

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICOBACTERIANO,
CITOTÓXICO Y SINÉRGICO DEL AMINOÉTER 26**

POR

IB DIANA GABRIELA SOLIS PERLA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

MARZO 2023

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICOBACTERIANO, CITOTÓXICO
Y SINÉRGICO DEL AMINOÉTER 26**

Aprobación de la tesis:

Dr. (a) María de Rayo Camacho Corona
Presidente

Dr. (a) Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Secretario

Dr. Omar González Santiago
Vocal

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICOBACTERIANO, CITOTÓXICO
Y SINÉRGICO DEL AMINOÉTER 26**

Revisión y aprobación de la tesis:

Comité Tutorial

Dr. (a) Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Comité tutorial

Dr. Omar González Santiago
Comité tutorial

Dr. Francisco Guadalupe Avalos Alanís
Comité tutorial

RESUMEN

IB Diana Gabriela Solis Perla
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de graduación:

Título del estudio: EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICOBACTERIANO, CITOTÓXICO Y SINÉRGICO DEL AMINOÉTER 26.

Número de páginas: 93

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y Método de estudio:

Se han descrito cerca de 200 especies de micobacterias diferentes por su morfología, bioquímica y fisiología. Las micobacterias patógenas causan enfermedades pulmonares y extrapulmonares que pueden afectar a todos los órganos. Las micobacterias estrictamente patógenas constan de dos grandes grupos: el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB que comprende *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, entre otras) que son (World Health Organization, 2021) responsables de la tuberculosis pulmonar (TB) y extrapulmonar, y *M. leprae*, que causa la lepra. Otras infecciones son causadas por micobacterias atípicas o no tuberculosas (MTN) que pueden causar infecciones similares a las causadas por *M. tuberculosis* (que comprende *M. avium*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, entre otras). La TB ocupa el décimo tercer lugar por causa de muerte y la enfermedad más mortífera por detrás del COVID-19 (World Health Organization, 2021). Se han descrito casos de tuberculosis multifarmaco resistente (TB MDR), extremadamente fármaco resistente (XDR) y totalmente fármaco resistente (XXDR) y no hay tratamiento para esta última. Por otro lado, la incidencia de infecciones por las MTN ha aumentado rápidamente, debido a que este género puede infectar la mayoría de los tejidos del ser humano, se encuentran en cualquier lugar del medio ambiente y suelen mostrar resistencia a los fármacos anti-TB. Actualmente, se han desarrollado fármacos con actividad anti-TB, pero solo unos pocos se encuentran en estudios preclínicos y clínicos. Por ello, existe una necesidad urgente de buscar nuevos agentes anti-TB efectivos. Las plantas medicinales han formado parte de la medicina tradicional y a partir de ellas se pueden encontrar compuestos con actividad anti-TB que nos

pueden conducir al desarrollo de mejores fármacos para tratar estas afecciones, entre ellos el desarrollo de productos semi-sintéticos.

Larrea tridentata es un arbusto de hojas perennes que crece en zonas áridas del país. Recibe un amplio uso medicinal y entre ellas la TB. Se han estudiado las actividades biológicas del extracto de la planta y se han encontrado que el extracto clorofórmico de *L. tridentata* posee propiedades antibacterianas y antimicobacterianas. En base a esta información, el grupo de investigación publicó el aislamiento y caracterización del lignano AmDG el cual posee actividad anti-TB *in vitro* (12.5-50 µg/mL contra tres aislados clínicos de TB-MFR y concentración mínima inhibitoria (CMI) de 50 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv). Con la finalidad de estudiar el AmDG y mejorar su actividad anti-TB en el 2017 el mismo grupo de investigación reportó la semi-síntesis de 33 derivados del AmDG incluyendo ésteres, éteres y aminoéteres. Todos los compuestos se probaron *in vitro* contra doce aislados clínicos y se determinó la citotoxicidad en células Vero. Uno de los compuestos más activos fue el aminoéter 26 mostrando valores de CMI de 6.25 y 12.5 mg/ml contra *M. tuberculosis* H37Rv y una MDR G122, respectivamente. También el compuesto 26 mostró un índice de selectividad de >77.92, lo que indicó que era más tóxico para *M. tuberculosis* que para células de mamíferos. Debido a las problemáticas y los antecedentes mencionados se plantea en el presente proyecto determinar la actividad antimicobacteriana, citotóxica y sinérgica del aminoéter 26, ya que la información de este compuesto es limitada para determinar si es un buen candidato como antifímico.

Para lograr lo mencionado se partió del extracto cloroformo/metanol (1:1) de las partes aéreas de *L. tridentata*. Posteriormente, se fraccionó este extracto mediante partición Líquido-Líquido. Una vez fraccionado el extracto sometió a una Cromatografía en Columna. De esta columna se seleccionaron las fracciones 152-282 para ser tratadas mediante otra Cromatografía en Columna, después se seleccionaron las subfracciones 60-95 para seguir con la purificación mediante Cromatografía de Capa Fina Preparativa. Una vez obtenido el AmDG semipuro se volvió a tratar mediante cromatografía en Columna y finalmente se purificó mediante recristalización con cloroformo. Después se llevó a cabo la semi-síntesis del aminoéter 26 y su purificación. El compuesto fue caracterizado mediante Resonancia Magnética Nuclear de H^1 y C^{13} . Posteriormente, se determinó la CMI de AE-26 contra nueve aislados clínicos entre ellas cepas de micobacterias no tuberculosas y tuberculosas. Después se evaluó la citotoxicidad del aminoéter en líneas celulares de macrófagos MH-S, J774A.1 y células epiteliales de humano A549. Finalmente, se evaluó la actividad sinérgica del aminoéter 26 con fármacos de primera (INH) y segunda línea (MOXI).

Conclusiones y contribuciones

Se obtuvieron 55 mg de AmDG a partir de 20 g de extracto crudo de *L. tridentata*, dicho lignano fue caracterizado por comparación de sus constantes espectroscopias reportadas por Reyes-Melo *et al.*, 2017. Para la obtención de 18 mg del semisintético AE-26 se ocuparon 30 mg de AmDG y el aminoéter fue caracterizado por RMN ^1H y ^{13}C para corroborar las modificaciones estructurales. En las pruebas biológicas se determinó que AE-26 exhibe CMI que oscilan entre 50-12.5 $\mu\text{g/mL}$ en las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv, CIBIN99, 5186, 96, 46P, SUDA31, *M. bovis*, *M. kansasii* y *M. abscessus*. De este mismo ensayo también se determinó la carga bacteriana de las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y CIBIN99. En la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv se encontró que INH a una concentración de 0.06 $\mu\text{g/mL}$ (CMI) tuvo una carga de 3,000 micobacterias/mL y el AE-26 a 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (CMI) tuvo una carga de 50, 000 micobacterias/mL. Mientras que en la cepa de *M. tuberculosis* CIBIN99 se encontró que MOXI a 0.06 $\mu\text{g/mL}$ (CMI) tuvo una carga de 5000 micobacterias/mL y el AE-26 a 25 $\mu\text{g/mL}$ (CMI) tuvo una carga de 60,000 micobacterias/mL. En el ensayo de citotoxicidad en las líneas celulares de macrófagos MH-S, J774A.1 y de células epiteliales de pulmón humano A549 se observó que hay una tendencia de dosis-dependiente en las gráficas donde se correlaciona tratamientos versus absorbancia, esto quiere decir que a mayor concentración más citotoxicidad. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes para definir totalmente la citotoxicidad de AE-26 en las líneas celulares ensayadas. Finalmente, en la actividad sinergista se obtuvo que en la combinación de AE-26 a 25 $\mu\text{g/mL}$ y MOXI a 0.03 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo un efecto indiferente. Por último, cabe mencionar que es la primera vez que se determina la actividad antimicobacteriana del AE-26 contra las cepas evaluadas de *Mycobacterium* tanto tuberculosas como no tuberculosas estudiadas y la actividad citotóxica con las líneas celulares usadas en este estudio.

Dr. (a) María del Rayo Camacho Corona

Director (a) de tesis

Dr. (a) Dulce Adriana Mata Espinosa

Co asesor (a) externa

Dr. Guillermo Núñez Mojica

Co asesor interno

AGRADECIMIENTOS

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Facultas de Ciencias Químicas, UANL

Por la aceptación en el equipo, planeación, asesoría, paciencia, proporción de los recursos, y apoyo para la finalización de este proyecto de tesis de maestría.



Dra. Dulce Adriana Mata Espinoza

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Por la aceptación en el laboratorio de patología, enseñanza y proporción de los recursos en el laboratorio para los ensayos biológicos de este proyecto.

Comité tutorial

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera

Dr. Omar González Santiago

Dr. Francisco Guadalupe Avalos Alanís

Facultad de Ciencias Químicas

Por sus observaciones de mejora del proyecto de tesis realizadas en las reuniones tutoriales y seminarios departamentales.

Dr. Rogelio Hernández Pando

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Por la aceptación de poder trabajar en el laboratorio de Patología Experimental y la oportunidad de participar en los seminarios.

Dra. Verónica Mayela Rivas Galinda

Departamento de Analítica, Facultad de Medicina, UANL.

Por la obtención de los FIDS de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Dr. Guillermo Núñez Mojica

Por tu apoyo en el Laboratorio de Productos Naturales y Sintéticos con las técnicas de separación y purificación del producto natural y derivado semisintético



Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas
Y
Laboratorio de Productos Naturales y Sintéticos
División de Estudios de Posgrado

Por la oportunidad de realizar la maestría, aportar los insumos, servicios e infraestructura para el desarrollo del proyecto de tesis.



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

CONACYT

Por proveer la beca de manutención durante estos dos años para mi formación como Maestra en Ciencias.

Quiero agradecer principalmente a mis padres por apoyarme en todo a pesar de no estar de acuerdo siempre conmigo, a ellos les debo en parte quien soy y son mi principal fuente de motivación. También a mis hermanos porque ellos me motivan a seguirme desafiando a ser mejor.

A mi asesora por siempre estar al pendiente de mi aprendizaje, por proveer todo lo necesario, por su paciencia y apoyo. Se que fueron 3 años difíciles durante la maestría porque el primer reto fue seguir trabajando durante una pandemia y a pesar de todas las dificultades que se fueron presentando estoy agradecida por poder concluir. Se que al principio fue dura conmigo, pero le agradezco porque eso fue lo que me ayudó a crecer, sé que no soy la misma que inició en enero 2020 a la que finaliza ahora en 2023. Me llevo conmigo muy bonitos recuerdos, aprendizajes y palabras suyas que sé que me seguirán guiando en mi camino como docente e investigadora.

También quiero agradecer a todo el Laboratorio de Patología Experimental en INCMNSZ donde Dra. Dulce Mata me dio la oportunidad de trabajar y aprender sobre las técnicas de laboratorio aplicadas en micobacterias.

Por ultimo y una de las partes mas importantes quiero agradecer a los amigos que hice durante estos años, ustedes son mi fuente de admiración y los veo como

ejemplos a seguir. Entre ellos gracias a Guillermo por ayudarme en el Laboratorio de productos Naturales, fuiste un gran apoyo durante este trabajo. También a Juan que me enseno a ser paciente y que las cosas no siempre salen como uno espera, pero a pesar de eso uno sigue aprendiendo y pueden salir mejores cosas durante este camino. También al Dr. Francisco por su ayudarme a veces con material prestado y otras veces con transporte saliendo del laboratorio, ya que no es fácil a veces ser estudiante más cuando eres foráneo.

Gracias a mis amigos en este laboratorio porque me hicieron sentir incluida y apoyada cuando más lo necesitaba, no fue fácil adaptarme en CDMX, pero gracias a ustedes fue rápido. Principalmente quiero agradecer al Dr. Manuel y a la M.C. Ilse, ya que su ayuda en laboratorio fue clave para poder aprender, son personas admirables por su gran conocimiento y habilidades en esta área.

Finalmente, quiero agradecer a mi mejor amiga Diana Aguilar por siempre estar para escucharme, apoyarme, darme consejos, estar en las buenas y en las malas. Fuiste una parte importante en esto y agradezco a ver tenido la oportunidad de conocerte en la clase de cultivo celular.

Gracias a todas las personas que aportaron algo para que este trabajo y etapa pudiera finalizar, realmente sin su ayuda no lo hubiera logrado. Tuve una etapa difícil durante mi último año, pero me alegra poder decir que ya esta por concluirse.

DEDICATORIA

A mi papá

ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN.....	18
1.1 <i>Mycobacterium</i>	18
1.2 <i>Mycobacterias no tuberculosas</i>	19
1.3 <i>Infección</i>	20
1.3.1 Tratamiento	22
1.4 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
1.4.1 Infección.....	25
1.4.2 Tratamiento	25
1.5 <i>Mecanismos de acción</i>	26
2 ANTECEDENTES.....	29
2.1 <i>Larrea tridentata</i>	29
2.2 <i>Usos de L. tridentata en la medicina tradicional</i>	30
2.3 <i>Algunos estudios químicos y farmacológicos de L. tridentata</i>	30
2.4 <i>Obtención de derivados semisintéticos con actividad antibacteriana</i> .	32
2.5 <i>Determinación de la citotoxicidad de compuestos</i>	34
3 HIPÓTESIS.....	36
3.1 <i>Hipótesis nula</i>	36
3.2 <i>Hipótesis alternativa</i>	36
4 Objetivo general.....	37
4.1 <i>Objetivos específicos</i>	37
4.1.1 Determinar la CMI de AE-26 en cepas sensibles y MDR del género <i>Mycobacterium</i>	37
4.1.2 Determinación de la carga bacteriana en la CMI.	37
4.1.3 Evaluar la actividad citotóxica del AE-26 en las líneas celulares MH-S, J774A.1 y A549.	37
5 MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1 <i>Separación y Purificación del AmDG a partir del extracto crudo</i>	38
1.5.1 Pretratamiento del extracto CHCl ₃ /MeOH de <i>Larrea tridentata</i>	38
1.5.2 Fraccionamiento del extracto CHCl ₃ /MeOH de <i>L. tridentata</i>	38
1.5.3 Aislamiento y purificación parcial del ácido meso-dihidroguaiarético	39

5.2	<i>Semi-síntesis del aminoéter 26 y su purificación</i>	41
5.3	<i>Elucidación estructural de AE-26</i>	42
5.4	<i>Determinación de concentración mínima inhibitoria por el método de resazurina</i>	42
5.5	<i>Determinación de la citotoxicidad</i>	50
5.6	<i>Determinación de la actividad sinergia de AE-26 con antifímicos de primera y segunda línea</i>	55
5.7	<i>Manejo de residuos</i>	58
5.7.1	<i>Síntesis y purificación</i>	58
5.7.2	<i>Ensayos biológicos</i>	59
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
6.1	<i>Aislamiento, purificación y caracterización del AE-26</i>	60
6.2	<i>Caracterización estructural de AE-26</i>	60
6.3	<i>Determinación de la CMI por el método de resazurina</i>	63
6.4	<i>Determinación de la actividad citotóxica de AE-26</i>	74
6.5	<i>Determinación de la actividad sinergista de AE-26 con antifímicos de primera y segunda línea</i>	81
7	CONCLUSIONES	85
8	PERSPECTIVAS	86
9	REFERENCIAS	87
10	DIFUSIÓN	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de infección por *M. abscessus*.

Figura 2. Pared celular de *M. tuberculosis*.

Figura 3. *Larrea tridentata*.

Figura 4. Estructura del lignano ácido meso-dihidroguaiarético (AmDG).

Figura 5. Aminoéter 26.

Figura 6. Cristales de AmDG.

Figura 7. Semi síntesis del aminoéter 26.

Figura 8. Montaje de la placa de CMI.

Figura 9. Montaje de placa para las diluciones de UFC's.

Figura 10. Montaje de placa de citotoxicidad.

Figura 11. Fórmula del porcentaje de viabilidad celular.

Figura 12. Montaje de la placa de sinergia.

Figura 13. Espectro RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de AE-26.

Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C (MHz 100, CDCl_3) de AE-26.

Figura 15. Lectura de CMI de AE-26 en *M. tuberculosis* H37Rv Stanford.

Figura 16. Determinación de carga micobacteriana UFC's en H37Rv Stanford.

Figura 17. Lectura de CMI de AE-26 en *M. tuberculosis* CIBIN99.

Figura 18. Determinación de carga micobacteriana UFC's en CIBIN99.

Figura 19. MIC de AE-26 en la cepa de *M. tuberculosis* SUDA31.

Figura 20. MIC de AE-26 en la cepa de *M. bovis* 301.

Figura 21. MIC de AE-26 en la cepa de *M. tuberculosis* 5186.

Figura 22. MIC de AE-26 en la cepa de *M. tuberculosis* 46P.

Figura 23. MIC de AE-26 en la cepa de *M. tuberculosis* 96.

Figura 24. MIC de AE-26 en la cepa de *M. kansasii*.

Figura 25. MIC de AE-26 en la cepa de *M. abscessus*.

Figura 26. A) *Citotoxicidad de AE-26 en células MH-S* B) *Comparación de tratamientos vs Absorbancia.*

Figura 27. A) *Citotoxicidad de AE-26 en células J774A.1* B) *Comparación de tratamientos vs Absorbancia.*

Figura 28. *Imágenes tomadas en microscopio invertido del ensayo de citotoxicidad en la línea celular J774A.1. Cada imagen representa un tratamiento.*

Figura 29. A) *Citotoxicidad de AE-26 en células A549* B) *Comparación de tratamientos vs Absorbancia.*

Figura 30. Fórmula de FICI.

Figura 31. Valores de sinergia de AE-26 en CIBIN99 analizados por FICI.

Figura 32. Ensayo de sinergia de AE-26 con MOXI en *M. tuberculosis*

CIBBIN99

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Algunos tipos de MTN que causan enfermedades en humanos.

Tabla 2. Tratamiento según las especies de MTN.

Tabla 3. Fraccionamiento del extracto pretratado.

Tabla 4. Sub-fracciones de F 151-282.

Tabla 5. Descripción de las cepas de MTB que se utilizaron.

Tabla 6. Ingredientes de los medios de cultivo para MTB.

Tabla 7. Cepas y controles positivos usados

Tabla 8. Características de las líneas celulares empleadas.

Tabla 9. Ingredientes para medios del cultivo de las líneas celulares.

Tabla 10. Ingredientes para la preparación de PBS-EDTA.

Tabla 11. CMI de AE-26, antifímicos de primera y segunda línea sobre diferentes cepas MTN y MTB.

LISTA DE ABREVIATURAS

^{13}C : carbono trece

^1H : protón

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AE-26: Aminoéter 26

AmDG: Ácido meso-dihidroguaiarético

Anti-TB: Anti-tuberculosos

ARN: Ácido ribonucleico

BSL-3: Laboratorio de contención nivel de bioseguridad 3

CAS: Central-Asia

CC: Cromatografía en Columna

CCF: Cromatografía en Capa Fina

CCFP: Cromatografía en Capa Fina Preparativa

CHCD_3 : Clorofórmo deuterado

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CO_2 : Dióxido de carbono

DMSO: Dimetilsulfóxido

EAI: Genotipo África-India

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ETM: Etambutol

FD: Factor de dilución

FE: Fase estacionaria

FICI: Fractional Concentration Index

FM: Fase móvil

g: gramos

H: Genotipo Haarlem

h: horas

IC₅₀: Concentración que mata el 50% de la población celular.

IL-1 β : Interleucina 1- β

INH: Isoniazida

iNOS: Expresión de óxido nítrico sintasa

K₂CO₃: Carbonato de potasio

L-L: Extracción líquido-líquido

LAM: Genotipo mediterráneo

MeOH/CHCl₃: Metanol:Cloroformo

mg: miligramos

mL: mililitros

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

MTN: Micobacterias no tuberculosas

N: Normalidad

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótico.

NDGA: Ácido norhidroguaiaretico

Nm: Nanómetros

NP: Productos Naturales

OADC: ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa

°C: Grados celcius

PBS: Solución salina tamponada de fosfato

Ppm: partes por millón

PZA: Pirazinamida

RIF: Rifampicina

RMN: Resonancia Magnética nuclear

Rpm: Revoluciones por minuto

SFB: Suero fetal bovino

SI: Índice de selectividad

SS: Semisintéticos

TB-MDR: Tuberculosis multifármaco resistente.

TB-XDR: Tuberculosis extremadamente fármaco resistente.

TB-XXDR: Tuberculosis totalmente fármaco resistente.

TB: tuberculosis

TLRs: Toll-like receptor

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α .

TNF: Factor de necrosis tumoral

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

μ g: microgramos

μ L: microlitros

μ M: Micromolar

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Mycobacterium*

Las micobacterias pertenecen al filo actinobacteria, que se caracteriza por un crecimiento en filamentos ramificados y un alto contenido de guanina y citosina. Se han descrito cerca de 200 especies de micobacterias diferentes por sus morfología, bioquímica y fisiología. Son aeróbicos o microaerófilos con tasas de crecimiento óptimas entre 25 y 50°C dependiendo de la especie. El 95% de las micobacterias son ambientales que se pueden encontrar en suelo, aire y agua, mientras que pocas especies causan enfermedades en animales y/o humanos (Johansen et al., 2020).

Las micobacterias patógenas causan enfermedades pulmonares y extrapulmonares que pueden afectar a todos los órganos. Las micobacterias estrictamente patógenas constan de dos grandes grupos: el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB que comprende *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. mungi*, *M. orygis*, *M. pinnipedii* y *M. surricatae*) que son responsables de la tuberculosis pulmonar (TB) y extrapulmonar, y *M. leprae*, que causa la lepra. Otras infecciones son causadas por micobacterias atípicas o no tuberculosas (MTN) que pueden causar infecciones similares a las causadas por *M. tuberculosis* (que comprende *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*, *M. kansasii*, entre otras) (Johansen et al., 2020).

Por otro lado, a nivel mundial existe una alta diversidad genética de las cepas de *MTB* y se han descrito como prevalentes los siguientes genotipos: Haarlem (H), Latín América-Mediterráneo (LAM), este de África-India (EAI), Central-Asia (CAS), T, X y Beijing. El genotipo más estudiado es el Beijing debido a que es muy prevalente en el Sudeste Asiático, la Ex Unión Soviética y en Sudáfrica(Zatarain-Barrón et al., 2020).

1.2 Mycobacterias no tuberculosas

La prevalencia de infecciones por MTN ha aumentado en las últimas 3 décadas. A pesar de su creciente importancia como problema de salud pública, su conocimiento es limitado. El 30% de las MTN se consideran patógenas para el ser humano, pero entre ellas se clasifica un amplio espectro de prevalencia o patogenicidad (por ejemplo: *M. kansasii* posee una patogenicidad alta, mientras que *M. abscessus complex*, *M. malmoense* y *M. xenopi* poseen una intermedia)(Máiz Carro et al., 2018). Las MTN poseen características de MTB, sin embargo, se dividen en grupos basados en la morfología de colonias, pigmentación y velocidad de crecimiento, pero las MTN son mayormente de crecimiento rápido (clasificación según Runyon) (Mancheno-Valencia et al., 2015).

Afortunadamente, las MTN son poco virulentas para los humanos. Para que exista una infección por MTN debe haber una combinación de exposición a las

mismas y de susceptibilidad del huésped (Máiz Carro et al., 2018). Las MTN pueden infectar los tejidos blandos, huesos, articulaciones y tracto genitourinario; sin embargo, con mayor frecuencia causan enfermedad pulmonar, linfadenitis e infección diseminada (Tabla 1). Se ha observado que en piel y tejidos blandos se forman granulomas de las piscinas y úlceras de buruli (Mancheno-Valencia et al., 2015).

Tabla 1. Algunos tipos de MTN que causan enfermedades en humanos.

Especies	Principales sitios de infección	Crecimiento
<i>M. avium</i>	Pulmonar	Lento
<i>M. intracellulare</i>	Ganglios linfáticos	Lento
<i>M. kansasii</i>	Pulmonar	Lento
<i>M. malmoense</i>	Pulmonar	Lento
<i>M. fortuitum</i>	Tejidos blancos/ Heridas quirúrgicas	Rápido
<i>M. abscessus</i>	Piel/ Tejidos blandos/ Sistema nervioso central/ Lesiones oculares/ Bacteriemia	Rápido

1.3 Infección

El proceso de infección en las MTN comparte notables similitudes con el de MTB, sin embargo, es importante resaltar que los mecanismos de transmisión de MTB están bien caracterizados, las rutas exactas de transmisión de las MTN no se comprenden bien.

En el proceso de infección una vez que las MTN hallan colonizado, los macrófagos y los neutrófilos se reclutan en el sitio de infección y fagocitan a las

micobacterias en un intento de destruir a él patógeno. En esta etapa, la respuesta inmune innata es suficiente para restringir la mayoría de las especies de MTN. Sin embargo, la mayoría de las MTN puede resistir los mecanismos de defensa fagosomales e inducir la producción de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF), que recluta células inmunitarias vecinas al sitio de infección y lo que lleva a la formación de un granuloma. Sin embargo, un ejemplo de MTN es *M. abscessus* que en este paso tiene un proceso único de infección ya que, durante la infección persistente, puede llegar a la descomposición del granuloma y la formación de cordones bacterianos extracelulares masivos (Figura 1)(Johansen et al., 2020).

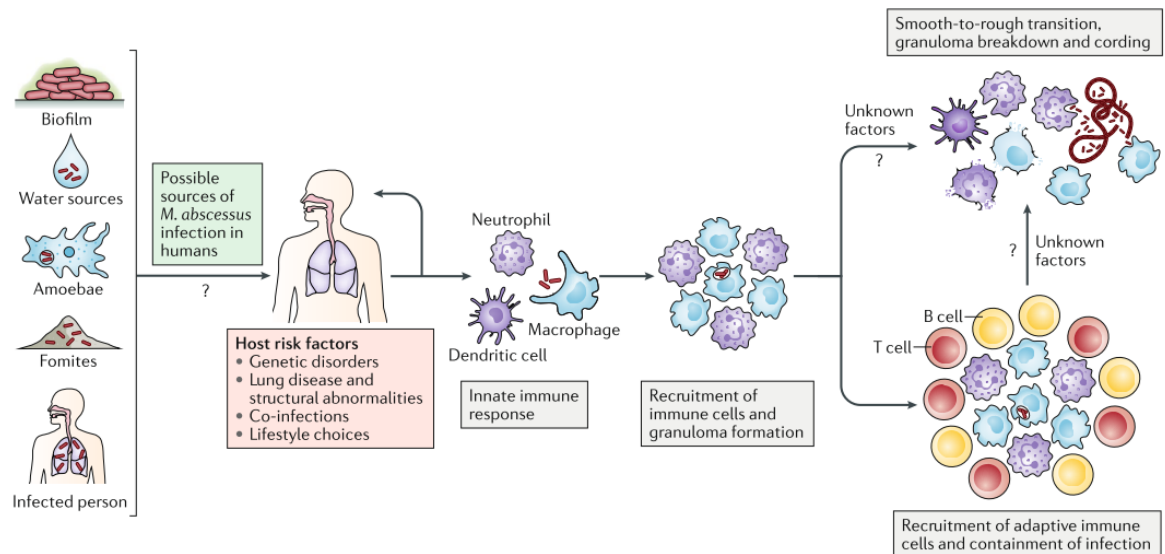


Figura 1. Ciclo de infección por *M. abscessus* (Johansen et al., 2020).

1.3.1 Tratamiento

El tratamiento varía entre las diferentes especies. Se debe distinguir entre las MTN de crecimiento lento o rápido. La mayoría de las especies de crecimiento lento el régimen del tratamiento incluye rifampicina (rifabutina o rifapentina), etambutol y un macrólido durante 18-24 meses. En casos de gravedad puede añadirse amikacina o estreptomicina los primeros 2-3 meses. Para las de crecimiento rápido, los tratamientos deben basarse en los resultados *in vitro* y la duración del tratamiento es de 12 meses desde la negativización del cultivo de esputo (Tabla 2)(Máiz Carro et al., 2018). Por otro lado, el tratamiento también varía según el sitio de infección y en muchos casos es necesario realizar procedimientos quirúrgicos, por ejemplo: la resección quirúrgica de un nódulo pulmonar se considera curativa, sin embargo, no todos los pacientes son seleccionados como candidatos para esto. Mientras que, el tratamiento ideal para linfadenitis cervical por MNT es la cirugía sin tratamiento antituberculoso en pacientes pediátricos (Mancheno-Valencia et al., 2015).

Tabla 2. Tratamiento según las especies de MTN.

Especie	Medicamentos
<i>M. kansasii</i>	Rifampicina o rifabutina Etambutol Isoniazida
<i>M. kansasii</i> resistente a rifampicina o isoniazida	Claritromicina Fluoroquinolonas (levofloxacino y moxifloxacino) Linezolid
<i>M. ulcerans</i>	Aminoglucósidos Macrólidos Quinolonas Rifampicinas

	Tratamiento quirúrgico
<i>M. fortuitum</i>	Amikacina Cefoxitina Imipenem Fluoroquinolonas
<i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> y <i>M. abscessus</i> <i>bolletii</i>	Claritromicina Fase inicial: clofazimina y cefoxitina y amikacina (2-4 meses) Fase de continuación: clofazimina, amikacina+linezolid
<i>M. marinum</i>	Claritromicina Sulfonamidas Tetraciclinas Rifampicina Etambutol

1.4 *Mycobacterium tuberculosis*

MTB es una micobacteria de crecimiento lento que tiene un tiempo de duplicación 12 a 24 horas en condiciones óptimas. Tiene forma de bacilo, es inmóvil y no esporulada. Posee un tamaño de 0.2 a 0.6 x 1 a 10 µM. La característica principal de MTB es la estructura de la pared celular, debido a que está compuesta por una gran cantidad de lípidos (peso seco tiene un porcentaje del 40%) y uno de los más abundantes son los ácidos micólicos (Figura 2). Esta cualidad proporciona una barrera fuerte para los fármacos, así mismo aumenta su virulencia y supervivencia (Delogu et al., 2013).

La tuberculosis es causada por *M. tuberculosis*, según la OMS la TB es la decimotercera causa de muerte en el mundo y la enfermedad infecciosa más mortífera por detrás del COVID-19 y por encima del VIH/SIDA. En el 2020 se estimaron que 1.5 millones de personas en el mundo murieron por TB, mientras

que entre ellas 214 000 parecían VIH. Dicha enfermedad afecta a personas de ambos sexos, en cualquier grupo de edad, pero se ha encontrado un mayor número de casos en hombres mayores de 15 años que representaron el 57% de casos. Mientras que las mujeres representaron el 32% y los niños menores de 15 años el 11% (World Health Organization, 2021).

La TB multirresistente es una crisis de salud pública y una amenaza para la salud sanitaria debido a que solo una de cada tres personas tiene acceso al tratamiento y la tasa de éxito del tratamiento para personas que padecen esta farmacorresistencia es de 59% (cuando presentan resistencia la rifampicina). La OMS estimó que, en el 2019 México tuvo una tasa de incidencia total de TB entre 23 y 37 mil casos por cada 100 000 habitantes, donde el 2.6% corresponde a nuevos casos de TB con TB-MFR y el 11% corresponde a casos previamente tratados de TB-MFR (Sánchez-Pérez, 2021).

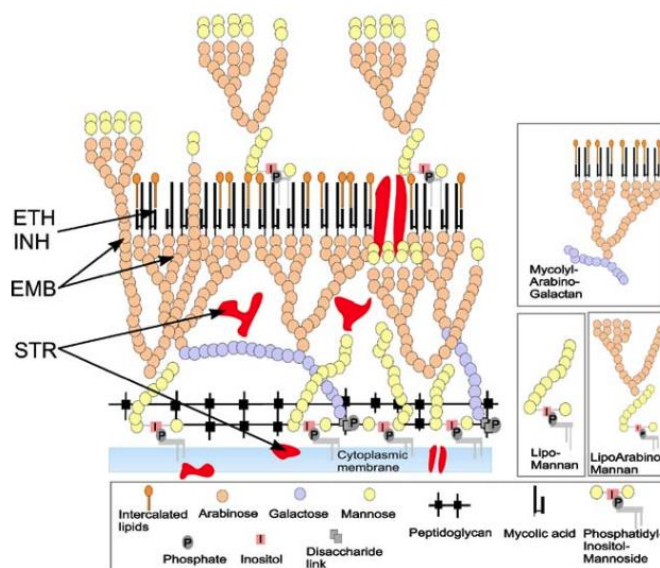


Figura 2. Pared celular de *M. tuberculosis* (Alsteens et al., 2008).

1.4.1 Infección

La infección con TB comienza con la inhalación (gotas en forma de aerosol) que contiene micobacterias. Una vez que son inhaladas recorren el tracto aéreo, donde el 90% de las bacterias quedan retenidas y solo el 10% llegan a los alveolos pulmonares, donde se desencadena una respuesta retardada inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria esta mediada por los macrófagos alveolares que son células del sistema inmune, su función ante MTB es ser activadas y llevarlas directamente a los lisosomas para ser destruidas, sin embargo, algunos bacilos pueden escapar y sobrevivir dentro del macrófago. Una vez infectados, los macrófagos pueden quedarse en los pulmones o migrar a otros órganos. A pesar de esto, solo una minoría de la población desarrolla tuberculosis ya que, en la mayoría de los individuos sanos, el sistema inmune se encarga de contener a la bacteria para que no se desarrolle la enfermedad (Delogu et al., 2013).

1.4.2 Tratamiento

El tratamiento para la tuberculosis consta de 2 meses con isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (ETM) y pirazinamida (PZA) que es la fase intensiva, seguido de 4 meses adicionales con INH y RIF que es la fase de continuación. Debido a la falta de adherencia a los tratamientos prescritos y la atención médica ineficiente se ha desarrollado la tuberculosis multifármaco resistente (TB-MDR) que se define como la resistencia al menos dos medicamentos de primera línea la INH y RIF. La TB-MDR requiere al menos 9-20 meses de tratamiento con

medicamentos de segunda línea (capreomicina, kanamicina, amikacina y fluoroquinolonas), la desventaja de estos fármacos es que son menos eficientes y tóxicos, con tasas de curación de 60-75%. También se han encontrado cepas que fueron ampliamente resistentes a los fármacos (TB-XDR), mostrando resistencia a la isoniacida y rifampicina, así como a todas las fluoroquinolonas y por los menos tres medicamentos inyectables de segunda línea. Por otro lado, lo que ha sido alarmante para el sector salud es que se han informado de cepas de TB totalmente resistentes a los fármacos de primera y segunda línea (TB-XXDR), actualmente no hay tratamiento para este tipo de TB (Migliori et al., 2012; Nguta et al., 2015).

1.5 Mecanismos de acción

a) Etambutol

El EMB es un fármaco de primera línea, su mecanismo de acción consta en interferir en la síntesis de la pared celular de las micobacterias mediante la inhibición enzimática de la arabinosiltransferasa, así mismo interrumpe el proceso de polimerización del arabinogalactano, un componente importante y abundante de la pared celular de la micobacteria. Se ha encontrado que el operón *embCAB* es responsable de la resistencia al EMB en *Mycobacterium* (Nguta et al., 2015).

b) Isoniazida

La INH es un profármaco que se activa por la enzima catalasa-peroxidasa para formar el complejo INH-NAD, que inhibe la enoil-ACP reductasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). Este paso es clave en la vía de los ácidos micólicos, una vez que es inhibida la enoil-ACP reductasa provoca la acumulación de ácidos grasos en el citoplasma y dando la muerte de la micobacteria. Se ha encontrado que los genes *katG* e *inhA* contribuyen entre un 70-80% en la resistencia a INH en *Mycobacterium* (Nguta et al., 2015).

c) Pirazinamida

La PZA es un profármaco que requiere la conversión por la enzima pirazinamidasa en ácido pirazinoico. Una vez que este ácido sale de la célula puede ser protonado y atravesar con mayor facilidad a la membrana micobacteriana y finalmente acidifica el citoplasma causando su muerte. También se ha encontrado que el ácido pirazinoico cuando es activado por el gen *RpsA*, este interfiere en la unión al ARN mensajero (Nguta et al., 2015).

d) Rifampicina

La RIF está dentro de un grupo amplio de fármacos antibacterianos, entre ellos: rifapentina, rifabutina y rifalazil. Su mecanismo de acción se basa en la unión de la subunidad beta de la polimerasa de ARN bacteriano, interfiriendo en la transcripción del ADN. Se ha encontrado que la resistencia adquirida por RIF se debe por mutaciones en la región 81 de pb del gen *rpoB* (codifica a la subunidad beta de la ARN polimerasa) (Nguta et al., 2015).

En la actualidad, se están desarrollando fármacos con actividad antituberculosa, pero solo unos pocos se encuentran en estudios preclínicos y clínicos (aproximadamente 10 compuestos)(Nguta et al., 2015). Por ello, existe una necesidad urgente de buscar nuevos agentes antituberculosos efectivos en el tratamiento de casos de TB MDR, XDR y XXDR que puedan acortar el largo tiempo de tratamiento y también los efectos colaterales, tanto para cepas sensibles como resistentes a fármacos.

Por otro lado, la incidencia de infecciones por las MTN ha aumentado rápidamente, con una prevalencia del 25-50% en Estados Unidos y Europa. Estas especies son patógenos ambientales y el agua potable es el principal reservorio de infección, mientras que estas especies pueden colonizar la mayoría de los tejidos del ser humano. Actualmente se desconocen los mecanismos de infección de las MTN y de la poca información disponible se conoce que la mayoría de las MTN suele mostrar cierta resistencia a los fármacos antituberculosos.

Dentro de este contexto, se sabe que las plantas medicinales han formado parte de la medicina tradicional y a partir de ellas se pueden encontrar compuestos anti-TB. También se pueden desarrollar productos semi-sintéticos para lograr enfrentar esta problemática actual.

2 ANTECEDENTES

2.1 *Larrea tridentata*

Las plantas medicinales han formado parte de la medicina tradicional por sus atributos fitoquímicos. Las partes de las plantas poseen compuestos activos para combatir patologías y a partir de ellos podemos llegar al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. *Larrea tridentata* (Sessé & Moc. Ex DC.) Coville pertenece a la familia Zygophyllaceae, es un arbusto de hojas perennes que alcanza una altura de 0.6-3 m, crece en zonas áridas del país. Esta planta recibe un amplio uso medicinal, ya que se ha utilizado en distintas patologías entre ellas TB (CONABIO, 2013). *L. tridentata* (Figura 3) esta planta es endémica de México y crece en los estados de Baja california norte y sur, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Zacatecas, Nuevo León y también en la parte sur de Estados Unidos. Se le conoce como gobernadora, debido a que inhibe el crecimiento de otras plantas a su alrededor (Arteaga et al., 2005).



Figura 3. *Larrea tridentata*.

2.2 Usos de *L. tridentata* en la medicina tradicional

L. tridentata es una planta importante debido a su amplio uso medicinal, se utiliza para afecciones urinarias (cálculos renales, dolor de riñón e inflamación de vejiga), problemas ginecológicos (esterilidad femenina y para regular menstruación), dermatitis, hepatitis, malestares gástricos, enfermedades venéreas y tuberculosis. Esta planta posee un gran efecto antioxidante, por ello se ha documentado que en la medicina tradicional se utilizan las partes aéreas para la elaboración de infusiones y tabletas entre otras formas orales. Actualmente el uso de estas formas tradicionales está limitado debido a que se ha informado casos de hepatotoxicidad y de enfermedad renal quística (Arteaga et al., 2005).

2.3 Algunos estudios químicos y farmacológicos de *L. tridentata*

L. tridentata posee una gran cantidad de productos naturales de alta importancia provenientes del metabolismo secundario de la planta. En la resina que recubre la planta se han encontrado flavonoides, lignanos, entre ellos el ácido norhidroguaiarético (NDGA). También se han aislado flavonoides glicosilados, sapogeninas, aceites esenciales, alcaloides halógenos, monoterpenoides, sesquiterpenoides, entre otros. Se encontró que en peso seco de las partes aéreas del arbusto predominan los ácidos grasos y el vinil y metil cetonas; estos son productos de las vías mevalónica y shikímica. Por otro lado estos compuestos atribuyen al olor característico de *L. tridentata* (Gnabre et al., 2015).

En base a los antecedentes se han estudiado las actividades biológicas del extracto de la planta, como resultado se obtuvo un reporte de la actividad terapéutica mostrada. También se han evaluado diferentes extractos y compuestos puros aislados de *L. tridentata* los cuales se mencionan a continuación:

Una de las investigaciones más destacadas del grupo de trabajo de la Dra. María del Rayo Camacho Corona, fue enfocar el estudio de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso en enfermedades bacterianas. Se reportó que el extracto clorofórmico de *L. tridentata* posee propiedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 250 mg/mL), *Bacillus subtilis* (CMI 62.25 mg/mL), *Lysteria monocytogenes* (CMI 125 mg/mL), *Acinetobacter baumannii* (CMI 125 mg/mL)(Camacho-Corona et al., 2008) y cuatro cepas monoresistentes de *M. tuberculosis* (CMI 100–200 mg/mL)(Favela-Hernández et al., 2012).

Posteriormente en el mismo grupo de investigación, Favela-Hernández y colaboradores en el 2012, publicaron el aislamiento y caracterización del lignano conocido como ácido meso-dihidroguaiarético (AmDG; Figura 4) a partir de *L. tridentata*. Dicho lignano posee actividad antituberculosa *in vitro* con una CMI en el rango de 12.5-50 µg/mL contra tres aislados clínicos de TB-MFR y concentración mínima inhibitoria (CMI) de 50 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv⁸. El mecanismo de acción del compuesto AmDG consiste en inhibir la coenzima A transferasa de *M. tuberculosis* H37Rv que está presente en las rutas

de degradación de geraniol y 1 y 2-metilnaftaleno, provocando la acumulación de estos metabolitos, desestabilizando la membrana de la bacteria, y ocasionando su muerte. Lo anterior se demostró por microarreglos, PCR en tiempo real y acoplamiento molecular (Clemente-Soto et al., 2014). Cabe mencionar que el mecanismo de acción del AmDG contra *M. tuberculosis* es diferente a cualquier agente antifímico usado actualmente para el tratamiento de la tuberculosis, lo que hace este producto natural prototipo para el desarrollo de nuevos fármacos antiTB.

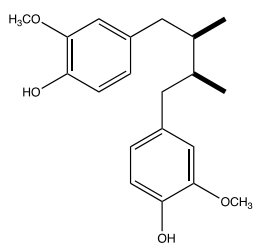


Figura 4. Estructura del lignano ácido meso-dihidroguaiarético (AmDG).

2.4 Obtención de derivados semisintéticos con actividad antibacteriana

En la actualidad se han caracterizado compuestos con actividad terapéutica a partir de las plantas medicinales. Una de las estrategias que siguen las farmacéuticas es seleccionar estos productos naturales (NP), ya que ofrecen estructuras químicas distintas con actividades terapéuticas, pero regularmente también ofrecen estructuras complejas, baja biodisponibilidad oral y efectos adversos graves. Debido a estas desventajas, en los últimos años se han propuesto modificar estructuralmente los NP, con el objetivo de potenciar o

minimizar la actividad farmacológica, que se les denominan productos semisintéticos (SS), ya que poseen una plantilla de origen natural y otra parte obtenida mediante semisíntesis (Butler et al., 2014).

En investigaciones previas Reyes-Melo y colaboradores en el 2017 reportaron la semi-síntesis de 33 derivados del AmDG incluyendo ésteres, éteres y aminoéteres. Todos los compuestos se probaron *in vitro* contra doce aislados clínicos resistentes a los fármacos, tales como bacterias gram-positivas y gram-negativas, incluyendo las cepas de *M. tuberculosis* sensibles a la primera línea de fármacos (H37Rv) y dos líneas MDR (G122 y G133). Los resultados mostraron que ocho análogos que tenían actividad moderada contra *S. aureus* resistente a la meticilina, mientras que dos aminoéteres (análogos 30 y 31) fueron activos contra *E. faecium* resistente a la vancomicina. Además, diecinueve compuestos exhibieron CMI bajas contra *M. tuberculosis* H37Rv y G122. El aminoéter 26 fue uno de los mas activos, teniendo valores de CMI de 6.25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ contra cepa sensible H37Rv y la cepa MDR G122 de *M. tuberculosis*, respectivamente, siendo estos valores comparables a los obtenidos por el control positivo etambutol, para ambas cepas. Posteriormente, para investigar el perfil de seguridad de los compuestos antimicobacterianos, se determinó la citotoxicidad en células Vero, el compuesto 26 mostró un índice de selectividad de >77.92 , lo que indicó que era mas tóxico para *M. tuberculosis* que para células de mamíferos. Por lo tanto, el aminoéter 26 puede considerarse como un agente antituberculoso efectivo y seguro (Figura 5) (Reyes-Melo et al., 2017).

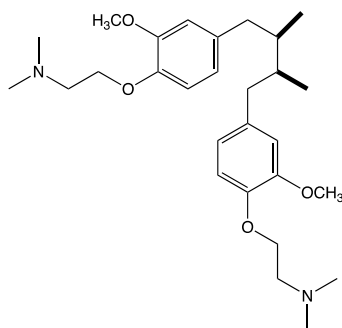


Figura 5. Aminoéter 26.

2.5 Determinación de la citotoxicidad y sinergia de compuestos

En la actualidad para el desarrollo de nuevos fármacos, se busca que los compuestos no sean nocivos para la salud de los individuos, por ende existen distintas metodologías donde se mide la citotoxicidad de estos compuestos y así mismo determinar si son viables y seguros como nueva alternativa farmacéutica. En el desarrollo de fármacos es importante determinar el índice de selectividad (SI) y esto se realiza en las primeras fases del descubrimiento. El SI relaciona la determinación citotóxica mediana general de un nuevo compuesto para una línea celular de mamífero (IC_{50}) y la concentración más baja que inhibe el crecimiento de MTB (IC_{50}/MIC).

Dado que los resultados *in vitro* realizados del aminoéter 26 fueron limitados, se propuso continuar con los ensayos *in vitro* para poder determinar su actividad contra otras cepas del género *Mycobacterium* para poder determinar si el compuesto puede ser evaluado en ensayos de modelos murinos.

Por otro lado, según la literatura se han reportado compuestos antiinflamatorios con un modesto potencial anti-TB que cuando son probados *in vitro* solos muestran valores de CMI entre 10-25 mg/L, a diferencia de cuando son probados en combinación aumenta su potencial anti-TB y disminuye el valor de CMI (Luna-Herrera et al., 2007). En base a esta información también se propone determinar la actividad farmacológica del AE-26 en combinación con antifímicos de primera y segunda línea.

3 HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis nula

El aminoéter 26 no tiene actividad citotóxica significativa sobre las líneas celulares de macrófagos MH-S, J774A.1 y A549. El aminoéter 26 tiene actividad antimicobacteriana sobre varias cepas de *Mycobacterium* y tiene efecto sinérgico con al menos un antifímico de primera línea o segunda línea.

3.2 Hipótesis alternativa

El aminoéter 26 tiene actividad citotóxica significativa sobre las líneas celulares de macrófagos MH-S, J774A.1 Y A549. El aminoéter 26 no tiene actividad antimicobacteriana sobre varias cepas de *Mycobacterium* y no tiene efecto sinérgico con un antifímico de primera línea o segunda línea

4 Objetivo general

Evaluar el efecto antimicobacteriano del aminoéter AE-26 en varias cepas del género *Mycobacterium* y el efecto citotóxico en las líneas celulares MH-S, J774A.1 y A549, así como su actividad de sinergia con al menos un agente antifímico.

4.1 Objetivos específicos

4.1.1 Determinar la CMI de AE-26 en cepas sensibles y MDR del género *Mycobacterium*.

4.1.2 Determinación de la carga bacteriana en la CMI.

4.1.3 Evaluar la actividad citotóxica del AE-26 en las líneas celulares MH-S, J774A.1 y A549.

4.1.4 Determinar la sinergia del aminoéter con al menos un agente antifímico

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Separación y Purificación del AmDG a partir del extracto crudo

1.5.1 Primer fraccionamiento del extracto CHCl₃/MeOH de *Larrea tridentata*

Se partió de una muestra de 20 g del extracto CHCl₃/MeOH de *L. tridentata*, luego el extracto se disolvió en 30 mL de agua más 2.5 mL de dimetilsulfóxido a 35°C y se sónico hasta que se disolvió la mayor parte. Una vez disuelto el extracto, se fracciona por partición líquido-líquido (L-L) secuencialmente con Hexano 100%, Hexano: Éter etílico 80:20, Hexano: Éter etílico 70:30 y Acetato de etilo 100%.

1.5.2 Segundo Fraccionamiento del extracto CHCl₃/MeOH de *L. tridentata*

La fracción orgánica del extracto fraccionado se volvió a tratar mediante cromatografía en columna (CC) donde se usó como fase estacionaria (FE) gel de sílice (260 g) y como fase móvil (FM) se utilizó un gradiente de Hexano/CHCl₃ con variaciones del 5%. Se obtuvieron un total de 294 fracciones con un volumen de 56 mL cada una. Las fracciones fueron analizadas mediante Cromatografía de Capa Fina (CCF) y fueron reveladas bajo luz ultravioleta y sulfato sérico amoniacal. Las fracciones que presentaron los mismos componentes fueron reunidas y etiquetadas como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Fraccionamiento del extracto pretratado.

Fracciones Reunidas	Polaridad CC	Observaciones
1-36	Hexano:CHCl ₃ 85:15	Componentes poco polares
37-66	Hexano:CHCl ₃ 85:15 y 75:25	Componentes poco polares
67-96	Hexano:CHCl ₃ 75:25 y 70:30	Un compuesto
97-114	Hexano:CHCl ₃ 70:30 y 65:35	Contaminantes
115-132	Hexano:CHCl ₃ 65:35 y 60:40	Contaminantes
133-148	Hexano:CHCl ₃ 60:40 y 55:45	Compuestos fenólicos
149-150	Hexano:CHCl ₃ 55:45	Un compuesto fenólico
151-190	Hexano:CHCl ₃ 50:50 y 40:60	Compuestos fenólicos y lignanos
191- 282	Hexano:CHCl ₃ 40:60 CHCl ₃ 100%	<i>AmDG</i> , lignanos y colorantes
283-294	MeOH 100%	Mezcla de compuestos

1.5.3 Aislamiento y purificación parcial del ácido meso-dihidroguaiarético

El *AmDG* se obtuvo de las fracciones 151- 282 (1.4 g), estas fracciones fueron seleccionadas para llevar a cabo su purificación parcial mediante CC usando como FE gel de sílice (28 g) y FM Hexano/Acetona con variaciones del 10%. Las subfracciones se analizaron mediante CCF utilizando como FM hexano/CHCl₃ 7:3. Se obtuvieron un total de 154 subfracciones (Tabla 4).

Tabla 4. Sub-fracciones de F 151-282.

Sub-fracciones Reunidas	Polaridad CC	Observaciones
1-59	Hexano:Acetona 90:10	Colorantes y un compuesto
60-95	Hexano:Acetona 85:15	Colorantes, lignanos y <i>AmDG</i> .
96-101	Hexano:Acetona 80:30	Colorantes, lignanos y <i>AmDG</i> .
102-125	Hexano:Acetona 80:30 y 70:30	Colorantes, lignanos y <i>AmDG</i> .
126-130	Hexano:Acetona 65:35	Componentes en menor cantidad
131-142	CHCl ₃ 100%	Componentes en menor cantidad
143-154	MeOH 100%	Componentes en menor cantidad

Se seleccionaron las subfracciones 60-95 para proseguir con la purificación del *AmDG* mediante Cromatografía en Capa Fina Preparativa (CCFP) utilizando como FE una hoja de aluminio recubierta de gel sílice y como FM CHCl₃/Acetona 98:2. Una vez obtenido el *AmDG* semipuro, se colocó una vez más en una CC para eliminar las impurezas. Se utilizó como FE gel de sílice y como FM CHCl₃/MeOH con variaciones del 50%. Las subfracciones obtenidas se analizaron mediante CCF utilizando como FM Hexano/CHCl₃ 7:3. Finalmente se purificó el *AmDG* mediante recristalización con cloroformo/hexano 85:15 (Figura 6).

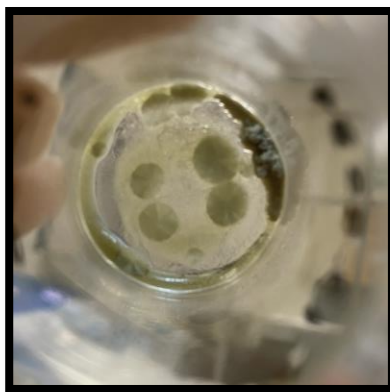


Figura 6. Cristales de *AmDG*.

5.2 Semi-síntesis del aminoéter 26 y su purificación

Se disolvieron 25 mg de *AmDG* en acetona 2 mL con clorhidrato de 2-cloro-*N,N*-dimetiletilamina y K_2CO_3 , se mantuvieron a reflujo y agitación por 24 horas. Se monitoreó la reacción mediante CCF cada 2 h (Figura 7). Una vez que se completó la reacción, a la mezcla de reacción se le adicionó 5 mL de agua y se extrajo tres veces con acetato de etilo. La fracción orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se destiló al vacío. El residuo orgánico seco se sometió a una cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil un gradiente de hexano/acetona. La estructura del producto puro se determinó por Resonancia Magnética Nuclear.

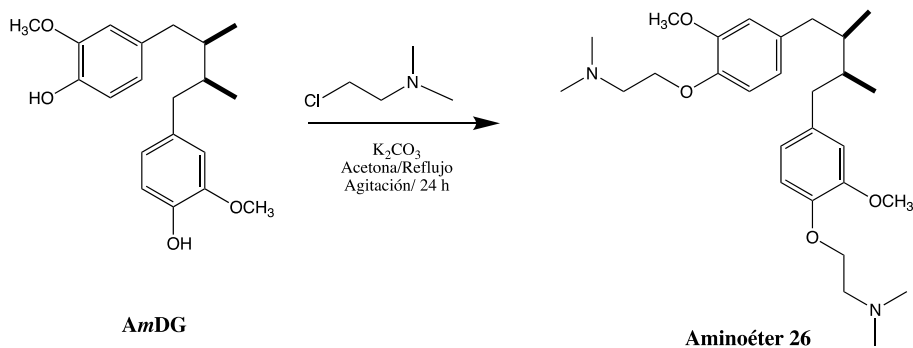


Figura 7. Semi-síntesis del aminoéter 26.

5.3 Elucidación estructural de AE-26

La elucidación estructural del AmDG y aminoéter 26 se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón y carbono RMN ^1H y ^{13}C , donde se analizaron los espectros para determinar las bandas pertenecientes a cada grupo funcional de los compuestos.

5.4 Determinación de concentración mínima inhibitoria por el método de resazurina.

Se siguió la metodología descrita por Caleffi-Ferracioli para determinar la actividad antimicobacteriana del aminoéter 26 en distintas cepas de MTB(Caleffi-Ferracioli et al., 2013).

Cepas

Para determinar la MIC se utilizaron las siguientes cepas (Tabla 5) donde se señala como sensibles a las cepas que son susceptibles a los fármacos de primera línea y MDR a las que son resistentes a la terapia de primera línea. Todas las cepas se mantenían en criovales de 1 mL congelados en solución salina fisiológica a -70°C , recuperadas a una densidad óptica (600 nm) entre 0.4-0.6 y cuantificadas por determinación de carga bacteriana en cultivo, para conocer la concentración de micobacterias por mL.

Tabla 5. Descripción de las cepas de MTB que se utilizaron (Estreptomicina, I= isoniazida, Etambutol y Pirazinamida.

No.	Cepas del género <i>Mycobacterium</i>	Características	Perfil de resistencia
1	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Sensible	--
2	<i>M. tuberculosis</i> CIBIN99	MDR	E, I ,Et, R, P
3	<i>M. tuberculosis</i> 46P	MDR linaje Beijing	--
4	<i>M. tuberculosis</i> 96	MDR linaje Beijing	--
5	<i>M. tuberculosis</i> SUDA31	MDR linaje Beijing	--
6	<i>M. tuberculosis</i> 5186	MDR linaje Harlem	---
7	<i>M. bovis</i>	MDR	P
8	<i>M. kanssasi</i>	MDR	P, I
9	<i>M. abcessus</i>	MDR	Resistencia elevada a los antibióticos

Cada letra representa los fármacos a que es resistente cada cepa

*Fármacos de primera línea (**E**streptomicina, **I**soniazida, **Et**ambutol, **R**ifampicina y **P**irazinamida).

*Fármacos de segunda línea (**M**oxiflozaxino, **A**mikacina).

Medios de cultivo para MTB

Se empleo el medio de cultivo parcialmente selectivo para micobacterias Difco® Middlebrook 7H9 y Agar 7H10 suplementado con medio enriquecido por BD BBL® Middlebrook OADC (ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa). Para preparar un litro de cada uno de los medios se requirieron los ingredientes que se muestran en la tabla 6. Una vez que ya se tenían listos los ingredientes de cada medio, se calentaron hasta disolver y se esterilizaron en autoclave a 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos. Finalmente, a temperatura ambiente se le agregó el OADC. Para el Agar 7H10 se vierten 17 mL a cajas Petri estériles,

se dejaron enfriar y secar aproximadamente 15 min, se colocaron a prueba de esterilidad en una incubadora a 37°C por al menos 48 horas.

Tabla 6. Ingredientes de los medios de cultivo para MTB.

Medio 7H9
4.7 g de medio 7H9 en polvo
5 mL de glicerol
900 mL de agua destilada
0.5mL de Sigma-Aldrich® Tyloxapol premium.
100mL de BD BBL® OADC (5 tubos)
Agar 7H10
900 mL de agua destilada
19 g de agar 7H10 en polvo
5 mL de glicerol
100 mL de BD BBL® OADC (5 tubos)

Antibióticos

Para los ensayos de CMI se utilizaron controles positivos para cada cepa (Tabla 7).

Tabla 7. Cepas y controles positivos usados.

Cepas	Control positivo
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	INH
<i>M. tuberculosis</i> CIBIN99	MOXIFLOXACINO (MOXI)
<i>M. tuberculosis</i> 46P	MOXI
<i>M. tuberculosis</i> 96	MOXI
<i>M. tuberculosis</i> SUDA 31	MOXI
<i>M. tuberculosis</i> 5186	MOXI
<i>M. abscessus</i>	MOXI
<i>M. bovis</i>	RIF
<i>M. kansasii</i>	AMIK

Se prepararon soluciones stock de INH y MOXI a una concentración de 1250 µg/mL en medio 7H9 y previamente se filtraron. Después se realizaron diluciones 1:5 y 1:2 en tubos Eppendorf para obtener las concentraciones de 250, 50, 10, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.6 y 0.3 µg/mL de cada control.

Para RIF se preparó una solución stock de 800 µg/mL en medio 7H9, se agitó por media hora y finalmente se filtró. Después se realizaron dos diluciones 1:10 con 7H9 para obtener las concentraciones de 80 y 8 µg/mL.

Compuesto AE-26

Para la determinación de CMI de AE-26 se preparó una solución stock de 1000 µg/mL en medio 7H9 y con 4% de DMSO. A partir de este stock se prepararon soluciones de trabajo con distintas concentraciones 100, 50 y 25 µg/mL de AE-26 en medio 7H9 para llevar a cabo su evaluación.

Preparación del cultivo e inóculo de MTB para el ensayo de CMI

Se tomaron los crioviales de 1 mL de las cepas de MTB del ultracongelador a -70°C y se descongelaron a 37°C por 10 minutos. Finalmente, en tubos Falcon de 50 mL previamente etiquetados con las cepas correspondientes se colocaron 6 mL de medio 7H9 + 1 mL de cada cepa del criovial. Una vez sellados los tubos con Parafilm, se colocaron en la incubadora con agitación por 15 días hasta alcanzar 1 en escala de McFarland. Una vez alcanzada la densidad óptica de 0.5 se procede a la preparación del inóculo para el ensayo de CMI. Se homogenizó en vórtex y se tomó el volumen necesario para hacer una suspensión de 3×10^5

micobacterias/100 μ L en medio 7H9 y colocarla en todos los pozos a utilizar en el ensayo.

Sanitización

Antes de cada ensayo se encendió la cámara de flujo laminar y se colocó la luz UV 10 minutos. Después se limpian todas las superficies con etanol al 80% y se colocó el material a utilizar previamente limpio con etanol al 80%.

Montaje de la placa

El ensayo se llevó a cabo en el cuarto de BSL-3 en una cámara de flujo laminar clase II. Se siguió el protocolo de sanitización antes de proceder al ensayo. Una vez lista la cámara se colocó el material a utilizar y placas estériles de poliestireno de 96 pozos con fondo plano y tapa. Todas las placas se rellenaron con agua estéril en los pozos de la periferia y se prosiguió con los siguientes pasos (Figura 8):

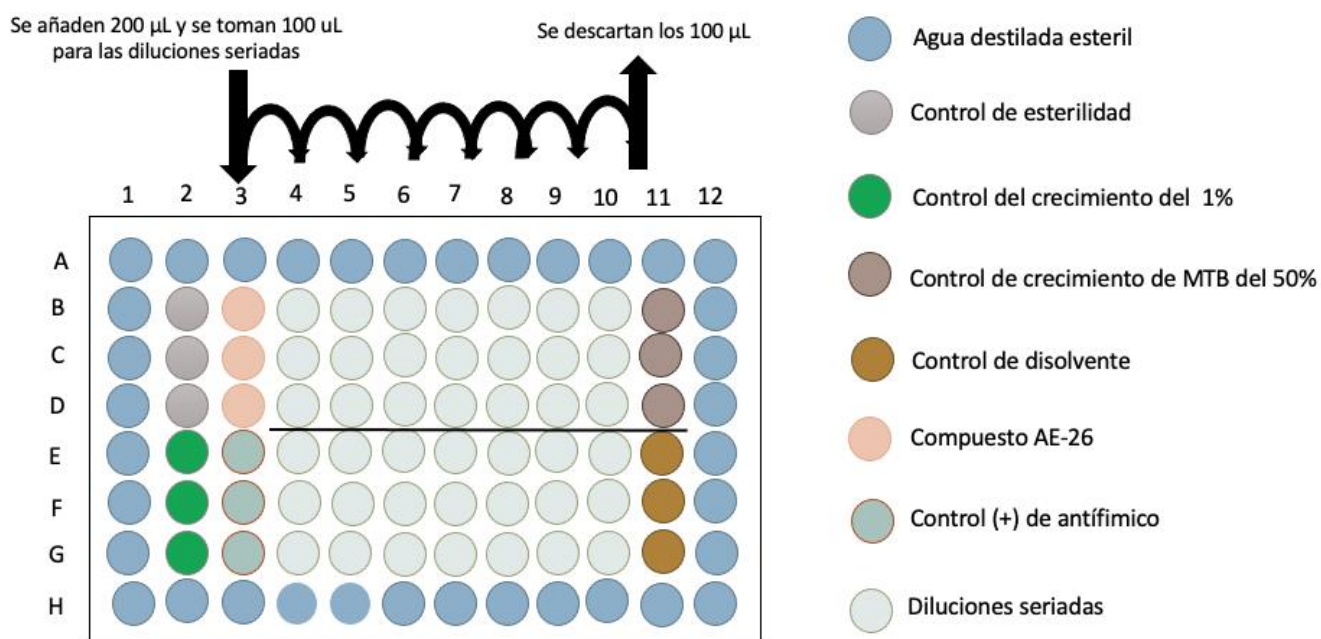


Figura 8. Montaje de placa para CMI.

1. Se añadió 100 μL de medio 7H9 en los pozos de las filas B-G columnas 4-11. También 200 μL en la fila B-D columna 2 y 180 μL en la fila E-F de la misma columna.
2. Se añadió 200 μL de la solución de trabajo a evaluar de AE-26 (dependiendo de que cepa era se añadía la concentración de 100, 50 o 25 $\mu\text{g/mL}$) en la fila B-D columna 3.
3. Se añadió 200 μL de solución stock del antifímico a usar como control positivo (dependiendo de la cepa se añade ya sea INH, RIF o MOXI) en la fila E-G columna 3.
4. Una vez completada la columna 3 se realizaron diluciones seriadas de la fila B-G columnas 3-10, donde consta de tomar 100 μL en la columna 3 y

a la siguiente colocarlos, agitar 10 veces, volver a tomar el mismo volumen y así hasta llegar a la columna 10.

5. Finalmente se añadieron 100 μ L el inóculo previamente preparado de MTB (dependiendo de la cepa a evaluar) en las filas B-G columnas 3-11. Se añaden 2 μ L en la fila E-G columna 2 (control del crecimiento micobacteriano del 1%) y se añaden 50 μ L en la fila B-D columna 2 (control del crecimiento micobacteriano del 50%).

Una vez completados los pasos anteriores las placas se taparon y se sellaron con cinta adhesiva en las orillas. Se colocaron en la incubadora a 35°C con agitación a 70 rpm por 7 días para cepas sensibles y 9 días para cepas MDR. Una vez completado el tiempo de incubación en el día 8 para sensibles y día 10 para MDR, se añadieron 30 μ L de resazurina 0.02% (peso/volumen) en agua destilada previamente preparada y filtrada. Se incubó por 24 horas. Se observó el cambio de color y si lo hay se determinó las Unidades Formadoras de Colonias (UFC's).

Determinación de las UFC en la CMI

Para determinar la carga micobacteriana en la CMI de cada cepa, se etiquetaron cajas Petri con agar 7H10, se marcaron y dividieron en 8 partes iguales con un marcador. Una vez listas las placas se tomaron placas de poliestireno de 96 pozos y se realizaron los siguientes pasos (Figura 9):

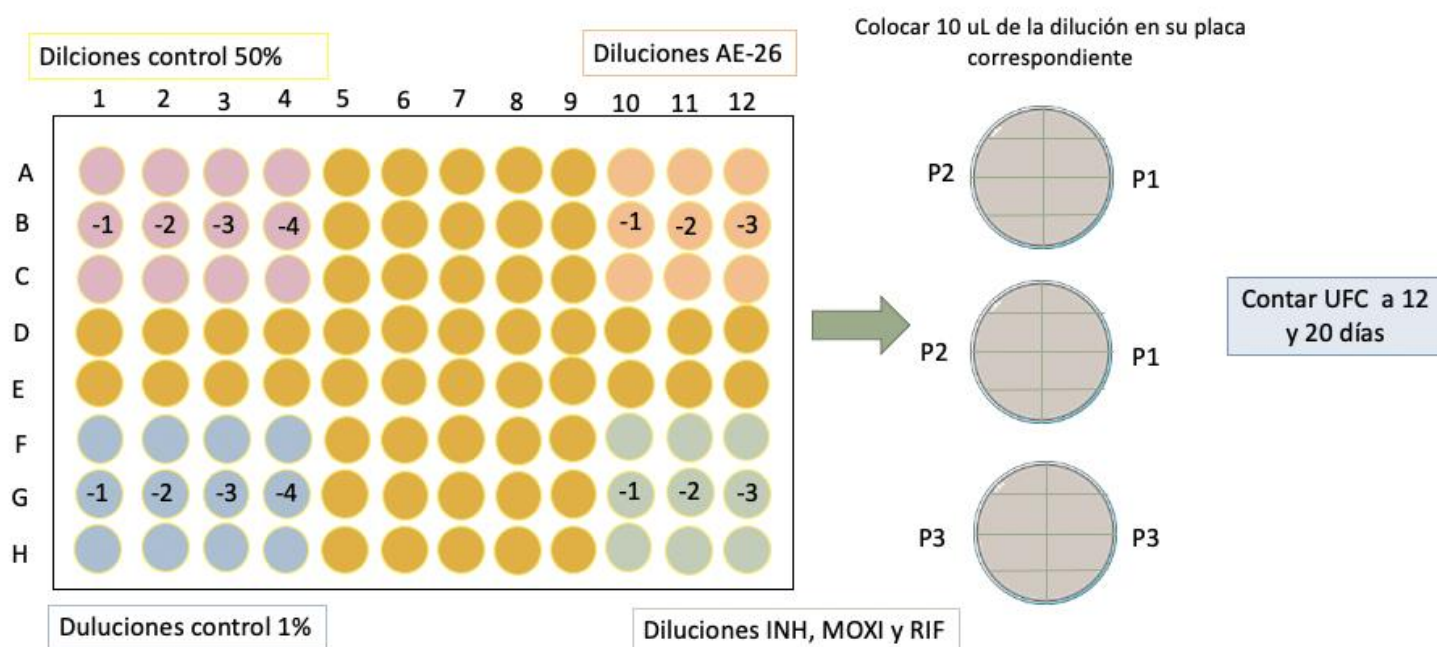


Figura 9. Montaje de placa para las diluciones de UFC's.

1. Se añadieron 270 μL de medio 7H9 en los pozos de las filas A-C y F-H columnas 1-4 y 10-12 para realizar diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} para AE-26 y el control positivo. Para los controles de crecimiento micobacteriano del 1% y 50% se realizaron diluciones hasta la 10^{-4} .

2. Se tomaron 30 μL de la placa de CMI de los pozos correspondientes de controles de crecimiento, la MIC de AE-26 y control (+) de INH, RIF o MOXI. Se acomodaron como se muestra en la Figura 8.
3. Se realizaron diluciones seriadas tomando 30 μL en 10^{-1} y llevando hasta 10^{-3} o 10^{-4} .
4. Se tomaron las placas con agar 7H10 y se colocaron 10 μL del concentrado (placa de MIC) y de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}).
5. Se dejaron absorber las muestras en el agar, se sellaron e incubaron a 37°C y 5% de CO_2 . Por último, se realizaron conteos de UFC's a los 14 y 21 días.
6. Finalmente se realizaron los análisis estadísticos de ANOVA (1 vía), Test Tukey.

5.5 Determinación de la citotoxicidad

En este ensayo tuvo como objetivo determinar a cual concentración el aminoéter 26 puede matar cierto porcentaje de la población celular en 48 horas (Escobar M. et al., 2010).

Líneas celulares

Para este ensayo se utilizaron las líneas celulares que se muestran en la siguiente Tabla 8. Las líneas celulares se mantuvieron en botellas para cultivo (área de cultivo de 75 cm^2) con medio RPMI suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%.

Tabla 8. Características de las líneas celulares empleadas

No.	Línea celular	Características
1	MH-S ATCC™	Macrófagos alveolares de pulmón de ratones machos Balb/c.
2	J774A.1 ATCC™	Macrófagos provenientes del peritoneo de ratones machos Balb/c.
3	A549 ATCC™	Célula humana epitelial proveniente del Pulmón.

Medio de cultivo para las líneas celulares

Se preparó medio de cultivo Gibco® RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Para preparar un litro se requiere lo que se muestra en la tabla 9. Una vez listo en la botella, se ajustó el pH a 7.4 utilizando solución de HCl o NaOH 0.1 N para después filtrarlo al vacío usando Stericup® de 1 L. Para hacer medio RPMI complementado, se añaden en un tubo falcón 9 mL de medio RPMI más 1 mL de SFB.

Tabla 9. Ingredientes para medios del cultivo de las líneas celulares.

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

PBS-EDTA

Para preparar un litro de PBS-EDTA se indica en la tabla 10, al finalmente se ajustó el pH a 7.4 con HCl o NaOH 0.1N para después filtrar al vacío usando un Stericup® de 1L.

Tabla 10. Ingredientes para la preparación de PBS-EDTA.

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

Dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%

Se prepararon 10 mL de DMSO al 10%, se tomó 1 mL de DMSO más 9 mL de RPMI y se filtró en la campana de flujo laminar con un filtro de 0.22 µm.

Resazurina

Se preparo resazurina a una concentración de 0.15 mg/mL en PBS estéril (pH 7.4), después se filtró con un filtro de 0.2 µm protegido de la luz (dentro de campana).

Compuesto AE-26

Para la determinación de CMI de AE-26 se preparó una solución stock de 1000 µg/mL en medio RPMI con 10 % de SFB y con 4% de DMSO. A partir de este stock se prepararon las soluciones de trabajo de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 y 0.78 µg/mL de AE-26 en medio RPMI con 10% de SFB en tubos Eppendorff.

Montaje de la placa

El ensayo se llevó a cabo en el cuarto de BSL-3 y en una cámara de flujo laminar clase II. Se siguió el protocolo de sanitización antes de proceder al ensayo. Una vez lista la cámara se colocó el material a utilizar. Se partió de una botella con un 80-90% de confluencia de la línea celular. Se retiró el sobrenadante de las botellas, se les añadieron 13 mL de PBS-EDTA y se incubaron a 37°C por 30

minutos. Después se les dio golpecitos a las botellas y se transfirió el contenido a tubos de 50 mL, se centrifugaron a 20°C por 10 minutos a 1500 rpm, después se desecharon los sobrenadantes y se suspendieron en 5 mL de medio RPMI suplementado con 10% de SFB.

En un microtubo se colocaron 10 µL de cada suspensión de células y 90 µL de azul tripano para realizarse diluciones de 1:10. En una cámara de Neubauer se colocó µL de las diluciones y se observaron al microscopio para calcular las células/mililitro mediante la siguiente fórmula:

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

FD= Factor de dilución

A partir del conteo anterior se prepararon suspensiones de 1×10^4 células/100 µL en tubos Eppendorf con medio RPMI con 10% SFB.

Montaje de la placa

1. Se añadieron 200 µL agua destilada en los pozos de la periferia e incluyendo en las filas F-G columnas 2-11.
2. Se añadieron 100 µL de la suspensión de células ya preparada en las filas B-E columnas 2-11.
3. Finalmente se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Una vez que las células se pegaron al fondo de los pocillos, se realizó lo siguiente

Figura 10:

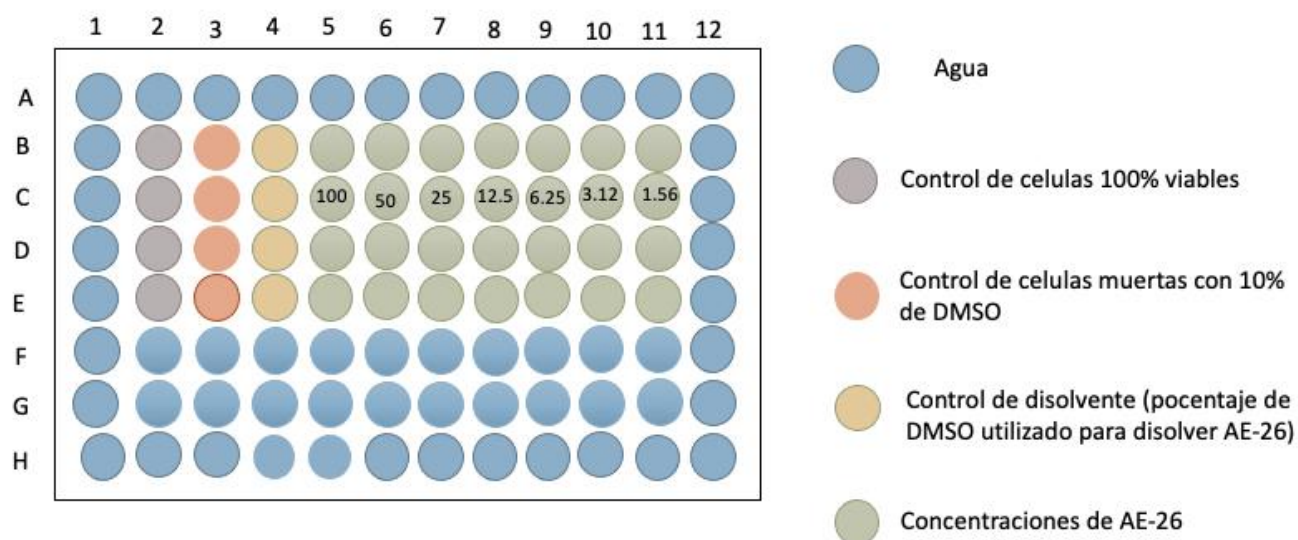


Figura 10. Montaje de placa de citotoxicidad.

1. Se retiraron los sobrenadantes de las células de las filas B-E columnas 2-11 y se realizaron 3 lavados con 100 μ L de PBS.
2. Se añadieron 100 μ L de RPMI con 10% de SFB en la fila B-E columna 2 como control de (+) de células viables.
3. Se añadieron 100 μ L de DMSO al 10% en la fila B-E columna 3 como control (-) de muerte celular.
4. Se añadieron 100 μ L de medio RPMI con 10% de SFB + 2% de DMSO como control de disolvente.
5. Finalmente, se colocaron 100 μ L de cada concentración a evaluar en un rango de 100-1.56 μ g/mL de AE-26 en las filas B-E columnas 5-11.

Una vez terminado el montaje de la placa se tapó y se incubó por 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después del tiempo de incubación se le añadió 20 µL de resazurina previamente preparada y se dejó toda la noche. Terminando el tiempo de incubación se tomó la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm de excitación/ 590 nm de emisión en el espectrofotómetro. Los resultados se compararon como absorbancia de las células tratadas contra la absorbancia de las células no tratadas mediante la fórmula (Figura 11). Los resultados se expresaron como porcentaje (absorbancia de las células tratadas contra la absorbancia de las células no tratadas).

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{D.O. de células tratadas}}{\text{D.O. de células control}} \times 100$$

Figura 11. Fórmula del porcentaje de viabilidad celular.

5.6 Determinación de la actividad sinergia de AE-26 con antifímicos de primera y segunda línea.

El objetivo de este ensayo es determinar si el aminoéter 26 puede presentar, sinergia, antagonismo, adición, entre otros con fármacos de primera y segunda línea (Luna-Herrera et al., 2007).

Cepas

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se utilizaron las cepas *M. tuberculosis* H37Rv y CIBIN99.

Antibióticos

Para el ensayo de sinergia las soluciones de trabajo se preparan a una concentración final de 4 veces la mitad de la CMI ($4 \times \frac{1}{2}$ CMI). Se prepararon soluciones de trabajo de INH y MOXI a una concentración final 0.125 µg/mL.

Compuesto AE-26

Para el ensayo de sinergia las soluciones de trabajo se prepararon a una concentración de 4 veces la CMI. Se prepararon soluciones de trabajo de AE-26 a una concentración de 50 y 100 µg/mL.

Preparación del cultivo e inóculo de MTB para el ensayo de MIC

Una vez alcanzada la densidad óptica de 0.5 se procede a la preparación del inóculo para el ensayo de CMI. Se homogenizó en vórtex y se tomó el volumen necesario para hacer una suspensión de 3×10^5 micobacterias/ 50 µL en medio 7H9 y colocarla en todos los pozos a utilizar en el ensayo.

Montaje de la placa

El ensayo se llevó a cabo en el cuarto de BSL-3 y en una cámara de flujo laminar clase II. Se siguió el protocolo de sanitización antes de proceder al ensayo. Una vez lista la cámara se colocó el material a utilizar y placas estériles de poliestireno de 96 pozos con fondo plano y tapa. Todas las placas se rellenaron con agua

estéril en los pozos de la periferia y se prosiguió con los siguientes pasos (Figura 12):

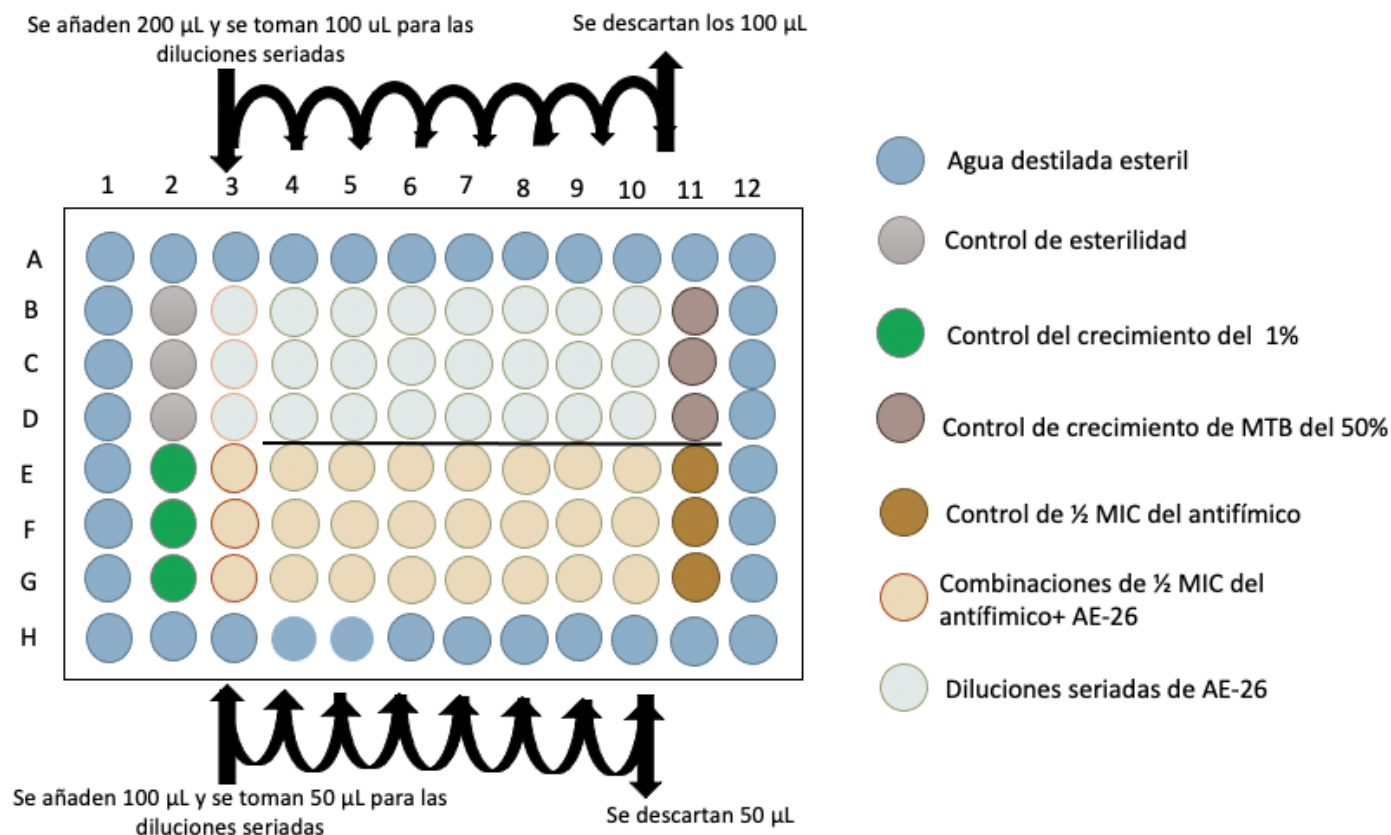


Figura 12. Montaje de la placa de sinergia.

1. Añadir 100 μ L de medio 7H9 en los pozos de las filas B-D columnas 4-11 y 50 μ L de medio 7H9 en las filas E-G columnas 4-11. También 200 μ L en la fila B-D columna 2 y 180 μ L en la fila E-F de la misma columna.
2. Añadir 200 μ L de la solución de trabajo a evaluar de AE-26 (dependiendo de que cepa era se añadirá la concentración de 100 o 50 μ g/mL) en la fila B-D columna 3. Posteriormente se toman 100 μ L y se realizan diluciones seriadas en la mismas fila y columnas 3-10.

3. Añadir 100 µL de la solución de trabajo de AE-26 en la fila E-G columna 3. Posteriormente se toman 50 µL y se realizan diluciones seriadas de la misma fila y columnas 3-10.
4. Añadir 50 µL de solución stock del antifímico a usar como control positivo (dependiendo de la cepa se añade ya sea INH o MOXI a ½ de CMI) en la fila E-G columnas 3-11.
5. Finalmente se añaden 100 µL el inóculo previamente preparado de MTB (dependiendo de la cepa a evaluar) en las filas B-D columnas 3-11 y se añaden 2 µL en la fila E-G columna 2. También se añaden 50 µL del inóculo en las filas E-G columnas

Una vez completados los pasos anteriores las placas se tapan y se sellan con cinta adhesiva en las orillas. Se colocan en la incubadora a 35°C con agitación a 70 rpm por 7 días para cepas sensibles y 9 días para cepas MDR. Una vez completado el tiempo de incubación en el día 8 para sensibles y día 10 para MDR, se añaden 30 µL de resazurina 0.02% (peso/volumen) en agua destilada previamente preparada y filtrada. Se incuba por 24 horas. Se observó el cambio de color y si lo hubo se determinaron UFC's.

5.7 Manejo de residuos

5.7.1 Síntesis y purificación

La disposición de los residuos generados en la síntesis y purificación del AE-26 a partir del *AmDG* se realizó en los contenedores ubicados en el Laboratorio de

Química de Productos Naturales en base al reglamento interno de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.7.2 Ensayos biológicos

Los residuos generados en los ensayos de actividad antituberculosa, sinérgica y citotóxica fueron dispuestos en base a lo establecido por el Laboratorio de Patología experimental situada en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición ‘Salvador Zubirán’.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento, purificación y caracterización del AE-26

A partir de 20 g de extracto crudo se obtuvo 55 mg de *AmDG*. Una cantidad de 30 mg de este lignano fue derivatizado en un aminoeter con K_2CO_3 (0.11 mmoles) en acetona anhidra (2 mL) y 2-cloro-*N,N*-dimetiletilamina (0.11 mmol) para obtener 18 mg del AE-26 con un rendimiento del 40%. Este derivado fue caracterizado por comparación de sus constantes espectroscópicas con las previamente reportadas por Reyes-Melo *et al.*, 2017.

6.2 Caracterización estructural de AE-26

Para la caracterización estructural es importante discutir las señales del producto natural sobre el cual se realizaron las modificaciones. El espectro de RMN 1H del *AmDG* presenta un patrón de señales simples, característica que se le atribuye a su estructura simétrica. Se observaron señales para seis hidrógenos aromáticos en la región entre 6 y 7 ppm; un singulete a 3.87 ppm correspondiente a dos metoxilos aromáticos; dos dobles de dobles a 2.73 ppm (dd, $J = 13.5$ Hz, H-7a, H-7a') que corresponden a protones bencílicos y 2.29 ppm (dd, $J = 13.9$ Hz, H-7b, H-7b'); un multiplete a 1.75 ppm (m, 2 H) que corresponde a los protones de los metinos. Finalmente un doblete a 0.843 ppm (d, $J = 6.76$ Hz, 6 H) que corresponde a los metilos unidos a la cadena alifática.

En el espectro de RMN 1H también se distinguen 3 señales que confirman la unión del grupo *N,N*-dimetiletilamina a los dos hidroxilos del *AmDG*. La primera

Chemical structure of compound 10 is shown above the spectrum. The structure is a dimeric molecule with two 3,4-dimethoxyphenyl rings connected by a central ether bridge. The rings are substituted with a 1,2-dimethyl-3-(dimethylamino)propyl group. The peaks are labeled with their corresponding protons: H2, H2', H5, H5', H6 y H6' (multiplet at 6.8 ppm); H10, H10' (doublet at 4.1 ppm); OMe-3, OMe-3' (singlet at 3.9 ppm); H11, H11' (doublet at 2.8 ppm); H7a, H7a', H7b, H7b' (multiplet at 2.3 ppm); H8, H8' (singlet at 2.0 ppm); Me 9, Me 9' (singlet at 0.0 ppm). Integration values are shown below the peaks: 1.9401, 3.8628, 3.8921, 5.7962, 1.1287, 1.1287, 2.2927, 2.0049, 6.0000.

El espectro de RMN ^{13}C de *AmDG* muestra diez señales correspondientes a los veinte carbonos de la molécula. Una de las señales que nos confirma la sustitución del grupo funcional es la de los metoxilos OMe-3 y OMe-3' a 55.82

ppm, las cuales se presentan como singuletes y que al momento de perder la simetría de la molécula, cambia a dos singuletes.

En la figura 14 se observan 13 señales correspondientes a los 28 carbonos de AE-26, de las cuales las señales a 45.90, 58.22 y 67.17 ppm corresponden a los 8 carbonos del sustituyente *N,N*-dimetiletilamina, con estas señales se corrobora las uniones de los sustituyentes a los hidroxilos del *Am*DG.

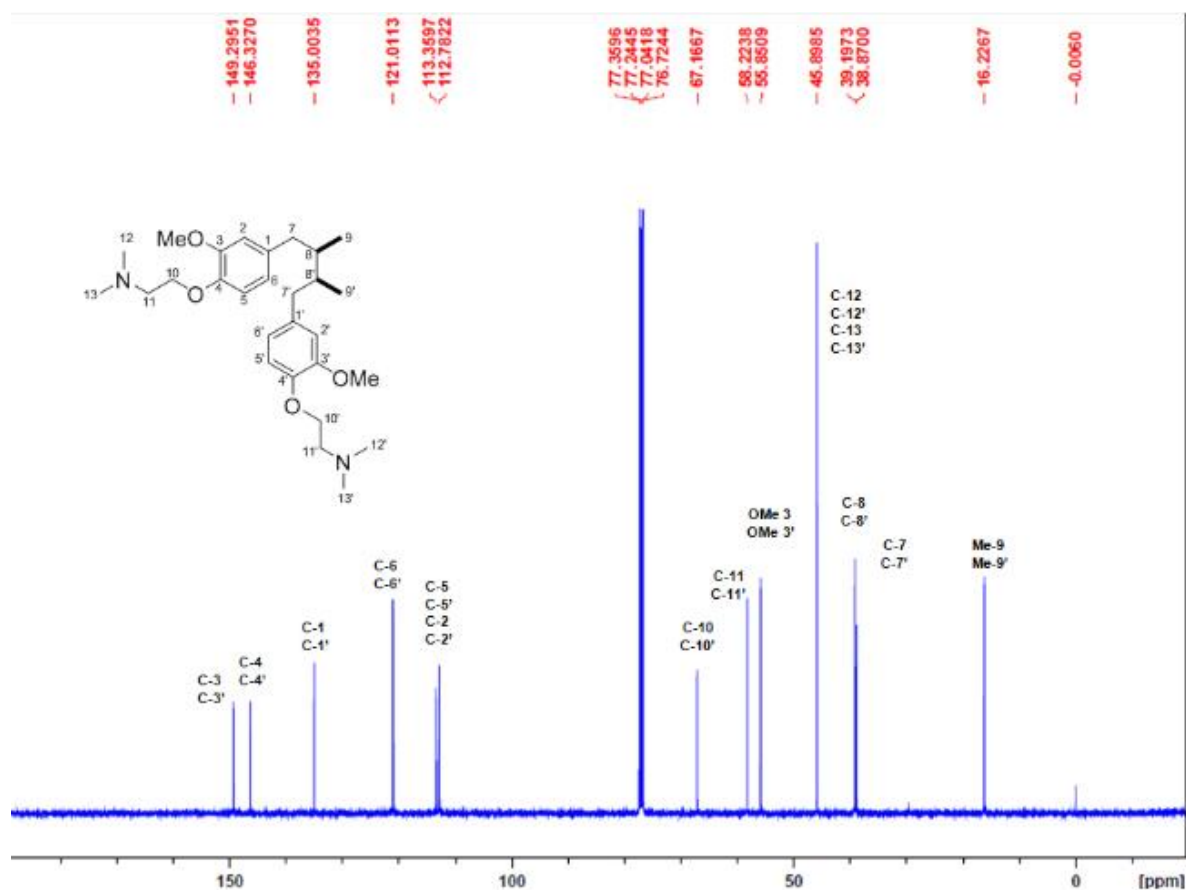


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C (MHz 100, CDCl_3) de AE-26.

6.3 Determinación de la CMI por el método de resazurina.

En este proyecto se utilizó la técnica colorimétrica que se basa en una reacción oxido-reducción, para determinar la concentración mínima inhibitoria de AE-26 que inhibe el crecimiento micobacteriano. La resazurina (color azul) en presencia de las deshidrogenasas mitocondriales provenientes de las micobacterias es reducida a resorufina (color rosa). Por lo tanto, un cambio en el color azul del medio a rosa indica que hay presencia de micobacterias viables y que el compuesto no pudo inhibir el crecimiento.

En este estudio se determinó la CMI en la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv Stanford debido a que es más virulenta que la cepa sensible de H37Rv ATCC 27794. Se encontró que el AE-26 tuvo un valor de CMI de 12.5 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv Stanford, dicho resultado si se compara con la CMI obtenida previamente por Reyes-Melo *et al.*, 2017 contra *M. tuberculosis* H37Rv (CMI 6.25 µg/mL) se encuentra que es menos sensible la cepa Stanford al AE-26. El antifímico de referencia INH tuvo una CMI de 0.06 µg/mL contra *M. tuberculosis* H37Rv Stanford siendo 208 veces más activo que el AE-26 contra esta misma cepa (Figura 15). Cabe mencionar que no se pudo usar el etambutol como estándar positivo ya que no se contaba con este antifímico en el laboratorio, que hubiera sido lo más conveniente usar para poder comparar los resultados obtenidos por Reyes-Melo *et al.*, 2017.(Reyes-Melo *et al.*, 2017)

De la misma placa donde se determinó la CMI de AE-26 y INH se tomaron alícuotas de los pozos donde se observó su CMI y se realizaron diluciones

seriadas en otra placa lo mismo que de los controles del crecimiento micobacteriano del 50 y 1%. De las ultimas diluciones realizadas de cada una de las muestras se realizaron sembrados en placas de agar Middlebrook 7H10 e incubaron a 37°C. Posteriormente, se realizaron conteos de UFC a los 14 y 21 días, con el propósito de determinar la carga bacteriana del AE-26 y de INH, con el propósito de compararlos.

En la Figura 16, se observa el grafico de barras donde se correlaciona las micobacterias/mL contra las muestras evaluadas. Se observa que los controles del 50% y del 1% de micobacterias alcanzan casi los mismos valores de micobacterias por mililitro (5×10^6). Mientras que INH alcanza disminuir la carga bacteriana a aproximadamente 3,000 micobacterias/mL a 0.06 µg/mL (CMI) y el AE-26 disminuye la carga 50, 000 micobacterias/mL a 12.5 µg/mL (CMI). Como se puede observar, aunque el aminoéter disminuye la carga bacteriana considerablemente, aunque no es comparable con la INH.

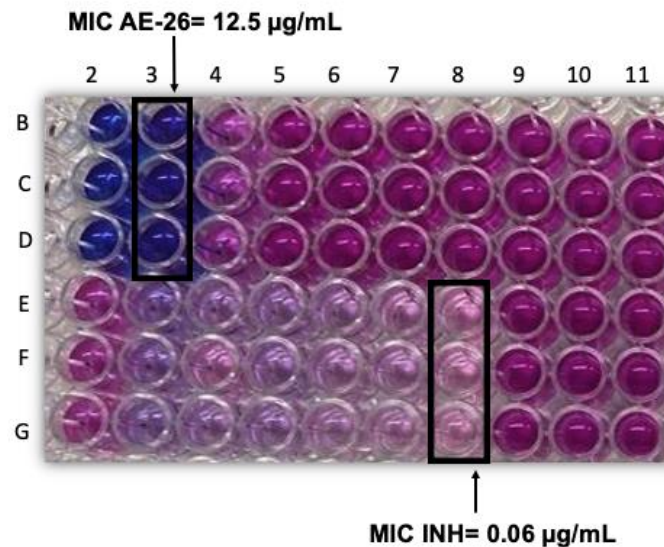


Figura 15. Lectura de CMI de AE-26 en *M. tuberculosis* H37Rv Stanford.

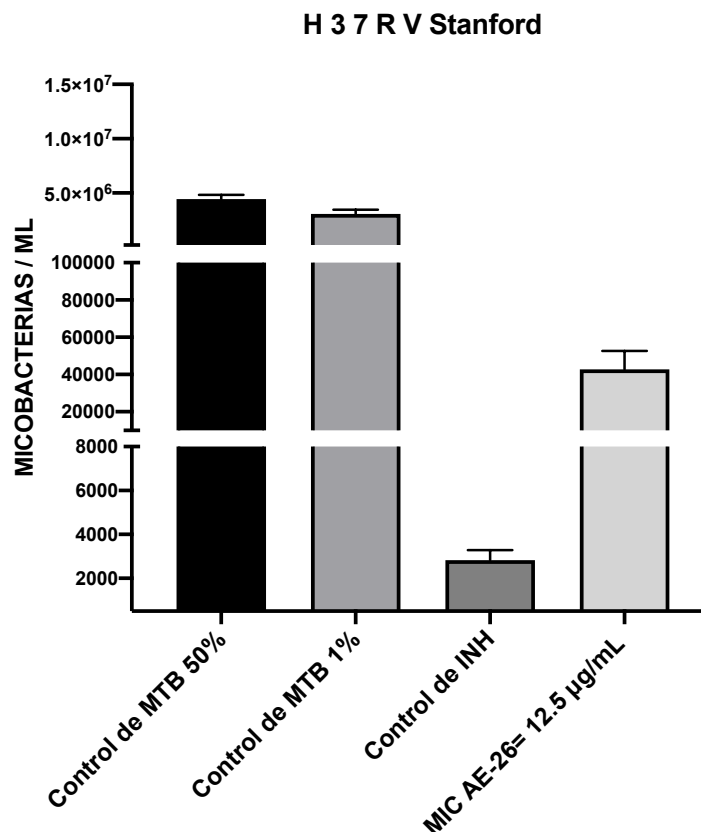


Figura 16. Determinación de carga micobacteriana UFC's. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas $\pm$ DE. ANOVA (1 vía) ****p<0.0001. Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

❖ El AE-26 inhibe el crecimiento micobacteriano de *M. tuberculosis* CIBIN99.

Se determinó la CMI en la cepa de *M. tuberculosis* CIBIN99 debido a que es una cepa MDR (resistente a todos los fármacos de primera línea). En la Figura 17 se observó que el aminoéter tuvo una CMI de 25 µg/mL para el AE-26, mientras que el control positivo MOXI mostró una CMI de 0.06 µg/mL, siendo este último 416 veces más potente que el AE-26 contra la cepa *M. tuberculosis* CIBIN99. Como el experimento anterior, también se determinó la carga micobacteriana de los controles sin tratar (50 y 1%), así como del AE-26 y del control positivo MOXI.

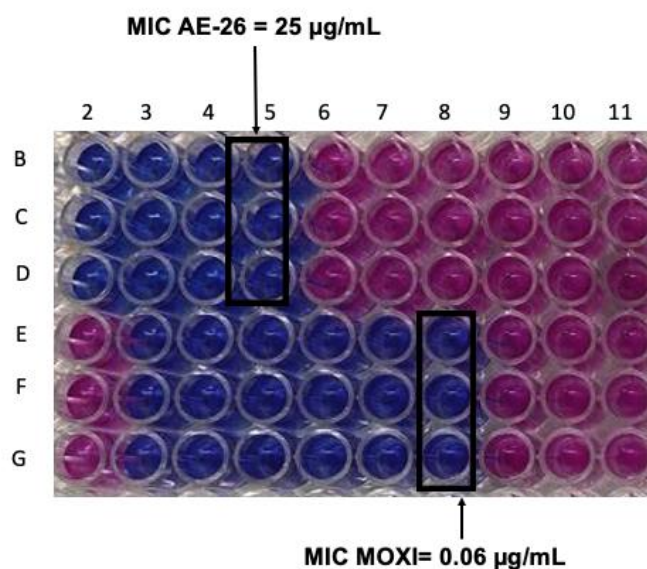


Figura 17. Lectura de CMI de AE-26 en *M. tuberculosis* CIBIN99.

En la Figura 18 se observa que el control sin tratar del 50% tuvo una carga bacteriana de 3.2×10^7 micobacterias/mL y el control del 1% tuvo una carga

bacteriana de 0.7×10^7 . En contraste el control positivo MOXI tuvo una carga bacteriana de aproximadamente 5000 micobacterias/mL a una concentración de 0.06 $\mu\text{g/mL}$ y el AE-26 tuvo una carga bacteriana de aproximadamente 60,000 micobacterias/mL a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$. En este caso también el aminoéter también disminuye la carga micobacteriana resistente, sin embargo, no es comparable con el control positivo.

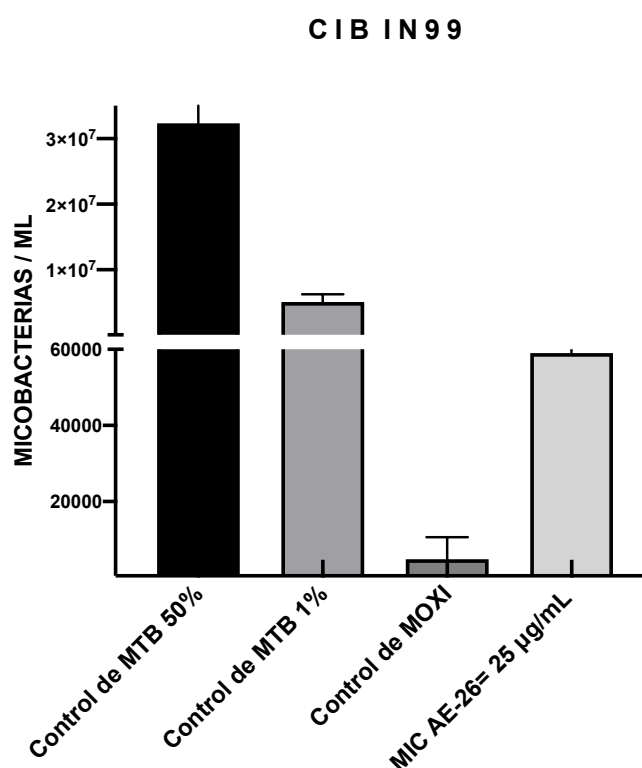


Figura 18. Determinación de carga micobacteriana UFC's. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas $\pm$ DE. ANOVA (1 vía) **** $p < 0.0001$. Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

❖ **El AE-26 inhibe el crecimiento micobacteriano en otras cepas MTB y MTN.**

Se determinó la CMI en las cepas de *M. tuberculosis* 5186, 46P, 96, SUDA31, *M. kanssasi*, *M. bovis* 301 y *M. abscessus*, debido a que no se ha probado este compuesto sobre estas cepas, se utilizó el mismo método colorimétrico de resazurina.

En la Figura 19 se observan los resultados de la actividad antimicobacteriana del AE-26 y el control positivo MOXI cuyos valores de CMI fueron de 12.5 y 0.125 µg/mL, respectivamente, contra de *M. tuberculosis* SUDA31. Cabe mencionar que esta cepa es del Linaje Beijing, la mayoría de este linaje es MDR. Se observa que el AE-26 fue 100 veces menos activo que el control positivo contra la cepa evaluada.

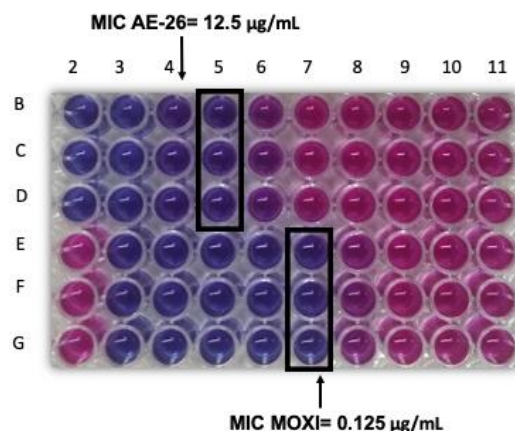


Figura 19. CMI de AE-26 en la cepa de *M. tuberculosis* SUDA 31.

La Figura 20 muestra los valores de CMI del AE-26 fue de 25 µg/mL y del control positivo RIF fue de 1 µg/mL contra la cepa de *M. bovis* 301 MDR (resistente a pirazinamida). Se observa que el AE-26 fue 25 veces menos activo que la RIF contra la cepa evaluada.

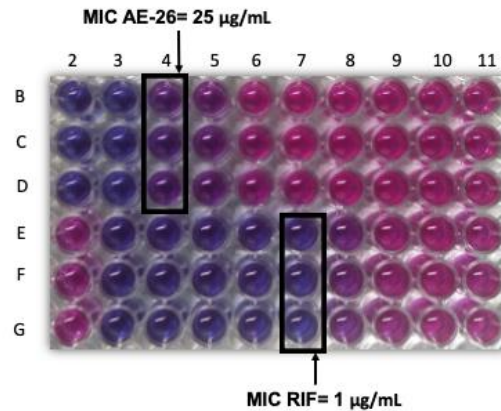


Figura 20. CMI de AE-26 en la cepa de *M. bovis* 301.

La cepa de *M. tuberculosis* 5186 es linaje Harlem por lo que MDR (se desconoce a que sea resistente). Para esta cepa el AE-26 tuvo una CMI de 25 µg/mL y el control positivo MOXI mostro una CMI de 0.125 µg/mL. En este caso el AE-26 fue 200 veces menos activo que el MOXI para *M. tuberculosis* 5186 (Figura 21).

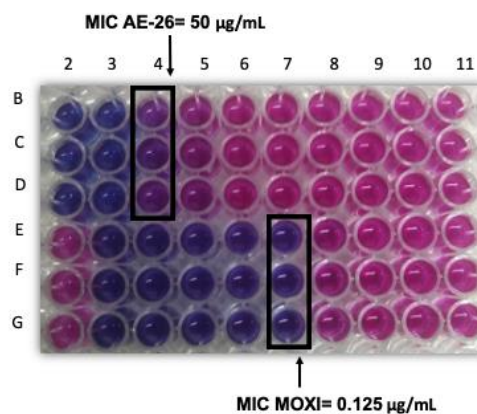


Figura 21. CMI de AE-26 en la cepa *M. tuberculosis* 5186.

La cepa de *M. tuberculosis* 46p es linaje Beijing y se considera hipervirulenta (se desconoce a que es resistente). Para esta cepa se obtuvo para el AE-26 una CMI de 12.5 µg/mL y para el control de antifímico MOXI, se obtuvo una CMI de 0.06 µg/mL. En este caso el AE-26 fue 208 veces menos activo que MOXI (Figura 22).

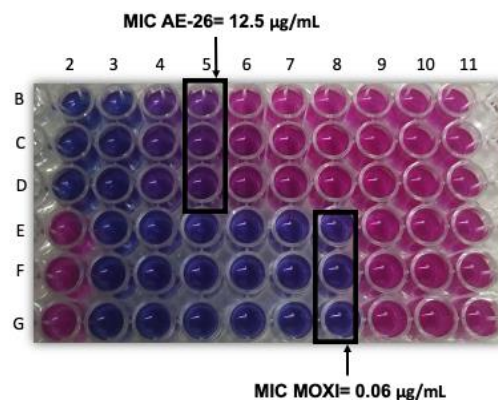


Figura 22. CMI de AE-26 en la cepa *M. tuberculosis* 46P.

La cepa de *M. tuberculosis* 96 es linaje Beijing y se considera hipervirulenta (se desconoce a que es resistente). Para esta cepa el AE-26 mostró una CMI de 25 µg/mL, mientras que el control de antifímico MOXI tuvo una CMI de 0.125 µg/mL. En este caso el AE-26 fue 200 veces menos activo que MOXI (Figura 23).

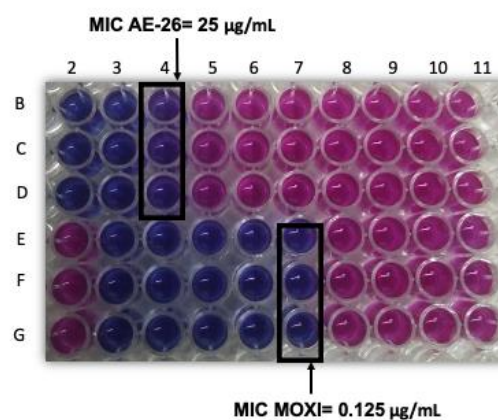


Figura 23. CMI de AE-26 en la cepa *M. tuberculosis* 96.

La cepa de *M. kanssasi* es MTN es de crecimiento rapido y es MDR (resistente a pirazinamida e isoniazida). Para esta cepa el AE-26 dio un valor de CMI de 50 µg/mL y el control del antifímico amikacina mostró una CMI de 1 µg/mL. El AE-26 fue 50 veces menos activo que la amikacina (Figura 24).

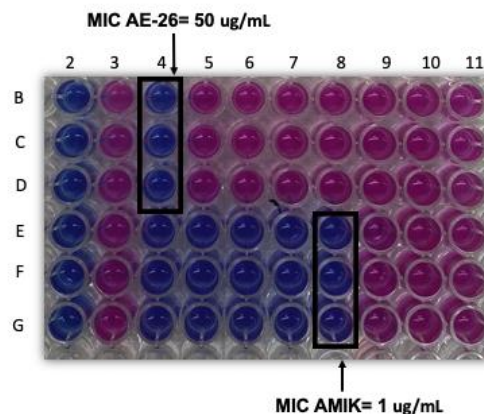


Figura 24. CMI de AE-26 en la cepa *M. kansasii*.

La cepa de *M. abscessus* es MTN de crecimiento rápido y es un aislado clínico debido a que presenta una resistencia elevada a los antibióticos. Para esta cepa el AE-26 dio una CMI $<50 \mu\text{g/mL}$ y no se utilizó un control antifímico (Figura 25).

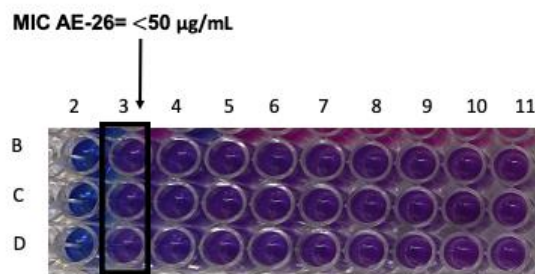


Figura 25. CMI de AE-26 en la cepa de *M. abscessus*.

Tabla 11. CMI de AE-26, antifímicos de primera y segunda línea sobre diferentes cepas MTN y MTB.

GRUPO	Cepas	AE-26 µg/mL/ µM	MOXI µg/mL/µM	AMIK µg/mL/µM	INH µg/mL/µM	RIF µg/mL/µM
1	<i>M. tuberculosis</i> <i>H37Rv Stanford</i>	12.5/ 26.46	0.06/0.149		0.06/0.14 9	
	<i>M. tuberculosis</i> <i>46p</i>	12.5/26.46	0.06/0.149	0.5/0.85		
	<i>M. tuberculosis</i> <i>SUDA31</i>	12.5/26.46	0.125/0.31 1	1/1.70		
2	<i>M. tuberculosis</i> <i>96</i>	25/ 52.92	0.125/0.31 1	1/1.70		
	<i>M. tuberculosis</i> <i>5186</i>	25/ 52.92	0.125/0.31 1			
	<i>M. tuberculosis</i> <i>CIBIN99</i>	25/ 52.92	0.06/0.149			
	<i>M. bovis</i> <i>301</i>	25/ 52.92				1/1.21
3	<i>M. kansasii</i>	50/105.85		1/1.70		
	<i>M. abscessus</i>	<50/105.8 5				

Se encontró que el AE-26 presenta valores de CMI que oscilan de 12.5–50 µg/mL en nueve distintos genotipos de *M. tuberculosis* (Tabla 11), mientras que las CMI de los fármacos antifímicos usados como controles positivos Moxifloxacino (0.06-0.125 µg/mL), Amikacina (0.5-1 µg/mL), Isoniacida (0.6 µg/mL) y Rifampicina (1

µg/mL). Como se pudo observar el aminoéter fue menos activo que los antifímicos de primera y segunda línea usados como controles positivos.

La actividad micobacteriana relevante definida por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), relaciona que una sustancia puede ser activa contra MTB cuando presenta una CMI <128 µg/mL, para el caso de extractos de plantas o < 25 µM para compuestos puros (Nguta et al., 2015). En base a lo que clasifica la CLSI se puede considerar que el aminoéter fue activo en *M. tuberculosis* H37Rv Stanford, 46p y SUDA31, debido a que se obtuvieron CMI de 12.5 µg/mL que equivale a 26.6 µM.

Como se mencionó anteriormente, AE-26 fue más activo a CMI 12.5 µg/mL en una cepa sensible y dos MDR de linaje Beijín (se desconoce a que son resistentes) como se muestra en la tabla 11 y en el grupo 1. Por otro lado, en la tabla 11 del grupo 2 se observa que AE-26 fue activo a CMI <25 µg/mL en una cepas MDR CIBIN99 (resistente a todos los fármacos de primera línea), 301 (resistente a pirazinamida), 96 y 5186 (linaje Beijín y se desconoce a que son resistentes). Otra observación importante, en la tabla 11 del grupo 3 se observa que AE-26 fue activo a CMI ≤ 50 µg/mL en cepas MTN que se consideran MDR *M. kansasii* (resistente a pirazinamida e isoniazida) y *M. abscessus* (aislado clínico resistente a todos los antibióticos macrólidos).

Esta similitud en los valores obtenidos de CMI en los 3 grupos, nos informa de una tendencia que puede estar asociada a la resistencia que presentan en común

estas cepas de MTB y MTN. Del Olmo *et al*, 2009, en un trabajo publicado menciona que las cepas resistentes a al menos un fármaco de primera o segunda línea, cuando son expuestas a ciertos antifímicos tienden a mutar en uno o dos genes como mecanismo de resistencia. Por lo que se puede sugerir que estas cepas de TB al ya ser MDR y al momento de ser expuestas a AE-26 podrían presentar otras mutaciones por lo que se vuelven más resistentes. Sin embargo, se necesita realizar un mapeo genético para corroborar a que son resistentes y poder comparar si estos valores obtenidos en CMI, tienen que ver por la similitud de resistencia que presentan al fármaco o también comparar la similitud entre los mecanismos de acción de dichos fármacos (del Olmo *et al.*, 2009).

Por otro lado, también se requiere determinar la CI_{50} del aminoéter con al menos una línea celular mamífera para determinar el Índice de selectividad (SI) y verificar que el aminoéter es más tóxico para las cepas de *Mycobacteria* que para las células mamíferas. Por esta razón se determinó la citotoxicidad del aminoéter con varias líneas celulares de mamíferos como se muestra a continuación.

6.4 Determinación de la actividad citotóxica de AE-26.

En este proyecto se utilizó la técnica colorimétrica de resazurina que se basa en una reacción oxido-reducción, para determinar la viabilidad celular de AE-26. La resazurina (color morado) en presencia de las deshidrogenasas mitocondriales provenientes de las células es reducida a resorufina (color rosa). Por lo tanto, un

cambio en el color azul del medio a rosa indica que hay presencia de células viables, mientras que el color azul indica daño/muerte celular.

En este estudio se decidió determinar la citotoxicidad de AE-26 en las líneas celulares de macrófagos MH-S, J774A.1 y células epiteliales de humano A549, debido a que Reyes-Melo *et al.*, 2017 solo probó en células epiteliales vero obteniendo un valor de citotoxicidad $IC_{50} = >487 \mu\text{g/mL}$ y también un índice de selectividad $SI (IC_{50}/CMI_{H37Rv}) = >77.92$. Utilizó como fármaco de referencia el etambutol y obtuvo valores de $IC_{50} = 390.9 \mu\text{g/mL}$ y $SI (IC_{50}/CMI_{H37Rv}) = 125.1$ (Reyes-Melo *et al.*, 2017).

❖ El AE-26 muestra citotoxicidad aparente en las líneas celulares de macrófagos MH-S, J774A.1 y células epiteliales A549.

En este ensayo de citotoxicidad en las líneas celulares se observó que hay una tendencia de dosis-dependiente en los gráficos 26, 27 y 28, donde se presenta absorbancia versus tratamientos, es decir que a mayor concentración del aminoéter 26 expuesto en las células, es más dañino para ellas. Por otro lado, en la línea celular J774A.1 (Figura 27) no se observó daño celular aparente en las concentraciones menores de 3.12 a 0.78 $\mu\text{g/mL}$ comparando estas barras con el control de viabilidad (RPMI + 10% de SFB).

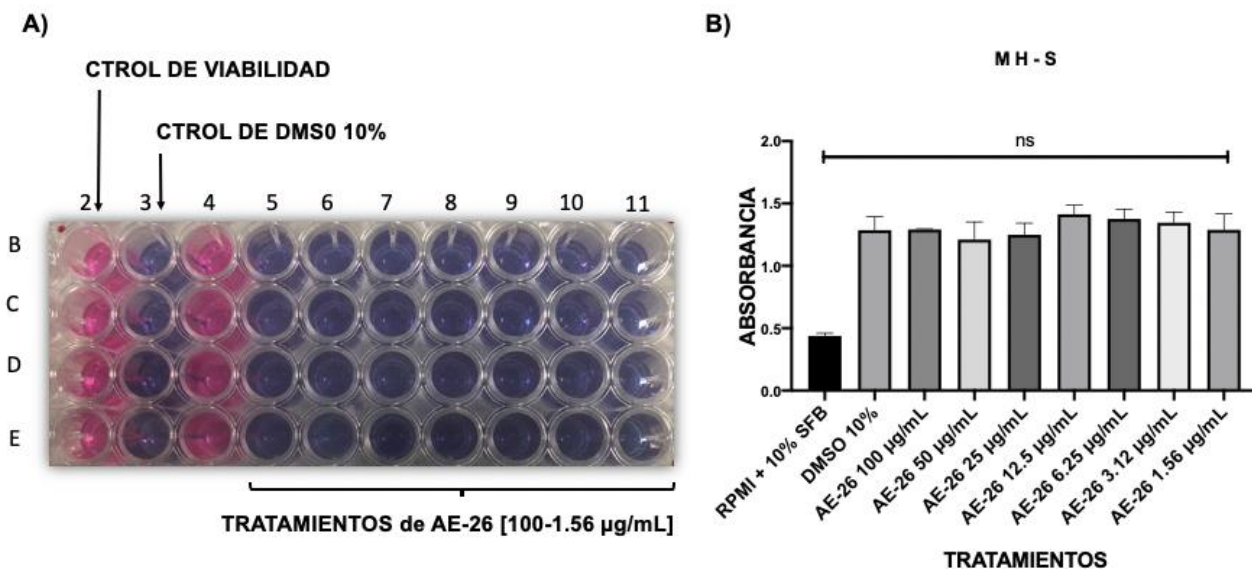


Figura 26. A) Citotoxicidad de AE-26 en células MH-S B) Comparación de tratamientos vs Absorbancia. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas $\pm$ DE. ANOVA (1 vía) **** $p < 0.0001$. Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

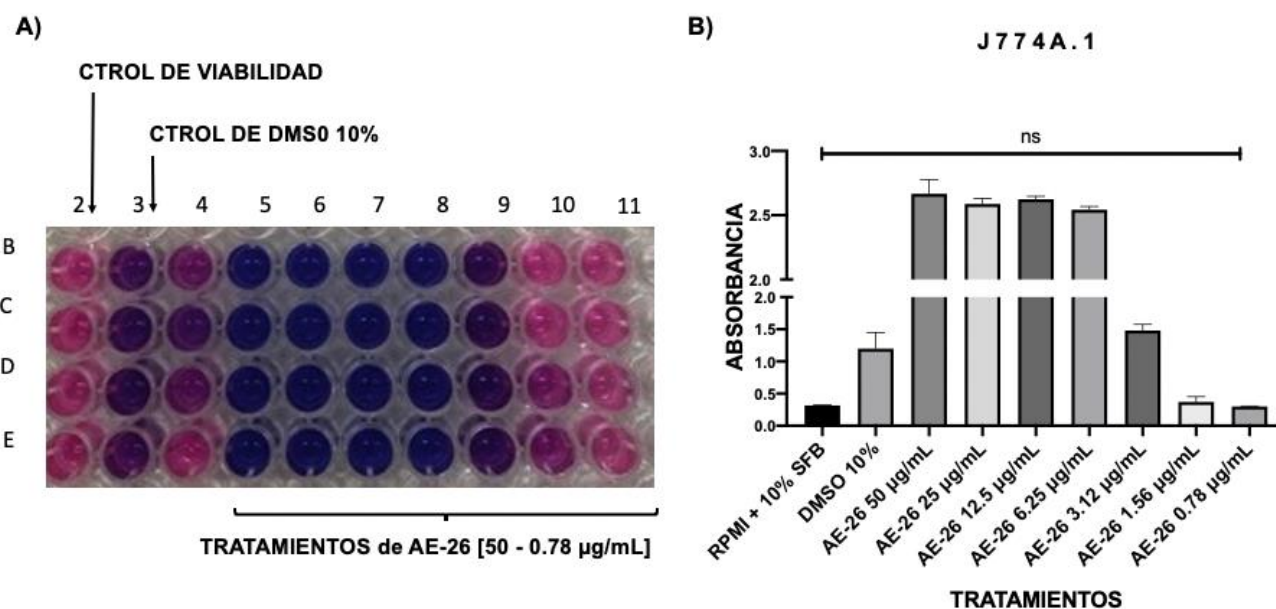


Figura 27. A) Citotoxicidad de AE-26 en células J774A.1 B) Comparación de tratamientos vs Absorbancia. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas $\pm$ DE. ANOVA (1 vía) **** $p < 0.0001$. Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

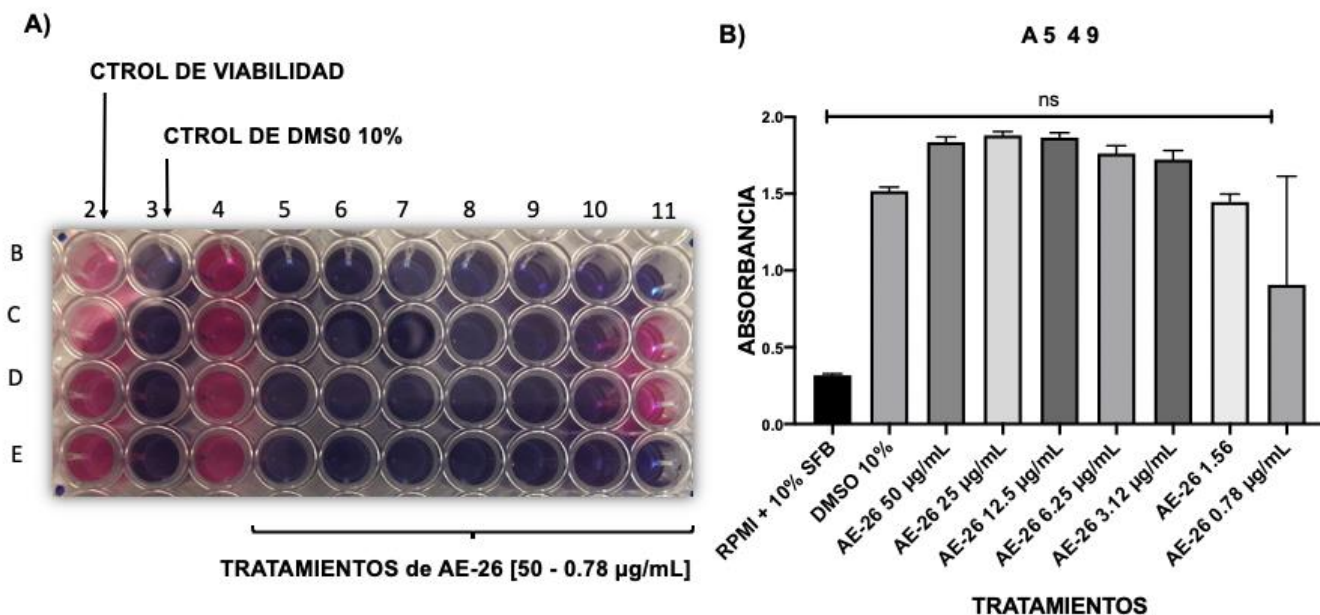


Figura 28. A) Citotoxicidad de AE-26 en células A549 B) Comparación de tratamientos vs Absorbancia. Las barras representan la media de 3 muestras paralelas $\pm$ DE. ANOVA (1 vía) **** $p < 0.0001$. Test de Tukey, se hicieron múltiples comparaciones entre todos los grupos.

Adicionalmente se tomaron fotografías bajo el microscopio de los diferentes tratamientos en la línea celular de J774A.1 para ver el estado de los macrófagos (Figura 29). Se observó que las células de los tratamientos no muestran daño aparente al estar en contacto con AE-26 en las concentraciones de 100 y 1.56 µg/mL, comparadas con el control negativo de DMSO 10%. Por otro lado, si comparamos las imágenes de los tratamientos del AE-26 con el control de viabilidad celular (RPMI+SFB 10%), estas se encuentran en una morfología diferente y puede ser porque sufran algún tipo de estrés causado por la exposición de AE-26 bajo esas concentraciones de 100 y 1.56 µg/mL.

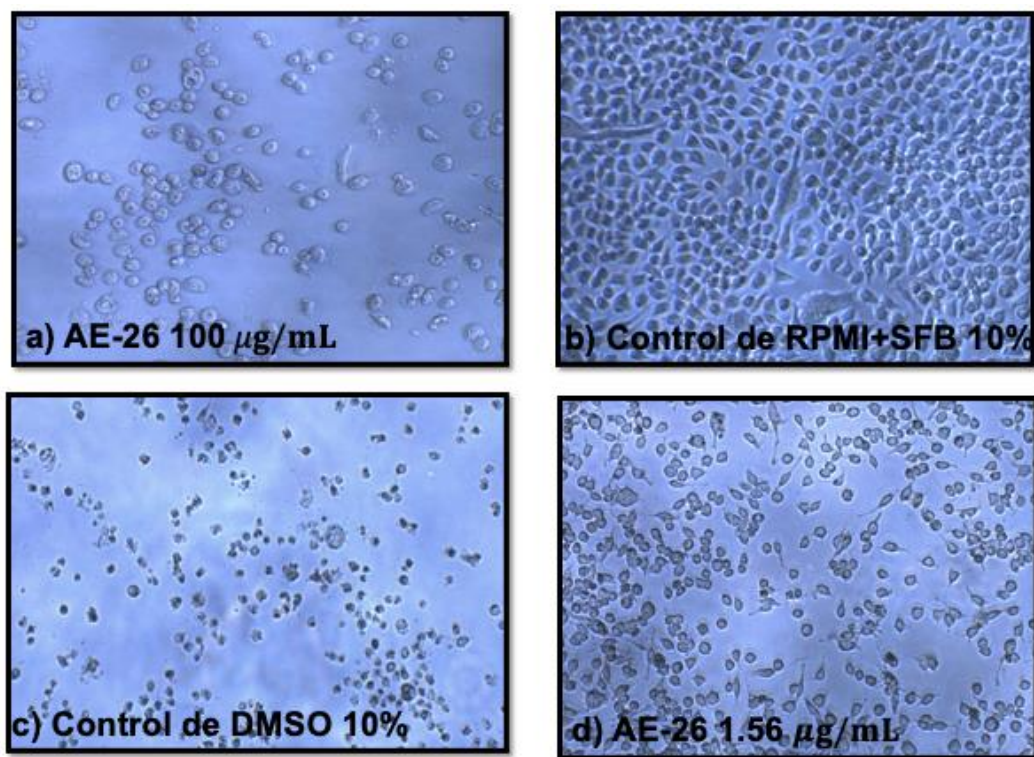


Figura 29. Imágenes tomadas en microscopio invertido del ensayo de citotoxicidad en la línea celular J774A.1. Cada imagen representa un tratamiento.

Con los resultados presentados en estas líneas celulares no se pudo determinar la CI_{50} , debido a que faltaron más concentraciones y valores para poder interpretarlos de esta manera, por ello estos resultados no se pueden comparar con los resultados obtenidos por Reyes-Melo *et al.*, 2017, donde ella probó la citotoxicidad del aminoéter 26 en células epiteliales vero obteniendo un valor de $IC_{50} = >487 \mu\text{g/mL}$ y también un índice de selectividad $SI (IC_{50}/CMI_{H37RV}) = >77.92$.

Con respecto a la información publicada del AE-26 se sabe que es un derivado semisintético con dos grupos de dimetilamina unidos a los dos grupos fenólicos

del lignano *AmDG*. En diferentes investigaciones se ha descrito que el *AmDG* posee muchas actividades biológicas entre ellas, propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, actividad antitumoral y anticancerígeno (Choi et al., 2015).

Por otro lado, en el diseño de moléculas para tratar la tuberculosis a sido de mayor relevancia diseñar fármacos con grupos funcionales similares al etambutol y SQ109, (integración de grupos aminos como: aminoéteres, aminoalcoholes, entre otros), por sus mecanismos de acción tan efectivos al tratar la TB latente contenida en los granulomas.

Del olmo *et al.*, 2009, en un estudio realizado sobre derivados lineales de aminoetanol y etilendiamina donde los eficientes contenían fragmentos relacionados con dihidroesfingosina (DSPH) y etambutol. Su diseño se basó en que la esfingosina-1-fosfato (S1P) y la forma activa se esfingosina (SPH) participa en un amplio espectro de procesos biológicos, incluida en la inmovilización de Ca^{+2} , el crecimiento celular, pero lo más relevante es que las funciones de SPH y S1P, juegan un papel importante en los endosomas que contienen a MTB conduciendo la activación del lisosoma en el macrófago infectado por la micobacteria, así mismo dando lugar a eliminar a la micobacterias (del Olmo et al., 2009).

Por otro lado Weigert *et al.*, 2019 menciona que los macrófagos son parte del sistema inmunitario y cumplen una amplia multitud de tareas, entre ellas, limpian células que han sufrido diferentes modos de muerte, intervienen en procesos

inflamatorios y participan en respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Los macrófagos sufren apoptosis (la apoptosis sirve para eliminar células infectadas del cuerpo para restaurar la homeostasis del tejido) durante una multitud de enfermedades tales como las infecciones microbianas y como en otras células el sistema SP1 juega un papel importante para la protección del macrófago contra la apoptosis, pero también puede desencadenarla (Weigert et al., 2019).

Conforme a lo que citan ambos autores se cree que en este ensayo de citotoxicidad al momento de exponer a las líneas de macrófagos con el aminoéter 26 en diferentes concentraciones, este pudo haber estimulado ese estrés observado en la figura 29 y que se puede interpretar a que el macrófago expuesto a AE-26 se indujo la apoptosis celular, debido a que el compuesto AE-26 muestra partes estructurales similares a las que menciona Del olmo *et al.*, 2019 para el diseño de sus compuestos y quizá AE-26 pueda seguir este mecanismo de acción que menciona este mismo autor sobre SP1 o también puede inducir esta muerte programada por otro tipo de mecanismo. Por otro lado, en base a lo que reporta la literatura sobre las moléculas que pueden seguir mecanismo de acción mediante la SP1 y SPH, pueden mostrar IC₅₀ o IC₉₀ elevadas como se muestra en el caso de Reyes-Melo *et al.*, 2017 que en su trabajo reporta IC₅₀=>487 µg/mL para AE-26 mientras que para el etambutol fue de IC₅₀= 390.9 µg/mL en células vero (las células vero también tienen este tipo de enzima SP1 y SPH), por lo que se sugiere que estos valores elevados pueden estar relacionados a que las moléculas con este mecanismo de acción, *in vitro* pueden llegar a inducir la

apoptosis cuando no están infectadas, pero cuando las células están infectadas *in vitro* pueden ayudar a la unión del fagolisosoma para eliminar a MTB.

Finalmente, es importante determinar adecuadamente la IC₅₀ en estas líneas celulares de macrófagos, para corroborar lo mencionado ya que sería de gran relevancia descubrir esta tendencia de AE-26.

6.5 Determinación de la actividad de sinergia de AE-26 con antifímicos de primera y segunda línea.

En este ensayo también se utilizó la técnica colorimétrica de resazurina y se determinó la CMI de AE-26 (25 µg/mL) en la parte superior de la placa, en la inferior se probó el ½ CMI del antifímico de segunda línea MOXI (0.03 µg/mL). Estos datos se llevaron a cabo en tableros de damas chinas o checkerboard (Figura 29). El objetivo fue combinar concentraciones diferentes de AE-26 (25 – 0.78) con una combinación fija de MOXI (0.03 µg/mL) para evaluar si tenían un efecto sinérgico.

Los resultados fueron analizados mediante el Fractional Concentration Index (FICI) que es un parámetro cuantitativo utilizado para determinar si existe como tal sinergia o no entre dos compuestos. Se determinó mediante una relación entre la CMI de ambos antibióticos probados en combinación y la CMI de los compuestos solos (Figura 30). Los valores obtenidos mediante la fórmula se

clasifican en 5 grupos: ≤ 0.5 sinergismo, $>0.5-1$ sinergismo parcial, $=1$ aditividad, >1 y <4 indiferencia y ≥ 4 antagonismo.

$$FICI = \frac{MIC\ AE-26\ combinación}{MIC\ AE-26\ solo} + \frac{MIC\ ANTIFÍMICO\ combinación}{MIC\ ANTIFÍMICO\ solo}$$

Figura 30. Fórmula de FICI.

❖ **El aminoéter 26 tuvo efecto indiferente en combinación con MOXI.**

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron analizados mediante la fórmula FICI como se muestra en la Figura 31. Debido a que la placa mostró un cambio de color de azul a rosa debido a la resazurina en la combinación de 25 $\mu\text{g/mL}$ de AE-26 + 0.03 $\mu\text{g/mL}$ de MOXI (Figura 32), mostró indiferencia mediante la ecuación de FICI de los compuestos en las concentraciones antes indicadas.

$$FICI = \frac{25\ \mu\text{g/mL}}{25\ \mu\text{g/mL}} + \frac{0.03\ \mu\text{g/mL}}{0.06\ \mu\text{g/mL}} = 1.5$$

Figura 31. Valores de sinergia de AE-26 en CIBIN99 analizados por FICI.

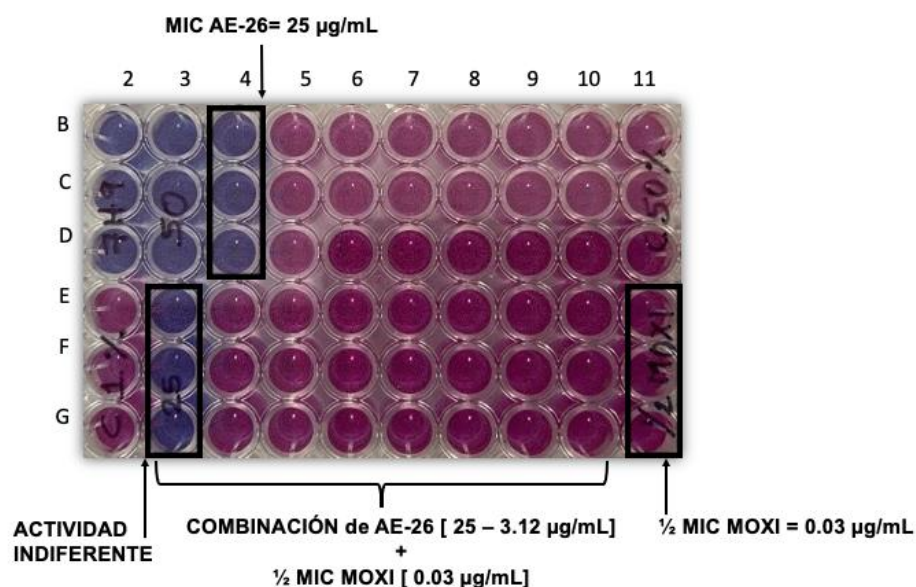


Figura 32. Ensayo de sinergia de AE-26 con MOXI en *M. tuberculosis* CIBIN99.

Una de las estrategias empleadas para combatir el alarmante fenómeno de resistencia y multi-resistencia a los antibióticos comprende a través de los tratamientos convencionales combinarlos con nuevos compuestos antimicrobianos. El efecto de combinación entre antibióticos puede ser aditivo, sinergismo, antagonismo o indiferencia. La indiferencia expresa que el efecto o actividad de una mezcla de antimicrobianos no es diferente a la actividad del agente de mayor actividad cuando actúa solo (de la Fuente-Salcido et al., 2015).

En base a las combinaciones realizadas de AE-26 más MOXI, se obtuvo que la combinación de 25 µg/mL de AE-26 + 0.03 µg/mL de MOXI mediante el análisis en la fórmula de FICI se obtuvo que fue efecto indiferente, Te Brake et al., 2016 menciona que actualmente no hay estudios recientes que mencionen porque el efecto de la moxifloxacina inhibe la farmacocinética del etambutol y actualmente

el régimen del tratamiento de primera línea contra la TB se centran en reemplazar la moxifloxacin por el etambutol, debido a que este inhibe al otro o tienen un efecto indiferente, pero por otro lado, cabe mencionar que en los resultados de sinergia el aminoéter no fue inhibido por MOXI, al contrario como resultado se obtuvo la MIC del aminoéter por lo que se sugiere que el aminoéter en combinación con MOXI podrían no afectarse directamente (Te Brake *et al.*, 2016).

Por otro lado, Bermudes *et al.*, 2001, menciona en su estudio que la combinación de MOXI con ETM para combatir a *Mycobacterium avium* fue eficaz cuando los dos se administraron en combinación, debido a que ambos compuestos solos son bacteriostáticos pero juntos mostraron ser bactericidas contra *M. avium*. Menciona que se puede sugerir a que el ETM afecto la pared celular de las micobacterias, aumentando la permeabilidad y facilitando así la captación de un segundo fármaco en este caso MOXI (Bermudez *et al.*, 2001).

Con la finalidad de tener resultados más congruentes se sugiere determinar el mecanismo de acción del aminoéter 26 y combinarlo con antifímicos que poseen mecanismos de acción diferentes para poder potencializar su efecto ya sea bacteriostático o bactericida. También sería bueno probar este ensayo en cepas de MTN como un régimen sin macrólidos, debido a que este tipo de micobacterias presentan una alta resistencia a dichos antibióticos.

7 CONCLUSIONES

- ❖ Es la primera vez que se describe la actividad antimicobacteriana del AE-26 contra las cepas de *Mycobacterium* ensayadas y la actividad citotóxica con líneas empleadas en este estudio.
- ❖ El AE-26 fue activo contra todas las cepas de *Mycobacterium*, siendo las más sensibles de *M. tuberculosis* H37Rv Stanford, SUDA 31 y 46p.
- ❖ El AE-26 muestra citotoxicidad aparente contra todas las líneas celulares ensayadas, dicha actividad es dependiente de la concentración del compuesto y se sugiere a que causa apoptosis celular en las líneas celulares.
- ❖ Se observó indiferencia en la combinación del AE-26 y moxifloxacino en la cepa CIBIN99.
- ❖ Con base a lo anterior, la hipótesis nula del presente trabajo se acepta parcialmente.

8 PERSPECTIVAS

- ❖ Determinar el mecanismo de acción de AE-26 por la técnica de microarreglos.
- ❖ Realizar una serie de derivados de AE-26 con base en un análisis *in silico* usando acoplamiento molecular con el acetil CoA transferasa.
- ❖ Realizar ensayos de sinergismo de AE-26 en combinación con fármacos de primera y segunda línea que tengan un mecanismo de acción similar o diferente (entre ellos etambutol).
- ❖ Añadir fármacos de referencia en el ensayo de citotoxicidad y usar un control de 100% de muerte.
- ❖ Determinar la CI_{50} del aminoéter en diferentes líneas celulares de macrófagos.
- ❖ Utilizar otro método para determinar citotoxicidad.
- ❖ Determinar el mecanismo de acción de AmDG y sus derivados en las líneas celulares de macrófagos.

9 REFERENCIAS

- Johansen MD, Herrmann JL, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(7):392-407. doi:10.1038/s41579-020-0331-1
- Alsteens, D., Verbelen, C., Dague, E., Raze, D., Baulard, A. R., & Dufrêne, Y. F. (2008). Organization of the mycobacterial cell wall: A nanoscale view. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 456(1), 117–125. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0386-0>
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., & Cárdenas, R. (2005). *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.002>
- Bermudez, L. E., Inderlied, C. B., Kolonoski, P., Petrofsky, M., Aralar, P., Wu, M., & Young, L. S. (2001). Activity of moxifloxacin by itself and in combination with ethambutol, rifabutin, and azithromycin in vitro and in vivo against *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), 217–222. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.217-222.2001>
- Butler, M. S., Robertson, A. A. B., & Cooper, M. A. (2014). Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Natural Product Reports*, 31(11), 1612–1661. <https://doi.org/10.1039/c4np00064a>
- Caleffi-Ferracioli, K. R., Maltempe, F. G., Siqueira, V. L. D., & Cardoso, R. F. (2013). Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. *Tuberculosis*, 93(6), 660–663. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.09.001>
- Camacho-Conora, M., Ramírez-Cabrera, M., González-Santiago, O., Garza-

- González, E., Paz Palacios, I., & Luna-Herrera, J. (2008). Activity against Drug Resistant-Tuberculosis Strains of Plants used in Mexican Traditional Medicine to treat Tuberculosis and Other Respiratory Diseases. *InterScience*. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Choi, M. S., Jeong, H. J., Kang, T. H., Shin, H. M., Oh, S. T., Choi, Y., & Jeon, S. (2015). Meso-dihydroguaiaretic acid induces apoptosis and inhibits cell migration via p38 activation and EGFR/Src/intergrin $\beta 3$ downregulation in breast cancer cells. *Life Sciences*, *141*, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.09.003>
- Clemente-Soto, A. F., Balderas-Rentería, I., Rivera, G., Segura-Cabrera, A., Garza-González, E., & Del Rayo Camacho-Corona, M. (2014). Potential mechanism of action of meso-dihydroguaiaretic acid on Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Molecules*, *19*(12), 20170–20182. <https://doi.org/10.3390/molecules191220170>
- CONABIO. (2013). *Larrea tridentata*. *Comisión Nacional Para El Conocimiento y Uso de La Biodiversidad (Larrea Tridentata)*, 263–266.
- de la Fuente-Salcido, N. M., Villarreal-Prieto, J. M., Díaz León, M. Á., & García Pérez, A. P. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, *46*(2), 7–16.
- del Olmo, E., Molina-Salinas, G. M., Escarcena, R., Alves, M., López-Pérez, J. L., Hernandez-Pando, R., Said-Fernández, S., & Feliciano, A. S. (2009). Simple dihydrosphingosine analogues with potent activity against MDR- Mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *19*(19), 5764–5768. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.147>
- Delogu, G., Sali, M., & Fadda, G. (2013). The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, *5*(1). <https://doi.org/10.4084/mjhid.2013.070>

- Escobar M., L., Rivera, A., & Aristizábal G., F. A. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*, 17(1), 67–74.
- Favela-Hernández, J. M. J., García, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., & Camacho-Corona, M. R. (2012). Antibacterial and antimycobacterial lignans and flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phytotherapy Research*, 26(12), 1957–1960. <https://doi.org/10.1002/ptr.4660>
- Gnabre, J., Bates, R., & Huang, R. C. (2015). Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5(3), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.024>
- Johansen, M. D., Herrmann, J. L., & Kremer, L. (2020). Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(7), 392–407. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>
- Luna-Herrera, J., Costa, M. C., González, H. G., Rodrigues, A. I., & Castilho, P. C. (2007). Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(3), 548–552. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl523>
- Máiz Carro, L., Barbero Herranz, E., & Nieto Royo, R. (2018). Respiratory infections due to nontuberculous mycobacterias. *Medicina Clinica*, 150(5), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2017.07.010>
- Mancheno-Valencia, M. A., Arenas-Guzmán, R., Carrillo-Casas, E. M., Fernández-Martínez, R., Toussaint-Caire, S., Hernández-Castro, R., Galván-Martínez, I., & Hajar-Serviansky, T. (2015). La infección por micobacterias no tuberculosas, una visión desde la perspectiva dermatológica. *Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana*, 43, S6–S13.
- Migliori, G. B., Centis, R., D'Ambrosio, L., Spanevello, A., Borroni, E., Cirillo, D.

- M., & Sotgiu, G. (2012). Totally drug-resistant and extremely drug-resistant tuberculosis: The same disease? *Clinical Infectious Diseases*, 54(9), 1379–1380. <https://doi.org/10.1093/cid/cis128>
- Nguta, J. M., Appiah-Opong, R., Nyarko, A. K., Yeboah-Manu, D., & Addo, P. G. A. (2015). Current perspectives in drug discovery against tuberculosis from natural products. *International Journal of Mycobacteriology*, 4(3), 165–183. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2015.05.004>
- Reyes-Melo, K., García, A., Romo-Mancillas, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., Miranda, L. D., Vargas-Villarreal, J., Favela-Hernández, J. M. J., & Camacho-Corona, M. del R. (2017). meso-Dihydroguaiaretic acid derivatives with antibacterial and antimycobacterial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(20), 5247–5259. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.047>
- Sánchez-Pérez, J. H. (2021). Tuberculosis in Mexico in times of COVID-19: some reflections. *Enf Emerg*, 20(3), 160–165.
- Te Brake, L. H. M., Van Den Heuvel, J. J. M. W., Buaben, A. O., Van Crevel, R., Bilos, A., Russel, F. G., Aarnoutse, R. E., & Koenderink, J. B. (2016). Moxifloxacin is a potent in vitro inhibitor of OCT- and MATE-mediated transport of metformin and ethambutol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7105–7114. <https://doi.org/10.1128/AAC.01471-16>
- Weigert, A., Olesch, C., & Brüne, B. (2019). Sphingosine-1-Phosphate and Macrophage Biology-How the Sphinx Tames the Big Eater. *Frontiers in Immunology*, 10(July), 1706. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01706>
- World Health Organization. (2021). *Global tuberculosis Report*.
- Zatarain-Barrón, Z. L., Ramos-Espinosa, O., Marquina-Castillo, B., Barrios-Payán, J., Cornejo-Granados, F., Maya-Lucas, O., López-Leal, G., Molina-Romero, C., Anthony, R. M., Ochoa-Leyva, A., De La Rosa-Velázquez, I.

A., Rebollar-Vega, R. G., Warren, R. M., Mata-Espinosa, D. A., Hernández-Pando, R., & van Soolingen, D. (2020). Evidence for the Effect of Vaccination on Host-Pathogen Interactions in a Murine Model of Pulmonary Tuberculosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Immunology*, 11(May). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00930>

10 DIFUSIÓN



