



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

---

## EFECTO DE LAS AMIDAS DERIVADAS DEL ÁCIDO RICINOLÉICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

**OMAR MORALES BARRIENTOS**

DIRECTORA: Dra. Silvia Guzmán Beltrán

ASESOR: M. en C. Manuel López Ortíz



Ciudad de México, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

---

## AGRADECIMIENTOS



Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, por la oportunidad de desarrollar este proyecto dentro de sus instalaciones, así como el acceso a sus recursos.



Al laboratorio L-9 planta alta de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza por su generosa aportación de las amidas evaluadas en este trabajo.

---

---

Al M. en C. Ivan Monsalvo, por su dedicación en el aula, por notar cualidades en mí que ni yo mismo sabía que poseía, por su intervención en mi desarrollo profesional que impulsó en mí el planteamiento de nuevas metas.

A la Dra. Silvia Guzmán, por su infinita paciencia y dedicación en la resolución de las interrogantes que surgían en mí en el día a día, por compartir sus conocimientos y por alentarme a vencer algunos temores, además de aceptarme como tesista aún sin saber mucho sobre mí.

Al Dr. Ignacio Regla, a los maestros Manuel López y Taide Arista y al QFB Oscar González, cuyas observaciones ayudaron a enriquecer este trabajo.

---

## DEDICATORIAS

A mi mamá, por apoyarme incondicionalmente en todas mis decisiones, por todo su esfuerzo en hacer de mí una persona productiva para la sociedad, por enseñarme a amar, a perdonar, a luchar por lo que quiero y hacerme ver que, sin importar cuantas veces tropiece, siempre podré levantarme y seguir adelante.

A mi papá, por ser el mejor y más grande ejemplo de perseverancia que la vida pudo haberme otorgado, sin todos sus esfuerzos y sacrificios sencillamente no habría logrado llegar hasta aquí, y que por ello se ha convertido en un modelo a seguir. Este logro también es de ustedes.

A mis hermanos, que con su sentido del humor me han regalado tantas risas, por su amor, por su apoyo, por su confianza en mí, por sus esfuerzos en hacerme ver que existe algo más en la vida a parte de las actividades académicas, por ustedes daría la vida.

A mi tía Roxana, aunque ya no se encuentra físicamente con nosotros, su confianza en mí siempre fue como una fuerte voz en mi cabeza que me motivó a seguir adelante, esto también fue por ti, porque también quería que te enorgullecieras de mí.

A mis amigos Lizbeth, Ivan y Carolina, no tengo palabras para describir lo importante que son ustedes para mí, siempre han tenido las palabras exactas para hablar conmigo, aunque no siempre sean las que quisiera escuchar, gracias por estar ahí en mis momentos de drama. Sé que sin importar las circunstancias que nos presente la vida, el lazo que me une a ustedes jamás se romperá.

Gracias a todas aquellas personas que se cruzaron en mi camino y aunque no permanecieron en él por mucho tiempo, me enseñaron mucho, a todos ustedes...

**¡GRACIAS!**

---

## ABREVIATURAS

<b>ADAR</b>	Amidas derivadas del ácido ricinoléico
<b>ADC</b>	Albúmina bovina, dextrosa, catalasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATCC</b>	Colección de cultivo americana
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BCG</b>	Bacilo de Calmette-Guérin
<b>CENAPRECE</b>	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CMTB</b>	Complejo Mycobacterium tuberculosis
<b>DBH</b>	(1S,4S)-diazabiciclo-[2.2.1]heptano
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal 50
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>EEUU</b>	Estados Unidos
<b>FIC</b>	Concentración inhibitoria fraccionada
<b>GalN</b>	Galactosamina acetilada
<b>LAM</b>	Lipoarabinomanano
<b>MTT</b>	Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dinefilitetrazolio)
<b>NAG</b>	N-acetil glucosamina
<b>NAM</b>	N-acetil murámico
<b>OADC</b>	Ácido oleico, albúmina bovina, dextrosa, catalasa

---

<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBS</b>	Solución buffer de fosfatos
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristato-13-acetato
<b>RIF</b>	Rifampicina
<b>RPMI</b>	Instituto Memorial Roswell Park
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>TAES</b>	Tratamiento acortado estrictamente supervisado
<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>TB-MDR</b>	Tuberculosis multidrogoresistente
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana

---

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. ANTECEDENTES .....	11
2.1 Tuberculosis .....	11
2.2 Situación actual de la Tuberculosis.....	12
2.3 Etiología de la tuberculosis pulmonar .....	15
2.4 Agente etiológico de la TB .....	16
2.4.1 Condiciones de crecimiento .....	17
2.5 Tratamiento.....	18
2.5.1 Tratamiento de Primera línea.....	19
2.5.2 Tratamiento de Segunda línea.....	21
2.6 Nuevas Alternativas.....	23
2.7 Aceite de Ricino.....	23
2.8 Ácido ricinoléico y sus derivados.....	24
2.9 Amidas.....	25
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVOS .....	31
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	33
6.1 Diseño experimental .....	34
6.2 Amidas derivadas del ácido ricinoléico.....	34
6.3 <i>M. tuberculosis</i> y medios de cultivo. ....	34
6.4 Determinación de la actividad antimicobacteriana .....	35
6.5 Cuantificación del crecimiento bacteriano por la resazurina .....	35
6.6 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	36
6.7 Efecto sinérgico de las ricinoleilamidas sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> . ....	36
6.8 Condiciones de cultivo y diferenciación de la línea celular THP-1 .....	37
6.9 Efecto tóxico de las amidas sobre la viabilidad de los macrófagos derivados de THP-1.....	39
6.10 Cuantificación de la viabilidad celular por MTT .....	39



---

6.11 Determinación del efecto de las ADAR sobre la viabilidad de las células infectadas con <i>M. tuberculosis</i> .....	40
6.12 Efecto de la ADAR H sobre el crecimiento intracelular de <i>M. tuberculosis</i> .....	40
6.13 Tinción de inmunofluorescencia LC3 para detección de autofagia .....	41
6.14 Análisis estadístico .....	41
7. RESULTADOS .....	42
7.1 Efecto bactericida de las ADB sobre <i>M. tuberculosis</i> H37 Ra.....	43
7.2 Efecto sinérgico de las ADAR sobre el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i> .....	44
7.3 Efecto de las amidas con actividad bactericida sobre la viabilidad de los macrófagos derivados de THP-1 .....	45
7.4 Dosis letal 50 de las ADAR con actividad micobactericida .....	46
7.5 Efecto de la ADAR H sobre la formación de autofagosomas .....	47
7.6 Efecto de la ADAR H en la viabilidad de células infectadas por <i>M. tuberculosis</i> y el crecimiento intracelular bacteriano. ....	48
8. DISCUSIÓN.....	50
8.1 Efecto inhibitorio de las ADAR sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>M. tuberculosis</i> .....	51
8.2 Efecto sinérgico de las ADAR que presentan actividad contra <i>M. tuberculosis</i> .....	51
8.3 Toxicidad de las ADAR en macrófagos derivados de THP-1.....	52
9. CONCLUSIONES .....	54
10. PERSPECTIVAS .....	56
11. REFERENCIAS.....	58
12. ANEXOS .....	67
ANEXO 1.Composición de medios de cultivo para <i>M. tuberculosis</i> . ....	68
ANEXO 2. Preparación de las soluciones .....	70
ANEXO 3. Composición de medio THP-1 .....	72
Anexo 4. Estructura de los compuestos evaluados .....	73

---

# 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa catalogada como un problema de salud pública a nivel mundial, ya que un tercio de la población está infectada. Se calcula que cada año mueren 1.8 millones de personas por esta enfermedad debido a su asociación con otras enfermedades como VIH/SIDA y diabetes,

---

aunado a la aparición constante de casos de fármaco resistencia, hace necesario ampliar el espectro de fármacos para el tratamiento de dicha enfermedad.

Las plantas nos proporcionan una fuente de diversos compuestos con actividad biológica, mismas que suministran un acervo de moléculas con potencial farmacológico, siendo los compuestos en su forma nativa, o modificados químicamente.

El objetivo principal de ese trabajo fue evaluar el efecto bactericida de amidas derivadas del ácido ricinoléico (ADAR) sobre el crecimiento *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis*, así como en el contexto de infección en una línea celular humana.

---

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Tuberculosis

El término tuberculosis fue acuñado por el médico y profesor alemán Johann L. Schönléin, proviene del latín *tuberculum*, que significa “protuberancia pequeña” y del sufijo griego –osis que denota enfermedad. El agente causal de la tuberculosis

---

es *M. tuberculosis*, ésta es una bacteria BAAR positiva que fue descrita por primera vez en 1882 por el médico alemán Robert Koch (1).

La TB es una enfermedad que no sólo afecta al humano sino también a diferentes especies de mamíferos como: roedores, ganado bovino, porcino, caprino, tejones, venados, elefantes, leones y algunos mamíferos marinos (2, 3). Esta enfermedad es causada por varias cepas de *Mycobacterium* llamado Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), denominado así por poseer el 95.5 % de identidad en su genoma. Este grupo está conformado por ocho especies: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. caprae*, *M. microti*, y *M. pinnipedi* (4).

A pesar de que la TB es una enfermedad predominantemente pulmonar, puede afectar también al sistema nervioso central, linfático, circulatorio, aparato digestivo, huesos, articulaciones e incluso la piel (5).

## **2.2 Situación actual de la Tuberculosis**

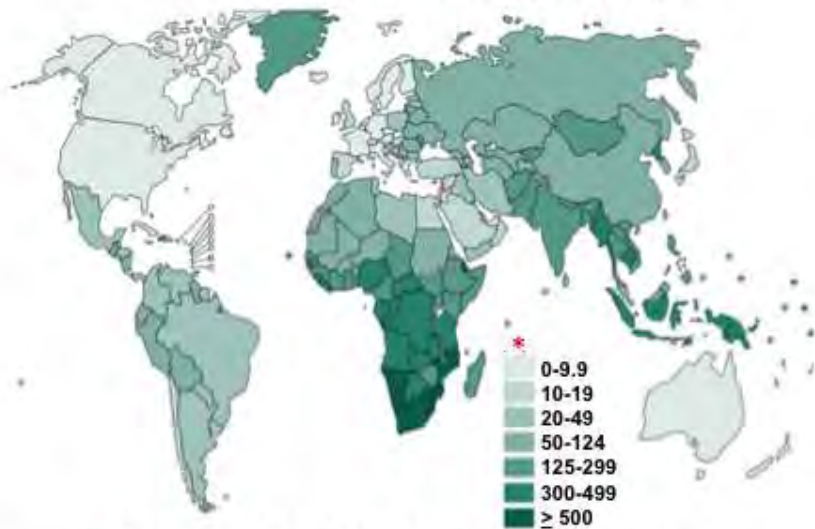
De acuerdo con datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), un tercio de la población mundial se encuentra infectada por *M. tuberculosis* y de estas personas una de cada 10 desarrollará TB activa en algún momento de su vida. En el año 2015 hubo 10.4 millones de casos nuevos; de los cuales murieron 1.8 millones, por esto, la TB es la segunda causa de muerte por infecciones en el mundo (6).

---

En 2015, la OMS, asoció a la TB con la pobreza, por lo que la mayoría de casos se encuentran en Asia (59 %) y África (26 %), mientras que en el Mediterráneo, Europa y América solo se registraron el 7 %, 5 % y 3 %, respectivamente (ver figura 1). A continuación se muestra la incidencia y la mortalidad de la TB a nivel mundial (OMS).

---

## INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS



\*Casos estimados por cada 100 mil habitantes

## MORTALIDAD POR TUBERCULOSIS



\*Casos estimados por cada 100 mil habitantes

Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad de tuberculosis, tomado de la OMS, 2014

En México, el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE), reportó en 2013 19,703 casos nuevos de TB, de los cuales, el 81.6% fue pulmonar, el 1.4% fue meníngea y el 17% de otras formas como ganglionar, en riñones, huesos, intestinos y genitales.

---

Es importante señalar que los casos de TB pulmonar (15,384) en nuestro país se han asociado con diversas patologías. El 22 % con pacientes diabéticos, el 13.7 % con desnutrición, el 6 % con alcoholismo y el 4.1 % con VIH/SIDA. Se sabe que los individuos que padecen estas enfermedades se encuentran inmunocomprometidos, por ello, la TB activa se desarrolla rápidamente (7).

### **2.3 Etiología de la tuberculosis pulmonar**

La TB se caracteriza por la presencia de “granulomas” en los pulmones. Se transmite de una persona a otra por vía aérea, debido al contacto con las gotitas de *Pflüge* provenientes de la tos o estornudo de pacientes con enfermedad pulmonar activa. Estas gotitas tienen de 1 a 3 bacilos y pueden permanecer suspendidas en el aire varias horas. Cuando una persona inmunocomprometida inhala estas partículas, éstas llegan hasta los alvéolos y comienza la infección.

En el 90 % de los casos, la infección se limita al sitio primario de invasión, ya que infecta a individuos inmuno-competentes, mientras que el 10 % restante manifiestan la enfermedad activa ya que la replicación bacilar es continua. Los síntomas clínicos de la TB son dolor de pecho, escalofríos, astenia, síndrome pseudogripal, pérdida de apetito, disminución de peso, fiebre, sudoración nocturna, eritema nodoso, necrosis de tejidos, tos con sangre de larga evolución de aproximadamente más de tres semanas y hemoptisis (8, 9).



---

## 2.4 Agente etiológico de la TB

*Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo curvo, no esporulado, inmóvil, mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud, con una envoltura celular constituida por: cápsula, pared celular y membrana plasmática (Figura 2). La complejidad de su envoltura le confiere la capacidad de ser ácido alcohol resistente (10).



Figura 2. *Mycobacterium tuberculosis*. Fotografía tomada del Centro de control y prevención de enfermedades de Salud pública de los EU., 2016.(11)

La cápsula es la parte exterior de la envoltura, formada de polisacáridos unidos a lípidos y proteínas. Esta capa funciona de barrera que protege contra factores externos como: desecación, frío y congelación, de hecho es esta parte la más antigénica de la bacteria(12).

La pared celular está compuesta por tres diferentes moléculas como: peptidoglicanos, arabinogalactanos y ácidos micólicos. De hecho, la pared celular es el blanco común de los fármacos antituberculosos. Los peptidoglicanos son polímeros formados de N-acetil glucosamina (NAM) y N-acetil murámico glicosilado (NAG). Cada polímero se une por puentes intra-peptídicos poco comunes con uniones 3-3 (80 %) y 4-3 (20 %). La capa de arabino-galactanos

está fuertemente unida a los peptidoglicanos. Los arabinogalactanos están formados por moléculas de galactano, que es un disacárido unido a los arabinanos. Este polímero de arabinosa, puede estar o no modificada por la unión a un grupo succinil o una galactosamina acetilada (GalN). Los arabinanos están unidos a la capa de ácidos micólicos, formados de dos ácidos grasos: uno saturado de cadena corta, C<sub>20</sub>-C<sub>26</sub>; y otro largo e insaturado de C<sub>60</sub>-C<sub>90</sub> (10). En la figura 3 se muestra un esquema de la envoltura celular de *M. tuberculosis*.

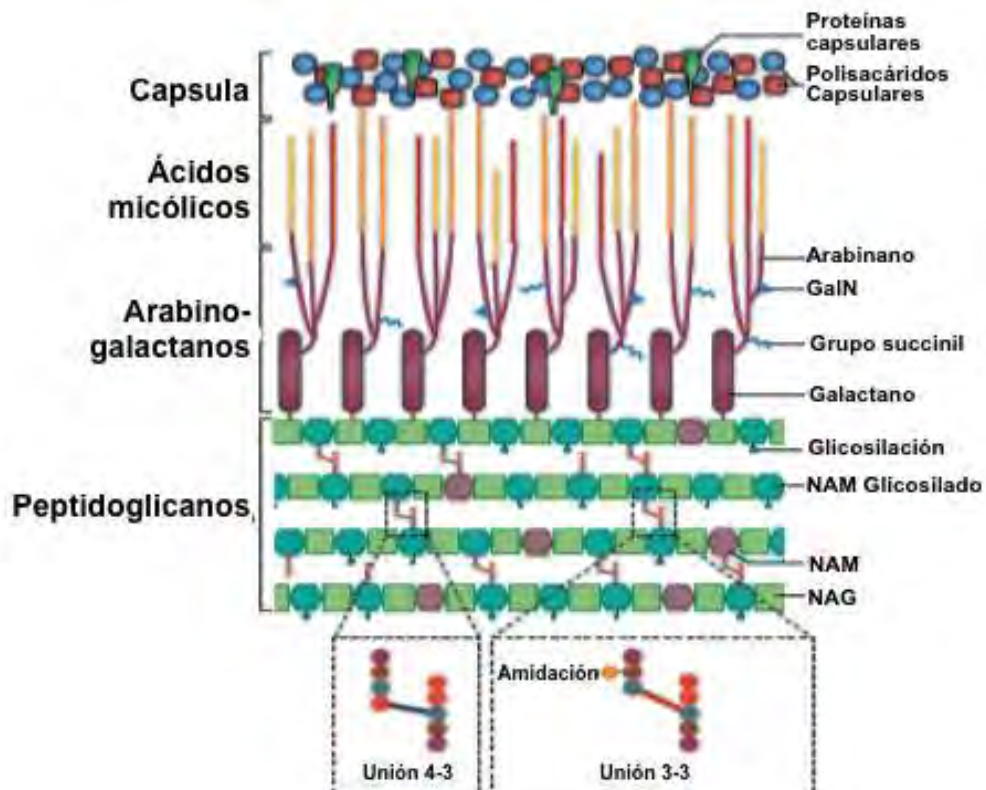


Figura 3. Envoltura celular de *M. tuberculosis*, tomada de Kieser, 2014(10).

#### 2.4.1 Condiciones de crecimiento

*M. tuberculosis* es un parásito intracelular, aerobio, microaerófilo e incluso se ha descrito que puede sobrevivir en condiciones de anaerobiosis (13). Es mesófilo, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque puede crecer en un rango

---

de temperatura entre 30 a 42 °C. Crecen en rangos amplios de pH (3.5 a 7.5), aunque el óptimo es de 5.5 (14). Su tiempo de duplicación en medio de cultivo y en modelos animales es aproximadamente de 24 horas. El crecimiento lento de esta bacteria y su capacidad de permanecer latente contribuyen a la naturaleza crónica de la enfermedad (15).

*M. tuberculosis* forma agregados celulares compactos debido a la naturaleza hidrofóbica de su pared celular. Cuando se cultiva en medio sólido, las colonias son grandes, compactas, secas, granulares, amorfas, convexas, elevadas, con bordes irregulares y de color amarillento (16). En la figura 4 se muestran las características de colonias crecidas en medio 7H10.

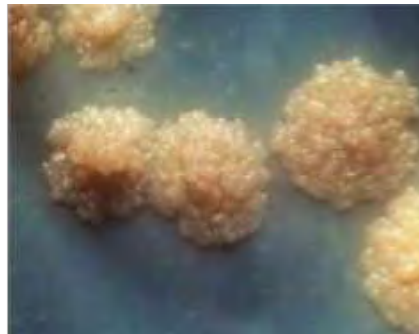


Figura 4. Características coloniales de *M. tuberculosis*.

## 2.5 Tratamiento

El tratamiento actual contra la TB fue establecido en la década de 1960 y se administra en un intervalo de 6 a 9 meses. Este tratamiento tiene dos objetivos principales: matar a los bacilos metabólicamente activos y destruir a los que se encuentran latentes (17, 18). En la década de los 90's, la OMS introdujo la estrategia del tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES)(6) .El éxito

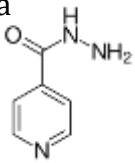
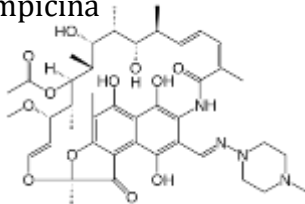
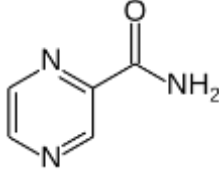
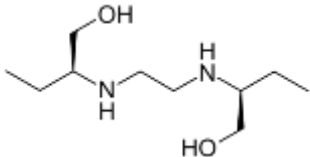
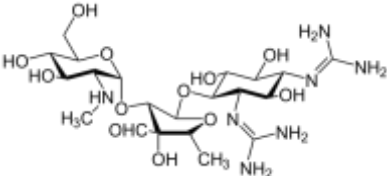
---

del TAES se establece con base en los pacientes curados o que completaron su tratamiento. En México, durante el año 2010 se reportó una tasa de éxito del 82.3% para el tratamiento primario de TB. La mayoría de los casos no exitosos se deben al abandono del tratamiento (6, 7).

### **2.5.1 Tratamiento de Primera línea**

Un tratamiento típico para TB no resistente comprende la administración de isoniazida, pirazinamida, etambutol y rifampicina durante dos meses, seguido por cuatro meses de rifampicina e isoniazida (19). En el cuadro 1 se muestran los mecanismos de acción y los diversos efectos secundarios de los antibióticos antes mencionados.

**Cuadro 1.** Antibióticos de primera línea utilizados para el tratamiento de la TB

Nombre y fórmula	Mecanismo de acción	Efectos secundarios
<p>Isoniazida</p> 	<p>Activada por la enzima catalasa peroxidasa. Inhibe la síntesis de ácidos micólicos.</p>	<p>Insomnio, inquietud, deficiencia de vitamina B6, daño hepático, polineuritis periférica.</p>
<p>Rifampicina</p> 	<p>Evita la transcripción, ya que se une a la subunidad β de la RNA polimerasa</p>	<p>Trastornos dermatológicos, hepáticos, hematológicos, ginecológicos, inmunológicos y gastrointestinales</p>
<p>Pirazinamida</p> 	<p>Activada por las pirazinamidasa. Inactiva enzimas vitales al disminuir el pH.</p>	<p>Hepatotoxicidad, artralgia, fotosensibilización de la piel, hiperuricemia y trastornos gastrointestinales.</p>
<p>Etambutol</p> 	<p>Inhibe la síntesis de arabinogalactano, lipoarabinomanano (LAM) y arabinosiltransferasa (pared celular).</p>	<p>Neuritis óptica y periférica, dolor general, trastornos gastrointestinales y dermatológicos.</p>
<p>Estreptomomicina</p> 	<p>Inhibe síntesis de proteínas, se une a subunidad 30s del ribosoma.</p>	<p>Ototoxicidad, insuficiencia renal, bloqueo unión neuromuscular, reacciones cutáneas.</p>

---

La administración prolongada de los antibióticos de primera línea genera múltiples efectos secundarios, lo cual propicia que el paciente interrumpa el tratamiento. Generalmente en estos casos se favorece la selección de cepas resistentes a isoniazida y rifampicina, llamadas cepas multidrogo-resistentes [TB-MDR] (20). Los casos de TB-MDR han aumentado en los últimos años, en la figura 5 se muestran los casos de resistencia a nivel mundial (6).

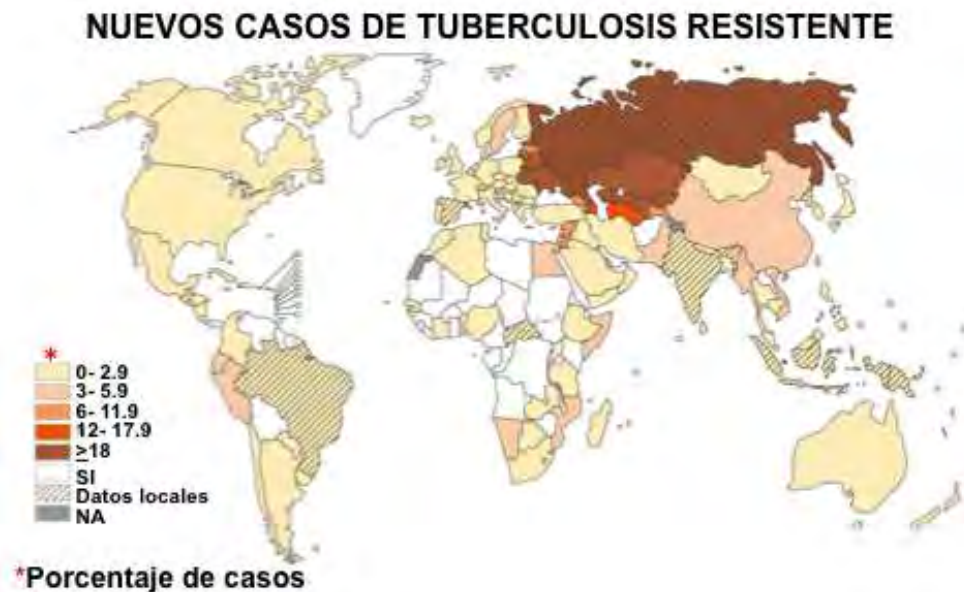


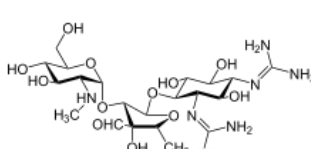
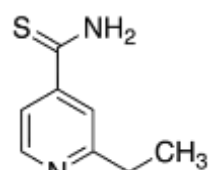
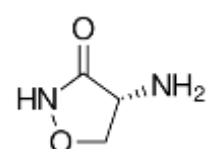
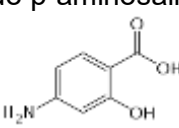
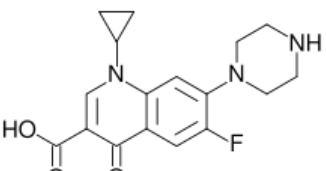
Figura. 5. Porcentaje de nuevos casos de tuberculosis resistente en el mundo, tomada de la OMS, 2016

### 2.5.2 Tratamiento de Segunda línea.

El tratamiento de TB-MDR tiene una duración de 18-24 meses y consiste en una combinación de fármacos de primera línea a los que la bacteria siga siendo susceptible (estreptomicina, pirazinamida y etambutol), conjuntamente con fármacos de segunda línea como: aminoglucósidos (kanamicina, capreomicina,

amikacina), etionamida, cicloserina, fluoroquinolonas (levofloxacino, ciprofloxacino) y ácido p-amino-salicílico (21). En el cuadro 2 se muestran los mecanismos de acción y los diversos efectos secundarios de estos fármacos.

**Cuadro 2.** Antibióticos de segunda línea utilizados para el tratamiento de la TB

Nombre y fórmula	Mecanismo de acción	Efectos secundarios
<p>Aminoglucósidos</p> 	Inhibe la síntesis proteica	Ototoxicidad, nefrotoxicidad, hipersensibilidad cutánea, hipopotasemia, hipocalcemia, hipomagnesemia.
<p>Etionamida</p> 	Inhibe síntesis de ácidos micólicos	Hepatitis, neurotoxicidad, reacciones cutáneas, neuropatía periférica, hipoglucemia, hipotiroidismo y desorden gastrointestinal.
<p>Cicloserina</p> 	Inhibe la síntesis de D-alanil-D-alanina (pared celular). Bacteriostática	Hepatitis, hipersensibilidad, anemia megaloblástica, alteraciones del Sistema Nervioso Central y psicóticas.
<p>Ácido p-aminosalicílico</p> 	Antifólico. Bacteriostático.	Hepatitis, malestar gastrointestinal, efecto antitiroideo, hipersensibilidad e hipopotasemia.
<p>Fluoroquinolonas</p> 	Evitan la síntesis de DNA inhibiendo la enzima girasa.	Malestar gastrointestinal, alteraciones del Sistema Nervioso Central, hipersensibilidad, fotosensibilidad.

---

## **2.6 Nuevas Alternativas**

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

Dentro de los nuevos fármacos utilizados está por ejemplo; la bedaquilina que se une selectivamente al dominio transmembranal de la ATP-sintetasa, interfiriendo en la conversión de ADP a ATP (22). Otro compuesto es el delamanid que inhibe la síntesis de ácidos micólicos (23).

Los productos naturales son los más ampliamente explotados en la industria farmacéutica ya que son una fuente valiosa de compuestos bioactivos. La gran biodiversidad de plantas siguen siendo una de las fuentes principales de productos naturales debido a un abundante contenido de metabolitos y vías comunes que pueden ser fácilmente manipuladas (24).

## **2.7 Aceite de Ricino**

El aceite de ricino se obtiene de las semillas de la planta *Ricinus communis*, representa aproximadamente entre el 40 al 50 % del peso total. Mientras que del 70 al 75% son ésteres de ácido ricinoléico en forma de triglicéridos. A diferencia de las propias semillas, no es tóxico, por ello su uso en humanos se ha extendido en dosis muy altas entre 10-15 g en bolo (25).

El aceite de ricino ha sido empleado desde hace cientos de años en la medicina tradicional mexicana por sus efectos benéficos, en el tratamiento de fiebre, como analgésico, como anti-inflamatorio, inductor del parto, dolor estomacal, diarrea,



---

estreñimiento y para tratar problemas respiratorios como: gripe, anginas y dolor pulmonar, entre muchas otras (26).

También se ha demostrado que el aceite de ricino tiene potencial bactericida contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis* y *Neisseria gonorrhoeae*. Las propiedades de este aceite se le han atribuido al ácido ricinoléico (27).

## **2.8 Ácido ricinoléico y sus derivados**

A partir del ácido ricinoléico se han preparado ésteres, amidas, aziridinas, derivados glicosilados, poliésteres, poliuretanos, lipoaminoácidos conjugados lipofenólicos. Estos presentan un amplio campo de aplicación, algunos de estos compuestos han mostrado actividad como antifúngicos, antiinflamatorios, analgésicos, antibióticos y algunos otros poseen potencial anticancerígeno (26, 28-31).

En 2010, Montes D'Oca y col., demostraron la actividad bactericida de algunas amidas derivadas de ácidos grasos. Algunas amidas lineales y cíclicas derivadas del ácido ricinoléico tuvieron efecto contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina e isoniazida observando que la ricinoleilpirrolidilamida (figura 6) presenta actividad mínima inhibitoria (CMI) entre 12.5 y 6.25 µg/mL frente a cepas resistentes (32).

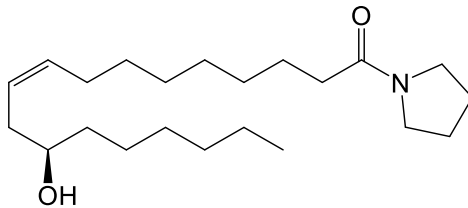


Figura 6. Estructura de la ricinoleilpirrolidilamida

Por otro lado, Rodrigues, M. O. y col. prepararon compuestos a partir de la unión de la isoniazida con diferentes ácidos grasos. Estos compuestos fueron evaluados frente a 4 cepas de *M. tuberculosis* (una sensible a rifampicina e isoniazida, dos cepas resistentes a isoniazida y una cepa resistente a rifampicina), observando que la adición de una cadena alifática mediante un enlace amida, aumenta la lipofilidad de la isoniazida, favoreciendo la entrada a la célula y disminuyendo la CMI (33).

## 2.9 Amidas

Las amidas son una familia de compuestos derivados de los ácidos carboxílicos, su estructura (figura 7a) le confiere poca reactividad en comparación con otros derivados de acilo. La estabilidad que poseen dichos compuestos permite que sean abundantes en los organismos, ya sea formando parte de proteínas o ácidos nucleicos (34, 35).

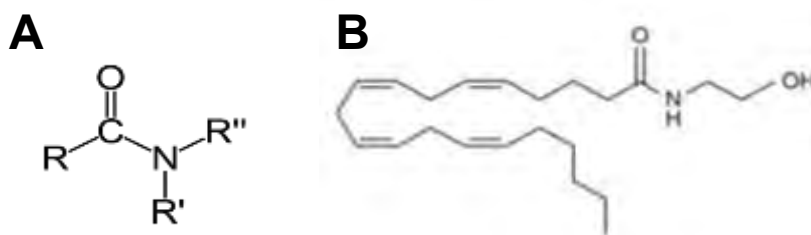


Figura 7. Estructura general de una amida (A) y de la anandamida (B).

Las amidas además de presentar una función estructural en las biomoléculas, también intervienen en el control metabólico ya que son moléculas señalizadoras que participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos; como es el caso de la anandamida (figura 7b) que es un neurotransmisor que induce el apetito, regula la temperatura corporal, disminuye la ansiedad y el miedo y además participa en la percepción de dolor (36).

Diversos fármacos empleados en la actualidad son amidas, por ejemplo la actividad de varios antibióticos se debe a la presencia del enlace amida, tal es el caso de la penicilina (figura 8), que presenta una amida cíclica, también denominada betalactama, que inhibe la síntesis de pared celular de las bacterias (37).

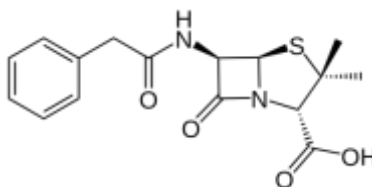


Figura 8. Estructura química de la penicilina



# **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**



---

La tuberculosis es un problema de salud pública a nivel mundial, actualmente se han presentado nuevos retos en el tratamiento de esta enfermedad aun cuando no está asociada con el VIH. El surgimiento de cepas resistentes a los fármacos de primera y segunda línea aunado a los efectos adversos presentados por el tratamiento, hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que sean activos contra el agente etiológico, y de ser posible, sin efectos adversos.

---

## 4. HIPÓTESIS

---

Con base en estudios realizados con amidas derivadas de ácidos grasos en donde se observa que la ricinoleilpirrolidilamida presenta mayor actividad micobactericida. Suponemos que las amidas derivadas del ácido ricinoléico mostrarán actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*, inhibiendo su crecimiento *in vitro*, así como su crecimiento intracelular en el contexto de infección en macrófagos derivados de THP-1.

---

## **5. OBJETIVOS**



- 
1. Determinar el efecto inhibitorio de amidas derivadas del ácido ricinoléico sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra (estructuras disponibles en el Anexo 4, página 72)
  2. Evaluar el posible efecto sinérgico de las amidas con actividad micobactericida.
  3. Evaluar el efecto tóxico de las amidas sobre la viabilidad de macrófagos derivados de la línea celular THP-1.

---

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

## **6.1 Diseño experimental**

Se realizó un estudio analítico-experimental, partiendo de un lote de bacterias de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, y de un cultivo continuo de la línea celular THP-1.

## **6.2 Amidas derivadas del ácido ricinoléico**

Las amidas derivadas del ácido ricinoléico fueron proporcionadas por el laboratorio de Síntesis de Fármacos de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM, a cargo del Dr. José Ignacio Regla Contreras. Para la síntesis de estos compuestos, primero se realizó una trans-esterificación del aceite de ricino con metanol, para generar ricinoleato de metilo, el cual, mediante una acilación del hidroxilo en el carbono 12, produjo el 12-fenilacetilricinoleato de metilo, que mediante una hidrólisis enzimática, permitió la obtención del ácido 12-fenilacetilricinoléico. Por último se prepararon las diferentes amidas mediante la reacción de diversas aminas vía formación de anhídrido mixto, para obtener las amidas derivadas del ácido ricinoléico (38).

## **6.3 *M. tuberculosis* y medios de cultivo.**

Se utilizó *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra, cepa avirulenta adquirida de la colección americana (ATCC, por sus siglas en inglés). Se cultivó en medio líquido Middlebrook 7H9 (ver apéndice 1) suplementado con ADC 10%, glicerol al 1% y tween 80 al 0.05% (7H9c) y en medio sólido Middlebrook 7H10 (ver anexo 1) suplementado con OADC 10%, glicerol al 1% y tween 80 al 0.05% (7H10c).

---

#### **6.4 Determinación de la actividad antimicobacteriana**

La actividad bactericida se realizó en cultivos de *M. tuberculosis* H37 Ra en medio 7H9c. Primero, el stock bacteriano se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se eliminó y el paquete celular se resuspendió en medio 7H9c, luego se transfirió la suspensión a un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se incubó durante 7 días a temperatura y agitación constante (37 °C y 120 rpm) en la incubadora Thermo Scientific MAXQ-400. En este tiempo el cultivo alcanza la fase exponencial temprana, esto es con el fin de asegurar cultivos viables y homogéneos. Posteriormente, las bacterias se transfirieron a placas de 96 pozos ( $1.0 \times 10^5$ /mL) y se adicionó 50 µl de las amidas a diferentes concentraciones (1000 a 1 µg/mL), se incubaron hasta la fase exponencial tardía (7 días más). Es importante señalar que se incluyeron controles experimentales. El cultivo de bacterias sin ningún tratamiento (control del crecimiento) y otro cultivo donde se añadió rifampicina, el cual es un antimicobacteriano (control bactericida) utilizado para tratar la TB. Se cuantificó el crecimiento bacteriano monitoreando indirectamente la actividad metabólica por la resazurina.

#### **6.5 Cuantificación del crecimiento bacteriano por la resazurina**

Para determinar el efecto de las amidas se monitoreó el crecimiento bacteriano por la técnica colorimétrica. Este método es rápido, confiable y reproducible, el cual indica la actividad metabólica (actividad enzimática de óxido-reducción), lo que representa indirectamente el crecimiento bacteriano. La resazurina es un compuesto azul intenso que al reducirse a resofurina cambia a rosa. Dicha reducción se utiliza como un índice de actividad metabólica y por tanto del

---

crecimiento bacteriano. Entonces aquellas bacterias que están creciendo reducen la resazurina (39).

Como se mencionó anteriormente, después del tratamiento del cultivo bacteriano con las diferentes amidas se adicionó la resazurina (5 µg/ml) y se incubaron por 24 hr a 37 °C y posteriormente se evaluó el cambio de color (de azul a rosa) en los diferentes tratamientos (40). Este ensayo nos proporcionó un valor absoluto del crecimiento (crece; color rosa o no crece; color azul), lo que nos permitirá hacer una selección primaria rápida de las amidas.

### **6.6 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La concentración mínima inhibitoria o CMI es la concentración más baja de un compuesto que inhibe totalmente el crecimiento de un microorganismo. Este valor nos da información sobre la sensibilidad de las bacterias; S (sensible), y R (resistente) de un compuesto en particular. La CMI por resazurina se definió como aquella concentración más baja de la amida que evita el cambio de color de la resazurina en medio líquido, es decir que el cultivo permanezca azul (41).

### **6.7 Efecto sinérgico de las ricinoleilamidas sobre el crecimiento de *M. tuberculosis*.**

El sinergismo es el efecto resultante de la acción combinada de dos o más fármacos, en comparación con el efecto observable de cada uno de los componentes de la mezcla por separado. La sinergia se presenta cuando se reduce cuatro veces o más la concentración requerida para inhibir el crecimiento o para eliminación de la bacteria (42). Para evaluar el posible efecto sinérgico se prepararon mezclas de los compuestos que presentaron una CMI entre 25 y 50

---

$\mu\text{g/mL}$ . Para ello, se prepararon diluciones seriadas 1:2 partiendo de la CMI de cada compuesto. Dichas mezclas se evaluaron sobre cultivos de *M. tuberculosis* en fase exponencial temprana (7 días posteriores a la siembra). La evaluación del efecto inhibitorio se realizó por el método de reducción de la resazurina después de 7 días más de incubación.

El sinergismo se basa en el valor del índice fraccional inhibitorio ( $\Sigma\text{FIC}$ ), la cual debe dar un valor menor o igual a 0.5. El valor de  $\Sigma\text{FIC}$  se obtiene con la siguiente fórmula (43):

$$\text{FIC}(x + y) = \frac{\text{CMI de } x \text{ en combinación con } y}{\text{CMI de } x \text{ solo}}$$

$$\text{FIC}(x + y) = \frac{\text{CMI de } y \text{ en combinación con } x}{\text{CMI de } y \text{ solo}}$$

### **6.8 Condiciones de cultivo y diferenciación de la línea celular THP-1**

La línea celular de monocitos humanos THP-1 se obtuvo de la colección de cultivo americana (ATCC por sus siglas en inglés American Type Culture Collection) TIB-202. Estas células originalmente se aislaron de sangre periférica, de un niño de 1 año de edad con leucemia monocítica (44).

El stock de THP-1 ( $1 \times 10^8$  células/mL) se descongeló a  $37^\circ\text{C}$  y se transfirió a un tubo de 50 mL de fondo cónico de propileno [Falcon] con 10 mL de medio RPMI suplementado (Medio THP-1, ver anexo 3). Luego las células se centrifugaron a

---

500g por 10 min [Beckman TJ-6R rotor TH-4]. El paquete celular se disgregó en el vórtex [Fisher Scientific] y se resuspendió en 10 mL de medio THP. Se cuantificó la viabilidad tiñendo las células con azul de tripano y se contaron en la cámara de Neubauer [Superior Marienfeld, Germany]. La suspensión celular se ajustó a  $0.2 \times 10^6$  células/mL y se cultivaron a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda con  $\text{CO}_2$ , al 5% y  $\text{O}_2$ , al 95%. Los cultivos se incubaron hasta alcanzar una concentración de 0.8 a  $1.0 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente las células se lavaron como se describió anteriormente y se resuspendieron en medio THP y se ajustó la concentración a  $0.6 \times 10^6$  células/mL.

Las THP-1 se diferenciaron a macrófagos ( $\text{M}\phi$  THP-1) mediante la adición de formol 12-mirysatato 13-acetato (PMA, Sigma) a concentración final de 50 nM a la suspensión celular ( $0.6 \times 10^6$  /mL), y se cultivaron 0.5 mL en cada pozo en placas de 48 pozos [Corning] y se incubaron durante 72 h a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  (45). Es importante recalcar que los  $\text{M}\phi$  THP-1 presentan una mayor capacidad fagocítica, aumento en el contenido de colesterol en la membrana celular, mayor volumen citoplasmático así como la capacidad de adherirse en superficies de cristal y plástico. También muestran incremento en el número de fagolisosomas y vesículas endocíticas, así como aumento en la actividad de las hidrolasas ácidas (45, 46).

---

## **6.9 Efecto tóxico de las amidas sobre la viabilidad de los macrófagos derivados de THP-1**

Para determinar el efecto de las ADAR sobre la viabilidad de los macrófagos,  $0.3 \times 10^6$  células se trataron con los compuestos E, F, H y N a diferentes concentraciones (1-100  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24, 48 y 72 h. Posteriormente se cuantificó la viabilidad celular por el método de MTT como se describe en una sección posterior. La evaluación se realizó comparando los valores de viabilidad de las células cultivadas en medio THP (control) con respecto a las células tratadas con las ADAR.

## **6.10 Cuantificación de la viabilidad celular por MTT**

La cuantificación de la viabilidad celular se basa en la reducción del 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio de bromidio o MTT [Sigma] que es de color amarillo y se reduce a formazán que es de color morado. El cambio de color se debe a la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales y se utiliza como índice del estado funcional de la cadena respiratoria y por consiguiente de las células vivas. La generación de formazán se puede detectar en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm (47).

La cuantificación del porcentaje de viabilidad celular se informó como la proporción de reducción de MTT a formazán del control sin tratamiento contra los diferentes tratamientos. Para ello se agregaron 150  $\mu\text{g/mL}$  de solución de MTT a cada pozo, se incubó por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente las células se centrifugaron a 725 g por 10 min, se eliminó el medio y se adicionó isopropanol ácido (ver anexo 3) para disolver los cristales de formazán. Posteriormente, se cuantificó en un espectrofotómetro, Multiskan Ascent <sup>(14)</sup> a 570 nm.



---

### **6.11 Determinación del efecto de las ADAR sobre la viabilidad de las células infectadas con *M. tuberculosis*.**

Se utilizaron  $0.3 \times 10^6$  de células THP-1 resuspendidas en medio THP por condición (0.5 mL). Se cultivaron en placas de 24 pozos y se diferenciaron a macrófagos con PMA por tres días. Luego se eliminó el sobrenadante y se adicionó medio fresco, inmediatamente se realizó la infección con *M. tuberculosis* con un índice de infección de 1:5 ( macrófagos: bacterias) y se incubaron durante 1 hora a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Las células se lavaron para eliminar las bacterias del sobrenadante y se adicionó la amida H, se incubaron durante 72 h.

### **6.12 Efecto de la ADAR H sobre el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis***

Para ello, primero se infectaron los macrófagos derivados de la línea celular THP-1 con *M. tuberculosis* a un índice de infección de 1:5 (macrófagos: bacterias) en medio THP. Después de 1 h de incubación a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, las células se lavaron para eliminar las bacterias no internalizadas (48). Inmediatamente después, se adicionó la ADAR H a concentraciones no tóxicas (4 y 6 µg/mL) y se incubaron a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h más. Para determinar el efecto de dicho compuesto sobre el crecimiento intracelular se cuantificaron las bacterias intracelulares. Los macrófagos se lisaron con 0.1% de SDS durante 10 min y después se neutralizó la acción del SDS mediante la adición de 10% de albúmina sérica bovina (BSA). Finalmente, el crecimiento bacteriano se cuantificó por UFC. Para cada condición se realizaron diluciones seriadas (1/10). Luego, cada dilución se sembró por triplicado (10µl) en medio

---

sólido 7H10 y se incubaron durante 21 días y finalmente se contaron las UFC para cada uno de los tratamientos.

### **6.13 Tinción de inmunofluorescencia LC3 para detección de autofagia**

Para los ensayos de microscopía,  $1 \times 10^5$  células/500  $\mu$ L de medio RPMI por pozo se cultivaron en una cámara Lab-Tak II 8-pozos, y se diferenciaron con PMA durante 3 días. Después las células fueron infectadas con *M. tuberculosis* que expresa la proteína fluorescente mCherry, transcurrida la infección se trataron con las amidas durante 24 h e inmediatamente después las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se tiñeron con un anticuerpo anti-LC3 [Life Sciences Enzo] y se visualizó con FITCI. Para detectar los núcleos se tiñeron con Hoechst [Life Sciences Enzo] siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se visualizaron en un microscopio AxioScope.A1 de fluorescencia [Carl Zeiss] y las imágenes fueron adquiridas y analizadas con el software ZEN Pro [Carl Zeiss] (48).

### **6.14 Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron en el programa estadístico Prisma 5 (California, USA). Los datos se analizaron a través de una ANOVA de una vía, seguido por un análisis de comparación múltiple Dunnett. Los valores con valor de  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. Los datos se expresaron en media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

---

## **7. RESULTADOS**

---

### 7.1 Efecto bactericida de las ADB sobre *M. tuberculosis* H37 Ra.

Se evaluó la actividad bactericida de 12 ADAR sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, de las cuales 9 inhibieron el crecimiento. De éstas, cinco ADAR fueron las más activas (E, F, H y N), inhibiendo totalmente el crecimiento a concentraciones entre 25 y 75 µg/mL. En el cuadro 3 se muestra la CMI de cada compuesto.

Cuadro 3. Efecto bactericida de las amidas sobre *M. tuberculosis*

<b>ADAR (clave)</b>	<b><sup>1</sup> CMI (µg/mL)</b>	<b><sup>2</sup>n</b>
B	125	4
C	125	5
D	NO	5
<b>E</b>	<b>50</b>	<b>6</b>
<b>F</b>	<b>75</b>	<b>6</b>
<b><u>H</u></b>	<b><u>25</u></b>	<b><u>8</u></b>
I	50	6
J	125	4
K	NO	4
L	125	4
M	NO	4
<b>N</b>	<b>75</b>	<b>4</b>

<sup>1</sup>CMI (Concentración mínima inhibitoria) y <sup>2</sup>n (número de experimentos independientes)  
NO: no determinada

## 7.2 Efecto sinérgico de las ADAR sobre el crecimiento de *M. tuberculosis*

La administración de dos o más antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas es una estrategia común para hacer más eficientes los tratamientos por su efecto sinérgico (49). Con el fin de evaluar la posible interacción de las ADAR se hicieron combinaciones de los compuestos E, F y H. Se pudo observar que solo la E, F, y H presentan sinergia parcial obteniendo valores entre 0.6 a 1.0 a concentraciones entre 6 y 38 µg/mL, en el cuadro siguiente se muestran los resultados obtenidos.

*Cuadro 4. Efecto sinérgico de las ADAR*

Combinación	Concentración (µg/ml)		FIC	Σ FIC	Interacción
	Solo	Combinado			
H/E	H: 25	12.5/25	H: 0.416	0.916	Sinergia parcial
	E: 50	6.25/25	E: 0.5		
E/N	H: 50	25/37.5	H: 0.5	0.875	Sinergia parcial
	E: 75	25/18.7	E: 0.375		
E/F	H: 50	25/18.7	H: 0.333	0.666	Sinergia parcial
	E: 75	12.5/37.5	E: 0.333		
		12.5/18.7			

### 7.3 Efecto de las amidas con actividad bactericida sobre la viabilidad de los macrófagos derivados de THP-1

De las ADAR con mayor actividad (E, F, H, I y N) se determinó la toxicidad sobre la viabilidad en macrófagos derivados de THP-1. Se evaluaron concentraciones entre 1 y 100  $\mu\text{g/mL}$ . Las ADAR E, F e I disminuyen significativamente la viabilidad celular a partir de los 10  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que la amida H y la mezcla de amidas N reducen viabilidad a los 8 y 5  $\mu\text{g/mL}$ .

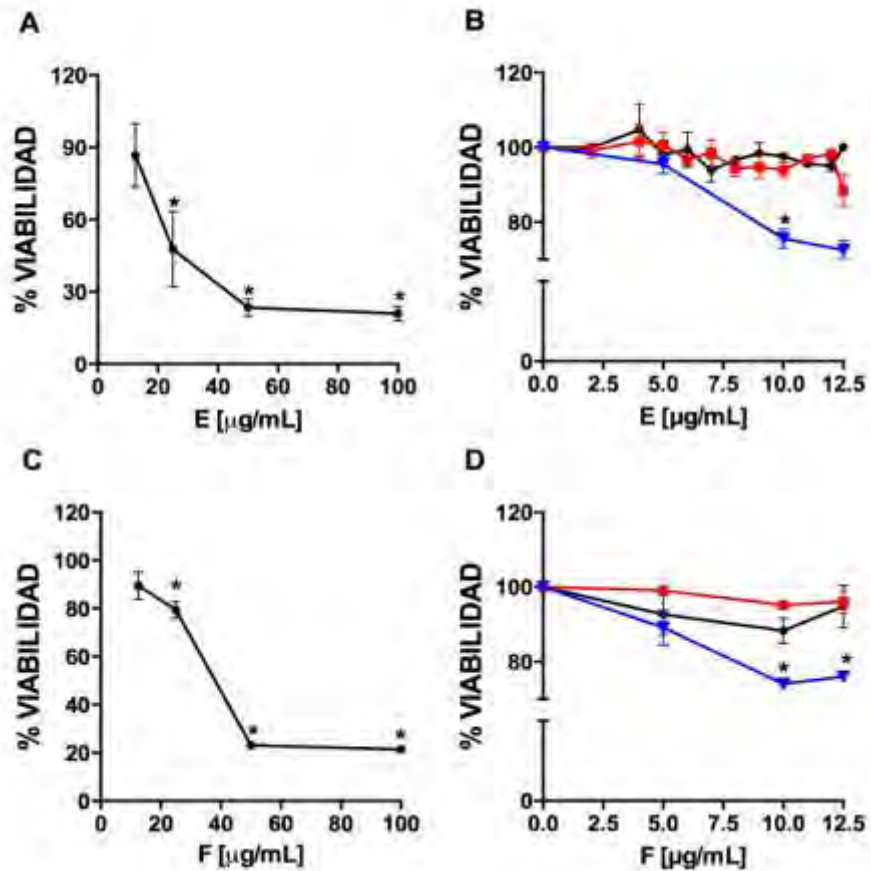


Figura 9. Efecto de las ADAR sobre la viabilidad celular de los macrófagos derivados de THP-1. Las células se expusieron a concentraciones crecientes de las ADAR (1.0-100  $\mu\text{g/mL}$ ) durante (■) 24, (▲) 48 y (◆) 72 h. Posteriormente se determinó la viabilidad colorimétricamente por reducción de MTT en las células tratadas con la ADAR E (A, B), y F (C, D). En la figura se presenta la media del índice de viabilidad celular obtenido de cuatro experimentos independientes. \* $P < 0.005$  vs control.

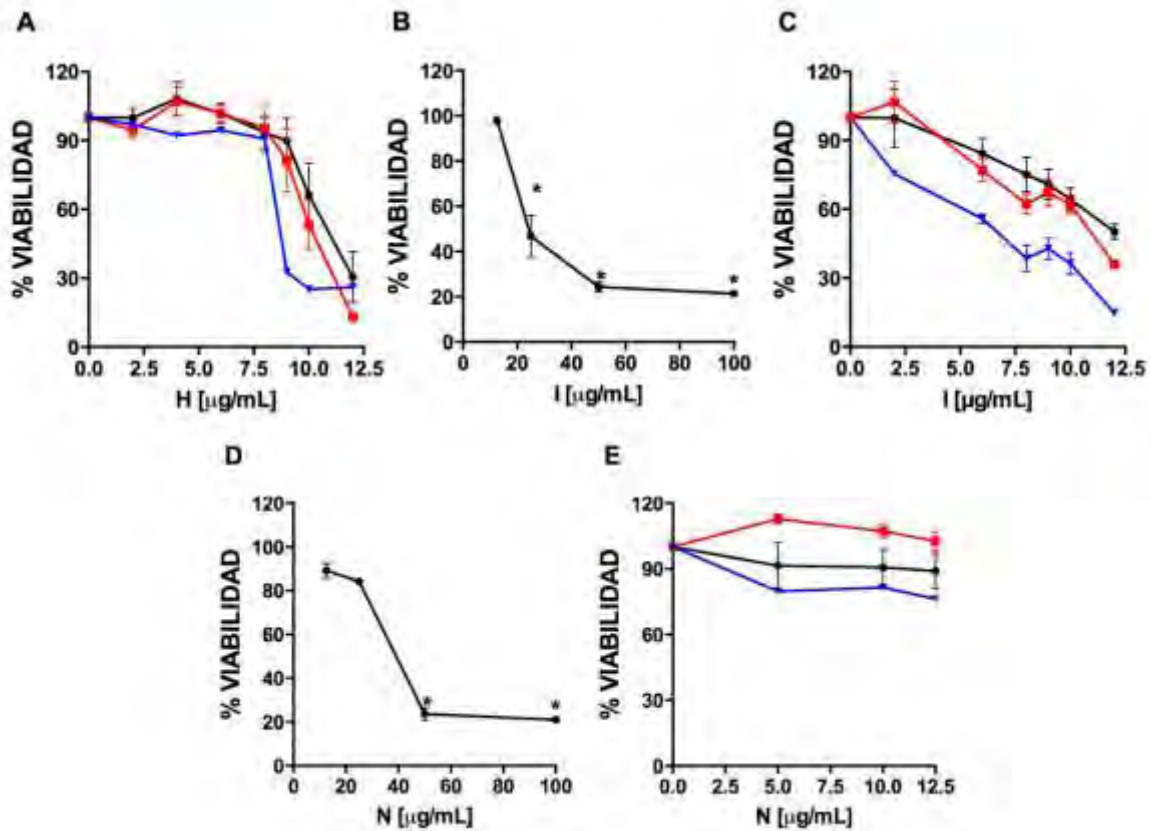


Figura 10. Efecto de las ADAR sobre la viabilidad celular de los macrófagos derivados de THP-1. Las células se expusieron a concentraciones crecientes de las ADAR (1.0-100 µg/mL) durante (■) 24, (▲) 48 y (◆) 72 h. Posteriormente se determinó la viabilidad colorimétrica por reducción de MTT en las células tratadas con la ADAR H (A), I (B, C) y N (D, E). En la figura se presenta la media del índice de viabilidad celular obtenido de cuatro experimentos independientes. \*P<0.005 vs control.

#### 7.4 Dosis letal 50 de las ADAR con actividad micobactericida

La dosis letal es una forma de expresar el grado de toxicidad de una sustancia.

Como norma general se utiliza la dosis semiletal o DL<sub>50</sub> que indica la toxicidad de un compuesto en un modelo animal o celular y se define como la concentración de una sustancia para matar al 50% de la población (50). La DL<sub>50</sub> de los compuestos

que se evaluaron se encuentra por debajo del valor de sus respectivos valores de CMI. En las primeras 24 horas las ADAR tienen valores de DL<sub>50</sub> entre 11 y 37 µg/mL, mientras que a las 48 h muestran valores entre 10 y 35 µg/mL. Finalmente a las 72 h las ADAR muestran toxicidad semiletal entre 9 y 28 µg/mL. En el cuadro siguiente se reportan los valores de DL<sub>50</sub> para los tres tiempos evaluados.

*Cuadro 5. Valores de la Dosis Letal 50 de las ADAR (DL<sub>50</sub>)*

ADAR	24 h	48 h	72 h
<b>SMF-148 (E)</b>	30.79 ± 0.147	27.37 ± 5.116	22.37 ± 2.665
<b>IMM-607 (F)</b>	36.78 ± 1.870	33.43 ± 0.263	27.91 ± 2.301
<b>SMF-158 (H)</b>	10.79 ± 0.717	9.91 ± 0.283	8.96 ± 0.153
<b>SMF-158 (I)</b>	20.02 ± 0.17	11.5 ± 0.283	5.16 ± 0.03
<b>IRC-(N)</b>	37.41 ± 3.243	35.17 ± 0.174	27.80 ± 0.327

### **7.5 Efecto de la ADAR H sobre la formación de autofagosomas**

Es importante resaltar que las ADAR a concentraciones entre 1 y 7.5 µg/mL no tienen efecto tóxico. Los compuestos E, F y N no presentan cambios visibles en la morfología. Sin embargo, la amida H, a pesar de no haber presentado cambios significativos en la viabilidad, se observaron la formación de vesículas. Por ello se evaluó si esos cuerpos membranosos son autofagosomas. Con relación a esto se sabe que en la autofagocitosis, la proteína LC3 migra desde el citoplasma intracelular a vesículas autofágicas. Por lo tanto, vesículas que reconocen el anticuerpo LC3 alrededor de vesículas indican autofagia (51). Se pudo observar



---

que la ADAR H a concentraciones de 4 y 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  forma autofagosomas en comparación con las células en medio solo.

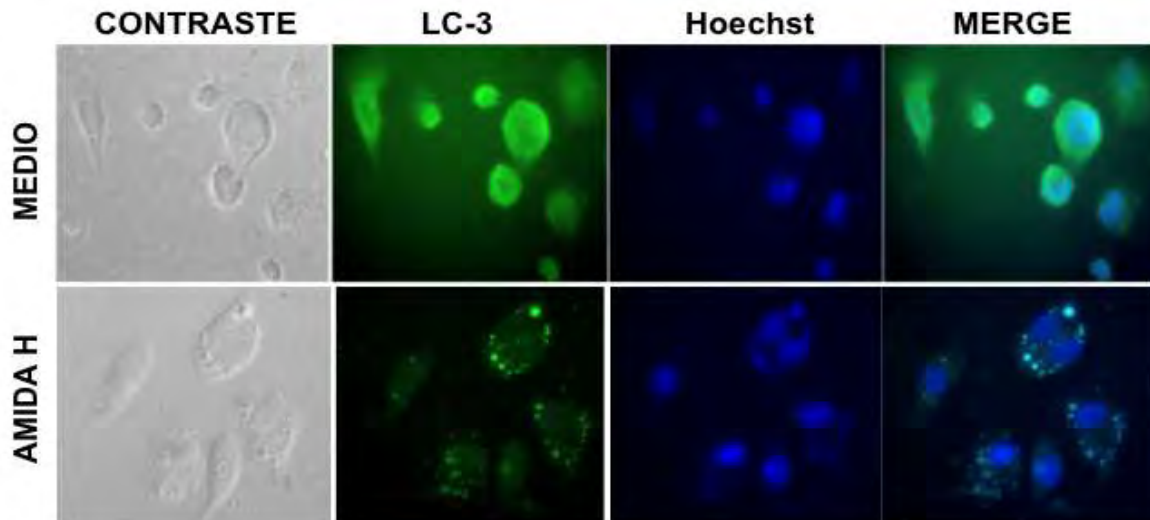


Figura 11. La ADAR H induce la formación de autofagosomas. Las células se expusieron a 4 y 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 h. La detección de autofagosomas se realizó mediante microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo anti-LC3-FITC humano. Las imágenes fueron adquiridas a 1000X.

### **7.6 Efecto de la ADAR H en la viabilidad de células infectadas por *M. tuberculosis* y el crecimiento intracelular bacteriano.**

Recientemente, se ha demostrado que la autofagia es un mecanismo para restringir la proliferación de micobacterias en los macrófagos humanos (10, 51). Por ello, primero se evaluó el efecto de la ADAR H sobre la viabilidad de células infectadas y el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la viabilidad de las THP-1 ni el crecimiento intracelular bacteriano después de 72 h de incubación. Además tampoco se observó un efecto sobre el crecimiento intracelular de las micobacterias.

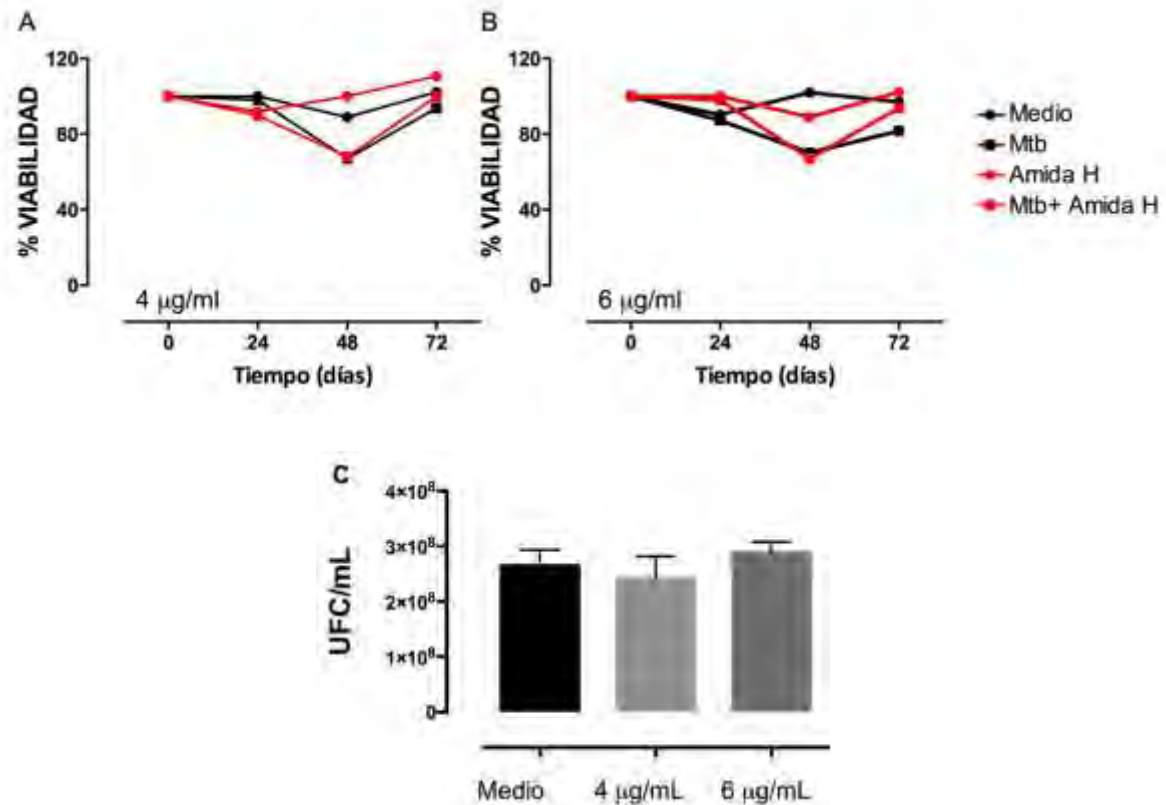


Figura 12. Efecto de las amidas sobre la viabilidad celular de los macrófagos de THP-1 infectados y el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*. Las células infectadas se trataron con la ADAR H a concentraciones de 4 (A) y 6 µg/mL (B) durante 72 h y se monitoreo la viabilidad por la reducción de MTT cada 24 h. El crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* se monitoreó a las 48 h. En la figura A y B se presenta el porcentaje de viabilidad celular obtenido de seis experimentos independientes. En la figura C se muestra el promedio de dos experimentos realizados por triplicados de dos experimentos independientes. \*P<0.005 vs control.

---

## 8. DISCUSIÓN

---

### **8.1 Efecto inhibitorio de las ADAR sobre el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis***

De los 12 compuestos que se probaron, 9 presentaron actividad bactericida sobre la cepa de *M. tuberculosis*, de las cuales cuatro ADAR presentaron una CMI menor a 100 µg/mL.

En las últimas décadas se han descrito compuestos con actividad antimicrobiana, antiviral, antitumoral, antiinflamatorio, analgésico, antipsicótico, anti-Alzheimer, efecto protector cardiovascular, etc. La actividad antimicrobiana de este sistema es uno de los más documentados (52). Por ejemplo la danofloxacina es una quinolona con un grupo DBH, la cual presenta un potente efecto antibacteriano (53). En este trabajo se observó que aquellos compuestos que presentan este sistema presentan valores de CMI menores, en contraste con los que no lo poseen. De igual manera pudo observarse que la presencia de sustituyentes que confieren bajo impedimento estérico al DBH presentan menor CMI en comparación con otras amidas con grupos de mayor número de átomos. Las restricciones presentes en los equilibrios conformacionales del sistema DBH favorecen la interacción entre moléculas.

### **8.2 Efecto sinérgico de las ADAR que presentan actividad contra *M. tuberculosis***

Se sabe que la administración conjunta de dos antibióticos muestra una respuesta significativamente favorable en el tratamiento de enfermedades infecciosas, como es el caso de la endocarditis por enterococos, tratada con penicilina y

---

estreptomycin a partir de la década de los 50's (54). Por ello como medida para reducir los posibles efectos tóxicos de las amidas sobre células humanas y reducir la dosis requerida para eliminar al patógeno se probaron combinaciones de las amidas con actividad frente a la cepa de *M. tuberculosis*, observando que la administración de la amida E formando mezclas independientes con las amidas F, H y N presentan sinergia parcial, reduciendo el valor de CMI.

### **8.3 Toxicidad de las ADAR en macrófagos derivados de THP-1**

Es importante la realización de ensayos de toxicidad cuando se cuenta con nuevas moléculas que puedan ser empleadas como fármacos en humanos, por ello, organismos reguladores solicitan este tipo de estudios previo a la evaluación de sus efectos en humanos (55, 56). Por cuestiones de ética los ensayos realizados en humanos se encuentran en la últimas fases del estudio de nuevas moléculas con aplicación terapéutica, los primeros estudios se realizan en animales de experimentación, habitualmente roedores, sin embargo el gran número de animales sacrificados anualmente ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas con la finalidad de no generar tanto estrés al animal o que el número de especímenes empleados sea menor, debido a esto se han empleado cultivos de tejidos y cultivos celulares.

Por ello, con el fin de determinar su potencial farmacológico de las cinco ADAR, se evaluó su toxicidad en macrófagos diferenciados a partir de la línea celular humana THP-1. Se determinó que concentraciones entre 10 µg/mL y 37 µg/mL afectan significativamente la viabilidad celular. Con relación a esto, la toxicidad

---

puede estar relacionada con la presencia del grupo tetrahidropiranyl unido al hidroxilo del carbono 12, ya que estos exhiben una  $DL_{50}$  menor en comparación con los compuestos que cuentan con el grupo hidroxilo libre. Se ha demostrado que algunas amidas derivadas del ácido ricinoléico presentan actividad contra líneas celulares de leucemia (57), de igual manera se ha observado que la unión del grupo tetrahidropiranyl a compuestos anticancerígenos disminuye la toxicidad en tejidos sanos sin modificar la actividad en células cancerosas (58).

En concentraciones inferiores a la  $DL_{50}$  de las ADAR se evaluó si generan cambios morfológicos en las células, se demostró que la ADAR H indujo la formación de vesículas de diversos tamaños. Para identificar su identidad se evaluó la presencia de la proteína LC3, componente característico de los autofagosomas maduros. De acuerdo a nuestros resultados se demostró que la naturaleza de las vesículas si son autofagocíticas. A pesar de que se ha reportado que la formación de autofagosomas puede utilizarse como mecanismo para eliminar a los patógenos intracelulares como *M. tuberculosis*, también es un tipo de muerte celular (59).

---

## **9. CONCLUSIONES**

- 
1. Nueve de las doce amidas mostraron actividad bactericida sobre *M. tuberculosis* H37 Ra (no virulenta). Las amidas H, E y N presentaron una CMI entre 25-50 µg/mL, probando que, con base en la hipótesis, no todas las amidas derivadas del ácido ricinoléico poseen actividad contra el patógeno.
  2. Las amidas E, H y N presentaron sinergia parcial disminuyendo su concentración mínima inhibitoria (CMI), inhibiendo parcialmente el crecimiento de *M. tuberculosis* H37 Ra *in vitro*.
  3. La DL<sub>50</sub> de las amidas E, F, H y N fue entre 12.5 a 80 µg/mL en macrófagos derivados de THP-1, lo que limita su potencial aplicación terapéutica.



---

## **10. PERSPECTIVAS**

---

La modificación de la estructura de las moléculas activas podría llevar al mejoramiento de sus propiedades antibacterianas y a la reducción de sus efectos tóxicos en células humanas, haciendo posible que puedan avanzar a posteriores etapas de ensayos preclínicos y clínicos para su posterior uso como alternativa al tratamiento de la tuberculosis sensible o drogorresistente.

---

## **11. REFERENCIAS**

- 
1. Sharma SK, Mohan A. Tuberculosis: From an incurable scourge to a curable disease - journey over a millennium. *Indian J Med Res.* 2013;137(3):455-93. Epub 2013/05/04.
  2. Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology.* 2002;148(Pt 10):2919-28. Epub 2002/10/09.
  3. Frota CC, Hunt DM, Buxton RS, Rickman L, Hinds J, Kremer K, et al. Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiology.* 2004;150(Pt 5):1519-27. Epub 2004/05/11.
  4. Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Maher M, van Soolingen D, Barry T. Novel multiplex real-time PCR diagnostic assay for identification and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):651-7. Epub 2010/12/03.
  5. OMS. Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades micobacterianas. Ginebra 1992. p. 43.
  6. OMS. Tuberculosis (TB). 2016 [citado 2016]; Disponible en: <http://www.who.int/tb/es/>.
  7. CENAPRACE. Tuberculosis. 2015 [citado 2015]; Disponible en: [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/portada\\_tuberculosis.html](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/portada_tuberculosis.html)].
  8. Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science.* 1992;257(5073):1055-64. Epub 1992/08/21.
  9. Kishore N, Mishra BB, Tripathi V, Tiwari VK. Alkaloids as potential anti-tubercular agents. *Fitoterapia.* 2009;80(3):149-63. Epub 2009/04/07.

- 
10. Kieser KJ, Rubin EJ. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(8):550-62. Epub 2014/07/08.
  11. CDC. Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis. 2016:21-3.
  12. Steck PA, Schwartz BA, Rosendahl MS, Gray GR. Mycolic acids. A reinvestigation. *J Biol Chem.* 1978;253(16):5625-9. Epub 1978/08/25.
  13. Rustad TR, Sherrid AM, Minch KJ, Sherman DR. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell Microbiol.* 2009;11(8):1151-9. Epub 2009/04/25.
  14. Mehta M, Rajmani RS, Singh A. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 Responds to Vacuolar pH-induced Changes in Mycothiol Redox Potential to Modulate Phagosomal Maturation and Virulence. *J Biol Chem.* 2016;291(6):2888-903.
  15. Cole ST. Inhibiting *Mycobacterium tuberculosis* within and without. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016;371(1707).
  16. Lemus. *Metodos rápidos para la detección de resistencia en Mycobacterium tuberculosis.* Habana, Cuba: Universidad de Cuba; 2007.
  17. Onyebujoh P, Zumla A, Ribeiro I, Rustomjee R, Mwaba P, Gomes M, et al. Treatment of tuberculosis: present status and future prospects. *Bull World Health Organ.* 2005;83(11):857-65. Epub 2005/11/23.
  18. Rivers EC, Mancera RL. New anti-tuberculosis drugs with novel mechanisms of action. *Curr Med Chem.* 2008;15(19):1956-67. Epub 2008/08/12.
  19. Zhang Y, Post-Martens K, Denkin S. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discov Today.* 2006;11(1-2):21-7. Epub 2006/02/16.

- 
20. Raviglione MC, Smith IM. XDR tuberculosis--implications for global public health. *N Engl J Med*. 2007;356(7):656-9. Epub 2007/02/16.
  21. Lado Lado FL, Garci Ramos R, Perez Del Molino ML, Ferreiro Regueiro MJ, Maceda Vilarino S, Tunez Bastida V. [Resistant tuberculosis by drugs]. *An Med Interna*. 2004;21(4):190-6. Epub 2004/04/28. Tuberculosis resistente a farmacos.
  22. Yadav S, Rawal G, Baxi M. Bedaquiline: A Novel Antitubercular Agent for the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(8):FM01-2.
  23. Xavier AS, Lakshmanan M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *J Pharmacol Pharmacother*. 2014;5(3):222-4. Epub 2014/09/12.
  24. Santhosh RS, Suriyanarayanan B. Plants: a source for new antimycobacterial drugs. *Planta Med*. 2014;80(1):9-21.
  25. Scarpa A, Guerci A. Various uses of the castor oil plant (*Ricinus communis* L.). A review. *J Ethnopharmacol*. 1982;5(2):117-37.
  26. Final report on the safety assessment of *Ricinus Communis* (Castor) Seed Oil, Hydrogenated Castor Oil, Glyceryl Ricinoleate, Glyceryl Ricinoleate SE, Ricinoleic Acid, Potassium Ricinoleate, Sodium Ricinoleate, Zinc Ricinoleate, Cetyl Ricinoleate, Ethyl Ricinoleate, Glycol Ricinoleate, Isopropyl Ricinoleate, Methyl Ricinoleate, and Octyldodecyl Ricinoleate. *Int J Toxicol*. 2007;26 Suppl 3:31-77.
  27. UNAM. Higuierilla. México: UNAM; 2009 [citado 2016]; Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Ricinus%20communis&id=7702>.

- 
28. Mohini Y, Prasad RB, Karuna MS, Poornachandra Y, Ganesh Kumar C. Synthesis and biological evaluation of ricinoleic acid-based lipoamino acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(21):5198-202. Epub 2016/10/26.
  29. Pabis S, Kula J. Synthesis and Bioactivity of (R)-Ricinoleic Acid Derivatives: A Review. *Curr Med Chem*. 2016;23(35):4037-56. Epub 2016/07/01.
  30. Reddy KK, Ravinder T, Kanjilal S. Synthesis and evaluation of antioxidant and antifungal activities of novel ricinoleate-based lipoconjugates of phenolic acids. *Food Chem*. 2012;134(4):2201-7. Epub 2013/02/28.
  31. Salimon J, Nallathamby N, Salih N, Abdullah BM. Synthesis and physical properties of estolide ester using saturated Fatty Acid and ricinoleic Acid. *J Autom Methods Manag Chem*. 2011;2011:263624. Epub 2011/10/19.
  32. D'Oca Cda R, Coelho T, Marinho TG, Hack CR, Duarte Rda C, da Silva PA, et al. Synthesis and antituberculosis activity of new fatty acid amides. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20(17):5255-7. Epub 2010/07/30.
  33. Rodrigues MO, Cantos JB, D'Oca CR, Soares KL, Coelho TS, Piovesan LA, et al. Synthesis and antimycobacterial activity of isoniazid derivatives from renewable fatty acids. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(22):6910-4. Epub 2013/10/10.
  34. McMurry J. QUÍMICA ORGÁNICA 7a ed. México: Cengage Learning; 2008.
  35. Wade LG. Química Orgánica. 5a ed. Madrid Pearson Prentice Hall; 2004.
  36. Farrell EK, Merkler DJ. Biosynthesis, degradation and pharmacological importance of the fatty acid amides. *Drug Discov Today*. 2008;13(13-14):558-68.
  37. Suarez C, Gudiol F. [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(2):116-29. Epub 2009/03/04. Antibioticos betalactamicos.

- 
38. S. M-F. Síntesis de amidas derivadas del ácido ricinoléico con actividad bactericida sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
39. Collins L, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(5):1004-9.
40. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(11):3616-9. Epub 2003/10/25.
41. Mendoza-Aguilar M, Almaguer-Villagran L, Jimenez-Arellanes A, Arce-Paredes P, Cid-Gutierrez JL, Rojas-Espinosa O. The use of the microplate alamar blue assay (MABA) to assess the susceptibility of *Mycobacterium lepraemurium* to anti-leprosy and other drugs. *J Infect Chemother.* 2012;18(5):652-61.
42. Katzung BGM, Susan B; Trevor, Anthony J. *Basic and Clinical Pharmacology*. 12 ed. United States of America: McGraw Hill; 2012.
43. Lechartier B, Hartkoorn RC, Cole ST. In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2012;56(11):5790-3. Epub 2012/08/29.
44. Armstrong CA, Klostergaard J, Granger GA. Isolation and initial characterization of tumoricidal monokine(s) from the human monocytic leukemia cell line THP-1. *J Natl Cancer Inst.* 1985;74(1):1-9.



- 
45. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*. 2010;5(1):e8668. Epub 2010/01/20.
46. Duque MA, Rojas M. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*. 2007;26(2):73-86.
47. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-82. Epub 1993/06/01.
48. Guzman-Beltran S, Rubio-Badillo MA, Juarez E, Hernandez-Sanchez F, Torres M. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and alpha-mangostin inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* by inducing autophagy. *Int Immunopharmacol*. 2016;31:149-57.
49. Miranda-Novales G, Leanos-Miranda BE, Vilchis-Perez M, Solorzano-Santos F. In vitro activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycin and amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006;5:25.
50. Gerth HU, Rompel A, Krebs B, Boos J, Lanvers-Kaminsky C. Cytotoxic effects of novel polyoxotungstates and a platinum compound on human cancer cell lines. *Anticancer Drugs*. 2005;16(1):101-6.

- 
51. Bradfute SB, Castillo EF, Arko-Mensah J, Chauhan S, Jiang S, Mandell M, et al. Autophagy as an immune effector against tuberculosis. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16(3):355-65.
  52. Murineddu G, Asproni B, Pinna G, Curzu MM, Dore A, Pau A, et al. Synthesis of biologically active bridged diazabicycloheptanes. *Curr Med Chem.* 2012;19(31):5342-63.
  53. Cheng Y, Avula SR, Gao WW, Addla D, Tangadanchu VK, Zhang L, et al. Multi-targeting exploration of new 2-aminothiazolyl quinolones: Synthesis, antimicrobial evaluation, interaction with DNA, combination with topoisomerase IV and penetrability into cells. *Eur J Med Chem.* 2016;124:935-45.
  54. Jewetz E, Gunnison JB, Bruff JB, Coleman VR. Studies on antibiotic synergism and antagonism. Synergism among seven antibiotics against various bacteria in vitro. *Journal of bacteriology.* 1952;64(1):29-39. Epub 1952/07/01.
  55. Ramírez Herrera RSR, Norma E. Estudios Pre-clínicos y Clínicos. In: establecimientos Dedadpy, editor. México: Secretaria de Salud; 2017.
  56. Orellana Sotelo AA. Estructura del expediente para registro. In: establecimientos Dedadpy, editor. México: Secretaria de Salud.
  57. Luviano A, Aguiniga-Sanchez I, Demare P, Tiburcio R, Ledesma-Martinez E, Santiago-Osorio E, et al. Antineoplastic activity of rinvanil and phenylacetylrinvanil in leukaemia cell lines. *Oncology letters.* 2014;7(5):1651-6. Epub 2014/04/26.
  58. Shimomura Y, Baba R, Watanabe A, Horikoshi Y, Asami K, Hyakuna N, et al. Assessment of late cardiotoxicity of pirarubicin (THP) in children with acute

---

lymphoblastic leukemia. *Pediatric blood & cancer*. 2011;57(3):461-6. Epub 2011/02/08.

59. Orrenius S, Kaminsky VO, Zhivotovsky B. Autophagy in toxicology: cause or consequence? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:275-97.

60. Alnimr AM. Dormancy models for *Mycobacterium tuberculosis*: A minireview. *Braz J Microbiol*. 2015;46(3):641-7.

61. Camacho-Corona Mdel R, Ramirez-Cabrera MA, Santiago OG, Garza-Gonzalez E, Palacios Ide P, Luna-Herrera J. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytother Res*. 2008;22(1):82-5.

62. Leibert E, Danckers M, Rom WN. New drugs to treat multidrug-resistant tuberculosis: the case for bedaquiline. *Ther Clin Risk Manag*. 2014;10:597-602. Epub 2014/08/13.

63. Rivers EC, Mancera RL. New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. *Drug Discov Today*. 2008;13(23-24):1090-8.

---

## 12. ANEXOS

---

**ANEXO 1. Composición de medios de cultivo para *M. tuberculosis*.**

Los reactivos que a continuación se mencionan a son para preparar un litro de medio de cultivo.

<b>Componente</b>	<b>Medio 7H10 (gramos)</b>	<b>Medio 7H9 (gramos)</b>
<b>Ácido L-glutámico</b>	0.5	0.5
<b>Agar</b>	15	---
<b>Biotina</b>	0.0005	0.0005
<b>Citrato de amonio férrico</b>	0.04	0.04
<b>Citrato de sodio</b>	0.4	0.1
<b>Clorhidrato de piridoxina</b>	0.001	---
<b>Cloruro de calcio</b>	0.0005	0.0005
<b>Fosfato disódico</b>	1.5	2.5
<b>Fosfato monopotásico</b>	1.5	1.0
<b>Piridoxina</b>	----	0.001
<b>Sulfato de amonio</b>	0.5	0.5
<b>Sulfato de cobre</b>	0.001	0.001
<b>Sulfato de magnesio</b>	0.025	0.05
<b>Sulfato de zinc</b>	0.001	0.001
<b>Verde de malaquita</b>	0.00025	---

---

### **Medio liquido 7H9**

Mezclar en una botella de 500 mL 1.88 g de agar 7H9 en polvo, 1.6 mL de glicerol, y 400 mL de agua desionizada. Agitar. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121°C. Enfriar a 50°C aproximadamente. Agregar 40 mL de ADC. Filtrar con membrana de 0.22 µm, guardar a 4°C.

### **7H10 agar (placas para cultivo de Mtb).**

Colocar 497 mL de agua desionizada en un matraz de 1000 mL en agitación con calor, agregar poco a poco el agar, glicerol y asparagina, disolver los reactivos hasta que el agar tome un color verde claro opaco. Después poner el agar en el horno de microondas y calentar poco a poco, sin dejar que hierva, se saca y se agita con la mano muy suavemente, este procedimiento se repite hasta que cambie de color verde claro opaco a verde botella translúcido. Tapar los matraces con tapones de algodón y gasas. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.

Enfriar un poco a temperatura ambiente, aproximadamente a 40 o 50 °, agregar 60 mL de OADC filtrándolo con jeringa y filtro de pirinola de 0.22 µm. Agitar suavemente y vaciar en cajas Petri.

---

## **ANEXO 2. Preparación de las soluciones**

Dichos compuestos se preparan en fresco y se almacenan en la oscuridad debido a que sufren foto-oxidación.

---

### **Solución stock 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT)**

---

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad /volumen</b>
<b>MTT (sigma)</b>	5 mg
<b>Agua destilada estéril</b>	1 mL

---

---

### **Solución de isopropanol acido (25:1)**

---

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad /volumen</b>
<b>2-propanol</b>	192 mL
<b>HCl 1.0 M</b>	8 mL

---

---

### **Ácido clorhídrico 1 M**

---

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad /volumen</b>
<b>HCl (Merck)</b>	36.46 g
<b>Agua desionizada</b>	1000 mL

---

---

**AMIDAS 2 mg/ mL stock**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad /volumen</b>
<b>ADAR</b>	2 mg
<b>DMSO (sigma)</b>	1 mL
<b>PBS (Bio-Whittaker)</b>	9 mL

---

**Rifampicina (RIF) 5 mg/ mL stock**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad /volumen</b>
<b>RIF (sigma)</b>	5 mg
<b>DMSO (sigma)</b>	1 mL
<b>PBS (Bio-Whittaker)</b>	9 mL



---

**ANEXO 3. Composición de medio THP-1**

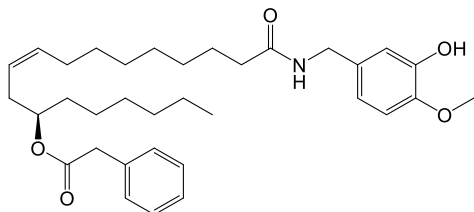
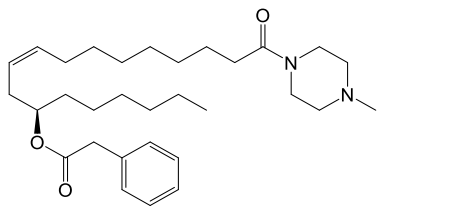
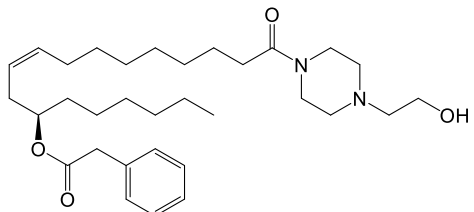
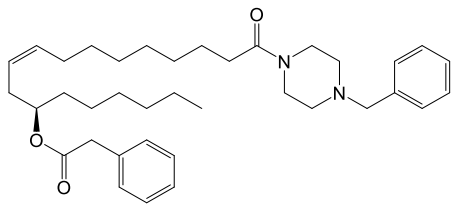
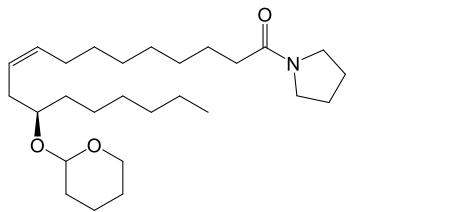
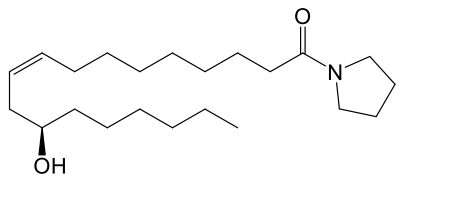
---

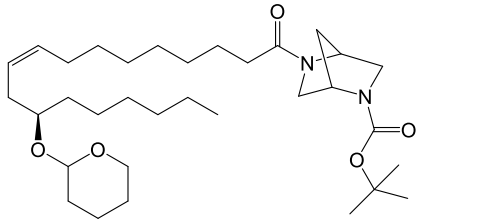
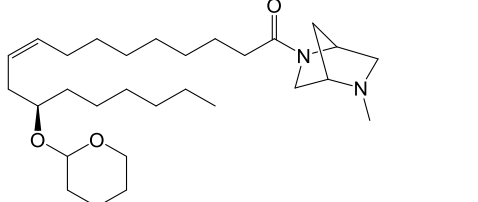
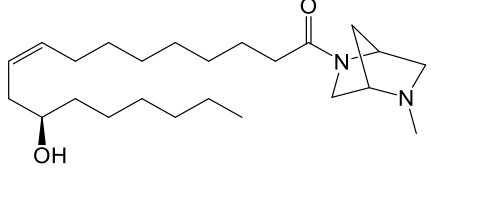
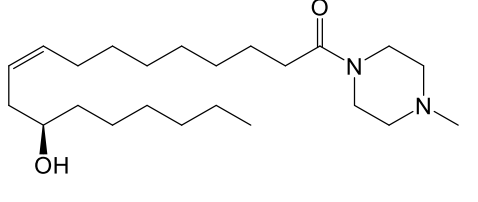
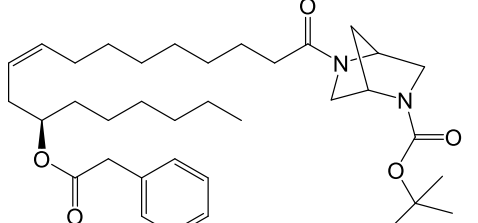
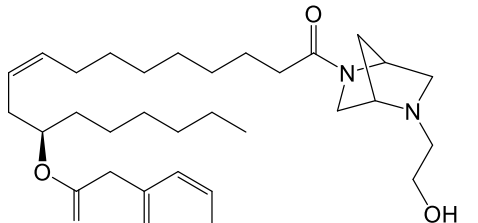
Reactivo concentración [ stock ]	Concentración [final]	Cantidad mL
RPMI		956
HEPES (1-6, 8-10, 14, 17, 19-21, 23, 27, 33, 34, 36, 37, 40, 42, 43, 45, 60-63)	(60)	10
Piruvato de Sodio (17)	(60)	10
L-glutamina [200 mM]	(60)	10
Estreptomicina/penicilina [5,000 U/5,000 U]	[500 u/500u]	10
Stock 1 de 2-mercapto etanol [2.8 mM]		4
Mezclar muy bien y adicionar el suero fetal bovino descomplementado y filtrado previamente (Lonza)		110

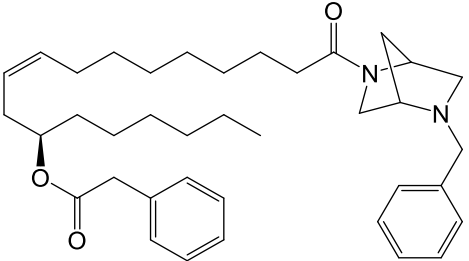
---

Mezclar muy bien pero despacio para evitar la formación de espuma y posteriormente filtrarlo en un sistema desechable de 1 L (Corning). Etiquetar y almacenar en el mismo frasco del sistema de filtración a 4°C, permanece estable por 3 a 6 meses.

#### Anexo 4. Estructura de los compuestos evaluados

Nombre del compuesto	Clave de Muestra	Estructura
A	IMM-617 200 mg/mL	
B	IMM-5-139 200 mg/mL	
C	ECP-144 200 mg/mL	
D	ECP-150 200 mg/mL	
E	SMF-148 200 mg/mL	
F	IMM-607 200 mg/mL	

G	SMF-160 200 mg/mL	
H	SMF-158 200 mg/mL	
I	IMM-605 200 mg/mL	
J	IMM-608 200 mg/mL	
K	IMM-5-122 200 mg/mL	
L	IMM-548 200 mg/mL	

M	IMM-162 200 mg/mL	 <p>The chemical structure of IMM-162 is a complex molecule. It features a long, branched hydrocarbon chain with a terminal double bond. Attached to this chain is a chiral center with a hydroxyl group (indicated by a wedge bond) and a benzyl ester group. The other end of the chain is connected to a carbonyl group, which is further linked to a bicyclic pyrrolidine ring system. A benzyl group is also attached to the nitrogen atom of this pyrrolidine system.</p>
N	IRC-696-B 200 mg/mL	Mezcla pirrolidina-higuerilla