



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LOS COMPUESTOS ROJO Y AZUL  
(BENZOQUINONAS) EN LA ACTIVIDAD  
CITOTÓXICA Y BACTERICIDA DE LAS CÉLULAS  
MH-S INFECTADAS CON *Mycobacterium tuberculosis*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

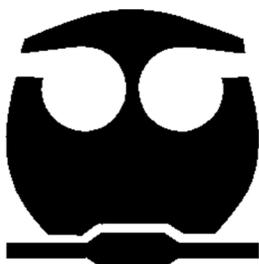
**P R E S E N T A:**

**ILSE MONSERRAT MENDOZA TRUJILLO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019**





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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN**  
**VOCAL:**                 **Profesor: JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ**  
**SECRETARIO:**         **Profesor: DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA**  
**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: GENARO JIMENEZ REYES**  
**2° SUPLENTE:**         **Profesor: TANYA PLETT TORRES**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR  
ZUBIRÁN”**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA**

**SUSTENTANTE (S): ILSE MONSERRAT MENDOZA TRUJILLO**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
I.1. INTRODUCCIÓN .....	2
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
II.1. <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> (Mtb).....	5
II.2. INFECCIÓN .....	7
II.3. TRATAMIENTO .....	7
II.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTI-TB .....	9
II.5. MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA (MIC).....	10
II.6. CITOTOXICIDAD .....	13
II.6.1. PRUEBA DE CITOTOXICIDAD CON CRISTAL VIOLETA .....	13
II.7. FAGOCITOSIS .....	14
II.8. MUERTE INTRACELULAR.....	15
II.9. COMPUESTOS AZUL Y ROJO (BENZOQUINONAS).....	16
<b>III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>20</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
III.1. MÉTODO DE PROLIFERACIÓN CON CELL TITER 96® AQUEOUS (MTS) PARA CONOCER LA MIC (MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA) DE LOS COMPUESTOS ROJO Y AZUL .....	22
III.2. CITOTOXICIDAD .....	27
III.3. MÉTODO DE KILLING PRE ESTIMULANDO CON LOS COMPUESTOS AZUL Y ROJO .....	34
III.4. MÉTODO DE KILLING ESTIMULANDO CON LOS COMPUESTOS AZUL A LA PAR DE LA INFECCIÓN.....	38
III.5. MÉTODO DE KILLING ESTIMULANDO CON LOS COMPUESTOS AZUL A LA PAR DE LA INFECCIÓN.....	40
III.6. MÉTODO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD FAGOCÍTICA .....	42
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
IV.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC) 47	
IV.2. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS AZUL Y ROJO EN LA LÍNEA CELULAR MH-S.....	56

IV.3. DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA AL INFECTAR UN CULTIVO DE MACRÓFAGOS CON MTB Y ESTIMULARLO CON LOS COMPUESTOS ROJO Y AZUL.....	59
IV.4. DETERMINACIÓN DE LA FAGOCITOSIS .....	64
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>74</b>
<b>VII. REFERENCIAS .....</b>	<b>76</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación de la estructura membranal de <i>M. tuberculosis</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Reducción del compuesto MTS a formazán por las bacterias metabólicamente activas.....	12
<b>Figura 3.</b> Estructura química de las benzoquinonas.....	17
<b>Figura 4.</b> Esquema de una placa de 96 pozos utilizada para realizar el ensayo de la determinación de la mínima concentración inhibitoria para los compuestos rojo y azul.	24
<b>Figura 5.</b> Esquema de una placa de 96 pozos utilizada para realizar el ensayo de citotoxicidad de los compuestos azul y rojo en la línea celular MH-S. ....	30
<b>Figura 6.</b> a) y b) Lectura de la densidad óptica del ensayo de MIC para el compuesto azul (1er lote) H37Rv ATCC. c) Determinación de UFCs para el ensayo de MIC del compuesto azul.....	48
<b>Figura 7.</b> Ensayo colorimétrico para detectar la MIC del compuesto azul para (2do lote) H37Rv Stanford.....	49
<b>Figura 8.</b> a) y b) Lectura de la densidad óptica del ensayo de MIC para el compuesto rojo (1er lote) en H37Rv.....	51
<b>Figura 9.</b> a) y b) Lectura de la densidad óptica del ensayo de MIC para el compuesto azul (2do lote) y rojo utilizando una cepa MDR de Mtb. c) y d) Determinación de UFCs en el ensayo de MIC para el compuesto rojo y azul utilizando una cepa MDR de Mtb.....	53
<b>Figura 10.</b> Repetición del ensayo colorimétrico para detectar la MIC del compuesto azul (2do lote) para MDR.....	54
<b>Figura 11.</b> Imágenes tomadas en microscopio invertido (objetivo 10X), son representativas de los seis pozos del ensayo de citotoxicidad después de poner las células MH-S en contacto con las diferentes sustancias.....	57
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de células MH-S vivas al ponerse en contacto con diferentes concentraciones del compuesto azul (2do lote) (8, 4 y 2µg/mL) y compuesto rojo (160, 16 y 1.6µg/mL) durante 48 horas. ....	58
<b>Figura 13.</b> Carga bacteriana dentro de macrófagos MH-S infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC (MOI 1:5) y pre estimulados 24 horas antes con diferentes concentraciones del compuesto azul (5, 25 y 50µg/mL) y compuesto rojo (5, 50 y 250µg/mL).....	59

**Figura 14.** Carga bacteriana dentro de macrófagos MH-S infectados con *M. tuberculosis* H37Rv ATCC (MOI 1:5) y estimulados a la par con diferentes concentraciones del compuesto azul (3er lote) (1, 2.5 y 5µg/mL)..... 61

**Figura 15.** Carga bacteriana dentro de macrófagos MH-S infectados con *M. tuberculosis* H37Rv ATCC (MOI 1:5) y estimulados post infección con diferentes concentraciones del compuesto azul (4to lote) (5, 25 y 50µg/mL) ..... 63

**Figura 16.** Porcentaje de fagocitosis de macrófagos MH-S al estar en contacto con *M. tuberculosis* H37Rv ATCC (MOI 1:5) y con el compuesto azul (3er lote) a 4 µg/mL en tres diferentes condiciones antes, a la par y después de la infección con la bacteria.....64

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) de los compuestos rojo y azul para diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y MDR..... 55

## ABREVIATURAS

ACP	enzima, <i>M. tuberculosis</i> proteína portadora de acilo
AG	arabinogalactano
ANOVA	análisis de varianza clásica
AP	ácido pirazinoico
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	albúmina de suero bovino
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DC-SIGN	receptor membranal, Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DE	desviación estándar
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMB	etambutol
ERO	especies reactivas de oxígeno
GPI	glicofosfatidilinositol
H37Rv	cepa tipo de laboratorio de <i>M. tuberculosis</i> , susceptible a fármacos de primera línea
IFN- $\gamma$	interferón gamma
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INH	isoniazida
InhA	enzima, <i>M. tuberculosis</i> reductasa transportadora de enoil-acil
katG	enzima, <i>M. tuberculosis</i> catalasa peroxidasa
LAM	lipoarabinomanano

LDH	enzima, Lactato deshidrogenasa
mAGP	complejo Arabinogalactano y Peptidoglicano
MDR	tuberculosis multidrogoresistente
MH-S	línea celular, macrófagos alveolares de ratones BALB/c
MIC	concentración mínima inhibitoria
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	patrones asociados a patógenos
PBS	solución buffer, phosphate buffered saline
pH	potencial de hidrógeno, logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno
PZA	pirazinamida
Rab	proteína membranal, guanosa trifosfatasa
RIF	rifampicina
ROI	intermedios reactivos de oxígeno
RPMI	medio de cultivo, Roswell Park Memorial Institute medium
RpsA	proteína ribosomal S1 de la subunidad 30S
SDS	dodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
Tb	Tuberculosis
TLRs	receptor membranal, Toll like receptors
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL	ensayo, Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling

tx	tratamiento
UFCs	unidades formadoras de colonias
UV	luz ultravioleta
XDR	tuberculosis extremadamente resistente a medicamentos
XTT	Hidróxido de 2,3-bis{2-metoxi-4-nitro-5 [(sulfinilamino)carbonil]-2H- tetrazolio}

**RESUMEN**

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta principalmente a los pulmones, es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), es considerada como una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y es la primera causa de muerte por un agente infeccioso. Afecta principalmente a la población inmunocomprometida y desnutrida, se le conoce como la enfermedad de la pobreza. El tratamiento se basa en un coctel de fármacos administrados diariamente por más de seis meses, que se sabe causan efectos adversos para la salud del paciente, al sentirse mejor el paciente abandona el tratamiento y esto ha causado el surgimiento de cepas resistentes a ellos. De ahí la importancia de seguir buscando nuevas alternativas que combatan a este microorganismo. En este trabajo se determinó la eficacia *in vitro* de dos nuevos compuestos (azul y rojo con una estructura base de benzoquinona) contra dos cepas de *M. tuberculosis* siendo una H37Rv (cepa tipo de laboratorio, susceptible a fármacos de primera línea) y la otra es una cepa multidrogorresistente (MDR) resistente a fármacos de primera línea pero susceptible a los de segunda línea). Se llevaron a cabo experimentos para determinar la mínima concentración del compuesto que es capaz de eliminar a la micobacteria (MIC), también se determinó la citotoxicidad en una línea celular de macrófagos alveolares murinos (MH-S), posteriormente se hicieron ensayos denominados "Killing" en donde se evalúa si los compuestos tienen una actividad directa sobre los macrófagos que pudieran aumentar su capacidad de combatir a la bacteria incrementando la muerte intracelular o el proceso de fagocitosis. Los resultados que se obtuvieron muestran que los compuestos azul y rojo tienen un efecto bactericida sobre Mtb mostrando una MIC de 8 y 160 µg/mL para la cepa H37Rv y MDR respectivamente. Por otra parte, los compuestos resultaron tóxicos para la línea celular MH-S al ponerlos en contacto durante 48 h a concentraciones >2 y >16 µg/mL respectivamente. Al estimular los macrófagos infectados con Mtb con estos compuestos se pudo observar una disminución significativa en la carga bacteriana intracelular al ponerse en contacto antes (5, 25 y 50 µg/mL para el compuesto azul y 5, 50 y 250 µg/mL para el rojo), durante (1, 2.5 µg/mL compuesto azul) y después de la infección (5, 25 y 50 µg/mL compuesto azul). Por último, se observó un incremento de la fagocitosis en los macrófagos que se pusieron en contacto con el compuesto azul durante y después de la infección con respecto a los que no fueron estimulados. El estudio de estos compuestos marca la pauta para su posible estudio en modelos murinos debido a su efecto bactericida así como de más experimentos para conocer su mecanismo de acción, ya que se cree, es diferente a los de los fármacos ya existentes para el tratamiento de la tuberculosis.

# **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

### I. INTRODUCCIÓN

#### I.1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (Tb) es considerada como una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial; la aproximación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2015 fue de 10.4 millones de casos (que oscilaron entre 8.7 millones y 12.2 millones), lo que equivale a 142 casos por cada 100 000 personas. Además, el 90% se presentan en países de bajos o de medianos ingresos que tienen infraestructuras de salud frágiles y recursos limitados como es el caso de México.

Se sabe que la tuberculosis es causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) donde se incluyen las siguientes: *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) el principal agente etiológico en los humanos, *M. africanum*, que causa TB en humanos solo en ciertas regiones de África; *M. bovis*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*, causando TB en mamíferos silvestres y domesticados y *M. microti*, que causa TB solo en ratones de campo<sup>1</sup>. El tratamiento para esta enfermedad consiste en un conjunto de fármacos que se debe tomar durante 6 a 9 meses<sup>2</sup>. Hasta hoy existen 10 medicamentos aprobados por la FDA clasificados en primera y segunda generación, de los cuales los de primera generación son la isoniazida (INH), la rifampicina (RIF), el etambutol (EMB) y la pirazinamida (PZA).

Debido a que el tratamiento en pacientes es muy largo y consiste en varios medicamentos que se sabe producen diversos efectos secundarios como daño hepático, hipersensibilidad, entre otros; la mayoría de los pacientes lo abandona

lo cual ha contribuido al aumento en la resistencia de algunas cepas de Mtb contra la isoniazida (INH) y la rifampicina (RIF), definidas como cepas multidrogorresistentes (MDR). Es por esto que, este proyecto se enfoca en la búsqueda de nuevos fármacos a los cuales esta bacteria sea susceptible y por lo tanto pueda ser usado en el tratamiento como reemplazo de los ya existentes o como adyuvante para disminuir la cantidad de fármacos usados o reducir el tiempo de medicación.

# **CAPÍTULO II.**

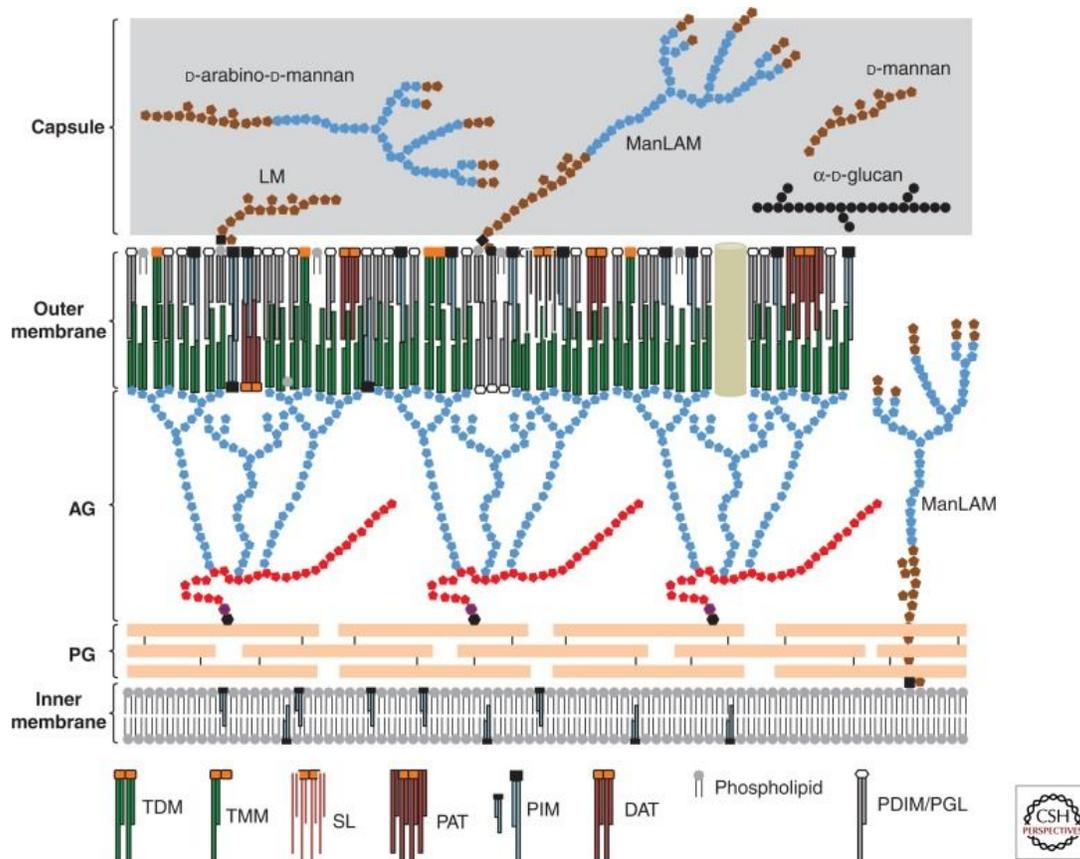
# **MARCO TEÓRICO**

## II. MARCO TEÓRICO

### II.1. *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (Mtb)

Mtb es una micobacteria con forma de bacilo de crecimiento lento con un tiempo de duplicación de entre 12 y 24 h en condiciones óptimas, es inmóvil, no esporulada y con un tamaño de 0,2 a 0,6 x 1 a 10  $\mu\text{m}$ . Su característica principal es la peculiar estructura de su pared celular formada por una gran cantidad de lípidos (hasta el 40% del peso seco de la bacteria), proporcionando una barrera impermeable a compuestos nocivos y fármacos contribuyendo así en su virulencia<sup>1</sup>.

El modelo más reciente divide a la envoltura externa de la micobacteria en 3 partes: una capa externa también llamada cápsula en especies patogénicas, una pared celular y una membrana plasmática interna<sup>3</sup> (Fig.1). La cápsula está compuesta por glucano, proteínas y en menor medida lípidos. La pared celular está compuesta por la "micomembrana" o membrana externa, arabinogalactano y peptidoglicano conocido como el complejo mAGP. La micomembrana presenta una organización de bicapa no convencional en la que la parte más interna está constituida por ácidos micólicos de cadena larga unidos a arabinogalactano, que a su vez está unida covalentemente a peptidoglicano. La cara exterior de la micobacteria está compuesta de fosfolípidos, glicopéptidos y lipoglicanos. Por último, un espacio periplásmico separa la pared celular de la membrana citoplasmática<sup>4</sup>.



**Figura 1.** Representación de la estructura membranar de *M. tuberculosis*. Los pentágonos representan residuos de arabinosa, las de color rojo residuos de galactosa, las de color café residuos de manosa y las negras residuos de glucosa. D-arabino-D-mannano, D-glucano y D-mannano son polisacáridos capsulares. Las cadenas de ácidos micólicos aparecen en verde oscuro. LM, lipomannano; ManLAM, lipoarabinomannano; AG, arabinogalactano; PG, peptidoglicano (Tomado de Jackson, 2014).

## II.2. INFECCIÓN

La infección con Mtb inicia con la inhalación de gotas (en forma de aerosol) que contienen una pequeña cantidad de bacterias. Una vez que recorren el tracto aéreo y llegan a los pulmones, son internalizadas a través del proceso de fagocitosis mediado por los macrófagos alveolares. Estas células del sistema inmune cuando son activadas transfieren las micobacterias a los lisosomas para ser destruidas, sin embargo, algunos bacilos pueden escapar y por consiguiente sobrevivir dentro del macrófago. Una vez infectados, los macrófagos pueden quedarse en los pulmones o migrar a otros órganos. A pesar de esto, solo una minoría de la población desarrolla tuberculosis ya que, en la mayoría de los individuos sanos, el sistema inmune se encarga de contener a la bacteria para que no se desarrolle la enfermedad<sup>5</sup>.

## II.3. TRATAMIENTO

Para el tratamiento de los nuevos casos de tuberculosis la OMS recomienda la implementación de un régimen de 6 meses con isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante los primeros 2 meses (fase intensiva), seguido de isoniazida y rifampicina por los 4 meses restantes (fase de sostén). Aumentar la duración del régimen no es recomendado ya que no se observa un aumento en la eficacia del tratamiento. Se recomienda la dosificación diaria durante toda la

duración de la terapia específicamente durante la fase intensiva de tratamiento; sin embargo, una dosis de tres veces por semana es suficiente<sup>6</sup>.

Por otra parte, el centro para el control y la prevención de enfermedades de Estados Unidos (CDC, por sus siglas en inglés) menciona que hay dos tipos de tuberculosis resistente a medicamentos. Estos tipos de tuberculosis son causados por cepas de Mtb resistentes a por lo menos un medicamento de primera línea contra la tuberculosis.

Para el caso en particular de la tuberculosis multirresistente (MDR Tb, por sus siglas en inglés) la resistencia es a más de un medicamento contra la tuberculosis, principalmente a la isoniazida y rifampicina que son los fármacos más potentes para eliminar a Mtb. La tuberculosis extremadamente resistente a los medicamentos (XDR Tb, por sus siglas en inglés) es menos común e incluye resistencia a la isoniazida y a la rifampicina, así como a todas las fluoroquinolonas y a por lo menos a uno de tres medicamentos inyectables de segunda línea (amikacina, kanamicina o capreomicina).

El régimen empírico recomendado para tratar la tuberculosis MDR debe incluir al menos cuatro medicamentos potencialmente activos: una generación posterior fluoroquinolona (moxifloxacina, gatifloxacina, olevofloxacina) y un aminoglucósido inyectable (amikacina, capreomicina o kanamicina), más cualquier medicamento de primera línea para el cual el aislado sea susceptible, como pirazinamida, más la adición de un medicamento como: cicloserina, ácido paraaminosalicílico, terizidona, protionamida, o etionamida.

## II.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTI-TB

### a) Isoniazida

Es un profármaco que entra a la micobacteria por difusión simple. Una vez dentro es activado por una enzima denominada katG, una catalasa-peroxidasa, que lo oxida generando especies reactivas como lo son el radical isonicotinoil que se une al  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  para formar aductos. Estas moléculas funcionan como inhibidores de la enzima enoyl-ACP reductasa dependiente de NADH (InhA) que es de gran importancia en el proceso de síntesis de ácidos micólicos<sup>7</sup>. La inhibición de la enoyl-ACP reductasa causa la acumulación de ácidos grasos de cadena larga y la muerte celular.

### b) Rifampicinas

Es un grupo de fármacos que incluye los siguientes derivados: rifampicina, rifapentina, rifabutina y rifalazil. Todos estos compuestos interactúan directamente con la subunidad  $\beta$  de la enzima ARN polimerasa dependiente de ADN para así evitar la transcripción del ADN<sup>8</sup>.

### c) Etambutol

Es un fármaco bacteriostático y antimicobacteriano que interfiere en el transporte de ácidos micólicos a la pared celular, se cree que esto se debe a la inhibición de la biosíntesis del polímero que se encuentra en la parte central de la pared celular, arabinogalactano (AG), generando una disminución en los receptores arabinos para ácidos micólicos. Se cree que también inhibe la síntesis de lipoarabinomanano (LAM)<sup>9</sup>.

**d) Pirazinamida**

Es un profármaco, análogo de la nicotinamida, que se convierte a su forma activa (el ácido pirazinoico, AP) por medio de la enzima PZasa/nicotinaminidasa. Una vez que este ácido sale de la célula puede ser protonado y atravesar con mayor facilidad la membrana de la micobacteria, esto genera la entrada de más protones a la bacteria y la acidificación del citoplasma afectando la actividad de enzimas vitales y causando la muerte<sup>10</sup>.

**II.5. MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA (MIC)**

Para determinar si *Mtb* es sensible a algún fármaco se conocen diversos métodos. La Concentración Mínima Inhibitoria o MIC por sus siglas en inglés (Minimum Inhibitory Concentration) se define como la mínima concentración de antimicrobiano ( $\mu\text{g/mL}$ ) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo<sup>11</sup>.

La técnica de proporciones es considerada como el "estándar de oro" para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, ésta se basa en comparar el grado de crecimiento del microorganismo en una placa con medio que contiene diferentes concentraciones de cierto fármaco contra una placa de medio sin fármaco. Sin embargo, debido a que se requiere de mucho tiempo (1 mes) y de principio activo a evaluar han aparecido opciones que requieren de menor tiempo para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana<sup>12</sup>.

Entre estas opciones se encuentran los ensayos de dilución, los cuales son usados para determinar la MIC y se han establecido como de los mejores métodos para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana; además de que puede confirmar

resistencias inusuales, dar respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos (p. e. método de difusión en disco) se encuentra los valores límite<sup>13</sup> y se obtiene un resultado cuantitativo.

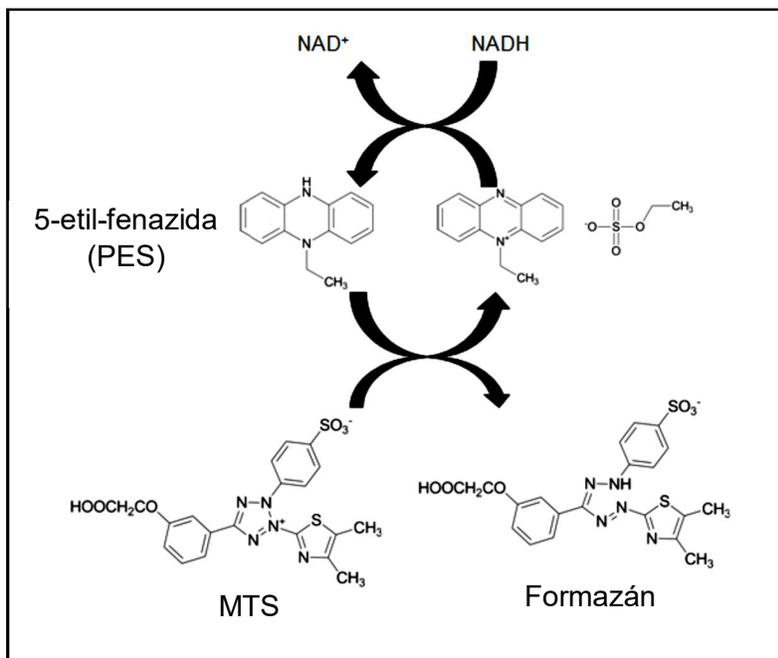
En los ensayos de dilución se busca conocer la capacidad de cierto microorganismo para crecer visiblemente en una serie de placas de agar o en medio de cultivo líquido (macro o microdilución) que contienen diferentes concentraciones del agente antimicrobiano. En este ensayo la MIC se considera como la concentración más baja del agente antimicrobiano que en condiciones *in vitro* previene la aparición del crecimiento visible de un microorganismo dentro de un periodo definido<sup>14</sup>.

El procedimiento para realizar estos ensayos involucra la preparación de diluciones seriadas del antimicrobiano (p.e. 1, 2, 4, 8, 16 y 32 µg/mL) en medio de cultivo contenido en tubos con un volumen mínimo de 2 mL (macrodilución) o bien en volúmenes más pequeños usando placas de 96 pozos (microdilución). Después se le inocula el microorganismo hasta formar una suspensión con densidad óptica de 0.5 en la escala de McFarland. Se mezcla y se incuba bajo las condiciones necesarias para el crecimiento del microorganismo<sup>15</sup>.

Para la determinación de la MIC la utilización de agentes visuales suelen facilitar la lectura del ensayo de microdilución y la obtención de resultados. Este es el caso de las sales de tetrazolio como el Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) e hidróxido de 2,3-bis{2-metoxi-4-nitro-5-

[(sulfonilamino)carbonil]-2H-tetrazolio} (XTT) que se usan para determinar visualmente la MIC además de la resazurina.

En el caso de estas sales (MTT, MTS y XTT) las células viables con metabolismo activo pueden convertir estos compuestos en formazán morado, que tiene una absorbancia cercana a 570 nm, a partir de reacciones con NADH o moléculas reductoras similares (Fig.2). Cuando las células mueren pierden la habilidad de convertir estas sales en formazán siendo la formación de color un buen marcador de células viables. La resazurina tiene un mecanismo similar sin embargo no se conoce todo a detalle<sup>16</sup>.



**Figura 2.** Reducción del compuesto MTS a formazán por las bacterias metabólicamente activas (Tomado de Riss, TL et al, 2013).

## II.6. CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad se considera como el potencial de una sustancia química para producir alteraciones en el comportamiento y procesos celulares que tienen como consecuencia la muerte<sup>17</sup>.

El uso de técnicas de cultivos celular en investigaciones toxicológicas se le denomina como citotoxicidad *in vitro*. Esto se basa en exponer una línea celular a diferentes concentraciones de una sustancia durante un determinado tiempo, y el grado de inhibición de la viabilidad o la funcionalidad de la célula es medida<sup>18</sup>.

Generalmente estos ensayos se basan en la determinación de la integridad de la membrana celular por medio de la reducción de MTT a un producto colorido, la inclusión o exclusión de colorantes como: el azul tripano, eosina o rojo neutro y la liberación de sustancias marcadas con radioactividad o de enzimas como lactato deshidrogenasa (LDH) o aspartato aminotransferasa<sup>17</sup>.

### II.6.1. PRUEBA DE CITOTOXICIDAD CON CRISTAL VIOLETA

El cristal violeta (N-hexametilpararosanilina) es un colorante básico que tiñe los núcleos de las células ya fijadas. También se puede utilizar como método para determinar la citotoxicidad de un agente químico, este se basa en que un agente tóxico, a pesar del sitio o mecanismo de acción, puede interferir en los procesos y resultar en la reducción del número de células viables. Solo las células viables son capaces de mantener los procesos intactos. El grado de inhibición del

crecimiento, relacionados con la concentración del agente probado, da un indicio del grado de toxicidad<sup>18</sup>.

Debido a que en la estructura del cristal violeta se encuentra un grupo cromóforo, este puede absorber cierta longitud de onda y reflejar otra que puede ser medida en un espectrofotómetro. De acuerdo con Gillies *et al* (1986), la absorbancia del cristal violeta medida a 590 nm es proporcional al número de células en el cultivo.

### II.7. FAGOCITOSIS

La fagocitosis es el proceso por el cual las células ingieren partículas con un tamaño mayor o igual a 5  $\mu\text{m}$  e involucra el reconocimiento y la unión a la presa por medio de receptores que se encuentran en la superficie celular. Mediante este proceso bacterias u hongos pueden ser eliminados del sitio de infección por neutrófilos, macrófagos y células dendríticas siendo así parte de la primera línea de defensa contra una infección<sup>19</sup>.

Por otra parte, se sabe que juega un papel clave en el inicio de la respuesta inmune adaptativa promoviendo la liberación de citocinas proinflamatorias y la llegada de más células linfoides al sitio de infección. También las células fagocíticas profesionales participan en el mecanismo de presentación del antígeno, derivado de la degradación de las partículas fagocitadas.

Como se mencionó previamente los macrófagos alveolares son los primeros en fagocitar a *M. tuberculosis* y ser infectados. Después, células dendríticas y

monocitos se unen a este proceso fagocítico. Este proceso está mediado por receptores que se unen a patrones asociados a patógenos (PAMPs) o a opsoninas. Entre estos receptores se encuentran lectinas de tipo C como los receptores de manosa, receptor de dendríticas (DC-SIGN) y dectina, receptores del complemento, receptores de proteína surfactante, receptores scavenger, receptores anclados a GPI (Glicofosfatidilinositol) como CD14, al igual que TLRs<sup>20</sup>.

### II.8. MUERTE INTRACELULAR

Mtb ha desarrollado ciertos mecanismos de sobrevivencia como el de evadir el fagosoma una vez dentro del macrófago. La razón es porque la bacteria interfiere con la proteína Rab encargada del control del tráfico de membranas evitando así la fusión entre el lisosoma y el fagosoma, es decir, la maduración del fagolisosoma<sup>20</sup>.

La evasión de Mtb del fagolisosoma se da en macrófagos no activados. Una vez que los macrófagos activados (que es una condición en la cual los macrófagos aumentan su capacidad microbicida, dada usualmente por la estimulación de citocinas) el bacilo es rápidamente transferido a lisosomas donde es destruido por medio de la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que aumentan al activarse. Para la activación se requiere la presencia de citocinas proinflamatorias donde el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son las más importantes<sup>20</sup>. Así mismo, debido a la estimulación con IFN- $\gamma$ , se activan en los macrófagos las GTPasas,

responsables de la reclutación de NOS2 al fagosoma micobacteriano generando la formación de óxido nítrico<sup>21</sup>.

## II.9. COMPUESTOS AZUL Y ROJO (BENZOQUINONAS)

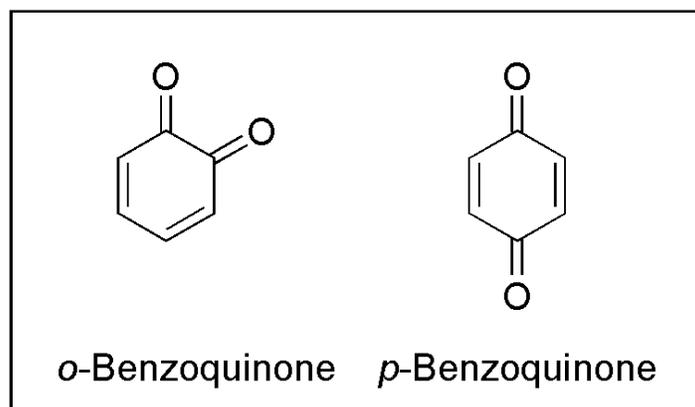
Los compuestos azul y rojo fueron proporcionados a nuestro laboratorio con la única información que tienen como estructura base una benzoquinona y que difieren entre ellos en los grupos sustituyentes.

La benzoquinonas son quinonas reactivas (Fig.3), formadas a través de la oxidación del benceno, un hidrocarburo aromático presente en el ambiente y producido en parte por la combustión de productos naturales. Son formados a partir de compuestos aromáticos con grupos donadores de electrones como fenoles y catecoles, los cuales incrementan su nucleofilicidad y con ello permiten la pérdida de su aromaticidad al ser oxidados<sup>22</sup>.

Esta propiedad les permite unirse a varios sitios nucleofílicos en proteínas, incluidos cisteína tioles, lisinas, aminas, histidinas imidazoles y aminas N-terminales de proteínas.

Por otra parte, se sabe que son componentes comunes de moléculas biológicamente relevantes. Algunos sirven como aceptores de electrones en las cadenas de transporte de electrones varios ejemplos son la plastoquinona, filoquinona en la fotosíntesis y ubiquinona en la respiración aeróbica.

En la literatura no se encuentra mucha información sobre la actividad biológica de las benzoquinonas sin embargo se menciona que algunas tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiparasitarias (Abraham *et al*, 2011); al igual que citotóxicas y genotóxicas, esto último debido a su capacidad de formar especies reactivas de oxígeno (ERO) y de unirse covalentemente a macromoléculas (Deloya-Brito *et al*, 2014).



**Figura 3.** Estructura química de las benzoquinonas (Tomada de <https://es.wikipedia.org/wiki/Quinona> 14 Oct-18 11:15 PM)

# **CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

### III. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es considerada como la primera causa de muerte a nivel mundial por un agente infeccioso y más del 90% de los casos se producen en países de bajos o medianos ingresos.

Los regímenes de tratamiento no adecuados y los problemas de adherencia del paciente han ocasionado que las tasas de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* hayan aumentado en el mundo, originando así la aparición de las cepas multidrogorresistentes (MDR) y con resistencia extensa a drogas (XDR).

Lo anterior crea la necesidad de buscar nuevas moléculas que sirvan como agentes antimicrobianos en contra de esta bacteria.

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad microbicida de los compuestos rojo y azul contra *Mycobacterium tuberculosis*, cepa tipo H37Rv y un aislado clínico MDR así como determinar si estos compuestos generan un aumento en la actividad citotóxica y bactericida de las células MH-S infectadas.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la concentración mínima inhibitoria para las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y MDR de los compuestos rojo y azul.
- Evaluar si los compuestos tienen un efecto inmunomodulador sobre la línea celular MH-S, aumentan la fagocitosis y evitan el crecimiento de la bacteria.
- Establecer si los compuestos tienen actividad citotóxica y bactericida en la línea celular MH-S infectada.

# **CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

##### IV.1. MÉTODO DE PROLIFERACIÓN CON CELL TITER 96® AQUEOUS (MTS) PARA CONOCER LA MIC (CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA) DE LOS COMPUESTOS ROJO Y AZUL.

Este ensayo tiene el objetivo de determinar la concentración mínima del compuesto a probar necesaria para inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*.

**Cepas:** Para los ensayos se utilizaron las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC, 27294) y un aislado clínico multidrogorresistente proporcionado por el “Instituto Mexicano del Seguro Social” (IMSS) Monterrey, las cuales se mantenían en crioviales de 1 mL congeladas en solución salina fisiológica a -70 °C, recuperadas a una densidad óptica (600 nm) de entre 0.4 - 0.6 y cuantificadas por determinación de carga bacteriana en cultivo, para conocer la concentración de bacterias por mL.

**Medios de cultivo para *M. tuberculosis*:** Medios de cultivo parcialmente selectivos para micobacterias Difco® Middlebrook 7H9 Broth y Difco® Middlebrook 7H10 Agar suplementado con BD BBL® Middlebrook OADC Enrichment (ácido oleico, albumina, dextrosa, catalasa).

Para preparar un litro se requiere de:

##### Agar 7H10

- 900 mL agua destilada.
- 19 g de agar 7H10 en polvo.
- 5 mL de glicerol.
- 100 mL de BD BBL® OADC (5 tubos).

Se calienta hasta disolver, por último, se esteriliza en autoclave a 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos, ya a temperatura ambiente se le agrega en esterilidad el OADC y se vierten 17 mL a cajas Petri estériles, se dejan enfriar y secar aproximadamente 15 min, se colocan a prueba de esterilidad en una incubadora a 37°C por al menos 48 horas.

### Medio 7H9

- 4.7 g de medio 7H9 en polvo.
- 5 mL de glicerol.
- 900 mL de agua destilada.
- 0,5 mL de Sigma-Aldrich® Tyloxapol premium.
- 100 mL de BD BBL® OADC (5 tubos).

Por último, se esteriliza filtrando al vacío usando un Stericup® de 1 L.

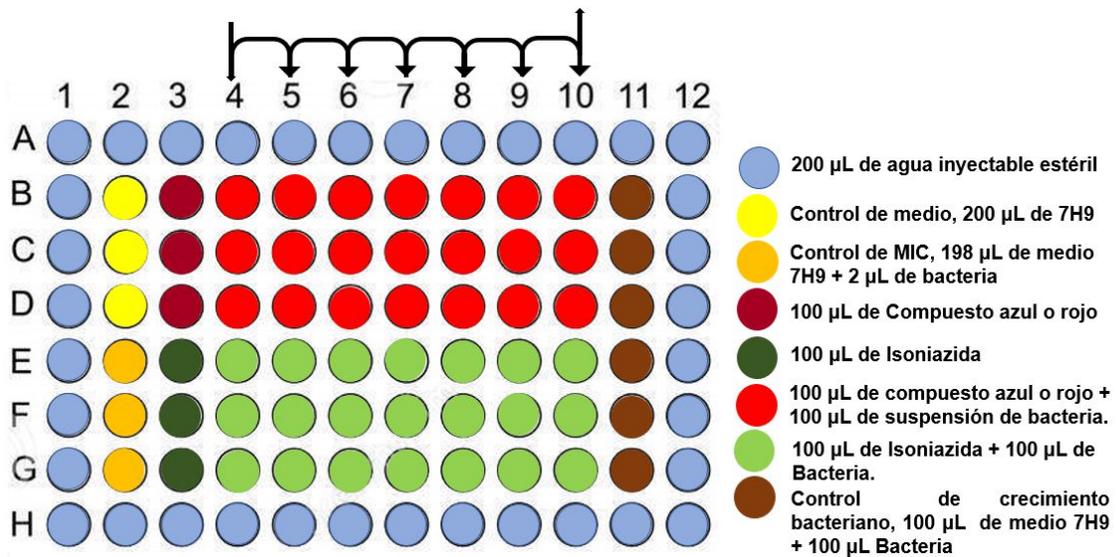
**Reactivo a usar:** CELL TITER 96® AQUEOUS (MTS)

**Antibióticos:** Para los ensayos de proliferación celular se utilizaron soluciones de Isoniazida con una concentración de 64 µg/mL preparadas antes de cada ensayo.

**Compuestos a probar:** Se trabajó con el compuesto azul y el compuesto rojo cuya estructura química base es la benzoquinona. Se utilizaron cuatro lotes diferentes del compuesto azul y un lote del rojo. Para el caso del azul el primer lote tenía una concentración de 0.31 µg/µL, el segundo de 0.4 µg/µL, el tercero de 0.47 µg/µL y el cuarto 0.37 µg/µL. Para el caso del rojo el primer lote tenía una concentración de 3.8 µg/µL. Ambos compuestos estaban disueltos en etanol al 20%.

Preparación del inoculo para el ensayo de MIC: Tomar los crioviales necesarios del ultracongelador a -70°C de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC o Stanford o MDR y descongelarlos colocándolos a 37°C durante 10 minutos. Finalmente, homogeneizar en un vórtex y tomar el volumen necesario para hacer una suspensión de  $3 \times 10^5$  bacterias/100 µL de medio 7H9 y colocarla en todos los pozos a utilizar en el ensayo (100 µL por pozo).

Montaje de la placa: Emplear 1 placa estéril de poliestireno de 96 pozos y fondo plano con tapa para cada experimento. Todas las placas se rellenan con agua inyectable estéril en los pozos de las orillas.



**Figura 4.** Esquema de una placa de 96 pozos utilizada para realizar el ensayo de la determinación de la mínima concentración inhibitoria para los compuestos rojo y azul.

### Paso1. Estímulo

- Prender la campana de flujo laminar y colocar la luz UV durante 10 min.
- Limpiar todas las superficies de la campana de flujo laminar con etanol al 70%.
- Colocar el material a usar dentro de la campana previamente limpiado con etanol al 70%.
- A partir de la solución stock del compuesto azul realizar una solución en medio 7H9 con una concentración final de 2 veces la concentración a probar.
- Agregar 100  $\mu\text{L}$  de medio 7H9 a los pozos de las filas (B-G), columnas (4-11) y 200  $\mu\text{L}$  en las filas (B-D) columna 2.
- Preparar la suspensión de bacteria y sonicarla durante 45 segundos.
- Agregar 198  $\mu\text{L}$  de medio 7H9 + 2  $\mu\text{L}$  de bacteria (previamente preparada) en las filas (E-G), columna 2. Estos pozos sirven como control de la concentración mínima inhibitoria MIC (1% de bacteria).
- Agregar 100  $\mu\text{L}$  de la solución de compuesto azul o rojo [64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] a las filas (B-D), columna 3 y 100  $\mu\text{L}$  de la solución de isoniazida [64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] a las filas (E-G), columna 3.
- A las filas (B-D), columna 4 agregar 100  $\mu\text{L}$  de la solución del compuesto azul o rojo [64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], resuspender y transferir 100  $\mu\text{L}$  a la columna siguiente, así sucesivamente hasta llegar a la columna 10, en este punto se descartan 100  $\mu\text{L}$  de la solución.

- Agregar 100  $\mu\text{L}$  de la solución de isoniazida [64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] a las filas (E-G), columna 4 y realizar el procedimiento mencionado en el punto anterior.
- Añadir 100  $\mu\text{L}$  a las filas B-G columna 3-11 de la suspensión de bacteria previamente preparada. Tapar la placa y sellarla de dos lados con cinta adhesiva.
- Colocar las placas en la incubadora a 35°C en agitación a 70 rpm durante 7 días.

### Paso2. Revelado:

- Sacar las placas y agregar a todos los pozos 40  $\mu\text{L}$  del reactivo Cell-Titer 96® AQueous. Regresar la placa a incubar a 35°C durante 3 horas.
- Tomar una foto a cada placa y cuantificar la absorbancia en un espectrofotómetro para placas de ELISA a una longitud de onda de 492 nm.

### Paso3. Determinación de la carga bacteriana:

- Colocar en una placa de poliestireno de 96 pozos 270  $\mu\text{L}$  de medio 7H9 por pozo.
- Tomar 30  $\mu\text{L}$  de cada uno de los pozos correspondientes a los controles y a la MIC para los compuestos azul, rojo e isoniazida y colocarlos en un pozo con 270  $\mu\text{L}$  de medio 7H9 por pozo resuspendiendo 10 veces (dilución 1/10).

- Una vez resuspendido tomar 30  $\mu\text{L}$  de ese pozo y pasarlo al siguiente pozo previamente relleno con 270  $\mu\text{L}$  de medio 7H9 resuspendiendo 10 veces (dilución 1:100).
- Realizar el proceso anterior 2 veces más, descartando los últimos 30  $\mu\text{L}$  (dilución 1:1000 y 1:10000) en pozos vacíos de la placa.
- Tomar una caja Petri con medio 7H10 y colocar por duplicado 10  $\mu\text{L}$  del concentrado (tomado directamente de la placa donde se hizo el ensayo) y de cada dilución (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000).
- Dejar absorber las muestras en el agar colocando las placas con tapa hacia arriba.
- Sellar e incubar las placas a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ .
- Hacer el conteo de unidades formadoras de colonias (UFCs) a los 14 y 21 días después de sembrar.
- Hacer cálculos, graficar y hacer análisis estadístico

### IV.2. CITOTOXICIDAD

Este ensayo tiene el objetivo de determinar la concentración a la cual el compuesto a probar puede matar cierto porcentaje de una población celular de macrófagos MH-S al estar en contacto directo durante 48 horas.

**Línea celular:** Para los ensayos *in vitro* de killing y fagocitosis se utilizó la línea celular MH-S ATCC™ provenientes de macrófagos alveolares de pulmón de ratones machos Balb/c se, la cual se mantuvo en botellas para cultivo celular (área de cultivo=75cm<sup>2</sup>) con medio RPMI suplementado Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%.

**Medio de cultivo para línea celular:** Medio de cultivo Gibco® RPMI 1640

Medio suplementado con 10% de SFB.

Para preparar un litro se requiere de:

### Medio RPMI

- 1 L de agua milliQ®.
- 1 sobre con medio Gibco® RPMI en polvo.
- 2 g de bicarbonato de sodio.

Por último, se ajusta el pH a 7.4 utilizando una solución de HCl o NaOH 0.1 N para después filtrarlo al vacío usando un Stericup® de 1 L.

### Medio RPMI completo

Se refiere al medio con SFB al 10%, para preparar 10 mL adicionar 1 mL de SFB más 9 mL de RPMI.

### PBS-EDTA

- 1 L de agua milliQ®.
- 5 tabletas de Sigma Aldrich™ PBS.
- 0.38 g EDTA anhidro.

Por último, se ajusta el pH a 7.4 con HCl o NaOH 0.1 N para después filtrar al vacío usando un Stericup® de 1 L.

### **Soluciones a usar:**

*Dimetilsulfóxido de sodio (DMSO) al 10%:* Para preparar 10 mL de DMSO al 10%, se tomó 1 mL de DMSO más 9 mL de RPMI. Filtrar en la campana de flujo laminar con filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

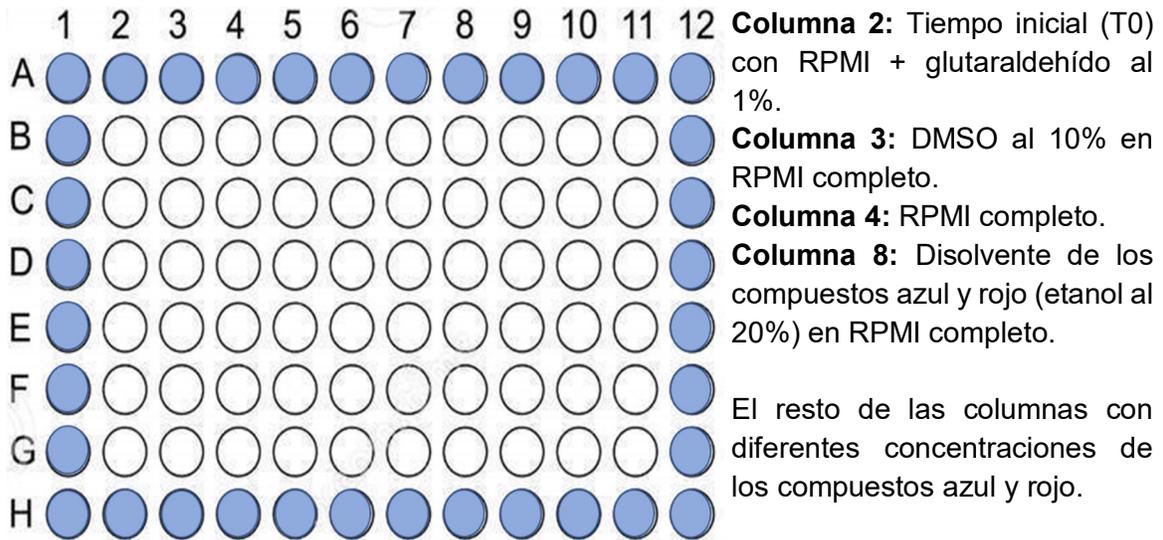
*Glutaraldehído al 1%:* Para preparar 10 mL de glutaraldehído al 1%, se tomaron 0.4 mL de glutaraldehído al 25% más 9.6 mL de RPMI. Filtrar en la campana de flujo laminar con filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

*Etanol al 20%:* Para preparar 10 mL de Etanol al 20%, se tomaron 2 mL de alcohol etílico absoluto más 8 mL de RPMI. Filtrar en la campana de flujo laminar con filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

*Cristal violeta al 0.1%:* Para preparar 10 mL, se pesaron 0.01 g y se disolvieron en 10 mL de ácido fórmico [200 mM], pH 6.0.

*Ácido acético al 10%:* Para preparar 10 mL de ácido acético al 10%, se tomó 1 mL de ácido acético glacial más 9 mL de RPMI.

*Montaje de la placa:* Emplear 1 placa estéril de poliestireno de 96 pozos y fondo plano con tapa para cada experimento. Todas las placas se rellenan con agua inyectable estéril en los pozos de las orillas.



*Figura 5. Esquema de una placa de 96 pozos utilizada para realizar el ensayo de citotoxicidad de los compuestos azul y rojo en la línea celular MH-S.*

#### Paso 1. Sembrado de células

- Prender la campana de flujo laminar y colocar la luz UV durante 10min.
- Limpiar todas las superficies de la campana de flujo laminar con etanol al 80%.
- Colocar el material a usar dentro de la campana previamente limpiado con etanol al 80%.
- A partir de una botella con un 80-90 % de confluencia de MH-S, se parte para iniciar el ensayo.

- Descartar el sobrenadante de la botella y añadir 13 mL de PBS-EDTA para después meter a incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Dar golpes firmes a la botella y transferir su contenido a un tubo de 50 mL para después centrifugarlo a 20°C por 10 minutos a 1500 rpm.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5mL de RPMI completo.
- Colocar en un microtubo de 10  $\mu$ L de esta suspensión de células y 90  $\mu$ L de azul tripano para hacer una dilución 1:10.
- En una cámara de Neubauer colocar 10  $\mu$ L de la dilución y observar al microscopio para contar el número de células que hay en la cuadrícula para glóbulos blancos.
- Calcular las células que hay por mililitro mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Células/mL} = \text{Promedio de los 4 cuadrantes} \times \text{FD} \times 10\,000$$

Donde FD= Factor de dilución

- Sembrar de  $15 \times 10^3$  células/200  $\mu$ L de medio RPMI completo en cada pozo
- Dejar las células incubando durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente húmedo.

### Paso 2. Estímulo

- Preparar soluciones de diferentes concentraciones de compuesto rojo [160, 16 y 1.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] y azul [8, 4 y 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], una solución de DMSO al 10% y una de glutaraldehído al 1% en medio RPMI completo.
- Retirar el sobrenadante de la columna 2 y colocar 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo RPMI con glutaraldehído al 1% durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante de la columna 4 y colocar 200  $\mu\text{L}$  de RPMI completo.
- Realizar el mismo proceso para el resto de los estímulos de acuerdo con la figura 5.
- Incubar la placa a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  en cámara húmeda durante 48 horas.

### Paso 3. Lectura

- Observar las células al microscopio para descartar contaminación y determinar confluencia.
- Retirar los estímulos y fijar con 100 $\mu\text{L}$  de medio de cultivo RPMI con glutaraldehído al 1%.
- Esperar 10 minutos y retirar el sobrenadante.
- Sacar la placa de la campana de flujo laminar y lavar con agua corriente.

- Secar durante aproximadamente 20 minutos.
- Agregar 80  $\mu\text{L}$  de una solución de cristal violeta al 0.1% a todos los pozos y colocar las placas en agitación suave durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Retirar el sobrenadante y lavar con agua corriente
- Secar durante aproximadamente 20 minutos.
- Agregar 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético al 10% en agua a cada pozo y colocar las placas en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Pasar 100  $\mu\text{L}$  previamente homogeneizados con la micropipeta de cada pozo a otra placa de 96 pozos con fondo plano y leer la densidad óptica a 570 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA.
- Los resultados se expresan como porcentaje (absorbancia de las células tratadas sobre la absorbancia de las células no tratadas o células con RPMI completo).
- Graficar el porcentaje de viabilidad o citotoxicidad contra los grupos de tratamiento para una mejor interpretación de los resultados.

### IV.3. MÉTODO DE KILLING PRE ESTIMULANDO CON LOS COMPUESTOS AZUL Y ROJO.

Este ensayo tiene el objetivo de determinar si el compuesto a probar, al colocarse antes de infectar macrófagos MH-S con *M. tuberculosis*, es capaz de generar un aumento o disminución en la capacidad de estas células para destruir a la micobacteria una vez fagocitada.

#### **Soluciones a usar:**

*Solución de RPMI + Antibiótico:* A partir de una solución de antibióticos Gibco™ Pen Strep 100x con una concentración de 10,000 U/mL de penicilina y 10,000 µg/mL de Streptomina se preparó una solución 1x en medio RPMI.

*Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1%:* Para preparar 10 mL de esta solución se pesó 0.01 g de SDS y se le agregaron 10 mL de medio 7H9. Se pone en agitación hasta que se disuelva completamente. Filtrar en la campana de flujo laminar con filtro de 0.22 µm y hacer alícuotas para congelar a -20°C.

*Albúmina de suero bovino (BSA) al 20%:* Para preparar 10 mL de esta solución se pesaron 2 g de BSA y se le agregaron 10 mL de medio 7H9. Se pone en agitación hasta que se disuelva completamente. Filtrar en la campana de flujo laminar con filtro de 0.22 µm y hacer alícuotas para congelar a -20°C.

*Preparación de la bacteria:* Tomar los crioviales necesarios del ultracongelador a -70°C con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC o Stanford del cual ya se sabe la concentración. Descongelar la bacteria colocando los crioviales a 37°C durante 10 minutos. Finalmente, homogeneizar en un vórtex y tomar el volumen necesario para hacer una suspensión de  $3 \times 10^5$  bacterias/100 µL de medio RPMI completo tomando en cuenta que en cada pozo se agregan 100 µL.

Montaje de la placa: Emplear 2 placas estériles de poliestireno de 96 pozos y fondo plano con tapa para cada día experimento. Todas las placas se rellenan con agua inyectable estéril en los pozos de las orillas, para evitar evaporación.

### Paso 1. Sembrado de células

- Realizar el *paso1. Sembrado de células del ensayo de citotoxicidad* hasta el punto 10.
- Hacer una suspensión de  $4 \times 10^3$  células/200  $\mu$ L y calcular el volumen necesario para colocar 200  $\mu$ L en los pozos de las 4 placas (D0, D1) más un exceso de 1/10.
- Dejar las células incubando durante 3 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### Paso 2. Estímulo

- Retirar el sobrenadante del cultivo de las células.
- Agregar 200  $\mu$ L de medio RPMI en los pozos de las células sin estímulo.
- Colocar 180  $\mu$ L de medio RPMI en los pozos de las células infectadas sin tratamiento.
- Añadir 20  $\mu$ L de los compuestos rojo o azul en los pozos correspondientes para tener una concentración final de 250, 50 y 5  $\mu$ g/mL y 50, 25 y 5  $\mu$ g/mL respectivamente.
- Dejar incubando durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### Paso 3. Infección

- Hacer la suspensión de bacteria y sonicarla durante 45 segundos.
- Retirar el sobrenadante de todos los pozos.
- Añadir 200  $\mu$ L de la solución de bacterias previamente sonicadas en los pozos de células infectadas con tratamiento.
- Incubar 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- Descartar el sobrenadante en cajas de Petri, evitando hacer burbujas y formar aerosoles. Realizar 3 lavados con 200  $\mu$ L de RPMI con antibióticos.
- Añadir 200  $\mu$ L de RPMI completo en todos los pozos.
- Dejar incubando a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 hora (Día 0) y 24 horas (Día 1).
- Al cumplirse ese tiempo, llevar a cabo el paso 4 y 5.

### Paso 4. Recolección de sobrenadante

- Tomar el resto del sobrenadante de los triplicados de una placa y juntarlos en un tubo de 1 mL.
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C.
- Pasar el sobrenadante por un filtro de 0.22  $\mu$ m de 4 mm de diámetro y colocarlo en un tubo de 1 mL.
- Congelar a -70°C hasta la medición de citocinas por ELISA.

### Paso 5. Determinación de carga bacteriana en macrófagos.

- Etiquetar correctamente las cajas Petri con agar 7H10 y hacer líneas con marcador en la parte exterior de la base de la placa para dividirla en 8 partes iguales.
- Colocar en una placa de poliestireno de 96 pozos con fondo convexo 270  $\mu\text{L}$  de medio 7H9 por pozo.
- Luego de tomar el sobrenadante para medir citocinas, colocar 100  $\mu\text{L}$  de 7H9 con SDS al 0.1%, mezclar vigorosamente y raspar en cruz el fondo de la placa durante 10 min a temperatura ambiente.
- Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de 7H9 con BSA al 20% a los pozos.
- Tomar 30  $\mu\text{L}$  de cada uno de los pozos correspondientes a cada concentración de compuesto probada y colocarlos en un pozo con 270  $\mu\text{L}$  de medio 7H9 por pozo, resuspendiendo 10 veces (dilución 1:10).
- Una vez resuspendido tomar 30  $\mu\text{L}$  de ese pozo y pasarlo al siguiente pozo previamente relleno con 270  $\mu\text{L}$  de medio 7H9 resuspendiendo 10 veces (dilución 1:100).
- Realizar el proceso anterior 2 veces más (dilución 1:1000 y 1:10000), descartando los últimos 30  $\mu\text{L}$  en pozos vacíos de la placa.
- Tomar una caja Petri con medio 7H10 y colocar por duplicado 10  $\mu\text{L}$  del concentrado (tomado directamente de la placa donde se hizo el ensayo) y de cada dilución (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000).
- Dejar absorber las muestras en el agar colocando las placas con tapa hacia arriba y prender la luz UV.

- Colocar las placas en bolsas con la tapa hacia abajo, sellar e incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- Hacer el conteo de unidades formadoras de colonias (UFCs) a los 14 y 21 días después de sembrar.

#### IV.4. MÉTODO DE KILLING ESTIMULANDO CON EL COMPUESTO AZUL A LA PAR DE LA INFECCIÓN.

Este ensayo tiene el objetivo de determinar si el compuesto a probar al colocarse al mismo tiempo que se infectan macrófagos MH-S con *M. tuberculosis* es capaz de generar un aumento o disminución en la capacidad de estas células para destruir a la micobacteria una vez fagocitada.

Preparación del inóculo: Tomar los crioviales necesarios del ultracongelador a -70°C con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC o Stanford del cual ya se sabe la concentración. Descongelar la bacteria colocando los crioviales a 37°C durante 10 minutos. Finalmente, homogeneizar en un vórtex y tomar el volumen necesario para hacer una suspensión de  $2 \times 10^6$  bacterias/300  $\mu$ L de medio RPMI completo tomando en cuenta que en cada pozo se agregan 300  $\mu$ L.

Montaje de la placa: Emplear 2 placas estériles de poliestireno de 12 pozos y fondo plano con tapa para cada día experimento.

##### Paso 1. Sembrado de células

- Realizar el *paso 1. Sembrado de células del ensayo de citotoxicidad* hasta el punto 10.

- Hacer una suspensión de  $2 \times 10^5$  células/500  $\mu\text{L}$  y calcular el volumen necesario para colocar 500  $\mu\text{L}$  en todos los pozos de las 8 placas a usar (D0, D1, D3 y D7) más un exceso de 1/10.
- Dejar las células incubando durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

### Paso 2. Estímulo e infección (1 placa por cada tiempo).

- Hacer la suspensión de bacteria y sonicarla durante 45 segundos.
- Retirar el sobrenadante de cultivo de las células que van a ser infectadas.
- Añadir 200  $\mu\text{L}$  de la solución de bacterias en los pozos de la mitad de las placas (1 placa por cada tiempo).
- Añadir el compuesto azul en los pozos correspondientes para obtener una concentración final de 1, 2.5 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Incubar 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .
- Descartar el sobrenadante en cajas de Petri, evitando hacer burbujas y formar aerosoles. Realizar 3 lavados con 200  $\mu\text{L}$  de RPMI con antibiótico.
- Añadir 500  $\mu\text{L}$  de RPMI en todos los pozos.
- Dejar incubando a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 1 hora (Día 0), 24 horas (Día 1), 72 horas (Día 3) y 168 horas (Día 7).

### Paso 4. Seguimiento

- A partir del día 3, colocar diariamente en las placas del día 3 y 7 la concentración previamente establecida de compuesto azul en los pozos correspondientes.

- En el día 5, colocar 1mL de medio RPMI completo a las placas correspondientes al día 7.
- Al cumplirse el tiempo de incubación, llevar a cabo el paso 5 y 6.

Paso 5. Recolección de sobrenadantes:

- Tomar el sobrenadante de los triplicados de una placa y juntarlos en un tubo de 1 mL.
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C.
- Pasar el sobrenadante por un filtro de 0.22 µm de 4 mm de diámetro y colocarlo en un tubo de 1 mL.
- Congelar a -70°C hasta la medición de citocinas por ELISA.

Paso 6. Determinación de carga bacteriana en macrófagos: \*Se realiza solo en las placas con macrófagos infectados con *M. tuberculosis*.

Realizar el *paso 5. Determinación de la carga bacteriana en el ensayo de Método de killing pre estimulando con los compuestos azul y rojo* cambiando solamente el volumen a usar de SDS al 0.1% y BSA al 20% a 200 µL.

#### IV.5. MÉTODO DE KILLING ESTIMULANDO CON LOS COMPUESTOS AZUL DESPUES DE SU INFECCIÓN.

Este ensayo tiene el objetivo de determinar si el compuesto a probar al colocarse después de infectar macrófagos MH-S con *M. tuberculosis* es capaz de generar un aumento o disminución en la capacidad de estas células para destruir a la micobacteria una vez fagocitada.

Preparación del inoculo: Tomar los crioviales necesarios del ultracongelador a -70°C con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC o Stanford del cual ya se sabe la concentración. Descongelar la bacteria colocando los crioviales a 37°C durante 10 minutos. Finalmente, homogeneizar en un vórtex y tomar el volumen necesario para hacer una suspensión de  $1 \times 10^6$  bacterias/500  $\mu$ L de medio RPMI completo tomando en cuenta que en cada pozo se agregan 500  $\mu$ L.

Montaje de la placa: Emplear 1 placa estéril de poliestireno de 12 pozos y fondo plano con tapa para cada día experimento.

Paso1. Sembrado de células

- Realizar el *paso 1. Sembrado de células del ensayo de citotoxicidad* hasta el punto 10.
- Hacer una suspensión de  $1 \times 10^5$  células/500  $\mu$ L y calcular el volumen necesario para colocar 500  $\mu$ L en todos los pozos de las 4 placas a usar (D0, D1, D3 y D7) más un exceso de 1/10.
- Dejar las células incubando durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Paso 3. Infección y estímulo (1 placa por cada tiempo).

- Hacer la suspensión de bacteria y sonicarla durante 45 segundos.
- Retirar el sobrenadante de cultivo de las células que van a ser infectadas.
- Añadir 500  $\mu$ L de la solución de bacterias en los pozos de todas las placas (1 placa por cada tiempo).
- Incubar 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

- Descartar el sobrenadante en cajas de Petri, evitando hacer burbujas y formar aerosoles. Realizar 3 lavados con 200  $\mu$ L de RPMI con antibiótico.
- Añadir 500  $\mu$ L del compuesto azul en los pozos correspondientes al tiempo 0 y Día 1, y 1 mL en las placas del día 3 y 7 para obtener una concentración final de 5, 25 y 50  $\mu$ g/mL .
- Dejar incubando a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 hora (Día 0), 24 horas (Día 1), 72 horas (Día 3) y 168 horas (Día 7).

### Paso 4. Seguimiento

- En el día 5, colocar 1 mL de medio RPMI completo a las placas correspondientes al día 7.
- Al cumplirse el tiempo de incubación, llevar a cabo el paso 4 y 5.

Realizar el *paso 5. Determinación de la carga bacteriana en el ensayo de Método de killing pre estimulando con los compuestos azul y rojo* cambiando solamente el volumen a usar de SDS al 0.1% y BSA al 20% a 200 $\mu$ L.

### IV.6. MÉTODO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD FAGOCÍTICA.

Este ensayo tiene el objetivo de determinar si el compuesto a probar es capaz de tener un efecto sobre la actividad fagocítica de macrófagos MH-S sobre *M. tuberculosis*.

Preparación del inoculo: Tomar los crioviales necesarios del ultracongelador a -70°C con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC o Stanford del cual ya se sabe la concentración. Descongelar la bacteria colocando los crioviales a 37°C durante 10 minutos. Finalmente, homogeneizar en un vórtex y tomar el volumen necesario

para hacer una suspensión de  $6 \times 10^5$  bacterias/400  $\mu\text{L}$  de medio RPMI completo tomando en cuenta que en cada pozo se agregan 400  $\mu\text{L}$ .

Montaje de la cámara- portaobjetos (chamber-slide): Se emplearon chamber-slides con 4 pozos de volumen final de 500  $\mu\text{L}$ .

Paso 1. Sembrado de células:

- Realizar el *paso 1. Sembrado de células del procedimiento de citotoxicidad*. Hacer una suspensión de  $3 \times 10^4$  células/500  $\mu\text{L}$ . Se calcula el volumen necesario para colocar 500  $\mu\text{L}$  en cada uno de los pozos más un exceso de 1/10.
- Colocar las células y dejar incubando durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

Paso 2. Preestimulación:

- Colocar en el primer pozo la cantidad necesaria del compuesto azul para obtener una concentración final de 8  $\mu\text{g/mL}$ .
- Regresar a incubación durante 24 horas más a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

Paso 3. Infección:

- Hacer la suspensión de bacteria y sonicarla durante 45 segundos.
- Quitar el sobrenadante de todos los pozos y colocar la suspensión de bacteria. En el segundo cuadrante colocar cierta cantidad del compuesto

azul para obtener una concentración final de 8 µg/mL. El volumen final de todos los pozos es de 500 µL.

- Dejar incubando por una hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- Retirar todos los estímulos y lavar cada pozo con 3 veces con 200 µL de RPMI + antibiótico.

### Paso 4. Postestimulación:

- Colocar en el tercer pozo cierta cantidad del compuesto azul para obtener una concentración final de 8 µg/mL y en el resto de los pozos 500 µL de RPMI completo.
- Dejar incubando una hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- Agregar 200 µL de metanol a todos los pozos y dejar incubando durante 10 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- Separar la cámara del portaobjetos y hacer una tinción de Ziehl Neelsen.

### Paso 5. Tinción de Ziehl-Neelsen:

- Colocar el colorante fucsina fenicada en todo el portaobjetos durante 5 minutos.
- Lavar con agua y agregar gotas de alcohol-ácido hasta que ya no se desprenda color.
- Lavar con agua y dejar secar.
- Colocar el colorante azul de metileno durante 5 minutos.

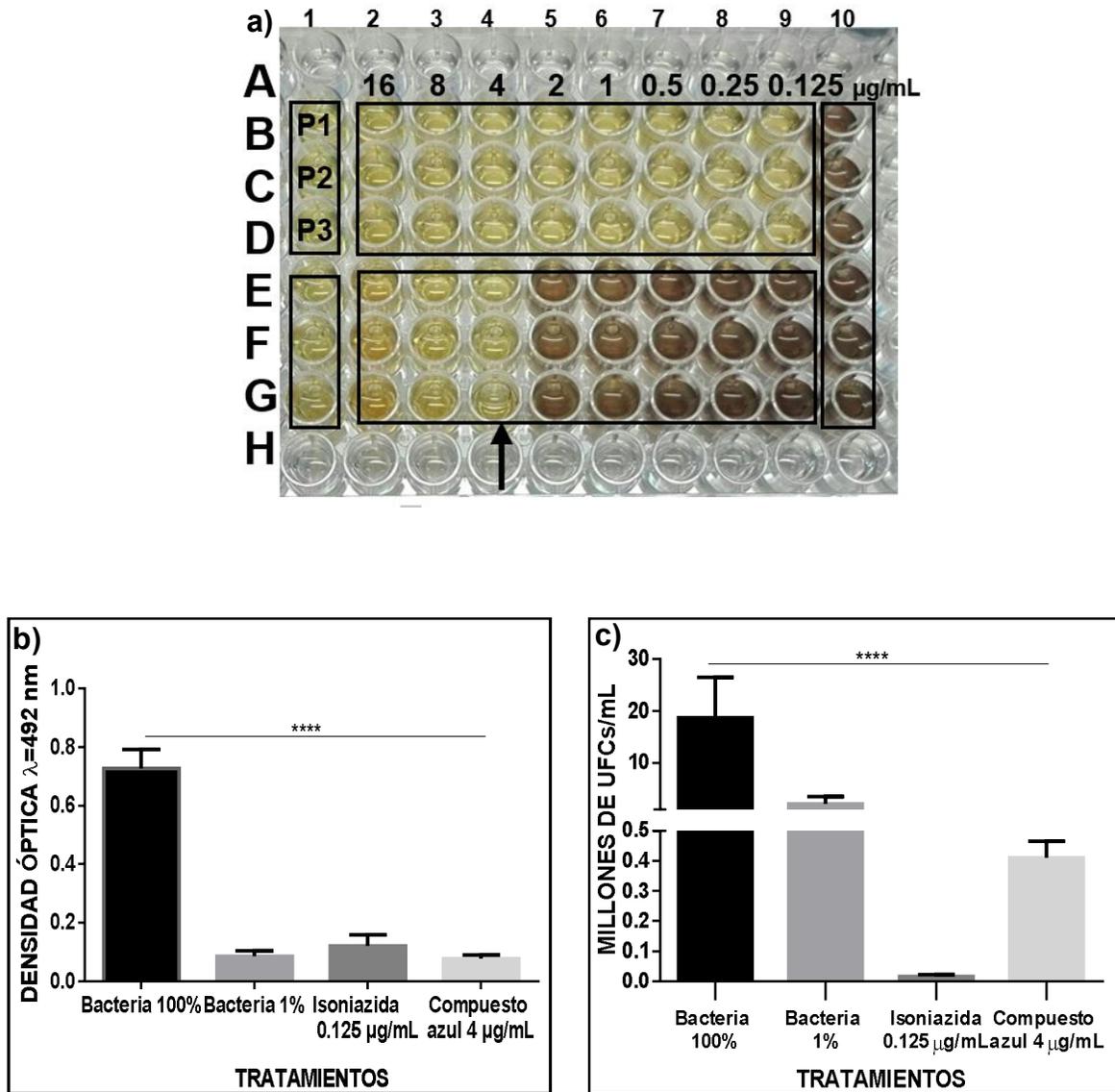
- Lavar con agua y una vez completamente seco colocar la resina y un cubreobjetos sobre la laminilla.
- Observar al microscopio con el lente de inmersión (100x).
- Dividir imaginariamente cada pozo en 4 secciones y en cada sección contar los macrófagos de cada una de las esquinas y el centro hasta llegar a un total de 300 macrófagos en cada pozo.

# **CAPÍTULO V. RESULTADOS**

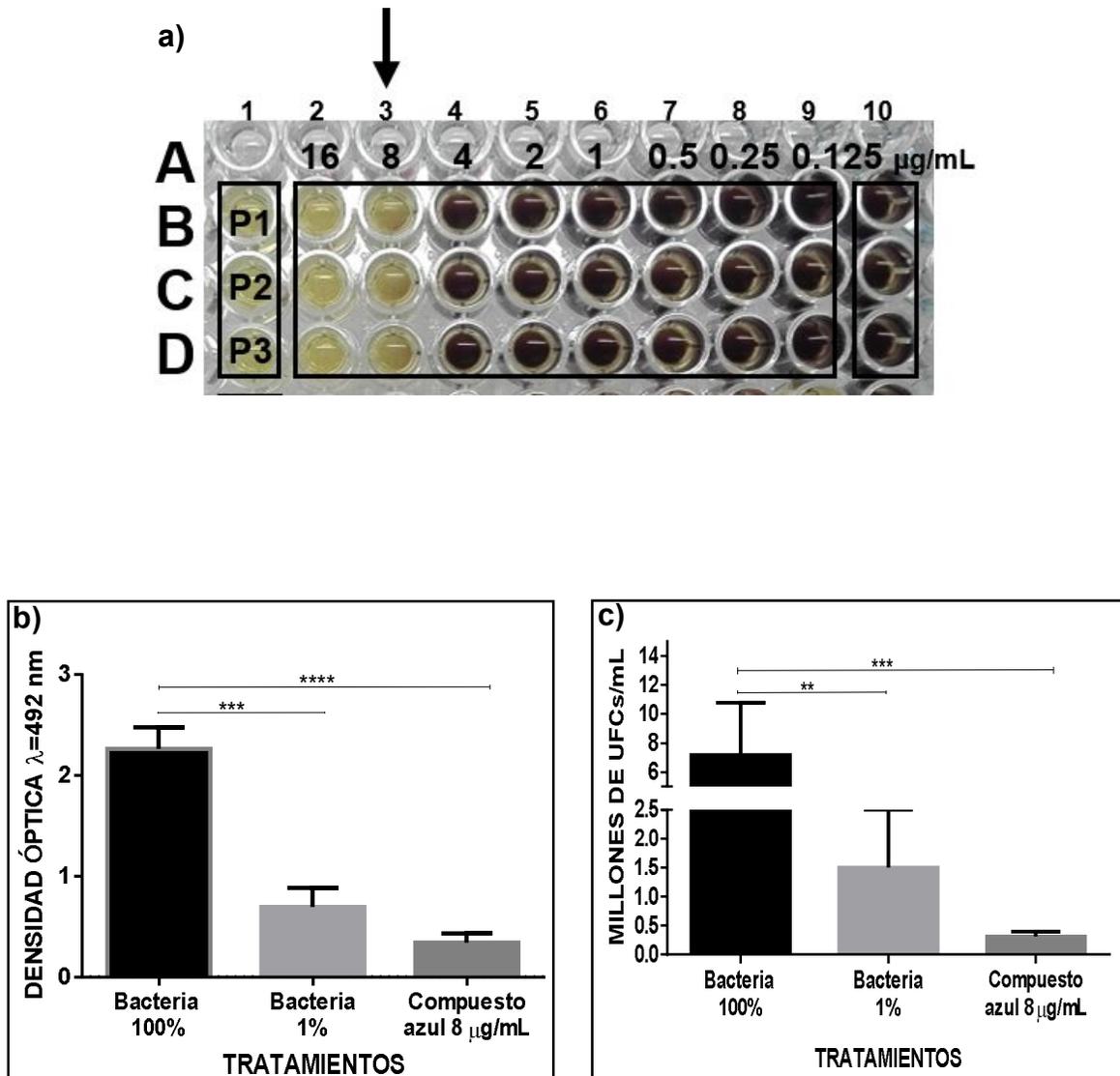
## V. RESULTADOS

### V.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

**El compuesto AZUL tiene actividad microbicida sobre *M. tuberculosis* H37Rv del ATCC y Stanford.** En el primer ensayo realizado se determinó una MIC de 4 µg/mL (columna 4, E a G) para el compuesto azul (Fig. 6). Al comparar los pozos con bacteria al 100% (columna 10, B a G) contra los pozos que estuvieron en contacto con la MIC del compuesto azul se puede ver una amplia disminución tanto en la densidad óptica como en las UFCs (Fig. 6b y 6c), llegando a ser significativa. Inclusive se ve una menor carga bacteriana con respecto a los pozos de bacteria al 1% (columna 1, E a G) aunque no menor que los pozos con isoniazida [0.125 µg/mL] (columna 9, B a D) (Fig. 6c). El mismo resultado se obtuvo para la cepa H37Rv Stanford (Fig. 7).

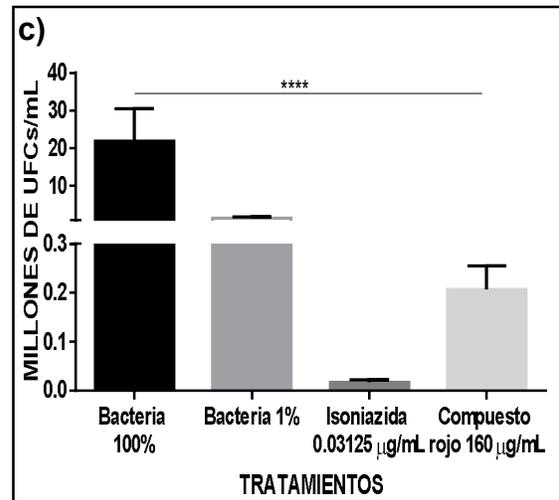
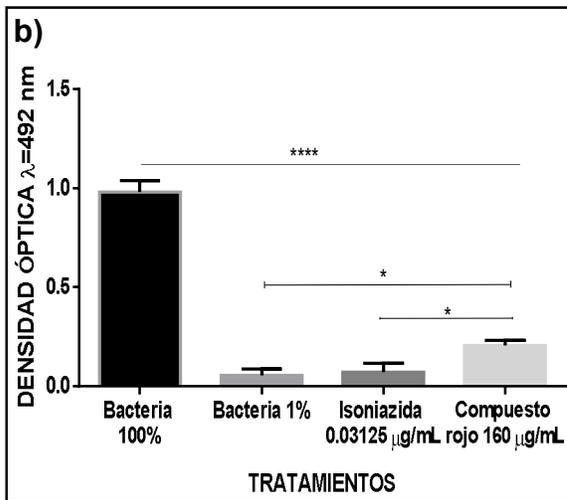
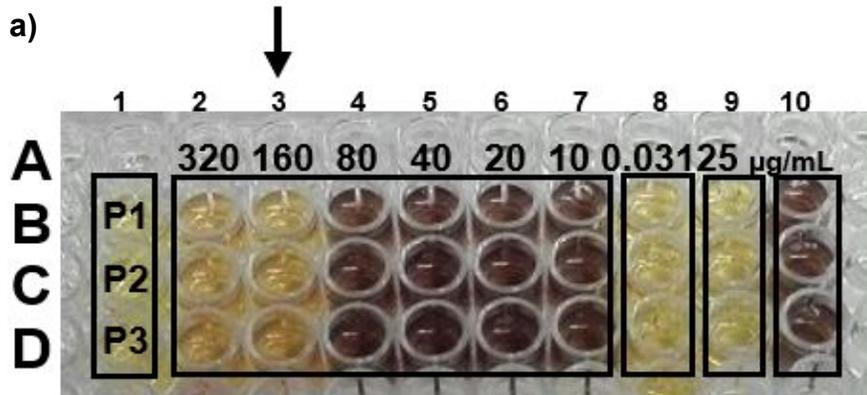


**Figura 6.** a) y b) Lectura de la densidad óptica del ensayo de MIC para el compuesto AZUL (1er lote) H37Rv ATCC. c) Determinación de UFCs para el ensayo de MIC del compuesto azul. Flecha indica la MIC. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas  $\pm$  DE. ANOVA (1 vía) \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.



**Figura 7.** Ensayo colorimétrico para detectar la MIC del compuesto AZUL para (2do lote) H37Rv Stanford. Fila B a D (Columna 2 a 9) corresponden al compuesto azul a las concentraciones correspondientes, Fila B a D (Columna 1) corresponde al control de bacteria al 1% y (Columna 10) al control de bacteria al 100%. a) y b) Lectura de la densidad óptica del ensayo de MIC para el compuesto azul en H37Rv Stanford. c) Determinación de UFCs para el ensayo de MIC del compuesto azul. La flecha indica la MIC. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas  $\pm$  DE. ANOVA (1 vía) \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

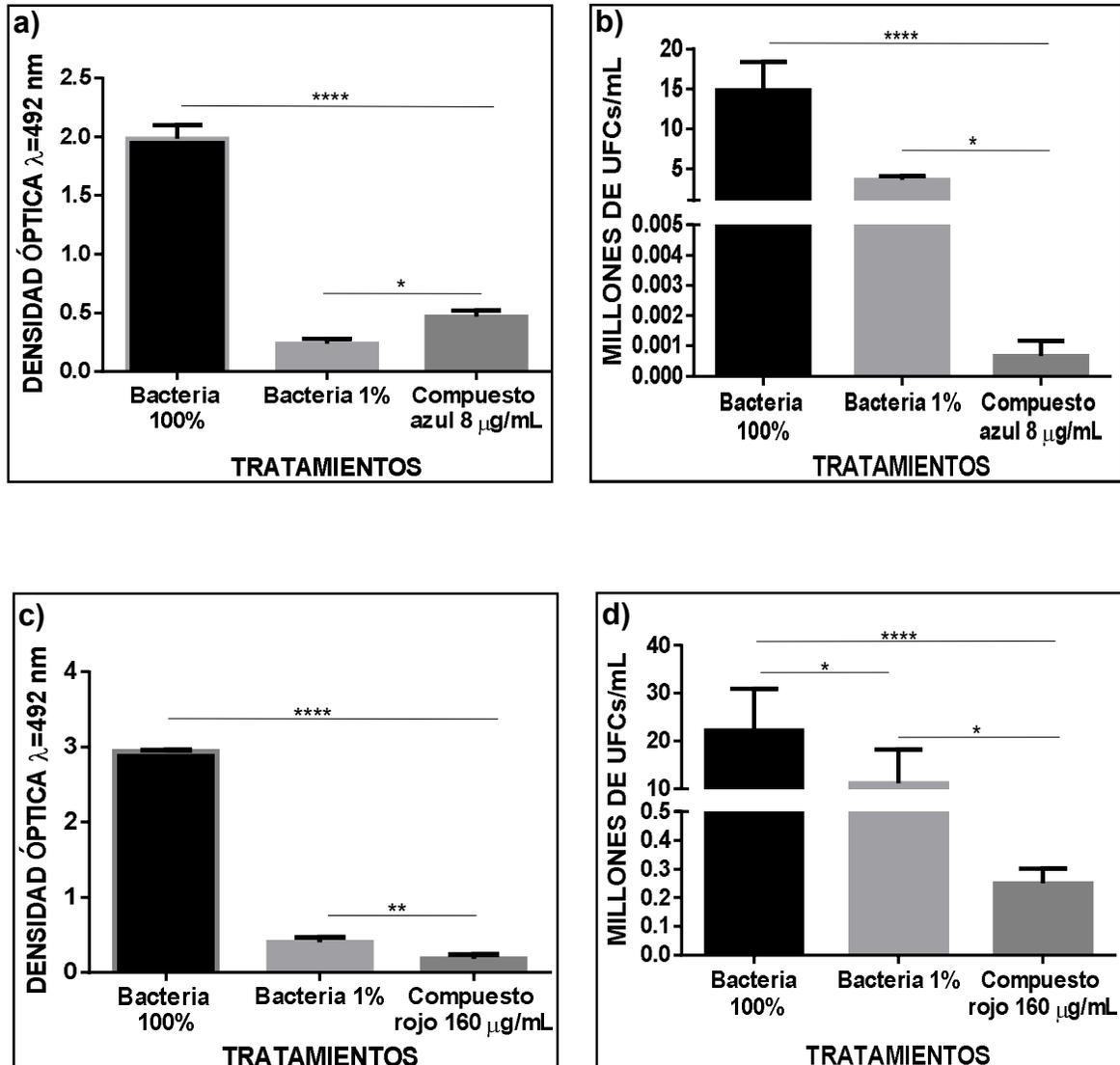
**El compuesto ROJO tiene actividad microbicida sobre *M. tuberculosis* H37Rv ATCC.** En el ensayo probando el compuesto rojo se obtuvo una MIC de 160 µg/mL (columna 3, B a D) (Fig. 8a), 40 veces más grande que el compuesto azul. Al comparar los pozos con bacteria al 100% (columna 10, B a D) contra los pozos que estuvieron en contacto con el compuesto rojo [160 µg/mL] (flecha negra) se puede ver una amplia disminución tanto en la densidad óptica como en las UFCs (Fig. 8b y 8c). Se observa también una menor carga bacteriana con respecto a los pozos de bacteria al 1% (columna 9, B a D) pero una cantidad de UFCs mayor a la de los pozos con isoniazida [0.03125 µg/mL] (columna 8, B a D).



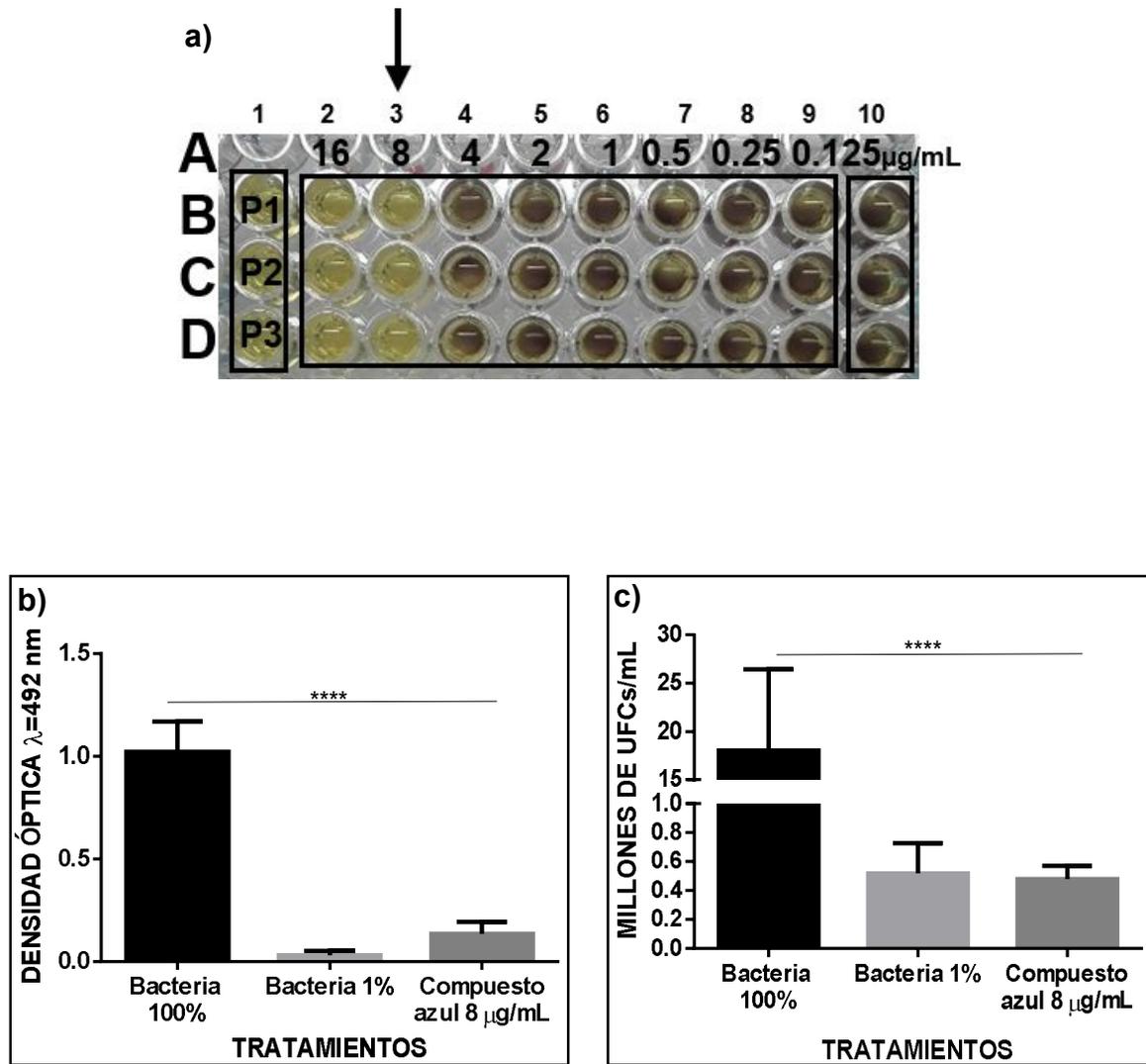
**Figura 8.** a) y b) Lectura de la densidad óptica del ensayo de MIC para el compuesto ROJO (1er lote) en H37Rv ATCC. c) Determinación de UFCs para el ensayo de MIC del compuesto rojo. La fecha indica la MIC. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas  $\pm$  DE. ANOVA (1 vía) \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

El compuesto **AZUL** y **ROJO** tienen actividad microbicida sobre *M. tuberculosis* **MDR**. En la determinación de la MIC para el aislado clínico MDR se obtuvo la misma concentración que arrojaron los ensayos con H37Rv para ambos compuestos, es decir 8 µg/mL para el compuesto azul y 160 µg/mL para el compuesto rojo. Se puede ver una disminución significativa de la cantidad de bacterias entre los pozos del control de bacteria al 100% y los pozos con el compuesto rojo y azul (Fig. 9b y 9d). Inclusive se observa que la carga bacteriana es mucho menor que en los pozos del control de bacteria al 1%. Se llevó a cabo la repetición de la MIC con MDR y se obtuvo el mismo resultado para el compuesto azul, es decir, 8µg/mL (Fig. 10).

## RESULTADOS



**Figura 9.** a) y c) Lectura de la densidad óptica del ensayo de MIC para el compuesto AZUL (2do lote) y ROJO (1er lote) utilizando una cepa MDR de Mtb. b) y d) Determinación de UFCs en el ensayo de MIC para el compuesto rojo y azul utilizando una cepa MDR de Mtb. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas  $\pm$  DE. ANOVA (1 vía) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.



**Figura 10.** Repetición del ensayo colorimétrico para detectar la MIC del compuesto AZUL (2do lote) para MDR. Fila B a D (Columna 2 a 9) corresponden al compuesto azul a las concentraciones correspondientes, y (Columna 10) al control de bacteria al 100%.

a) y b) Lectura de la densidad óptica del ensayo de MIC para el compuesto azul en MDR. c) Determinación de UFCs para el ensayo de MIC del compuesto azul. La flecha indica la MIC. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas  $\pm$  DE. ANOVA (1 vía) \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

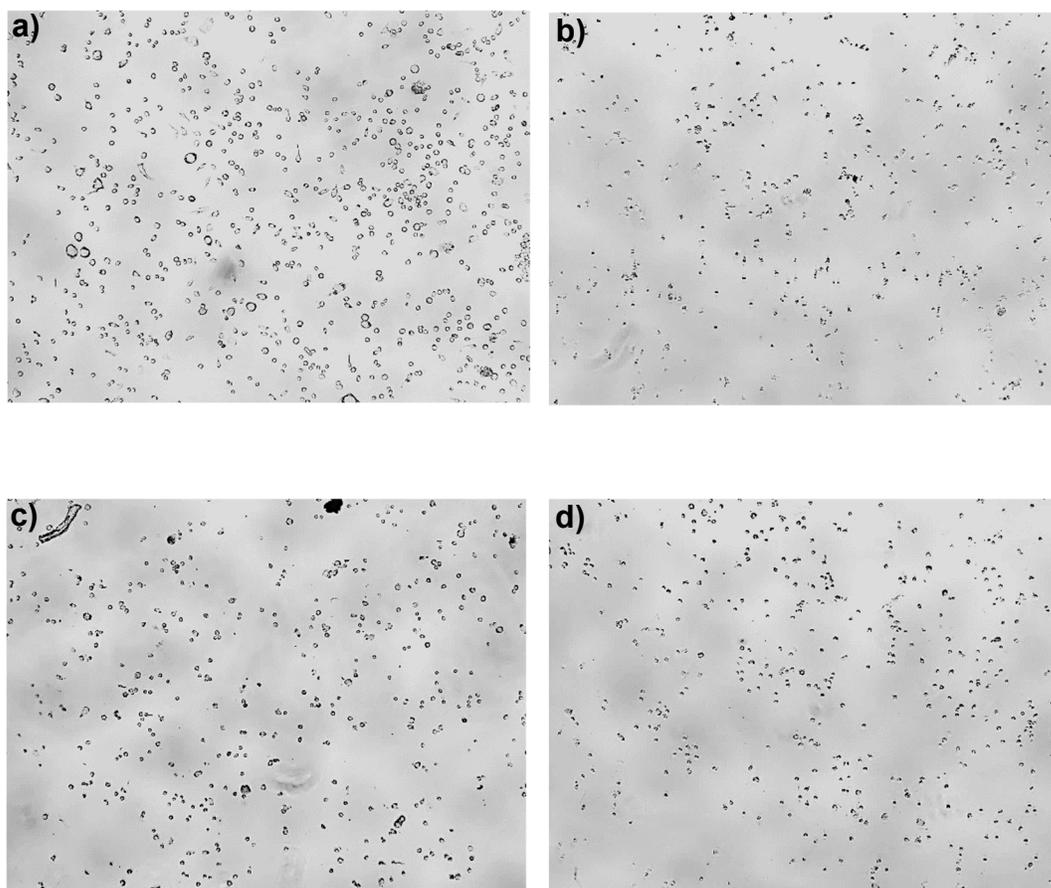
## RESULTADOS

	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) (1er lote)	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) (2do lote)
Compuesto azul		
<b><i>M. tuberculosis</i> H37Rv (ATCC)</b>	4	-
<b><i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Stanford)</b>	-	8
<b><i>M. tuberculosis</i> MDR (aislado)</b>	-	8/8
Compuesto rojo		
<b><i>M. tuberculosis</i> H37Rv (ATCC)</b>	160	-
<b><i>M. tuberculosis</i> MDR (aislado)</b>	160	-

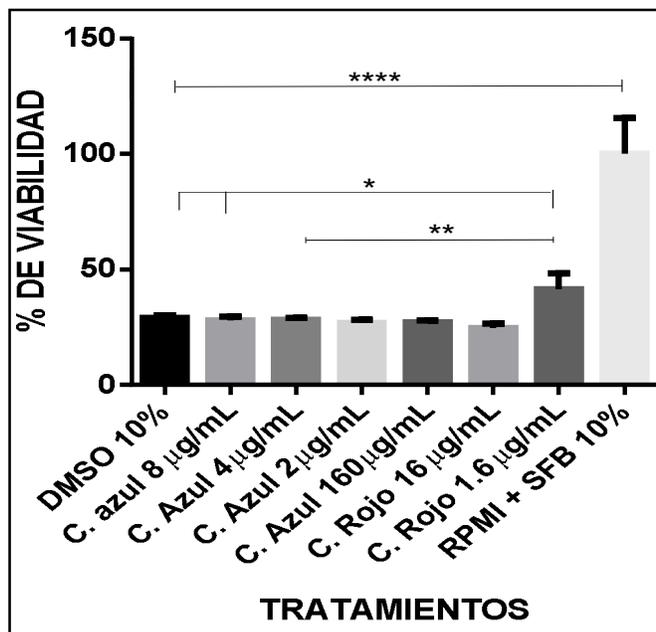
**Tabla1.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) de los compuestos rojo y azul para diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y MDR.

### V.2. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS AZUL Y ROJO EN LA LÍNEA CELULAR MH-S

**El compuesto azul y rojo son citotóxicos para las células MH-S a concentraciones de 2 a 8 µg/mL y 16 a 160 µg/mL respectivamente.** Al poner en contacto los compuestos azul y rojo con diferentes concentraciones con macrófagos murinos MH-S durante 48 horas se pudo observar que disminuyó el porcentaje de la población del cultivo celular (Fig. 11) inclusive al mismo nivel que los expuestos a Dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración del 10% (Fig. 12). El compuesto rojo a 1.6 µg/mL no es tóxico sin embargo se trata de una concentración 100 veces menor que la MIC.



**Figura 11.** Imágenes tomadas en microscopio invertido (objetivo 10X), son representativas de los seis pozos del ensayo de citotoxicidad después de poner las células MH-S en contacto con las diferentes sustancias: a) RPMI con SFB al 10% b) DMSO al 10% c) C. azul [8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] d) C. rojo [160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].

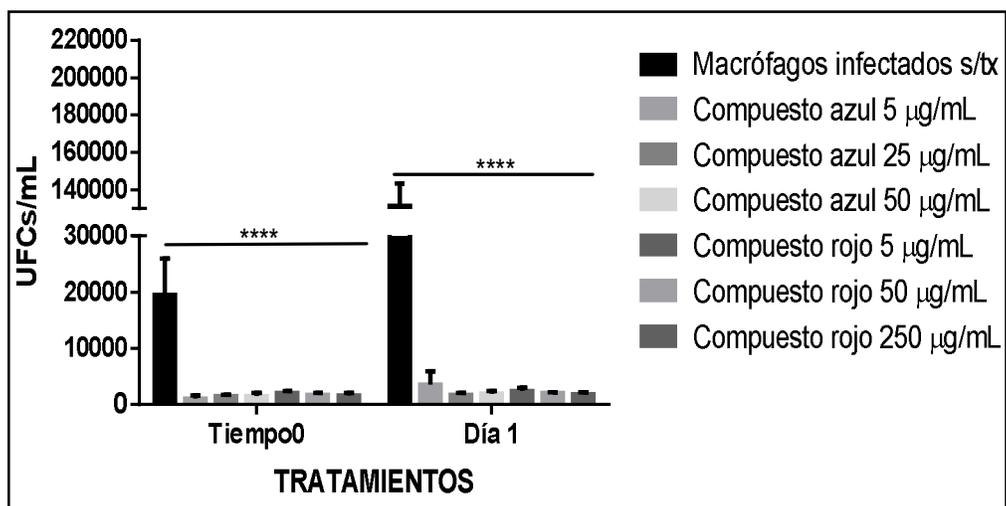


**Figura 12.** Porcentaje de células MH-S vivas al ponerse en contacto con diferentes concentraciones del compuesto azul (2do lote) (8, 4 y 2 µg/mL) y compuesto rojo (160, 16 y 1.6 µg/mL) durante 48 horas. Las barras representan la media de 6 muestras paralelas ± DE. ANOVA (1 vía) \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

V.3. DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA AL INFECTAR UN CULTIVO DE MACRÓFAGOS CON MTB Y ESTIMULARLO CON LOS COMPUESTOS ROJO Y AZUL.

CONDICIÓN: Pre-estimulación

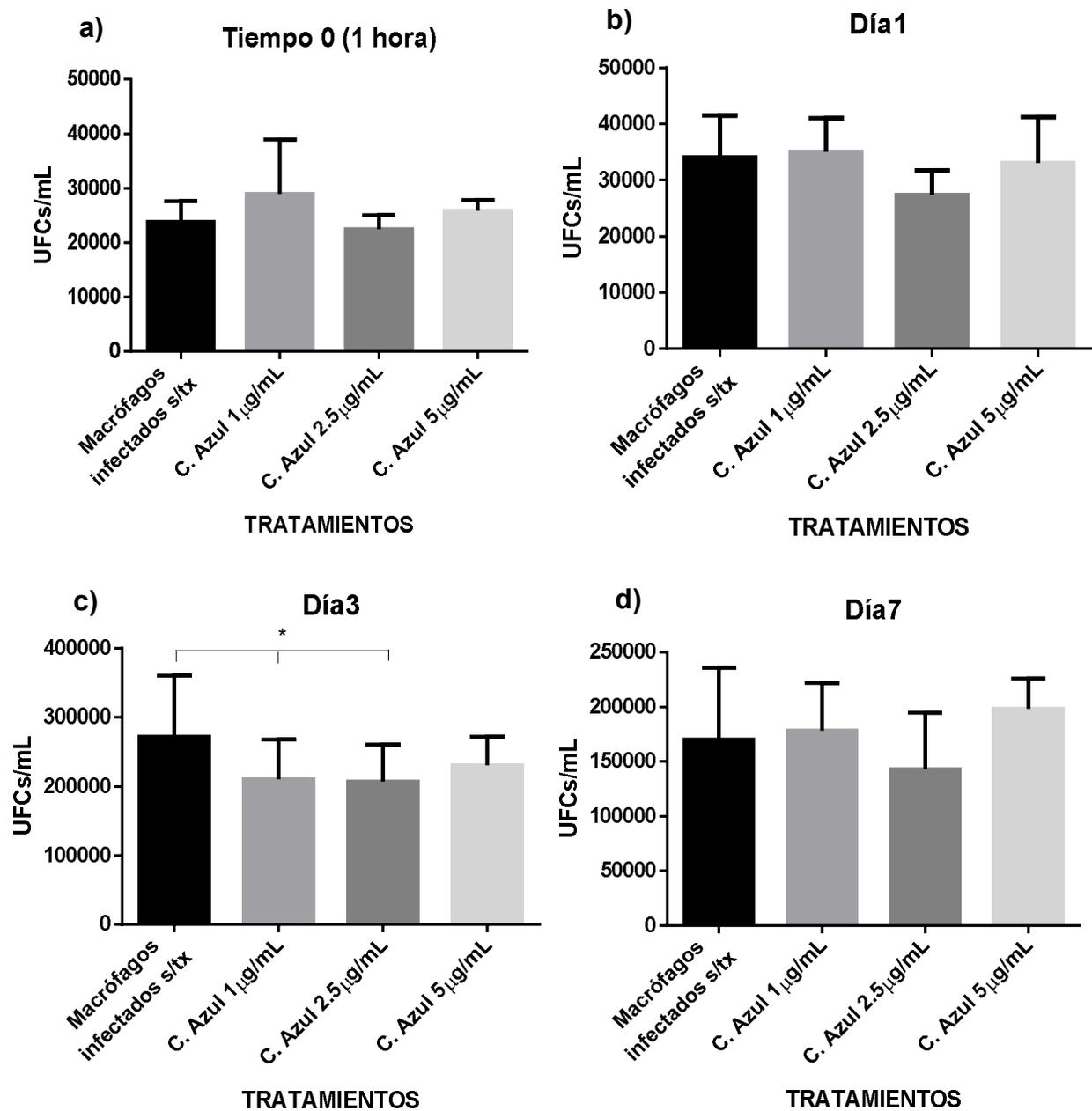
**Los compuestos azul y rojo al ponerse en contacto con macrófagos murinos MH-S que después son infectados con Mtb generan una disminución en la cantidad de bacterias intracelulares.** Los resultados del ensayo de killing muestran que al poner en contacto los compuestos durante todo un día con los macrófagos y después infectarlos por una hora con *M. tuberculosis* H37Rv se disminuye la cantidad de bacterias que se encuentran dentro del macrófago. Esto se ve en las barras correspondientes para Tiempo 0, donde la carga bacteriana disminuyó significativamente 1 hora después de iniciar la infección (Fig.13). Cabe señalar que antes de iniciar la infección se observó una disminución en la población celular de los pozos que habían sido expuestos a las diferentes concentraciones de compuesto azul y rojo.



**Figura 13.** Carga bacteriana dentro de macrófagos MH-S infectados con *M. tuberculosis* H37Rv ATCC (MOI 1:5) y pre estimulados 24 horas antes con diferentes concentraciones del compuesto azul (5, 25 y 50 µg/mL) y compuesto rojo (5, 50 y 250 µg/mL). Las barras representan la media de 6 muestras paralelas ± DE. ANOVA (2 vías) \*\*\*\* $p < 0.0001$ , Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

CONDICIÓN: Estimulación a la par

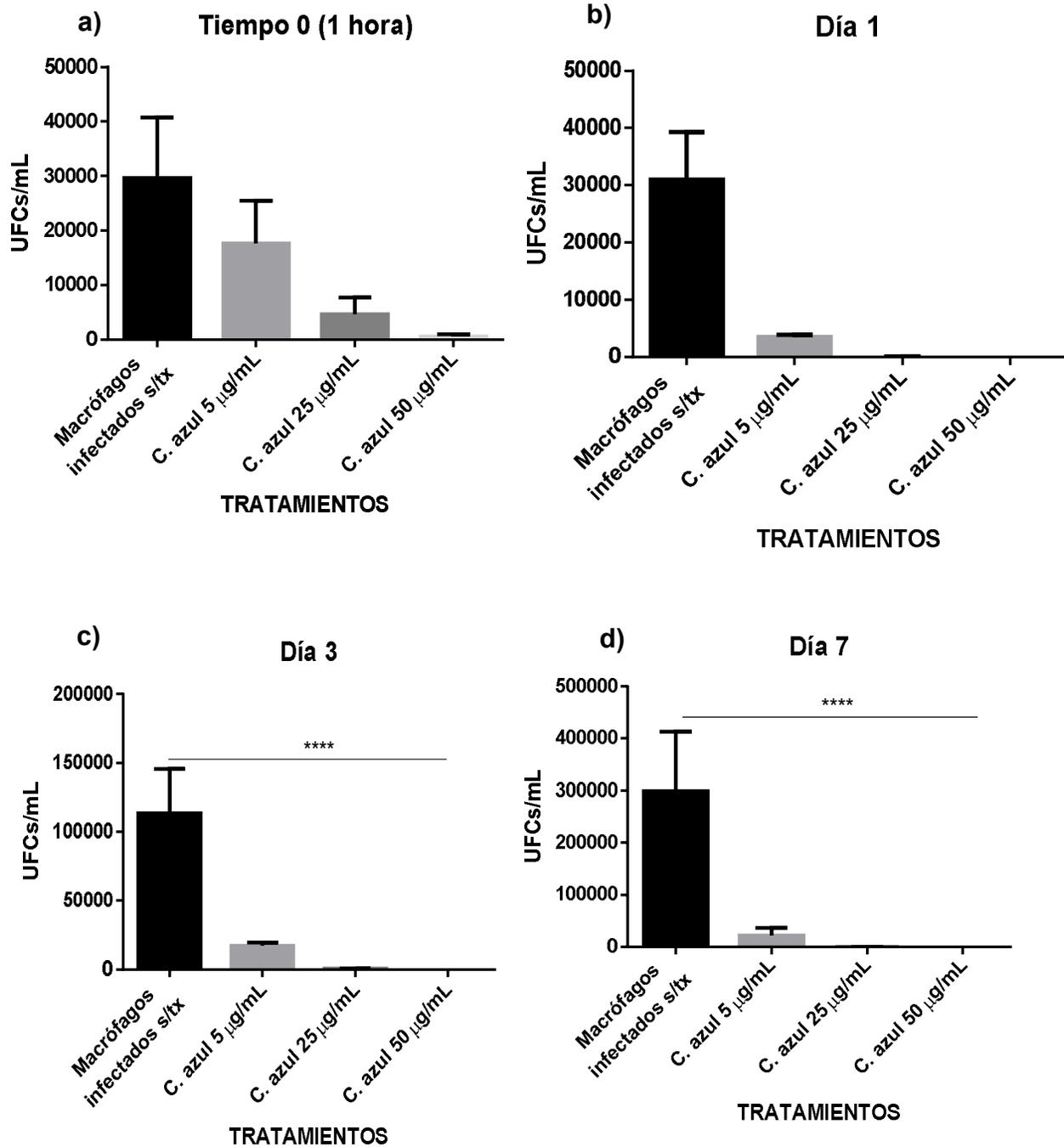
**El compuesto azul al estar en contacto con el macrófago en diferentes concentraciones cuando se está infectando con Mtb aumenta su capacidad para matar a las bacterias ya fagocitadas al día 3 post-infección.** Al día 1 las concentraciones usadas del compuesto azul no generaron un cambio significativo en la carga bacteriana con respecto al control de macrófagos sin compuesto, sin embargo, al día 3 que es cuando se empezó a suplementar el cultivo celular con más compuesto se puede ver que la carga bacteriana empezó a disminuir. A pesar de que no se ve diferencia entre las dosis usadas, la concentración de 2.5 µg/mL en todos los tiempos es la que tiene menor carga bacteriana llegando a ser significativa al día 3 con respecto al control de macrófagos sin tratamiento al igual que la dosis de 1 µg/mL (Fig.14).



**Figura 14.** Carga bacteriana dentro de macrófagos MH-S infectados con *M. tuberculosis* H37Rv ATCC (MOI 1:5) y estimulados a la par con diferentes concentraciones del compuesto azul (3er lote) (1, 2.5 y 5 µg/mL). a) 1 hora b) 1 día c) 3 días d) 7 días. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas ± DE. ANOVA (2 vías) \* $p < 0.05$ , Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

### CONDICIÓN: Post-Estimulación

**El compuesto azul al estar en contacto con el macrófago después de haber sido infectado con Mtb aumenta su capacidad para matar a las bacterias fagocitadas.** Todas las concentraciones usadas del compuesto azul generaron un cambio significativo en la carga bacteriana al día 3 y 7 después de la estimulación. Se puede observar un efecto dosis-respuesta donde mientras más aumenta la concentración de compuesto azul más disminuye la carga bacteriana (Fig. 15).

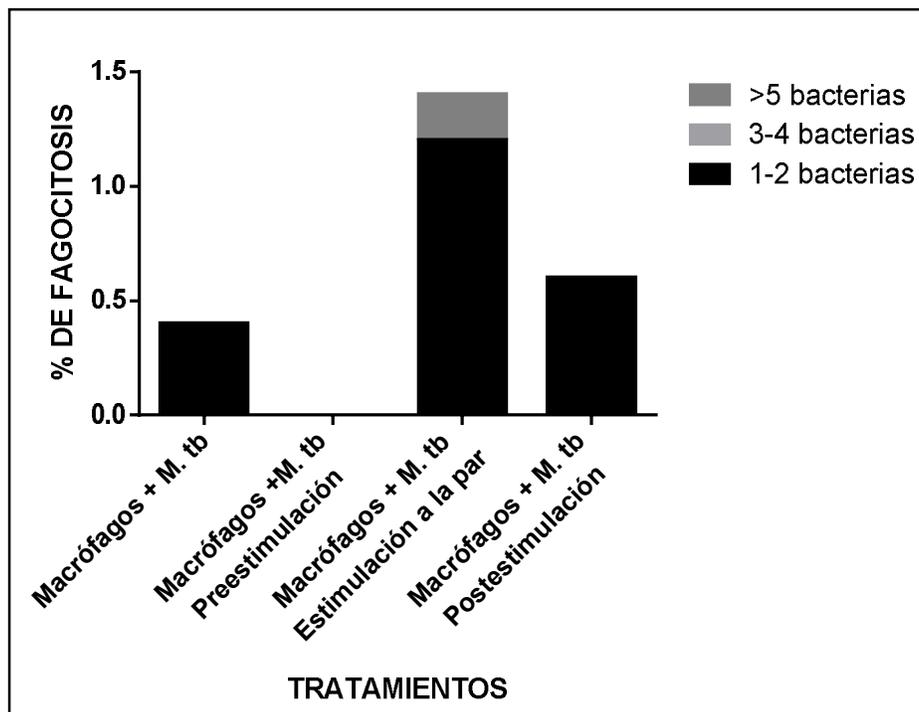


**Figura. 15.** Carga bacteriana dentro de macrófagos MH-S infectados con *M. tuberculosis* H37Rv ATCC (MOI 1:5) y estimulados post infección con diferentes concentraciones del compuesto azul (4to lote) (5, 25 y 50 µg/mL). Las barras representan la media de 3 muestras paralelas ± DE. ANOVA (2 vías) \*\*\*\* $p < 0.0001$ , Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

## V.4. DETERMINACIÓN DE LA FAGOCITOSIS

**El compuesto azul favorece la fagocitosis de *M. tuberculosis* H37Rv del ATCC en macrófagos al estar en contacto con las células durante o después de su infección.**

Los mayores porcentajes de fagocitosis se dieron cuando el compuesto se puso en contacto al mismo tiempo con el macrófago y la bacteria (1.2%) o en menor proporción cuando el compuesto se agrega después de que los macrófagos están infectados (0.6%). Cuando el compuesto se colocó en el cultivo celular 18 horas antes de la infección no se observó fagocitosis (Fig.16).



**Figura 16.** Porcentaje de fagocitosis de macrófagos MH-S al estar en contacto con *M. tuberculosis* H37Rv ATCC (MOI 1:5) y con el compuesto azul (3er lote) a 4 µg/mL en tres diferentes condiciones: antes, a la par y después de la infección con la bacteria. Las barras representan el porcentaje con respecto al conteo de 300 macrófagos totales.

# **CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN**

## VI. DISCUSIÓN

En este proyecto se utilizó una técnica colorimétrica basada en una reacción oxido-reducción, para determinar la mínima concentración de dos benzoquinonas ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que inhiben el crecimiento de Mtb; el MTS o Cell-Titer 96® AQueous (color amarillo) en presencia de enzimas deshidrogenasas de *Mycobacterium tuberculosis* es reducido a formazán (color café oscuro). Por lo tanto, un cambio en el color café del medio indica que hay presencia de bacterias o en otras palabras que el compuesto no pudo inhibir su crecimiento.

Se determinó que el compuesto azul presenta una MIC de  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 8a). Este resultado se considera prometedor ya que no se aleja mucho de los valores para la MIC de los fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis que son Pirazinamida ( $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), Streptomina ( $0.25\text{-}1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), Etambutol ( $0.06\text{-}0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), Rifampicina ( $0.06\text{-}0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e Isoniazida ( $0.016$  a  $0.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>23</sup>. \*MICs determinadas para Mtb H37Rv (ATCC)\*. En cuanto al compuesto rojo se obtuvo una MIC para H37Rv ATCC de  $160 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 10a) lo cual es mucho más alto que la MIC de los fármacos de primera línea.

Por otra parte, el *Clinical Laboratory Standards Institute*, (CLSI) establece que una sustancia se puede considerar con actividad relevante contra Mtb cuando presenta una MIC menor a  $128 \mu\text{g}/\text{mL}$  para el caso de extractos de plantas o menor a  $25 \mu\text{M}$  para extractos puros<sup>24</sup>. Debido a que lo único que se conoce de la estructura química de los dos compuestos es que son benzoquinonas y por consiguiente no se sabe el peso molecular, los valores reportados en gramos por mililitro ( $\text{g}/\text{mL}$ ) no se pueden convertir a molaridad ( $\text{mol}/\text{L}$  o  $\text{M}$ ) pero utilizando el peso molecular de la benzoquinona como

referencia (108.1 g/mol) el compuesto azul tendría una MIC de 37.04  $\mu\text{M}$  y el rojo de 1481.5  $\mu\text{M}$ . El valor del compuesto azul es el que más se acerca a lo estipulado en la CLSI y suponiendo que el peso molecular sea mayor por la adición de sustituyentes el valor disminuiría entrando en el rango. Al comparar el compuesto rojo vemos que se aleja por mucho de estos valores con lo cual podemos decir que no posee una actividad micobacteriana relevante. A parte de esto, la ventaja de tener una MIC pequeña es que se reduce la probabilidad de efectos secundarios que puedan llegar a ser tóxicos para el organismo haciendo al compuesto rojo una opción no viable para el tratamiento de esta enfermedad.

Para determinar si el compuesto es bactericida (que lo mata completamente) o bacteriostático (que no mata completamente si no que inhibe crecimiento de forma transitoria), se analizaron las UFCs correspondientes a los pozos que tenían la concentración mínima inhibitoria para el compuesto azul. En el ensayo con el compuesto azul y la cepa H37Rv ATCC es notable y significativa la disminución en la carga bacteriana con respecto al control del 100% de bacteria, inclusive se puede ver una menor cantidad de UFCs aunque no significativa con respecto al pozo con bacteria al 1% (Fig. 6c). Aun así, la carga bacteriana del compuesto azul es mayor a comparación de los pozos con isoniazida (0.03125  $\mu\text{g/mL}$ ), esto es porque la cepa utilizada es muy susceptible a este fármaco en específico<sup>4</sup>. La misma tendencia ocurre con el compuesto rojo (Fig. 8c).

En el segundo ensayo con el compuesto azul usando el lote 2 se puede ver (Fig. 7a y 7b) que a pesar de que se empezó con el mismo número de bacterias que en el primer experimento (300,000 bacterias) se obtuvo un resultado diferente en cuanto a niveles de

carga bacteriana. El número de UFCs para el control de bacteria al 100% fue mucho menor a 20 millones que fue lo obtenido en el primer experimento tanto para el compuesto azul y rojo (Fig. 6c y 8c), lo cual se pudo haber debido a la alícuota de bacteria utilizada, lo importante es que las tendencias entre el primer y segundo experimento son similares, es decir que el compuesto azul disminuye de manera significativa la carga bacteriana.

Se comprobó también que ambos compuestos pueden inhibir a la cepa MDR con una MIC de 8  $\mu\text{g/mL}$  y 160  $\mu\text{g/mL}$  para el compuesto azul y rojo respectivamente (Fig. 9). Esto tiene un gran impacto ya que esta cepa ha desarrollado resistencia a los fármacos de primera línea y para controlarla se deben administrar fármacos de segunda línea que son tóxicos y causan muchos efectos adversos, como cefalea, náuseas, vómito, diarrea, etc; probablemente si los compuestos rojo y azul se administran junto con los fármacos de segunda línea *in vivo* podría reducirse el tiempo de tratamiento y por lo tanto disminuir los malestares y al mismo tiempo controlar la infección por Tb.

En el ensayo de citotoxicidad se observa que el compuesto azul mata aproximadamente al 70% de las células a las 3 concentraciones que se usaron en el experimento (8, 4 y 2  $\mu\text{g/mL}$ ) mientras que el compuesto rojo a concentraciones de 160 y 16  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 11). Esto es de importancia ya que la MIC del compuesto azul es de 4  $\mu\text{g/mL}$ , la cual de acuerdo con el experimento de citotoxicidad con cristal violeta mantiene viables al 30% de las células MH-S. Sin embargo, su baja MIC sugiere que puede ser un candidato para probarse en un modelo murino *in vivo* de tuberculosis pulmonar progresiva.

En el caso del compuesto rojo la concentración de 1.6 µg/mL (Fig.11) fue menos tóxica en esta línea celular pero probablemente no pueda matar a la mayoría de las bacterias presentes en el anfitrión ya que su MIC es 100 veces mayor.

El ensayo de killing nos indica de forma cuantitativa la capacidad que tienen los macrófagos de destruir la bacteria al ser estimulados con los compuestos azul y rojo o en otras palabras permite determinar si los compuestos incrementan la capacidad bactericida de estas células. Debido a que se quería estandarizar el ensayo se utilizaron 3 condiciones diferentes para ver en cual se observaba el efecto: pre-estimulación, estimulación a la par y post-estimulación.

Los resultados muestran que en los macrófagos que fueron pre-estimulados con compuesto azul antes de ser infectados hay una disminución en la cantidad de bacterias intracelulares viables con respecto al control (macrófagos infectados sin tratamiento) aunque no de una manera dosis-dependiente (Fig. 13). El compuesto rojo también muestra esta disminución sin embargo aquí si se observa el efecto dosis-respuesta.

En este ensayo la disminución en la cantidad de bacterias se debió principalmente al efecto citotóxico de ambos compuestos sobre los macrófagos ya que se pudo observar una diferencia en la cantidad de células en los pozos de macrófagos infectados sin tratamiento y los tratados con los compuestos, haciendo a esta condición no favorable para observar un efecto de estimulación sobre los macrófagos.

El segundo ensayo de killing con un nuevo lote de compuesto arrojó otros resultados. En este caso se estimuló solamente con el compuesto azul debido a que la MIC del compuesto rojo resultó ser muy alta y se usó la condición a la par, es decir, que el

compuesto azul se puso al mismo tiempo que se hizo la infección con el bacilo. Es importante mencionar que en esta condición no hubo una disminución tan drástica en la cantidad de UFCs como en el ensayo anterior y las micobacterias siguieron replicándose de manera similar dentro de los macrófagos tratados y no tratados (30,000 a 300,000 macrófagos del día 1 al día 3) (Fig. 14b y 14c) indicando que las células estaban viables y no fueron afectadas por el efecto citotóxico del compuesto probablemente debido a que estuvo en contacto con los macrófagos y la bacteria durante 1 hora. A pesar de esto, en todos los días posteriores si se ve una disminución en la carga bacteriana de los macrófagos tratados con compuesto siendo significativa en las concentraciones de 1 y 2.5  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 14c). Debido a que se observa un efecto en la disminución de las UFCs sin verse afectada la viabilidad de los macrófagos, podemos decir que esta condición es la óptima para evaluar si el compuesto tiene un efecto sobre las células, que provoque el incremento de su actividad bactericida.

El tercer experimento de killing es lo más parecido a lo que pasa en la enfermedad en humanos donde los medicamentos se empiezan a dar en una etapa avanzada de la enfermedad, es decir, cuando las bacterias ya se encuentran dentro del macrófago. Al igual que en el primer killing se puede ver una disminución en la carga bacteriana de tipo dosis-dependiente (Fig. 15) siendo significativa a partir del día 3 (Fig. 15c). Se puede decir que este fenómeno observado se debe a la alta muerte celular que induce el compuesto lo cual se comprueba en la concentración más alta (50  $\mu\text{g/mL}$ ) donde no hay crecimiento de ninguna colonia de Mtb.

Por otra parte, en algunos artículos se ha descrito el efecto de las benzoquinonas en líneas celulares cancerígenas llegando a la conclusión que este tipo de compuestos

genera un incremento en la muerte celular en específico, de la apoptosis<sup>25,21,26</sup>. E en algunos casos se pudo observar un aumento en los radicales libres de oxígeno<sup>27</sup>, esto podría explicar la disminución en la cantidad de macrófagos al ser expuestos a los compuestos rojo y azul (Fig. 11) al igual que en los experimentos de killing con las condiciones de pre-estimulación (Fig. 13) y post-estimulación (Fig. 15).

Como último experimento se realizó un ensayo de fagocitosis donde se comprobó que el compuesto azul si genera un aumento de la actividad fagocítica solo cuando se pone en contacto con ambos el bacilo y el macrófago (a la par) o cuando el macrófago ya está infectado (post-estimulación) (Fig. 16). Esto es de suma importancia ya que se pone de manifiesto el efecto directo sobre la bacteria y el efecto también sobre el macrófago ya infectado. Lo cual puede significar que el compuesto tiene efecto sobre el macrófago o que puede entrar al macrófago infectado y una vez dentro destruir a la bacteria. Se puede decir que el proceso evaluado se trata de fagocitosis ya que la micobacteria tiene dimensiones de 0,2 a 0,6 x 1 a 10  $\mu\text{m}$  siendo una condición de este proceso que las partículas midan más de 5 $\mu\text{m}$ .

Explicando con mayor detalle podemos plantear que el efecto en la disminución intracelular de la carga bacteriana observada en el experimento de killing se debe a que los macrófagos infectados son estimulados para irse a apoptosis por el efecto directo de la benzoquinona. Este efecto también sucedería al poner en contacto la micobacteria con el compuesto azul, explicando por qué estos compuestos funcionan de igual manera para diferentes cepas de *M. tuberculosis*. El mecanismo exacto por el cual se genera la apoptosis ya sea en Mtb o en los macrófagos no es claro, sin embargo, en otras líneas celulares se han encontrado que se debe al aumento en la producción de ROS<sup>27</sup> o por

la activación de la vía intrínseca o extrínseca (dependiente de mitocondria o de receptores de la muerte respectivamente)<sup>26</sup>.

También se sabe que algunos antibióticos poseen en su estructura química el grupo benzoquinona como es el caso de las antraciclinas, mitomicinas, estreptonigrina y saframicina. A pesar de compartir similitudes los mecanismos de acción de cada grupo es diferente, por ejemplo, algunos funcionan uniéndose covalentemente al ADN, secuestrando iones metálicos, rompiendo las cadenas de ADN por la formación de enlaces fosfodiéster o produciendo un exceso de especies reactivas de oxígeno<sup>28</sup>.

Debido a la gran variedad de mecanismos conocidos, es importante plantear más ensayos para determinar el mecanismo de acción del compuesto azul. El análisis de la ultraestructura de la bacteria o del macrófago al estar en contacto con el compuesto azul, permitiría observar si el compuesto causa algún tipo de daño directo en alguna parte específica de las células. Un ensayo de TUNEL permitiría comprobar si genera apoptosis y por último se podría determinar la producción de radicales libres de oxígeno.

# **CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES**

## VII. CONCLUSIONES

Se confirmó el efecto antimicrobiano de los compuestos rojo y azul contra la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv del ATCC, Stanford y contra un aislado clínico MDR. La MIC del compuesto azul es de 4 µg/mL para H37Rv y 8 µg/mL MDR; para el compuesto rojo es de 160 µg/mL para ambas cepas de micobacterias.

El compuesto azul y rojo pueden ser una opción para el tratamiento de la tuberculosis ya que a pesar de tener cierta toxicidad en macrófagos alveolares también se pudo ver que al poner en contacto estos compuestos con las células se genera un aumento en la fagocitosis y en la muerte de Mtb previamente fagocitada por macrófagos, esto último a través de un mecanismo no conocido que puede ser la inducción de la apoptosis, generación de daño al ADN o la producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno . Se requieren hacer otros experimentos para confirmar la hipótesis.

## PERPECTIVAS

- Llevar a cabo un ensayo de killing donde se pueda cuantificar la muerte celular para poder diferenciar si la disminución de la carga bacteriana se debe a la muerte de los macrófagos o a un aumento en su capacidad bactericida.
- Determinar la producción de especies reactivas de oxígeno en células que se pusieron en contacto con el compuesto.

- Realizar un ensayo de TUNEL para identificar procesos apoptóticos células expuestas al compuesto.
- Identificar si el compuesto azul tiene un efecto de activación sobre el macrófago mediante un ensayo de ELISA para determinar la producción de citocinas proinflamatorias.
- Administrar el compuesto en ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv o MDR como un tratamiento de 2 meses y determinar si hay una disminución en la carga bacteriana de pulmones.

# **CAPÍTULO VII. REFERENCIAS**



## VIII. REFERENCIAS

1. Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 5(1), e2013070. <http://doi.org/10.4084/MJHID.2013.070>
2. <https://www.cdc.gov/tb/topic/treatment/tbdisease.htm> 28/12/2017 12:51 p. m.
3. Mary Jackson (2014). The Mycobacterial Cell Envelope—Lipids. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 4:a021105; DOI: 10.1101/cshperspect.a021105.
4. Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Odile, B., Etienne, G., Tropis, M. & Dafé M. (2017). Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Scientific Reports* 7: 12807, 1-12, DOI:10.1038/S41598-017-12718-4
5. Pieters, J. (2008). Mycobacterium tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell Host & Microbe* 3, 397-407, DOI:10.1016/j.chom.2008.05.006.
6. Zumla, A. (2015). Tuberculosis treatment and management—an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. *Lancet Respiratory Medicine*; 3: 220–34.
7. Timmins, G. S. Y Deretic V. (2006) Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1220–122, DOI:10.1111/j.1365-2958.2006.05467.x
8. Wehrli W. (1983) Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Reviews of Infectious Disease*. 5 Suppl 3:S 407-411.

9. Goude, R., Amin, A. G., Chatterjee, D. y Parish T. (2009). The Arabinosyltransferase EmbC Is Inhibited by Ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10) 4138-4146, DOI:10.1128/AAC.00162-09
10. Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W., & Mitchison, D. (2013). Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum*, 2(4), 1–12. DOI: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013
11. Mills, K. & Wanger, A. (1996). Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin, and Streptomycin by Using Etest. *Journal of clinical microbiology* 34(7), 1672–1676.
12. Hall, L., Jude, K.P., Clark, S.L., Wengenack, N.L. (2011). Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex for First and Second Line Drugs by Broth Dilution in a Microtiter Plate Format. *J. Vis. Exp.* (52), e3094, DOI:10.3791/3094.
13. Horna Q., G; Silva D., M; Vicente T., W. y Tamariz O., J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev Med Hered* [online]., vol.16, n.1 [citado 2018-02-11], 39-45. Disponible en: <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2005000100007&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1018-130X.
14. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)

- (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), 1-7, DOI:10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x
15. Balouiri, M., Sadiki, S., Koraichi Ibsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71–79. DOI: [10.1016/j.jpha.2015.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005)
16. Riss, TL, Moravec, RA, Niles, AL, *et al.* Cell Viability Assays. (2013) [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, *et al.*, editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.
17. Gillies, R. J., Didier, N. y Denton, M (1986). Determination of Cell Number in Monolayer Cultures. *Analytical Biochemistry* 159, 109-113.
18. Castell, J. V. y Gómez-Lechón, M. J. (1997). *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Valencia, España. Academic Press. p. 467.
19. Flannagan, R., Jaumouillé, V. y Grinstein, S. (2012). The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 7:61–98. DOI: [10.1146/annurev-pathol-011811-132445](https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445)
20. Schäfer, G., Jacobs, M., Wilkinson, R. y Brown, G. (2009). Non-Opsonic Recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by Phagocytes. *Journal of Innate Immunity*; 1:231–243, DOI: [10.1159/000173703](https://doi.org/10.1159/000173703)
21. Zappavigna, S., Scuotto, M., Cossu, A., Ingrosso, D., De Rosa, M., Schiraldi, C., Filosa, R. y Caraglia, M. (2016) The 1,4 benzoquinone-featured 5-lipoxygenase inhibitor RF-Id induces apoptotic death through downregulation of IAPs in human

- glioblastoma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 35:167.  
DOI: 10.1186/s13046-016-0440-x.
22. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/p-benzoquinone#section=Top> 14-  
Oct-18 9:19:39 PM
23. Baigi, M., Brault, L., Néguesque, A., Beley, M., El Hilali, R., Gaüzère, F. y Bagrel, D. (2008). Apoptosis/necrosis switch in two different cancer cell lines: Influence of benzoquinone- and hydrogen peroxide-induced oxidative stress intensity, and glutathione. *Toxicology in Vitro* 22, 1547–1554.
24. Mwanzia Nguta, J., Appiah-Opong, R., Nyarko, A., Yeboah-Manu, D., Addo, P. (2015). Current perspectives in drug discovery against tuberculosis from natural products. *International Journal of Mycobacteriology* 4, 165-183.
25. Fotakis, G y Timbrell J. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 160, 171–177.
26. Chia-Chun Yu et al (2012). Ardisianone, a natural benzoquinone, efficiently induces apoptosis in human hormone-refractory prostate cancers through mitochondrial damage stress and survivin downregulation. *The prostate* 1-13.  
DOI: 10.1002/pros.22548
27. Sumalatha, K., Gowda, M. y Meenakshisundaram S. (2017). ROS-mediated induction of apoptosis by benzoquinone embelin in human colon adenocarcinoma cells HT-29. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 2017; 20160131.

28. Lown, J. William (1983). The mechanism of action of quinone antibiotics.  
*Molecular and Cellular Biochemistry* 55. 17-40.