

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INFERIOR DE
LINFOCITOS Y REACCIONES NO POLARES DE
CÉLULAS MÚLTIPLES Y PULSOS INFERIORES CONTRA
Mycobacterium tuberculosis

Por

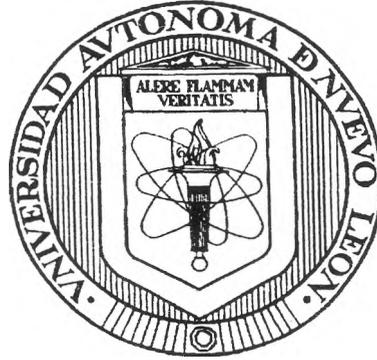
Gulio Arzate Quintana

Contra escrito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con acentuación
en Inmunobiología

Noviembre, 2005.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES NO
POLARES DE *Gymnosperma glutinosum* Y *Persea americana* CONTRA *Mycobacterium*
tuberculosis

Por

Carlos Arzate Quintana

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con
acentuación en Inmunobiología

Noviembre, 2006

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
NOMENCLATURA.....	xv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	2
3. OBJETIVOS.....	3
3.1 Objetivo general.....	3
3.2 Objetivos particulares.....	3
4. ANTECEDENTES.....	4
4.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
4.2 Medicina tradicional y su relación con la farmacología.....	
contemporánea.....	10
4.3 <i>Gymnosperma glutinosum</i>	12
4.3.1 Características generales.....	12
4.3.2 Usos medicinales tradicionales.....	12
4.3.3 Estudios fotoquímicos.....	13
4.3.4 Farmacología y toxicidad.....	13
4.3.5 Estudios preliminares.....	14
4.4 <i>Persea americana</i>	14

4.4.1	Características generales.....	14
4.4.2	Usos medicinales tradicionales.....	14
4.4.3	Estudios fotoquímicos.....	15
4.4.4	Farmacología y toxicidad.....	16
4.4.5	Estudios preliminares.....	18
4.5	Confiabilidad de las pruebas de susceptibilidad a drogas.....	
	para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
4.5.1	Métodos colorimétricos.....	19
4.5.2	Intensidad de fluorescencia.....	20
4.5.3	Incorporación de compuestos indicadores.....	21
4.5.4	Citometría de flujo.....	21
5.	MÉTODOS.....	23
5.1	Aislamiento de sustancias bioactivas en plantas.....	23
5.1.1	Obtención de los extractos acuosos de.....	
	<i>Gymnosperma glutinosum</i> y <i>Perseaamericana</i>	23
5.1.2	Obtención de extractos metanólicos de.....	
	<i>Gymnosperma glutinosum</i> y <i>Perseaamericana</i>	24
5.1.3	Fraccionamiento por el método Soxhlet.....	24
5.1.4	Cromatografía en columna para el extracto de.....	
	<i>Gymnosperma glutinosum</i>	25
5.1.5	Cromatografía en capa fina.....	26
5.2	Efecto inhibitorio de los extractos acuosos y.....	
	metanólicos de <i>Gymnosperma glutinosum</i> y <i>Persea</i>	
	<i>americana</i> contra algunas cepas microbianas de.....	
	importancia clínica.....	28
5.2.1	Cultivo y crecimiento de <i>V.cholerae</i> , <i>C. albicans</i>	
	y <i>E.coli</i>	28
5.2.2	Ensayos de inhibición del crecimiento de.....	
	<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 25870, <i>Candida</i>	
	<i>albicans</i> (aislado clínico) y <i>Escherichia coli</i>	
	ATCC 25922 y 43895 midiendo la reducción.....	
	del bromuro de (3-4,5 dimetil-2 tiazol)-2,5.....	
	difenil- 2H tetrazolio (MTT).....	28
5.2.3	Ensayos de inhibición del crecimiento de <i>Vibrio</i>	
	<i>cholerae</i> ATCC 25870, <i>Candida albicans</i>	
	(aislado clínico) y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	
	y 43895 mediante el conteo de unidades.....	
	formadoras de colonias en placas de agar.....	30
5.3	Preparación de los drogas control.....	31
5.4	Actividad <i>in vitro</i> de los extractos de plantas.....	
	contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
5.4.1	Cultivo y crecimiento de <i>Mycobacterium</i>	
	<i>tuberculosis</i>	31
5.4.2	Ensayos de citotoxicidad con azul Alamar para.....	
	medir el efecto inhibitorio de los extractos.....	

metanólicos crudos y sus fracciones en contra.....	
de <i>M.tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	32
5.4.3 Ensayos de citotoxicidad con azul de Alamar.....	
para medir el efecto inhibitorio de las drogas.....	
control (Clofazimina y Rifampicina) contra.....	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	33
5.5 Efecto de los extractos metanólicos en la viabilidad y.....	
producción de óxido nítrico de los macrófagos.....	
intraperitoneales murinos.....	34
5.5.1 Extracción de macrófagos peritoneales murinos.....	34
5.5.2 Estandarización del método para medir.....	
producción de nitritos de macrófagos estimulados.....	
con lipopolisacárido (LPS)de <i>Escherichia coli</i>	35
5.5.3 Medición de la citotoxicidad y estimulación.....	
en la producción de óxido nítrico por macrófagos.....	
peritoneales murinos estimulados con los extractos.....	
metanólicos crudos de <i>Gymnosperma glutinosum</i>	
y <i>Persea americana</i>	36
5.6 Análisis estadístico.....	37
6. RESULTADOS.....	38
6.1 Ensayos de inhibición del crecimiento de la cepa.....	
ATCC 25870 de <i>Vibrio cholerae</i> , un aislado.....	
clínico de <i>Candida albicans</i> y las cepas ATCC.....	
25922 y 43895 de <i>Escherichia coli</i>	38
6.1.1 Efecto antifúngico contra aislado clínico.....	
de <i>Candida albicans</i>	38
6.1.2 Efecto antibiótico contra la cepa ATCC 25870.....	
de <i>Vibrio cholerae</i>	40
6.1.3 Efecto antibiótico contra la cepa ATCC 25922.....	
de <i>Escherichia coli</i>	42
6.1.4 Efecto antibiótico contra la cepa ATCC 43895.....	
de <i>Escherichia coli</i>	43
6.2 Efecto inhibitorio de las drogas control.....	
contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	45
6.2.1 Efecto inhibitorio de la Clofazimina.....	
contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	45
6.2.2 Efecto inhibitorio de la Rifampicina.....	
contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	46
6.3 Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos.....	
de <i>Gymnosperma glutinosum</i> y <i>Persea americana</i>	
contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47
6.3.1 Actividad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
cepa H37Ra.....	47
6.3.2 Actividad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
cepa H37Rv.....	49

6.4 Efecto del las fracciones obtenidas por el método.....	
Soxhlet a partir del extracto crudo de <i>Persea</i>	
<i>americana</i> contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	51
6.4.1 Efecto inhibitorio de la fracción hexánica del.....	
extracto de <i>Persea americana</i> contra.....	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	52
6.5 Efecto inhibitorio de las fracciones obtenidas por.....	
separación en columna de Sílica gel a partir del.....	
extracto hexánico de hojas de <i>Gymnosperma</i>	
<i>glutinosum</i> contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
6.5.1 Efecto inhibitorio de la fracción SCI del.....	
extracto de <i>Gymnosperma glutinosum</i> contra.....	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	55
6.5.2 Efecto inhibitorio de la fracción SC4 del.....	
extracto de <i>Gymnosperma glutinosum</i> contra.....	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	58
6.5.3 Efecto inhibitorio de la fracción B1 del extracto.....	
de <i>Gymnosperma glutinosum</i> contra.....	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	59
6.5.4 Efecto inhibitorio de la fracción B2 del extracto.....	
de <i>Gymnosperma glutinosum</i> contra.....	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	60
6.5.5 Efecto inhibitorio de la fracción C2 del.....	
extracto de <i>Gymnosperma glutinosum</i> contra.....	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	62
6.5.6 Efecto inhibitorio de la fracción DI del extracto.....	
de <i>Gymnosperma glutinosum</i> contra.....	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	64
6.5.7 Efecto inhibitorio de la fracción EI del extracto.....	
de <i>Gymnosperma glutinosum</i> contra.....	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	66
6.6 Ensayos con macrófagos.....	69
6.6.1 Medición de nitritos en ensayos con macrófagos.....	
intrapéritoneales murinos estimulados con el.....	
extracto metanólico crudo de <i>Gymnosperma</i>	
<i>glutinosum</i> y <i>Persea americana</i>	69
6.6.2 Citotoxicidad de los extractos metanólicos.....	
crudos de <i>Gymnosperma glutinosum</i> y.....	
<i>Persea americana</i> contra macrófagos.....	
intrapéritoneales murinos.....	71
7. DISCUSIÓN.....	74
8. CONCLUSIONES.....	80
LITERATURA CITADA.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Gymnosperma glutinosum</i>	12
2. <i>Persea americana</i>	14
3. Comparación de la forma oxidada y reducida del azul Alamar.....	20
4. Diagrama de disposición de los tratamientos en placas de 96 pozos (<i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> y <i>V. cholerae</i>).....	30
5. Diagrama de disposición de los tratamientos en placas de 96 pozos (<i>M tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv).....	34
6. Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de ambas plantas contra el crecimiento de <i>Candida albicans</i> (Azul Alamar).....	38
7. Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de ambas plantas contra el crecimiento de <i>Candida albicans</i> (UFC).....	39
8. Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de ambas plantas contra el crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> (MTT).....	40
9. Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de ambas plantas contra el crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> (UFC).....	41
10. Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de ambas plantas contra el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> 25922 (MTT).....	42
11. Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de ambas plantas contra el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> 25922 (UFC).....	43

12. Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de ambas plantas contra el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> 43895 (MTT).....	44
13. Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de ambas plantas contra el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> 43895 (UFC).....	45
14. Efecto inhibitorio de la Clofazimina contra <i>M.tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	46
15. Efecto inhibitorio de la Rifampicina contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv.....	47
16. Efecto inhibitorio de los extractos metabólicos crudos de <i>G. glutinosum</i> y <i>P. americana</i> en contra de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra (Azul Alamar).....	48
17. Efecto inhibitorio de los extractos metabólicos crudos de <i>G. glutinosum</i> y <i>P. americana</i> en contra de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra (UFC).....	49
18. Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de <i>G. glutinosum</i> y <i>P. americana</i> en contra de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Azul Alamar).....	50
19. Efecto inhibitorio de los extractos metabólicos crudos de <i>G. glutinosum</i> y <i>P. americana</i> en contra de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (UFC).....	51
20. Efecto inhibitorio de la fracción PAH contra <i>M. tuberculosis</i> FI37Ra y H37Rv (Azul Alamar).....	52
21. Efecto inhibitorio de la fracción PAH contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv (UFC).....	53
22. Efecto inhibitorio de la fracción SCI contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv (Azul Alamar).....	56
23. Efecto inhibitorio de la fracción SCI contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv (UFC).....	57
24. Efecto inhibitorio de la fracción SC4 contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv (Azul Alamar).....	58
25. Efecto inhibitorio de la fracción SC4 contra	

<i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv (UFC).....	59
26. Efecto inhibitorio de la fracción B1 contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv (Azul Alamar).....	60
27. Efecto inhibitorio de la fracción B2 contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv (Azul Alamar).....	61
28. Efecto inhibitorio de la fracción B2 contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv (UFC).....	62
29. Efecto inhibitorio de la fracción C2 contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv. (Azul Alamar).....	63
30. Efecto inhibitorio de la fracción C2 contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv (UFC).....	64
31. Efecto inhibitorio de la fracción DI contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra (Azul Alamar).....	65
32. Efecto inhibitorio de la fracción DI contra <i>M. tuberculosis</i> FI37Ra y FI37Rv (UFC).....	66
33. Efecto inhibitorio de la fracción EI contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra (Azul Alamar).....	67
34. Efecto inhibitorio de la fracción EI contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra y H37Rv (UFC).....	69
35. Medición de nitritos en un ensayo con macrófagos estimulados con el extracto metanólico de <i>P. americana</i>	70
36. Medición de nitritos en un ensayo con macrófagos estimulados con el extracto metanólico de <i>G. glutinosum</i>	71
37. Efecto citotóxico del extracto de <i>P. americana</i> contra macrófagos peritoneales murinos (MTT).....	72
38. Efecto citotóxico del extracto de <i>G. glutinosum</i> contra macrófagos peritoneales murinos (MTT).....	73

NOMENCLATURA

ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
°C	Grados Celsius
¹⁴ C	Carbono 14
CLF	Clofazimina
¹⁴ CO ₂	Dióxido de Carbono 14
CO ₂	Dióxido de carbono
CD 4	Grupo de diferenciación 4
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DO	Densidad Óptica
ESM	Error Estándar de la Media
g	Gramos
kg	Kilogramo
h	Horas
IF	Intensidad de Fluorescencia
IFN-γ	Interferón gama
IgE	Inmunoglobulina E
LPS	Lipopolisacárido
m	Metros

mg	Miligramos
mi	Mililitros
mm	Milímetros
MTT	bromuro de (3-4,5 dimetil-2 tiazol)-2,5 difenil- 2H tetrazolio
Rg	Microgramos
μl	Microlitros
pm	Micrómetros
N	Normal
nm	Nanómetros
nMol	Nanomoles
PAH	Fracción de Hexano de <i>P. americana</i>
PAMC	Fracción de Cloruro de Metileno de <i>P. americana</i>
PAME	Fracción de Metanol de <i>P. americana</i>
PAMM	Fracción de la Mezcla Cloruro de Metileno-Metanol de <i>P. americana</i>
Pg	Picogramos
RF	Factor de Resistencia
RFP	Rifampicina
SIDA	Síndrome de Inmuno-deficiencia
TB	Tuberculosis
TNF-a	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VIH	Virus de Inmuno-deficiencia humana

RESUMEN

En las últimas tres décadas ha renacido el interés por los productos naturales y sus posibles aplicaciones en la industria agrícola, alimenticia y farmacéutica; ésta última, en su búsqueda de medicamentos nuevos y más eficientes. Aproximadamente el 30% de los fármacos empleados en los países industrializados proceden o se han modelado a partir de productos vegetales. La efectividad de los tratamientos botánicos ha sido reconocida por muchos. Sin embargo, son pocos los estudios científicos que validen las propiedades medicinales de las plantas. A pesar de la gran variedad de plantas mexicanas, el porcentaje de especies estudiadas por su actividad antibiótica es bajo. Tomando en consideración lo anterior, el objetivo de este trabajo fue el de encontrar nuevas sustancias que puedan ser utilizadas como antimicrobianos, en contra de *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de extractos de plantas de fácil acceso en gran parte del territorio nacional, como lo son el árbol de aguacate y el arbusto tatalencho o pegajosa. El efecto inhibitorio de los extractos fue medido en ensayos *in vitro* directos por medio de una técnica colorimétrica fluorimétrica (Azul alamar) y por medio del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Posteriormente se procedió a fragmentar los extractos por los métodos de Soxhlet y con la columna de Silica gel. Las fracciones generadas fueron entonces probadas como agentes inhibitorios contra las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis* con los métodos ya mencionados. Los extractos y sus fracciones demostraron tener efecto inhibitorio en contra de las micobacterias, siendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la fracción hexánica (PAH) de *P. americana* de 7.8 pg/ml, y para la fracción hexánica (El) de *G. glutinosum* de 31.2 pg/ml, por lo que podemos considerar a dichos extractos como potenciales terapias antituberculosas. Para complementar el trabajo y aumentar su relevancia, se probó *in vitro* la capacidad de los extractos para activar macrófagos peritoneales murinos, lo cual fue determinado indirectamente al medir la concentración de nitritos (un metabolito estable de la degradación del óxido nítrico) en el medio de cultivo. Los macrófagos no fueron activados por el extracto de *P. americana*, pero sí aumentaron ligeramente la producción de óxido nítrico al ser expuestos al extracto de *G. glutinosum*. Por último, se determinó la toxicidad de los extractos contra estas mismas células. Ambos extractos presentaron una citotoxicidad del 15% a una concentración de 250 pg/ml, que fue, sin embargo, una de las concentraciones más altas utilizadas en los ensayos. El aislamiento e identificación de las sustancias activas serán tema para trabajos posteriores.

ABSTRACT

In the last decades the interest for natural products and their potential applications in farming, food and pharmaceutical industries has increased, encouraging research to find new and more efficient cures for diverse maladies. About 30% of drugs used in industrialized countries have their origin in vegetal products. Effectiveness of botanical therapy has been acknowledged empirically; however, there is only a few scientific studies that validate their healing properties. Despite that there are an enormous variety of Mexican plants, the percentage of species scientifically studied for their antibiotic properties is rather low. This study was undertaken to search new substances with potential antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Plants were selected based on that they were from the región and freely available, as the avocado tree and “tatalencho” bush are. The inhibitory effect was measured with *in vitro* assays using the flourimetric technique Alamar blue and the colony forming unit (CFU) method. Then, fragmentation of the plant extracts was the next phase to complete. For this, the Soxhlet and Silica gel methods were used. Revealed fractions were then tested against *M. tuberculosis* strains H37Ra and H37Rv growth. Minimal inhibitory concentration (MIC) for the hexanic fraction of *P. americana* was 7.8 µg/ml and for the hexanic fraction of *G. glutinosum* (E1) was 31.2 µg/ml, these results indicate that the extracts can be considered as potential therapy against tuberculosis. To further add to the relevance of the present work, the potential of the extract to activate peritoneal murine macrophages *in vitro* was evaluated. Nitrites, which are a stable metabolite of the degradation of nitric oxide, were measured in the culture broth. The *P. americana* extract did not activate the cells, but nitric oxide production was slightly increased by the *G. glutinosum* extract which was associated with 15% toxicity at a dose of 250 µg/ml. Elucidation of the Chemical structure of the active compound (s) is underway.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad producida por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que se considera re-emergente y uno de los problemas de salud pública más importantes del mundo, además de ser la causa de aproximadamente tres millones de muertes en el mundo cada año. En las últimas décadas se han detectado cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes a drogas, aumentando la gravedad del problema. La importancia de este trabajo radica en la búsqueda de nuevos medicamentos capaces de inhibir el crecimiento de las cepas drogo-resistentes. Una fuente de sustancias antimicrobianas que no ha sido explorada óptimamente son las plantas. Debido a su gran diversidad y distribución mundial, podrían ser una fuente inagotable para la investigación científica. El objetivo de este trabajo fue el de evaluar la efectividad de extractos de plantas en contra del bacilo tuberculoso, para lo cual se seleccionaron dos plantas en base a su uso tradicional contra diversas enfermedades. Las plantas seleccionadas fueron *Gymnosperma glutinosum* (árbol pegajoso) y *Persea americana* (árbol de aguacate). Ambas plantas presentaron actividad inhibitoria contra las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*, siendo más efectivos los extractos de *P. americana*. Los extractos de *G. glutinosum*, sin embargo, estimularon ligeramente la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos, mostrando tener actividad pro-inflamatoria. En base a los resultados podemos considerar que los extractos de estas plantas tienen potencial como drogas para el control de la tuberculosis; sin embargo, aún falta aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad antimicobacteriana, lo cual se realizará en futuros trabajos.

2. HIPÓTESIS

Los extractos de hojas de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana* y sus fracciones activas tienen el potencial de inhibir el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, y poseen efectos pro-inflamatorios demostrables en la inducción de la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales murinos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antimicrobiano de extractos de hojas de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana* y fracciones activas contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

3.2.1 Determinar el efecto inhibitorio directo *in vitro* de extractos crudos y fracciones de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana* contra las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2.2 Evaluar el efecto *in vitro* de extractos de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana* en la activación de macrófagos peritoneales murinos (producción de óxido nítrico).

4. ANTECEDENTES

4.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno intracelular facultativo que causa alta morbilidad y mortalidad alrededor del mundo, y que mata a 3 millones de individuos por año (Murria *et al.*, 1990; Raha, 2004; Raviglione *et al.*, 1995). Se calcula que la tercera parte de la población mundial está infectada con el bacilo tuberculoso. Tras la infección, existe una probabilidad del 10% de adquirir la enfermedad, mientras que el 90% restante se traduce en infecciones latentes con bacilos viables circulando en el organismo del paciente. Este 10% equivale a los 8 millones de reportes anuales con tuberculosis activa, resultando en el número de muertes antes mencionadas. Por lo mismo, la tuberculosis tiene el primer lugar en muertes causadas por agentes infecciosos (Bonecini-Almeida *et al.*, 1998). Las infecciones por esta bacteria se han incrementado a raíz de la pandemia inducida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y a la aparición de cepas resistentes a múltiples drogas (Chaisson y Slutkin, 1989; Chan *et al.*, 1992; Greene *et al.*, 1982; Sepkowitz *et al.*, 1995; Raviglioni *et al.*, 1995). Debido a la emergencia de casos de tuberculosis resistentes a drogas (Fischl *et al.*, 1992), se requieren de nuevos y más eficaces medicamentos anti-micobacterianos para el mejoramiento de la terapia actual.

La tuberculosis fue definida como entidad clínica con el término de “tuberculosis” en 1830 y el bacilo fue identificado por Koch en 1882. La transmisión de bacilos tuberculosos se produce básicamente por vía aérea, y en la zona de inoculación pulmonar, los macrófagos alveolares actúan destruyendo los bacilos (Vincent y Marchal,

2002; Raha, 2005). Posteriormente, los bacilos son transportados por los propios macrófagos a los ganglios regionales donde se produce la respuesta inmunitaria, mediada fundamentalmente por los linfocitos T (inmunidad celular). El tiempo que transcurre desde la entrada del bacilo (infección) hasta que se establece la respuesta inmunitaria es el período de incubación que oscila entre 6 a 8 semanas. Puede ocurrir que antes del desarrollo de la respuesta inmunitaria celular se produzca una diseminación vía sangre o linfa que dé lugar a siembra de bacilos en diversos tejidos como las zonas apicales del pulmón, las vértebras, las epífisis de huesos largos, etc., que condicionen la evolución ulterior a enfermedad progresiva tras períodos largos de latencia.

Los macrófagos alveolares actúan fagocitando los bacilos tuberculosos a nivel de los alvéolos pulmonares (Vincent y Marchal, 2002). En esta fase puede ocurrir que los bacilos sean destruidos en su totalidad o que se produzca una persistencia y replicación de los mismos dentro del macrófago alveolar, debido a que las micobacterias poseen mecanismos que les permiten eludir los mecanismos bactericidas de los macrófagos, entre estos se encuentran la producción de enzimas hidrolíticas y compuestos nitrogenados, la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, la inhibición de la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno, la modulación de la presentación antigénica, la alcalinización del fagosoma, etc., (Flynn y Chan, 2003; Pai *et al.*, 2003; Raha, 2005).

Los macrófagos, además del mecanismo de fagocitosis, producen citocinas para el control de la infección (Hickman *et al.*, 2003; Fenhalls *et al.*, 2002). El factor de

necrosis tumoral-alfa (TNF-a) es fundamental para producir una respuesta granulomatosa adecuada. Las interleucinas a su vez actuarían reclutando nuevas células defensivas al foco de infección, como son macrófagos y linfocitos. Esta I^a respuesta defensiva limita la replicación inicial pero generalmente es insuficiente para eliminar todos los bacilos. Subsecuentemente, se produce la migración de macrófagos y células dendríticas infectadas a los ganglios linfáticos regionales, donde tiene lugar la respuesta específica de antígeno dependiente de los linfocitos T CD4+. Se sabe que *M. tuberculosis* tiene la capacidad de inducir la producción de TNF-a y óxido nítrico por macrófagos que afectan el crecimiento de esta bacteria. Además, el interferón gamma (IFN- γ), producido por los linfocitos T, puede potenciar la actividad microbicida de los macrófagos contra *M. tuberculosis* (Trajkovic *et al.*, 2002; Aung *et al.*, 1996). El papel del TNF-a en la tuberculosis es positivo, al reclutar leucocitos encargados de la formación de granulomas a los focos de infección, lo que se observa comúnmente en ratones (Kindler *et al.*, 1989; Raha, 2005). Sin embargo, en humanos, se ha demostrado que en los monocitos y los macrófagos alveolares, el TNF-a promueve la replicación intracelular de los bacilos de la tuberculosis (Byrd *et al.*, 1997), lo cual podría deberse a la patología inflamatoria intrínseca de esta citocina en los pulmones (Moreira *et al.*, 2002).

El potente activador de macrófagos IFN- γ , es crítico para el desarrollo de una respuesta inmunológica efectiva contra la tuberculosis, cuya acción protectora depende de la inducción de la producción de óxido nítrico por macrófagos (Dalton *et al.*, 1993; Flynn *et al.*, 1993; Ghering *et al.*, 2003; Gordon, 2003; Jo *et al.*, 2003). El IFN- γ juega un

papel central en la defensa del huésped contra *M. tuberculosis* mediante la activación del macrófago y la regulación del procesamiento de antígeno por moléculas de MHC clase II (Gehring *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha reportado que *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir en los macrófagos una vez que se estimulan los linfocitos T CD4+, lo cual controla pero no elimina a este patógeno; una lipoproteína de 19-kDa de esta bacteria inhibe la expresión del ARNm y de la proteína HLA-DR regulada por IFN- γ (Gehring *et al.*, 2003). En forma análoga, Gomez-Flores *et al.* (1997b) demostraron que la activación de los macrófagos con IFN- γ antes o después de la infección por el complejo *Mycobacterium avium*- *M. intracellulare* (MAC) podría dirigir el curso de la infección, y que el óxido nítrico podría ser perjudicial, más que benéfico para los macrófagos infectados con MAC.

Cuarenta por ciento de los casos mundiales anuales de tuberculosis son reportados en el sureste de Asia; tan sólo en la India ocurren 500 mil muertes al año, con una incidencia y prevalencia de 1.5 a 3.5 millones al año (Raha, 2005). En México, durante el año 2000, se observaron cifras de morbilidad variables en los estados, teniendo como valor inferior 3.03 por 100,000 en el estado de Tlaxcala, y como cifra máxima 38 por 100,000 en el estado de Tamaulipas. Los estados con incidencias mayores fueron Tamaulipas, Baja California, Guerrero, Veracruz, Nuevo León, Nayarit, Sinaloa, Tabasco, Chiapas y Colima y los estados con menor morbilidad fueron Tlaxcala, Zacatecas, Guanajuato, Estado de México, Distrito Federal, Michoacán, Yucatán, Aguascalientes, Puebla y Jalisco. El grupo de edad más afectado fue el de la población en edad productiva y las

enfermedades que se asociaron con mayor frecuencia a la tuberculosis fueron la diabetes mellitus, la infección por VIH y el SIDA.

La mortalidad por tuberculosis pulmonar se ha incrementado considerablemente en los últimos años; en 1999 ocupó el lugar número 19 con 3.3 muertes por cada 100,000 habitantes, siendo la segunda causa de muerte ocasionada por un sólo agente etiológico (sólo superada por el VIH/SIDA) y el 95% de las defunciones ocurre en mayores de 15 años. El estado con la mortalidad más alta en el país en los últimos 10 años ha sido Chiapas. Por casi 30 años no se han desarrollado nuevos agentes antituberculares con nuevos mecanismos de acción (Cohn *et al.*, 1997; Espinal *et al.*, 2001).

Ha habido una serie de obstáculos prácticos para el desarrollo de nuevos agentes anti-TB, entre estos están la falta de incentivos económicos debido a la predominancia de la enfermedad en los países en desarrollo. El crecimiento lento y la naturaleza altamente contagiosa de *M. tuberculosis* también han coadyuvado a desalentar los esfuerzos para el descubrimiento de drogas. Sin embargo, en los últimos años se han identificado varias drogas con interesante actividad anti-TB; tales compuestos son las rifamicinas. La rifabutina es activa contra un pequeño porcentaje de cepas resistentes a la rifampina (Chien *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1998), y es clínicamente activa (Matteelli *et al.*, 1999; Narita *et al.*, 2000). El rifapenteno tiene una vida media mayor, lo cual permite administrar dosis en forma intermitente, pero este exhibe reacción cruzada con rifampina (Leanerts *et al.*, 1999). El compuesto KRM-1648 es al parecer el más potente de las rifamicinas y ha demostrado tener actividad en la fase clínica II para el tratamiento de la tuberculosis (Tomioka, 2000); sin embargo, también exhibe reacción cruzada con la rifampina. Las fluoroquinolonas, tales como la ofloxacina y la levofloxacina, han

demostrado actividad clínica (Maranetra, 1999; Sirgel *et al*, 2000; Yew *et al.*, 2000); sin embargo, la moxifloxacin (recientemente aprobada), es la fluoroquinolona más activa contra *M. tuberculosis in vitro* y en ratones (Gillespie y Billington, 1999; Ji *et al.*, 1998; Miyazaki *et al.*, 1999). Dos miembros de una nueva clase de antimicrobianos llamados oxazolidinonas, han mostrado una actividad modesta *in vivo* contra *M. tuberculosis* (Cynamon *et al.*, 1999). Aunque todos estos compuestos muestran potencial, ninguno ha sido evaluado en fases clínicas (con la excepción del compuesto KRM-1648 y algunas quinolonas). formador lo anterior expuesto, es muy crítico identificar nuevos agentes antimicobacterianos.

La resurgencia de enfermedades infecciosas tales como la tuberculosis resistente a múltiples drogas hace necesario el descubrimiento de nuevas drogas específicas de fuentes naturales y sintéticas. En relación al uso de extractos de plantas y sus compuestos activos contra *M. tuberculosis*, se han evaluado una gran variedad de terpenoides de los cuales uno de los más efectivos es el norditerpenoide 12-demetilmulticaulina (Farley, 1993), aislado de las raíces de *Salvia multicaulis*, con una concentración mínima inhibitoria (CM1) de 0.46 pg/ml. Es más activo que el etambutol y tan activo como la rifampina. Otros terpenoides con altas actividades anti-TB son el sesquiterpeno dehidrocostuslactona (Barre *et al*, 1997), el esteral ergosterol-5,8-endoperóxido (Francois *et al.*, 1996), y el (E)-fitol (Jones y Luchsinger, 1986). Además, se ha reportado que los extractos hexánicos de *Lantana hispida* inhibieron el crecimiento *in vitro* de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (Jiménez-Arellanes *et al*, 2002).

4.2 Medicina tradicional y su relación con la farmacología contemporánea.

El uso de hierbas para tratar enfermedades era ya conocido por civilizaciones antiguas alrededor del mundo, sin embargo, su importancia dentro de la ciencia había sido poca hasta tiempos recientes, y cada vez es más común encontrar terapias que involucran a la medicina occidental con la medicina tradicional. (Abreu y Branco, 2003; Akihisa *et al.*, 2005; Hostettmann y Terreaux, 2000; Kawashima *et al.*, 2006; Kimura, 2006; Plaeger, 2003; Rojas *et al.*, 2006). El interés por la medicina botánica se ha incrementado en los últimos años; médicos y público en general parecen mostrar preferencia por los productos que contienen “extractos naturales” que por los productos basados en sustancias “sintéticas”. (Borchers *et al.*, 2000; Torrado-Truiti *et al.*, 2003). Actualmente, en Estados Unidos, entre un tercio y la mitad de los productos farmacéuticos tienen su origen en plantas superiores; sin embargo, pocos son utilizados como antibióticos ya que para este fin hemos confiado en las drogas que han circulado desde la década de 1950, como lo son la penicilina, ampicilina y tetraciclina entre otros, provocando que el papel de los derivados de plantas sea mínimo. Sin embargo, este arsenal fue utilizado indiscriminadamente, causando que las cepas bacterianas se adaptaran creando mecanismos inhibidores de drogas. Este problema fue enfrentado creando medicamentos de segunda generación, que son en realidad drogas ya conocidas modificadas químicamente en el laboratorio. Los microorganismos rápidamente crearon resistencia a esta nueva gama de tratamientos, surgiendo así la necesidad de buscar una nueva fuente de compuestos antibióticos. La variedad (de 250 a 500 mil especies) y distribución mundial de las plantas son las características deseables para explorar una nueva fuente, barata y al alcance de la mano (Ahmed *et al.*, 2005; Cowan, 1999; Fabricant y Farnsworth, 2001; Moi *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2006; Torrado-Truiti *et al.* 2003). Los

usos tradicionales primarios de las plantas medicinales en la región norte de México incluyen el tratamiento de enfermedades respiratorias, tos, resfriados, bronquitis, amigdalitis, neumonía; enfermedades gastrointestinales, dolores estomacales, diarrea, disentería, problemas hepáticos, excesiva secreción de bilis, diabetes, indigestión, gastritis, amibiasis, helmintiasis; enfermedades ginecológicas, amenorrea, infecciones vaginales y venéreas, hemorragias; enfermedades de la piel, úlceras, infecciones fúngicas, heridas, y en infecciones oculares (García-Alvarado *et al.*, 2001a, -b; Gomez-Flores *et al.*, 2000).

En el caso específico de *M. tuberculosis*, existen ya numerosos trabajos en los cuales se describen sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano, procedentes de plantas. Tal vez el ejemplo más notable sea el caso de la diploicina, obtenida a partir del liquen *Buellia canescens*, la cual fue modificada posteriormente dando como resultado la clofazimina, una de las drogas utilizadas en el tratamiento de la tuberculosis. También, en busca de antimicrobianos más eficaces, existen reportes de diferentes compuestos alterados químicamente, como es el caso de la diosporina (Lall *et al.*, 2003). Tomando en cuenta las características químicas de ésta y otras drogas antituberculosas (isoniazida, rifampicina, etambutol, etc.), además de las características de la micobacteria, podemos predecir que los nuevos compuestos serán insolubles en agua, y deberá ser posible su fagocitosis por parte de los macrófagos, para que puedan así eliminar a los bacilos tuberculosos (Reddy *et al.*, 1999).

4.3 *Gymnosperma glutinosum*

4.3.1 Características generales

Gymnosperma glutinosum, también conocida popularmente como Tatalencho, Jarilla, Moto, Mariquita, Motita, Cola de Zorro, Xonequitl, Hierba Pegajosa, Jucu Ndede, Zazal, Escobilla, Pegajosa), es una planta de un metro de altura, cuyos tallos exudan un material pegajoso. Las hojas son angostas y las flores, de color amarillos pálido, se encuentran en cabezuelas sobre las puntas de la planta. Es un arbusto distribuido desde Guatemala y México hasta el sureste de los Estados Unidos (Gallardo-Vázquez *et al.*, 1992).



Figura 1.- *Gymnosperma glutinosum*

4.3.2 Usos medicinales tradicionales *Gymnosperma glutinosum*

En la medicina tradicional de México se usa esta planta para el tratamiento de diarreas, úlceras y reumatismo (Martínez, 1959). En el estado de México, Durango y Guanajuato se utiliza para tratar reumatismo, fiebre e inflamación. En Puebla, su aplicación medicinal abarca dolores de cabeza, piquetes de hormiga, jiotos (enfermedad de la piel caracterizada por manchas blanquecinas), y en animales se

utiliza en la rotura de huesos. Otras propiedades que se le atribuyen son como antidiarréico, para tratar la fiebre amarilla y para soldar huesos (Gallardo-Vázquez *et al.*, 1992). Aunque existen reportes de toxicidad hacia el ganado (Lañe, 1980), recientemente se ha reportado su uso como forraje en el noreste de México (Foroughbackhch *et al.*, 1997).

4.3.3 Estudios fitoquímicos

Los pocos estudios fitoquímicos realizados hasta ahora han resultado en el descubrimiento de más de 20 flavonoides (Domínguez y Torre, 1974; Yu *et al.*, 1988) a partir de los extractos alcohólicos, y de 4 diterpenos (Maldonado *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 1994, Calderón *et al.*, 2001) de los extractos hexánicos. No existe, sin embargo, ningún reporte en la literatura científica sobre una relación entre la estructura de los productos naturales aislados y citotoxicidad hacia células de mamíferos o de actividad biológica en contra de agentes infecciosos.

4.3.4 Farmacología y toxicidad

Hay estudios que indican que el aceite esencial se absorbe rápidamente por tejido subcutáneo, excita la función motora de los centros musculares, pero al mismo tiempo impide las funciones de las extremidades de los nervios sensitivos de la piel y la excitabilidad de la fibra muscular. El aceite esencial puede causar la muerte por parálisis de los centros bulbares respiratorios, y el extracto hidroalcohólico por vía subcutánea produce parálisis, dilatación de las pupilas, somnolencia, abatimiento de la temperatura y muerte (Gallardo-Vázquez *et al.*, 1992).

4.3.5 Estudios preeliminares.

En nuestro laboratorio hemos demostrado actividad antibacteriana contra especies de *Salmonella*, *Escherichia* y *Pseudomonas* (datos mostrados en los resultados), que nos permiten anticipar que esta planta tendría un efecto contra el bacilo de la tuberculosis.

4.4 *Persea americana*

4.4.1 Características generales.

También conocido como árbol de aguacate, es una planta que se cultiva en climas cálidos o templados que alcanza 20 m de altura, de tronco grueso y con hojas alargadas que terminan en punta. Las flores son pequeñas y sus frutos son ovalados, con semilla grande rodeada por la pulpa carnososa. Se cultiva por sus frutos y crece asociado con la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, perennifolia, matorral xerófilo; bosques mesófilo de montaña, de encino y pino (Gallardo-Vázquez *et al.*, 1992).



Figura 2.- *Persea americana*

4.4.2 Usos medicinales tradicionales

La planta de aguacate es frecuentemente empleada contra lombrices y parásitos intestinales. Para este tratamiento, se utiliza la cáscara de la semilla o del fruto en

infusión, o bien, el cocimiento de la hoja. Se usa también en padecimientos del tipo ginecológico (cólicos menstruales, facilitación del parto), diabetes (Antia *et al.*, 2005), en trastornos digestivos como diarreas y dolor de estómago, y en problemas de la piel y reumas (Gallardo-Vázquez *et al.*, 1992). Existen diversos estudios *in vivo* e *in vitro* sobre el efecto protector del tejido conjuntivo para el aceite (especialmente el de las semillas); a nivel articular, posee efecto condroprotector, inhibiendo la actividad colagenolítica, reduciendo la producción espontánea de estromielsina, interleucina-1, interleucina-6, interleucina-8 y prostaglandina E2 por parte de los condrocitos, contribuyendo al mantenimiento del contenido en glicosaminoglicanos e hidroxiprolina, al inhibir su alteración enzimática. Los resultados fueron superiores con la asociación de los insaponificables de aguacate y soya (Antia *et al.*, 2005) Gallardo-Vazquez et al 1992; Hall-Ramirez et al., 2002). Estudios *in vivo* o *in vitro* realizados con diferentes extractos de la hoja (fresca o desecada, a veces con tallos) han demostrado actividad antiparasitaria (antimalaria, anti giardia), diurética, relajante de la musculatura lisa y citostática (Antia *et al.*, 2005).

4.4.3 Estudios fitoquímicos

Se utiliza el aceite (*Avocado oleum*) obtenido por expresión de la pulpa del fruto, su insaponificable y la hoja (*Persea folium*). El aceite contiene 85% de triglicéridos además de mono y diglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos. Como ácidos grasos característicos: ácidos cis-9-hexadecanóico, palmitoleico y zoomarínico, si bien los mayoritarios son los ácidos oleico, linoleico, linolénico, palmítico y esteárico (Gallardo-Vazquez et al 1992; Hall-Ramirez et al., 2002). El insaponificable contiene hidrocarburos alifáticos de C18 a C22 (20%), alcoholes

triterpénicos (aprox. 30%, cicloartenol, 24-metil-cicloartenol) y un 45% de esteróles (colesterol, beta-sitosterol y campesterol). Otros componentes del aceite son las saponinas, los taninos, las flovataninas, los flavonoides, los alcaloides y los polisacáridos (Antia *et al.*, 2005); además, posee también tocoferoles, carotenoides y vitaminas A, D y E. Hoja: contiene 0,5% de aceite esencial, con estragol (3-85%), cariofileno (6-49%), eugenol, anetol, alfa y beta-pineno, cimeno, linalol, fameseno, e-cadineno y humuleno. Otros componentes de la hoja son polioles (4.7%, perseitol) y taninos catéquicos (4,7%)(Hall-Ramirez et al., 2002).

4.4.4 Farmacología y toxicidad

Los extractos de la semilla se han probado contra diversos microorganismos, entre ellos *Escherichia coli*, *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lútea* (Gallardo-Vázquez *et al.*, 1992; Hall-Ramírez *et al.*, 2002). Por otro lado, los compuestos alifáticos de cadena larga aislados de la cáscara del fruto, como por ejemplo el 1,2,4,tihidroxi-n-heptadeca-16-eno, han demostrado actividad bactericida sobre microorganismos gram-positivos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella tiphy*, *Shigella disenterie* y *Staphylococcus aureus* (Hall-Ramirez *et al.*, 2002). También se ha observado actividad antitumoral *in vitro* del extracto metanólico preparado de hojas frescas en un cultivo de células inducidas por el virus de Epstein Barr. Varios estudios con animales han sugerido actividad hipotensora en extractos acuosos y etanólico-acuosos, preparados con hojas y administrados en ratas por las vías intravenosa e intragástrica (Gallardo-Vazquez et al 1992; Hall-Ramirez et al., 2002). Esta actividad fue también observada en perros tratados por la vía intravenosa con extractos acuoso y etanólico (95%) preparado con hojas y tallos. Se

ha observado también una actividad diurética en ratas tratadas por vía intragástrica con un extracto hidro-alcohólico preparado a partir de hojas. Se ha probado experimentalmente una fuerte actividad de estimulación del útero de las ratas tratadas con extractos metanólicos y acuosos de hojas y tallos. La actividad espasmogénica y relajante del músculo liso se ha observado en extractos acuosos y etanólicos preparados a partir de hojas de tallos de esta planta, en diferentes modelos experimentales utilizando órganos aislados de conejo (duodeno) y cobayo (íleon). Se ha demostrado en ratones que una fracción no saponificable obtenida a partir de frutos de esta planta administrada vía intraperitoneal es inmunoestimulante (Gallardo-Vazquez et al 1992; Hall-Ramirez et al., 2002). En la literatura se indica que la actividad bactericida se debe a la presencia de uno de los compuestos alifáticos no saturados de carbono (1,2,4-trihidroxiheptadecano), que se encuentra en la pulpa y las semillas de la planta. Algunos autores le asignan al compuesto obtenido de semillas flavanol 4,8- biscatequín la actividad antitumoral comprobada frente al Sarcoma 180 en ratones y ratas. La actividad irritante del aceite obtenido de la semilla se evaluó por una prueba de irritación oftálmica en conejos, obteniendo resultados positivos. Algunos autores reportan envenenamiento, que en ocasiones ha provocado la muerte de diversos tipos de animales al ingerir diferentes partes de la planta. En los estudios con canarios la autopsia ha revelado presencia de congestión pulmonar e hidropericardio como posibles causas de muerte. Diversos estudios sugieren que las toxicidades agudas por vía intraperitoneal de 8.8 g/kg y agudas y sub-agudas por vía oral son muy bajas (Gallardo-Vazquez *et al.* 1992).

4.4.5 Estudios preliminares.

Resultados preliminares en nuestro laboratorio muestran que los extractos de *P. americana* presentan actividad inhibitoria contra *Candida albicans*, y además presentan citotoxicidad contra las líneas celulares L929, L1210 y U937. Se ha reportado también que los extractos metanólicos de la semilla de *P. americana* poseen actividad inhibitoria contra *Trypanosoma cruzi* (Abe *et al.*, 2005). Basándonos en los reportes previos, creemos que los extractos de esta planta presentarán actividad antimicobacteriana.

4.5 Confiabilidad de las pruebas de susceptibilidad a drogas para *Mycobacterium tuberculosis*

Si analizamos detenidamente la situación actual de las pruebas de susceptibilidad de drogas en micobacterias usadas tradicionalmente y si además las llevamos a la práctica, observamos inmediatamente altos costos y deficiencias en su reproducibilidad, velocidad y confiabilidad. Sin embargo, dicha situación permaneció inalterable por décadas, y no fue hasta que surgió la necesidad de mantener una vigilancia estrecha sobre la incidencia de cepas mutiresistentes a drogas que han comenzado a surgir nuevas técnicas, más eficientes y más rápidas (Ribeiro *et al.*, 2004; Kim, 2005; Akselband *et al.*, 2005). Debido a que la mayor incidencia de esta enfermedad es en los países en vías de desarrollo, se busca que los nuevos métodos sean de bajo costo y fáciles de realizar para que la capacitación del personal sea lo menos complicada posible.

4.5.1 Métodos colorimétricos

Los métodos colorimétricos están basados en la medición de densidades ópticas (absorbancias a 540nm ó 570nm, por ejemplo). Algunos de estos métodos miden de manera directa la formación de algún metabolito, como en el caso del ensayo de reducción de nitritos, el cual está basado en la habilidad de *M. tuberculosis* de reducir los nitratos a nitritos, los cuales pueden ser fácilmente medidos con reactivos que producen un cambio de color (por ejemplo el reactivo de Griess) (Martin *et al.*, 2004). Otros métodos colorimétricos se basan en la reducción de un reactivo agregado, el cual al ser alterado químicamente presenta un cambio de la coloración, tales son los casos del bromuro de (3-4,5 dimetil-2 tiazol)-2,5 difenil- 2H tetrazolio (MTT) y el Resazurin (azul Alamar), entre otros.

El MTT, cuyo color original es amarillo, al ser reducido por enzimas deshidrogenasas produce un cristal insoluble en agua (azul de formazán), el cual precipita y debe ser diluido en un agente poco polar, como es el caso del dimetil sulfóxido (DMSO) para poder determinar su concentración por medio de la determinación de las densidades ópticas (Gomez-Flores *et al.*, 1995; Mshana *et al.*, 1998). Por su parte, el azul Alamar mientras está en estado oxidado mantiene una coloración azul, y al ser reducido cambia a un fuerte color rosa (Franzblau *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2004).

4.5.2 Intensidad de fluorescencia

Para esta técnica son necesarias moléculas que al ser excitadas con un rayo de cierta longitud de onda emita fluorescencia. La intensidad de dicha fluorescencia puede ser medida y registrada. Estos principios pueden ser utilizados para determinar el porcentaje de inhibición de un microorganismo al ser expuesto a un agente químico. El azul Alamar no solamente es útil para técnicas colorimétricas, si no que además se puede aprovechar en fluorimetría. Las bacterias en proceso de proliferación producen moléculas reductoras, y es gracias a esta actividad metabólica que el azul Alamar puede ser una herramienta en el monitoreo de la sensibilidad a antibióticos, la cual se puede medir gracias al cambio de color del reactivo. La forma oxidada (azul) no es fluorescente, pero al ser reducida (rosa) se vuelve fluorescente, y la medición de la intensidad de fluorescencia se realiza excitando a 530-560nm y midiendo la emisión a 590nm y la información se expresa en unidades de intensidad de fluorescencia (Collins y Franzblau, 1997; Franzblau *et al*, 1998; Martin *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2004).

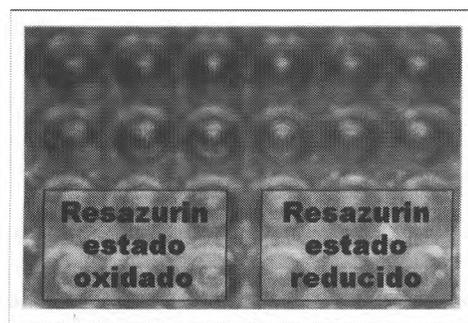


Figura 3.- Comparación de la forma oxidada y reducida del azul Alamar

4.5.3 Incorporación de compuestos indicadores

Las sustancias radioactivas pueden ser una herramienta útil en la medición de viabilidad y son usadas en experimentos con líneas celulares y ensayos de sensibilidad bacteriana. En el caso de *M. tuberculosis* es necesaria una molécula que sea capaz de atravesar la pared de lipo-arabino-manano que cubre al bacilo y se incorpore a su medio intracelular. Se han realizado trabajos en diferentes especies de micobacterias usando timidina y glicerol tritizados (Gomez-Flores *et al.*, 1997a; Pacini *et al.*, 1997). Después de un período relativamente corto de incubación, las bacterias son recuperadas a través de un sistema de filtración, y diluidas en líquido de centelleo. La medición se realiza en cuentas por minuto (Clayton *et al.*, 2004). Sin embargo, es una técnica cuyo costo final es elevado, y presenta además el problema del proceso de desechos radioactivos. En otros estudios se utilizan también medios de cultivo, como el 7H12, a los cuales se les adicionan sustancias como el ácido palmítico marcado con ^{14}C , que al ser metabolizado produce $^{14}\text{C}\text{O}_2$, el cual puede ser utilizado para medir el índice de crecimiento de las micobacterias (Lall *et al.*, 2003).

4.5.4 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica instalada en el laboratorio clínico produciendo resultados rápidos. Esta técnica está basada en el conteo individual de células, además de ser capaz de diferenciar la complejidad de los diferentes tipos celulares. Tomando ventaja de esta última característica, se han realizado estudios en los que se han incorporado tinciones fluorescentes de los ácidos nucleicos (Pina-Vaz *et al.*, 2005) para aumentar la precisión de la prueba, ya que de esta manera, al poder diferenciar entre células o bacterias vivas y muertas, se puede obtener un estimado

más exacto del número de unidades formadoras de colonias (UFC) viables en nuestra muestra. Aplicada en pruebas de sensibilidad a antibióticos en micobacterias podría ser una técnica confiable, segura y rápida. Sin embargo, no todos los laboratorios poseen los recursos necesarios para obtener y pagar el mantenimiento de un citómetro. El manejo de este aparato es más bien complejo y requiere de cierto nivel de conocimiento, por lo que la capacitación del personal puede ser lenta.

5 MÉTODOS

5.1 Aislamiento de sustancias bioactivas de plantas

5.1.1 Obtención de los extractos acuosos de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana*

Las hojas colectadas se enjuagaron para eliminar restos de polvo y material de insectos, y se dejaron secar a 37°C por 24 horas, después de lo cual las hojas secas se pulverizaron. Se dejaron hervir aproximadamente 80ml de agua destilada en un vaso de precipitados, se retiró de la placa caliente y se vertieron 5g de pulverizado de hojas. Se homogenizó la mezcla con un agitador de vidrio y se dejó reposar durante diez minutos a temperatura ambiente. Terminado este tiempo se filtró el sobrenadante utilizando un embudo de vidrio y un papel filtro; la muestra obtenida se refrigeró (aprox. 13° C) hasta su uso posterior. Después, se pesaron 16 viales de vidrio de 5ml estériles sin tapón, realizando las debidas anotaciones, se etiquetaron y se depositaron en ellos 2ml del filtrado previamente obtenido. Posteriormente se congelaron utilizando hielo seco en acetona, procurando que el filtrado quedara adherido a las paredes del vial. Inmediatamente después se sometieron al proceso de liofilización (Freeze dry System 7750020, LABCONCO Corporation, Kansas City, Missouri). El proceso duró aproximadamente cuatro horas. Una vez obtenido el liofilizado se pesaron de nuevo los viales sin tapón y se calculó la cantidad de extracto obtenido; se refrigeraron los viales hasta su uso, procurando evitar contaminación, en este caso se sellaron con parafilm (Akihisa *et al*, 2005; Holetz *et al.*, 2002; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003; Rai y Acharya, 1999).

5.1.2 Obtención de los extractos metanólicos de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana*

Se pesaron 5g del pulverizado de hojas, el cual se transfirió a una gasa (10cm X 10cm) y se formó un saquito, asegurándolo con un alambre. En un vaso de precipitados se depositaron aproximadamente 80ml de metanol, en este se sumergió el saquito asegurándolo a la orilla con un clip, y se agregó un agitador magnético. Se selló el vaso con parafilm, se aseguró con cinta adhesiva, se colocó sobre una base agitadora (Laboratory Stirrer PC-410, Corning, NY) y se dejó mezclando por 24 horas. Mientras tanto se etiquetaron y pesaron 20 tubos Eppendorf vacíos y estériles, y se realizaron las anotaciones necesarias. Terminadas las 24 horas, se transfirió un mililitro del extracto a cada tubo Eppendorf y se refrigeró (aprox. 13°C) hasta su uso posterior. Se sometieron los extractos a un proceso de secado utilizando un concentrador al vacío (Centrivap concentrador, Labconco, Kansas City, MO), este proceso duró aproximadamente cuatro horas. Al terminar, se pesaron de nuevo los tubos de Eppendorf y se realizaron los cálculos para conocer la cantidad de extracto obtenido. Se refrigeraron los extractos hasta su uso posterior, procurando evitar contaminación, en este caso se utilizó parafilm (Ahmed *et al.*, 2005; Akihisa *et al.*, 2005; Betoni *et al.*, 2006; Holetz *et al.*, 2002; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003; Rai y Acharya, 1999).

5.1.3 Fraccionamiento por el método Soxhlet

Por medio de la técnica Soxhlet se separaron sustancias de los extractos de *G. glutinosum* y *P. americana* en base a su polaridad por medio del arrastre con diferentes solventes. Los solventes utilizados fueron: hexano, cloruro de metileno,

metanol-cloruro de metileno y metanol. Para esto se pesaron 60 g de la muestra previamente secada y pulverizada, y se colocó en un cartucho de celulosa de 45 X 123 mm (Cellulose extraction thimbles, Whatman, Maidstone, England). Se inició la extracción con 600 mL de Hexano destilado. Posteriormente se concentró el extracto utilizando un rotavapor (Rotavapor R-205 Büchi, Brinkman Instruments, Inc., Wesbury, NY) y se rotuló y guardó el extracto hasta su uso posterior. La misma muestra de macerado pasó entonces a una extracción similar, pero se cambió el solvente a cloruro de metileno destilado (400 mL). Se volvió a concentrar el extracto con el rotavapor y almacenar la muestra debidamente identificada. El tercer solvente utilizado fue una mezcla de cloruro de metileno-metanol (500mL). Finalmente se realizó una última extracción con 500mL de metanol. Todos los extractos fueron debidamente etiquetados y almacenados hasta su uso posterior (Bates y Schaefer 1977; Hostettmann y Terreaux, 2000).

5.1.4 Cromatografía en columna del extracto de *Gymnosperma glutinosum*

La columna de vidrio se colocó en un soporte y se sujetó con pinzas. Se colocó la llave de paso en la columna. Se tomó un trozo de fibra de vidrio, se compactó y se introdujo en el fondo de la columna utilizando un aditamento largo de metal para colocar a presión la fibra en la parte angosta. Se colocó arena de mar (Sand, white quartz, Sigma-Aldrich St. Louis MO) para cromatografía en columna hasta formar un tapón de aproximadamente un centímetro de grosor. Se removieron las partículas de arena que quedaron adheridas a las paredes de la columna utilizando cloroformo y dando golpecillos con un martillo de goma. Se pesaron 25 g de Sílica Gel (Silica gel 60, 32 - 63 μ m, Universal Scientific Incorporated, Atlanta, Georgia) en un matraz

Erlenmeyer se realizó una suspensión con 50 mL de cloroformo. La sílica formó entonces una interfase con el eluente. Se dieron ligeros golpes a la columna con un martillo de goma hasta que la sílica se compactó completamente. Se tomó una cantidad determinada del extracto a separar y se disolvió en el mínimo de cloroformo. Se colocó la muestra sobre el nivel de la sílica formando círculos concéntricos para que la muestra quedara homogéneamente distribuida. Se agregó un poco de solvente y se bajó el nivel del mismo para que la muestra quedara a nivel de la sílica. Se colocó arena de mar hasta formar un tapón de aproximadamente un centímetro de grosor. Se removieron las partículas de arena adheridas a la columna utilizando eluente. Al final se obtuvieron 7 fracciones super-colectivas o FSC. Sin embargo, se realizaron mezclas con las fracciones similares, como fue el caso de las FSC 2 y 3; Se mezclaron también las FSC 5,6 y 7. Dichas fracciones fueron fraccionadas nuevamente, obteniendo un nuevo grupo de fracciones (Tabla I) (Bates y Schaefer 1977; Domínguez y Torre, 1974).

5.1.4 Cromatografía en capa fina

La cromatografía de capa fina se utilizó como un método de identificación de las diferentes fracciones obtenidas por el método de cromatografía en columna. Por medio de un factor de resistencia (RF) se determinó la polaridad de cada compuesto y fue posible clasificar las fracciones obtenidas. La mezcla a separar se colocó en una placa de vidrio con una fase estacionaria de sílica gel con indicador para luz ultravioleta (Silica gel 60 F254, EM Science, Darmstadt, Germany) mezclada con sulfato de calcio como fraguante. Se disolvieron las fracciones en una pequeña cantidad de cloroformo en un tubo de ensayo, a partir de estos se tomaron las

muestras con un capilar de vidrio y se colocaron en forma de puntos en la sílica. Posteriormente se colocó la placa de sílica en posición vertical dentro de un recipiente con 10 mL del eluente (mezcla 1:1 cloroformo-acetato de etilo) (Bates y Schaefer 1977; Maldonado *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 1994).

Fracción	RF
SC1	1.0 y 0.879
SC4	0.541
A1	1.0
A2	1.0 y 0.879
B1	0.882
B2	0.337
C1	0.823, 0.729 y 0.635
C2	0.337 y 0.216
D1	0.541
D2	0.337 y 0.216
E1	0.541, 0.337 y 0.216
E2	0.216
F	0.216

Tabla I.- Fracciones obtenidas a partir de hojas de *G. glutinosum* por el método de cromatografía en columna

5.2 Efecto inhibitorio de los extractos acuosos y metanólicos de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana* contra algunas cepas microbianas de importancia clínica: Estudio preliminar de actividad antibiótica.

5.2.1 Cultivo y crecimiento de *V.cholerae*, *C. albicans* y *E.coli*.

Las cepas fueron proporcionadas amablemente por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. *C. albicans* (aislado clínico) fue mantenida en cajas de agar Mueller Hinton (Becton Dickinson, Edo. de México). Para preparar soluciones de 1×10^3 levaduras/ml se utilizó el agar YM Broth (Becton Dickinson, Detroit, Michigan). En los casos de *V. cholerae* cepa 25870 y *E. coli* cepas 25922 y 43895 se utilizó el medio de Infusión Cerebro Corazón (ICC) (Becton Dickinson, Edo. De México) con 35% de agar-agar (Research organics, Cleveland, Ohio) para su mantenimiento. Para las soluciones de 1×10^3 bacterias/ml se utilizó caldo ICC.

5.2.2 Ensayos de inhibición del crecimiento de *Vibrio cholerae* cepa ATCC 25870, *Candida albicans* (aislado clínico) y *Escherichia coli* cepas ATCC 25922 y 43895, midiendo la reducción del bromuro de (3-4,5 dimetil-2 tiazol)-2,5 difenil-2H tetrazolio (MTT).

Primero se colocaron 100pL del extracto a una concentración de 1mg/ml en cada pozo de la fila A de la caja de 96 pozos (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) y se adicionaron 50pL del medio de cultivo en las 7 filas restantes (B, C, D, E, F, G y H), posteriormente se realizaron diluciones seriadas con relación 1:2. Aparte, en la

muestras con un capilar de vidrio y se colocaron en forma de puntos en la sílica. Posteriormente se colocó la placa de sílica en posición vertical dentro de un recipiente con 10 mL del eluente (mezcla 1:1 cloroformo-acetato de etilo) (Bates y Schaefer 1977; Maldonado *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 1994).

Fracción	RF
SC1	1.0 y 0.879
SC4	0.541
A1	1.0
A2	1.0 y 0.879
B1	0.882
B2	0.337
C1	0.823, 0.729 y 0.635
C2	0.337 y 0.216
D1	0.541
D2	0.337 y 0.216
E1	0.541, 0.337 y 0.216
E2	0.216
F	0.216

Tabla I.- Fracciones obtenidas a partir de hojas de *G. glutinosum* por el método de cromatografía en columna

misma placa se usaron seis réplicas del control positivo, que consistían en 50pL de un antibiótico para los microorganismos utilizados (Fungizona para *C. albicans*; Tetraciclina para *E. coli* y *V. choleraé*). Para el control negativo se agregaron 50pL del medio de cultivo solamente. Se agregaron 50pL de la solución de 1×10^3 bacterias por mililitro a todos los pozos, de manera que el volumen final fue de 100pL. La concentración final de los extractos fue de 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 y 7.8 pg/ml (Fig.5). Se dejó incubar a 37°C y 5% de CO₂, el tiempo varía según el microorganismo (16 horas para *C. albicans* y 6 horas para *E. coli* y *V. choleraé*). Se adicionan 10pL de MTT (0.5 mg/ml, concentración final) por pozo y se dejó incubar aproximadamente 15 minutos (o hasta que se pudo apreciar un cambio en la coloración de los controles negativos). Posteriormente, se adicionaron 100pL de dimetilsulfóxido (DMSO) con el fin de disolver los cristales de azul de formazán, se realizó una homogenización y se midieron las absorbancias en un lector de microplacas a 540nm (Microplate autoreader, Biotek-Instruments, Winooski, VT) (Gomez-Flores *et al.*, 1995).

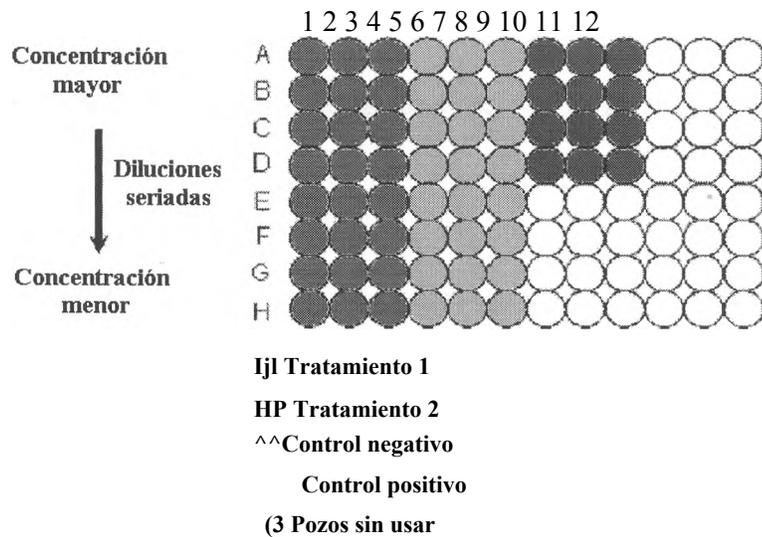


Figura 4.- Diagrama de disposición de los tratamientos en placas de 96 pozos (*C. albicans*, *E. coli* y *V. cholerae*)

5.2.3 Ensayos de inhibición del crecimiento de *Vibrio cholerae* cepa ATCC 25870, *Candida albicans* (aislado clínico) y *Escherichia coli* cepas ATCC 25922 y 43895, mediante el conteo de unidades formadoras de colonias en placas de agar.

Se preparó una placa de 96 pozos como ya se describió anteriormente. Después de agregar la solución de bacterias e incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante ocho o dieciséis horas, se realizó una dilución 1:10,000 de cada uno de los pozos. Se tomaron 100pL de cada una de dichas diluciones y se colocaron en una placa de agar previamente identificada (cepa, tratamiento, concentración y fecha), se dispersó el contenido con un asa de dispersión esterilizada a la flama. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂ hasta observar crecimiento macroscópico. Se realizó el conteo en un contador

de colonias (ULB-100 Lightbox 37864-2000, Scienceware BEL-ART products, Pequannock, NJ) y se realizaron los cálculos necesarios para determinar el porcentaje de inhibición de los microorganismos (Kansal *et al.*, 1997).

5.3 Preparación de las drogas control

Se disolvió 1mg de clofazimina o rifampicina en 500pL de DMSO, 500pL de metanol y 1.0pL de HCl 6N. A partir de esta muestra se realizaron diluciones de menor concentración usando el medio Middlebrook 7H9 Broth. Como control positivo de los ensayos de inhibición de los extractos metanólicos contra *M. tuberculosis* se usó una concentración de 1pg/ml de la clofazimina.

5.4 Actividad *itt vitro* de los extractos de plantas contra *Mycobacterium tuberculosis*.

5.4.1 Cultivo y crecimiento de *M. tuberculosis*.

Las cepas de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv fueron amablemente proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas del Noreste, en Monterrey, N.L., y se mantuvieron en tubos con medio Lowenstein-Jensen (Remel, Lenexa, Kansas City, MO). Las suspensiones bacterianas se prepararon cultivando un inóculo inicial en agar Middlebrook 7H10 (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, MD), y subcultivando en caldo Middlebrook 7H9 (Difeo Laboratories, Detroit, Mich) conteniendo 0.5% de glicerol (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN), 10% de enriquecimiento OADC (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa) (Remel) y 0.05% de Tween 80 (Polisorbato 80, Sorbitan-Oleato, Poli-Oxietileno, Materiales y abastos especializados Jal. México) por 72 h a 37°C. Las suspensiones

celulares (conteniendo perlas de vidrio de 3 mm de diámetro (Baxter, McGAw Park, 111) se agitaron y sonicaron por 10 minutos en un ultrasonicador de baño de agua (80 Watts de poder; Laboratory Supplies Co., Hicksville, NY) hasta que los agregados visibles se disgregaron. La solución de bacterias se centrifugó a 500 RPM por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, los cultivos se diluyeron en el mismo caldo a la concentración de 2.5×10^6 para la cepa H37Ra y de 1×10^6 bacilos/ml para la cepa H37Rv (Cillins LA y Franzblau SG, 1997) utilizando una cámara de Neubauer (100X) y se confirmó la concentración de los bacilos con ensayos de UFC en placas de agar 7H10 (Bonecini-Almeida *et al.*, 1998). Estas suspensiones se congelaron a -80°C hasta su uso (Gomez-Flores *et al.*, 1996 a,b).

5.4.2 Ensayos de citotoxicidad con azul de Alamar para medir el efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos y sus fracciones en contra de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*.

Se colocaron 200pL de medio de cultivo 7H9 en los pozos de la orilla de la placa para evitar la desecación del resto de los pozos. Posteriormente se transfirieron 100pL del extracto metanólico crudo (1000pg/mL) o de las fracciones (500pg/mL) en la segunda fila de la placa de 96 pozos de color negro de fondo plano (Greiner bio-one 96 well black polystyrene flat bottom). Se colocaron 50pL del medio de cultivo Middlebrook 7H9 broth con Tween 80 al 0.05% en las 7 filas restantes. Se tomaron 50pL de la segunda fila (la que contenía el extracto) y se realizaron diluciones seriadas, de manera que todos los pozos tuvieron un volumen final de 50p.L. Para el control negativo se colocaron 50pL del medio de cultivo solamente.

Como control positivo se utilizó CLF a 1 pg/ml. Se agregaron 50pL de la solución de bacterias a todos los pozos, para la cepa H37Ra la concentración fue de 5×10^4 bacterias/mL y para H37Rv fue de 2×10^5 bacterias/mL (Fig.6) (Collins y Franzblau, 1997), de manera que todos los pozos tuvieron un volumen final de 100pL. Se dejó incubar (37°C y 5% de CO_2) por doce días. Aparte se preparó una mezcla 1:1 de tween 80 al 10% y azul de Alamar 10X. Se agregaron 15mL/pozo de dicha mezcla y se dejó incubar por 24 horas más o hasta que el reactivo cambió de color azul a rosa (Franzblau *et al.*, 1998). Se midió la intensidad de fluorescencia del alamar blue para determinar la viabilidad de las micobacterias. En este caso el filtro de excitación fue de 535nm y el de emisión 595nm (Springer *et al.*, 1998). Se confirmaron los resultados por medio del conteo de UFCs en placas de agar Middlebrook 7H10 (explicado anteriormente) (Bonecini-Almeida *et al.*, 1998; Falzari *et al.*, 2005).

5.4.3 Ensayos de citotoxicidad con azul de Alamar para medir el efecto inhibitorio de las drogas control (Clofazimina y Rifampicina) contra las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

Se repitió el mismo método que en los ensayos para extractos metanólicos crudos y fracciones descritos anteriormente en el texto. Las diluciones seriadas se realizaron a partir de 500 hasta 10 pg/ml para CLF y de 10 hasta 0.3 pg/ml para RFP. Se incubó a 37°C y 5% de CO_2 durante doce días. Se agregó el azul Alamar y se midió la intensidad de fluorescencia (excitación: 535nm, emisión: 595nm) (Falzari *et al.*, 2005; Springer *et al.*, 1998).

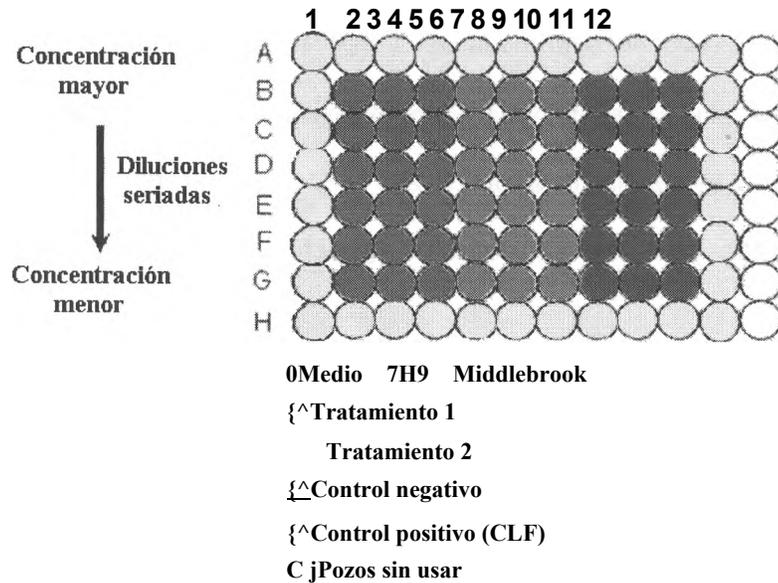


Figura 5.- Diagrama de disposición de los tratamientos en placas de 96 pozos (cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*)

5.5 Efecto de los extractos metanólicos en la viabilidad y producción de óxido nítrico de los macrófagos peritoneales murinos

5.5.1 Extracción de macrófagos peritoneales murinos

Los macrófagos se colectaron mediante lavado de la cavidad peritoneal con medio RPMI 1640 frío sin suero fetal bovino inmediatamente después de matar al animal, como se ha descrito previamente (Gomez-Flores *et al.*, 1997a,b). La suspensión celular se lavó una vez con este medio, y se resuspendió y ajustó a una concentración 1.7×10^6 células/ml en medio AIM-V conteniendo 0.5% de solución de penicilina-estreptomicina (debido a que se ha reportado que el suero por si solo

puede activar al macrófago, Chen *et al.*, 1994), el medio de cultivo RPMI 1640 se cambió en esta etapa por el medio AIM-V el cual no contenía suero, pero facilitó el cultivo celular (Kaldjian *et al.*, 1992). Cien microlitros de esta suspensión se incubaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) por 2 h a 37°C en 5% de CO₂. Las células no adherentes se removieron, y a las células adherentes (macrófagos) se les adicionó medio AIM-V y los tratamientos.

5.5.2 Estandarización del método para medir producción de nitritos de macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*.

Se extrajeron los macrófagos según lo explicado en el punto anterior. Se eliminó el medio AIM-V de todos los pozos de la placa y se reconstituyó el volumen usando diluciones seriadas del LPS de *E. coli*, el volumen final por pozo fue de 100 μ l. Como control negativo se usaron pozos reconstituidos con medio AIM-V, los cuales fueron usados como punto de comparación. La placa se incubó por 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Terminado el tiempo de incubación, se tomaron 50 μ L de cada pozo y se colocaron en otra placa de 96 pozos. En la placa original se adicionaron 15 μ L de MTT (5mg/ml) a cada uno de los pozos y se incubó por dos horas a 37°C y 5% de CO₂, terminado el tiempo de incubación se adicionaron 100 μ L de DMSO. Mientras tanto se atemperaron los dos reactivos de Griess; en la segunda placa se adicionaron 50 μ L del reactivo B (sulfanilamida) a cada uno de los pozos con muestra, se protegió de la luz y se incubó por 5-10 minutos. Se agregaron 50 μ L del reactivo A (NED) a cada pozo, se protegió de la luz y se incubó por 5 a 10 minutos. Se

obtuvieron las absorbancias en el lector de microplacas a 540nm (Gomez-Flores *et al.*, 1997a,b).

5.5.3 Medición de la citotoxicidad y estimulación en la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales murinos estimulados con los extractos metanólicos crudos de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana*.

Se obtuvieron los macrófagos peritoneales murinos como se explicó anteriormente. Se decantó el medio AIM-V la placa y en su lugar se adicionaron las diluciones seriadas de los extractos metanólicos crudos de *G. glutinosum* y *P. americana*. Como control negativo se usó el medio AIM-V sólo; como control positivo se usó el LPS de *E. coli* a una concentración de 3pg/ml. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por 72 horas. Terminado este tiempo se tomaron 50pL de cada pozo y se colocaron en otra placa de 96 pozos. En la placa original se adicionaron 15pL de MTT (5mg/ml) (Gomez-Flores y Weber, 2001) a cada uno de los pozos y se incubó por dos horas a 37°C y 5% de CO₂, terminado el tiempo de incubación se adicionaron 100pL de DMSO. Mientras tanto se atemperaron los dos reactivos de Griess. En la segunda placa se adicionaron 50pL del reactivo B (sulfanilamida) a cada uno de los pozos con muestra, se protegió de la luz y se incubó por 5 a 10 minutos. Se agregaron 50pL del reactivo A (NED) a cada pozo, se protegió de la luz y se incubó por 5 a 10 minutos. Se obtuvieron las absorbancias en el lector de microplacas a 540nm (Gomez-Flores *et al.*, 1997a,b).

5.6 Análisis estadístico

La distribución de los datos se analizó por el método de una muestra de Kolmogorov-Smirnov, el nivel de significancia se determinó mediante la prueba t de Student y el análisis de varianza (One way ANOVA). La prueba de Dunnett se utilizó para determinar diferencias entre los grupos control y los tratamientos.

6. RESULTADOS

6.1 Ensayos de inhibición del crecimiento de la cepa ATCC 25870 de *Vibrio cholerae*, un aislado clínico de *Candida albicans* y las cepas ATCC 25922 y 43895 de *Escherichia coli*

6.1.1 Efecto antifúngico contra un aislado clínico de *Candida albicans*

En el caso de *C. albicans* se observó que ambos compuestos inhiben su crecimiento. El extracto metanólico crudo de *P. americana*, a una concentración de 500p.g/ml inhibe a la levadura hasta un 47%, y a la concentración menor de 7.8p.g/ml aún se observa una inhibición del 11% (Fig.6).

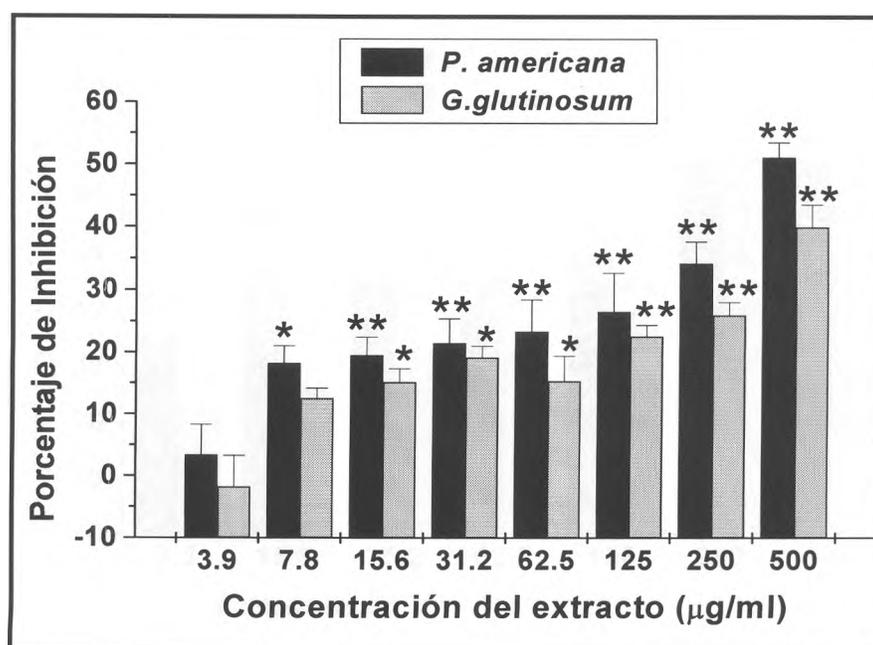


Figura 6.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos contra el crecimiento de *Candida albicans*. Inhibición determinada por la técnica de reducción del MTT. Los datos representan la media \pm ESM de cuatro repeticiones por tratamiento, de tres experimentos independientes. El valor de D.O. del control fue de 0.382 ± 0.02 . *, $P < 0.05$; **, P.O.Ol.

El extracto metanólico crudo de *G. glutinosum* tiene un efecto similar, ya que a la concentración de 500 µg/ml se observa una inhibición del 35%, y el efecto se observa aún en la concentración de 125 µg/ml con una inhibición del 16% (Fig.7). Los ensayos de UFCs, sin embargo, muestran que los porcentajes de inhibición son aún mayores, a pesar de que la curva de crecimiento es similar. Por ejemplo, la concentración de 500 µg/ml del extracto de *P. americana* inhibe hasta un 71% el crecimiento de la levadura, mientras que el extracto de *G. glutinosum* a la misma concentración el porcentaje llega hasta 62% (Fig.7).

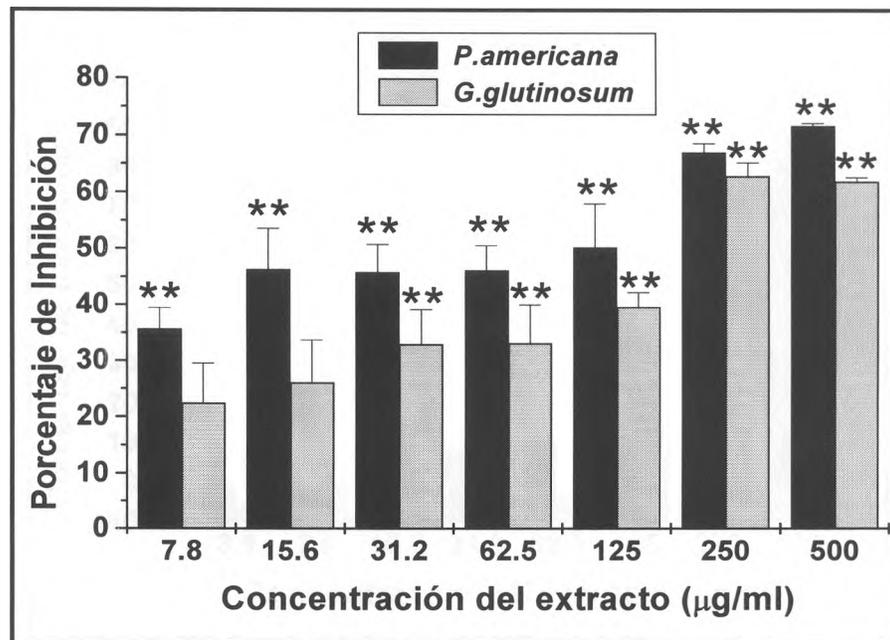


Figura 7.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos contra el crecimiento de *Candida albicans*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media ± ESM de dos experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $5 \times 10^8 \pm 6 \times 10^7$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Los vehículos de metanol no tuvieron un efecto significativo en comparación con el control, el valor de D.O. del control fue de 0.449 ± 0.04 .

6.1.2 Efecto antibiótico contra la cepa ATCC 25870 de *Vibrio cholerae*

Ambos extractos tienen también efecto inhibitorio sobre *V. cholerae*, en especial el extracto de *P. americana*, con el cual se observa una inhibición de hasta el 89% a una concentración de 500pg/ml, la siguiente dilución (250pg/ml) presenta todavía un 53% de inhibición; el efecto disminuye sensiblemente hasta el 10% cuando la concentración del extracto es de 125 pg/ml (Fig.8).

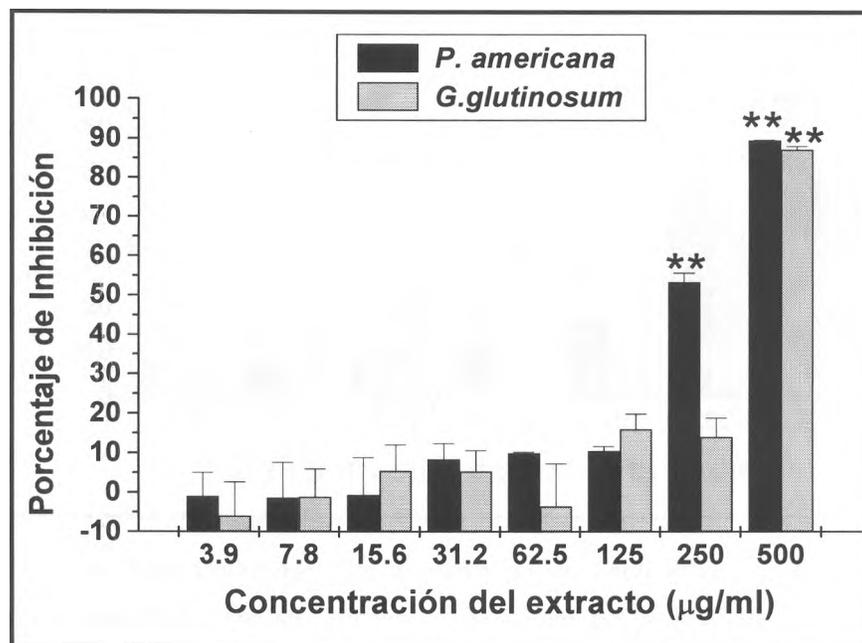


Figura 8.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos contra el crecimiento de *Vibrio cholerae*. Inhibición determinada por la técnica de reducción del MTT. Los datos representan la media \pm ESM de cuatro repeticiones por tratamiento, de tres experimentos independientes. El valor de D.O. del control fue de 0.862 ± 0.04 .*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

El extracto de *G. glutinosum* a 500 µg/ml presenta una inhibición del 87%, sin embargo, este efecto disminuye hasta 14% en la siguiente dilución (250µg/ml) (Fig.9). Los ensayos de UFCs corroboraron los datos arrojados por el método del MTT, aunque de nuevo los porcentajes de inhibición aumentaron. Para *P. americana* se observó que en la concentración de 500µg/ml el porcentaje de inhibición fue de 99%; el extracto de *G. glutinosum* a la misma concentración presentó un 89% de inhibición (Fig.9).

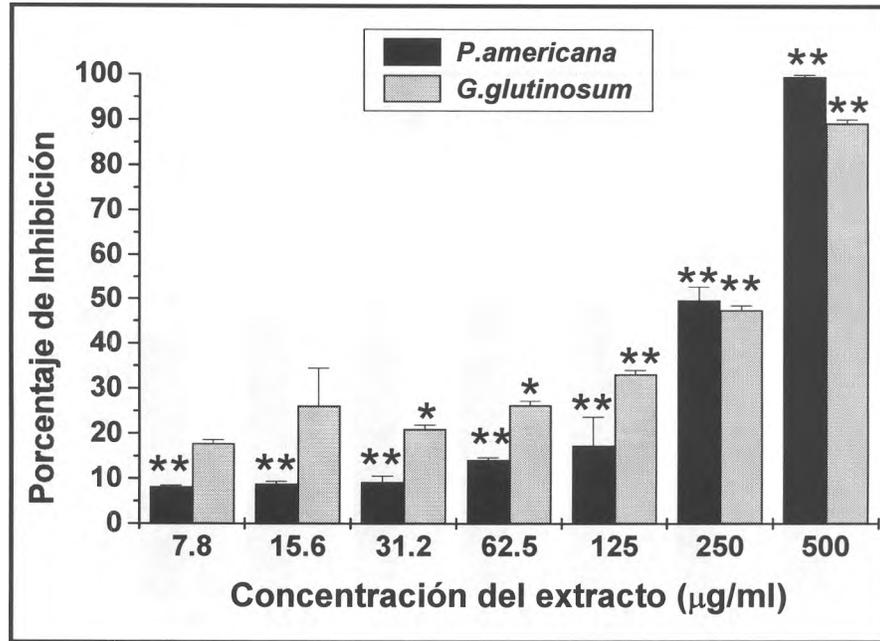


Figura 9.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos contra el crecimiento de *V. cholerae*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de dos experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $2 \times 10^9 \pm 9.8 \times 10^7$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Los vehículos de metanol no tuvieron un efecto significativo en comparación con el control, el valor de D.O. del control fue de 1.264 ± 0.12 .

6.1.3 Efecto antibiótico contra la cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli*

Los resultados obtenidos con la cepa ATCC 25922 de *E. coli* mostraron que el extracto de mayor efecto inhibitorio fue el de *G. glutinosum*, que inhibe desde 54% a 7.8p.g/ml, hasta 84% a 500p.g/ml. Mientras que *P. americana* inhibe en todas las concentraciones probadas, alrededor del 40% del crecimiento (Fig. 10). Los UFC muestran que la inhibición del extracto de *G. glutinosum* fue de 22% para la concentración de 7.8pg/ml, y de 90% para la de 500pg/ml. Con *P. americana* el rango fue del 10% para 7.8pg/ml al 40% para 500pg/ml (Fig.11).

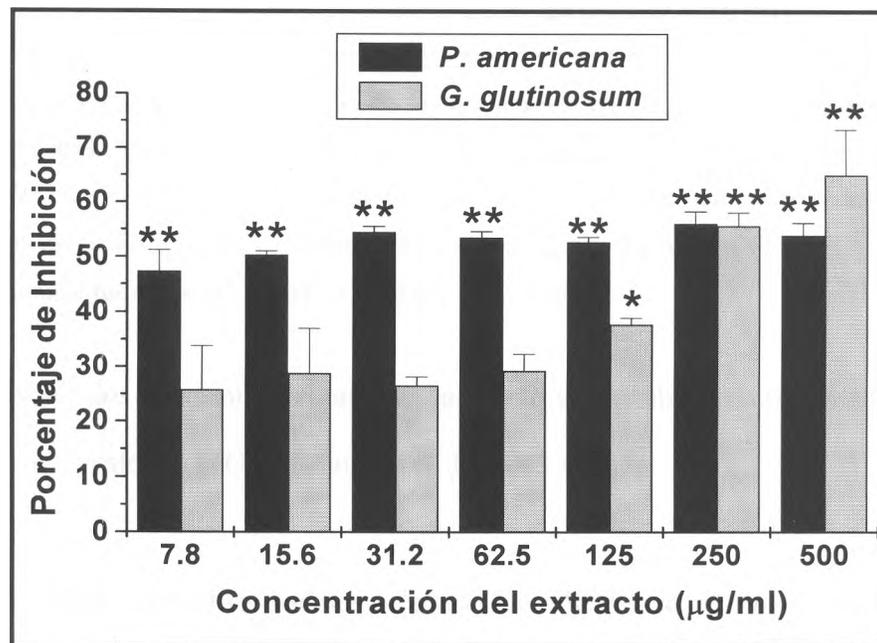


Figura 10.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos contra el crecimiento de la cepa 25922 de *Escherichia coli*. Inhibición determinada por la técnica de reducción del MTT. Los datos representan la media \pm ESM de cuatro repeticiones por tratamiento, de tres experimentos independientes. El valor de D.O. del control fue de 1.373 ± 0.04 . *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

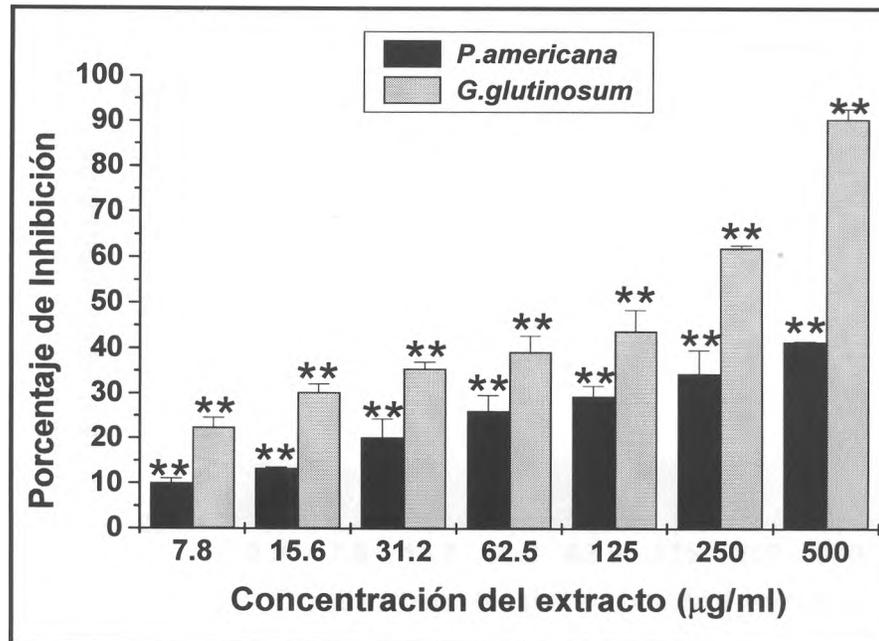


Figura 11.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos contra el crecimiento de *Escherichia coli* 25922. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de dos experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $2 \times 10^9 \pm 1 \times 10^8$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Los vehículos de metanol no tuvieron un efecto significativo en comparación con el control, el valor de D.O. del control fue de 1.095 ± 0.07 .

6.1.4 Efecto antibiótico contra la cepa ATCC 43895 de *Escherichia coli*

La otra cepa de *E. coli* utilizada fue la 43895, con la cual se observó escasa actividad por parte de ambos extractos. De manera que para el extracto metanólico crudo de *G. glutinosum* a una concentración de 500pg/ml la inhibición fue de casi 26%, y a 250pg/ml de 19%. Para el extracto de *P. americana* se vio que la inhibición fue de 28% a 500pg/ml, en ninguna otra de las diluciones se observó actividad (Fig. 12).

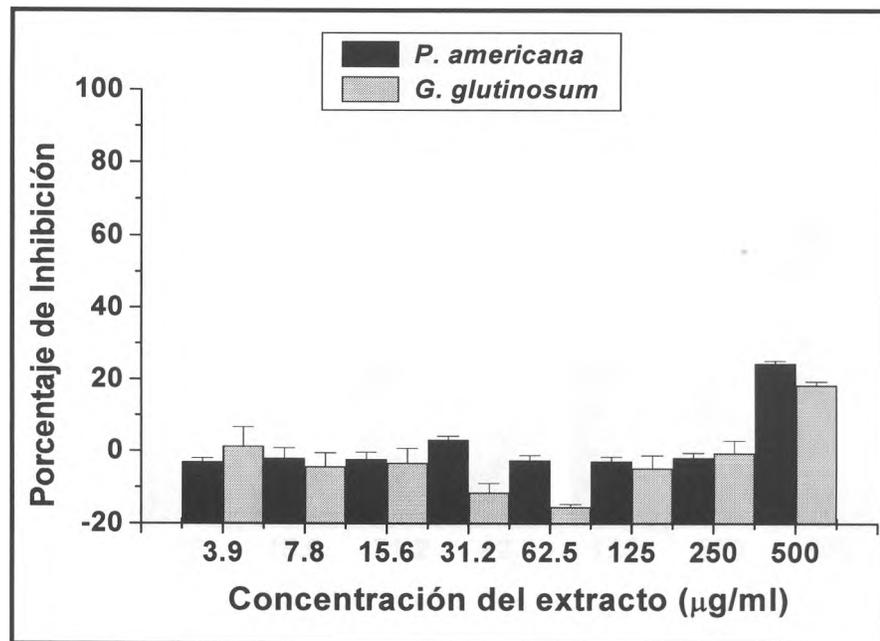


Figura 12.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de contra el crecimiento de la cepa 43895 de *Escherichia coli*. Inhibición determinada por la técnica de reducción del MTT. Los datos representan la media \pm ESM de cuatro repeticiones por tratamiento, de tres experimentos independientes. El valor de D.O. del control fue de 1.289 ± 0.02 .*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Los UFC mostraron los mismos resultados que la técnica del MTT, la actividad de los extractos fue baja, y solamente tubo efecto inhibitorio a la concentración de 500pg/ml (Fig. 13).

Los vehículos de metanol no tuvieron un efecto significativo en comparación con el control, el valor de D.O. del control fue de 1.161 ± 0.03 .

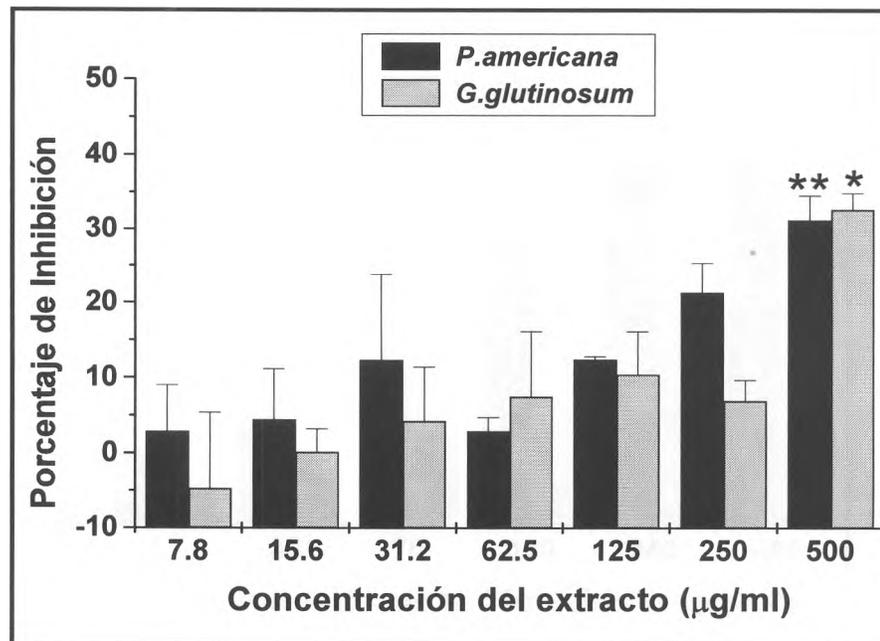


Figura 13.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos contra el crecimiento de la cepa 43895 de *Escherichia coli*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de dos experimentos independientes. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. El número de UFC del control fue de $1.5 \times 10^9 \pm 3.6 \times 10^7$.

6.2 Efecto inhibitorio de las drogas control contra *Mycobacterium tuberculosis*

6.2.1 Efecto inhibitorio de la clofazimina (CLF)

La clofazimina demostró ser efectiva contra las dos cepas utilizadas. Contra H37Ra su CMI fue de 120pg/ml, mientras que para la cepa H37Rv la actividad disminuyó hasta 150pg/ml (Fig 14).

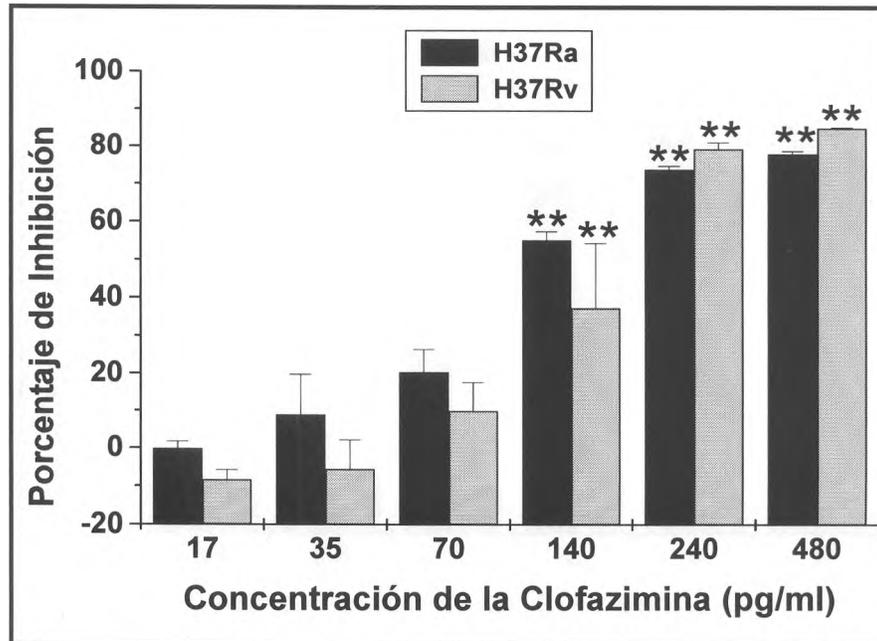


Figura 14.- Efecto inhibitorio de la clofazimina contra *M.tuberculosis* H37Ra y H37Rv. Inhibición determinada por la técnica de reducción del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de tres experimentos independientes. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. El valor de I.F. del control fue de $9.6 \times 10^7 \pm 3.5 \times 10^6$ para H37Ra y de $7.8 \times 10^7 \pm 6.1 \times 10^6$.

6.2.2 Efecto inhibitorio de la rifampicina (RFP)

La rifampicina fue aún más tóxica contra la micobacteria que la clofazimina.

La CMI contra H37Ra fue de 1 pg/ml y contra H37Rv de 2 pg/ml (Fig 15).

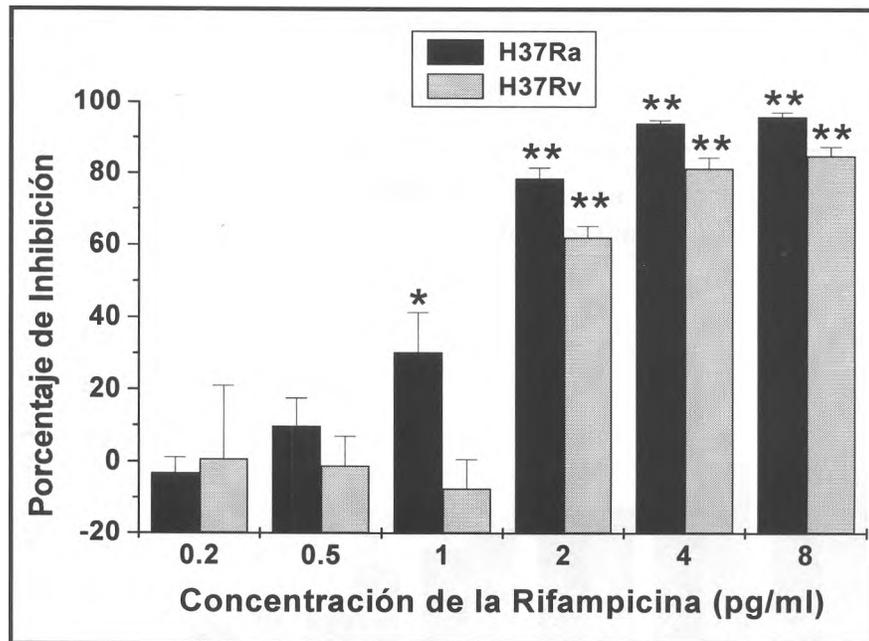


Figura 15.- Efecto inhibitorio de la rifampicina contra *M.tuberculosis* H37Ra y H37Rv. Inhibición determinada por la técnica de reducción del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de tres experimentos independientes. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. El valor de I.F. del control fue de $9.6 \times 10^7 \pm 3.5 \times 10^6$ para H37Ra y de $7.8 \times 10^7 \pm 6.1 \times 10^6$.

6.3 Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana* contra *Mycobacterium tuberculosis*

6.3.1 Actividad contra la cepa H37Ra de *Mycobacterium tuberculosis*

El extracto metanólico crudo de *G. glutinosum* presentó actividad contra la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* a partir de 250pg/ml con una inhibición del crecimiento del 31%, y a 500p.g/ml de 68%. Por el contrario, *P. americana* mostró actividad a

partir de 125pg/ml, con una inhibición de 53%, y con 250pg/ml y 500pg/ml la inhibición fue de 73 y 74%, respectivamente (Fig.16).

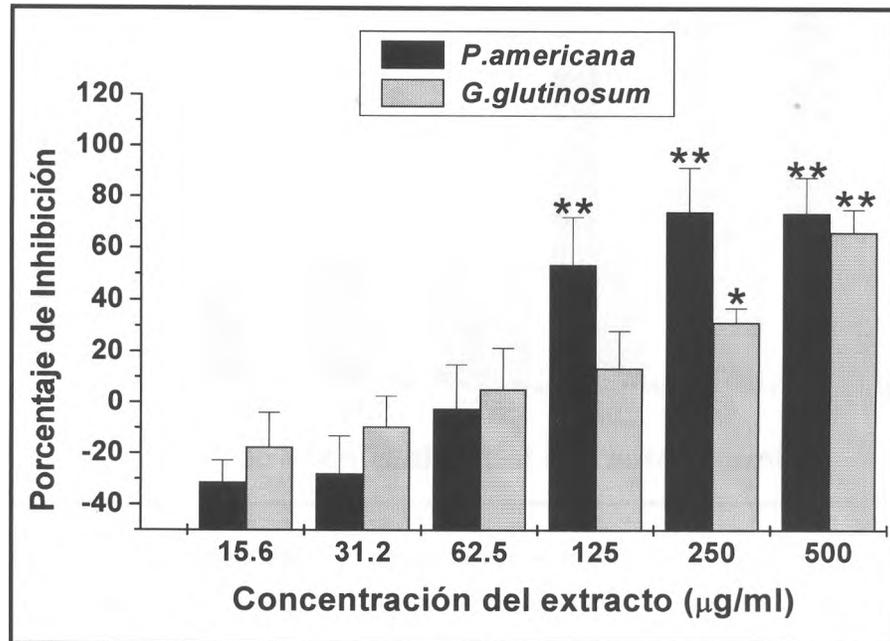


Figura 16.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos contra el crecimiento de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica de oxidación del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de cuatro experimentos independientes. El valor de I.F. del control fue de $7.2 \times 10^7 \pm 3.2 \times 10^6$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

En los resultados obtenidos por el método de UFCs se observa que el extracto metanólico crudo de *Gymnosperma glutinosum* tiene actividad a partir de 62.5pg/ml con una inhibición de 19%, a 125pg/ml de 33%, a 250pg/ml de 54% y a 500pg/ml de 100%. Con el extracto metanólico de *Persea americana* también se observó un incremento de la actividad. A 31.2pg/ml y 62.5pg/ml se observa una inhibición del 12 al 13%. A 125pg/ml se observa una inhibición del 81% y a 250pg/ml y 500pg/ml del 96 al 99%. (Fig. 17).

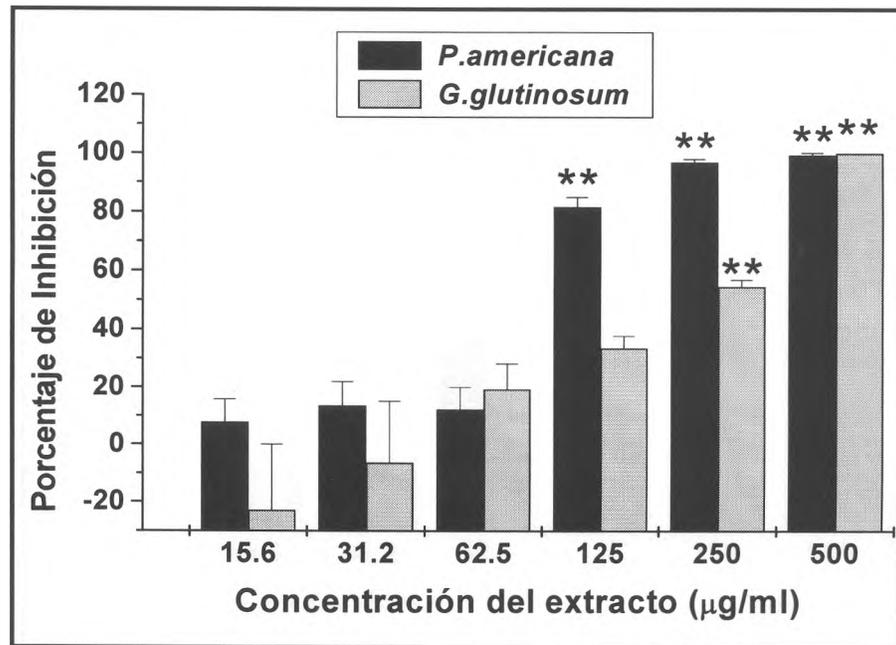


Figura 17.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos de contra el crecimiento de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $2.8 \times 10^7 \pm 9.1 \times 10^6$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

6.3.2 Actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv

El extracto metanólico crudo de *G. glutinosum* presentó actividad contra la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* a 500pg/ml una inhibición del 56%. Mientras que el extracto metanólico crudo de *P. americana* inicia su actividad a 62.5pg/ml con una inhibición de 41%, a las concentraciones de 125, 250 y 500pg/ml la inhibición varía del 81 al 83%. (Fig. 18).

Los vehículos de metanol no tuvieron un efecto significativo en comparación con el control, el valor de I.F. del control fue de $6.3 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^6$.

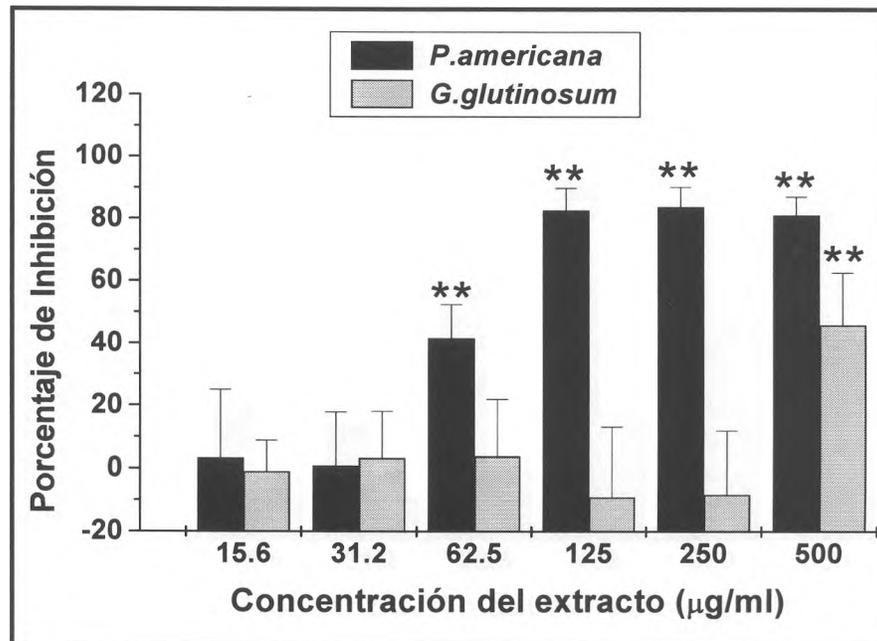


Figura 18.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos contra el crecimiento de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica de oxidación del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de cuatro experimentos independientes. El valor de I.F. del control fue de $1.3 \times 10^8 \pm 6.5 \times 10^5$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Por el método de UFCs confirmamos los resultados obtenidos con el azul Alamar, ya que el extracto metanólico crudo de *G. glutinosum* muestra actividad a 250 µg/ml con una inhibición de 38%, y a 500 µg/ml de 100%. Con el extracto metanólico de *P. americana* se observó que a 62.5 µg/ml con una inhibición de 46%, a las concentraciones de 125, 250 y 500 µg/ml la inhibición varía del 92 al 93% (Fig. 19).

Los vehículos de metanol no tuvieron un efecto significativo en comparación con el control, el valor de I.F. del control fue de $9.5 \times 10^7 \pm 3.1 \times 10^6$.

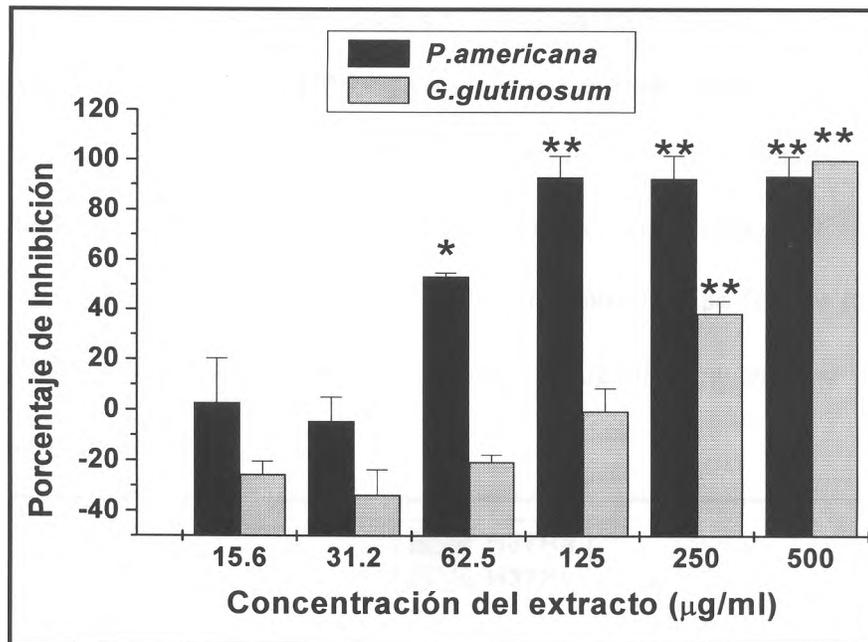


Figura 19.- Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos crudos contra el crecimiento de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $4.7 \times 10^7 \pm 3 \times 10^6$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

6.4 Efecto de las fracciones obtenidas por el método Soxhlet a partir del extracto crudo de *Persea americana* contra *Mycobacterium tuberculosis*

Por el método Soxhlet se obtuvieron cuatro fracciones y fueron nombradas de acuerdo con el solvente utilizado para separarlas. Las cuatro fracciones fueron la fracción de metanol (PAME), la fracción de metanol y cloruro de metileno (PAMM), la fracción de cloruro de metileno (PAMC) y la fracción de hexano (PAH). Solamente la fracción PAH presentó actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis*.

6.4.1 Efecto inhibitorio de la fracción hexánica del extracto de *Persea americana* contra las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

La fracción hexánica del extracto de *P. americana* inhibió el crecimiento de la cepa H37Ra de *M. tuberculosis* hasta un 92 y 93% a una concentración de 31.2|o.g/ml y de 20% con 15.6jug/ml del extracto. La inhibición contra la cepa H37Rv se mantuvo hasta 84% a 31.2pg/ml, bajando a 71% a 15.6pg/ml, para terminar en 14% a 7.8 µg/ml (Fig.20).

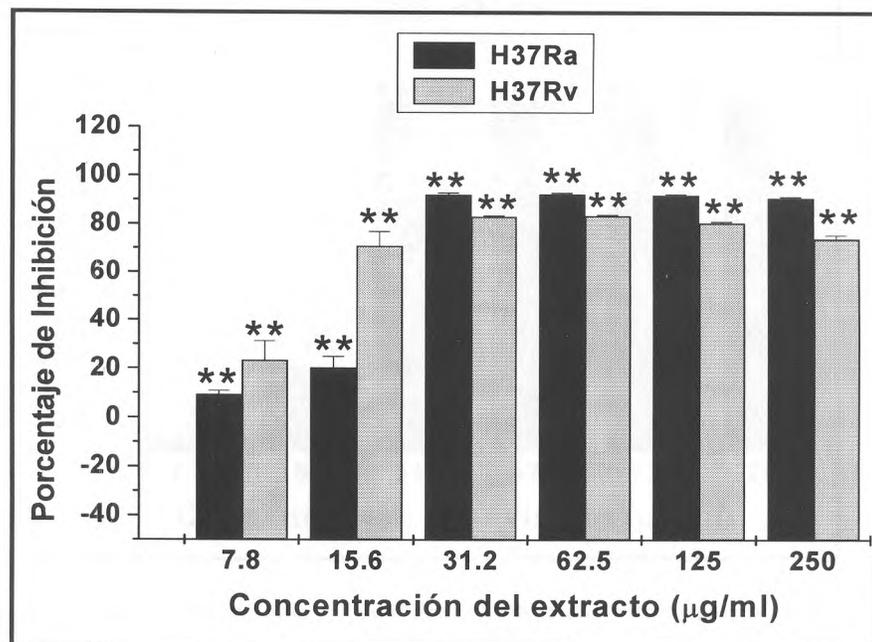


Figura 20.- Efecto inhibitorio de la fracción PAH contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica de oxidación del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de cuatro experimentos independientes. El valor de I.F. del control fue de $1.9 \times 10^8 \pm 2.6 \times 10^6$ para H37Ra y de $2.3 \times 10^8 \pm 2.4 \times 10^6$ para H37Rv. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Por el medio de las UFCs confirmamos los resultados obtenidos con el azul Alamar, la fracción PAH muestra actividad contra la cepa H37Ra a partir 15.6pg/ml, con una inhibición de 17.6%, y hasta 250pg/ml la inhibición llega a 100%. En contra de la cepa H37Rv, la actividad comienza a 15.6pg/ml con una inhibición de 86.5%, y 100% en las concentraciones más altas (Fig.21).

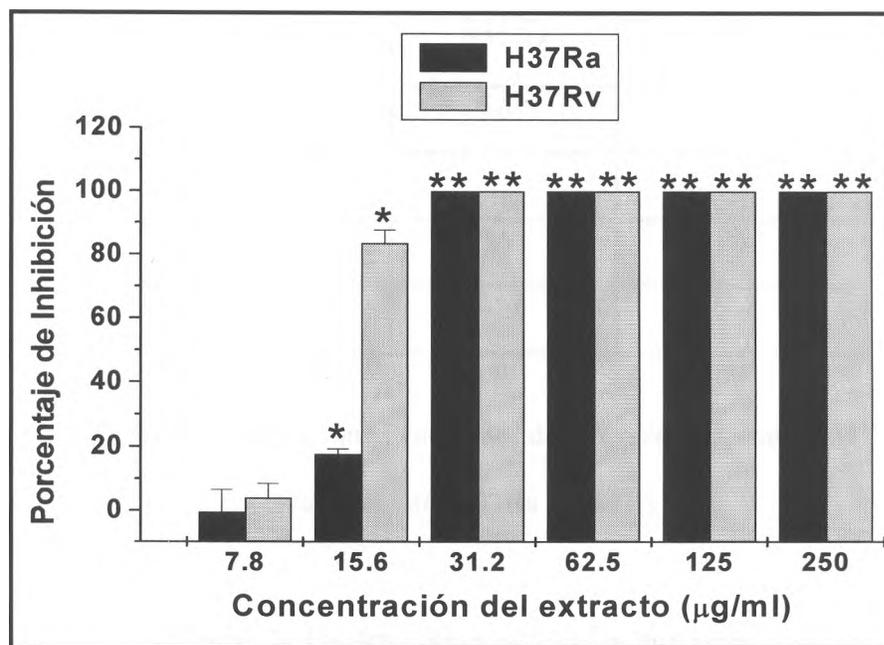


Figura 21.- Efecto inhibitorio de la fracción PAH contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de dos experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^6$ para H37Ra y de $1 \times 10^8 \pm 3.1 \times 10^6$ para H37Rv. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

El efecto inhibitorio de los vehículos de hexano no fue significativamente diferente, por lo que se considera que la actividad se debe exclusivamente al extracto PAH. En los ensayos con dicho vehículo, se presentó un valor de I.F. de $9.7 \times 10^7 \pm 3.3 \times 10^6$ para la cepa H37Ra, y de $9.6 \times 10^7 \pm 5.3 \times 10^6$ para la cepa H37Rv.

Fracción	CMI (pg/ml)	
	H37 Ra	H37Rv
PAME	SA*	SA*
PAMM	SA*	SA*
PAMC	SA*	SA*
PAH	15.6	7.8

*SA: Sin actividad a 250pg/ml

Tabla II.- CMIs de las Fracciones de *P.americana* contra *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv

6.5 Efecto inhibitorio de las fracciones obtenidas por separación en columna de Sílica gel a partir del extracto hexánico de hojas de *Gymnosperma glutinosum* contra *Mycobacterium tuberculosis*

Por medio del factor de resistencia (RF) en columna de sílica gel 60 (32 - 63 mm) se obtuvieron varias fracciones y fueron nombradas de manera arbitraria. Las fracciones probadas, en orden de menor a mayor polaridad fueron: SCI, SC4, B1, B2, C1, C2, DI, El y F (Tabla III). De dichas fracciones, SCI solamente presentó inhibición a 250pg/ml, SC4, B1 y C2 a partir de 125pg/ml; las fracciones B2, DI y El mostraron

actividad a la concentración de 62.5pg/ml; las fracciones C1 y F no interfirieron con la replicación de la micobacteria.

Fracción	Origen
SC 1	FSC* 1
SC 4	FSC 4
B 1	FSC 2 y 3
B 2	FSC 5,6 y 7
C 1	FSC 2 y 3
C 2	FSC 5,6 y 7
D 1	FSC 2 y 3
E 1	FSC 2 y 3
F	FSC 5,6 y 7
* FSC: Fracción Super Colectiva	

Tabla III Extractos utilizados en los ensayos de viabilidad de *M. Tuberculosis*

6.5.1 Efecto inhibitorio de la fracción SCI del extracto de *Gymnosperma glutinosum* contra las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

La fracción SCI solamente presentó inhibición del 87% el crecimiento de la cepa FÍ37Ra a una concentración de 250pg/ml, la cepa H37Rv no se afectó por este extracto (Fig.22).

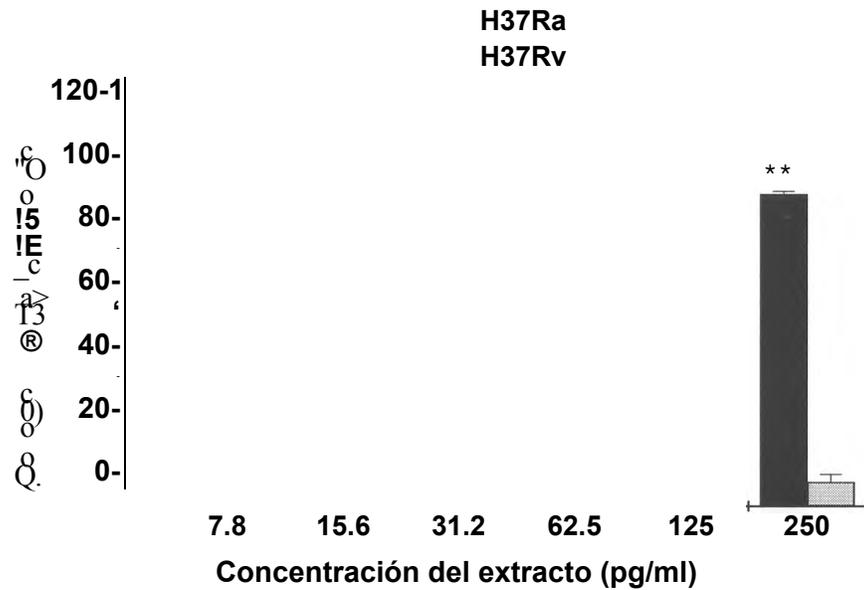


Figura 22.- Efecto inhibitorio de la fracción SCI contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica de oxidación del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de dos experimentos independientes. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. El valor de I.F. del control fue de $2.3 \times 10^8 \pm 1 \times 10^7$ para la cepa H37Ra y de $1.3 \times 10^8 \pm 5.3 \times 10^6$ para la cepa H37Rv.

Estos resultados fueron confirmados con las UFCs. La fracción SCI muestra actividad contra la cepa H37Ra a partir 125pg/ml con una inhibición de 18.5%, y a 250pg/ml del 100%. En contra de H37Rv no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. (Fig.23).

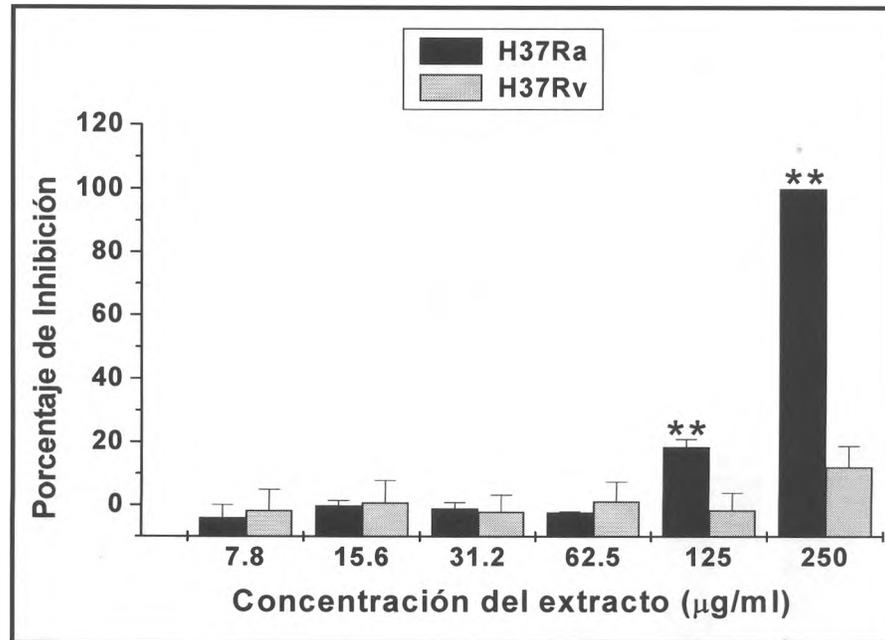


Figura 23.- Efecto inhibitorio de la fracción SCI contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de dos experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $1 \times 10^8 \pm 2.6 \times 10^6$ para la cepa H37Ra y de $1.3 \times 10^8 \pm 8.3 \times 10^6$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

El efecto inhibitorio de los vehículos de cloroformo no fue significativo, para la cepa H37Ra el valor de I.F. del control fue de $1.8 \times 10^8 \pm 1.2 \times 10^6$ y para la cepa H37Rv fue de $1.4 \times 10^8 \pm 1 \times 10^6$.

6.5.2 Efecto inhibitorio de la fracción SC4 del extracto de *Gymnosperma glutinosum* contra las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

La fracción SC4 presentó inhibición significativa contra ambas cepas, contra H37Ra a 125p.g/mL con 72.9% y a 250pg/mL con 79.2; contra la cepa H37Rv se presentó a 125µg/mL con 84% y a 250µg/ml con 86% (Fig.24).

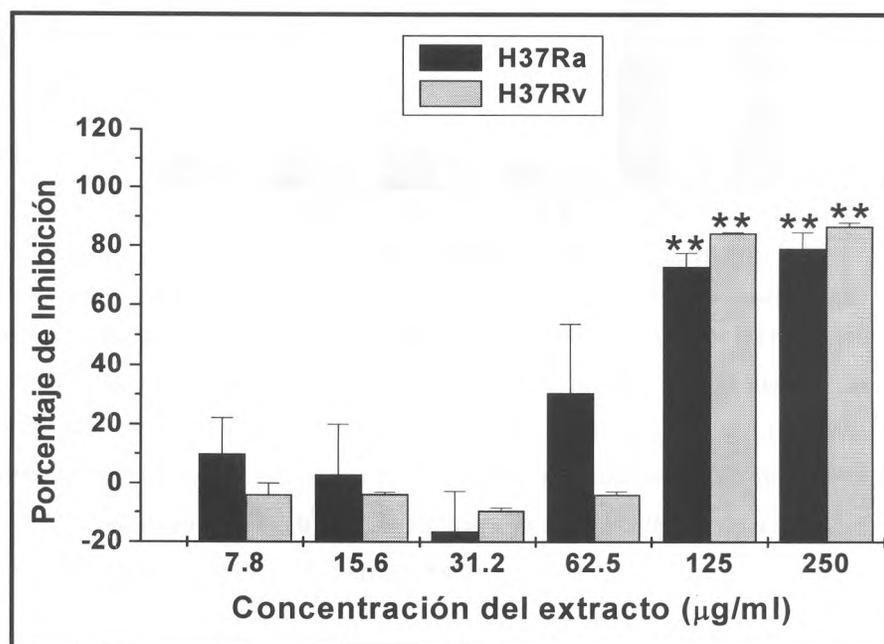


Figura 24.- Efecto inhibitorio de la fracción SC4 contra el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv. Inhibición determinada por la técnica de oxidación del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de tres experimentos independientes. El valor de I.F. del control fue de $1.1 \times 10^8 \pm 1.4 \times 10^7$ para la cepa H37Ra y de $5.5 \times 10^8 \pm 2.7 \times 10^5$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Las UFCs mostraron un comportamiento similar. La fracción SC4 muestra actividad contra las cepas H37Ra y H37Rv a 125p.g/ml con una inhibición de 94 y 98%, respectivamente, y a 250pg/ml del 100 y 98% (Fig.25).

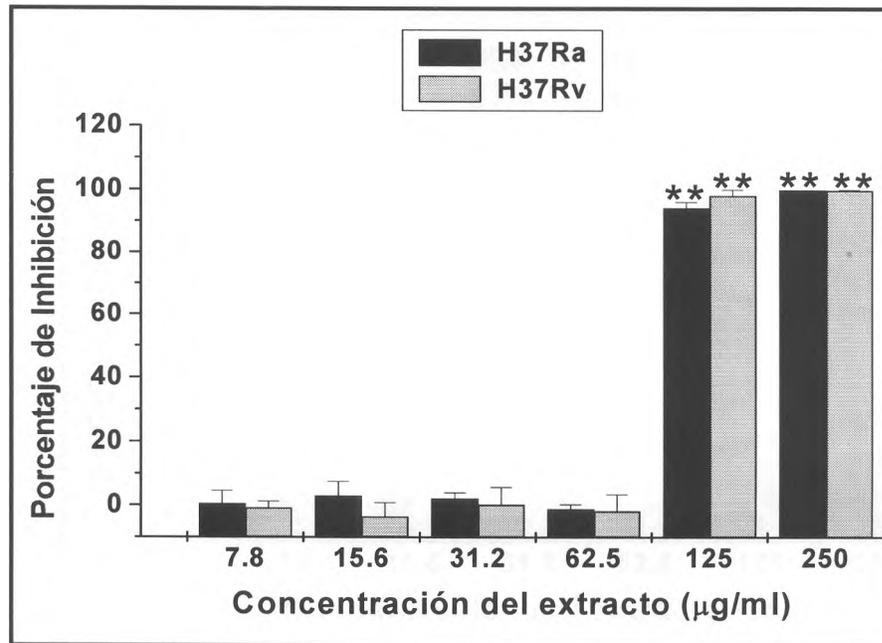


Figura 25.- Efecto inhibitorio de la fracción SC4 contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de dos experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $1 \times 10^8 \pm 2.6 \times 10^6$ para la cepa H37Ra y de $1.3 \times 10^8 \pm 8.3 \times 10^6$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, PO.OI.

6.5.3 Efecto inhibitorio de la fracción B1 del extracto de *Gymnosperma glutinosum* contra las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

La fracción B1, por el contrario, solamente afectó a la cepa H37Rv, con una inhibición del 33% a 250p.g/ml y 16% a 125pg/ml (Fig.26).

En los ensayos por conteo de UFC no hubo inhibición de las cepas por parte del extracto B1 de *G. glutinosum*. El número de UFC para el control de la cepa H37Ra fue de $9.4 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^6$; para el control de la cepa H37Rv fue de $1.2 \times 10^8 \pm 5.3 \times 10^6$.

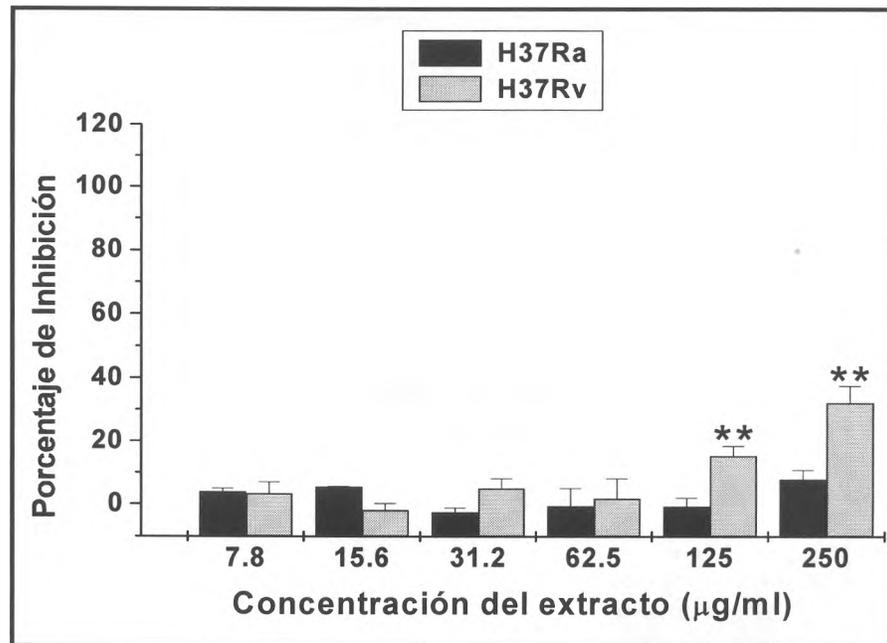


Figura 26.- Efecto inhibitorio de la fracción B1 contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica de oxidación del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de dos experimentos independientes. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. El valor de I.F. del control fue de $2.4 \times 10^8 \pm 3.5 \times 10^6$ para la cepa H37Ra y de $1.3 \times 10^8 \pm 5.3 \times 10^6$ para la cepa H37Rv.

6.5.4 Efecto inhibitorio de la fracción B2 del extracto de *Gymnosperma g/utinosum* contra las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

La fracción B2 inhibió en 47.5% el crecimiento de la cepa H37Ra a partir de 62.5pg/ml, y a 76% con las concentraciones más altas. Mientras que para la cepa H37Rv la inhibición empezó a 125pg/ml con una inhibición del 85% (Fig.27).

En los resultados con UFCs podemos observar que la fracción B2 tiene actividad contra la cepa H37Ra a partir de 62.5pg/mL con un porcentaje de inhibición de 50% y de 100% para las concentraciones más altas. En contra de la cepa H37Rv tiene actividad a 125 y 250pg/ml con una inhibición del 100% (Fig.28).

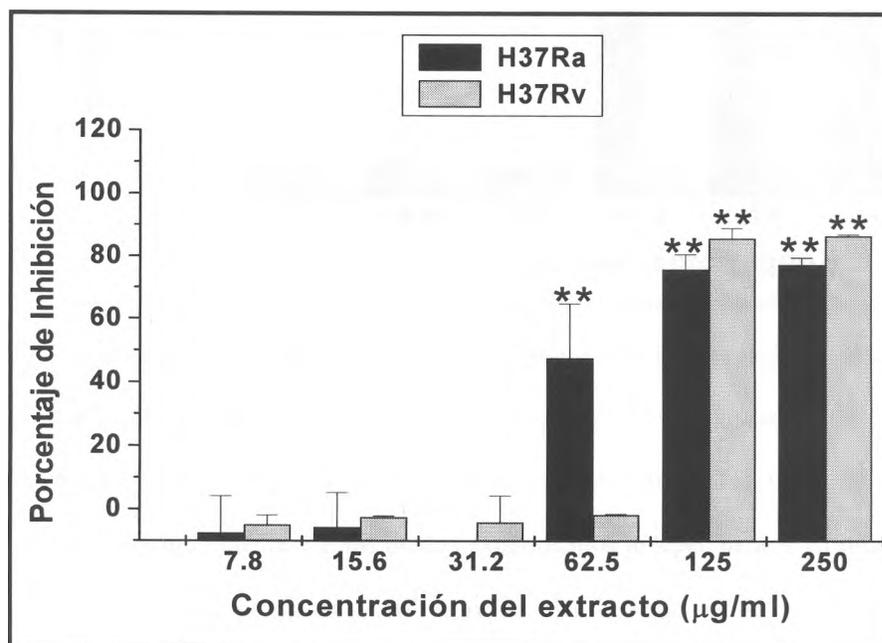


Figura 27.- Efecto inhibitorio de la fracción B2 contra el crecimiento de de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica de oxidación del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de tres experimentos independientes. El valor de I.F. del control fue de $1.2 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^7$ para la cepa H37Ra y de $5.5 \times 10^8 \pm 2.7 \times 10^5$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

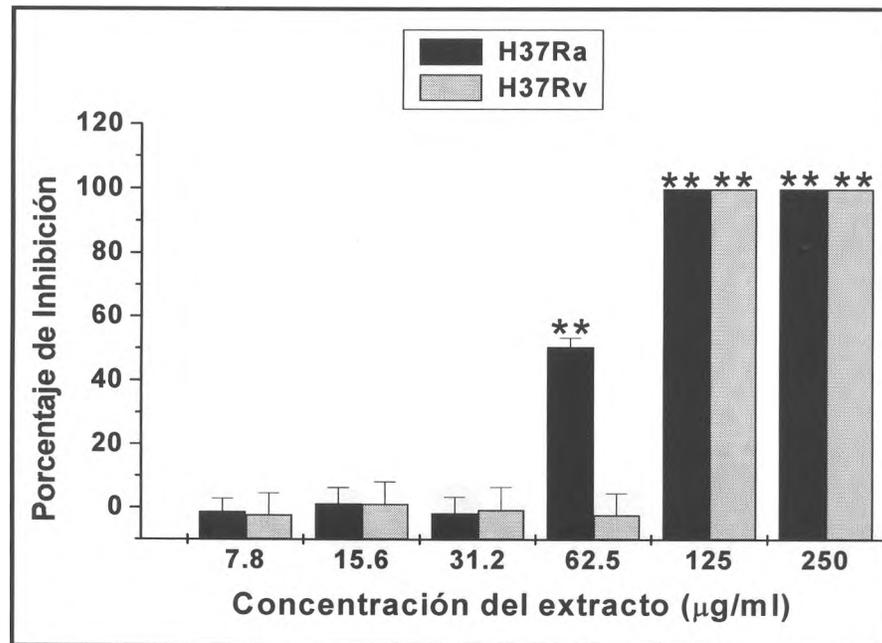


Figura 28.- Efecto inhibitorio de la fracción B2 contra el crecimiento de para las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de dos experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^6$ para la cepa H37Ra y de $1.4 \times 10^8 \pm 9.4 \times 10^6$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, PO.OI.

6.5.5 Efecto inhibitorio de la fracción C2 del extracto de *Gymnosperma glutinosum* contra las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

La fracción C2 inhibió de manera importante a ambas cepas a una concentración de 250pg/ml (91% contra la cepa H37Rv y 73% contra la cepa H37Ra), sin embargo a 125pg/ml solo inhibió a la cepa H37Ra en un 73% (Fig.29).

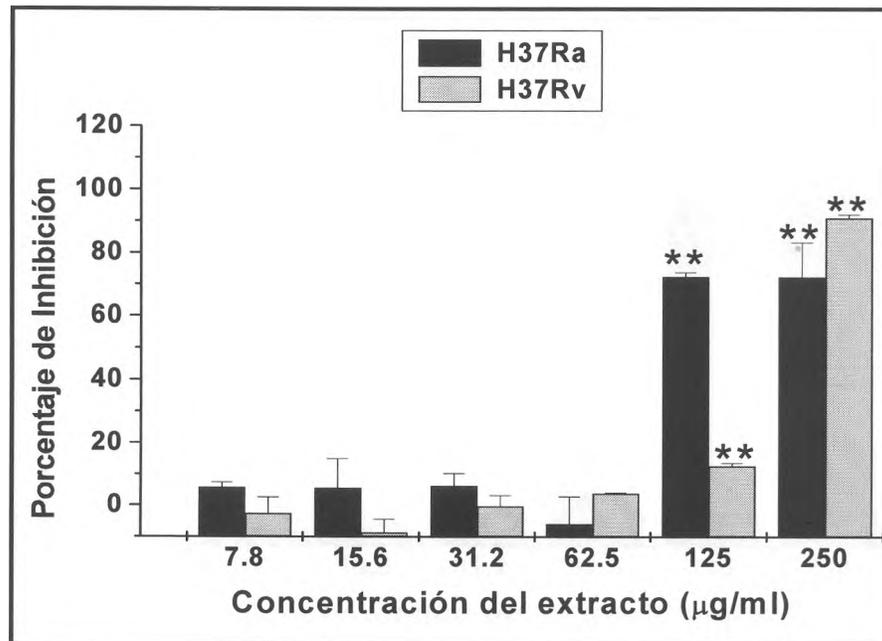


Figura 29.- Efecto inhibitorio de la fracción C2 contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica de oxidación del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de dos experimentos independientes. El valor de I.F. del control fue de $1.6 \times 10^8 \pm 8 \times 10^6$ para la cepa H37Ra y de $1.4 \times 10^8 \pm 1.4 \times 10^5$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

En los ensayos con UFCs confirmamos que la fracción C2 tiene actividad contra la cepa H37Ra, a partir de 125pg/ml con una inhibición del 100%; contra la cepa H37Rv la actividad sólo se presentó a 250pg/ml con una inhibición de 95.5% (Fig.30).

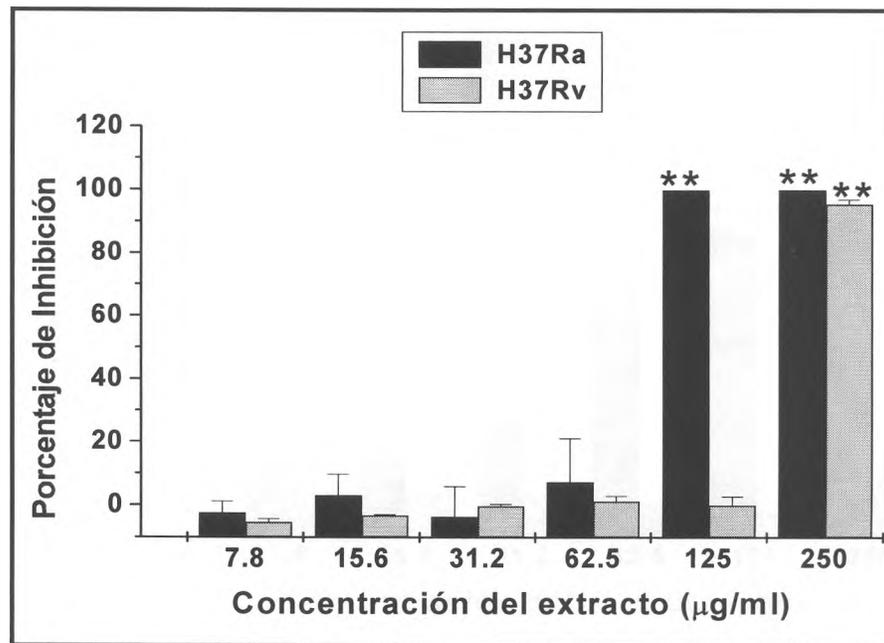


Figura 30.- Efecto inhibitorio de la fracción C2 contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de dos experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $9.7 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^6$ para la cepa H37Ra y de $1.2 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^6$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

6.5.6 Efecto inhibitorio de la fracción DI del extracto de *Gymnosperma glutinosum* contra las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

La fracción DI presentó los siguientes valores de porcentaje de inhibición para la cepa H37Ra: 91% a 250p.g/ml, 80% a 125pg/ml y 49% a 62.5p.g/ml contra la cepa H37Rv no tuvo actividad estadísticamente significativa. (Fig.31).

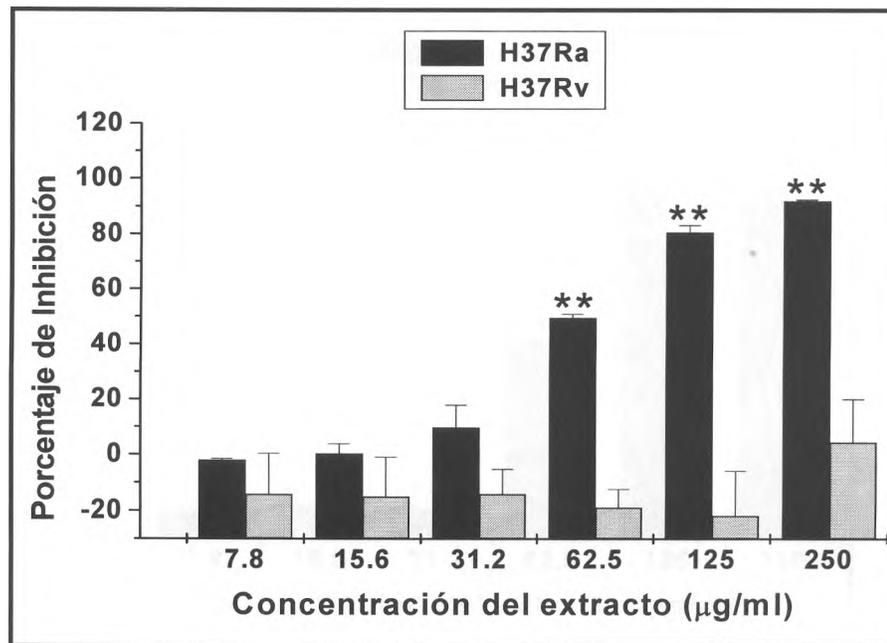


Figura 31.- Efecto inhibitorio de la fracción DI contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*, determinada por la técnica de oxidación del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de dos experimentos independientes. El valor de I.F. del control fue de $2.5 \times 10^8 \pm 1.2 \times 10^7$ para la cepa H37Ra y de $9 \times 10^7 \pm 6.9 \times 10^6$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Para la cepa H37Rv, los resultados con UFCs no muestran sensibilidad en contra de la fracción DI, sin embargo, para la cepa H37Ra la sensibilidad comienza a la concentración de 62.5pg/mL, con una inhibición del 52.7%, a 125 y 250pg/mL se inhibió al 100% (Fig.32).

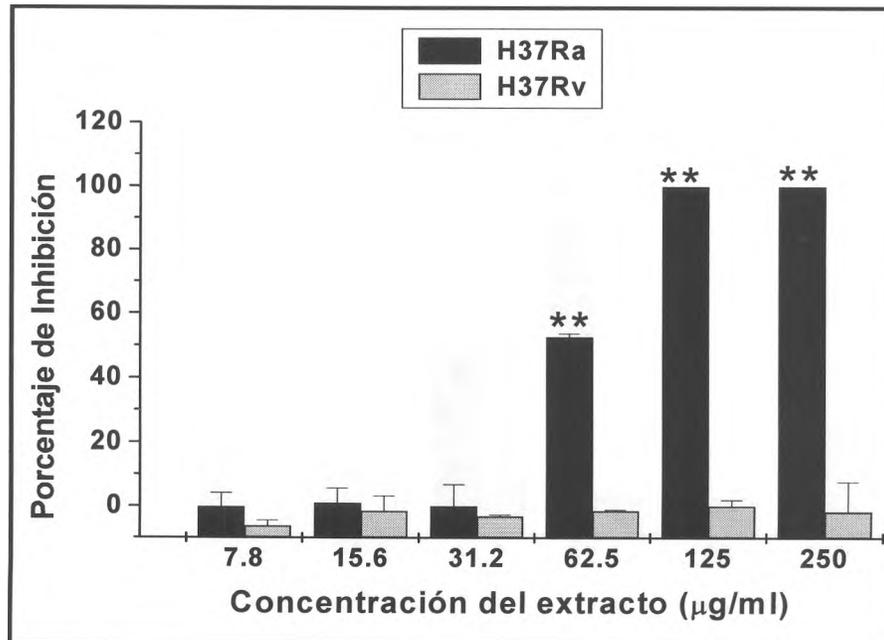


Figura 32.- Efecto inhibitorio de la fracción DI contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de dos experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $9.9 \times 10^7 \pm 3.4 \times 10^6$ para la cepa H37Ra y de $1.2 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^6$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, PO.OI.

6.5.7 Efecto inhibitorio de la fracción EI del extracto de *Gymnosperma glutinosum* contra las cepas H37Ra y H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

La fracción EI tuvo una actividad ligeramente mayor a la de la fracción DI, sus porcentajes de inhibición fueron: 91% a 250pg/mL, 93% a 125pg/mL, 86% a 62.5 pg/mL y 37% a 31.2 pg/mL para la cepa H37Ra y de a 74% 250pg/mL para H37Rv (Fig.33).

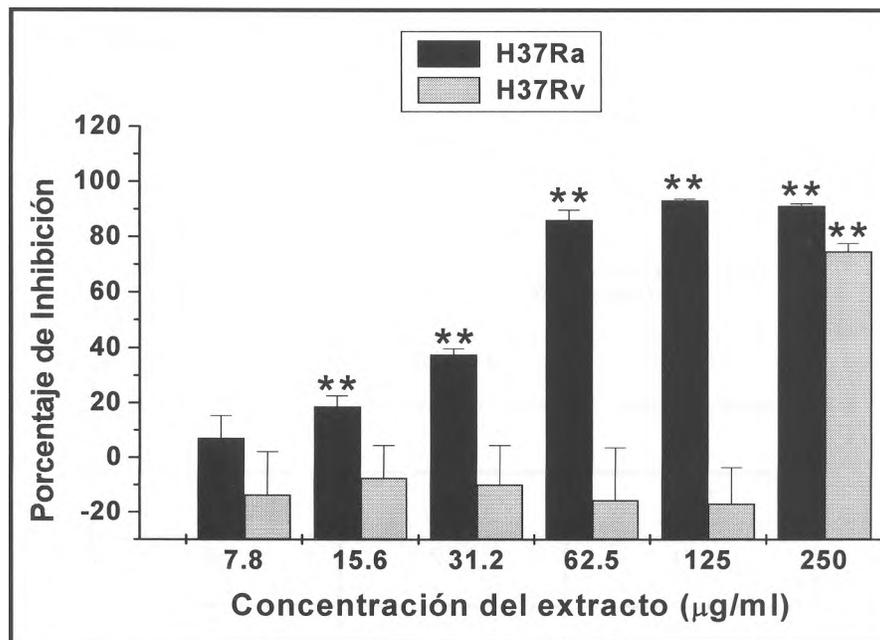


Figura 33.- Efecto inhibitorio de la fracción El contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica de oxidación del Azul Alamar. Los datos representan la media \pm ESM de tres repeticiones por tratamiento, de tres experimentos independientes. El valor de I.F. del control fue de $2.5 \times 10^8 \pm 1.5 \times 10^7$ para la cepa H37Ra y de $9.1 \times 10^7 \pm 8.3 \times 10^6$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Los UFCs arrojaron datos similares a los obtenidos por el Resazurin, indicando que la cepa H37Rv es resistente al la fracción El, mientras que para la cepa H37Ra se presentó actividad a partir de 31.2p.g/mL, con una inhibición de 37.2%, a 62.5pg/mL del 68.6%, y a 125 y 250pg/mL del 100% (Fig.34).

Fracción	CMI (pg/ml)	
	H37 Ra	H37Rv
SCI	250	SA*
SC4	125	62.5
B1	SA*	125
B2	125	62.5
C1	SA*	SA*
C2	125	SA*
DI	62.5	SA*
E1	31.2	250
F	SA*	SA*

*SA: Sin actividad a 250(ig/ml)

Tabla IV.- CMIs de las Fracciones de *G. glutinosum* contra las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*.

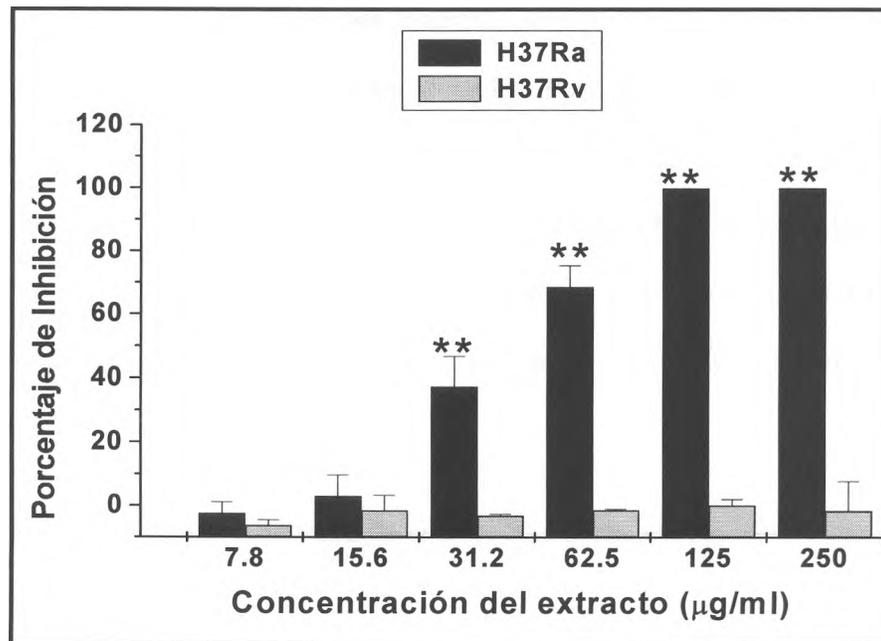


Figura 34.- Efecto inhibitorio de la fracción El contra el crecimiento de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis*. Inhibición determinada por la técnica del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Los datos representan la media \pm ESM de dos experimentos independientes. El número de UFC del control fue de $9.7 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^6$ para la cepa H37Ra y de $1.2 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^6$ para la cepa H37Rv. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

6.6 Ensayos con macrófagos

6.6.1 Medición de nitritos en ensayos con macrófagos intraperitoneales murinos estimulados con el extracto metanólico crudo de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana*

La detección de la liberación de nitritos, es una medida indirecta de probar la producción de óxido nítrico por macrófagos activados. En este trabajo se demostró la

producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales murinos tratados con ambos extractos metanólicos crudos. Con el extracto de *P. americana* no se observa un incremento en la producción de nitritos, e incluso en algunos pozos la producción fue menor en comparación con el control negativo (Fig.35). El extracto de *G. glutinosum* estimuló a los macrófagos, aumentando la producción de nitritos desde 2.7 hasta 3.5nMol/pozo, sin embargo en las concentraciones del extracto más altas la producción disminuye (Fig.36).

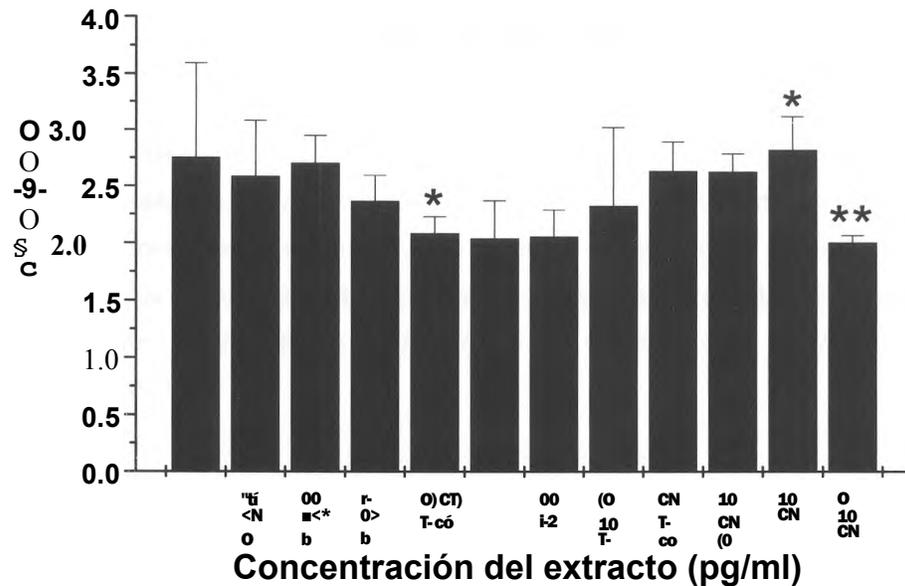


Figura 35.- Medición de nitritos en un ensayo con macrófagos estimulados con extracto metanólico de *P. americana*. Los nMoles/pozo fueron determinados con el método de Griess, las absorbancias fueron obtenidas con un filtro de 540nm. Los datos representan la media ± ESM de cuatro repeticiones de dos experimentos independientes. La producción de nMol/pozo del control fue de 2.754 ± 0.837 *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

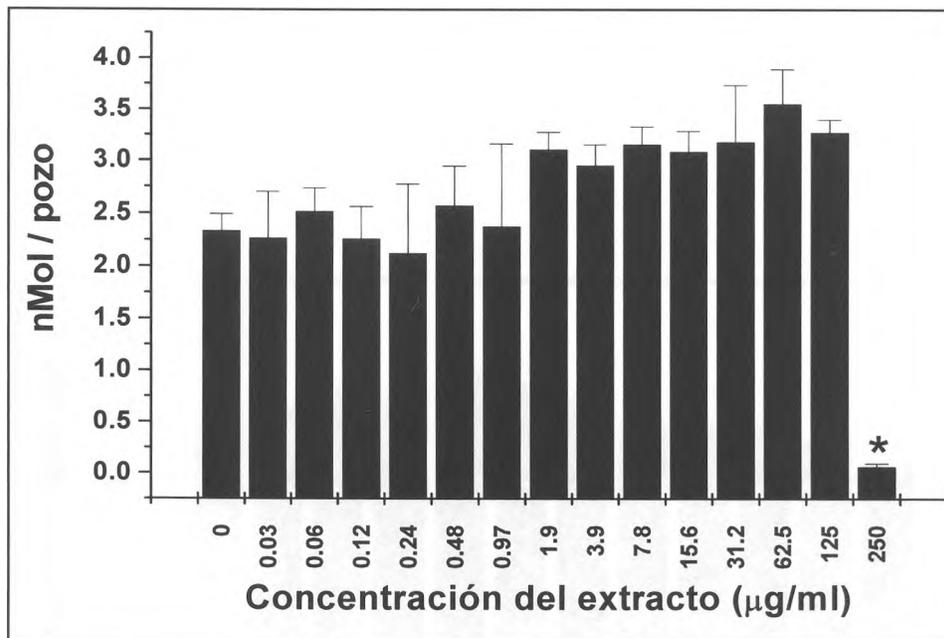


Figura 36.- Medición de nitritos en un ensayo con macrófagos estimulados con extracto metanólico de *G. glutinosum*. Los nMoles/pozo fueron determinados con el método de Griess, las absorbancias fueron obtenidas con un filtro de 540nm. Los datos representan la media \pm ESM de cuatro repeticiones de dos experimentos independientes. La producción de nMol/pozo del control fue de 2.332 ± 0.159 *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

6.6.2 Citotoxicidad de los extractos metanólicos crudos de *Gymnosperma glutinosum* y *Persea americana* contra macrófagos intraperitoneales murinos

El extracto metanólico crudo de *P. americana* presenta toxicidad contra los macrófagos a partir de 250 µg/mL, con un porcentaje de 14% de muerte celular (Fig.37).

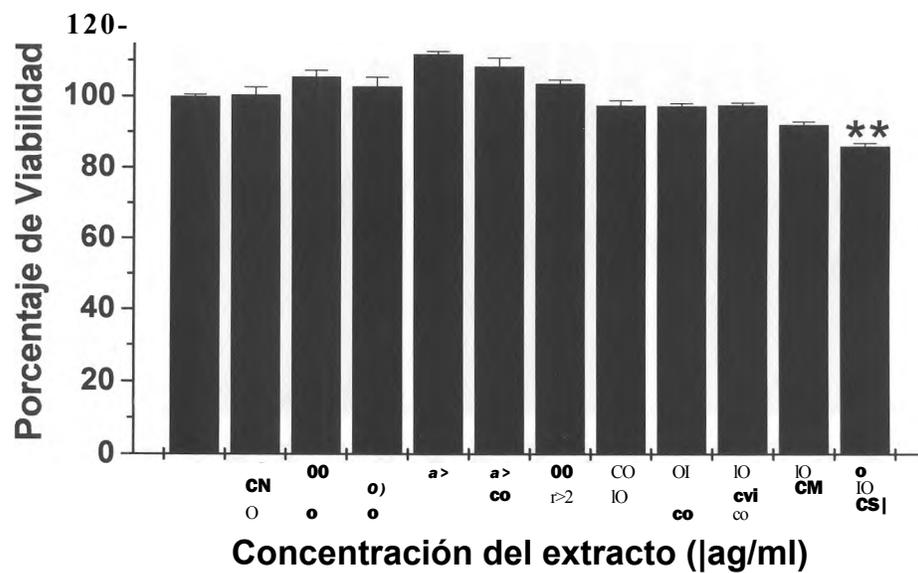


Figura 37.- Efecto citotóxico del extracto de *P. americana* contra macrófagos peritoneales murinos. Citotoxicidad determinada por la técnica de reducción del MTT. Los datos representan la media \pm ESM de cuatro repeticiones por tratamiento, de dos experimentos independientes. El valor de D.O. del control fue de 0.626 ± 0.003 .*, $P < 0.05$;**, $P < 0.01$.

G. glutinosum también presentó toxicidad, alcanzando el 15% de muerte celular a 250pg/mL (Fig.38).

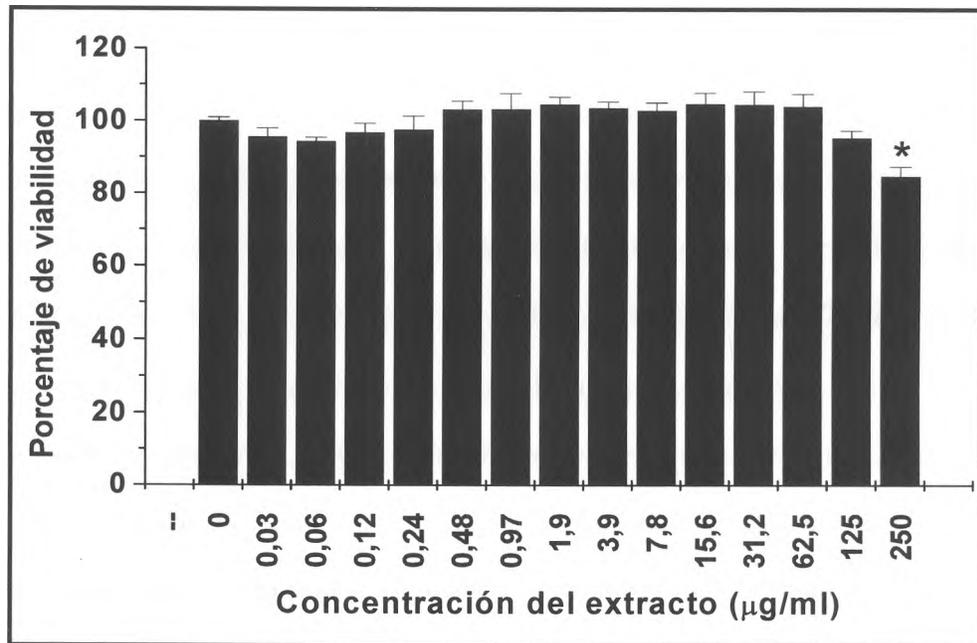


Figura 38.- Efecto citotóxico del extracto de *G. glutinosum* contra macrófagos peritoneales murinos. Inhibición determinada por la técnica de reducción del MTT. Los datos representan la media \pm ESM de cuatro repeticiones por tratamiento, de dos experimentos independientes. El valor de D.O. del control fue de 0.684 ± 0.006 .*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

7. DISCUSIÓN

Al iniciar este proyecto, los estudios con plantas de las familias Asteraceae y Lauraceae como agentes antibacterianos eran muy escasos, por lo que la selección de las plantas se realizó principalmente en base su uso medicinal tradicional. Sin embargo, el renovado interés general por la farmacología herbolaria ha dado como producto varias publicaciones recientes, en las que se analizan experimentos realizados con otras plantas, como *Baccharis gaudichaudiana* (Guo *et al.*, 2006), *Echinops ritro* (Fokialakis *et al.*, 2006), *Anthemis aciphyla* (Baser *et al.*, 2006), *Artemisa asiatica* (Oh *et al.*, 2005) y *Pterocaulon spp* (Stein *et al.*, 2006) por parte de la familia Asteraceae, o bien *Machilus odoratissima* (Giang *et al.*, 2006) y *Cinnamomum verum* (Shoene *et al.*, 2005; Rosi y Gastaldi, 2005) de la familia Lauraceae. La información recabada, además de los estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, reforzó nuestra decisión de probar los extractos de hojas de *G. glutinosum* y *P. americana*.

En la primera etapa del experimento, se seleccionaron los extractos acuosos y metanólicos y se obtubieron de acuerdo a la técnica utilizada en otros estudios (Ahmed *et al.*, 2005; Akihisa *et al.*, 2005; Betoni *et al.*, 2006; Holetz *et al.*, 2002; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003; Rai y Acharya, 1999). En los extractos acuosos se obtuvieron compuestos de naturaleza polar alta, y era predecible que no mostraran actividad inhibitoria en contra de *M. tuberculosis*, ya que la micobacteria está rodeada por una cápsula cerosa compuesta por lípidos hidrofóbicos. En base a dichos resultados, se optó por no prolongar los experimentos con los extractos acuosos. Es lógico esperar que solamente las moléculas de baja polaridad puedan interferir con el metabolismo de la

micobacteria (Reddy *et al.*, 1999). Los extractos metanólicos crudos, a diferencia de los acuosos mostraron actividad inhibitoria antimicobacteriana, por lo que se procedió a fraccionar dichos extractos a través del método Soxhlet (explicado en 5.1.3). Al revisar resultados de otros experimentos publicados, se puede decir que sus resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo. Por ejemplo, Molina-Salinas en el 2006, reportó haber trabajado con extractos crudos acuosos, hexánicos y cetónicos, de los cuales el único que no presentó actividad antibacteriana fue el extracto acuoso. Otros autores no mencionan haber trabajado con extractos acuosos, reportan solamente resultados obtenidos con extractos a base de hexano, metanol o alcohol absoluto (Torrado-Truiti, 2003; Shawar, 1997; Jiménez-Arellanes, 2003). En contraste, al buscar nuevos antimicóticos, como en los trabajos realizados por Holezt *et al.* (2002) y Rai y Acharya (1999), se prefiere trabajar con extractos acuosos, o bien obtenidos de una combinación agua-metanol (90-10%). Al buscar un nuevo agente antimicrobiano siempre hay que tener en mente la naturaleza y estructura del patógeno.

Los extractos hexánicos de ambas plantas mostraron mayor actividad en contra de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis* en comparación con los extractos obtenidos con otros solventes y con los extractos metanólicos crudos. Sin embargo, solamente se llevó a fraccionamiento por columna de sílica gel al extracto de *G. glutinosum*, del cual se obtuvieron sustancias con diferente factor de resistencia al cloroformo-acetato de etilo 1:1 (RF), las cuales fueron identificadas de manera arbitraria con números y letras, de las cuales se seleccionaron las fracciones que contenían la mayor gama de compuestos, de manera que se seleccionaron las fracciones SCI, SC4, BI, B2, CI, C2, DI, EI y F. En el extracto SCI se identificaron sustancias con RF de 0.879 y LO; en el extracto

7. DISCUSIÓN

Al iniciar este proyecto, los estudios con plantas de las familias Asteraceae y Lauraceae como agentes antibacterianos eran muy escasos, por lo que la selección de las plantas se realizó principalmente en base su uso medicinal tradicional. Sin embargo, el renovado interés general por la farmacología herbolaria ha dado como producto varias publicaciones recientes, en las que se analizan experimentos realizados con otras plantas, como *Baccharis gandichaudiana* (Guo *et al*, 2006), *Echinops ritro* (Fokialakis *et al*, 2006), *Anthemis aciphyla* (Baser *et al*, 2006), *Artemisa asiatica* (Oh *et al*, 2005) y *Pterocaulon spp* (Stein *et al*, 2006) por parte de la familia Asteraceae, o bien *Machilus odoratissima* (Giang *el al*, 2006) y *Cinnamomum verum* (Shoene *et al*, 2005; Rosi y Gastaldi, 2005) de la familia Lauraceae. La información recabada, además de los estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, reforzó nuestra desición de probar los extractos de hojas de *G. glutinosum* y *P. americana*.

En la primera etapa del experimento, se seleccionaron los extractos acuosos y metanólicos y se obtubieron de acuerdo a la técnica utilizada en otros estudios (Ahmed *et al*, 2005; Akihisa *et al*, 2005; Betoni *et al*, 2006; Holetz *et al*, 2002; Jiménez-Arellanes *et al*, 2003; Rai y Acharya, 1999). En los extractos acuosos se obtuvieron compuestos de naturaleza polar alta, y era predecible que no mostraran actividad inhibitoria en contra de *M. tuberculosis*, ya que la micobacteria está rodeada por una cápsula cerosa compuesta por lípidos hidrofóbicos. En base a dichos resultados, se optó por no prolongar los experimentos con los extractos acuosos. Es lógico esperar que solamente las moléculas de baja polaridad puedan interferir con el metabolismo de la

Bidé 0.882; en el extracto B2 de 0.337; en el extracto C1 de 0.635, 0.729 y 0.823; en el extracto C2 de 0.216 y 0.337; en los extractos SC4 y DI de 0.541, en el extracto El de 0.216, 0.337 y 0.541; y en el F de 0.216. Cabe mencionar que las sustancias de mayor RF son las de menor polaridad. Los extractos que inicialmente presentaron mayor actividad fueron el DI y El, por lo que decidimos probar los extractos con los mismos componentes, pero con mayor pureza, por lo que se seleccionaron los extractos B2 y SC4. Los extractos El y el DI tienen en común la sustancia de RF 0.541; sin embargo, la actividad de la mezcla de sustancias presentes en la fracción El fue mayor a la actividad de las moléculas en estado más puro, probablemente debido a un efecto sinérgico entre las sustancias con RF de 0.541, 0.337 y 0.216. Dichas fracciones deberán seguir siendo estudiadas para identificar sus componentes por medio de estudios con resonancia magnética, nuclear, rayos infrarrojos y espectrometría de masas. El extracto de *P. americana* será fraccionado y probado en estudios posteriores. También quedará pendiente la identificación del mecanismo por el cual estos extractos ejercen su actividad microbicida en contra de *M. tuberculosis*.

Durante su replicación, las micobacterias tienden a formar grumos, los cuales pueden estar formados por unos cuantos bacilos o por cientos de ellos. Esta característica puede traducirse en resultados engañosos al momento de realizar los ensayos. Para corregir este problema se recomienda que durante la preparación de alícuotas bacterianas estandarizadas, se utilice medio Middlebrook 7H9 adicionado con 0.05% de Tween 80.

Para disgregar de manera eficaz a las micobacterias se recomienda además sonicar, centrifugar y/o filtrar (poro de 0.8µm) la solución de bacterias (Collins y Franzblau, 1997; Franzblau *et al.*, 1997; Yajko *et al.*, 1995). Debido a la naturaleza hidrofóbica de la cápsula de las micobacterias, es más difícil una interacción entre el azul alamar y las enzimas reductoras bacterianas. Para facilitar este proceso es necesario debilitar ligeramente la estructura de la cápsula, Collins y Franzblau (1997), por ejemplo, adicionan al mismo tiempo a cada pozo 12.5µl de azul Alamar 10X y 20µl de Tween 80 al 20% (detergente), o bien, una mezcla 1:1 recién preparada del azul Alamar 10X y Tween 80 al 10% (Franzblau *et al.*, 1998). De no seguirse dichos protocolos, las lecturas pueden ser engañosas y habría una deficiente reproducibilidad de los ensayos.

Abate (1998), Mshana *et al.* (1998) y Caviedes (2002) reportaron el uso de MTT para la determinación de resistencia a diversas drogas para *M. tuberculosis*, sin embargo, al repetir la metodología usada por estos autores no se obtuvieron resultados confiables. Para solucionar este problema se realizaron los ajustes a la técnica sugeridos por Morcillo *et al.*, (2004) y Ribeiro *et al.* (2004), que consiste en realizar mezclas de MTT con Tween 80, pero los resultados fueron los mismos, las absorbancias fueron homogéneas incluso en los pozos considerados como blancos (medio sin bacterias ni tratamientos). Al tratarse de una técnica colorimétrica también existe la posibilidad de que los pigmentos contenidos en los propios extractos pudieran provocar interferencia a la hora de realizar las lecturas en el espectrofotómetro. En la realización de los primeros ensayos se presentaron los problemas antes mencionados, por lo cual se decidió cambiar el método de evaluación de la viabilidad, optando mejor por la técnica del azul Alamar.

Los resultados obtenidos en un ensayo de sensibilidad a extractos o drogas serán aún más confiables si se utiliza más de una técnica para medir la viabilidad de las bacterias. Falzari *et al.* (2005), por ejemplo, además de usar el azul Alamar, también reporta el uso del conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Dicha técnica fue implementada en el presente trabajo, confirmando los resultados obtenidos. El aspecto negativo de las UFC es que la duración de cada ensayo puede llegar a triplicarse. Aunado a esto, hay que tener en cuenta que al trabajar con la micobacteria no es recomendable agregar antibióticos a los medios de cultivo, por lo que el manejo de estos y del material de trabajo en general deberá de realizarse con extrema cautela, realizando constantes pruebas de asepsia a lo largo del proyecto. Las placas de agar Middlebrook 7H10 son peculiarmente susceptibles a contaminación por hongos, por lo que se recomienda realizar varias repeticiones dentro de un mismo ensayo.

Gomez-Flores *et al.*, en el 2000, en un ensayo *in vitro* demostró la activación de macrófagos y linfocitos de ratón utilizando extractos metanólicos crudos de hojas de *Plantago major*. En dicho estudio se midió la producción de TNF- α y de óxido nítrico en macrófagos expuestos a los extractos, los cuales aumentaron de manera considerable, por lo que se podría inferir que los extractos actuaron como una señal de activación de las células, es decir, produjeron un efecto pro-inflamatorio. En base a este antecedente se decidió medir los niveles de nitritos, el producto metabólico más estable del óxido nítrico, lo cual es una manera indirecta de medir su producción. También fue una buena oportunidad para medir la toxicidad de nuestros extractos en contra de células del sistema inmune. Los resultados mostraron que el extracto metanólico crudo de *G.*

glutinosum estimulaba la producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales murinos, pero también resultó ser tóxico a concentraciones elevadas. El extracto de *P. americana*, en cambio, no favoreció la activación de los macrófagos, y los niveles de óxido nítrico se mantuvieron a un nivel basal o ligeramente menor. El fundamento de la técnica para detectar nitritos está basado en la interacción química de tres compuestos, los nitritos contenidos en el medio de cultivo, la sulfanilamida (reactivo B) y el dihidrocloruro de N-1-naptiletilendiamina ó NED (reactivo A).

8. CONCLUSIONES

En los ensayos contra de las cepas H37Ra y H37Rv de *M. tuberculosis* se observó que el extracto metanólico crudo de *G. glutinosum* solamente presenta actividad inhibitoria en las concentraciones más altas, y a pesar de que la actividad mejoró después de haber fraccionado el extracto en componentes más puros, sigue siendo exclusiva de las concentraciones mayores. Las fracciones que mostraron mayor actividad antimicobacteriana fueron la SC4, DI y EI. Sin embargo, la concentración mínima inhibitoria fue de 31.2pg/ml, la cual es relativamente alta si la comparamos con las terapias que se utilizan actualmente.

En cambio, el extracto metanólico crudo de *P. americana* presentó actividad inhibitoria a partir de concentraciones más pequeñas (7.8 pg/ml) que el extracto de *G. glutinosum*, en contra de ambas cepas de *M. tuberculosis*. A pesar de que la fracción hexánica obtenida por el método Soxhlet (PAH) aún contiene una cantidad de moléculas muy diversa, la actividad aumentó, tal y como se esperaba, en comparación con el extracto metanólico crudo y al seguir purificando los componentes dicha actividad se seguirá incrementando. En base a estos resultados podemos decir que los extractos de esta planta tienen el potencial necesario para considerarlos como potenciales drogas para combatir la tuberculosis.

El extracto metanólico crudo de *P. americana* no estimula la producción de óxido nítrico en macrófagos intraperitoneales murinos, y a concentraciones iguales o mayores de

250pg/ml resulta tóxico para estas células, por lo que podemos concluir que dicho extracto no contiene constituyentes que actúen como agentes pro-inflamatorios.

En el caso del extracto metanólico crudo de *G. glutinosum* también presenta citotoxicidad a partir de 250pg/ml en contra de los macrófagos, lo cual podría estar relacionado con la producción de óxido nítrico que está asociado a la inducción de apoptosis en estas células (Albina *et al.*, 1993).

LITERATURA CITADA

Abate G, Mshana RN, Miomer H. 1998. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2(12): 1011-1016.

Abe F, Nagafuji S, Okawa M, Finjo J, Akahane H, Ogura T, Martinez-Alfaro MA, Reyes-Chilpa R. 2005. Trypanocidal Constituents in Plants 5. Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in the Seeds of *Persea americana*. Notes Biol. Pharm. Bull. 28(7): 1314-1317.

Abreu PM y Branco PS. 2003. Natural Product-Like Combinatorial Libraries. J. Braz. Chem. Soc. 14(5):675-712.

Ahmed E, Malik A, Ferheen S, Afza N, Azhar-Ul-Haq, Lodhi MA, Choudhery MI. 2005. Chymotrypsin inhibitory triterpenoids from *Silybum marianum*. Chem. Pharm. Bull. 54(1) 103—106.

Akihisa T, Franzblau SG, Ukiya M, Okuda H, Zhang F, Yasukawa K, Suzuki T, Kimura Y. 2005. Antitubercular activity of triterpenoids from Asteraceae flowers. Boil. Pharm. Bull. 28(1): 158-160.

Akselband Y, Cabral C, Shapiro DS, McGrath P. 2005. Rapid mycobacteria drug susceptibility testing using gel microdrop (GMD) growth assay and flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* 62 (2): 181-197.

Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. 1993. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *Journal of Immunology* 150 (11):5080-5085.

Antia BS, Okokon JE, Okon PA. 2005. Hypoglycemic activity of aqueous leaf extract of *Persea Americana* Mili. *Indian J. Pharmacol.* 37(5):325-326.

Aung H, Toossi Z, Wisnieski JJ, Wallis RS, Culp LA, Phillips NB, Phillips M, Averill LE, Daniel TM, Ellner JJ. 1996. Induction of monocyte expression of tumor necrosis factor- α by the 30-kD α -antigen of *Mycobacterium tuberculosis* and synergism with fibronectin. *J. Clin. Investig.* 98:1261-1268.

Barre JT, Bowden BF, Coll JC, Jesús J, Fuente VE, Janairo GC, Ragasa CY. 1997. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. *Phytochemistry* 45:321-324.

Baser KHC, Demirci B, Iscan G, Hashimoto T, Demirci F, Noma Y, Asakawa Y. 2006. The Essential Oil Constituents and Antimicrobial Activity of *Anthemis aciphylla* BOISS. var. *discoidea* BOISS. *Chem. Pharm. Bull.* 54(2) 222—225

Bates RB, Schaefer JP. (1977). Técnicas de investigación en química orgánica. Editorial Prentice/may Internacional: Madrid España, pp. 45-49, 83-89, 95-97.

Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Femanes-Junior A. 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 101 (4):387-390.

Bonecini-Almeida MG, Chítale S, Boutsikakis I, Geng J, Doo H, He S, Ho JL. 1998. Induction of In Vitro Human Macrophage *Anti-Mycobacterium tuberculosis* Activity: Requirement for IFN- γ and Primed Lymphocytes. The Journal of Immunology 160:4490-4499.

Borchers AT, Keen CL, Stem JS, Gershwin ME. 2000. Inflammation and native American medicine: the role of botanicals. The American journal of clinical nutrition 72:339-47.

Byrd TF. 1997. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) promotes growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes iron-mediated growth suppression is correlated with decreased release of TNF- α from iron-treated infected monocytes. J. Clin. Investig. 99:2518-2529.

Calderón JS, Segura-Correa R, Cespedes CL, Toscano RA. 2001. Crystal and molecular structure of (-)-17-hydroxy-neo-clerod-3-en-15-oic acid from *Gymnosperma glutinosum*. *Anal Sci.* 17(12): 1467-8.

Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. 2002. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 40(5): 1873-1874.

Clayton RD, Duffy SR, Wilkinson N, Garry R, Jackson AM. 2004. Anti-proliferative effect of mycobacteria, IFN- γ and TNF- α on primary cultures derived from endometrial stroma: possible relevance to endometriosis? *American journal of reproductive immunology* 51:63-70.

Cohn DL, Bustreo F, Raviglione MC. 1997. Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. *Clinical Infectious Diseases* 24: S121.

Collins LA y Franzblau SG. 1997. Microplate Alamar Blue assay versus BACTEC 640 system for High-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41(5): 1004-1009.

Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12(4):564-582.

Cynamon MH, Klemens SP, Sharpe CA, Chase S. 1999. Activities of several novel oxazolidinones against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1189-91.

Chaisson RE and Slutkin G. 1989. Tuberculosis and human immune deficiency virus infection. *Am Rev Respir Dis* 139:96 - 100.

Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, and Bloom BR. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* 175:1111 - 1122.

Chen T, Scott E, Morrison DC. 1994. Differential effects of serum on lipopolysaccharide receptor-directed macrophage activation for nitric oxide production. *Immunology Letters* 40:179-187.

Chien HP, Yu MC, Ong TF, Lin TP, Luh KT. 2000. *In vitro* activity of rifabutin and rifampin against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association* 99:408-11.

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. 1993. Múltiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. *Science* 259:1739-1742.

Domínguez XA, Torre B. 1974. Two pentamethoxylated flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 13:1624-1625.

Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, Hoffner S, RiederHL, Binkin N, Dye C, Williams R, Raviglione MC. 2001. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *New England Journal of Medicine* 344:1294-303.

Fabricant DS y Farnsworth NR. 2001. The Value of Plants Used in Traditional Environmental Health Perspectives. 109:69-75.

Falzari K, Zhu Z, Pan D, Lui H, Hongmanee P, Franzblau SG. 2005. In Vitro and In Vivo Activities of Macrolide Derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(4): 1447-1454.

Farley, D. 1993. Making sure hype doesn't overwhelm Science. *FDA Consumer* 27:8-13.

Fenhalls G, Stevens L, Bezuidenhout J, Amphlett GE, Duncan K, Bardin P, Lukey PT. 2002. Distribution of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Immunology*. 105(3):325-35.

Fischl M, Uttamchandani ARB, Daikos GL, Poblete RB, Moreno JN, Reyes RR, Boota AM, Thompson LM, Clearly TJ, and Lai S. 1992. An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug-resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann. Intern. Med.* 117:177-183.

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, and Bloom BR. 1993. An essential role for interferon- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* 178:2249-2254.

Flynn JL, Chan J. 2003. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol.* 15(4):450-5.

Francois G, Ake Assi L, Holenz J, Bringmann G. 1996. Constituents of *Picralima nitida* display pronounced inhibitory activities against asexual erythrocytic forms of *Plasmodium falciparum* in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 54:113-117.

Fokialakis N, Cantrell CL, Duke SO, Skaltsounis AL, Wedge DE. 2006. Antifungal activity of thioterpens from *Echinops ritro*. *J. Agric. Food Chem.* 54:1651-1655.

Foroughbackhch R, Ramírez RG, Hauad LA, Castillo-Morales NE, Moya-Rodríguez J. 1997. Seasonal dynamics of the leaf nutrient profile of 10 native shrubs of northeastern México. Forest, Farm and Community Tree Research Reports 2:8-12.

Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernández A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. 1998. Rapid, Low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. Journal of clinical microbiology 36(2):362-366.

Gal lardo-Vázquez MC, Jiménez-Aponte R, Ballesteros-muñoz ML, Torres-Galvan MG, Gonzalez-Hernandez A, Cano-Asseleih LM. 1992. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana III. Instituto nacional indigenista. Biblioteca de la medicina tradicional mexicana. México pp.55-58 y 1318-1319.

García-Alvarado JS, Iracheta F, Galván F, Heredia NL. 2001a. Microbiological survey of retail herbs and spices from Mexican markets. Journal of Food Protection 64(1):99-104

García-Alvarado JS, Verde-Star MJ, Heredia NL. 2001b. Traditional Uses and scientific knowledge of medicinal plants from México and Central America. A review. J. Herbs Spi. Med Plants 8(2/3):37-89.

Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, Lakey DL, Harding CV, Boom WH. 2003. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fe gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 71(8):4487-97.

Giang PM, Son PT, Matsunami K, Otsuka H. 2006. New Neolignans and Lignans from Vietnamese Medicinal Plant *Machilus odoratissima* NEES. *Notes Chem. Pharm. Bull.* 54(3):380-383.

Gillespie SH, Billington O. 1999. Activity of moxifloxacin against mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44:393-5.

Gómez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R, Mehta RT. 1995. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *Journal of Clinical Microbiology* 33:1842-1846.

Gomez-Flores R, Hsia R, Tamez-Guerra R, Mehta RT. 1996a. Enhanced intramacrophage activity of resorcinomycin-A against *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex after liposome encapsulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40:2545-2549.

Gomez-Flores, R. Kansal, R. Tamez-Guerra, Mehta RT. 1996b. Growth promotion of *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex by enterobacterial acetate. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55(6):610-616.

Gomez-Flores R, Tucker SD, Kansal R, Tamez-Guerra R, Mehta RT. 1997a. Enhancement of antibacterial activity of clofazimine against *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex infection induced by IFN- γ is mediated by TNF- α . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39(2): 189-197.

Gomez-Flores R, Tamez-Guerra R, Tucker SD, Mehta RT. 1997b. Bidirectional effects of IFN- γ on growth of *Mycobacterium avium* complex in murine peritoneal macrophages. *Journal of Cytokine and Interferon Research* 17:331-336.

Gomez-Flores R, Calderón CL, Scheibel LW, Tamez-Guerra P, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra R., Weber RJ. 2000. Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. *Phytotherapy Research* 14(8):617-622.

Gomez-Flores R, RJ Weber. 2001. Increased tumor necrosis factor- α and nitric oxide production by rat macrophages following *in vitro* stimulation and intravenous administration of the S-opioid agonist SNC 80. *Life Sciences* 68(24):2675-2684.

Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3(1):23-35.

Greene JB, Sidhu GS, Lewin S, Levine JF, Masur H, Simberkoff MS, Nicholas P, Good RC, Zolla-Pazner SB, Pollock AA, Tapper ML, Holzman RS. 1982. *Mycobacterium avium-intracellulare*: a cause of disseminated life-threatening infection in homosexuals and drug abusers. *Ann. Intern. Med.* 97:539-546.

Guo Y, Li Y, Xu J, Watanabe R, Oshima Y, Yamakuni T, Ohizumi Y. 2006. Bioactive *ent*-Clerodane Diterpenoids from the Aerial Parts of *Baccharis gaudichaudiana*. J. Nat. Prod 69:274-276.

Hall-Ramirez V, Rocha-Palma M, Rodríguez-Vega E. 2002. Plantas Medicinales Volumen II. Centro Nacional de Información de Medicamentos: Costa Rica, pp. 1-2.

Hickman SP, Chan J, Sálgame P. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. J Immunol. 168(9):4636-42.

Holezt FB, Pessini GL, Sanches NR, García-Cortez DA, Vataru-Nakamura C, Dias-Filho BP. 2002. Screening of some plants used in brazilian Folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rios de Janeiro 97(7): 1027-1031.

Hostettmann K, Terreaux C. 2000. Search for new Fead Compounds from higher Plants. Chimia. 54:.652-657.

Ji B, Founis N, Maslo C, Truffot-Pemot C, Bonnafous P, Grosset J. 1998. *In vitro* and *in vivo* activities of moxifloxacin and clinafloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42:2066-9.

Jimenez-Arellanes A, Meckes M, Ramirez R, Torres J, Luna-Herrera J. 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy research* 17:1-6.

Jo EK, Park JK, Dockrell HM. 2003. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis.* 16(3):205-10.

Jones SBJr, Luchsinger AE. 1986. *Plant systematics*. McGraw-Hill Book Co. New York, N.Y.

Kaldjian EP, Chen GH, and Cease KB. 1992. Enhancement of lymphocyte proliferation assays by use of serum-free médium. *Journal of Immunological Methods* 147:189-195.

Kansal R, Gomez-Flores R, Mehta RT. 1997. Therapeutic efficacy of liposomal clofazimine against *Mycobacterium avium* complex (MAC) in mice depends on size of initial inoculum and duration of infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:17-23.

Kawashima K, Fujimura Y, Makino T, Kano Y. 2006. Pharmacological properties of traditional medicine (XXXII): Protective effects of Hangeshashinto and the combination of its major constituents on gastric lesions in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 29(9): 1973-1975.

Kim SJ. 2005. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *European respiratory journal* 25:564-569.

Kimura I. 2006. Medical benefits of using natural compounds and their derivatives having multiple pharmacological actions. *The pharmaceutical society of Japan* 126(3): 133-143.

Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56:731-740.

Lall N, Das-Sarma M, Hazra B, Meyer JJM. 2003. Antimycobacterial activity of diospyrin derivatives and a structural analogue of diospyrin against *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 51: 435-438.

Lañe MA. 1980. Ph. D. Dissertation, University of Texas, Austin, Texas, USA.

Leanerts AM, Chase SE, Chmielewski AJ, CynamonMH. 1999. Evaluation of rifapentine in long-term treatment regimens for tuberculosis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:2356-60.

Maldonado M, Segura-Correa R, Ortega A, Calderón JS, Fronczek FR. 1994. Ent-Labdane and neo-Clerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 35:721-724.

Maranetra KN. 1999. Quinolones and multidrug-resistant tuberculosis. *Chemotherapy* 45:12-8.

Martin A, Palomino JC, Portaels F. 2004. Rapid detection of Ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by two low-cost colorimetric methods: Resazurin and nitrate reductase. *Journal of microbiology* 43(4): 1612-1616.

Martínez M. 1959. *Las Plantas Medicinales de México*, 4^a. Ed., México, pp. 299.

Martínez R, Calderón JS, Toscano RA, Valle-Aguilera L, Mendoza-Candelaria HM. 1994. Ent-Ceoclerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 35:1505-1507.

Matteelli A, Olliaro P, Signorini L, Cadeo G, Scalzini A, Bonazzi L, Caligaris S, Tomasoni L, Tebaldi A, Carosi G. 1999. Tolerability of twice-weekly rifabutin-isoniazid combinations versus daily isoniazid for latent tuberculosis in HIV-infected subjects: a pilot study. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 3:1043-6.

Miyazaki E, Miyazaki M, Chen JM, Chaisson RE, Bishai WR. 1999. Moxifloxacin (BAY12 - 8039), a new 8-methoxyquinolone, is active in a mouse model of tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:85-9.

Molina-Salinas GM, Ramos-Guerra MC, Vargas-Villarreal J, Mata-Cardenas BD, Becerril-Montes P, Said-Fernandez S. 2006. Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Arch. Med. Res. 37: 54-49.

Morcillo N, Di-Giulio B, Testani B, Pontino M, Chirico C, Dolmann A. 2004. A microplate indicator-based method for determining the susceptibility of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* to microbial agents. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 8(2):253-259.

Moreira AL, Tsenova L, Haile Aman M, Bekker LG, Freeman S, Mangaliso B, Schroder U, Jagirdar J, Rom WN, Tovey MG, Freedman VH, Kaplan G. 2002. Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. Infect. Immun. 70:2100-2107.

Moi TI, Ball AR, Anklesaria Z, Casadei G, Lewis K, Ausubel FM. Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. PNAS 103(27): 10414-10419.

Mshana RN, Genet T, Abate G, Miomer H. 1998. Use of 3-(4,5-Dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of clinical microbiology 36(5): 1214-1219.

Murria CJL, Styblo K, Rouillon A. 1990. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention, and cost. Bull . Int . Union Tuerc. 65:6 - 24 .

Narita M, Stambaugh JJ, Hollender ES, Jones D, Pitchenik AE, Ashkin D. 2000. Use of rifabutin with protease inhibitors for human immunodeficiency virus-infected patients with tuberculosis. Clinical Infectious Diseases 30:779-83.

Oh TY, Ahn GJ, Choi SM, Ahn BO, Kim WB. 2005. Increased susceptibility of ethanol-treated gastric mucosa to naproxen and its inhibition by DA-9601, an *Artemisa asiatica* extract. World journal of gastroenterology 11(47):7450-7456.

Pacini S, Aterini S, Salvadori M, Ippolito E, Ruggiero M, Amato M. 1997. Cellular proliferation and second messenger formation altered by dialysis membranes. Nephrol. Dial. Transplant 12:500-504.

Pai RK, Convery M, Hamilton TA, Boom WH, Harding CV. 2003. Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. J Immunol. 171 (1): 175-84.

Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Rodríguez AG. 2005. Safe susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by flow cytometry with the fluorescent nucleic acid stain SYTO 16. Journal of medical microbiology 54:77-81.

Plaeger SF. 2003. Clinical immunology and traditional herb medicines. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 10(3):337-338.

Rai MK and Acharya D. 1999. Screening of some Asteraceous plants for antimycotic activity. *Compositae newsletter* 34:37-43.

Raha A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* 120:213-232

Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. 1995. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *Journal of the American Medical Association* 273:220-6.

Reddy VM, O'Sullivan JF, Gangadharam PRJ. 1999. Antimycobacterial activities of riminophenazines. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 43:615-623.

Ribeiro MO, Da Silva-Gomez M, Gonfalves-Senna S, Rosa-Rosseti ML, De Souza-Fonzeca L. 2004. Evaluation of rapid microplate assays using cellular-viability indicators to determine patterns of susceptibility to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 30(4):455-460.

Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA, Muñoz JF. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6:2.