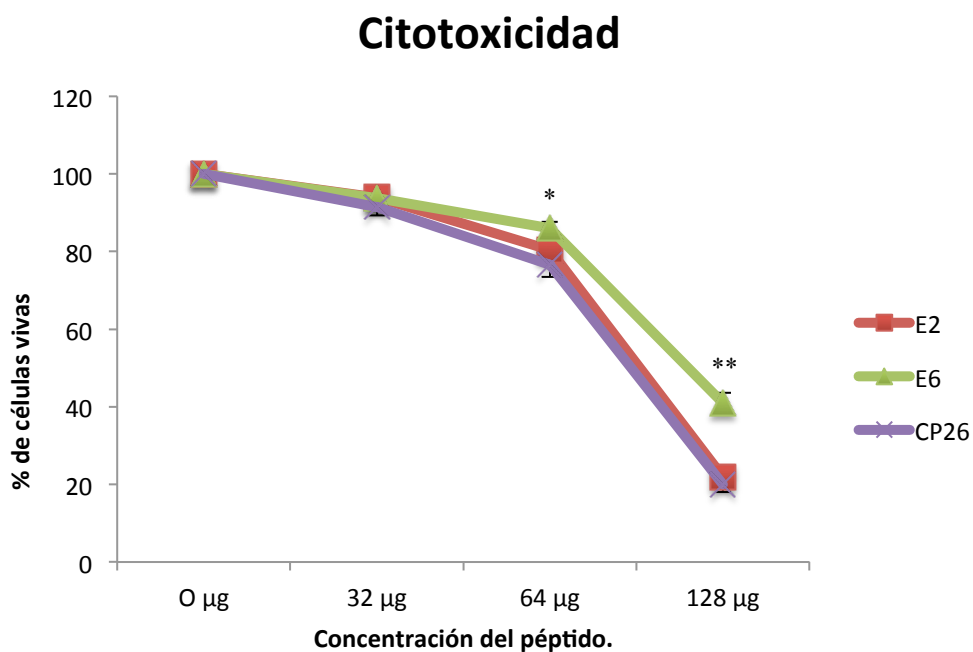
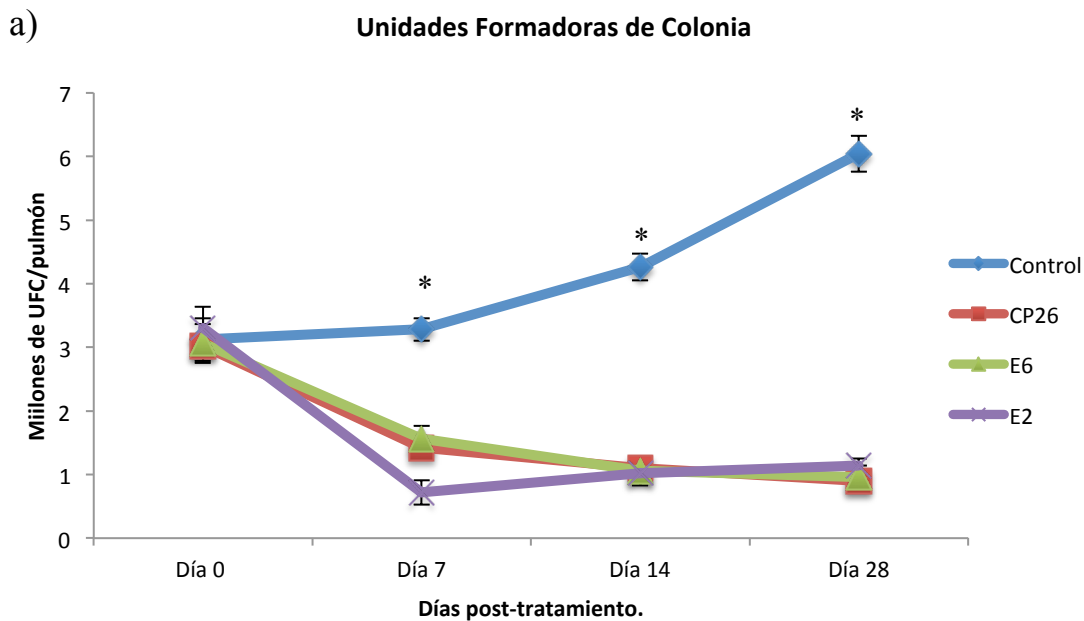


Fig. 18. Citotoxicidad de los péptidos en cultivo de neumocitos tipo 2. Neumocitos tipo 2 se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de péptidos y se midió la toxicidad ocasionada por los péptidos antimicrobianos.

Con estos resultados podemos confirmar que a bajas concentraciones (0-32µg) estos péptidos no producen ningún efecto citotóxico en células epiteliales de pulmón y que también a bajas concentraciones tiene un importante efecto micobactericida, por lo tanto, decidimos probar su efecto *in vivo* en el modelo experimental de tuberculosis murina.

Efecto Terapéutico de los péptidos antimicrobianos sintéticos en ratones infectados con *M. tuberculosis* cepa H37Rv.

Los resultados obtenidos en las pruebas realizadas *in vitro* nos alentaron para llevar a cabo los experimentos *in vivo*, para lo cual infectamos ratones BALB/c con *M. tuberculosis* cepa H37 Rv y después de 2 meses, cuando la enfermedad se encontraba en una etapa progresiva, iniciamos el tratamiento de los ratones con 32 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$, ya que, encontramos que a esta concentración todos los péptidos tienen efecto bactericida y además no producen efectos citotóxicos importantes. El tratamiento en una primera etapa se dió por vía intratraqueal, teniendo tiempos de sacrificio cortos los cuales fueron 0, 7 , 14 y 28 días post-tratamiento. Esta primera etapa fue realizada con el fin de observar el efecto *in vivo* que tiene estos péptidos, observando que todos tienen un importante efecto en la disminución de la carga bacteriana así como en el daño pulmonar (Fig. 15).



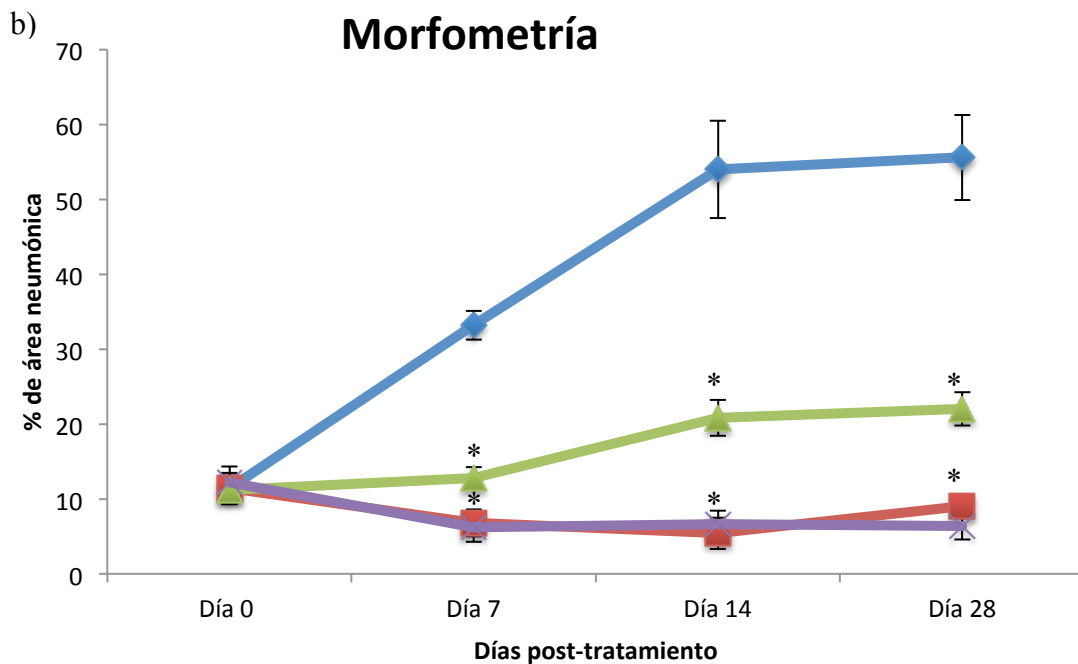


Fig.19. Efecto terapéutico de los péptidos antimicrobianos sintéticos en cepas drogo-sensibles durante un mes de tratamiento. a) Se observa disminución en carga bacteriana en aquellos ratones tratados con los péptidos antimicrobianos después de los primeros 7 días de tratamiento. b) Análisis morfométrico de los pulmones de ratones infectados con cepas drogo-sensibles, con y sin tratamiento de

Los resultados de este primer experimento, en los cuales se observa que los 3 péptidos muestran un prometedor efecto terapéutico en contra de, *M.tuberculosis*, nos hicieron pensar que la utilización prolongada de estos péptidos podría tener un mejor efecto micobactericida, por lo tanto, decidimos realizar un segundo experimento en donde se aplicarían durante dos meses estos péptidos realizando el sacrificio de los ratones a los 30 y 60 días post-tratamiento, observando que la carga bacteriana y el daño en los pulmones de estos ratones disminuye significativamente (Fig. 17).

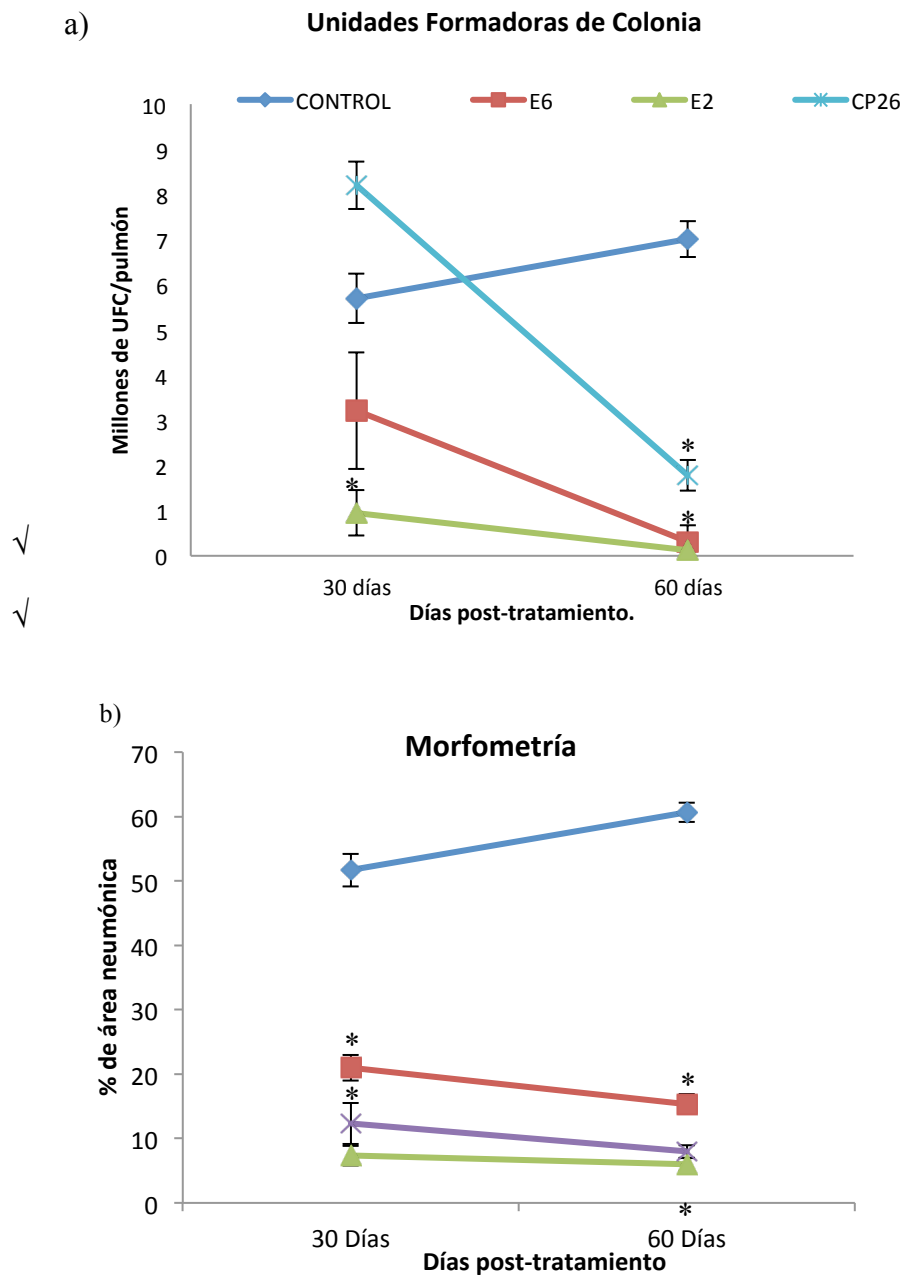


Fig. 20. Efecto terapéutico del uso de péptidos antimicrobianos sintéticos después de 2 meses de tratamiento. Se observa la disminución de las UFC (a) así como la disminución del área neumónica (b) en ratones tratados con los diferentes péptidos antimicrobianos sintéticos

Estos resultados nos permiten observar que el tratamiento con péptidos antimicrobianos sintéticos tiene una gran efectividad, especialmente el péptido E2, en el cual observamos que la carga bacteriana disminuye casi a cero y de manera similar se observa que el daño pulmonar disminuye significativamente en todos los casos con respecto al control.

Se puede observar que la cantidad de bacterias presentes en el pulmón de aquellos ratones tratados con el péptido CP26 tienen una mayor carga bacteriana que lo observado en experimentos anteriores, lo cual lo podríamos explicar debido a una mala infección, aplicando una mayor cantidad de bacterias. De cualquier manera se observó un potente efecto terapéutico al día 60 post-tratamiento.

Los resultados observados en este trabajo nos permiten pensar que una posible alternativa de inmunoterapia en contra de la tuberculosis, puede ser el uso de los péptidos antimicrobianos, ya sea mediante su administración o bien mediante la inducción endógena de estas moléculas.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Al iniciar el experimento teníamos los antecedentes de que la L-Isoleucina era un fuerte inductor de β -defensinas en células epiteliales de pulmón, sin embargo, no sabíamos si esta inducción era capaz de disminuir la viabilidad de las micobacterias, por lo tanto, realizamos un primer experimento donde se estimularon células epiteliales con 25 $\mu\text{g/mL}$ de L-Isoleucina y se cultivo por 72 horas a multiplicidad de infección, para posteriormente determinar la viabilidad de la micobacterias. Con lo que se observó que disminuye considerablemente el número de micobacterias vivas en aquellas células estimuladas con L-isoleucina (Fig, 3), lo cual confirma la capacidad micobactericida de las β -defensinas [19] y demuestra por primera vez que la inducción de estos péptidos es suficiente para eliminar a esta bacteria, ya que, hasta el momento se ha encontrado que las defensinas son el unico mecanismo bactericida con el que cuentan las celulas del epitelio alveolar. Con estos resultados decidimos realizar experimentos *in vivo*, para demostrar si la L-Isoleucina induce la producción de mBD-3 y mBD-4 en ratones sanos, obteniéndose que existe un aumento en la expresión de β -defensinas al incrementarse la cantidad de L-Isoleucina libre (Fig. 4), lo cual puede explicarse por el hecho de que este aminoácido es un aminoácido esencial, el cual no puede sintetizarse en el cuerpo y es utilizado para la síntesis de proteínas. Al encontrarse este aminoácido libre en grandes cantidades, ésto puede ser una señal de que existe un microorganismo que está degradando proteínas, dejando en estado libre a este aminoácido. Desafortunadamente, hasta el momento no se ha podido reconocer la naturaleza del receptor encargado de iniciar esta respuesta, pero se ha podido observar que la exposición a este aminoácido produce la activación de NF- κ B, el cual se ve involucrado en la señalización para la respuesta inmune del hospedero [87].

Sabiendo que la L-isoleucina es un fuerte inductor de β -defensinas en ratones sanos y con el conocimiento de que existe una relación entre la disminución en la producción de defensinas y la progresión de la enfermedad [18], pensamos que el tratamiento con L-isoleucina en ratones con tuberculosis progresiva, restablecería la producción de estos péptidos antimicrobianos, lo cual ayudaría a controlar la infección, por lo tanto, se procedió a infectar ratones con *M. tuberculosis* cepa H37Rv y después de 1 mes y medio de infección, cuando la enfermedad se encuentra en etapa progresiva e inmunológicamente se tiene una respuesta tipo Th2, la cual se caracteriza por regular la actividad de macrófagos evitando su activación y por lo tanto, se ve disminuida la capacidad de eliminación del bacilo por el hospedero [97], además de que, la producción de defensinas es casi nula [18]. Transcurrido este tiempo administramos este aminoácido cada 48 horas durante 1 mes y medio, realizando los estudios correspondientes a los 15, 30 y 45 días después de iniciado el tratamiento. Con lo que se encontró una disminución de la carga bacilar en los pulmones de los ratones tratados con L-isoleucina.

Estos resultados se pueden correlacionar con el aumento en la expresión de β -defensinas (Fig.5). Esta sobreexpresión de defensinas puede ayudar al control de la micobacteria de 2 maneras; la primera por la actividad bactericida que tienen las defensinas ayudando directamente a la eliminación del bacilo y la segunda, es por las propiedades quimiotácticas y de activación que tienen estos péptidos sobre células del sistema inmune que colaborarán con la producción de citocinas tipo Th1, lo cual producirá un aumento en los niveles de IFN γ que, a su vez, provocará la activación de macrófagos los cuales podrán eliminar de una mejor manera al bacilo [50, 63, 64].

Los resultados obtenidos durante la primera parte del experimento, nos permitieron pensar que el tratamiento con L-isoleucina aunado a la quimioterapia convencional en contra de la tuberculosis, nos permitirían disminuir el tiempo de tratamiento. Para demostrar esto procedimos a infectar ratones, a los cuales después de 6 semanas de infección se les administro cada 24h el tratamiento convencional y cada 48h la L-isoleucina durante 60 días, sacrificando en los días 7, 14, 30 y 60 después de iniciado el tratamiento, obteniendo pulmones para su análisis. Se puede observar que el tratamiento combinado no tiene mejores resultados en la eliminación de la bacteria (Fig.6). Este mismo comportamiento se puede observar en la disminución del área neumónica, en el cual se puede observar que aquellos ratones tratados con la combinación de la L-Isoleucina y la quimioterapia convencional en contra de la tuberculosis, tiene un comportamiento muy similar en la disminución del área neumónica comparados con aquellos tratados solo con quimioterapia convencional. Mientras tanto puede observarse que aquellos ratones tratados con L-isoleucina mantienen un nivel constante de áreas neumónicas, esto puede ser debido a que la inducción de defensinas actuara como agente quimiotáctico, aumentando el infiltrado celular (Fig. 7).

Para determinar la participación de las β -defensinas en la eliminación de la bacteria se procedió a realizar qPCR para los ratones tratados. Pudiendo observar que para aquellos ratones que se les administro solo la L-isoleucina tenían el mayor incremento en la expresión de mBD-3 comparados con los otros tratamientos, esto podría explicarse por la rápida eliminación que tiene la quimioterapia convencional, por lo cual no es necesaria una sobre-expresión de defensinas ya que la enfermedad está controlada. Con lo que respecta a mBD-4, en todos los

tratamientos existe un incremento considerable con respecto a los ratones a los cuales no se les aplicó ningún tratamiento.

Debido a la gran expresión obtenida para mBD-3 con los ratones tratados con L-iso-leucina, quisimos estudiar el efecto inmunomodulador que puede tener la sobre-expresión de esta defensina, por lo que decidimos realizar el estudio de la expresión genética de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ y TNF α , las cuales tienen un papel muy importante en el control de la infección con *M.tuberculosis* y se encuentran disminuidas en la fase progresiva de esta enfermedad. Con este experimento observamos que la mayor expresión de IFN- γ se da a los 14 días al igual que mBD-3, lo cual podría sugerir que mBD-3, al ser quimiotáctica de células dendríticas inmaduras, atraerá a estas células al sitio de infección donde las células maduran produciendo IL-12, la cual tendrá un efecto activador sobre las células citotóxicas (CD 8⁺ y NK), que producirán IFN γ activando a los macrófagos, los cuales producirán TNF α , la cual es una citocina autóloga que además, activa otros monocitos y macrófagos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este experimento, ya que, el aumento en la expresión de TNF α se empieza a dar en el día 14 llegando a su máxima expresión en el día 30 después de iniciado el tratamiento.

Es posible que al usar cepas drogossensibles, los fármacos convencionales estén enmascarando el efecto que tiene la L-Isoleucina, pero los experimentos anteriores muestran que la L-Isoleucina, por sí sola, tiene efecto bactericida en contra micobacterias drogossensibles, por lo tanto, es posible pensar que si se realizaran estos mismos experimentos bajo diferentes condiciones, como por ejemplo, disminución de la dosis de la terapia convencional o bien disminuyendo los

tiempos de sacrificio post-tratamiento, podríamos encontrar el efecto adyuvante que esperábamos en un principio.

Con el conocimiento de que la L-isoleucina por si sola, es capaz de disminuir la carga micobacteriana en ratones infectados con cepas drogo-sensibles y sabiendo que la aparición de cepas multidrogoresistentes es un problema de salud pública que emerge rápidamente, pensamos que el uso de este aminoácido tendría efectos terapéuticos contra este tipo de cepas pudiendo observar que, el tratamiento de ratones infectados con esta micobacteria tenían, además de una menor carga bacteriana, una mayor sobrevida, que se asocia a una mayor expresión de péptidos antimicrobianos. Esta sobrevida se asocia con una disminución en el daño pulmonar y es muy importante recalcar que durante los primeros 30 días de tratamiento, aquellos ratones tratados con L-Isoleucina tienen una mayor inflamación pulmonar, sin embargo después de los 60 días de tratamiento la inflamación desaparece casi por completo. Este aumento en la inflamación pulmonar de los ratones tratados puede atribuirse a la inducción de defensinas y al efecto proinflamatorio que tienen éstas, ya que, el análisis de la expresión genética de estos péptidos demuestran que durante estos días, en los cuales se aumenta la inflamación y disminuye la viabilidad micobacteriana, existe una mayor expresión de dichos genes. Este aumento se podría correlacionar con el aumento de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , lo cual permitiría una mejor activación macrofágica y por lo tanto, una mayor eliminación micobacteriana, lo cual explica el menor número de micobacterias viables.

Durante la segunda etapa del experimento, decidimos estudiar el efecto terapéutico de los péptidos antimicrobianos al aplicarse de manera directa en ratones infectados con *M. tuberculosis*, para esto decidimos colaborar con el Dr.

Robert Hancock de la Universidad de British Columbia, el cual diseñó una técnica para la síntesis de péptidos antimicrobianos, la cual resultaba económicamente sustentable, además de obtenerse altos rendimientos del péptido [1]. Este grupo de investigadores, obtuvieron diferentes péptidos antimicrobianos sintéticos mediante la modificación de aminoácidos o bien fusionando diferentes tipos de péptidos, mostrando que los péptidos obtenidos tenían un fuerte efecto bactericida en contra de una variedad de bacterias gram positivas, gram negativas y algunos hongos [95, 96]. Sin embargo, en este trabajo se demuestra por primera vez que los péptidos denominados E2, E6 y CP26 tienen un potente efecto en contra de *M. tuberculosis* cepa H37Rv, tanto *in vitro* como *in vivo*. Lo cual se lo podemos atribuir a su potente efecto bactericida, ya que, algunos derivados de estos péptidos en estudios resientes, no han mostrado un potente efecto inmunoregulador, sin embargo han mostrado un gran capacidad de interactuar con algunos lípidos componentes de la pared celular, así como una gran capacidad para formar poros en ellas [98].

Estos experimentos nos permiten pensar que este tipo de tratamientos con péptidos antimicrobianos sintéticos pudieran ser un adyuvante a la quimioterapia convencional o bien como una nueva alternativa en el tratamiento de cepas drogo-resistentes. Sin embargo es necesario realizar una nueva serie de experimentos para poder confirmarlo, como por ejemplo, probar la capacidad terapéutica de estos péptidos en ratones infectados con cepas multidrogo-resistentes o bien buscar aplicarlos en ratones infectados con cepas drogo-sensibles que estén recibiendo el tratamiento convencional, buscando algún efecto adyuvante, con el fin de reducir el tiempo de tratamiento.

Otro punto importante a discutir de este trabajo, son las ventajas que podrían tener los tratamientos experimentales que presentamos con respecto al tratamiento

convencional actualmente utilizado. Una de las ventajas que podemos mencionar son los efectos adversos, los cuales, la L-isoleucina al ser un aminoácido esencial el riesgo de que pueda causar algún efecto adverso es mínimo, el efecto que este aminoácido puede causar es la elevada producción de β -defensinas, las cuales pueden tener efectos citotóxicos en altas concentraciones, de cualquier manera como pudimos demostrar, la inducción de este péptido mediante este aminoácido es limitada, ya que, como podemos observar en la figura 8, la expresión de defensinas tiene un máximo a los 250 μ g/100 μ L y posteriormente esta expresión disminuye, con lo cual podemos pensar que mediante este método no se obtendría una concentración de defensinas tóxica. Otro tratamiento alternativo sugerido en este trabajo es el uso de péptidos antimicrobianos sintéticos, los cuales mostraron un potente efecto bactericida y muy poca citotoxicidad a la dosis utilizada. Por el contrario, se ha reportado que los fármacos de primera línea en contra de la tuberculosis (isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomycin), tienen efectos adversos como, hepatotoxicidad, reacciones cutáneas, intolerancia gastrointestinal, falla renal y en algunos casos daños hematológicos como lo es la anemia hemolítica [99, 100]. Además si hablamos del tratamiento en contra de cepas multidrogo-resistentes, el cual es más largo (18 a 24 meses), encontramos una mayor hepatotoxicidad en comparación con la primera línea de fármacos.

Otra diferencia entre los tratamientos experimentales y los tratamientos utilizados en la actualidad, es el costo. De acuerdo con datos obtenidos de la secretaria de salud, el tratamiento de la tuberculosis de primera línea tiene una duración de 8 meses y un costo aproximado de 4 mil pesos, con una efectividad del 70%, mientras que el tratamiento para cepas multidrogo-resistentes es de aproximadamente 2 años con un costo de 360 mil pesos y una efectividad del 50%.

Es importante mencionar que con los datos obtenidos en este experimento no poder hacer una análisis de costo-efectividad tan completos, sin embargo si podemos comparar el costo de los 2 meses de tratamiento aplicados, en el cual el tratamiento con L-isoleucina tiene un costo de alrededor de 2 pesos por mes, mientras que el tratamiento convencional tuvo un costo de 24 pesos por mes, lo cual es alrededor de 12 veces mas costoso que nuestro tratamiento experimental.

CONCLUSIÓN.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la administración intrapulmonar de L-Isoleucina induce la producción de β -defensinas *in vivo*, y esto correlaciona con la mejora en la inmunidad protectora y la mayor resistencia a la infección micobacteriana, cuando es administrada durante la etapa tardía de la enfermedad progresiva inducida por cepas drogosensibles o multidrogoresistente. Aunque este tratamiento no es completamente curativo, estos resultados sugieren que la continua administración de L-isoleucina por vía respiratoria podría ser una posible terapia que puede ayudar a controlar esta importante enfermedad infecciosa.

También nuestros resultados demuestran que los péptidos sintéticos E2, E6 y CP26 tienen un potente efecto micobactericida *in vitro* y por su potente efecto terapéutico *in vivo*, podemos sugerir que estos péptidos podrían ser una alternativa de tratamiento en cepas drogo-resistentes o colaborar disminuyendo la terapia convencional en contra de cepas drogo-sensibles.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Bommarius, B., et al., *Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in Escherichia coli*. Peptides, 2010. **31**(11): p. 1957-65.
2. Selsted, M.E. and A.J. Ouellette, *Mammalian defensins in the antimicrobial immune response*. Nat Immunol, 2005. **6**(6): p. 551-7.
3. Shai, Y., *Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1462**(1-2): p. 55-70.
4. Karakousis, P.C., W.R. Bishai, and S.E. Dorman, *Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response*. Cellular microbiology, 2004. **6**(2): p. 105-16.
5. Aziz, M.A. and A. Wright, *The World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Surveillance for Anti-Tuberculosis Drug Resistance: a model for other infectious diseases*. Clin Infect Dis, 2005. **41 Suppl 4**: p. S258-62.
6. Rook, G.A., D.B. Lowrie, and R. Hernandez-Pando, *Immunotherapeutics for tuberculosis in experimental animals: is there a common pathway activated by effective protocols?* J Infect Dis, 2007. **196**(2): p. 191-8.
7. Caminero, J.A., *Management of multidrug-resistant tuberculosis and patients in retreatment*. Eur Respir J, 2005. **25**(5): p. 928-36.
8. Grode, L., et al., *Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin*. J Clin Invest, 2005. **115**(9): p. 2472-9.
9. Lowrie, D.B., et al., *Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination*. Nature, 1999. **400**(6741): p. 269-71.
10. Skinner, M.A., et al., *Immunization with heat-killed Mycobacterium vaccae stimulates CD8+ cytotoxic T cells specific for macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1997. **65**(11): p. 4525-30.
11. Hernandez-Pando, R., et al., *A combination of a transforming growth factor-beta antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis*. Clin Exp Immunol, 2006. **144**(2): p. 264-72.
12. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 389-95.
13. Zanetti, M., *Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(1): p. 39-48.
14. Yang, D., et al., *Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6*. Science, 1999. **286**(5439): p. 525-8.
15. Tjabringa, G.S., K.F. Rabe, and P.S. Hiemstra, *The human cathelicidin LL-37: a multifunctional peptide involved in infection and inflammation in the lung*. Pulm Pharmacol Ther, 2005. **18**(5): p. 321-7.
16. Rivas-Santiago, B., et al., *The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis*. Scand J Immunol, 2008. **67**(5): p. 448-52.
17. Rivas-Santiago, B., et al., *Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells*. Infect Immun, 2008. **76**(3): p. 935-41.
18. Rivas-Santiago, B., et al., *beta -Defensin Gene Expression during the Course of Experimental Tuberculosis Infection*. J Infect Dis, 2006. **194**(5): p. 697-701.

19. Kisich, K.O., et al., *Antimycobacterial agent based on mRNA encoding human beta-defensin 2 enables primary macrophages to restrict growth of Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2001. **69**(4): p. 2692-9.
20. Wayne, L.G., *Microbiology of tubercle bacilli*. *Am Rev Respir Dis*, 1982. **125**(3 Pt 2): p. 31-41.
21. van Soolingen, D., et al., *A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa*. *Int J Syst Bacteriol*, 1997. **47**(4): p. 1236-45.
22. Sola, C., et al., *Is Mycobacterium africanum subtype II (Uganda I and Uganda II) a genetically well-defined subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex? J Clin Microbiol*, 2003. **41**(3): p. 1345-6; author reply 1346-8.
23. Niemann, S., E. Richter, and S. Rusch-Gerdes, *Differentiation among members of the Mycobacterium tuberculosis complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of M. bovis*. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(1): p. 152-7.
24. Peloquin, C.A. and S.E. Berning, *Infection caused by Mycobacterium tuberculosis*. *Ann Pharmacother*, 1994. **28**(1): p. 72-84.
25. Gravatt, B., *Current concepts in the pharmacologic treatment and management of tuberculosis*. *J Sch Nurs*, 1997. **13**(4): p. 28-38.
26. Tager, I.B., *Current concepts in the treatment of tuberculosis*. *West J Med*, 1987. **146**(4): p. 461-5.
27. Riley, L.W., *Of mice, men, and elephants: Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and pathogenesis*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1475-8.
28. Smith, I., *Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence*. *Clin Microbiol Rev*, 2003. **16**(3): p. 463-96.
29. Raviglione, M.C., D.E. Snider, Jr., and A. Kochi, *Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic*. *Jama*, 1995. **273**(3): p. 220-6.
30. Daffe, M. and G. Etienne, *The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity*. *Tuber Lung Dis*, 1999. **79**(3): p. 153-69.
31. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(5): p. 338-44.
32. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. *Immunol Rev*, 2000. **173**: p. 89-97.
33. Moreno Ramiez, E., et al., *[Study of immunoglobulins, proinflammatory cytokines, lymphoproliferation and phagocytosis in peripheral blood of healthy young people exposed to different levels of atmospheric pollution]*. *Rev Alerg Mex*, 2006. **53**(1): p. 3-8.
34. Rivas-Santiago, B., P. Vieyra-Reyes, and Z. Araujo, *[Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review]*. *Invest Clin*, 2005. **46**(4): p. 391-412.
35. Lin, Y., M. Zhang, and P.F. Barnes, *Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1998. **66**(3): p. 1121-6.
36. Roy, S., et al., *Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an in vitro correlate of innate immune response to Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*, 2004. **112**(3): p. 471-80.
37. Sharma, M., et al., *Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-gamma in response to Mycobacterium tuberculosis infection*. *Immunol Cell Biol*, 2007. **85**(3): p. 229-37.

38. Taylor, P.R., et al., *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 901-44.
39. Russell, D.G., *Who puts the tubercle in tuberculosis?* Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 39-47.
40. Flynn, J.L., *Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development*. Tuberculosis (Edinb), 2004. **84**(1-2): p. 93-101.
41. Noss, E.H., C.V. Harding, and W.H. Boom, *Mycobacterium tuberculosis inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages*. Cell Immunol, 2000. **201**(1): p. 63-74.
42. Singh, C.R., et al., *Processing and presentation of a mycobacterial antigen 85B epitope by murine macrophages is dependent on the phagosomal acquisition of vacuolar proton ATPase and in situ activation of cathepsin D*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3250-9.
43. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
44. Wozniak, K.L., J.M. Vyas, and S.M. Levitz, *In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis*. Infect Immun, 2006. **74**(7): p. 3817-24.
45. Geijtenbeek, T.B., et al., *Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 7-17.
46. Stenger, S., K.R. Niazi, and R.L. Modlin, *Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3582-8.
47. Cox, G., J. Crossley, and Z. Xing, *Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**(2): p. 232-7.
48. Pedrosa, J., et al., *Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic Mycobacterium tuberculosis infection of mice*. Infect Immun, 2000. **68**(2): p. 577-83.
49. Tan, B.H., et al., *Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1864-71.
50. Oppenheim, J.J., et al., *Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity*. Ann Rheum Dis, 2003. **62 Suppl 2**: p. ii17-21.
51. Kaiser, V. and G. Diamond, *Expression of mammalian defensin genes*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(6): p. 779-84.
52. Boman, H.G., *Peptide antibiotics and their role in innate immunity*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 61-92.
53. Valore, E.V., et al., *Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues*. J Clin Invest, 1998. **101**(8): p. 1633-42.
54. Rivas-Santiago, B., et al., *[Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases]*. Salud Publica Mex, 2006. **48**(1): p. 62-71.
55. Selsted, M.E., et al., *Primary structures of three human neutrophil defensins*. J Clin Invest, 1985. **76**(4): p. 1436-9.
56. Sharma, S., I. Verma, and G.K. Khuller, *Therapeutic potential of human neutrophil peptide 1 against experimental tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(2): p. 639-40.
57. Zhu, B.D., et al., *Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) enhances human beta-defensin-1 gene transcription in human pulmonary gland epithelial cells*. Acta Pharmacol Sin, 2003. **24**(9): p. 907-12.
58. Sherman, H., N. Chapnik, and O. Froy, *Albumin and amino acids upregulate the expression of human beta-defensin 1*. Mol Immunol, 2006. **43**(10): p. 1617-23.

59. Singh, P.K., et al., *Production of beta-defensins by human airway epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14961-6.
60. Hiratsuka, T., et al., *Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **249**(3): p. 943-7.
61. Harder, J., et al., *Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5707-13.
62. Yang, D., et al., *Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(1): p. 9-14.
63. Funderburg, N., et al., *Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(47): p. 18631-5.
64. Biragyn, A., et al., *Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1025-9.
65. Zheng, Y., et al., *Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils*. Br J Dermatol, 2007. **157**(6): p. 1124-31.
66. De, Y., et al., *LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1069-74.
67. Niyonsaba, F., et al., *A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis*. Immunology, 2002. **106**(1): p. 20-6.
68. Tjabringa, G.S., et al., *Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors*. Int Arch Allergy Immunol, 2006. **140**(2): p. 103-12.
69. Wimley, W.C., M.E. Selsted, and S.H. White, *Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores*. Protein Sci, 1994. **3**(9): p. 1362-73.
70. Guina, T., et al., *A PhoP-regulated outer membrane protease of Salmonella enterica serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides*. J Bacteriol, 2000. **182**(14): p. 4077-86.
71. Guo, L., et al., *Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides*. Cell, 1998. **95**(2): p. 189-98.
72. Rooijackers, S.H., K.P. van Kessel, and J.A. van Strijp, *Staphylococcal innate immune evasion*. Trends Microbiol, 2005. **13**(12): p. 596-601.
73. Peschel, A., et al., *Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1067-76.
74. Peschel, A., et al., *Inactivation of the dlt operon in Staphylococcus aureus confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8405-10.
75. Jia, H.P., et al., *Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach*. Gene, 2001. **263**(1-2): p. 211-8.
76. Froy, O., *Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways*. Cell Microbiol, 2005. **7**(10): p. 1387-97.
77. Lehrer, R.I. and T. Ganz, *Defensins of vertebrate animals*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 96-102.

78. Harder, J., R. Glaser, and J.M. Schroder, *The role and potential therapeutical applications of antimicrobial proteins in infectious and inflammatory diseases*. Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets, 2007. **7**(2): p. 75-82.
79. Zanetti, M., *The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals*. Curr Issues Mol Biol, 2005. **7**(2): p. 179-96.
80. Ogata, K., et al., *Activity of defensins from human neutrophilic granulocytes against Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. Infect Immun, 1992. **60**(11): p. 4720-5.
81. Miyakawa, Y., et al., *In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1996. **64**(3): p. 926-32.
82. Sharma, S., I. Verma, and G.K. Khuller, *Antibacterial activity of human neutrophil peptide-1 against Mycobacterium tuberculosis H37Rv: in vitro and ex vivo study*. Eur Respir J, 2000. **16**(1): p. 112-7.
83. Rivas-Santiago, B., et al., *Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4505-11.
84. Liu, P.T., et al., *Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin*. J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2060-3.
85. Islam, D., et al., *Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 180-5.
86. Raqib, R., et al., *Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9178-83.
87. Fehlbaum, P., et al., *An essential amino acid induces epithelial beta -defensin expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12723-8.
88. Gussmann, J., et al., *Long-term effects of natural amino acids on infection with Chlamydia trachomatis*. Microb Pathog, 2008. **44**(5): p. 438-47.
89. Ikehara, O., et al., *Acute and chronic treatment of L-isoleucine ameliorates glucose metabolism in glucose-intolerant and diabetic mice*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(3): p. 469-72.
90. Murata, K. and M. Moriyama, *Isoleucine, an essential amino acid, prevents liver metastases of colon cancer by antiangiogenesis*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3263-8.
91. Kindrachuk, J., et al., *Stability, toxicity, and biological activity of host defense peptide BMAP28 and its inversed and retro-inversed isomers*. Biopolymers, 2011. **96**(1): p. 14-24.
92. Jiang, Z., et al., *Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides to target Gram-negative pathogens, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa: utilization of charge, 'specificity determinants,' total hydrophobicity, hydrophobe type and location as design parameters to improve the therapeutic ratio*. Chemical biology & drug design, 2011. **77**(4): p. 225-40.
93. Knappe, D., et al., *Oncocin (VDKPPYLPRPRPPRIYNR-NH₂): a novel antibacterial peptide optimized against gram-negative human pathogens*. Journal of medicinal chemistry, 2010. **53**(14): p. 5240-7.
94. Knappe, D., N. Kabankov, and R. Hoffmann, *Bactericidal oncocin derivatives with superior serum stabilities*. International journal of antimicrobial agents, 2011. **37**(2): p. 166-70.

95. Hilpert, K., et al., *High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity*. Nature biotechnology, 2005. **23**(8): p. 1008-12.
96. Friedrich, C., et al., *Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1999. **43**(7): p. 1542-8.
97. Rook, G.A. and R. Hernandez-Pando, *The pathogenesis of tuberculosis*. Annu Rev Microbiol, 1996. **50**: p. 259-84.
98. Wieczorek, M., et al., *Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity*. Chemistry & biology, 2010. **17**(9): p. 970-80.
99. Chung-Delgado, K., et al., *Factors associated with anti-tuberculosis medication adverse effects: a case-control study in Lima, Peru*. PloS one, 2011. **6**(11): p. e27610.
100. Forget, E.J. and D. Menzies, *Adverse reactions to first-line antituberculosis drugs*. Expert opinion on drug safety, 2006. **5**(2): p. 231-49.