

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFEECTO DEL BLOQUEO DE TGF- β Y UN INHIBIDOR DE LA
COX-2 EN UN MODELO MURINO DE
TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA**

**Tesis que para obtener el título de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

CRISTIAN ARCE HERNÁNDEZ

TUTOR

DR. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN

ASESORA

DRA. RAQUEL RETANA UGALDE

2015

México, D. F.



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.

“La humanidad necesita hombres prácticos, que obtengan el mayor provecho de su trabajo, y, sin olvidar el bienestar general, salvaguardando sus propios intereses.

Pero la humanidad también necesita soñadores para quienes el desarrollo desinteresado de una tarea sea tan cautivante que les resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio.”

Marie Curie

Agradecimientos

“Porque tú, oh Señor Jehová, eres mi esperanza.
Seguridad mía desde mi juventud.” Salmo 71:5

A Dios por ser la parte fundamental de este logro en mi vida ya que sin su infinita misericordia yo no hubiera podido pensar jamás en ser un profesional, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad, por cada bendición que me ha dado y que inmerecidamente he recibido, por ser llamado su hijo que es el mayor privilegio que puedo tener, mucho más valioso que cualquier título de la tierra.

A mis padres Oscar Arce y Maricela Hernández por apoyarme en cada paso de mi vida, por su confianza y creer en mí, por los sacrificios que hicieron a lo largo de mi carrera para que yo pudiera salir adelante.

A mi hermano Edgar Arce por su apoyo, comprensión y ser un ejemplo a seguir.

A Víctor Pérez y Alejandra Melo por estar siempre presentes a lo largo de toda mi trayectoria académica, personal y formar parte de nuestra familia.

A la familia Aguilera, en especial a Idalia Aguilera por abrirnos las puertas de su corazón y de su casa para que a través de los años este sueño fuera hecho realidad.

A mis hermanos Víctor, Fernanda, Isaac y Rodrigo Pérez por llenar mi vida de grandes momentos.

A Mónica Hernández por los momentos buenos y malos que vivimos, por todas aquellas veces que me explicaste, por el apoyo otorgado en gran parte de la carrera el cual estaré siempre agradecido.

A Verónica González por ser una de las amistades más lindas que me dejó esta experiencia, por su paciencia, por los consejos y el apoyo recibido en los momentos difíciles de mi vida, por ser una excelente amiga. Te quiero amiga.

A mi Winnie por haberme acompañado quince años de mi vida, por estar presente en tantas noches de desvelo y por recibirme siempre con alegría. Te extrañare.

A mis profesores (as) I.Q. Lucía Magaña por su paciencia en mi terquedad y porque sin su apoyo no hubiera podido estudiar en esta universidad, al I.Q. Fco. Javier Mandujano por sus consejos, enseñanzas y proporcionarme su ayuda en momentos difíciles, a la Q.F.B. Enriqueta Castrejón e I.Q. Magín Juárez por su paciencia y ayudarme a adaptarme al sistema escolarizado.

A mis amigos (as) Jazmín Camacho, Scarlet García, Karen González, Sandra Castillo, Esperanza Olivares e Itzel Gamez (las chicas), Amairani Hernández (Fanylú), a Aldo Hernández, Carlos Beltrán, Diego Martínez (Cachorro), José Luis Galván, Jorge Cruz, Gabriel Cabrera y Abihú Martínez por haberme acompañado en esta trayectoria escolar, proporcionarme su amistad y hacer divertida esta experiencia.

A la UNAM y a la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** por la excelente formación académica.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por la confianza otorgada y permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A mi director de tesis Dr. Jorge Barrios por haberme compartido sus conocimientos, por todo el apoyo y tiempo recibido para la realización de esta tesis.

A la Dra. Dulce Mata, Dra. Brenda Marquina por el apoyo y facilidades otorgadas para desarrollar mi tesis profesional.

Al Dr. Fernando López Casillas del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por el suministro del Betaglicano Soluble Recombinante ya que sin su apoyo este trabajo no se pudo haber realizado.

A la Dra. Raquel Retana, Dra. Ma. Teresa Corona, al Dr. Rubén Marroquín y a la Mtra. Yolanda Flores por su dedicación y colaboración para presentar de la mejor manera este trabajo.

A todos mis compañeros (as) del laboratorio de Patología Experimental del INCMNSZ.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| I. ABREVIATURAS..... | 1 |
| II. RESUMEN..... | 3 |
| III. INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| IV. MARCO TEÓRICO..... | 6 |
| 1. TUBERCULOSIS..... | 6 |
| 1.1 GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS..... | 6 |
| 1.2 CLASIFICACIÓN..... | 7 |
| 1.3 CARACTERÍSTICAS MICOBACTERIANAS | 7 |
| 1.4 CONSTITUYENTES DE LA MICOBACTERIA..... | 8 |
| 1.4.1 CÁPSULA..... | 8 |
| 1.4.2 PARED CELULAR..... | 8 |
| 1.4.3 MEMBRANA CELULAR..... | 9 |
| 1.5 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES PARA SU CRECIMIENTO, CULTIVO Y AISLAMIENTO..... | 10 |
| 1.6 PROCESO DE INFECCIÓN..... | 11 |
| 1.7 TUBERCULOSIS MDR Y TRATAMIENTO | 11 |
| 1.8 DIAGNÓSTICO..... | 13 |
| 2. FUNCIONES, ISOFORMAS, RECEPTORES TGF- β 2..... | 13 |
| 2.1 RUTA DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF- β | 14 |
| 2.2 BETAGLICANO RECOMBINANTE..... | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3 ACCIÓN DEL ÁCIDO NIFLUMICO COMO INHIBIDOR DE PROSTAGLANDINA EN TUBERCULOSIS..... | 17 |
| V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 18 |
| VI. HIPÓTESIS..... | 19 |
| VII. OBJETIVOS..... | 20 |
| A) OBJETIVO GENERAL..... | 20 |
| B) OBJETIVOS PARTICULARES..... | 20 |
| VIII. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 21 |
| 1. MODELO EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN RATONES BALB/C..... | 21 |
| 1.1 DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 23 |
| 1.2 PREPARACIÓN DE CEPA MULTIDROGORESISTENTE (MDR)..... | 25 |
| 1.3 COSECHA DE MICOBACTERIAS..... | 25 |
| 1.4 DETERMINACIÓN DE CARGA BACTERIANA Y PREPARACIÓN DEL INOCULO PARA INFECCIÓN DE ANIMAL..... | 26 |
| 1.5 DETERMINACIÓN DE UFC'S EN PULMONES INFECTADOS..... | 27 |
| 1.6 PREPARACIÓN DEL TEJIDO PARA EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO..... | 28 |
| IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 28 |
| X. RESULTADOS..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| XI. ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 34 |
| XII. CONCLUSIONES..... | 39 |
| XIII. PERSPECTIVAS..... | 41 |
| XIV. REFERENCIAS..... | 42 |
| ANEXOS..... | 52 |

I. ABREVIATURAS

ADC, Albúmina, Dextrosa, Catalasa

ADN, Ácido Desoxirribunucleico

ALK, Activin Receptor Like Kinases

AN, Ácido Niflúmico

BAAR, Bacilo Ácido Alcohol Resistente

BGSR, Betaglicano Soluble Recombinante

Baculoviral

BMP's, Bone Morphogenetic Proteins

CAV-1, Caveolina 1

CD4, Marcador de Linfocitos T CD4+

CO₂, Dióxido de Carbono

COX-2, Ciclooxygenasa isoforma 2

DST, Drug Susceptibility Testing

FT, Factores de Transcripción

GC, Guanina-Citosina

GDF's, Growth Differentation Factors

H₂O, Agua

H&E, Hematoxilina y Eosina

i.g, Vía de Administración Intragrástrica

IFN- γ , Interferón Gamma

IL, Interleucinas

iNOS, Nitric Oxide Synthase

i.p, Vía de Administración Intraperitoneal

i.t, Vía de Administración Intratraqueal

LAM, Lipoarabinomanano

LAP, Proteína Asociada a Latencia

LLC, Large Latent Complex

L-TBP, Péptido Asociado a TGF- β
Latente

LM, Lipomanano

MAPKs, Mitogen Activated Protein
Kinases

MDR, Multifármaco Resistente

μ g, Microgramos

MHCII, Complejo Mayor de
Histocompatibilidad Clase II

μL, Microlitros

Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*

nm, Nanometros

PG, Péptido Glicano

PGE -2, Prostaglandina Clase 2

PBS, Solución Buffer de Fosfatos

PI3K, Fosfoinositol 3 Quinasas

PPD, Derivado de Proteína Purificada

R-Smads, Receptor-regulated SMADs

SARA, Smad Anchor for Receptor
Activation

SBE, Smad Binding Elements

Smads, Drosophila Protein Mothers
Against decapentaplegic

SSI, Solución Salina Isotónica

TB, Tuberculosis

TGF-β, Factor de Crecimiento
Transformante Beta

TGF-βRI, Factor de Crecimiento
Transformante Beta Receptor 1

TGF-βRII, Factor de Crecimiento
Transformante Beta Receptor 2

TGF-βRIII, Factor de Crecimiento
Transformante Beta Receptor 3

Th1, Linfocitos cooperadores tipo 1

Th2, Linfocitos cooperadores tipo 2

TNF-α, Factor de Necrosis Transformante
alfa

UFC'S, Unidades Formadoras de Colonias

VIH, Virus de Inmunodeficiencia Humana

II. RESUMEN

La tuberculosis pulmonar (TB) es una infección bacteriana de salud pública a nivel mundial. Actualmente el manejo inadecuado de los antibióticos y el incumplimiento de los tratamientos han provocado resistencia bacteriana a fármacos de primera línea, ante esta problemática nosotros estudiamos el efecto protector del betaglicano soluble recombinante y un inhibidor de la COX-2 en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar, para ello se utilizaron 46 ratones machos BALB/c de 8 semanas y se administró a cada ratón por vía intratraqueal 90,000 bacterias MDR, cuarenta días post-infección los ratones fueron tratados con AN, SSI, BGSR, después de uno y dos meses de tratamiento, 6 ratones de cada grupo fueron anestesiados con éter etílico anhidro y sacrificados por exanguinación, el pulmón derecho de cada ratón fue perfundido con alcohol absoluto (MACRON USA) para el análisis histopatológico y morfométrico el pulmón izquierdo fue congelado en nitrógeno y almacenado a -70 °C para la determinación de carga bacilar. Se determinó la sobrevivencia de los ratones, el porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía y el área de granulomas en los diferentes grupos mediante un analizador de imágenes automatizado (Leica Q500/W Version 4.3 Milton Keynes, UK). Los resultados sugieren que al adicionar BGSR se podría inhibir la activación alternativa del macrófago, el cual se asociaría a una disminución del crecimiento intracelular de Mtb invirtiendo el patrón de respuesta de Th2 a Th1, lo anterior apoya el concepto que el utilizar terapias clínicas basadas en la modulación de esta citocina mediante BGSR representaría una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de micobacterias resistentes a antibióticos.

III. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis humana (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa que se origina por la inhalación de aerosoles que portan al patógeno *M. tuberculosis* provenientes de una persona infectada, afectando principalmente a los pulmones, pero puede afectar otros sitios también (TB extra pulmonar). Causa anualmente alrededor de tres millones de muertes e infecta de manera latente a dos billones de personas, por lo que sigue siendo un importante problema sanitario a escala mundial, ya que es una de las enfermedades infecciosas curables que registra más muertes en el mundo; se considera que actualmente la tercera parte de la población mundial está infectada¹. La tasa de incidencia varía entre los países, la mayor parte de los nuevos casos se produjeron en Asia (58%), la Región de África (27%), la Región del Mediterráneo Oriental (8%), la Región de Europa (4%) y el Región de las Américas (3%)². Los cinco países con el mayor número de casos incidentes fueron la India (2,0 millones-2,4 millones), China (0.900.000 a 1.100.000), Sudáfrica (0,4 millones-0,6 millones), Indonesia (0,4 millones hasta 0,5 millones) y Pakistán (0,3 millones a 0,5 millones)³.

Recientemente, cepas resistentes y multifármacoresistentes (MDR) del bacilo de TB han llegado a ser preocupantes en nuestro país como en el mundo^{2,4,5}, por eso es de suma importancia el estudio y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, que permitan disminuir el tiempo de los tratamientos para cepas MDR, permitiendo así un mejor control de la infección^{6,7}. Se ha descrito que las proteínas PGE's y el TGF- β son moduladoras de la respuesta inmunológica en el proceso inflamatorio⁸ y fibrotico⁹ de la TB pulmonar, por lo que en este estudio nos propusimos evaluar la actividad y el efecto protector en la

administración del betaglicano soluble recombinante (BGSR) y un inhibidor de COX-2 (Ácido Niflúmico) durante el desarrollo de la TB progresiva con una cepa MDR.

IV. MARCO TEÓRICO

1. TUBERCULOSIS

La TB es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad que aún afecta a diversas poblaciones^{10,11}, fue descubierta el 24 de marzo del año de 1882 por Robert Koch en la Sociedad de Fisiología de Berlín por lo que en honor a su descubridor también es conocido con el nombre de bacilo de Koch¹², es una enfermedad multifactorial, en la que participan factores del huésped (constitución genética, respuesta inmunológica), de la bacteria (genes y factores de virulencia) y del medio ambiente (pobreza, desnutrición, etc.), ha sido estudiada mediante el empleo de cultivo de células, principalmente macrófagos y recientemente células dendríticas^{13,14} y neumocitos^{15,16}, así también como en modelos animales. Aunque el cultivo de células es más fácil de trabajar y ofrece resultados más rápidos, solamente se limita a describir las etapas tempranas de la enfermedad, mientras que los modelos animales permiten el estudio de todos los estadios. Los ratones son los animales más utilizados gracias a la existencia de líneas puras y algunas que poseen mutaciones en el sistema inmunológico¹⁷.

1.1 GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS

En el complejo *Mycobacterium tuberculosis* se engloban las especies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis-Calmette y Guérin*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii* y *Mycobacterium canettii*. Estas especies son las causantes de la TB en humanos y animales¹⁸.

1.2 CLASIFICACIÓN

El género *Mycobacterium* fue propuesto por Lehmann y Neumann en 1896 para agrupar *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*¹⁹. Posteriormente, el género *Mycobacterium* se clasificó dentro de la familia Mycobacteriaceae, orden Actinomycetales, clase Actinomycetes²⁰. Esta división inicial estaba basada en dos características presentes en todos y cada uno de los miembros del género: la morfología (bacilos, inmóviles) y la ácido-alcohol resistencia¹⁹. En la actualidad, los requisitos mínimos necesarios para la inclusión de una especie dentro del género *Mycobacterium* son la ácido-alcohol resistencia, la presencia de ácidos micólicos con 60-90 átomos de carbono de longitud y un 61-71% de GC en su genoma²¹.

1.3 CARACTERÍSTICAS MICOBACTERIANAS

El género *Mycobacterium* está conformado por bacilos curvos delgados de 0.85 μ de longitud y de 0.2-0.6 μ de grosor, intracelulares, inmóviles y aerobios estrictos, aunque algunos crecen en baja concentración de oxígeno (*M. bovis*)^{22,23}.

La ácido alcohol resistencia (BAAR) que presentan es la propiedad que poseen algunas micobacterias de incorporar ciertos colorantes y retenerlos resistiendo la decoloración al someterlas a la acción de ácidos fuertes y alcohol, y está determinada por la presencia de ácidos micólicos que son ácidos grasos de cadenas ramificadas de alto peso molecular (de 60 a 70 átomos de carbono) y se observan de color rojo al ser teñidos con los colorantes de Ziehl-Neelsen, mientras que otras bacterias y células toman distintos tonos de azul debido al azul de metileno que se utiliza como colorante de contraste²⁴⁻²⁶.

1.4 CONSTITUYENTES DE LA MICOBACTERIA

La envoltura de Mtb es una estructura compleja, constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática²⁷.

1.4.1 CÁPSULA

La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias tiene un grosor de 70 a 100 nm²⁸, y tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmune²⁹, sus características y composición varían en las diferentes especies y cepas de micobacterias, entre los principales componentes se encuentran el ácido micólico, glicolípidos, y dimicolato de trehalosa. Los glicolípidos junto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria^{30, 31}, el dimicolato de trehalosa es el lípido más estudiado de la cápsula, ya que contiene ácidos micólicos del mismo tipo que los que se encuentran localizados en la pared celular³².

1.4.2 PARED CELULAR

La pared micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula separada por un espacio periplásmico, posee un elevado contenido en lípidos (50-60%) que le proporcionan un carácter hidrofóbico y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática³³, le confiere ventajas frente a condiciones de estrés, choque osmótico, desecación y baja permeabilidad celular³⁴. Está conformada por una matriz insoluble compuesta de 3 macromoléculas unidas de forma covalente: el péptidoglicano, el arabinogalactano y los ácidos micólicos³⁵,³⁶, el complejo ácido micólico-arabinolactano-péptidoglucano es una barrera frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales³⁰. Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de gran importancia taxonómica para micobacterias y bacterias de

géneros relacionados como *Nocardia* y *Corinebacterium*; en el caso de las micobacterias, los ácidos micólicos tienen de 70-80 carbonos y se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura³¹.

1.4.3 MEMBRANA CELULAR

Tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, y tiene como principal función la protección osmótica y el transporte de iones y moléculas³⁷. Está constituida por una bicapa lipídica a la que se asocian proteínas y algunos lipopolisacáridos como lipoarabinomano (LAM) y lipomanano (LM) que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la TB como la inactivación de macrófagos a través de la disminución de IFN- γ ^{38,39}(Fig.1).

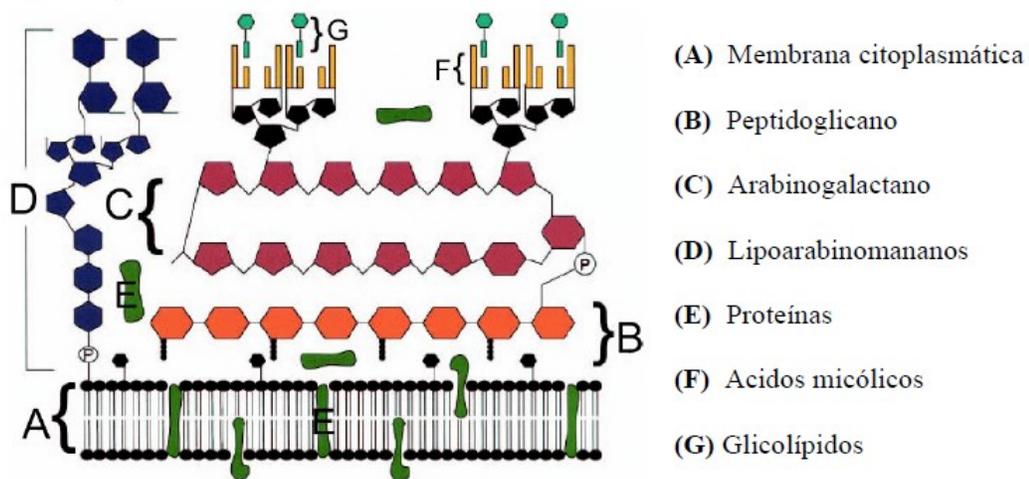


Fig 1. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. La bacteria está dentro de una membrana citoplasmática debajo del péptidoglicano (PG), existen proteínas que se encuentran en asociación con PG y entre la membrana, los PG y algunas de ellas pueden ser inmunogénicas⁴⁰.

1.5 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES PARA SU CRECIMIENTO, CULTIVO Y AISLAMIENTO

Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos y quimioorganotrofos, catalasa positivos, oxidan la glucosa y el glicerol a CO₂ y H₂O^{41, 42}, utilizan el glicerol como fuente de carbono y energía, a excepción de *M. bovis* que es glicerofóbico y utiliza piruvato. Como fuente de nitrógeno pueden utilizar asparagina, glutamato y amonio. Las micobacterias son prototrofas para todos los aminoácidos, purinas y pirimidinas y vitaminas del complejo B⁴³. Crecen en medios de cultivo especiales con base de huevo, como Lowenstein Jensen, Ogawa kudoh o medios con base agar como Middlebrook 7H10 o 7H11. A los medios de cultivo se les suelen agregar suplementos tales como: ácido oleico, albumina dextrosa o micobactina. También crecen en medios líquidos como Dubos Tween Albumina, Middlebrook 7H9, etc.^{44,45}.

Las micobacterias pueden ser asignadas a 2 grupos taxonómicos, basados en la velocidad de crecimiento de diferentes especies:

a) Micobacterias de crecimiento lento: Agrupa a las especies que tardan más de 7 días en dar colonias visibles en medios de cultivo sólidos. Las micobacterias patógenas pertenecen en general a este grupo.

b) Micobacterias de crecimiento rápido: Agrupa a las especies que tardan menos de 7 días en dar colonias visibles en medios de cultivo sólidos. La mayor parte de las micobacterias saprofitas pertenecen a este grupo⁴¹.

1.6 PROCESO DE INFECCIÓN

La infección por *Mtb* se inicia cuando un individuo con TB pulmonar activa expelle aerosoles al estornudar, toser o hablar cargados con micobacterias viables⁴⁶, que al ser inhalados, entran al tracto respiratorio y al llegar al pulmón son fagocitados por los macrófagos alveolares, los cuales en individuos inmunocompetentes controlan eficazmente la infección evitando la proliferación del bacilo, una vez que se da el inicio de la respuesta inmune celular, las bacterias disminuyen y se desarrollan agregados redondos u ovoides de límites precisos denominados granulomas, conformados principalmente de macrófagos que están rodeados de linfocitos y, a veces, de células plasmáticas, estos agregados son considerados como las estructuras fundamentales para contener a las micobacterias^{47,48}.

Por otro lado en individuos inmunocomprometidos al no poder controlar la infección la bacteria crece rápidamente dentro de los macrófagos, progresando hacia una TB primaria activa la cual es asintomática, y una vez que las bacterias son liberadas puede haber diseminación linfohematógena produciendo la enfermedad, la cual es diseminada afectando a otros órganos como el bazo, hígado, riñón y cerebro (TB extra pulmonar)⁴⁹ de preferencia en un sistema retículo endotelial abundante y con alta tensión de oxígeno^{46,50}.

1.7 TUBERCULOSIS MDR Y TRATAMIENTO

Una complicación creciente del manejo inadecuado de fármacos antituberculosis es la multifarmaco-resistencia (MDR) de *Mtb*, lo que significa que la cepa es resistente a todos los antibióticos de primera línea como son isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol^{51,52}. La resistencia a estos fármacos puede deberse a fracasos en los programas de control, fallas en la supervisión del tratamiento o incumplimiento de mismo^{53, 54}, y puede

clasificarse como primaria cuando la infección es por una cepa resistente en un paciente que nunca ha recibido tratamiento, o adquirida cuando se desarrolla en pacientes que han recibido terapia antituberculosa previamente^{54, 55}. Para curar la TB MDR, los profesionales de salud deben recurrir a una combinación de medicamentos de segunda línea, varios de los cuales se muestran aquí (Tabla 1), estos fármacos pueden tener más efectos secundarios, el tratamiento puede durar mucho más tiempo, y el costo puede ser hasta 100 veces más que la terapia de primera línea. Estas cepas también pueden volverse resistentes a los medicamentos de segunda línea, lo que complica aún más el tratamiento.⁵⁶

| Tabla 1 Fármacos antituberculosos de segunda línea | | | | | |
|--|--|-----------------------|-------------------------|-----------------|---|
| Fármaco | Presentación | Dosis diaria | | | Reacciones adversas |
| | | Adultos Mg/Kg peso | Niños Mg/Kg peso | Dosis Máxima | |
| Kenamicina (Kn) Amikacina (Am) Capreomicina (Cm) | Fco. Amp. 1g Fco. Amp. 0.5g Fco. Amp. 0.5g | 15-20 | 10-15 15-30 15-20 | 1g | Nefrotoxicidad, vértigo, hipoacusia, rara vez bloqueo neuromuscular reversible. |
| Ciprofloxacino (Cfx) | Tab. 250 y 500mg | 7.5-15 | 30 | 1.5g | Náusea, vómito, gastritis, artralgias y cefaleas. |
| Ofloxacino (Ofx) | Tab. 400mg | 7.5-15 | 20 | 800mg | Náusea, vómito, gastritis, artralgias y cefaleas. |
| Levofloxacino (Lfx) | Tab. 400mg Tab. 750mg | 7.5-15 | 10-15 | 1.5 | Náusea, vómito, gastritis, artralgias, cefaleas y mareo. |
| Moxifloxacino (Mfx) | Tab. 400mg | 3-7 | 3-10 | 800mg | Precauciones: evitar si hay hipokalemia o historia de arritmias. Náusea 7%, mareo 3% y diarrea 6%. |
| Protionamida (Pth) Etionamida (Eth) | Tab. 250mg | 10-15 | 15-20 15-20 | 1g | Gastritis, neuropatía periférica, depresión, crisis convulsivas, hepatitis e hipoglucemia e hipotiroidismo. |
| Cicloserina | Tab. 250mg | 10-15 | 10-20 | 1g | Cambios de personalidad y psicosis, crisis convulsivas, exantemas. |
| Ácido Paraaminosalicílico (PAS) | Sobres o tabletas de 3g | 200 y 300 | 200 y 300 | 10-12g | Alteraciones gastrointestinales, hepatitis e hipersensibilidad. |

Tabla. 1 Esquema de tratamiento y reacciones adversas de TB MDR^{56,57}.

1.8 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico preciso y temprano de la TB pulmonar activa es fundamental para controlar la transmisión de la enfermedad. El diagnóstico incluye estudios radiológicos, la evaluación de manifestaciones clínicas como son tos, sudoración, fiebre nocturna o vespertina, pérdida de peso etc.⁵¹. A nivel de laboratorio, los cultivos, la prueba cutánea de PPD (Derivado de la Proteína Purificada) y la baciloscopía mediante la tinción de Ziehl-Neelsen, practicada en muestras de esputo que permite diagnosticar y evaluar la progresión de la TB pulmonar bajo tratamiento, además de las pruebas de susceptibilidad a fármacos DST (del inglés Drug Susceptibility Testing) de 1a. y 2a. línea^{58, 59}.

2. FUNCIONES, ISOFORMAS, RECEPTORES DE TGF- β

El TGF- β es el miembro de una familia de factores de crecimiento celular, ubicuos, multifuncionales y esenciales para la sobrevivencia, que tienen un papel importante en el desarrollo embrionario, quimiotaxis, proliferación e inhibición celular, inflamación, reparación de tejidos y la respuesta inmunológica^{60,61}. Es considerado como una citocina multifuncional (pleiotrópica) debido a los efectos que tiene sobre los diferentes tipos celulares dependiendo del tejido en el que actúen, de la concentración local de esta citocina, del equilibrio de expresión de otras citocinas y del grado de diferenciación de las células blanco. La producción y activación excesiva del TGF- β se ha relacionado con inmunosupresión en diversas enfermedades autoinmunes, neoplásicas e infecciosas⁶².

Estos factores son clasificados en subfamilias dependiendo de su homología estructural y funcional. En los mamíferos, la familia TGF- β está dividida en tres subfamilias: TGF- β s, Activinas/Inhibinas y BMP's/GDF's (Bone Morphogenetic Proteins/Growth Differentiation factors)⁶³. Se han descrito tres tipos de receptores para que el TGF- β lleve a cabo su

señalización (TGF- β RI o ALK *Activin-Receptor Like Kinases*, TGF- β RII y TGF- β RIII). Receptores TGF- β : R1 y R2 son receptores transmembrana de tipo serina/treonina kinasa que son críticos para su activación⁶⁴. Por otro lado, el receptor tipo III, también llamado β -glicano, más abundante que R1 y R2 no tiene dominio de señalización intracelular y puede ser anclado a la membrana o secretado en forma soluble cuya función es captar la señal TGF- β y transferirla, regulando los ligandos a los receptores R1 y R2, lo que hace que estos dos últimos receptores tengan el papel más importante en la vía de señalización⁶⁵.

Existen tres isoformas TGF- β , los precursores TGF- β ($-\beta$ 1, $-\beta$ 2 y $-\beta$ 3)⁶⁴ y se sintetizan inicialmente como homodiméricos inactivos grandes. Todos ellos son procesados en el interior de aparato de Golgi por proteasas tipo furina⁶⁷.

2.1 RUTA DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF- β

Normalmente, el TGF- β es almacenado en forma latente dentro de la célula como un homodímero, el cual se encuentra en un complejo latente (LLC: *Large Latent Complex*) unido en forma no covalente con la proteína asociada a latencia (LAP) y a la proteína de unión al TGF- β (LTBP). En el complejo latente el TGF- β carece de actividad, presumiblemente porque su asociación con el LAP le impide unirse a su receptor y la unión de la citocina a su receptor requiere la remoción de LAP, proceso que es catalizado *in vivo* por plasmina, trombospondina, furina e *in vitro* puede ser inducida por cambios en el pH o la temperatura^{68, 69}. La liberación también depende de muchos otros factores que actúan como activadores de TGF- β , entre los que se han descrito las integrinas, las proteasas, los cambios del pH de la célula, las especies reactivas de oxígeno, o incluso los cambios en la

matriz extracelular, de ellos dependerá también los niveles de TGF- β liberados, así como la respuesta celular a éstos⁷⁰.

Los dímeros de TGF- β bioactivos inducen la activación de proteínas G (proteínas reguladoras heterotrimericas ligadas a GTP) y se unen a los receptores de tipo I y tipo II formando un complejo heterotetramérico en la superficie celular⁶⁹, compuesto por el TGF- β dimérico, dos receptores tipo II y dos receptores tipo I. El receptor tipo II fosforila y activa al receptor tipo I, el cuál fosforila a los R-Smads (del inglés: *Receptor-regulated Mothers Against Decapentaplegics* "SMADs"). Esta fosforilación en el receptor tipo I activa a las cinasas en residuos de tirosina que fosforilan a los factores de transcripción Smad2 y Smad3^{70,73}, la actividad de éstas está modulada por proteínas adaptadoras como SARA (del inglés *Smad anchor for receptor activation*) que los mantiene secuestrados en el citoplasma pero que tras activación facilitan la interacción de los Smad 2/3 con el receptor de TGF- β activado^{74,76}, una vez fosforilados, forman un complejo de dimerización con Smad 4 para trasladarse del citoplasma hacia el núcleo, donde se unirán a los SBE (del inglés: *Smad binding elements*) de los genes diana junto con una serie de co-factores y factores de transcripción (FT) que al unirse al ADN y regulan la expresión de genes específicos para inducir la actividad requerida⁷⁶.

Ciertas I-Smad, principalmente las tipo Smad-6 y Smad-7, que carecen de la región normalmente fosforilada por el receptor TGF- β RI interfieren con la fosforilación de Smad-2 o Smad-3, regulando su actividad^{73,77-79}, lo cual sugiere que hay un mecanismo de autorregulación negativa intracelular que regula la señal del TGF- β ^{80,81}.

Hay evidencia de que el TGF- β es capaz de activar otras vías de transducción, independientes y en paralelo a las Smad, como son por ejemplo la vía clásica de las MAPKs y la vía de PI3K, entre otras, lo que parece tener un efecto más importante en la regulación de la matriz extracelular⁸²⁻⁸⁵.

Dada la importancia que tiene la vía del TGF- β en la regulación de diversos procesos como son el crecimiento, desarrollo, la homeostasis y muerte celular entre otros, se ha observado que las alteraciones en esta vía de transducción llevan al desarrollo de diferentes patologías como son el cáncer, fibrosis, enfermedades del sistema inmune, inflamaciones crónicas y otras⁵.

2.2 BETAGLICANO RECOMBINANTE

Betaglicano soluble recombinante baculoviral (BGSR) es un homodímero formado por dos monómeros de 110 kDa asociados por enlaces no covalentes que inhiben las acciones del TGF- β , es preparado como una proteína recombinante usando el sistema de expresión de baculovirus en células de insecto⁸⁶. El BGSR, al igual que el betaglicano soluble natural, tiene una alta afinidad por las 3 isoformas del TGF- β , con rangos constantes de disociación (Kd) que van de 3.5 nM para el TGF- β 1, hasta de aproximadamente 0.5 nM para el TGF- β 2, esta selectividad relativa de isoforma refleja con precisión las afinidades mostradas por el receptor silvestre, lo cual indica que el betaglicano recombinante tiene propiedades que podrían ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades como la enfermedad renal crónica, angiogénesis tumoral, pacientes que cursan fibrosis, entre otras, en el que el exceso de TGF- β desempeña un papel fisiopatológico central⁸⁷⁻⁸⁹.

2.3 ACCIÓN DEL ÁCIDO NIFLUMICO COMO INHIBIDOR DE PROSTAGLANDINAS EN TUBERCULOSIS

Un factor que afecta la inmunidad protectora en la TB es la producción de prostaglandinas, las cuales son potentes mediadores de la inflamación en particular la PGE-2⁸². La participación de las PGE en la protección y progresión de la TB pulmonar depende de las concentraciones, altas concentraciones tienen un efecto en la disminución de la proliferación linfocitaria T, células natural killer y expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII), además de inhibir la producción de citocinas de linfocitos cooperadores tipo 1 (Th1) y regular negativamente la activación de macrófagos, bajas concentraciones producen un aumento en la inflamación y mayor expresión de TNF- α , IFN- γ e iNOS⁹⁰⁻⁹⁶.

La inhibición farmacológica de PGE mediante la administración de AN, un fármaco que bloquea a la enzima ciclooxigenasa-2 durante la fase tardía de la infección por TB, promueve la expresión de genes como IL-1 α , TNF α e IFN- γ y una regulación negativa en la expresión de iNOS, lo que se sugiere que las PGE's participan en la disminución de la protección de la respuesta celular contribuyendo al desarrollo de la enfermedad⁴.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la incidencia de los casos de TB en los últimos años ha ido en aumento, por lo que sigue siendo un problema de salud pública tanto en México como en el mundo. El manejo inadecuado de los antibióticos así como los tratamientos no supervisados, han provocado el surgimiento de cepas multiresistentes a los fármacos de primera línea, por lo que la acción terapéutica requiere su uso prolongado para alcanzar la curación, además de tener efectos tóxicos en el organismo y un costo elevado.

Es por ello que es necesario la implementación y desarrollo de nuevas estrategias con acciones terapéuticas más eficaces, que ayuden a disminuir el tiempo del tratamiento y los efectos secundarios para el control de esta enfermedad.

VI. HIPÓTESIS

Siendo el TGF- β una citocina Th2 y las prostaglandinas moduladoras de la respuesta inmunológica en el proceso inflamatorio de la TB pulmonar la administración de Ácido Niflúmico y Betaglicano Soluble Recombinante conferirá protección durante la etapa crónica de la infección revirtiendo el patrón de Th2 a Th1.

VII. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto protector de la administración del betaglicano recombinante (BGSR) y un inhibidor de COX-2 (Ácido Niflúmico) durante el desarrollo de la TB progresiva con una cepa multidrogoresistente.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto protector de los tratamientos (AN, BGSR) en el modelo de TB.
2. Analizar el efecto terapéutico de cada inhibidor específico "*in vivo*" como posible tratamiento para la TB progresiva.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Tipo de estudio:

Experimental-Prospectivo-Longitudinal-Comparativo.

- **Criterios de inclusión:**

Ratones singénicos Balb/c machos de 8 semanas y 22 gramos de peso.

- **Criterios de exclusión:**

Ratones singénicos Balb/c hembras y machos menores a 8 semanas o mayores a 10 semanas y con peso menor a 22 gramos.

- **Criterios de eliminación:**

Ratones singénicos Balb/c muertos.

B. Universo

46 ratones singénicos Balb/c machos de 8 semanas.

C. Variables

- Dependiente: efecto terapéutico en los ratones infectados.
- Independiente: tratamientos.

D. Técnicas

1. MODELO EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN RATONES BALB/C

El modelo se caracteriza por usar animales genéticamente idénticos (cepa singénica Balb/c) de 8 semanas de edad y 22 gramos de peso, los cuales se infectan por vía intratraqueal con bacterias vivas y virulentas (cepa prototipo H37Rv). La dosis empleada para infectar a los ratones es elevada (1×10^6 , 2.5×10^5), puesto que estos animales no son hospederos naturales de estos microorganismos⁹⁷ y se caracteriza por el establecimiento de dos fases principales durante el desarrollo de la enfermedad.

La primera fase, es la etapa aguda, que corresponde al primer mes de infección y se caracteriza histológicamente por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios, en la segunda y tercera semana de infección, hay presencia de granulomas que están constituidos principalmente por macrófagos, linfocitos Th1 y una elevada producción de IFN- γ que activa a los macrófagos, estimulándolos a producir iNOS generando así óxido nítrico que al reaccionar con radicales libres de oxígeno forman peroxinitrilos los cuales contribuyen a la muerte celular. Los macrófagos activados en los granulomas producen IL-1, citocina que al igual que el TNF- α contribuyen a la activación celular y estimulan la producción de IL-2 incrementando la población linfocitaria para mantener el control temporal de la enfermedad⁹⁸.

La segunda etapa de la enfermedad corresponde a la fase crónica o progresiva, que se caracteriza por un incremento en el número de bacterias vivas en los pulmones, así como áreas progresivas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial, que en conjunto conduce a la muerte debido a hipoxia⁹⁸. En esta fase se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th-2) los cuales se caracterizan por producir interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. La IL-4 que es importante en la inducción de la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos considerados no protectores en la TB, además que la IL-4, IL-10, y la IL-13 son eficientes antagonistas de las células Th1, de manera que al haber estos cambios en la producción de citocinas, los macrófagos sufren modificaciones morfo-funcionales como vacuolas que contienen lípidos bacterianos como la lipoarabinomanano el cual los inactiva y disminuye significativamente su producción de

TNF- α , IL-1 e iNOS, e incrementando la producción de citocinas antiinflamatorias y supresoras de la inmunidad celular, como el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) y la IL-10^{98,99}. En este estudio se utilizó una infección de 9×10^4 micobacterias Multidrogoresistente.

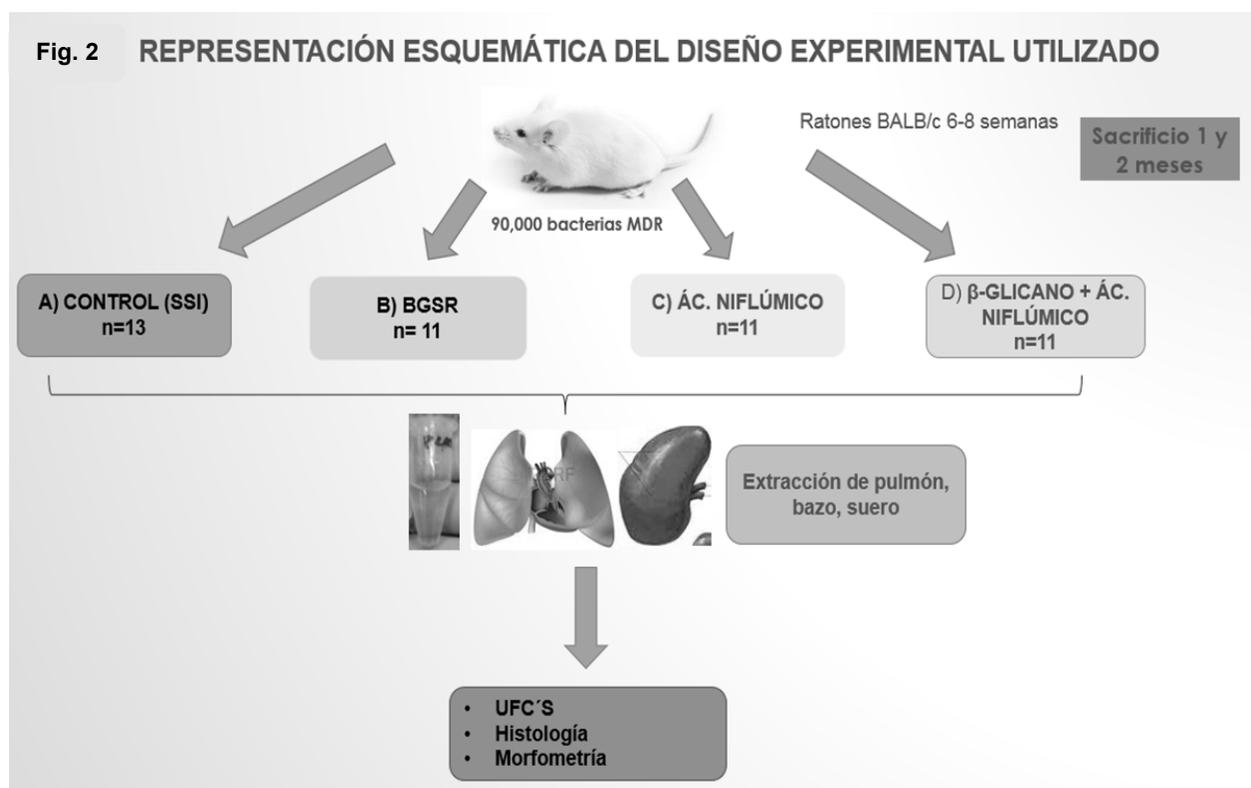
1.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este trabajo se utilizaron 46 ratones machos de la cepa Balb/c de 8 semanas de edad y 22 gramos de peso, fueron anestesiados con sevoflurano (Laboratorios Pisa S.A. de C. V.) e infectados vía intratraqueal con 90,000 micobacterias viables MDR, fueron mantenidos en grupos de 13 y 11 ratones (4 grupos) en micro aisladores conectados a un sistema de presión positiva (Allenton, USA). Todos los procedimientos se realizaron en un gabinete de flujo laminar con nivel de bioseguridad III. El protocolo y los procedimientos para la manipulación y almacenaje de los animales empleados fue aprobado por el Comité de Investigación de Animales (CINVA) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición en México.

Cuarenta días post-infección iniciaron los tratamientos, al grupo uno se le administraron 100 μ L de SSI dos veces por semana vía i.p, al grupo dos 30 μ g de BGSR dos veces por semana i.p., el grupo 3 recibió 500 μ g de AN dos veces al día, cinco días a la semana vía i.g. con ayuda de una cánula (Cadense Science, catálogo 7901 curved calibre 22Gx1.0" w/ 1.25 mm ball) más 30 μ g de BGSR dos veces por semana i.p. y finalmente al grupo 4 le fueron administrados 500 μ g de ácido niflúmico dos veces al día, cinco días a la semana i.g. (Tabla 2). Después de uno y dos meses post-tratamiento se sacrificaron 6 ratones de cada grupo para tomar muestras de suero, pulmones y bazo (Fig. 2).

Tabla 2. Esquema de tratamiento, vía de administración, dosis de los fármacos y días de tratamiento.

| Grupos | Núm de ratones | Fármaco | Dosis y Vía de administración | Días a la semana/veces al día |
|--------------------------|----------------|-----------|---|-------------------------------|
| 1.Control | 13 | SSI | 100 µL i.p. | 2/1 |
| 2.BGSR | 11 | BGSR | 30 µg en 100 µL i.p. | 2/1 |
| 3.BGSR + Ácido Niflúmico | 11 | BGSR + AN | 30 µg en 100 µL i.p.+ 500 µg en 100 µL i.g. | 2/1 + 5/2 |
| 4.Ácido Niflúmico | 11 | AN | 500 µg en 100 µL i.g. | 5/2 |



1.2 PREPARACIÓN DE CEPA MULTIDROGORESISTENTE (MDR)

La cepa fue manipulada en un gabinete de flujo laminar de clase III (Forma Class II, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c) en medio Lowestein Jensen, cultivada en botellas de 25 cm² con 8mL y escalada en botellas de 75 cm² con 60 mL del medio Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI USA) enriquecido con ADC (albúmina, catalasa y dextrosa, Becton-Dickinson, Sparks, MD) e incubados a 37 °C en agitación constante (170 rpm) durante 21 días hasta alcanzar la fase exponencial del crecimiento bacteriano (DO 600 nm=0.6).

1.3 COSECHA DE MICOBACTERIAS

Los procedimientos se realizaron dentro de un gabinete de flujo laminar de clase III (Forma Class II, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c). Cincuenta mL del cultivo con DO=0.6 se transfirió a un tubo Corning de 50 mL y mediante centrifugación a 3000 rpm/10'4 °C se recuperó el pellet, posteriormente al pellet se le agregaron perlas de vidrio de 3 mm, 15 mL de PBS- tween y se dieron 5 ciclos de agitación-descanso en vortex, después, se centrifugó a 1500 rpm /10min / 4 °C, se recuperó el sobrenadante por decantación (aproximadamente 15 mL) transfiriendo el sobrenadante a un tubo de 50mL Corning para su lavado con 30 mL de PBS 1X, se agitó en vortex durante un min y centrifugación a 2500rpm/10min/4 °C, el pellet obtenido se resuspendió en 10 mL de SSI y se transfirió a un tubo nuevo Corning de 50 mL denominado pool, donde se agregan todos los pellets resuspendidos. Finalmente el tubo denominado pool se centrifugó a 2500 rpm / 10min / 4 °C se descartó el sobrenadante y se llevó a un volumen de 45 mL con SSI, se agitó en vortex durante un min y se hicieron alícuotas de 1.5 mL en criotubos Corning de 2 mL (aprox. 29 crioviales) y etiquetando el tubo

inicial, intermedio y final para la posterior determinación del título de carga bacteriana, las alícuotas fueron vaciadas a nitrógeno y almacenados a -70 °C hasta su uso.

1.4 DETERMINACIÓN DE CARGA BACILAR Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA LA INFECCIÓN DE ANIMALES.

Tomando en cuenta la infección de 100 µL de suspensión bacteriana para cada ratón Balb/c se realizaron cálculos para 60 ratones, 22 días previos a la infección se hicieron diluciones seriadas de -1 a -3 para determinar la cantidad de bacteria a utilizar, las diluciones se realizaron por duplicado en tubos ependorff de 1.5 mL con 900 µL de medio 7H9 enriquecido con ADC (Becton, Dickinson y Compañy Sparks, MD) para ello se tomaron 100 µL de una suspensión realizada con 631 µL de suspensión de micobacterias MDR en 5370 µL de SSI, se tomaron 10 µL de cada dilución y se sembraron en cajas de Petri con agar 7H10 / OADC.

Preparación del inóculo:

1 dosis = 10.51 µL de bacteria MDR + 89.5 µL de SSI

60 dosis = 631 µL de bacteria MDR + 8950 µL de SSI

La siguiente fórmula muestra el cálculo para el número total de bacterias:

(Promedio del conteo de bacterias de la dilución) (Factor de dilución) = # de bacterias en 10 µL.

◆ TÍTULO BACTERIANO MDR

| Dilución | -1 | -2 | -2 | -3 | Promedio dilución -2 |
|--------------------|-----|-------|-------|-------|----------------------|
| Factor de dilución | 10 | 100 | 100 | 1000 | |
| Núm. de UFC'S | I/I | 93/84 | 88/95 | 17/16 | 90 |

Nota: I corresponde a un núm. incontable de bacterias.

Tabla 4. Número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC'S) crecidas en placas de agar 7H10 de cada dilución.

Ecuaciones para calcular el número total de bacterias:

$(90) (100) = 9000$ bacterias esto en 10 μ L de suspensión

Realizando en cálculo por cada 100 μ L de la suspensión:

9,000 bacterias – 10 μ L de suspensión

X= 90,000 bacterias - 100 μ L de suspensión

Un día antes de la infección se pasó un vial de micobacteria MDR de -70 °C a -20 °C para descongelarlo lentamente, después se transfirió a 4 °C, una vez descongelado se agitó en vortex durante 10 seg, se aseguró la pureza del vial mediante una tinción de Ziehl-Nielsen y se sembró una asada en agar sangre, después se procede a hacer la suspensión para el inóculo.

1.5 DETERMINACIÓN DE UFC'S EN PULMONES INFECTADOS

El pulmón derecho de los ratones se utilizó para la determinación de carga bacilar por el conteo de UFC'S. Los pulmones se homogenizaron 3 ocasiones, durante 20 seg con 1 mL de PBS-Tween 80 al 0.05% en un Fast Prep-24 versión 6004.3, se sonicaron durante 45 seg (Ultrasonic Cleaner Cole Palmer), se hicieron diluciones de cada uno de los homogenizados y se sembraron por duplicado en placas de agar Bacto Meddlebrook 7H10 (Difco, Detroit, MI USA) enriquecido con OADC (Becton, Dickinson y Compañía, Sparks, MD), se incubaron a 37 °C y en una atmosfera al 5% de CO₂, el número de colonias fue contado a los 14 y 21 días después del sembrado^{100,101}.

1.6 PREPARACIÓN DEL TEJIDO PARA EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO Y MORFOMÉTRICO

Para el estudio histológico tres pulmones izquierdos fueron perfundidos intratraquealmente con un 1 mL de etanol absoluto (J.T. USA) y se dejaron fijar por 72 horas, se cortaron por la región parasagital de cada pulmón y se continuo su deshidratación en etanol absoluto, posteriormente se eliminó el alcohol residual a través de baños de 1 hora en xileno (J.T. Baker, U.S.A.) y finalmente fueron embebidos en parafina (SAKURA FINETEK U.S.A. INC.). Los tejidos se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4 μm con un micrótomo (Leica RM2135) de cada pulmón obtenido y fueron teñidos con hematoxilina-eosina. El porcentaje del área de cada pulmón afectado por neumonía fue determinado con un analizador de imágenes con el software Leica Q500/W versión 4.2 (Milton Keynes, UK) y el área de los granulomas fue medido en micras².

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó usando el software IBM SPSS Statistics versión 21 utilizando la prueba de Kaplan-Meier para las curvas de sobrevida y un análisis de varianza tipo ANOVA y una t de Student con los cuales se compararon los análisis morfométricos, las determinaciones de UFC'S de los ratones infectados con o sin tratamiento considerando una diferencia significativa de $p < 0.05$.

X. RESULTADOS

A. Determinación de sobrevida

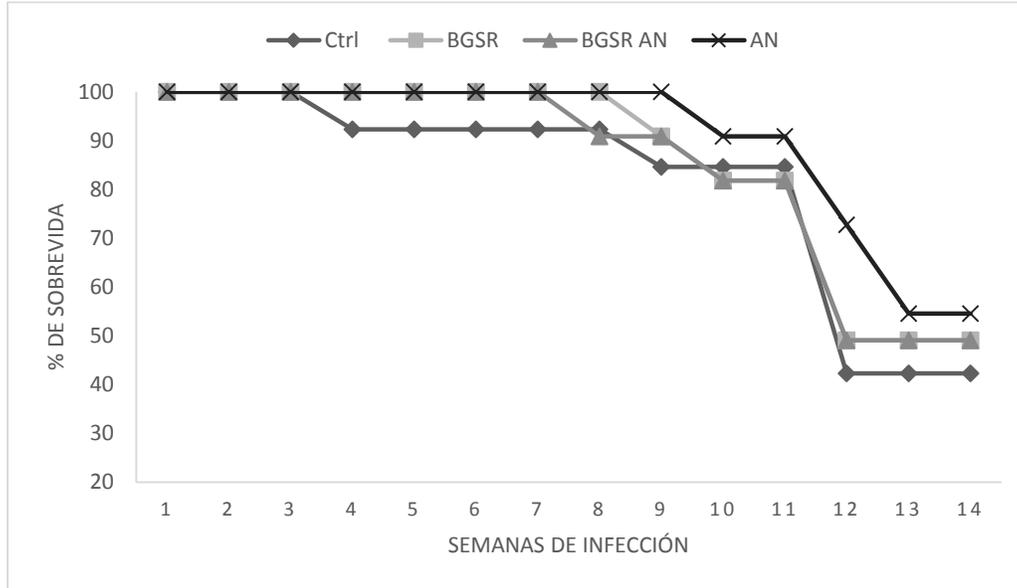
Para la determinación de sobrevida se utilizaron 4 grupos de ratones Balb/c, 13 para el control y 11 para los restantes grupos respectivamente. Los ratones a lo largo del tiempo presentaron pérdida de fuerza y peso corporal y macróscópicamente se observó adinamia, piloerección, cianosis y dificultad para respirar.

El grupo con menor tasa de sobrevida es el grupo control con 42% y el de mayor tasa de sobrevida es el grupo tratado con ácido niflúmico con 55% (Fig.3 A).

B. Determinación de carga bacilar

Para la determinación de carga bacilar se utilizó la técnica de conteo de colonias por UFC's de tal manera que los resultados indican que a los 30 días post-tratamiento la carga bacilar de cada grupo en estudio fue muy similar, a excepción del BGSR que esta aumentada. A los 60 días post-tratamiento se aprecia que el grupo CTRL y el BGSR presentan menor carga bacilar que AN, AN-BGSR y comparando la cantidad de micobacterias del grupo CTRL y el BGSR del día 60 con los grupos del día 30 la cantidad es menor. En ningún grupo se presentaron diferencias significativas (Fig. 3 B).

A.



B.

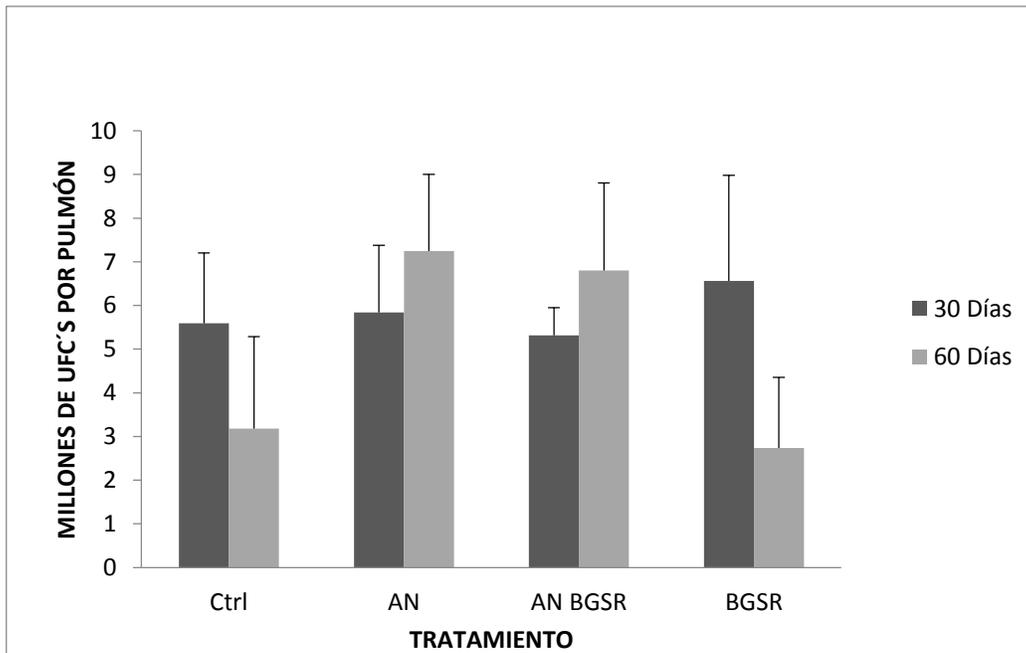


Fig. 3. Porcentaje de supervivencia y determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC'S) en ratones BALB/c infectados por i.t. a lo largo del experimento. A) Supervivencia de cada grupo expresado en porcentaje. B) Carga bacteriana a los 30 y 60 días post-tratamiento, expresada en millones de UFC'S por pulmón. En las gráficas se presentan la media y la desviación estándar de los datos. Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$.

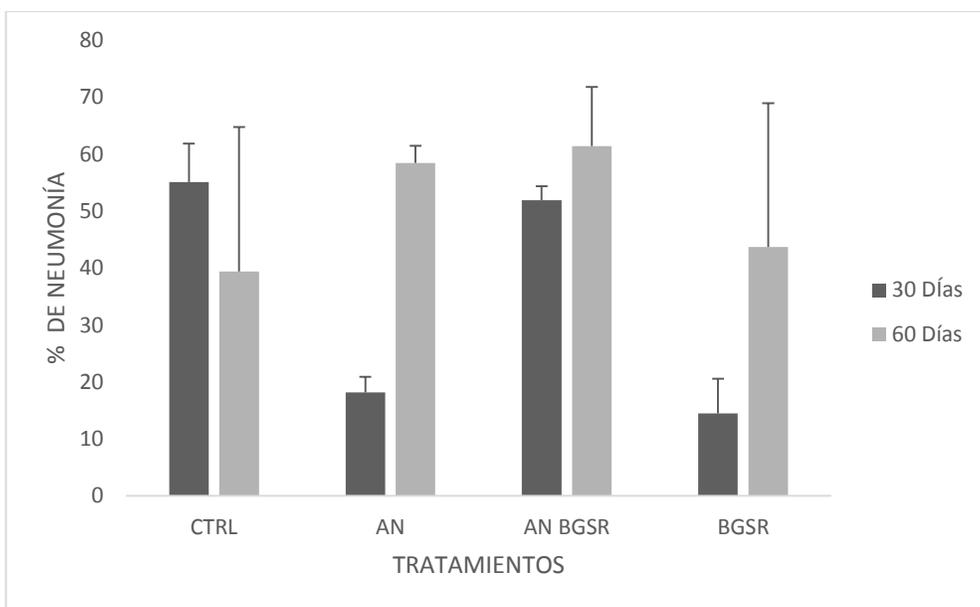
C. Determinación del porcentaje de neumonía

Para determinar el área afectada por neumonía se analizaron tres pulmones de cada grupo por tiempo de sacrificio. Los resultados indican que los porcentajes de neumonía aumentan con casi todos los tratamientos en los días 30 y 60 excepto en el grupo control del día 60. Dichos porcentajes van desde 14% hasta un 55% en el primer mes y de un 25% a un 61% para el segundo mes dependiendo del tratamiento administrado. También se observó que el tratamiento AN-BGSR en el segundo mes favorece su disminución, ya que fue el único tratamiento que no aumento hasta tres veces o menos su neumonía comparado con el primer mes (Fig. 4 C).

D. Promedio del área de los granulomas

Para calcular el promedio de granulomas se medieron al menos diez en cada corte histológico. Durante su formación se observa que el crecimiento es progresivo a lo largo de los tratamientos CTRL, AN, AN-BGSR a excepción del BGSR que disminuye en el segundo mes (Fig. 4 D). En los datos no se muestra ninguna diferencia significativa.

C.



D.

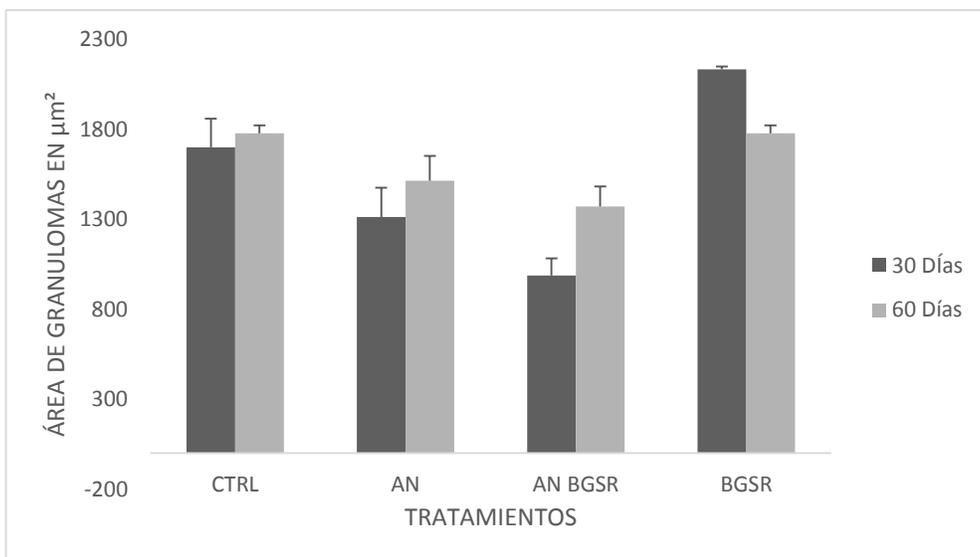


Fig. 4. Análisis morfométrico en pulmones infectados con la cepa MDR tratados con AN, BGSR, SSI, BGSR+AN determinado con un analizador de imágenes con el software Leica Q500/W versión 4.2 (Milton Keynes, UK). C) Área de pulmón afectada por neumonía, expresado en porcentaje. D) Área promedio en μm^2 de los granulomas encontrados en cada tratamiento \pm DE. En las gráficas se presentan la media y la desviación estándar de los datos.

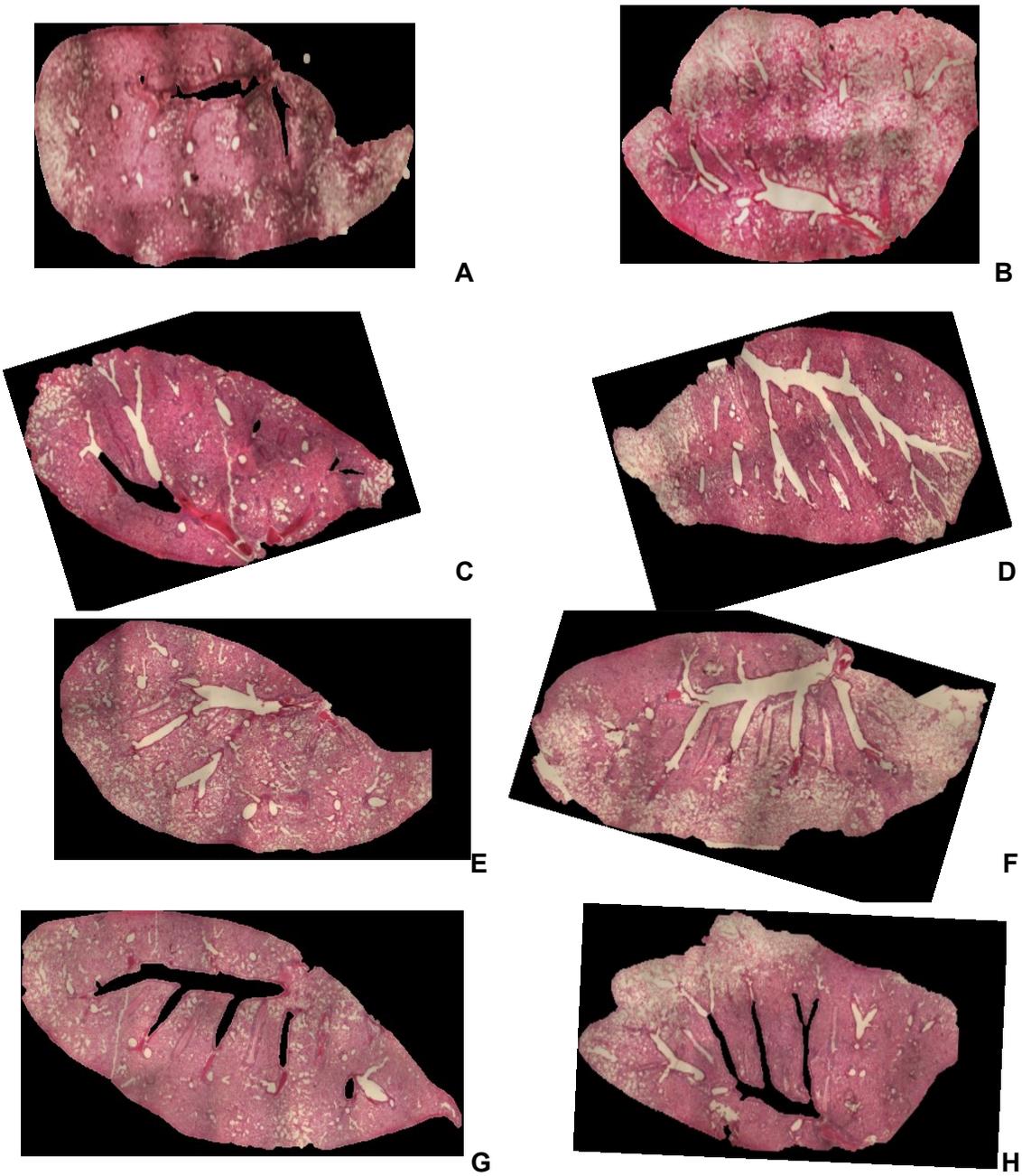


Fig. 5 Microfotografías representativas de los pulmones de ratones infectados con la cepa MDR sin tratamiento CTRL (A, B) y tratados con AN (C, D), BGSR (E, F), BGSR+AN (G, H) al mes (izquierda) y dos meses (derecha) post-tratamiento Tinción H&E a 10x.

XI. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En este trabajo se analizó el proceso inmunopatológico del efecto del bloqueo de TGF- β y COX-2 durante la fase progresiva de la infección. Los datos arrojados por este estudio mostraron que dependiendo de los diferentes fármacos administrados a los grupos de infección, la tasa de sobrevivencia aumentaba o disminuía debido al grado de protección que otorgaban, de tal manera que el grupo al que se le administró el antiinflamatorio AN fue el más beneficiado en este sentido, debido a que esta enfermedad-infecto contagiosa produce aumento en la inflamación conforme progresa la enfermedad sin embargo no reduce la carga bacilar, al inhibir la COX-2 no hay producción de PGE y por tanto la inflamación disminuye. En algunos modelos con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y otros trabajos^{102,103} se ha descrito que el empleo de antiinflamatorios como inhibidores de la COX-2 como el meloxicam, ácido mefenámico y la nimesulida, incrementan la tasa de sobrevivencia de los ratones infectados (86-100%), y reduce significativamente la carga bacilar en pulmones con tiempos de post-tratamientos iguales a los ocupados en este trabajo, los resultados arrojados en este estudio mostraron que al utilizar el mismo tratamiento AN pero en una bacteria MDR no hay disminución de la carga bacilar.

También se observa que existe en los grupos una relación directa, entre la carga bacteriana y el nivel de neumonía e indirecta en el porcentaje de sobrevivencia y el tamaño de granulomas, a excepción del grupo AN, debido que al haber mayor cantidad bacteriana existe mayor porcentaje del tejido pulmonar afectado por neumonía y disminuye la sobrevivencia y el tamaño de granulomas, de tal manera que la muerte se da por dificultad respiratoria, ocasionada por la neumonía causada por Mtb¹⁰⁴.

En el grupo CTRL se observa que el porcentaje de sobrevida es menor debido a que a este grupo no se le administró ningún tratamiento^{105, 106}. Con respecto a la carga bacilar en los primeros 30 días de tratamiento las UFC'S son muy similares en todos los grupos a excepción del BGSR que la tiene ligeramente aumentada. A los 60 días de tratamiento el grupo CTRL y BGSR presentan menor carga bacilar. La disminución y el aumento de carga bacilar del grupo BGSR en el segundo y primer mes puede ser debido a que en el modelo murino de TB se sabe que las concentraciones de TGF- β aumentan conforme progresa la enfermedad, existiendo dos fases; una pro-inflamatoria, en la que la concentración de TGF- β es menor y otra anti-inflamatoria la cual, la concentración es mayor. Por otra parte estudios recientes mencionan que la regulación de la citocina está dada por dos diferentes vías de activación de los receptores mediada por invaginaciones: internalización por endocitosis vía clatrina la cual regula positivamente la regulación de la esta citocina mediante la señalización de SARA y por ende promueve que los endosomas faciliten la activación de SMAD Y R-SMAD o internalización por endocitosis vía caveolas la cual tiene un efecto inhibitorio mediante la disminución de la señalización de smad 2/3 y degradación del receptor por ubiquitinación mediante smurf 1/2. La síntesis de SMADs inhibitorias (SMAD 6 Y 7) es inducida por el TFG- β , lo cual sugiere que hay un mecanismo de autoregulación negativa intracelular que regula la señal TFG- β ^{107, 108}.

De este modo al estar agregando el BGSR la cantidad de citocina disminuye a través del tiempo de tal manera que se revierte la señal anti-inflamatoria a una pro-inflamatoria. La disminución de la citocina estimula que el receptor se internalice vía clatrina, regulando positivamente la señalización (Día 60) y provocando la activación clásica del macrófago (Th1), esto se relaciona con otros modelos, como la malaria en los que proponen que los

macrófagos tienen gran cantidad de receptores TGF- β y son muy sensibles a concentraciones bajas de la citocina, lo que los hace más susceptibles a la activación por IFN- γ de tal manera que disminuye la carga bacilar por dicha activación. No así en el día 30 donde la cantidad de la citocina es mayor en comparación al día 60 donde el macrófago necesita inhibir la señal por tanto sobreestimulo inducido por la citocina, regulando negativamente la señalización provocando que el receptor se internalice vía caveolas, ya que se ha determinado que la interacción de CAV-1 (proteína constitutiva de las balsas lipídicas) con moléculas de transducción puede causar la inhibición de la ruta de señalización, como la interacción de CAV-1 inhibiendo la transducción de eNOS (endotelial nitric oxide synthase) y disminuyendo iNOS (inducible nitric oxide synthase)^{109,110,111}.

La regulación negativa estimula que el macrófago se active alternativamente (Th2) y provoca aumento de proteínas derivados de la ornitina como las poliaminas y la prolina que promueven el crecimiento intracelular del parásito, la producción de colágeno y la reparación del tejido dañado por la neumonía. Además también se ha demostrado que el incremento de TGF- β puede disminuir la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno en macrófagos disminuyendo la producción de IFN- γ ^{112, 113,114}.

Aunado a esto la micobacteria tiene propiedades que hacen el uso directo de la vía de señalización del TGF- β en el huésped, lo que sugiere que la *M. tuberculosis* activa la vía para facilitar su entrada a las células y con ello la carga bacilar aumenta¹⁰⁹.

En base a todo esta información se puede decir que es posible revertir un señal antiinflamatoria a una proinflamatoria mediante la utilización de BGSR, ya que la disminución endógena del TGF- β provocada por su administración promueve la disminución de la

afinidad de SARA sobre Smad 2/3, activándolas y facilitando su transporte hacia el núcleo para la formación de procesos transcripcionales de unión al ADN para posteriormente activar macrófagos por la vía clásica e inducir la expresión y producción de TNF- α y IFN- γ para la eliminación de patógenos intracelulares.

El análisis morfométrico mostró que el papel del TGF- β en la formación de los granulomas es ambiguo, aun cuando numerosos reportes han descrito altos niveles de expresión de esta citocina en diferentes tipos de lesiones granulomatosas, como en la esquistosomiasis hepática (*S. mansoni*) que es el mejor ejemplo de este proceso. El TGF- β producido por las células en los granulomas inducidos por el huevo del parásito parece ser el principal inductor de fibrosis, a través de la estimulación de la producción de heparan sulfato, proteoglicanos, colágena y otros componentes de matriz extracelular, así como un inductor de la proliferación de fibroblastos. En este sentido, la citocina TGF- β producida por macrófagos activados, promueve el depósito de colágeno y favorece la quimiotaxis de otros macrófagos, teniendo una actividad permisiva en la formación del granuloma¹¹⁵, por otra parte granulomas pequeños en los pulmones infectados son el resultado de la alta estimulación de IL-10 y IL-4 por células Th2¹¹¹, lo cual concuerda con nuestro modelo y con los resultados mostrados (Fig. 4 D tamaño de granuloma) ya que se observa que el grupo con el tratamiento BGSR es el que tiene mayor tamaño de granulomas tanto en los 30 y 60 días post-tratamiento sugiriendo un mejor control de la infección.

Con respecto a los niveles de neumonía, se ha apreciado en el modelo de TB pulmonar *in vivo* que la infección de Mtb produce aumento en los niveles plasmáticos de PGE2, estimulando la actividad de arginasa y ornitina, que eleva la producción de poliaminas y desfavorece la producción de NO en el macrófago (activación alternativa) produciendo

aumento en el crecimiento bacteriano dentro del macrófago incluyendo la supresión de IL-12^{80,96,116}, nuestros resultados muestran (Fig. 4 C) una disminución del nivel de neumonía en el grupo BGSR en los primeros 30 días post-tratamiento y un aumento de carga bacilar con respecto al CTRL, esto debido al efecto que tiene TGF- β regulando PGE2^{117,118} y al haber menor concentración de la citocina por la administración del receptor BGSR produce menor inflamación.

Por último la eficacia se midió como la habilidad de un fármaco para producir un efecto y no como el efecto máximo de un fármaco, observando el efecto producido en la disminución de carga bacilar, disminución de los niveles de neumonía, mayor tasa de supervivencia por lo que el BGSR tiene mayor eficacia y mayor efecto terapéutico solo, en comparación con los otros tratamientos.

XII. CONCLUSIONES

Dada la importancia que tiene la vía del TGF- β en la regulación de diversos procesos como son el equilibrio de expresión de otras citocinas, crecimiento, desarrollo, homeostasis y muerte celular entre otros, se ha observado que las alteraciones en el incremento de esta vía de transducción llevan al desarrollo de diferentes patologías inflamatorias graves. Nuestros datos sugieren que la participación del TGF- β en la progresión de la TB depende de la concentración ya que es un regulador importante de la inflamación, porque en concentraciones bajas la promueve (pro-inflamatorio) o la inhibe en concentraciones altas (anti-inflamatorio). Es muy probable que todas estas respuestas tengan lugar en caveolas, por lo que determinar el papel que juega cada uno de estos componentes ayudará a comprender mejor cómo una misma citoquina puede ejercer funciones tan diferentes en una misma célula.

En las infecciones crónicas como la tuberculosis es crucial que el sistema inmune tenga la capacidad de contener al patógeno y prevenir su diseminación o proliferación, pero sin causar una patología excesiva. Por este motivo, el TGF- β puede ser importante para mantener el balance entre el control y eliminación de organismos infecciosos, como es el caso de parásitos intracelulares, y por otra parte, en la prevención de patologías mediadas inmunológicamente como la enfermedad de chagas y leishmaniosis.

Todo lo anterior sugiere utilizar terapias clínicas basadas en la modulación de esta citocina mediante BGSR lo que representaría una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de desórdenes en la función inmune, ya que el TGF- β administrado solo o en combinación con otros medicamentos puede constituir un nuevo tipo de inmunoterapia, que contribuiría

a la disminución del tiempo de tratamiento, permitiendo un mejor control de la enfermedad producida por microorganismos resistentes a antibióticos.

XIII. PRESPECTIVAS

- ✓ Determinación de citocinas como iNOS, TNF- α , IFN- γ , IL-12 ya que se ha visto pueden modular positiva o negativamente la respuesta de TGF- β .
- ✓ Evaluar los mismos tratamientos con una misma y una menor carga bacilar de *Micobacterium tuberculosis* MDR para determinar si las tendencias de los datos son las mismas.
- ✓ Evaluar los tratamientos comparando con antibióticos.
- ✓ Debido a que se ha demostrado que un gran número de patógenos utiliza como vía de entrada a las balsas lipídicas/caveolas presentes en la membrana plasmática sería bueno identificar si CAV-1 y otras moléculas presentes en macrófagos interaccionan con micobacterias para su internalización.

XIV. REFERENCIAS

1. Gandy M, Zumla A. Introduction. In: Gandy M, Zumla A, eds. The return of the white plague global poverty and the 'new' tuberculosis. London: Verso, 2003; 7–12.
2. World Health Organization. TB-a global emergency. WHO report on the TB endemics. Geneva.WHO.2013; 8-14.
3. North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:599-623.
4. Secretaria Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud, Dirección General de Epidemiología. Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México. Secretaria de Salud. México. 2012
5. Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de defunciones 1979-2009: Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). [México]: Secretaría de Salud. 2009, [accesado 26 Julio 2014]. Disponible en: <http://www.sinais.salud.gob.mx>
6. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, INEGI. Censo de Población y Vivienda. 2010. [accesado 26 Julio 2014]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx>
7. Dirección General de Epidemiología. “Tuberculosis” Panomarama Epidemiológico 2000-2010.Secretaria de Salud. México. 2011; Vol. 8 (10); 1-8
8. Rangel M.J., Estrada García, I, García, H.M.L., Aguilar, L.D., Márquez, V.R. Hernández Pando, R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 2002; 106: 257-66
9. Chapnick DA, Warner L, Bernet J, Rao T, Liu X: Partners in Crime: TGF-beta and MAPK pathways in cancer progression. *Cell Biosci.* 2011; 1: 42.
- 10.Zink A, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, Nerlich AG. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 359-367.
- 11.Rosemberg J. Tuberculose. Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Bol Pneumologia Sanitária.* 1999; 7: 5-29.
- 12.Fuentes Castillo C, Blanco Cancelo JL. Los postulados de Koch: Revisión histórica y perspectiva actual. *RCCV.* 2007; Vol 1(2): 262.

13. Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Núñez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol* 2007; 179: 2509-19.
14. Jiao X, Lo-Man R, Guernonprez P, Fiette L, Deriaud E, Burgaud S, et al. Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol* 2002; 168: 1294-1301.
15. Kinshikar AG, Verma I, Chandra D, Singh KK, Weldingh K, Andersen P, et. al. Potential role for ESAT6 in dissemination of *M. tuberculosis* via human lung epithelial cells. *Mol Microbiol*. 2010; 75(1):92-106.
16. Mehta P, Karls R, White E, Ades E, Quinn F. Entry and intracellular replication of *Mycobacterium tuberculosis* in cultured human microvascular endothelial cells *Microbial Pathogenesis*. 2006; 41(2):119-24.
17. Kaufmann SH. Immune response to tuberculosis: experimental animal models. *Tuberculosis*. 2003; 83(3):107-11.
18. Herrera León L, Pozuelo Díaz R, Molina Romero T, Azucena Valverde Cobacho, Pilar Saiz Vega y María Soledad Jiménez Pajares. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(9):496–502.
19. Lehmann, K.B., y Neumann, R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 1 ed. 1896.
20. Shinnick, T.M., y Good, R.C. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13: 884-901
21. Levy-Frebault, V.V, Portaels, F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol*. 1992; 42: 315-323
22. Gorocica P, Jiménez Martínez MC, Garfias Yonatan, Sada I, Lascurains R. Componentes glicosilados de la envoltura de Mtb que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Res Mex*. 2005; Vol. 18 (2): 142-153.
23. AF Cunningham and C. L. Spreadbury, Mycobacterial Stationary Phase Induced by Low Oxygen Tension: Cell Wall Thickening and Localization of the 16 Kilodalton Crystallin Homolog. *Microbiology*. 1998; Vol. 180 (4): 801–8.

24. Manual of Microbiological Methods, Committee on Bacterial Technic Society of American Bacteriologists. New York. 1957.
25. E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr, H. J. Shadomy. Manual of clinical microbiology. 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1985
26. Isenberg H. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992; , Vol. 1.
27. Schlesinger LS, Hull SR, Kaufman TM. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol* 1994; 152: 4070-79.
28. Ortalo-Magne, A. and M. Daffe. The outermost capsular arabinomannans and other mannoconjugates of virulent and avirulent tubercle bacilli. *Microbiology*. 1996; 142: 927-35.
29. Warwick JB, Paul W, Winter N. Mechanisms of persistence of mycobacteria. *Trends Microbiol* 1994; 2: 284-88.
30. Brennan PJ. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev Infect Dis* 1989; 11 Suppl 2: 420-30.
31. Steck PA, Schwartz MS, Rosendhal G, Gray R. Mycolic acids: a reinvestigation. *J Biol Chem* 1978; 253: 5625-40.
32. Rastogi, N. and C. Sola The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech* 2001; 20(1): 21-54.
33. Draper P. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci* 1998; 3: 1253-61.
34. E. C. Hett and E. J. Rubin. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*. 2008; 72 (1): 126–56.
35. Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiol* 2001; 11: 107-118.
36. Kremer, L., S. Gurcha, et al. Temperature-induced changes in the cell-wall components of *Mycobacterium thermoresistibile*. *Microbiology*. 2002; 148: 3145-54.
37. G. S. Besra, C. B. Morehouse, C. M. Rittner, C. J. Waechter, and P. J. Brennan. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* 1997; 272 (29): 18460–66.

38. M. Daffé, and J.-M. Reyrat. The Global Architecture of the Mycobacterial Cell Envelope in *The Mycobacterial Cell Envelope*. ASM Press. Washington, DC, 2008; 3–23.
39. M. Daffé and G. Etienne. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuberc Lung Dis. Off. J. Int. Union against Tuberc. Lung Dis.* 1999; 79 (3): 153–69.
40. Bersa GS, Chatterjee D. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. En Bloom BR, editor. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Washington DC. American Society for Microbiology; 1994; 285-306.
41. Goodfellow M. *Taxonomy of Mycobacteria*. New York, ITP International Thompson Publishing. 1998.
42. Wayne, L. and G. Kubica. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. 1986.
43. Cubero de Frutos N. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en estado de latencia en muestras clínicas. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. 2009; 31-2.
44. Koneman, E., S. Allen, et al. *Diagnóstico Microbiológico*. Washington. 1999.
45. Forbes A.B. *Diagnóstico microbiológico*. 12ed. Medica Panamericana. 2007; 492-493
46. Collins HL, Kaufmann SH. The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology* 2001; 103: 1-9.
47. Knechel NA. Tuberculosis: Pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Crit Care Nurse* 2009; 29: 34-43.
48. Arias J, Aller M.A, Arias J.I, Lorente L. *Fisiopatología Quirúrgica: Traumatismos, Infecciones, Tumores*. Madrid: Tébar. 1999; 297.
49. Hernández Pando R, Barrios-Payán J. Tuberculosis latente. El enigma de en qué células de nuestro organismo se esconde la bacteria que más muertes ha producido en la historia de la humanidad. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 2013; Vol. 56 (6): 59-61.
50. Van Cravel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15 (2): 294-309.
51. Secretaria de salud. *Guía práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento de casos nuevos de tuberculosis pulmonar*: 2009; 15-20.

52. Ramos G, Lado L, Bastida P., Barrón O. Tratamiento actual de la tuberculosis; anales de medicina interna; 2003; 20 (2):91-100.
53. Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998; 393: 537-544.
54. Méndez MV. La tuberculosis Pulmonar: Pasado, Presente y Futuro en Venezuela. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Salus. 2011; Vol. 15 (3): 37,38.
55. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Manual para el Laboratorio Bacteriológico de la tuberculosis Normas y Guía Técnica. Parte I. 2008.
56. Secretaría de Salud. Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México. Programa Nacional de Tuberculosis. México. 2009; 43: 69-73,80.
57. WHO. Treatment of tuberculosis. Guidelines. Fourth Edition, Geneva, 2010: 82-92.
58. Hernández C, Gómez M. Técnicas bacteriológicas para el diagnóstico el identificación de *Mycobacterium tuberculosis*. Act. Cient Venezolana 2001; 52: 23-25.
59. Secretaría de Salud. Guía práctica para la atención de la Tuberculosis en niños, niñas y adolescentes. Programa Nacional de Tuberculosis. México. 2011; 46-48.
60. Hernández Pando R, Orozco H., Honour J, Silvia P, Rook GAW. Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis a clue to pathogenesis? FEMS Microbiology Immunology. 1995; 12: 63-72.
61. McCartney-Francis N, Mizel D, Wong L, Whal L, Whal S. TGF-B regulates production of growth factors and TGF-B by human peripheral blood monocytes. Growth Factors 1990; 4: 27-35.
62. Wahl SM. Transforming growth factor beta in inflammation: a cause and a cure. J Clin Immunol 1992; 12: 61-68.
63. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune response by TGF-B. Annu Rev Immunol 1998; 16: 137-61.
64. Schmierer B., and C. S. Hill. TFGbeta-SMAD signal transduction: molecular spececificity and functional flexibility. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8: 970-982.
65. Chen RH, Ebner R, Derynck R. Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF-beta activities. Science. 1993; 260: 1335-133.

66. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 2000; 342(18): 1350-8.
67. Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V. Transforming growth factor beta-1: Structure, function, and regulation mechanisms in cancer. *Salud Publica Mex* 2001; 43: 340-351.
68. Munger, JS, JG Harpel, PE Gleizes, R Mazziere, I Nunes and DB Rifkin. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int*. 1997; 51(5): 1376-82.
69. Omer FM, Kurtzhals JAL., and Riley EM. } Maintaining the immunological balance in parasitic infections: A role for TGF- β ? *Parasitol*. 2000; 16: 18-23.
70. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14: 163-76.
71. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. 2003; 116: 217-24.
72. Wrana JL. y cols. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, 1994; 370: 341-7.
73. Wharton, K., y Derynck, R. TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development*. 2009; 136(22): 3691-7.
74. Blobel G, Schiemann W, Lodish H. Role of transforming growth factor B in human disease. *N Engl J Med* 2000; 4: 1350-1358.
75. Itoh S, P ten Dijke. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Current opinion in cell biology*. 2007; 19: 176-184.
76. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*. 1998; Dec 11; 95(6): 779-91.
77. Massague, J. and Wotton, D. Transcriptional Control by the TGF-beta/Smad Signaling System. *EMBO J*. 2000; 19: 1745-54.
78. Zhu H, Burgess A. Regulation of transforming growth factor B signaling. *Mol Cell Biol Res Community* 2001; 4: 321-330.
79. Caestecker M. The transforming growth factor-B superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 1-11.

80. Dijke Pt, Miyazono K, CH H. Signalling inputs converge on nuclear effectors in TGF- β signaling. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 64-70.
81. Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y. Y., Grinnell B. W., Richardson M. A., Topper J. N., Gimbrone M. A., Jr., Wrana J. L., & Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell*. 1997; 89: 1165-73.
82. Nakao A., Afrakhte M., Moren A., Nakayama T., Christian J. L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N. E., Heldin C. H., & ten D. P. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature*. 1997; 389: 631-35.
83. Derynck R y Zhang YE. Smad dependent and Smad- independent pathways in TGF-B family signaling. *Nature*. 2003; 425: 577-84
84. Moustakas A, Heldin CH: Non-Smad TGF- β signals. *J Cell Sci* 2005; 118: 3573-84.
85. Derynck R, Zhang YE: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*. 2003; 425: 577-84.
86. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res* 2009; 19:128-39.
87. Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza- Hernández GL, López-Casillas F. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-neutralizing agent. *Biochem J*. 2001; 355: 215–22
88. Esparza-López J, Montiel JL, Vilchis-Landeros MM, Okadome T, Miyazono K, López-Casillas F. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of transforming growth factor superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor- α and inhibin. *A J Biol Chem* 2001; 276: 14588-96.
89. Andres JL, Stanley K, Cheifetz S, Massagué J. Membrane anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J Cell Biol*. 1989; 109: 3137-45.
90. Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernández G, López-Casillas F. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor- β neutralizing agent. *Biochem J* 2001; 355: 215-22.
91. Goto TR, Herberman RB, Maluish A, Strong DM. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E induced suppression of human natural killer cell activity. *J Immunol* 1983; 130: 1350–5.

92. Snyder DS, Beller DI, Unanue ER. Prostaglandins modulate macrophage expression. *Nature*. 1982; 299: 163–5.
93. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th-1 lymphokines but not of Th-2 lymphokines. *J Immunol* 1991; 146: 108–13.
94. Wu CY, Wang K, McDyer JF, Seder RA. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol* 1998; 161: 2723–30.
95. Tineke CTM, van der Pouw K, Boeije LCM, Smeenk RJT, Wijdenes J, Aarden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995; 181:775–9.
96. Kuroda E, Sugaira T, Zeki K, Yoshida Y, Yamashita U. Sensitivity difference to the suppressive effect of prostaglandin E2 among mouse strains: a possible mechanism to polarize Th2 type response in BALB/c mice. *J Immunol* 2000; 164: 2386–95.
97. Schultz RM, Pavlidis NA, Stylos WA, Chirigos MA. Regulation of macrophage tumoricidal function: a role of prostaglandins of the E series. *Science* 1978; 202:320
98. Hernández-Pando R, Orozco EH, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd L, Madrid MW. Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; 89: 26-33.
99. Hernández Pando R, Orozco E, Aguilar L. D, López Casillas F, Rook: G. Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. *Mensaje Bioquímico* 2004; Vol. 28: 129-50.
100. Hernández-Pando R, Orozco EH, H Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 1997 ;90 (4): 607-617.
101. Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernández-Pando R, Kremer K, Roholl P, et. al Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitive responses after infection with different Mycobacterium tuberculosis genotypes in BALB/c mouse model. *Clin. Exp Immunol*. 2004; 137 (3): 460-468.
102. Infante E, Aguilar L D, Gicquel B, Hernández-Pando R. Immunogenicity and protective efficacy of the Mycobacterium Tuberculosis fadD26 mutant. *Clin. Exp Immunol* 2005; 141 (1): 21-28.

103. Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, De La Luz Garcia Hernandez M, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*. 2002; 106: 257–266.
104. C. Peres-Buzalaf, L. de Paula, F.G. Frantz, E.M. Soares, A.I. Medeiros, M. Peters-Golden², et al. Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2011; Vol. 85 (2): 75-81.
105. Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R. Immunitary response in tuberculosis and the role of Mycobacterium tuberculosis secretion antigens in its protection, pathology and diagnosis. *Invest Clin*. 2008; 49(3): 411-41.
106. Hernández-Pando R, Orozco EH, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd L, Madrid MW. Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; 89: 26-33.
107. Hernández-Pando R, Orozco EH, Arriaga AK, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 α , tumor necrosis factor α and transforming growth factor β during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997; 90: 607.
108. Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y. Y., Grinnell B. W., Richardson M. A., Topper J. N., Gimbrone M. A., Jr., Wrana J. L., & Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell*. 1997; 89: 1165-73.
109. Nakao A., Afrakhte M., Moren A., Nakayama T., Christian J. L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N. E., Heldin C. H., & ten D. P. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 1997; 389: 631-635.
110. Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M. G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D. H., Husain, M. & Letarte, M. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res*. 2005; 96: 684-92.

111. Feron, O, Saldana F, Michel J B, Michel T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J. Biol. Chem.* 1998; 3125-28.
112. Moreira AL, Tsenova-Berkova L, Wang J, Laochumroonvorapong P, Freeman S, Freedman GK. Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tuber Lung Dis.* 1997; 78: 47-55.
113. Fitzpatrick DR, Bielefeldt-Ohmann H. Transforming growth factor β in infectious disease: always there for the host and the pathogen. *Trends Microbiol.* 1999; 7: 232-36.
114. Waghabi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, Soeiro MNC, Mendonca-Lima L. *et al.* SB-431542 a transforming growth factor β inhibitor impairs *Tripanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasites cycle completion. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2905-10.
115. Hirsch C, Hussain R, Tosí Z, Dawood G, Shahid F, Ellner J. Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3193-98.
116. Artículo de Revisión. Avances en el estudio de los mecanismos moleculares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001; Vol.14 (1): 39-48.
117. Freire-de-Lima, C. G., D. O. Nascimento, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*. 2000; 403(6766): 199-203.
118. Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998; 101(4): 890-8.
119. Fong, C. Y., L. Pang, et al. TGF-beta1 stimulates IL-8 release, COX-2 expression, and PGE(2) release in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(1): 201-7.

ANEXO

- **Preparación de medio 7H9 con 0.5% de glicerol y tween 80 al 0.05%**

Pesar 4.7 g del polvo en 900 ml de agua bidestilada y en constante agitación adicionar 5ml de glicerol anhidro y 0.5 ml de tween 80. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 min a 15 libras de presión y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Posteriormente dentro de una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel III limpia y esterilizada durante 10 min con luz UV adicionar 100ml de ADC (albumina, catalasa y dextrosa Becton, Dickinson y Compañy, Sparks, MD), homogenizar y colocarlo en una incubadora a 37°C, con 5% de CO₂ durante tres días para prueba de esterilidad.

- **Plaqueado y preparación de medio 7H10 con glicerol al 0.5%**

Pesar 19 g de polvo en 900 ml de agua bidestilada y en constante agitación adicionar 5 ml de glicerol anhidro. Calentar hasta que hierva durante un minuto (o cambio de vire en el medio). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 min a 15 libras de presión y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 15 min.

Posteriormente dentro de una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel III limpia y esterilizada durante 10 min con luz UV adicionar 100ml de OADC (ácido oleico, albumina, catalasa y dextrosa Becton, Dickinson y Compañy, Sparks, MD), homogenizar y adicionar en caliente 15 ml del medio en cajas Petri estériles desechables de 100X15mm, envolver en paquetes de 10 cajas en bolsas de plástico e incubar todas las cajas (alrededor de 66 cajas) a 37°C, con 5% de CO₂ durante tres días para prueba de esterilidad.

- **Preparación PBS-TWEEN 80 al 0.05%**

Disolver en 800 ml de agua bidestilada:

0.2g de KCl

0.12G de $K_2 HPO_4$

8g de NaCl

1.13 g de Na_2HPO_4

Ajustar a Ph de 7.4 con HCl, completar a 1 L con agua bidestilada y adicionar 0.5 mL de Tween 80. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 min a 15 libras de presión y dejar enfriar a temperatura ambiente.

- **Preparación de 1000 dosis de Ácido Niflúmico concentración 500µg/100µL**

Pesar 0.5 g de Ácido Niflúmico (AN) y transferirlo en un vaso de precipitados de 100 mL. Posteriormente adicionar 40 m L de agua inyectable estéril y colocar en agitación constante, agregar solución de NaOH(c) hasta solubilización del AN (pH=12.4). Enseguida adicionar solución de HCl(c) hasta que el AN comience a insolubilizarse y adicionar de 10 a 20 mL de agua estéril (leer pH). Finalmente repetir el paso anterior cuantas veces sea posible (Nota: el pH debe ir disminuyendo) ajustando a un pH= 7.4 y aforando a 100 mL. Guardar a -4 °C en un frasco ambar lejos de la luz.

- **Preparación de 33 dosis de betaglicano recombinante concentración 30µg/100µL**

Hidratar 1 mg de betaglicano recombinante en 3.3 m L de agua inyectable estéril.

○ **Imágenes**

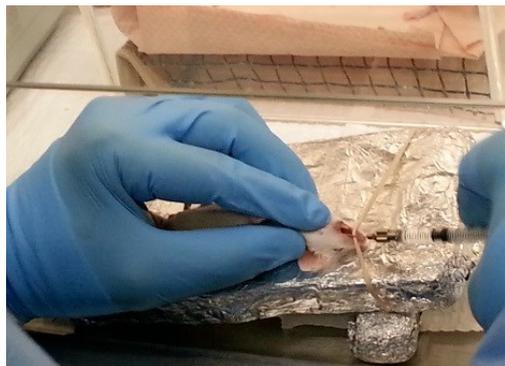


Fig. 6 Infección intratraqueal



Fig. 7 Pool de animales infectados

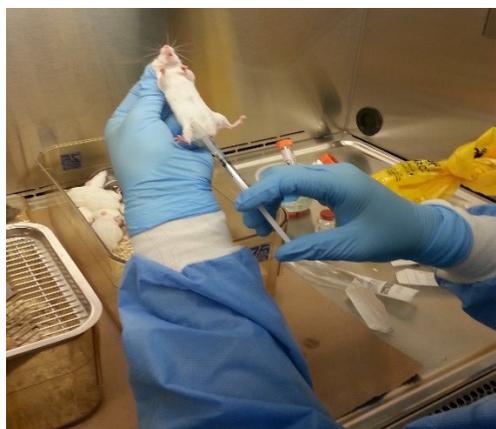


Fig. 8 Administración vía intraperitoneal

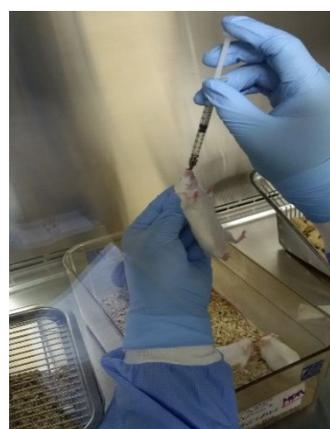


Fig. 9 Administración vía intragástrica