



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

*El Efecto Protector del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) en Hígado y Pulmón
Contra la Toxicidad Inducida por Dosis Elevadas de Antifímicos*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

BIÓL. EXP. OSCAR BELLO MONROY

CODIRECTORES:

DR. LUIS ENRIQUE GÓMEZ QUIROZ
DR. ROGELIO ENRIQUE HERNÁNDEZ PANDO

ASESORA:

DRA. MA. CONCEPCIÓN GUTÉRREZ RUIZ

MÉXICO, D.F.

25 DE AGOSTO DE 2014

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: **283859**. Agradezco la beca otorgada por CONACyT durante la Maestría.

La investigación presentada en esta tesis se desarrolló en los laboratorios de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y en el Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” dirigido por el Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando y contó con financiamiento del CONACyT con número de proyecto 131707 siendo responsable técnico el Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, así como de PROMEP 913026 14612111 y de la propia Universidad.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00125

Metkuz: F123802009

EL EFECTO PROTECTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF) EN HIGADO Y PULMON CONTRA LA TOXICIDAD INDUCIDA POR DOSIS ELEVADAS DE ANTIFIMICOS.

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 25 del mes de agosto del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ
DRA. VERONICA SOUZA ARROYO
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA
DRA. DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA



OSCAR BELLO MONROY
ALUMNO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: OSCAR BELLO MONROY

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

VOCAL

DRA. VERONICA SOUZA ARROYO

VOCAL

DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

SECRETARIA

DRA. DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "El Efecto Protector del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF) en Hígado y Pulmón Contra la Toxicidad Inducida por Dosis Elevadas de Antifímicos" que presentó Oscar Bello Monroy.

El día 25 de Agosto del año 2014

Presidente



Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz.
Profesora Titular de Tiempo Completo,
Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS,
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
Correo electrónico: mcgr@xanum.uam.mx

Secretario



Dra. Dulce Adriana Mata Espinosa.
Investigadora en Ciencias Médicas C.
Departamento de Patología, Sección de Patología Experimental,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".
Correo electrónico: dulmat@yahoo.com.mx

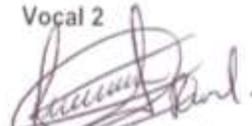
Vocal 1



Dra. Verónica Souza Arroyo.
Profesora Titular de Tiempo Completo,
Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS,
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
Correo electrónico: veso@xanum.uam.mx

Vocal 2

P.A.



Dr. Jorge Alberto Barrios Payán.
Investigador en Ciencias Médicas C.
Departamento de Patología, Sección de Patología Experimental,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".
Correo electrónico: gcjbp77@yahoo.com.mx

Miembros del comité tutorial.

Co-Director Interno

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.
Profesor Titular de Tiempo Completo.
Departamento de Ciencias de la Salud. DCBS.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
Correo electrónico: legg@xanum.uam.mx

Co-Director Externo

Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando.
Investigador en Ciencias Médicas F.
Jefe de la Sección de Patología Experimental. Departamento de Patología.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".
Correo electrónico: rhdezpando@hotmail.com

Asesora

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz.
Profesora Titular de Tiempo Completo.
Departamento de Ciencias de la Salud. DCBS.
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
Correo electrónico: mcgr@xanum.uam.mx

Agradecimientos

- ❖ A Dios. Por dame valor para enfrentar mis problemas y darme cuenta de que yo puedo resolverlos. Por enseñarme que por mis acciones seré medido y cuando realice plenamente esta realidad yo me liberare del miedo de ayer, de hoy y de todas las mañanas y me liberare también del falso orgullo, celos, ambición y envidia.
- ❖ A la UAM por la oportunidad brindada de incorporarme a su posgrado y formarme como investigador que en un futuro ayude a la sociedad.
- ❖ Al Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando. Por el conocimiento transmitido y por brindarme la confianza de trabajar plenamente sin ninguna atadura.
- ❖ A la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz. Por la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y a su conocimiento compartido.
- ❖ Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz. Por brindarme la oportunidad de crecer como estudiante y enseñarme a ser un buen investigador.
- ❖ A los Doctores: Dulce Mata, Jorge Barrios y Brenda Marquina por lo aprendido en su asesoría.
- ❖ A las Doctoras: Verónica Souza, Roxana Miranda, Leticia Bucio por la enseñanza de cada día y en cada seminario.
- ❖ A mis amigos Brenda Ramos Robles y Uriel Juárez Hernández, por el apoyo brindado en todo momento desinteresadamente.
- ❖ A los miembros del laboratorio de Patología Experimental del INCMNSZ.
- ❖ A mis amigos del laboratorio de Fisiología Celular de la UAM Iztapalapa. Patricia, Cristina, Arturo, Nelly, Elizabeth, Mayra, Soraya, Benjamín, Natalia y Denisse.

Dedicatorias

Dedico este trabajo:

- ❖ A mi hermana Marisol Bello Monroy quien desde el 2010 se ha convertido en el ángel que cuida de toda mi familia. Por enseñarme que si quiero disfrutar del arcoíris antes debo sufrir la tormenta.
- ❖ A mis Padres: José Bello Escamilla y María Alicia Monroy Luz. Por ser las personas más apreciadas que me dio el creador. Les doy las gracias porque con mucho amor, me acogieron, educaron y alimentaron. Son el modelo que debo seguir. Espero algún día poder recompensar lo que han hecho por mí.
- ❖ A mis pequeños: Leslie Aidee Romero Bello y Ángel Giovanni Bello Monroy. Los únicos que logran poner una sonrisa en mi rostro tan solo con verlos. Quienes me dieron el papel de padre sin estar listo para debutar en ello. Gracias por considerarme de esa manera. Los AMO.
- ❖ A mis hermanos José Luis Bello Monroy y Jazmín Bello Monroy con quienes crecí, compartí y viví todas las etapas de mi vida, aprendiendo con ellos día a día, les agradezco todo lo aprendido.
- ❖ A mi sobrina Giovanna Bello Velázquez por la sonrisa que le regala a este humilde servidor día a día.
- ❖ A toda mi familia quienes siempre han apoyado este sueño.
- ❖ A todos aquellos anónimos que se han cruzado en mi camino y aportaron algo en todos los aspectos de mi vida.

Índice

Índice.....	I
Índice de Figuras.....	III
Índice de Tablas.....	IV
Abreviaturas	V
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
Introducción.....	1
Tuberculosis.....	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
Incidencia.....	2
Respuesta inmune en tuberculosis.....	4
Tratamiento de Tb fármaco – sensible.....	6
Tratamiento de Tb MDR.....	7
Rifampicina.....	7
Isoniazida.....	8
Factor de crecimiento de hepatocitos.....	10
c-Met.....	12
Antecedentes	14
Modelo de Tb pulmonar progresiva.....	14
Hígado.....	16
Pulmón.....	17
Justificación.....	19
Hipótesis.....	20
Objetivo General	20

Objetivos Particulares	20
Material y Métodos	21
Crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
Recuperación de micobacterias a partir de cultivos frescos.	21
Conteo de micobacterias para infección de ratones.	22
Modelo de Tb pulmonar progresiva.	22
Tratamiento.....	23
Obtención y preservación del tejido hepático y pulmonar.....	24
Conteo de Unidades Formadoras de Colonias.	25
Detección de especies reactivas de oxígeno.....	25
Análisis Estadístico	25
Resultados	26
Sobrevida, carga bacilar, histopatología y determinación de anión superóxido en ratones BALB/c sanos e infectados y tratados con antifímicos vía Ig.	26
Sobrevida, carga bacilar, histopatología y determinación de anión superóxido en ratones BALB/c sanos e infectados y tratados con antifímicos vía It.	35
Discusión.....	44
Conclusiones.....	48
Bibliografía	49

Índice de Figuras

Figura 1.	Tasas de incidencia de tuberculosis a nivel mundial3
Figura 2.	Biotransformación de Isoniazida10
Figura 3.	Procesamiento y estructura del HGF11
Figura 4.	Estructura del receptor c-Met12
Figura 5.	Principales rutas de señalización inducidas por HGF/c-Met13
Figura 6.	Características fundamentales de la Tb pulmonar progresiva en ratones BALB/c infectados por vía It con micobacterias vivas y virulentas (cepa H37 Rv)15
Figura 7.	Determinación de la carga bacilar en homogenizados pulmonares de ratones infectados y tratados con antifímicos por vía Ig27
Figura 8.	Imágenes histológicas representativas de pulmón tomadas con el objetivo 20x29
Figura 9.	Imágenes representativas de la determinación de anión superóxido <i>in situ</i> en criocortes frescos de pulmón30
Figura 10.	Imágenes histológicas representativas de hígado tomadas con el objetivo 40x32
Figura 11.	Imágenes representativas de la determinación de anión superóxido <i>in situ</i> en criocortes frescos de hígado.34
Figura 12.	Determinación de la carga bacilar en homogenizados pulmonares de ratones infectados y tratados con antifímicos por vía It36
Figura 13.	Imágenes histológicas representativas de pulmón tomadas con el objetivo 20x38

Figura 14.	Imágenes representativas de la determinación de anión superóxido <i>in situ</i> en criocortes frescos de pulmón39
Figura 15.	Imágenes histológicas representativas de hígado tomadas con el objetivo 40x41
Figura 16.	Imágenes representativas de la determinación de anión superóxido <i>in situ</i> en criocortes frescos de hígado43

Índice de Tablas.

Tabla 1.	Esquema de administración de antifímicos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de la tuberculosis.6
Tabla 2.	Distribución de los grupos experimentales y tratamientos empleados durante el experimento.23

Abreviaturas

aa	Aminoácidos.
ARE	Elementos de respuesta antioxidante.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATDH	Hepatotoxicidad inducida por fármacos antituberculosos.
BALB/c	Cepa de ratón de la especie <i>Mus musculus</i> utilizada en investigación científica.
c-Met	Factor de transición celular epitelio-mesénquima.
CO ₂	Dióxido de carbono.
CPA	Células presentadoras de antígenos.
CYP450	Citocromo P450.
DHE	Dihidroetidio.
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte.
DOTS	Terapia acortada estrictamente supervisada.
ACP	Proteína Acarreadora de acilos.
FLIP	Proteína inhibitoria parecida a FLICE.
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos.
IFN- γ	Interferón gamma.
Ig	Intragástrica.
IL	Interleucina.

INH	Isoniazida.
Inha	Enoil ACP-reductasa.
iNOS	Sintetasa de óxido nítrico inducible.
Ip	Intraperitoneal.
It	Intratraqueal.
kDa	Kilodaltones.
MDR	Multifarmaco-resistente.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
NAT2	N-acetil transferasa 2.
NF-κB	Factor Nuclear kappa B.
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PYR	Pirazinamida.
RIF	Rifampicina.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
STAT3	Transductor de la señal y activador de la transcripción 3.
SSE	Solución salina estéril.
T CD4 ⁺	Linfocitos T CD4.

T CD8 ⁺	Linfocitos T CD8.
Tb	Tuberculosis.
Tb MDR	Tuberculosis Multifarmaco-resistente.
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta.
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1.
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.
Tx	Tratamiento.
UFC's	Unidades formadoras de colonias.
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana.

Resumen

Dos millones de personas mueren anualmente a causa de la tuberculosis (Tb), una enfermedad infecciosa tratable y curable. Entre los efectos adversos del tratamiento antituberculoso se encuentran: reacciones de la piel, desórdenes neurológicos y el más común hepatotoxicidad inducida por los fármacos antituberculosos (ATDH), que causan sustancial morbilidad y mortalidad, contribuyendo a falla en el tratamiento y recaída de los pacientes. Algunos investigadores han sugerido que el incremento en las dosis de los fármacos convencionales eliminaran bacterias multifarmaco-resistentes (MDR) con el riesgo de desarrollar daño hepático; es por ello que se deben buscar nuevas opciones terapéuticas que brinden hepatoprotección sin comprometer los efectos contra la micobacteria. En este trabajo se utilizaron ratones BALB/c sanos e infectados con una cepa MDR de *Mycobacterium tuberculosis* para someterlos a tratamiento con Isoniazida y Rifampicina a dosis altas tres meses después de haber sido infectados utilizando la vía intragástrica (Ig) o la vía intratraqueal (It) para la administración de los mismos, y en presencia o no del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Posterior a esto se sacrificaron a uno y dos meses de tratamiento, obteniendo muestras para: conteo de unidades formadoras de colonias (pulmón), determinación de anión superóxido *in situ* y análisis histológico (hígado y pulmón). Los resultados muestran que HGF disminuye la carga bacilar participando en el control de la infección aumentando la producción de anión superóxido para una eficiente destrucción micobacteriana que correlaciona con daño pulmonar mínimo y al mismo tiempo juega un papel similar en el hígado disminuyendo el daño hepatocelular provocado por el estrés oxidante producto de la biotransformación de los antifímicos restringiendo la producción de anión superóxido y limitando la esteatosis y muerte celular. La vía It mostró mejores resultados que la Ig. En conclusión el HGF se presenta como un importante agente terapéutico al brindar protección a nivel hepático y pulmonar frente a daño oxidante regulando el estado redox celular en la tuberculosis pulmonar progresiva.

Abstract

Each year 2 million people die due to tuberculosis (Tb), a treatable infection disease with antibiotic drugs. However, this antituberculosis drugs usually cause side effects such as skin reactions and neurological disorders, but definitely liver hepatotoxicity is the most common effect that induce an increment in mortality and morbidity, which contributes to failure on the treatment and relapse of the disease. Some researchers have proposed to increase the doses of the antituberculosis drugs, because of the rise in the multidrug resistant strains of the bacilli, but this can be directly associated to the increase in liver failure. Thus, it is important the search of new therapeutic options that can protect the liver against the toxicity of drugs without compromise of the bacteria clearance. In this preclinical work, we used BALB/c strain mice that were infected with a multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. After, the mice have developed pulmonary progressive tuberculosis are administered with high doses of rifampicin and isoniazide, using either intratraqueal or intragavage administration, and co-treated or not with HGF. Then mice were scarified at 30 and 60 days. Colony formation units in lungs, and routing histology studies were performed as well as ROS content were determined in lungs and liver. Results show that HGF decreases de bacteria content in lungs increasing ROS, suggesting an improvement in drugs treatment induced by the growth factor. Liver and lung damage, due to toxicity of drugs was decreased significantly, as well as the steatosis, one of the hallmarks in drug-induced liver damage. In addition, the intratraqueal administration of the drugs exhibited the best results for treatment. In conclusion HGF could be considered a good adjuvant in the treatment of tuberculosis due to its effect in liver and pulmonary protection possibly because can manage the oxidative stress.

Introducción

Tuberculosis.

La Tb es una enfermedad infecto-contagiosa pulmonar de progresión lenta cuyo agente causal son bacterias del género *Mycobacterium* que afectan a un amplio espectro de hospederos. La Tb humana es causada principalmente por el bacilo facultativo intracelular *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), el cual puede causar tanto enfermedad progresiva, como infección latente asintomática (Glaziou *et al.*, 2009). La transmisión de dicho microorganismo ocurre de persona a persona mediante aerosoles producidos al toser, estornudar o hablar. El inoculo necesario para producir infección en un individuo es realmente pequeño, incluso se habla de un bacilo único (Kaufmann, 2001).

Mycobacterium tuberculosis.

En 1882, Roberto Koch identificó el agente causal de la Tb. Gracias a este descubrimiento, el médico alemán fue acreedor del premio Nobel en 1905; sin embargo no fue sino hasta 1944 que se documentó la recuperación total de un paciente con Tb, al ser tratado con estreptomycin, el primer agente antifímico que logró la recuperación de más de un 90% de los casos documentados, sin embargo, se registró un número significativo de pacientes que presentó de nuevo el cuadro sintomático. Se realizaron cultivos con muestras de saliva de estos pacientes detectando cepas emergentes resistentes a la estreptomycin (Keshavjee and Farmer).

El género *Mycobacterium* incluye bacilos rectos o ligeramente curvos que miden entre 0.2 a 0.6 μm por 1 a 10 μm , no flagelados. Presentan un alto contenido de guanina y citosina en su ADN, así como un alto contenido de lípidos en su pared celular, los cuales, contribuyen a la alta hidrofobicidad, a la resistencia a daños físicos, así como a la virulencia de la micobacteria (Gorocica, 2005).

Mtb es un aerobio estricto y prefiere sitios con alta concentración de oxígeno, su pared celular es única, compuesta de ácidos micólicos que forman una membrana cerosa y gruesa alrededor de la micobacteria, confiriéndole protección ante la desecación por largos periodos de tiempo, así como a la entrada de fármacos, debido a la disminución de la permeabilidad celular, lo que obliga un tratamiento costoso y de larga duración (Barry et al., 1998). En resumen, la peculiar conformación de la pared celular más la habilidad de este bacilo para catabolizar los ácidos grasos, son adaptaciones indispensables para el éxito de esta bacteria al infectar a su hospedero.

Incidencia

La Tb es la enfermedad infecciosa que más ha afectado a la humanidad a lo largo de su historia, siendo aún hoy en día una importante causa de enfermedad y muerte, sobre todo en los estratos más pobres de la sociedad (OMS, 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que la Tb es la segunda causa de muerte por un agente infeccioso después del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). De acuerdo con la OMS, en 2012 se notificaron 8.6 millones de nuevos casos de Tb, registrándose 1.3 millones de muertes por esta infección, de las cuales más de 300 mil personas eran VIH positivas. África y Asia son los continentes con las tasas más altas de incidencia y mortalidad, mientras que India y China en conjunto tienen casi el 40% de los casos mundiales de Tb. El Mediterráneo Oriental, Europa y América son las regiones con menor incidencia y mortalidad por Tb (**Figura 1**). Según el reporte de 2013, México se encuentra entre los países con una baja incidencia de Tb, reportándose 26 casos por cada 100,000 habitantes y una mortalidad casi 20 veces menor que el promedio mundial. Sin embargo, las bajas incidencias de Tb en nuestro país se asocian a un alto subregistro, un déficit en el pronóstico y además, muchas personas conviven con enfermos, de los cuales no todos están en tratamiento. Por lo anterior la OMS estima, con base en datos estadísticos, que en México existen tres veces más

casos de los que se reportan anualmente en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de la Secretaría de Salud (OMS, 2013; SINAVE, 2013).

Asociado a esto el número de casos de Tb MDR está incrementando, globalmente se estima que el 3.7% de los nuevos casos y 20% de los casos previamente tratados presentan infección por estas cepas (OMS, 2013), los factores que contribuyen al incremento de estos números son: la pobreza, el hacinamiento, la desnutrición y la infección con VIH.

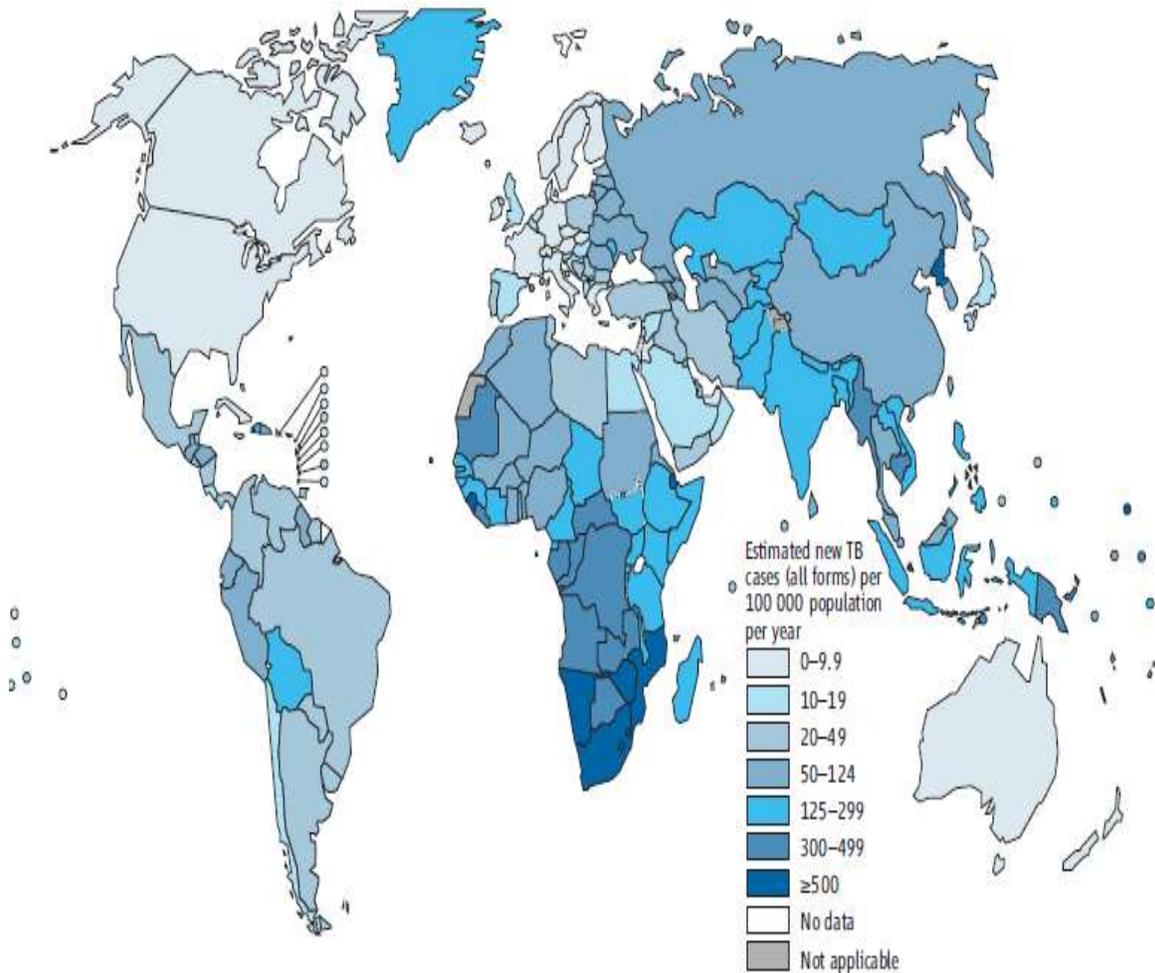


Figura 1. Tasas de incidencia de tuberculosis a nivel mundial. Casos nuevos de Tb estimados en el año 2012 en todas sus formas por cada 100 000 habitantes. Tomado de (OMS, 2013).

Respuesta inmune en tuberculosis.

Una persona con la enfermedad pulmonar activa expelle gran cantidad de bacilos al toser o estornudar. Las pequeñas gotas al ser inhaladas penetran hasta los alvéolos pulmonares, donde el microorganismo se establece y multiplica (Glaziou *et al.*, 2009). Debido a que el agente causal penetra al organismo casi de forma exclusiva por la vía respiratoria, la Tb afecta generalmente a los pulmones; sin embargo, en una proporción variable, se puede producir una diseminación hematogena, que dará lugar a una Tb extrapulmonar. La Tb pulmonar es la principal forma de la enfermedad debido a que Mtb entra al organismo a través del tracto respiratorio (Ferguson and Schlesinger, 2000; Ganz, 2002; Knowles and Boucher, 2002; van Crevel *et al.*, 2002).

La naturaleza ha provisto al espacio alveolar con mecanismos innatos de defensa que involucran a los macrófagos alveolares, las células dendríticas, los neutrófilos, los linfocitos B, las células epiteliales, las células alveolares tipo I y II y factores solubles como la mucina, lisozima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A2, inmunoglobulinas y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis del pulmón y la eliminación de partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio (Ferguson and Schlesinger, 2000; Ganz, 2002; Knowles and Boucher, 2002; van Crevel *et al.*, 2002).

La llegada de Mtb hasta el espacio alveolar significa que ha superado la barrera mucociliar del tracto respiratorio; sin embargo, ahora se enfrenta a los macrófagos que constituyen la primera línea de defensa y este primer contacto es crucial ya que define el control de la infección o el desarrollo de la enfermedad. La fagocitosis del bacilo es llevada a cabo principalmente por los macrófagos a través de diversos mecanismos y es favorecida por el surfactante A producido por las células epiteliales alveolares de tipo II ya que aumentan la interacción entre la micobacteria y los macrófagos (Ferguson and Schlesinger, 2000).

Durante la fagocitosis, la micobacteria es encapsulada en un fagosoma y destruida por enzimas lisosomales al formarse el fagolisosoma y algunos de sus antígenos son procesados y presentados a linfocitos T CD4+ y CD8+ por lo que los

macrófagos además de ser células efectoras funcionan como células presentadoras de antígenos (CPA) y pueden definir el curso de la respuesta inmune adaptativa (Th1 o Th2), que se basa en el reconocimiento específico entre diferentes células y la secreción de factores solubles como las citocinas y quimiocinas. Este tipo de respuesta es específica y su desarrollo depende en gran medida de la eficiencia de la respuesta inmune innata, ya que si los macrófagos no son capaces de controlar la infección se favorece una respuesta inmune humoral (Th2), que no es protectora en Tb y es caracterizada por la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), las cuales antagonizan la respuesta inmune celular de tipo Th1, eficiente en infecciones causadas por microorganismos intracelulares y caracterizada por la producción de citocinas como interferón gamma (IFN- γ), IL-2, IL-12, IL-18 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Flynn and Chan, 2001; Schluger, 2001).

Tratamiento de Tb fármaco – sensible.

El tratamiento (Tx) contra Mtb es diferente al utilizado contra otros patógenos bacterianos debido al largo tiempo de replicación, a su constitución estructural, y a su capacidad de permanecer en estado de latencia. La quimioterapia consiste, actualmente en la Terapia Acortada Estrictamente Supervisada (DOTS por sus siglas en inglés) en la que se administra una terapia combinada de cuatro antifímicos de primera línea: Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Pirazinamida (PYR) y Etambutol (**Tabla 1**). Son administrados diario de lunes a sábado por 10 semanas hasta completar 60 dosis: RIF (600 mg), INH (300 mg), PYR (1,500-2000 mg) y Etambutol (1,200 mg) que constituye la fase intensiva del Tx. La segunda fase del Tx (de sostén) consiste en la administración de una dosis 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) durante 15 semanas hasta completar 45 dosis de INH (800 mg) y RIF (600 mg); buscando eliminar los bacilos remanentes en estado durmiente o con baja actividad replicativa (Barrios-Payan et al., ; Clínica, 2009; Suk and Kim)

Antifímicos (Presentación)	Dosis Diaria			Reacciones Adversas
	Niños mg/Kg de peso	Adultos mg/Kg de peso	Dosis Máxima por día	
Isoniazida (Comp. 100mg)	5 – 10	5 – 10	300	Neuropatía periférica hepática
Rifampicina (Comp. 300mg Jarabe 100mg/5ml)	15	10	600	Hepatitis Hipersensibilidad
Pirazinamida (Comp. 500 mg)	25 – 30	20 – 30	1.5 – 2 gr	Hepatitis
Estreptomina (Ampolletas 1gr)	25 – 30	15	1 gr	Hipoacusia Vértigo Dermatosis
Etambutol (Comp. 400 mg)	20 – 30	15 – 25	1.2 gr	Alteraciones Visuales

Tabla 1. Esquema de administración de antifímicos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de la tuberculosis. NOM-066-SSA2-1993 “Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud”. Tomado de (Clínica, 2009).

Por lo anterior, se debe determinar si una cepa en estudio es resistente a RIF, a INH o a ambos antibióticos, ya que esta situación determinará en gran medida el éxito del Tx, la complejidad y su costo (Suk and Kim, 2012).

Tratamiento de Tb MDR.

En estos casos el esquema de Tx se basa en el criterio del médico tratante, sin embargo la OMS recomienda que se usen 4 antifímicos en conjunto, los cuales pueden incluir un agente de primera línea, un aminoglucósido, una fluoroquinolona, y por último algún fármaco oral que actúe como bacteriostático de segunda línea (OMS, 2013).

Rifampicina.

La RIF es un antibiótico complejo macrocíclico, derivado semisintético de las rifamicinas, con un amplio espectro antibacterial, que requiere de concentraciones relativamente bajas ($0.01\mu\text{/ml}$) en el Tx contra micobacterias y microorganismos Gram-positivos, actúa inhibiendo la síntesis de ARN mensajero, inhibiendo la subunidad β de la ARN polimerasa de procariotas, interactúa directamente con la ARN polimerasa bacteriana sin interferir con la actividad de su homóloga en mamíferos (1983; Sande, 1983; Suk and Kim, 2012; Yee et al., 2003).

La RIF puede inducir disfunción hepatocelular, lo que se resuelve suspendiendo el Tx, sin embargo, esto representa un riesgo de recaída en los pacientes y el surgimiento de cepas MDR. Se desconoce el mecanismo mediante el cual la RIF causa hepatotoxicidad, debido a que no hay evidencia de la participación de algún producto tóxico secundario. Este fármaco es un potente inductor de los citocromos P450 (CYP450) en el hígado y en el intestino, por lo que se incrementa la biotransformación de muchos otros compuestos. El uso combinado de la RIF e INH ha sido señalado como un factor de alto riesgo para desarrollar

hepatotóxicidad, debido a la inducción de la hidrolasa de la INH, que incrementa potencialmente la producción de hidracina, lo que explica la toxicidad al combinar estos dos fármacos (Chen et al.).

La resistencia a este fármaco esta mediada principalmente por mutaciones agrupadas en una región del gen *rpoB* el cual codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa. Es un fármaco básico en el esquema actual de Tx y su introducción permitió el acortamiento de la duración del mismo. Su toxicidad está asociada a fallas en la excreción de bilirrubina y en la aparición de colestasis (1983; Sande, 1983; Suk and Kim, 2012; Yee et al., 2003).

Isoniazida.

Es el antifímico más ampliamente utilizado, se activa por la *catalasa-peróxidasa* de procariotas y actúa bloqueando a *InhA*, una *enoil-ACP reductasa* involucrada en la síntesis de ácidos micólicos, los cuales son esenciales de la pared micobacteriana. Es un pro-fármaco altamente específico para las micobacterias y posee actividad bactericida contra los bacilos intracelulares como extracelulares en fase de crecimiento, penetra al interior de la célula bacteriana por difusión pasiva, proceso facilitado al ser una molécula neutra a pH fisiológico y tener tamaño pequeño, además de la presencia de una porción no polar (el anillo de piridina). Su presencia ocasiona alteraciones en la morfología del bacilo, que comienza en los polos y se extiende a su totalidad, simultáneamente se acumulan en el citoplasma ácidos grasos saturados de 24 a 26 carbonos y se inhibe la síntesis de ácidos grasos mayores, estos efectos confirman que la INH inhibe la síntesis de ácidos micólicos, y modifica la permeabilidad y estructura de la pared celular. (Suk and Kim, 2012; Yee *et al.*, 2003)

La ruta metabólica principal para la biotransformación de la INH es la acetilación mediante la enzima hepática N-acetiltransferasa 2 (NAT2) (Tostmann et al., 2008) produciendo acetil-INH y después, hidrolizarla en acetil hidracina y ácido isonicotínico. La acetil hidracina principalmente es hidrolizada en hidracina o acetilada para la formación de diacetil hidracina, sin embargo una pequeña cantidad de INH es hidrolizada directamente formando ácido isonicotínico e hidracina (**Figura 2**); esta vía de biotransformación alterna, es de vital importancia, dado que, la incidencia de hepatitis inducida por antifímicos, es mayor en aquellos individuos que presentan un genotipo de acetilación lento. La toxicidad de la INH es debida a la producción de metabolitos tóxicos como la acetil hidracina, que actúa como agente acetilador de macromoléculas de los hepatocitos (Suk and Kim, 2012; Yee *et al.*, 2003) y la hidracina como un agente causante de daño hepatocelular (Keshavjee and Farmer).

La oxidación es la ruta principal para la biotransformación de la hidracina, siendo los posibles intermediarios el nitrógeno y la diacina, un potente agente reductor. Estudios realizados en microsomas de hígado de rata señalan a los radicales de nitrógeno y oxígeno, como parte fundamental de la etiología de la hepatotoxicidad (Tostmann et al., 2008; Walubo et al., 1998). La toxicidad inducida por la biotransformación de la INH también está relacionada con el CYP450 2E1 (CYP2E1) cuando a partir de acetilhidracina se genera hidracina (**Figura 2**), por lo anterior, el CYP2E1 es una de las enzimas más importante en la activación de intermediarios procarcinógenos y hepatotóxicos como la hidracina (Huang et al., 2003).

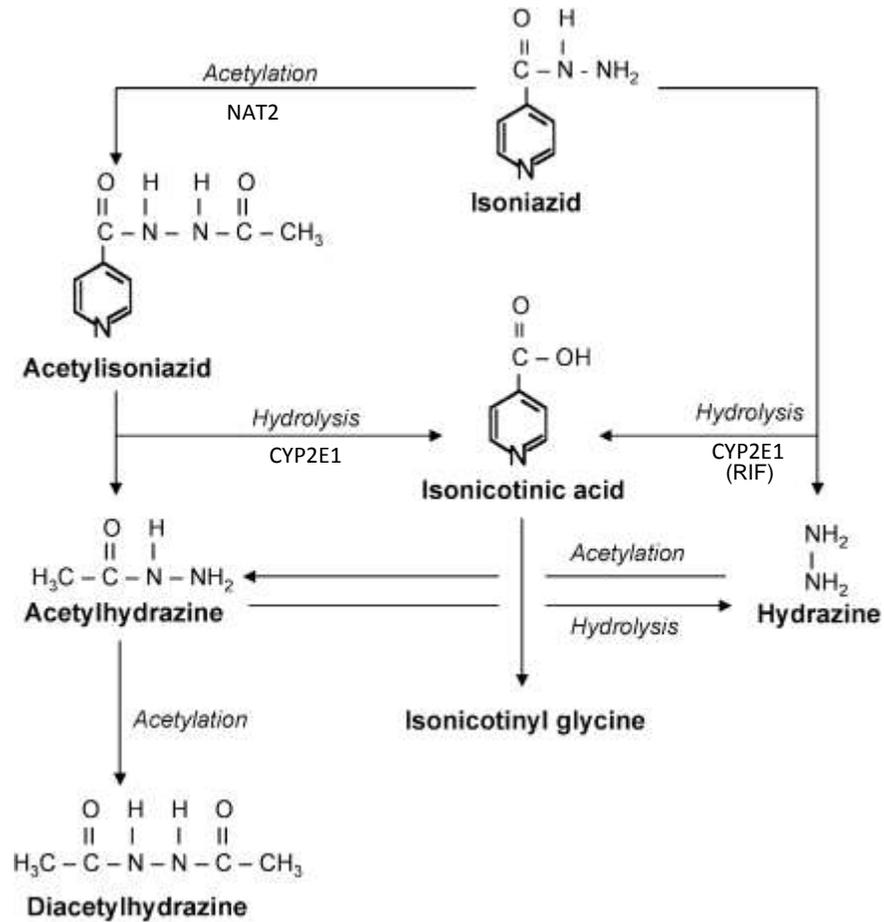


Figura 2. Biotransformación de Isoniazida. Modificado de (Tostmann et al., 2008)

Factor de crecimiento de hepatocitos.

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF por sus siglas en inglés) fue descubierto en el suero de rata, en 1984, como un potente agente mitógeno de hepatocitos de rata adulta. El HGF es sintetizado y secretado como un precursor proteico biológicamente inactivo de cadena sencilla de 728 aminoácidos (aa) (pro-HGF), se localiza en la superficie celular o anclado en la matriz extracelular, posteriormente es procesado por proteasas de serina mediante un corte proteolítico en sus residuos arginina-valina (494-495 aa) que da origen a la forma

activa de dos cadenas unidas entre sí por puentes disulfuro (**Figura 3**). El HGF maduro es un heterodímero de 697 aa, cuyas subunidades alfa y beta están unidas por un puente disulfuro. La cadena α está formada por 463 aa y contiene cuatro dominios tipo Kringle. La cadena β consiste de 234 aa. El HGF es un factor paracrino producido por células de origen mesenquimal (por ejemplo fibroblastos y macrófagos) (Segura-Flores, 2004).

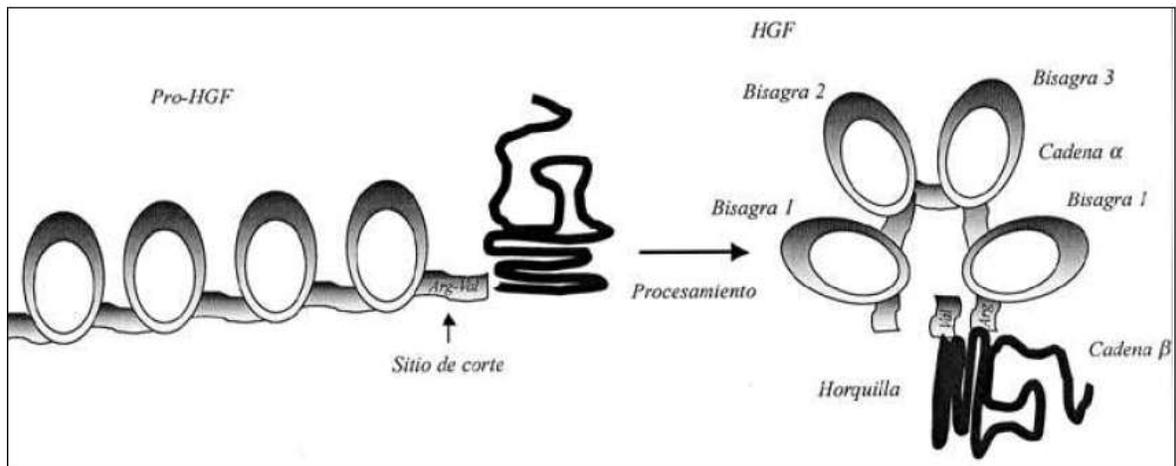


Figura 3. Procesamiento y estructura del HGF. HGF es sintetizado y secretado como un precursor biológicamente inactivo de cadena sencilla; es procesado mediante un corte proteolítico que da origen a la forma activa de dos cadenas. Tomado de (Segura-Flores, 2004).

La transducción de señales activadas por el HGF conducen a una variedad de respuestas biológicas incluyendo, la proliferación celular, la protección contra apoptosis y la morfogénesis, la derivación de tubulogénesis en tipos celulares específicos, la motilidad celular, la invasión y la metástasis (Panganiban and Day), todos estos eventos inician con la inducción de la dimerización y la activación del receptor del HGF por su ligando, el proto-oncogen c-Met (por sus siglas en inglés cellular-mesenchymal epithelial transition factor).

c-Met.

Es un polipéptido de 150 kDa heterodimérico. La cadena α contiene múltiples sitios de regulación por fosforilación. La unión del ligando al receptor lleva a la autofosforilación. Adicionalmente, la fosforilación genera un sitio de anclaje (docking site) para el reclutamiento de proteínas adaptadoras y ejecutoras de la transducción de señales. Finalmente, c-Met contiene un dominio conocido como yuxtamembranal (**Figura 4**), que al ser fosforilado inicia la endocitosis y el reclutamiento de ligasas de ubiquitinas iniciando el proceso de degradación del receptor tras su activación y función, por lo que este dominio representa un punto de regulación negativa de la ruta iniciada por el HGF. Las principales rutas de protección inducidas por el HGF, favorecen la expresión de proteínas de supervivencia o antiapoptóticas, regulan y activan factores que inducen la expresión de enzimas antioxidantes, induciendo de manera conjunta a la supervivencia y a la reparación del tejido (**Figura 5**) (Palestino-Dominguez, 2012; Segura-Flores, 2004).

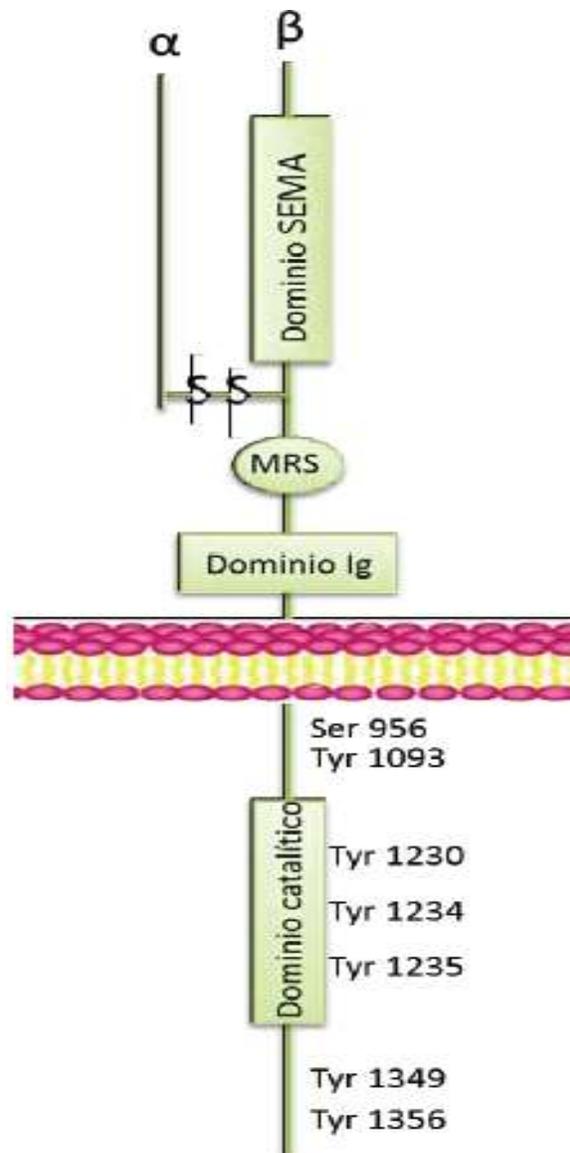


Figura 4. Estructura del receptor c-Met. Formado por una cadena α extracelular y una cadena β transmembranal, unidas por un puente disulfuro. Se muestran los principales sitios catalíticos, donde se autofosforila tras la unión a su ligando HGF. Las tirosinas 1230, 1234, 1235 se localizan en el dominio catalítico. Y en el sitio de unión multisustrato las tirosinas 1349 y 1356. En el dominio yuxtamembranal se localiza la Serina 956 y la Tirosina 1093 que al ser fosforiladas conducen a la degradación del receptor. Tomado de (Palestino-Dominguez, 2012)

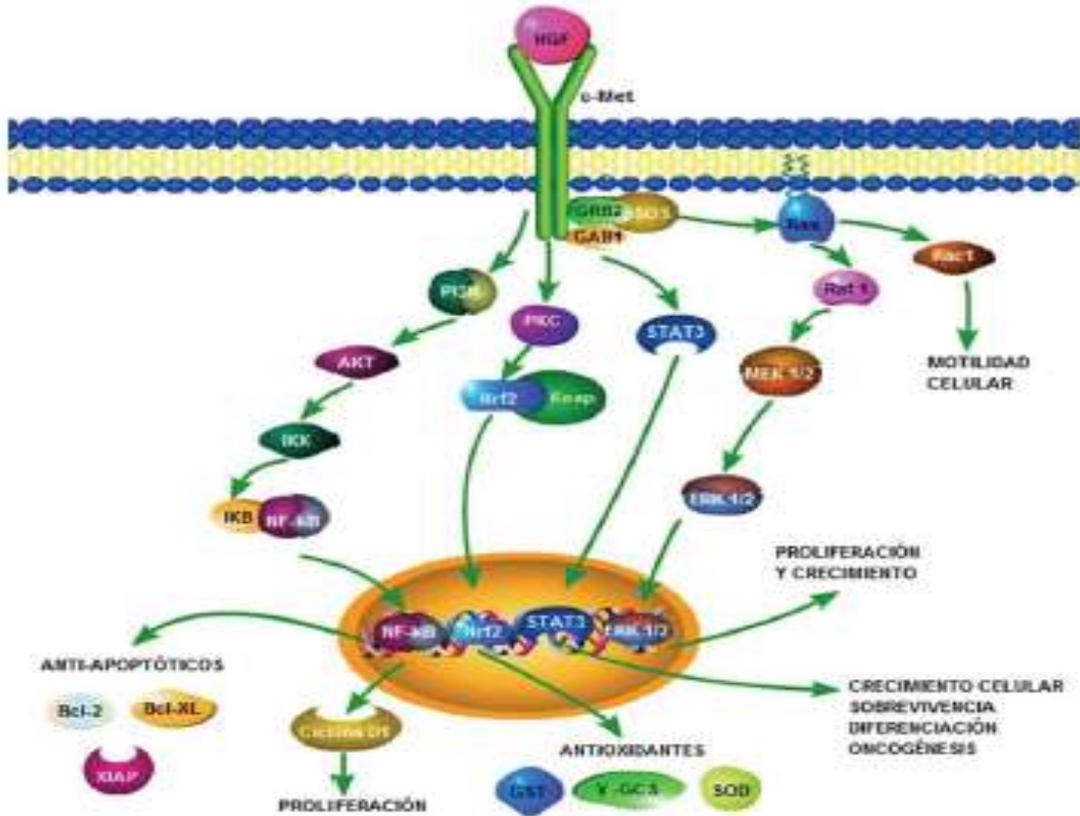


Figura 5. Principales rutas de señalización inducidas por HGF/c-Met. Tras la dimerización y autofosforilación del receptor c-Met se reclutan proteínas adaptadoras y efectoras, las cuales desencadenan cascadas de señalización que activan factores de transcripción importantes para la síntesis de proteínas de proliferación, diferenciación, motilidad, supervivencia y antioxidantes. Tomado de (Palestino-Domínguez, 2012)

Antecedentes

Modelo de Tb pulmonar progresiva.

El modelo fue desarrollado por nuestro grupo de investigación (Hernandez-Pando et al., 1996), utiliza ratones singénicos de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad que son infectados por vía It con 2.5×10^5 micobacterias vivas y virulentas de la cepa prototipo de Mtb H37Rv con una cinética de sacrificio en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 post-infección, en este modelo se observan dos fases. La primera es la etapa temprana, la cual corresponde al primer mes de infección y se caracteriza histológicamente por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolo-capilar, en la segunda semana de infección se lleva a cabo la formación sistemática de granulomas constituidos principalmente por la acumulación de linfocitos y macrófagos, organizados en estructuras redondas u ovoides de límites precisos para contener la replicación y diseminación micobacteriana. Estos granulomas de fase temprana y los infiltrados inflamatorios intersticiales y perivenulares están constituidos principalmente por linfocitos T CD4⁺ productores de citocinas como el IFN- γ e IL-2 y macrófagos activados productores de TNF- α , IL-1 y gran cantidad de la enzima sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS). Estos granulomas alcanzan su madurez en el día 21 correspondiente al clímax de la respuesta protectora (**Figura 6**). La segunda etapa de la enfermedad corresponde a la fase avanzada o progresiva, la cual se caracteriza por un incremento en el número de bacterias vivas en los pulmones, así como áreas de consolidación neumónica con focos de inducción de la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos, que se consideran como no protectores en la Tb. Los macrófagos disminuyen significativamente la producción de TNF- α , IL-1 e iNOS, e incrementa su capacidad productora de potentes citocinas anti-inflamatorias y supresoras de la inmunidad celular, como el TGF- β y la IL-10 (**Figura 6**).

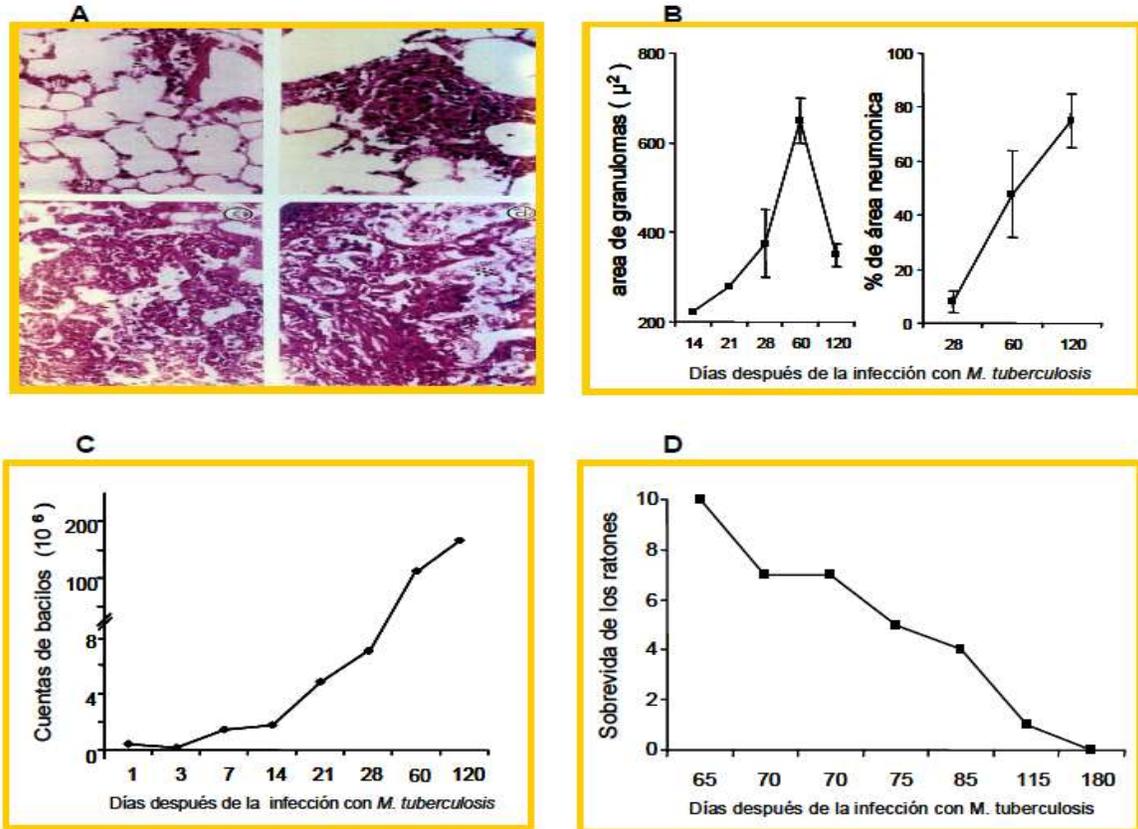


Figura 6. Características fundamentales de la Tb pulmonar progresiva en ratones BALB/c infectados por vía It con micobacterias vivas y virulentas (cepa H37 Rv). (A) Imágenes histológicas representativas de la fase temprana (inflamación y granulomas) y de la fase progresiva (neumonía, necrosis y fibrosis). (B) Morfometría automatizada del tamaño de los granulomas y el porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía a lo largo de la enfermedad. (C) Determinación de unidades formadoras de colonia bacterianas en homogenizados pulmonares. (D) Curva prototipo de la supervivencia de los animales durante el curso de la enfermedad. Tomado de (Hernandez-Pando et al., 1996).

Hígado.

El hígado regularmente está expuesto a retos que inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), como la infección por virus, toxinas o la biotransformación de fármacos, por lo tanto es más vulnerable a la toxicidad inducida por ellos, en el Tx de la Tb también está presente la resistencia a la terapia, por lo que se requiere utilizar un mayor número de antifímicos, lo que genera que se tenga mayor probabilidad de reacciones adversas principalmente a nivel hepático. La inducción de los sistemas de detoxificación, antioxidantes y antiapoptóticos son regulados por factores de crecimiento siendo el HGF el más importante en este órgano. (Beyer *et al.*, 2008; Matsumoto and Nakamura, 1992; Nakamura and Mizuno, 2010)

HGF/c-Met ha demostrado su capacidad de montar una respuesta de sobrevivencia, principalmente por activación de vías de señalización antiapoptóticas y antioxidantes. Nuestro grupo de investigación se ha enfocado en la caracterización de esta respuesta y su impacto en enfermedades de este órgano, tales como hepatotoxicidad inducida por fármacos antituberculosos (ATDH por sus siglas en inglés), cáncer, enfermedad del hígado alcohólico y fibrosis (Enriquez-Cortina *et al.*, 2013; Kaposi-Novak *et al.*, 2006; Marquardt *et al.*, 2012; Takami *et al.*, 2007; Valdes-Arzate *et al.*, 2009).

Previamente publicamos que HGF disminuye el efecto prooxidante de los antifímicos, disminuyendo la apoptosis y la inflamación por un mecanismo mediado por PKC delta (Enriquez-Cortina *et al.*, 2013). Además HGF protege a células hepáticas de daño oxidante inducido por el metabolismo de alcohol a través de un mecanismo mediado por el factor nuclear kappa B (NF-κB) (Valdes-Arzate *et al.*, 2009), también, la eliminación de la señalización de c-Met en hepatocitos de ratón (MetKO) conduce a un incremento de ROS por un mecanismo de sobreactivación de la NADPH oxidasa (Gomez-Quiroz *et al.*, 2008). Más tarde, demostramos que HGF/c-Met regula esta enzima prooxidante al transducir señales por un mecanismo mediado por el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). Bajo condiciones normales el Nrf2 se encuentra asociado a su represor

citosólico keap1, este complejo actúa como sensor del estado redox celular, por lo que, al presentarse estrés oxidante, keap1 libera al Nrf2, permitiendo su translocación al núcleo que inicia la transcripción de enzimas antioxidantes, uniéndose a elementos de respuesta antioxidante (ARE) en el genoma, por lo que el Nrf2 tiene un papel de protección hepática fundamental. El HGF como activador del Nrf2 lo convierte en un blanco terapéutico, disminuyendo las ROS y promoviendo la transcripción de genes de respuesta antioxidante, mostrando así que la señalización HGF/c-Met es un regulador clave del estado redox celular (Clavijo-Cornejo et al., 2013).

Pulmón.

El HGF promueve regeneración del tejido normal y previene remodelación fibrótica en el corazón, riñón, pulmón e hígado. Además es expresado de manera local en respuesta a daño en diferentes tejidos, incluyendo el riñón, pulmón e hígado. Y también producido en el pulmón en respuesta a daño distal, sugiriendo una función endocrina para la reparación tisular (Yanagita et al., 1992). El papel del HGF en la reparación del tejido pulmonar ha sido bien establecido. Estudios indican que HGF se eleva en el pulmón seguido de daño. Los niveles de ARN mensajero del HGF son elevados en tejido pulmonar dañado, y los niveles de proteínas están incrementados en lavado bronqueo-alveolar extraído de pulmones dañados. Al paso del tiempo de la inducción del HGF seguida de daño pulmonar correlaciona con proliferación de células epiteliales alveolares y células endoteliales vasculares (Ishizawa et al., 2004; Sakamaki et al., 2002).

La regeneración epitelial y endotelial normal es crítica para la reparación seguida de daño tisular. Por lo tanto, la reparación normal del tejido requiere de factores, tal como el HGF, que apoyan específicamente el crecimiento en células epiteliales y endoteliales, pero no en miofibroblastos. El HGF es mitogénico e induce sobrevivencia en células endoteliales pulmonares y células epiteliales alveolares tipo II (Nakagami et al., 2001; Singh-Kaw et al., 1995). El HGF bloquea la apoptosis de células epiteliales y endoteliales en pulmón. La actividad de sobrevivencia celular por el HGF ha sido atribuida a la activación de un número de

vías de señalización anti-apoptóticas aunque los mecanismos específicos del HGF parecen diferir entre los tipos celulares. Tres predominantes vías están implicadas en la sobrevivencia por el HGF ERK/MAPK, PI3K/Akt y el transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Fan et al., 2005; Moumen et al., 2007).

En células endoteliales de pulmón murino sujetadas a estrés hipóxico seguido por re-oxigenación, un procedimiento que activa la vía apoptótica extrínseca a través del complejo de señalización inductor de muerte (DISC) y caspasa-8. El HGF confiere protección contra apoptosis extrínseca a través de la regulación al alza dependiente de PI3K/Akt del inhibidor de caspasa-8 la proteína inhibitoria parecida a FLICE (FLIP) y a través de la regulación a la baja en la formación de DISC, además de inhibir la translocación de Bax dentro de la mitocondria, también en una manera dependiente de Akt (Wang et al., 2004).

Finalmente, recientemente se ha demostrado que el HGF afecta la viabilidad de miofibroblastos a través de mecanismos directos. Aunque los fibroblastos normales pierden el receptor Met para el HGF, los miofibroblastos tomados de pulmones fibróticos de animales experimentales han mostrado que expresan a Met. El HGF ha mostrado ser inductor de apoptosis de una manera dependiente de caspasas asociada con un incremento en la degradación de matriz extracelular. El HGF incrementa la actividad predominantemente de enzimas involucradas en la degradación de fibronectina y una disminución en un dominio de unión celular central a fibronectina el cual está involucrada en la fosforilación de FAK, estas dos actividades conducen a la disminución de la sobrevivencia de miofibroblastos (Mizuno et al., 2005).

Justificación

La Tb es responsable de dos millones de muertes por año, número que prevalece dada la aparición de cepas resistentes a la terapia antifímica. En los últimos años se han incrementado los casos de infección de Mtb con cepas MDR lo que ha ocasionado que diferentes autores sugieran el incremento en las dosis o los tiempos de tratamiento para eliminar estas cepas, con el riesgo de generar consecuentemente, el aumento en la incidencia de reacciones adversas, principalmente a nivel hepático (Enriquez-Cortina et al., 2013).

Es bien conocido que el principal mecanismo de daño por los antifímicos es la inducción de daño en el hígado que se puede presentar como lesión de los hepatocitos, hepatitis aguda o crónica, esteatosis, colestasis, necrosis o incluso falla hepática fulminante (Cillo et al., 2005; Enriquez-Cortina et al., 2013; Idilman et al., 2006). Existe evidencia de que intermediarios tóxicos y la generación de ROS por la biotransformación de la INH han sido implicados en la hepatotoxicidad, particularmente en combinación con RIF (Chen et al.).

Es por ello que se deben buscar nuevas opciones terapéuticas que brinden hepatoprotección sin comprometer los efectos de los antifímicos contra la micobacteria.

Hipótesis

El HGF inducirá una respuesta protectora a nivel hepático y pulmonar contrarrestando la generación de ROS inducida por el tratamiento con INH y RIF en ratones infectados con una cepa MDR de Mtb.

Objetivo General

Determinar el efecto del HGF en pulmón e hígado en el proceso terapéutico mediado por dosis elevadas de INH y RIF en ratones BALB/c infectados con una cepa MDR de Mtb.

Objetivos Particulares

- 1) Evaluar el efecto de dosis elevadas de INH/RIF sobre la eliminación de bacterias MDR.
- 2) Estudiar la toxicidad de los antifímicos en hígado por medio de histología en ratones infectados con una cepa MDR de Mtb comparados con un grupo sano.
- 3) Establecer el efecto protector del HGF sobre hígado y pulmón y su impacto en el efecto antibiótico de INH/RIF.

Material y Métodos

Se utilizaron ratones machos BALB/c de 8 semanas de edad y 22 gr de peso. Los animales se alojaron dentro de microaisladores en un equipo con ventilación individual positiva (Allentown, USA) en las instalaciones de Patología Experimental en el bioterio del INCMNSZ, con agua y alimento *ad libitum* y ciclos de luz-obscuridad de 12-12h. El manejo de los animales se hizo acorde a la NOM-062-ZOO-1999.

Crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

Se seleccionó una cepa de Mtb MDR a antifímicos de primera línea (INH, RIF, PYR, Estreptomina y Etambutol), el cual fue aislado, identificado y caracterizado en el Laboratorio de Micobacteriología del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social (Monterrey, NL, México) y se creció en medio líquido Middlebrook 7H9 (Difco, USA) adicionado con glicerol, tween-80 y enriquecido con ADC (albúmina, dextrosa y catalasa) a 37 °C. Una botella de cultivo con medio líquido se utilizó para determinar el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica usando un espectrofotómetro realizando lecturas seriadas a una longitud de onda de 600nm cada tercer día. Los cultivos finalmente se recuperaron en fase logarítmica de crecimiento.

Recuperación de micobacterias a partir de cultivos frescos.

Los cultivos se recuperaron al alcanzar una DO_{600} . El líquido de cada botella de cultivo se transfirió a un tubo falcón de 50ml y se centrifugo a 3000rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y se agregó 15 ml de PBS-tween 0.05% y perlas de vidrio, cada tubo se agitó en vortex a velocidad máxima por un minuto y, se dejó reposar en hielo por un minuto la agitación se repitió 5 veces. Cada tubo se centrifugo a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante en un nuevo tubo falcón al cual se le agrego PBS hasta aforar a 45 ml, se centrifugo este tubo a 2500 rpm, se decantó el sobrenadante dejando solo el botón de bacterias, y se resuspendió en 10 ml de solución salina estéril (SSE), y se agitó durante 1

minuto, posteriormente se distribuyó en alícuotas de 1 ml y se congeló a -80 grados hasta su uso.

Conteo de micobacterias para infección de ratones.

Se tomaron alícuotas al azar y se descongelaron gradualmente, se agitaron en vortex a velocidad máxima por un minuto, posterior a esto se realizaron diluciones seriadas de la muestra hasta tener 6 diluciones. Cada dilución se sembró por triplicado en cajas de petri con agar 7H10 adicionado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y se incubaron a 37°C con una atmósfera al 5% de dióxido de carbono (CO₂) durante 21 días, al término de éste tiempo se contaron las colonias en cada dilución y determinó el número de micobacterias presentes por ml de concentrado para ajustar a 10,000 unidades formadoras de colonias (UFC's) vivas por cada 100 µl de SSE e infectar a los ratones por vía It.

Modelo de Tb pulmonar progresiva.

Este modelo ha sido descrito previamente por nuestro grupo de investigación (Hernandez-Pando et al., 1996). Para este experimento se utilizaron 120 ratones que fueron divididos aleatoriamente en 10 grupos experimentales de 12 animales cada uno. Seis grupos (**Tabla 2. Grupos 1 a 6**) se anestesiaron con sevoflurano (Sevorane) y se inocularon vía It; los animales se mantuvieron en posición vertical hasta su recuperación (presencia de reflejos y contracción muscular); posterior a su recuperación se agruparon en 12 animales por microaislador y se dejaron tres meses para que desarrollaran Tb pulmonar progresiva de acuerdo a lo reportado por el grupo de (Hernandez-Pando et al., 1996), cumplido este tiempo se inició el Tx correspondiente para cada grupo.

Los cuatro grupos restantes (**Tabla 2. Grupos 7 a 10**) se formaron con ratones sanos. Agrupados en 12 animales por microaislador; tres meses después se inició el Tx correspondiente para cada grupo.

Tratamiento.

Se administraron 150 mg/Kg de peso de RIF en combinación de 75 mg/Kg de peso de INH para la vía intragástrica (lg), o 10 mg/Kg de peso de RIF en combinación con 75 mg/Kg de peso de INH para la vía lt, usando SSE como vehículo; y se administró en presencia o no del HGF a una concentración de 10 µg/Kg de peso en SSE por vía intraperitoneal (lp). Los grupos y sus tratamientos se especifican a continuación:

GRUPO	Número de ratones	Estatus de los ratones	MDR	INH+RIF vía lg.	INH+RIF vía lt.	HGF vía lp.
1. MDR.	12	Infectados	X			
2. MDR+INH+RIF vía lg.	12	Infectados	X	X		
3. MDR+INH+RIF+HGF vía lg.	12	Infectados	X	X		X
4. MDR+INH+RIF vía lt.	12	Infectados	X		X	
5. MDR+INH+RIF+HGF vía lt.	12	Infectados	X		X	X
6. MDR+HGF.	12	Infectados	X			X
7. INH+RIF vía lg.	12	Sanos		X		
8. INH+RIF+HGF vía lg.	12	Sanos		X		X
9. INH+RIF vía lt.	12	Sanos			X	
10. INH+RIF+HGF vía lt.	12	Sanos			X	X

Tabla 2. Distribución de los grupos experimentales y tratamientos empleados durante el experimento.

El Tx para todos los grupos dio inicio a los 3 meses post-infección y se realizaron sacrificios a los 1 y 2 meses post-tratamiento sacrificando 6 animales por grupo en cada sacrificio.

Obtención y preservación del tejido hepático y pulmonar.

Para el sacrificio, los animales fueron anestesiados en una cámara con éter anhidro, se hizo un corte en el plexo braquial para cortar la vena subclavia e inducir la muerte por exanguinación, la sangre fue recolectada en un tubo eppendorf de 1.5 ml y una vez coagulada se centrifugó a 3000 rpm para la obtención del suero. Posteriormente se hizo una pequeña incisión a la altura del pubis, seguida de un corte longitudinal por la línea media hasta la garganta del ratón, se separaron los planos de piel y se cortó la capa muscular desde el pubis hasta el apófisis xifoides para exponer la cavidades peritoneal y torácica.

Una sección de tejido hepático y el pulmón izquierdo que se perfundio con OCT se embebieron en OCT (Tissue Tek®) para la elaboración de cortes por congelación y realizar la determinación de anión superóxido *in situ*, otro fragmento del hígado y el pulmón izquierdo que se perfundio con etanol absoluto se colocaron en el mismo alcohol para su fijación. Los pulmones derechos se utilizaron para determinar la carga bacilar por conteo de UFC's.. Todos los procedimientos de infección y sacrificio se realizaron en un gabinete de seguridad biológica nivel 3. El uso de animales fue aprobado por el comité de ética del INCMNSZ y de la UAM-I.

Conteo de Unidades Formadoras de Colonias.

Al menos cuatro pulmones por tiempo de sacrificio fueron homogenizados con ayuda de un politrón (Kinematica, Luzern) en tubos estériles con 1ml de solución PBS-tween 80 0.05%. Cuatro diluciones de cada homogenizado fueron sembradas por duplicado en cajas con agar Middlebrook 7H10 (Difco) enriquecido con OADC (Becton Dickinson), y se incubaron a 37°C con una atmosfera al 5% de CO₂. El número de colonias fueron contadas a los 14, 21 y 28 días después de la siembra. Para obtener el número de bacterias por pulmón, se multiplico el número de UFC's encontradas por su correspondiente factor de dilución:

Dilución	Concentrado	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Factor de Dilución	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10	100

El resultado obtenido se interpreta como millones de UFC's por pulmón.

Detección de especies reactivas de oxígeno.

Debido a que la INH y RIF producen daño principalmente por la generación de ROS, se realizó la determinación de anión superóxido con dihidroetidio (DHE) 50 µM *in situ* en criocortes frescos de tejido hepático y pulmonar. El DHE al ser oxidado por el anión superóxido emite fluorescencia a los 560 nm, las imágenes de este ensayo se obtuvieron con un microscopio confocal multifotónico Carl Zeiss LSM 780 NLO.

Análisis Estadístico

Cada experimento se realizó por duplicado con tejido de al menos 4 animales. Los datos fueron reportados como el promedio ± error estándar (EE). Para la comparación de promedios de los diferentes grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de comparaciones múltiples por la prueba de Bonferroni. Se empleó el programa GraphPad Prism versión 5.0. El nivel de significancia fue de p<0.05.

Resultados

Sobrevida, carga bacilar, histopatología y determinación de anión superóxido en ratones BALB/c sanos e infectados y tratados con antifímicos vía Ig.

1) Sobrevida de ratones sanos e infectados con Mtb MDR.

Se llevó un registro de la sobrevida de los animales durante la duración del experimento, después de 5 meses todos los animales sanos e inoculados llegaron a término y tienen un 100% de sobrevida por lo que no existen diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados).

2) Carga bacilar.

La determinación de la carga bacilar en los pulmones de ratones infectados y tratados por un mes con antifímicos por vía Ig mostró una disminución significativa en comparación con el grupo MDR; sin embargo el mismo grupo que recibió el Tx por dos meses aumentó la carga sugiriendo un proceso de adaptación por parte de la micobacteria a los antifímicos. Asimismo el grupo tratado durante un mes con los antifímicos y con HGF disminuyó las UFC's de manera significativa en comparación con el grupo MDR teniendo un efecto mayor después de dos meses en comparación con su control (MDR 2 meses). Por último el grupo infectado y tratado con HGF también mostró una disminución de la carga bacilar de manera significativa teniendo un efecto similar al primero y segundo mes de Tx (**Figura 7**).

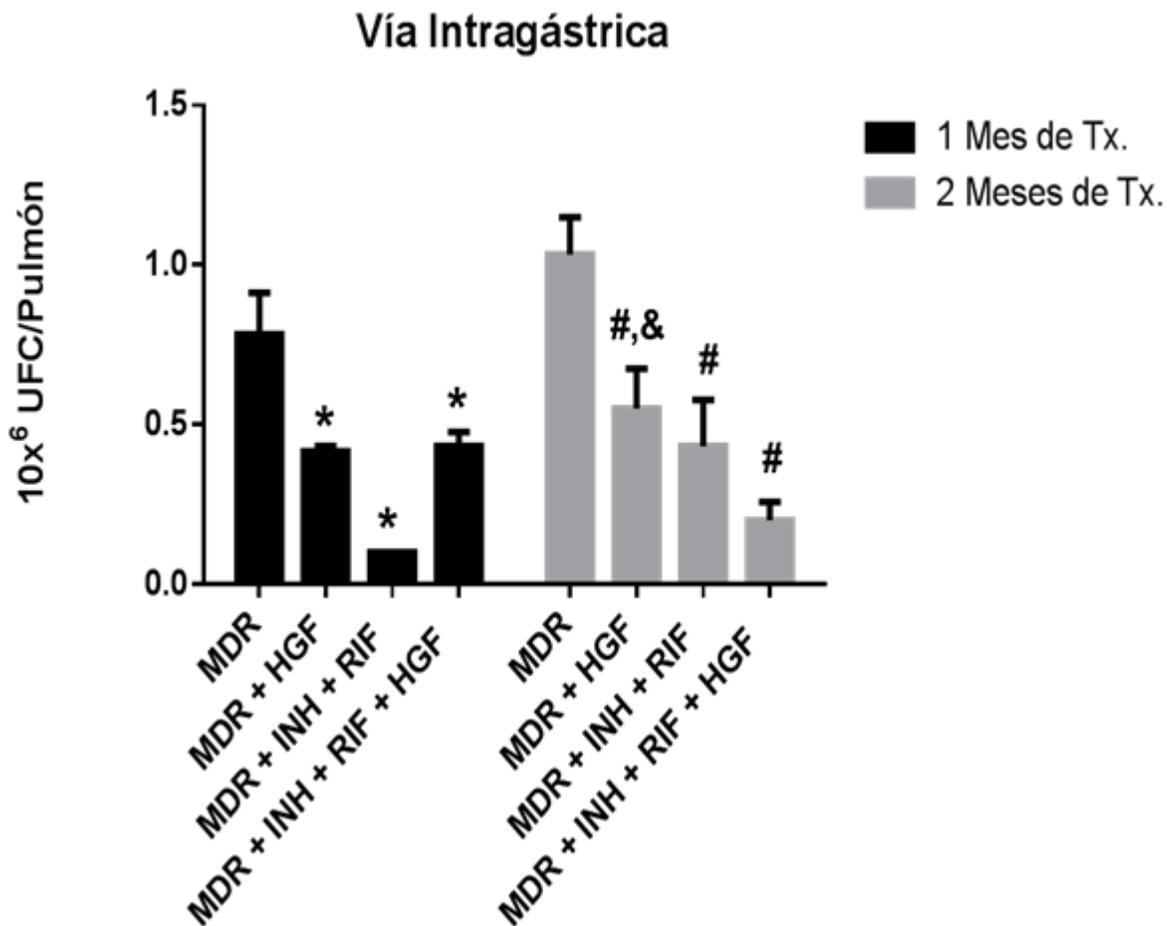


Figura 7. Determinación de la carga bacilar en homogenizados pulmonares de ratones infectados y tratados con antifímicos por vía Ig. Los símbolos representan diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0.05$ en comparación con MDR 1 mes; # $p < 0.05$ en comparación con MDR 2 Meses; & $p < 0.05$ en comparación con MDR + INH + RIF + HGF 2 Meses).

3) Histopatología pulmonar.

El daño histológico se determinó en cortes de pulmón teñidos con H&E, midiendo el área pulmonar afectada por la neumonía. Los animales no infectados presentan una histología normal demostrando que no hay daño por el Tx (**Figura 8 E, F, K y L**). Los pulmones de animales infectados con la cepa MDR presentan un infiltrado inflamatorio caracterizado por la presencia de células mononucleares que llegan al sitio de infección. En el grupo MDR las áreas de neumonía son más extensas con el paso del tiempo (**Figura 8 A y G**), en los animales infectados y tratados con

los antifímicos por vía Ig se observan pequeñas áreas de consolidación neumónica mostrándose un efecto mayor a los dos meses (**Figura 8 C e I**), ésta disminución en la neumonía se ve potenciada cuando se administra HGF junto con los antifímicos por vía Ig, observándose incluso una recuperación en la arquitectura pulmonar (**Figura 8 D y J**). Interesantemente el grupo infectado y tratado con el HGF disminuye la progresión de la neumonía (**Figura 8 B y H**). Todos estos hallazgos correlacionan con la disminución en la carga bacilar.

4) Determinación de anión superóxido en pulmón.

Debido a que el principal mecanismo bactericida de los macrófagos es vía ROS se utilizó la sonda fluorescente DHE para detectar la presencia de anión superóxido. En la **Figura 9 F y 9 L** podemos observar una baja positividad al anión superóxido en pulmones sanos y tratados con los antifímicos por vía Ig junto con el HGF brindando protección frente a ROS, datos que correlacionan con una arquitectura pulmonar normal observada en la tinción de H&E. Por otra parte en animales infectados con una cepa MDR y tratados con el HGF (**Figura 9 B y H**) y en animales infectados y tratados con antifímicos vía Ig y con el HGF (**Figura 9 D y J**) el nivel de positividad al anión superóxido aumentó y esto puede deberse a la activación de células inmunocompetentes como los macrófagos que pueden eliminar eficientemente a la micobacteria vía ROS. Éstos resultados se relacionan con la disminución en la carga bacilar y la recuperación en la arquitectura pulmonar, siendo más claro éste efecto en el grupo tratado con los antifímicos y HGF al primer y segundo mes de Tx, mostrando así un papel dual del HGF en pulmón debido a la presencia o ausencia de la micobacteria.

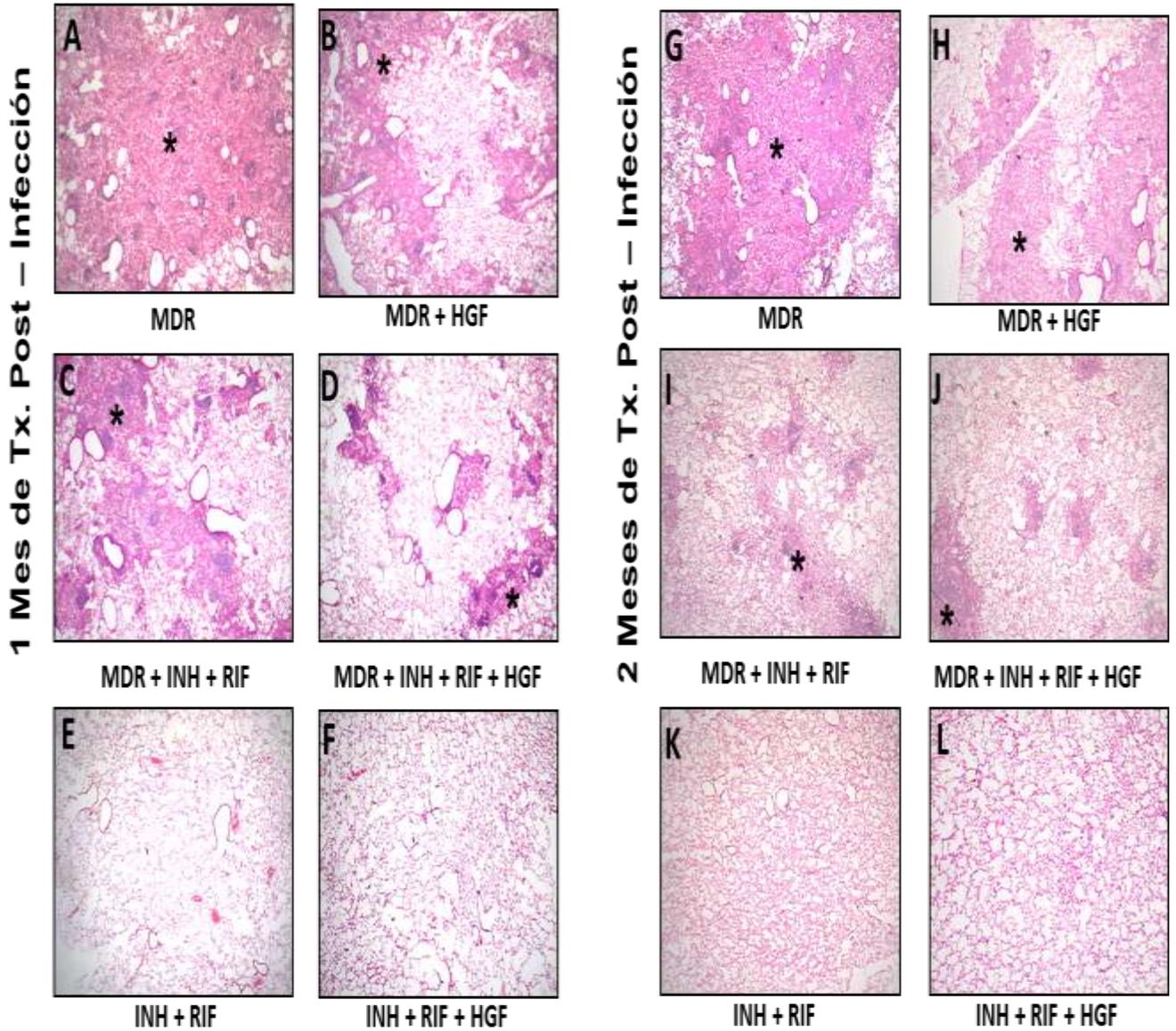


Figura 8. Imágenes histológicas representativas de pulmón tomadas con el objetivo 20x. El HGF disminuye el grado de neumonía, en animales infectados y con HGF (B y H), animales infectados y tratados con los antifímicos por vía Ig y HGF (D y J) y no afecta la arquitectura pulmonar en animales sanos tratados con los antifímicos por vía intragástrica y HGF (F y L). Los * representan áreas de consolidación neumónica.

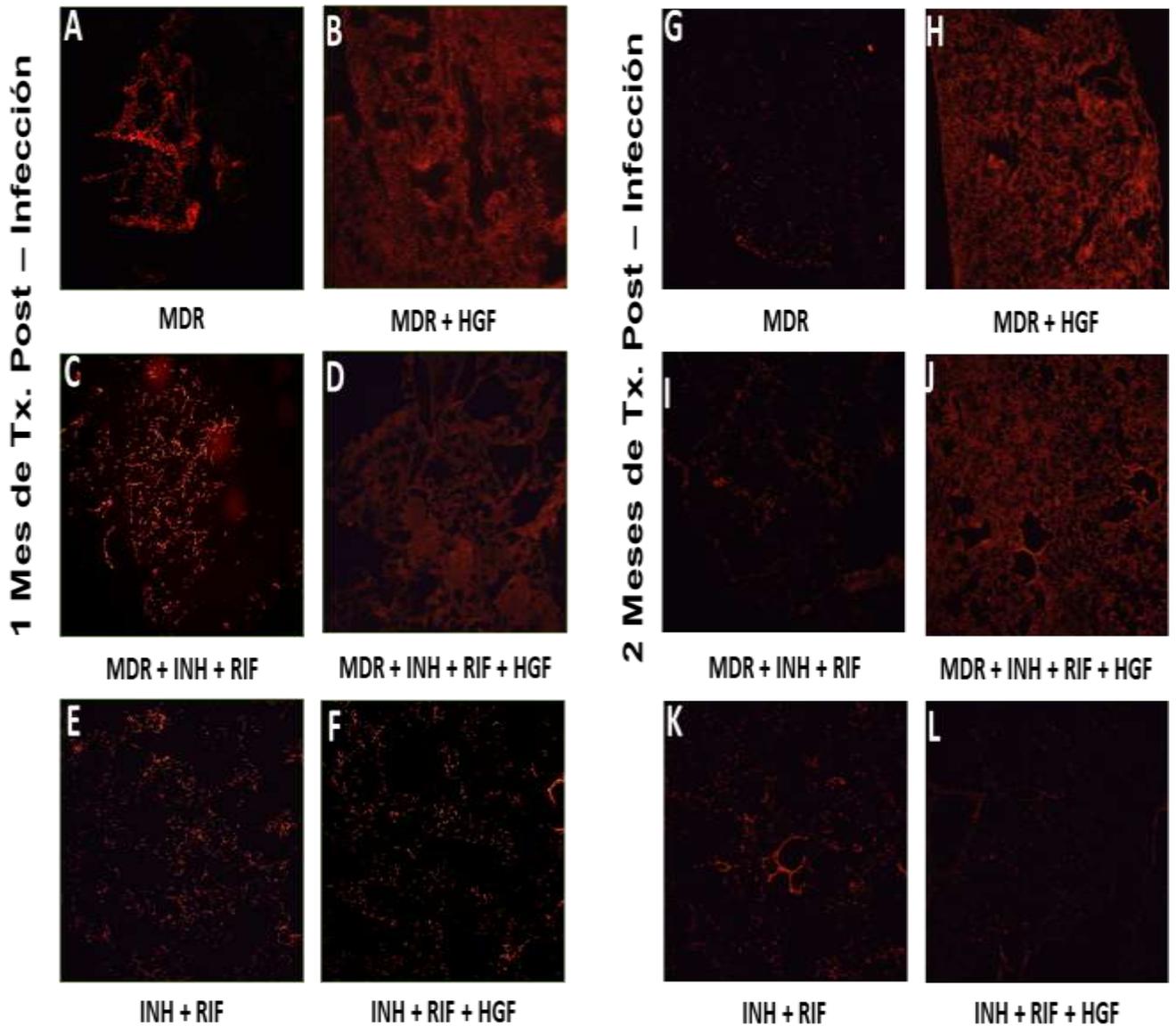


Figura 9. Imágenes representativas de la determinación de anión superóxido *in situ* en criocortes frescos de pulmón. Las imágenes representan la inmunofluorescencia del dihidroetidio (DHE) tomadas con el objetivo 40x. El HGF tiene un papel dual en pulmón. Incrementa el efecto prooxidante en tejido pulmonar de animales infectados y tratados con HGF (B y H) y en animales infectados tratados con antituberculars por vía Ig y con HGF (D y J) y este efecto prooxidante disminuye en animales sanos tratados con antituberculars y HGF (F y L).

5) *Histopatología hepática.*

Una de las principales complicaciones de la quimioterapia antifúngica es el daño hepático que puede conducir a una falla del órgano e incluso provocar la muerte del individuo por una falla hepática fulminante, es por ello que se evaluó la integridad de éste órgano en animales sanos e infectados.

En la **Figura 10** se muestra la tinción de H&E en cortes de hígado de animales sanos e infectados en donde se pueden observar las alteraciones en su arquitectura con el paso del tiempo, como la aparición de granulomas (**Figura 10 G**) que demuestra una diseminación micobacteriana. Cuando estos animales infectados son tratados por vía Ig con dosis suprafarmacológicas de antifúngicos muestran una esteatosis microvesicular a un mes de Tx (**Figura 10 C**) que al segundo mes evoluciona a macrovesicular (**Figura 10 I**) por la agresión constante de los antifúngicos que favorecen la acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos. Esta esteatosis ya sea micro o macrovesicular es menor en aquellos animales que reciben los antifúngicos junto con el HGF en ambos casos (**Figura 10 D y J**). Los animales sanos presentan alteraciones similares a los infectados con la aparición de pequeñas gotas lipídicas en los hepatocitos a un mes de Tx (**Figura 10 E**) las cuales aumentan de tamaño a los dos meses de Tx con antifúngicos (**Figura 10 K**) comprometiendo la estructura-función de este órgano. De igual manera cuando estos animales sanos son tratados con los antifúngicos y con el HGF la esteatosis micro y macrovesicular desaparece (**Figura 10 F y L**), sugiriendo un proceso de reparación hepática posterior a la agresión tóxica.

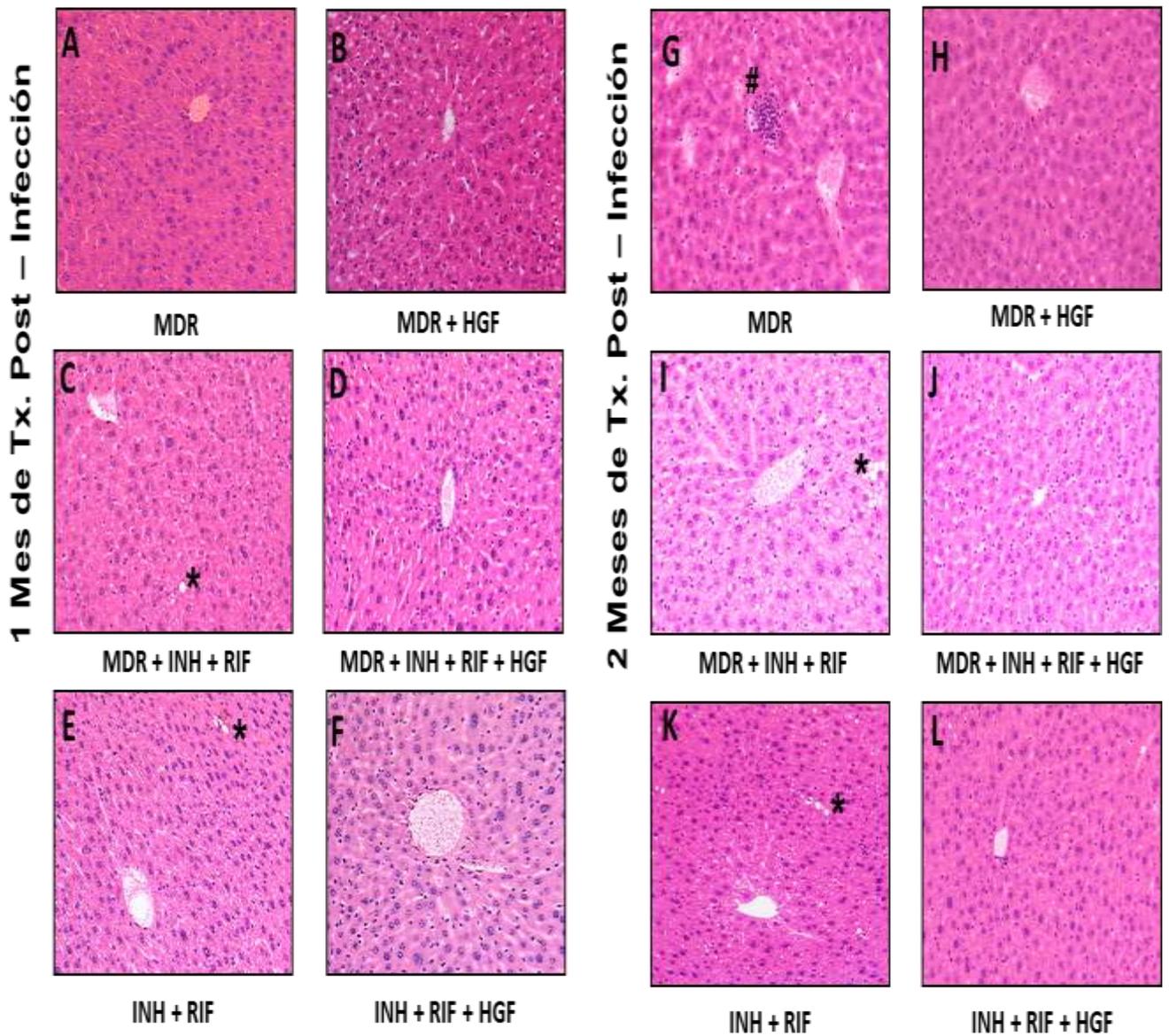


Figura 10. Imágenes histológicas representativas de hígado tomadas con el objetivo 40x. El HGF disminuye la esteatosis hepática en animales sanos e infectados tratados con dosis suprafarmacológicas de antifímicos por vía Ig. Los símbolos representan alteraciones en la arquitectura hepática (# = granuloma hepático; * =esteatosis microvesicular a 1 mes de Tx y a esteatosis macrovesicular a 2 meses de Tx).

6) *Determinación de anión superóxido en hígado.*

La INH y la RIF requieren de procesos de biotransformación para que puedan actuar sobre la micobacteria; estos son realizados en el hígado con la consecuente generación de ROS que pueden causar daño a este órgano, es por esta razón que determinamos la presencia de anión superóxido mediante el fluoróforo DHE *in situ* en tejido hepático de animales sanos e infectados con una cepa MDR de Mtb.

La INH y la RIF incrementan la señal fluorescente del anión superóxido tanto en animales sanos (**Figura 11 E y K**) como en aquellos que se encuentran infectados con Mtb (**Figura 11 A, C, G e I**). La presencia de este anión denota estrés oxidante inducido por este radical-anión producido principalmente vía el CYP2E1. Esta señal fluorescente esta disminuida en presencia del HGF en animales sanos (**Figura 11 F y L**) e infectados (**Figura 11 B, D, H y J**), sugiriendo un proceso de protección hepática al disminuir el estrés oxidante iniciado por esta especie reactiva.

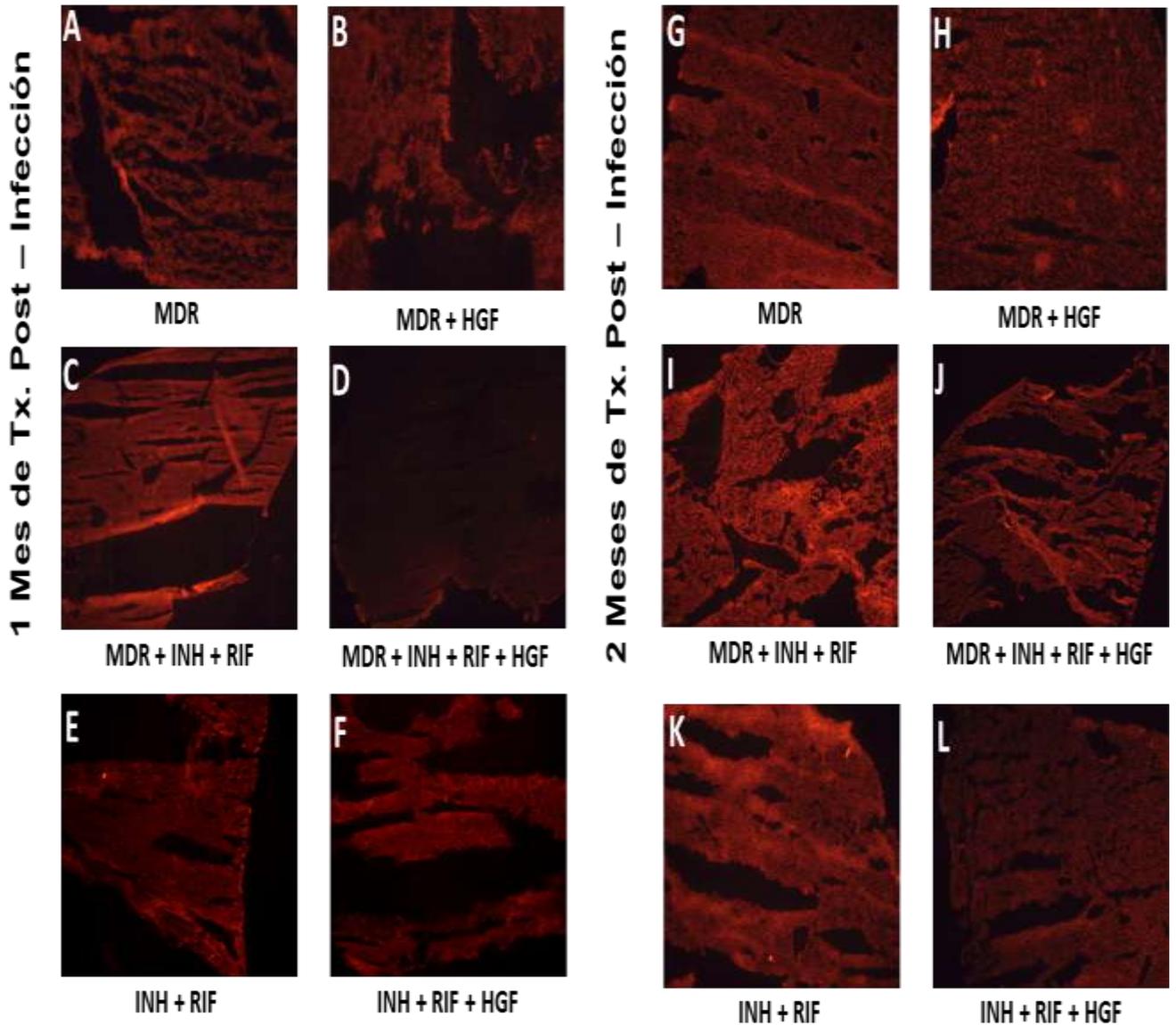


Figura 11. Imágenes representativas de la determinación de anión superóxido *in situ* en criocortes frescos de hígado. Las imágenes representan la inmunofluorescencia del dihidroetidio (DHE) tomadas con el objetivo 40x. El HGF disminuye el efecto prooxidante inducido por los antifímicos, en tejido hepático de animales infectados tratados con antifímicos por vía Ig y HGF (H y J) y de animales sanos que son tratados con los antifímicos por vía Ig y HGF (F y L).

Sobrevida, carga bacilar, histopatología y determinación de anión superóxido en ratones BALB/c sanos e infectados y tratados con antifímicos vía It.

1) Sobrevida de ratones sanos e infectados con una cepa MDR de Mtb.

Como se mencionó con anterioridad todos los animales llegaron a término del experimento, por lo que no existen diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados).

2) Carga bacilar.

En cuanto a la carga bacilar obtenida de homogenizados de pulmón de ratones infectados con la cepa MDR y tratados con dosis suprafarmacológicas de antifímicos por vía It se obtuvieron resultados similares a la vía Ig. Mostrando una disminución significativa en el grupo infectado y tratado con los antifímicos a un mes de tratamiento; dicha disminución es mantenida en el grupo infectado y tratado con los antifímicos que recibió el Tx por dos meses sugiriendo que esta vía de administración es una alternativa eficiente contra la Tb MDR. Asimismo el grupo infectado y tratado con antifímicos y el HGF a un mes de Tx disminuye la carga bacteriana de manera significativa teniendo un efecto similar a los dos meses. Por último el grupo infectado y tratado con HGF también disminuye la carga bacilar de manera significativa teniendo un efecto similar a uno y dos meses de Tx, controlando la infección (**Figura 12**).

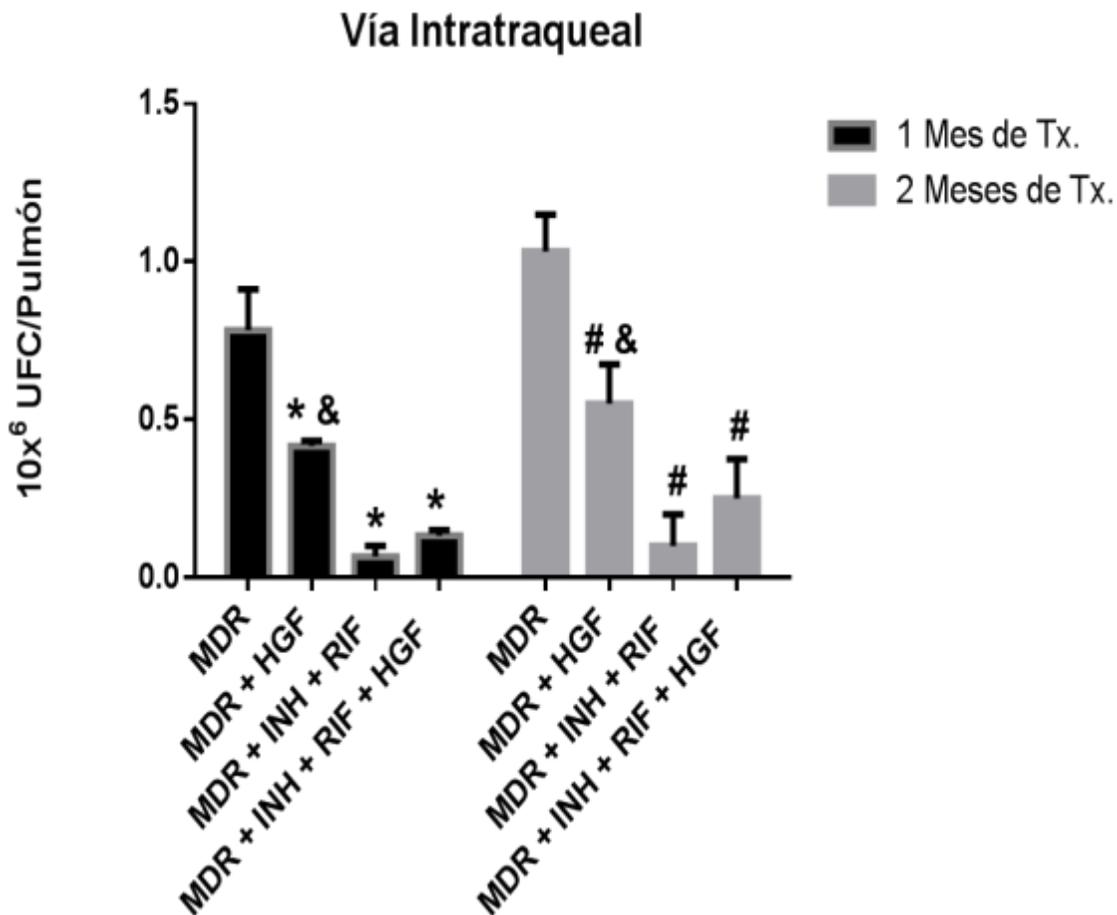


Figura 12. Determinación de la carga bacilar en homogenizados pulmonares de ratones infectados y tratados con antifímicos por vía It. Los símbolos representan diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0.05$ en comparación con MDR 1 mes; # $p < 0.05$ en comparación con MDR 2 Meses; & $p < 0.05$ en comparación con MDR + INH + RIF a 1 y 2 Meses Respectivamente).

3) Histopatología pulmonar.

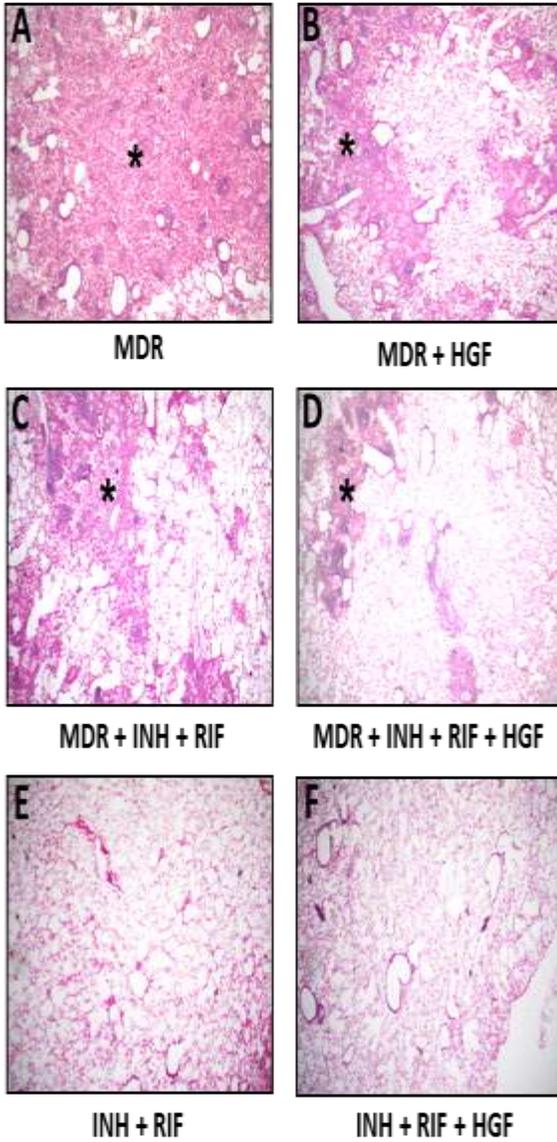
Los animales no infectados presentan una arquitectura pulmonar normal (**Figura 13 E, F, K y L**). Los pulmones de animales infectados con la cepa MDR presentan un infiltrado inflamatorio. La neumonía en el grupo MDR es más extensa al paso del tiempo (**Figura 13 A y G**), en el grupo infectado y tratados con los antifímicos por vía It se observan pequeñas áreas de consolidación neumónica mostrando un efecto mayor a los dos meses (**Figura 13 C e I**), ésta disminución de áreas neumónicas se ve potenciada cuando se administra HGF y antifímicos vía It, observándose recuperación en la arquitectura pulmonar (**Figura 13 D y J**) e

incluso granulomas (**Figura 13 J**). El grupo infectado y tratado con HGF disminuye el grado de neumonía (**Figura 13 B y H**), teniendo un papel importante en el control de la infección. Todos estos hallazgos correlacionan con la disminución en la carga bacilar, aunque cabe resaltar que a pesar de que el grupo infectado y tratado con los antifímicos mostraba una disminución mayor en la carga bacteriana en comparación con aquellos que recibieron los antifímicos y el HGF, estos últimos muestran menor grado de neumonía y mejor recuperación de la arquitectura pulmonar. Sugiriendo que la vía It es efectiva para la eliminación de la bacteria y es potenciada cuando se suma el HGF a los antifímicos, acelerando el proceso de reparación.

4) Determinación de anión superóxido en pulmón.

Nuevamente se realizó la determinación de anión superóxido mediante el fluoróforo DHE. En la **Figura 14 F y 14 L** podemos observar una disminución en la fluorescencia positiva al anión superóxido en pulmón de animales sanos y tratados con los antifímicos por vía It y HGF brindando protección frente a ROS, dato que correlaciona con una arquitectura pulmonar normal observado en la tinción de H&E. Por otra parte en animales infectados y tratados con HGF (**Figura 14 B y H**) y en animales infectados y tratados con los antifímicos vía It y el HGF (**Figura 14 D y J**) el nivel de positividad a anión superóxido aumenta sugiriendo nuevamente la activación de células inmunocompetentes. Éstos resultados correlacionan con la disminución en la carga bacilar y la recuperación en la arquitectura pulmonar, siendo más claro éstos efectos en el grupo infectado y tratado con los antifímicos y HGF a dos meses de Tx.

1 Mes de Tx. Post – Infección



2 Meses de Tx. Post – Infección

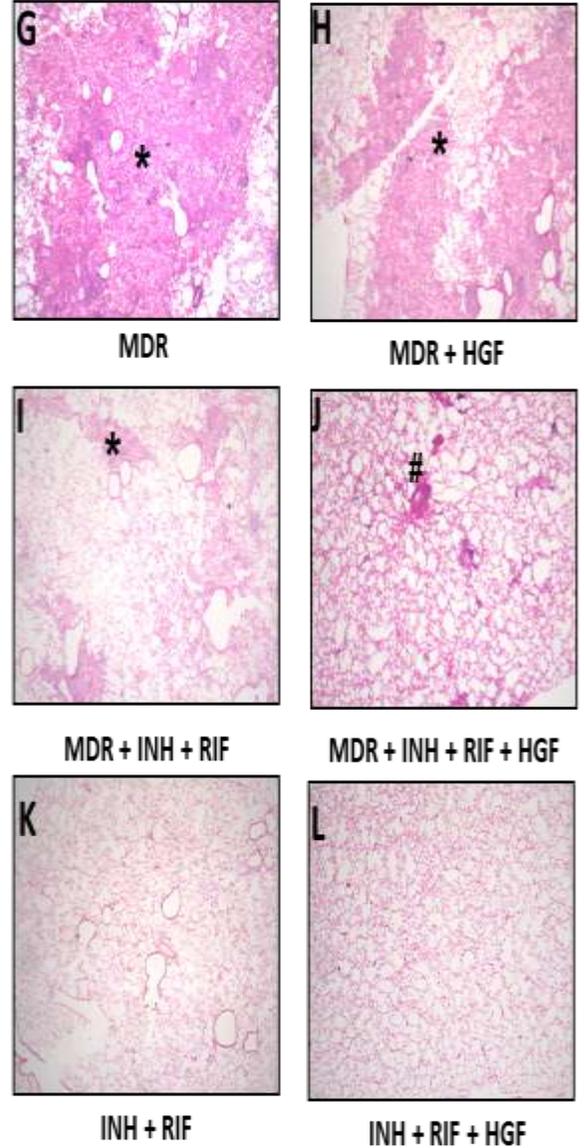


Figura 13. Imágenes histológicas representativas de pulmón tomadas con el objetivo 20x. El HGF disminuye el grado de neumonía, en animales infectados y tratados con los antifímicos por vía It y HGF (D y J) y no afecta la arquitectura pulmonar en animales sanos tratados con los antifímicos por vía It y HGF (F y L). Los * representan áreas de consolidación neumónica y el # representa granulomas.

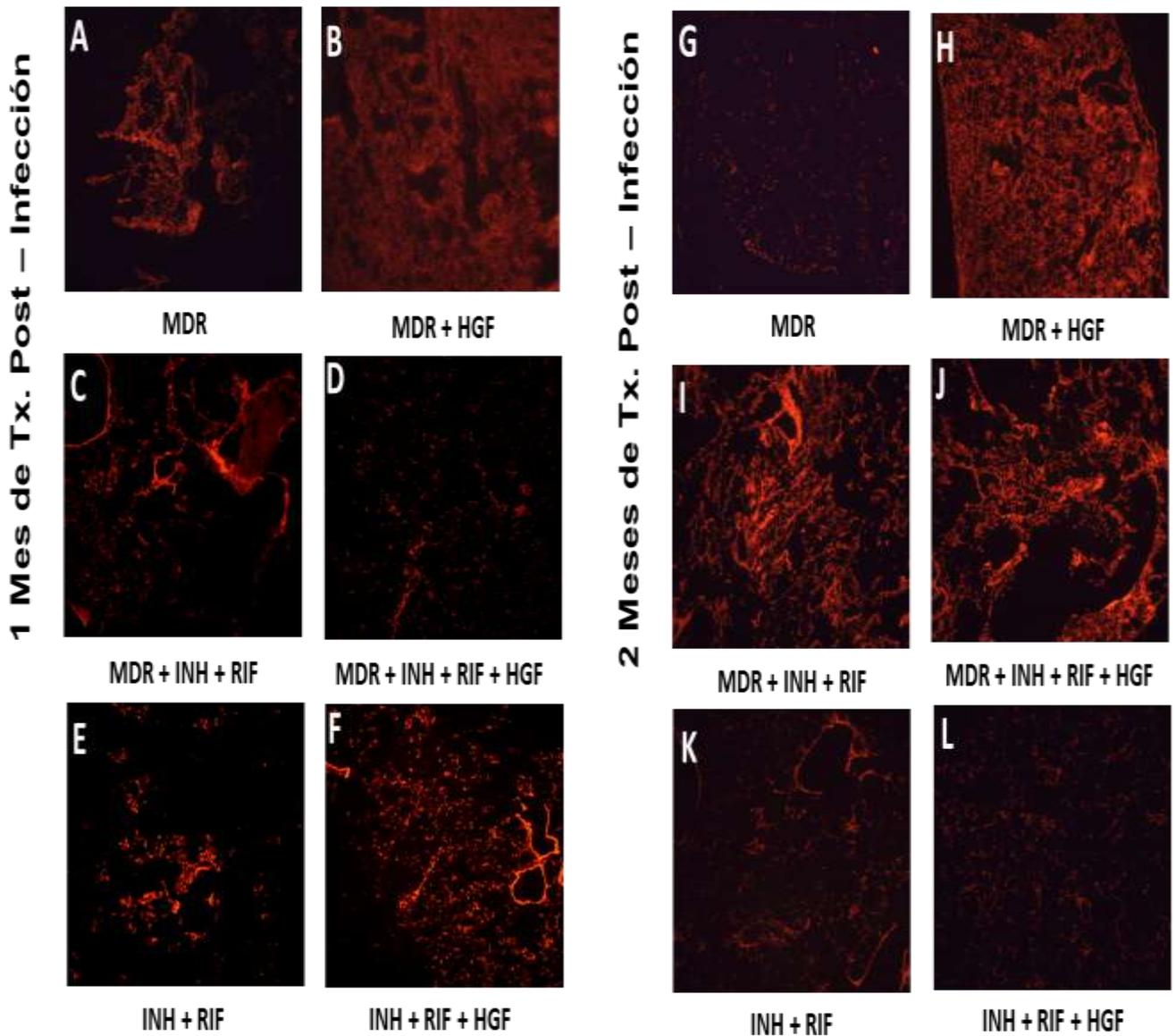


Figura 14. Imágenes representativas de la determinación de anión superóxido *in situ* en criocortes frescos de pulmón. Las imágenes representan la inmunofluorescencia del dihidroetidio (DHE) tomadas con el objetivo 40x. HGF tiene un papel dual en pulmón. Incrementa el efecto prooxidante en tejido pulmonar de animales infectados y tratados con HGF (B y H) y en animales infectados tratados con fármacos antifímicos por vía It y HGF (D y J) y disminuye este efecto prooxidante en animales sanos y tratados con fármacos antifímicos por vía It y con HGF (F y L).

5) *Histopatología hepática.*

Finalmente se evaluó la integridad del hígado mediante tinción de H&E. En la **Figura 15** se muestran los tejidos de animales sanos e infectados en donde se puede observar granulomas (**Figura 15 G**). A diferencia de la vía Ig cuando estos animales infectados son tratados por vía It con dosis suprafarmacológicas de antifímicos y HGF no muestran cambios significativos en su arquitectura a un mes de tratamiento (**Figura 15 C, D, E, F**); sin embargo después de dos meses aquellos animales infectados y tratados con antifímicos muestran esteatosis microvesicular leve (**Figura 15 I**) debido a la agresión tóxica, sugiriendo que mediante esta vía de administración el daño hepático es menor. Esta esteatosis microvesicular es abatida en aquellos animales que se encuentran infectados y son tratados con los antifímicos y el HGF (**Figura 15 J**). Los animales sanos presentan un comportamiento similar a los animales infectados con la aparición de pequeñas gotas lipídicas en el tejido hepático después de dos meses de Tx (**Figura 15 K**). De igual manera cuando son tratados con los antifímicos y el HGF la esteatosis microvesicular desaparece (**Figura 15 L**), sugiriendo un proceso de reparación hepática después de la agresión tóxica.

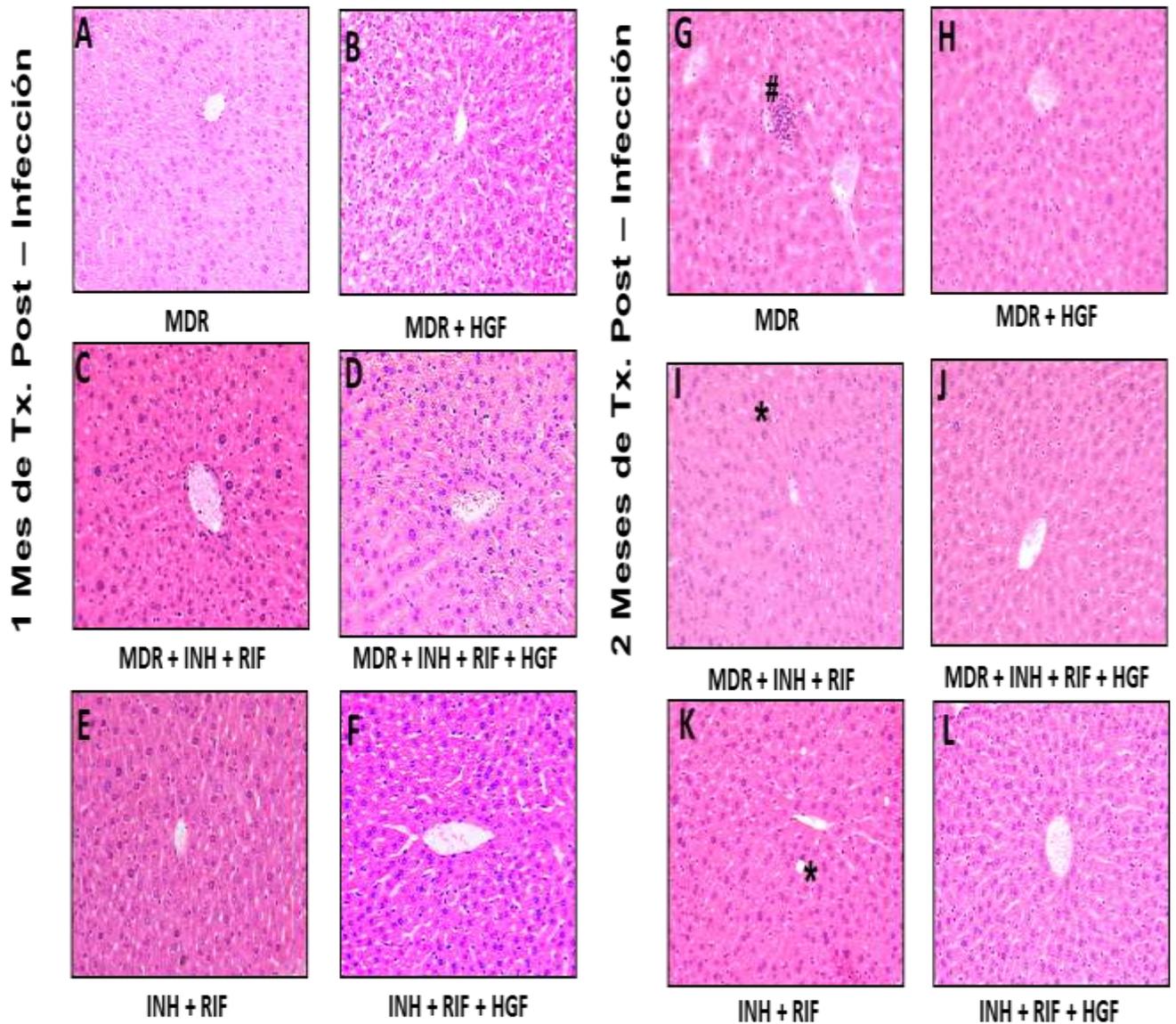


Figura 15. Imágenes histológicas representativas de hígado tomadas con el objetivo 40x. HGF disminuye la esteatosis hepática en animales sanos e infectados que son tratados con dosis suprafarmacológicas de fármacos antituberculosos por vía It. Los símbolos representan alteraciones en la arquitectura hepática (# representa granuloma hepático; * representa esteatosis microvesicular a 2 mes de Tx).

6) *Determinación de anión superóxido en hígado.*

La INH y la RIF incrementan la señal fluorescente al anión superóxido tanto de animales sanos (**Figura 16 K**) como de aquellos que se encuentran infectados con Mtb (**Figura 16 G e I**) a dos meses de Tx con los antifímicos por vía It, mostrando que cuando el antifímico es depositado de manera local disminuye la cantidad del mismo que llega a ser biotransformado en el hígado, por lo que no se observa tanta señal positiva al anión superóxido, sugiriendo que el nivel de estrés es menor que en la vía Ig, lo cual correlaciona con la aparición de esteatosis microvesicular hasta los dos meses de Tx y menor daño hepático . Además esta señal fluorescente positiva a anión superóxido es disminuida en presencia de HGF en animales sanos (**Figura 16 L**) e infectados (**Figura 16 J**), sugiriendo un proceso de protección hepática al disminuir el estrés oxidante iniciado por esta especie reactiva. Estos datos están directamente relacionados con una arquitectura hepática normal evaluada por microscopia convencional.

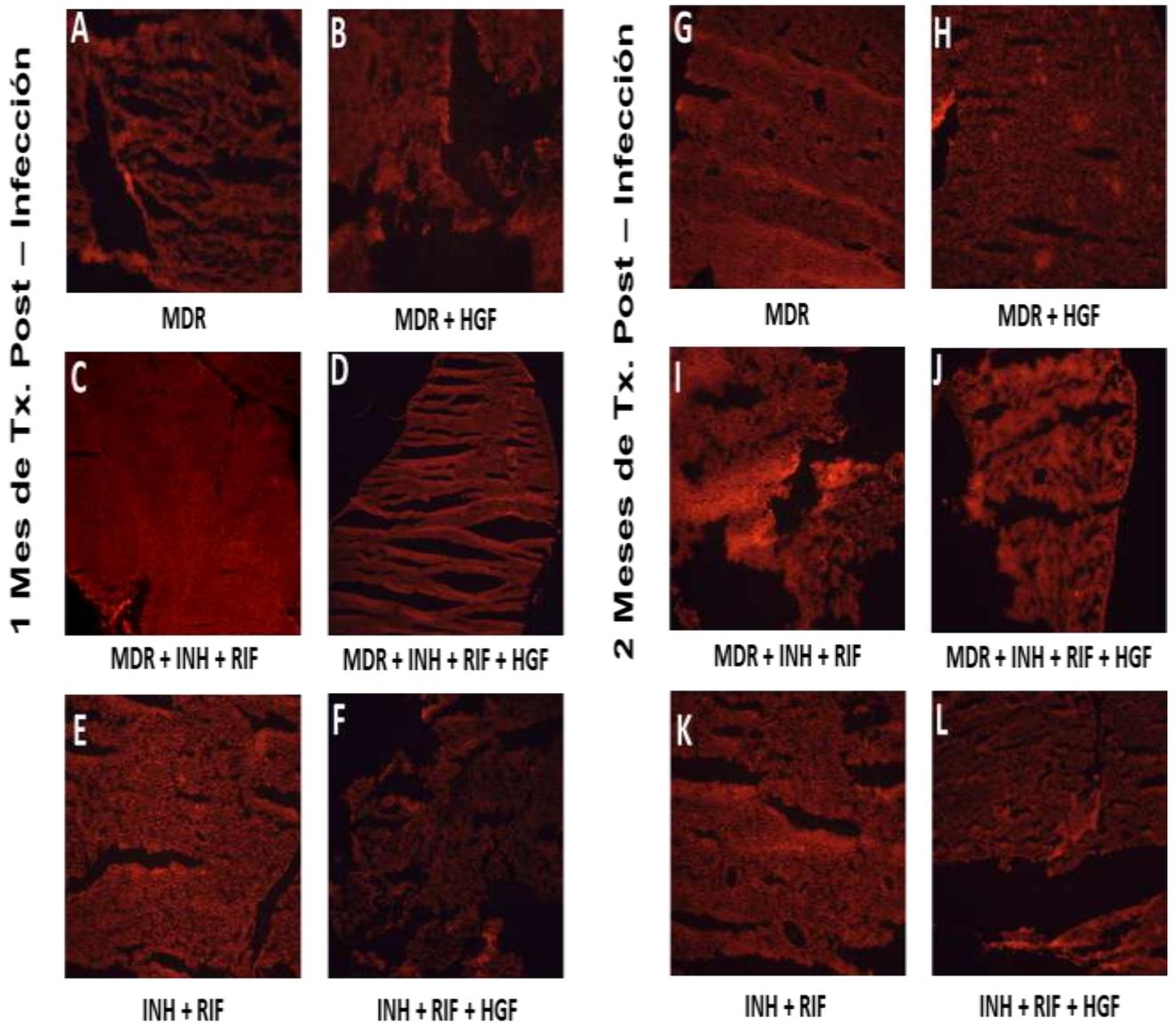


Figura 16. Imágenes representativas de la determinación de anión superóxido *in situ* en criocortes frescos de hígado. Las imágenes representan la inmunofluorescencia del dihidroetidio (DHE) tomadas con el objetivo 40x. El HGF disminuye el efecto prooxidante inducido por los fármacos antifímicos, en tejido hepático de animales infectados y tratados con HGF (B Y H), animales infectados tratados con antifímicos por vía It y HGF (D y J) y animales sanos que son tratados con los fármacos antifímicos por vía It y HGF (F y L).

Discusión.

Dos millones de personas mueren anualmente a causa de Tb, una enfermedad infecciosa tratable y curable. Entre los efectos adversos del Tx antifímico están las reacciones de la piel, desórdenes neurológicos y ATDH, que causa sustancial morbilidad y mortalidad, contribuyendo a la falla en el Tx y recaída de los pacientes (Tostmann et al., 2008). Aunado a esto la OMS reporta un incremento del 42% en la aparición de cepas MDR en 2012 que complica el panorama en esta enfermedad (OMS, 2013), Chang y Leung sugieren que al incrementar las dosis de los fármacos convencionales estos serán capaces de eliminar bacterias MDR con el riesgo de desarrollar ATDH. Es bien sabido que INH en combinación con RIF inducen daño hepático leve, moderado e incluso falla hepática fulminante, cuadro que depende principalmente de la capacidad hepática del individuo para la biotransformación de los antifímicos (Cillo et al., 2005; Idilman et al., 2006). Es por ello, que surge la necesidad de identificar moléculas que desplieguen respuestas de protección hepática y puedan ser administradas terapéuticamente, antes de dar inicio al Tx o en conjunto con los antifímicos disponibles, lo cual puede cambiar el panorama actual de esta enfermedad.

El receptor c-Met a diferencia de otros, es activado únicamente por el HGF. La importancia de esta relación uno a uno, ha sido demostrada mediante la eliminación condicional del receptor c-Met en hígado, en donde los efectos fisiológicos y terapéuticos del HGF son únicos, por lo que no pueden ser sustituidos en su totalidad por la acción de ningún otro factor de crecimiento (Marquardt et al., 2012). El HGF puede inducir la activación de vías de señalización como Erk, STAT3 o Akt que eventualmente activan al factor de transcripción NF-kB, desplegando la expresión de genes que codifican proteínas tanto antioxidantes como antiapoptóticas (Gomez-Quiroz et al., 2008), o permitir la expresión de enzimas de fase II y III de detoxificación al modular al factor de transcripción Nrf2 (Kaposi-Novak et al., 2006).

El principal mecanismo de daño celular inducido por INH, es la producción de ROS (Tafazoli et al., 2008) provenientes del sistema de oxidación microsomal, particularmente el CYP2E1 (Sotsuka et al.). En el presente trabajo, confirmamos en un modelo de Tb pulmonar progresiva, que la terapia de INH en combinación con RIF induce la sobreproducción de anión superóxido *in situ* en hígado tanto por vía Ig (**Figura 11 C, E, I y K**) como It (**Figura 16 C, E, I y K**). Este hallazgo fue relacionado con la deposición de lípidos (esteatosis) que por sí mismos promueven el estrés oxidante (Rolo et al., 2012), el cual puede exacerbar el desbalance redox en el órgano bajo Tx crónico. Esta esteatosis fue observada en la vía Ig desde el primer mes (**Figura 10 C, E, I y K**); mientras que la vía It estas alteraciones aparecen hasta el segundo mes de Tx (**Figura 15 I y K**), tal vez debido a que la deposición de los fármacos antifímicos de manera local permite que sea muy poca la cantidad de fármaco que llegue al hígado y pueda dañarlo.

Datos de Enriquez-Cortina et al., 2013 muestran que el HGF disminuye a valores normales la expresión de CYP2E1, lo cual asegura un buen metabolismo de los fármacos sin exacerbar el efecto oxidante, reduciendo así el efecto prooxidante de los antifímicos. El control en la generación de las ROS quedó comprobada por la determinación *in situ* de anión superóxido en la vía Ig (**Figura 11 D, F, J y L**) y la It (**Figura 16 D, F, J y L**).

Todos estos hallazgos nos hacen hipotetizar que el HGF protege al hígado reduciendo el efecto prooxidante de los antifímicos, disminuyendo la apoptosis y la inflamación por un mecanismo mediado por PKC delta (Enriquez-Cortina et al., 2013). Aunque falta indagar en estas vías de señalización para corroborar que efectivamente se trata de este mecanismo, propuesto con anterioridad por (Enriquez-Cortina et al., 2013).

La Tb es una enfermedad pulmonar de progresión lenta cuyo agente causal son los bacilos del género Mtb, un organismo facultativo intracelular el cual usualmente infecta los pulmones. La primera interacción que tiene Mtb con el hospedero es con componentes de la respuesta inmune innata, como macrófagos alveolares y

células dendríticas (DC), iniciando la respuesta inflamatoria local, que se caracteriza por un reclutamiento exagerado de células mieloides al pulmón. Posteriormente, las micobacterias viables se diseminan hacia los ganglios linfáticos regionales, donde los linfocitos T son activados vía complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se generan linfocitos T efectores que también serán reclutados al pulmón observándose así áreas de consolidación neumónica (Martino, 2008) **Figura 8 A, G y Figura 13 A, G**) lo cual correlaciona con una elevada carga bacilar (**Grupo MDR Figura 7 y Figura 12**).

Una vez que los macrófagos alveolares fagocitan a Mtb se inicia una serie de mecanismos bactericidas por parte de la respuesta inmune innata. Uno de los más importantes se conoce como “estallido respiratorio”, cuyo objetivo es la eliminación de las bacterias fagocitadas. El mecanismo requiere el adecuado ensamblaje y activación de la enzima NADPH oxidasa para producir anión superóxido y de la iNOS para producir óxido nítrico (Ng et al., 2004; Singh et al., 2004). El anión superóxido producido por la NADPH oxidasa puede ser detectado con la sonda permeable DHE (**Figura 9 A, G y Figura 14 A, G**), el cual se ve incrementado en presencia del HGF en pulmón (**Figura 9 B, H y Figura 14 B, H**) confirmando que HGF regula esta enzima pro-oxidante como lo reportado por (Clavijo-Cornejo et al., 2013) participando en el control de la infección y disminuyendo así la carga bacilar (**Grupo MDR+HGF Figura 7 y Figura 12**) y las áreas de neumonía (**Grupo MDR+ HGF Figura 8 B, H y Figura 13 B, H**) sugiriendo un papel inmunomodulador del HGF en la Tb pulmonar progresiva.

Es bien sabido que la INH en combinación con la RIF pueden eliminar micobacterias fármaco-sensibles y el incremento de la dosis de estos antifímicos puede ayudar a eliminar micobacterias MDR (Chang and Leung). En este trabajo comprobamos que dosis suprafarmacológicas de los antifímicos eliminan bacterias MDR (**Grupo MDR+INH+RIF Figura 7 y Figura 12**), y esta disminución se ve potenciada en presencia del HGF (**MDR+INH+RIF+HGF Figura 7 y Figura 12**) aminorando las áreas de consolidación neumónica (**Figura 8 C e I y Figura 13 C e I**), siendo más evidente en los grupos tratados con antifímicos a dosis

suprafarmacológicas y con el HGF (**Figura 8 D, J y Figura 13 D**) observando incluso en la vía It la formación de granulomas (**Figura 13 J**) y evitar así la diseminación linfo-hematógena (Hernandez-Pando et al., 1996).

En cuanto a la determinación de anión superóxido en los grupos que fueron tratados con los antifímicos no existen cambios en la fluorescencia positiva a DHE (**Figura 9 C e I y Figura 14 e I**) comprobando así que la eliminación bacteriana es debida a la presencia de los antifímicos, sin embargo aquellos grupos tratados con antifímicos y HGF se incrementa la fluorescencia positiva a DHE (**Figura 9 D, J y Figura 14 D, J**) sugiriendo una activación eficiente de la NADPH oxidasa para la eliminación micobacteriana y el control de la infección. Como era de esperar en los ratones sanos que fueron tratados con los fármacos antifímicos ya sea por vía Ig o por vía It, no existen alteraciones en la arquitectura pulmonar (**Figura 9 E, F, K, L y Figura 14 E, F, K, L**). Sorprendentemente el HGF disminuye la fluorescencia positiva a DHE en pulmón en animales tratados con los antifímicos (**Figura 9 F, L y Figura 14 F, L**) sugiriendo que el control de la NADPH oxidasa en Tb pulmonar progresiva por HGF es dependiente de la presencia de la micobacteria.

Conclusiones

- 1) Las dosis suprafarmacológicas empleadas por vía Ig y por vía It eliminan bacterias MDR, disminuyendo la carga bacilar en pulmón.
- 2) El HGF protege al hígado y aminora las áreas de consolidación neumónica induciendo procesos de reparación hepática y pulmonar.
- 3) El HGF proporciona protección hepática y pulmonar frente a ROS jugando un papel dual en pulmón:
 - a) En animales sanos el HGF brinda protección al pulmón contra ROS generadas al someter a los animales a Tx con INH y RIF a dosis suprafarmacológicas.
 - b) Por otra parte en animales infectados con una cepa MDR de Mtb el nivel de ROS aumenta sugiriendo activación de células inmunocompetentes en Tb.
- 4) El mecanismo protector del HGF es el mismo reportado por (Enriquez-Cortina et al., 2013).
- 5) La esteatosis hepática producida al someter a los animales a dosis suprafarmacológicas de antifímicos es abatida en presencia de HGF.

Bibliografía

(1983). The use of rifampin in the treatment of nontuberculous infections. Symposium held in San Francisco, California April 1982. *Rev Infect Dis 5 Suppl 3*, S399-632.

Barrios-Payan, J.A., Castanon-Arreola, M., Flores-Valdez, M.A., and Hernandez-Pando, R. (2010). [Biological, clinical and epidemiological aspects of latent tuberculosis]. *Salud Publica Mex 52*, 70-78.

Barry, C.E., 3rd, Lee, R.E., Mdluli, K., Sampson, A.E., Schroeder, B.G., Slayden, R.A., and Yuan, Y. (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res 37*, 143-179.

Beyer, T.A., Xu, W., Teupser, D., auf dem Keller, U., Bugnon, P., Hildt, E., Thiery, J., Kan, Y.W., and Werner, S. (2008). Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J 27*, 212-223.

Cillo, U., Bassanello, M., Vitale, A., D'Antiga, L., Zanusi, G., Brolese, A., Burra, P., Ciarleglio, F.A., Guariso, G., Zancan, L., *et al.* (2005). Isoniazid-related fulminant hepatic failure in a child: assessment of the native liver's early regeneration after auxiliary partial orthotopic liver transplantation. *Transpl Int 17*, 713-716.

Clavijo-Cornejo, D., Enriquez-Cortina, C., Lopez-Reyes, A., Dominguez-Perez, M., Nuno, N., Dominguez-Meraz, M., Bucio, L., Souza, V., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S., *et al.* (2013). Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie 95*, 1177-1184.

Clínica, G.d.P. (2009). Diagnóstico y tratamiento de casos nuevos de tuberculosis pulmonar (México, Secretaria de Salud).

Chang, K.C., and Leung, C.C. (2010). The best approach to reintroducing tuberculosis treatment after hepatotoxicity is still open to debate. *Clin Infect Dis 51*, 366-367; author reply 367-368.

Chen, X., Xu, J., Zhang, C., Yu, T., Wang, H., Zhao, M., Duan, Z.H., Zhang, Y., Xu, J.M., and Xu, D.X. (2011). The protective effects of ursodeoxycholic acid on isoniazid plus rifampicin induced liver injury in mice. *Eur J Pharmacol*.

- Enriquez-Cortina, C., Almonte-Becerril, M., Clavijo-Cornejo, D., Palestino-Dominguez, M., Bello-Monroy, O., Nuno, N., Lopez, A., Bucio, L., Souza, V., Hernandez-Pando, R., *et al.* (2013). Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* *135*, 26-36.
- Fan, S., Gao, M., Meng, Q., Latterra, J.J., Symons, M.H., Coniglio, S., Pestell, R.G., Goldberg, I.D., and Rosen, E.M. (2005). Role of NF-kappaB signaling in hepatocyte growth factor/scatter factor-mediated cell protection. *Oncogene* *24*, 1749-1766.
- Ferguson, J.S., and Schlesinger, L.S. (2000). Pulmonary surfactant in innate immunity and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis* *80*, 173-184.
- Flynn, J.L., and Chan, J. (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* *19*, 93-129.
- Ganz, T. (2002). Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* *109*, 693-697.
- Glaziou, P., Floyd, K., and Raviglione, M. (2009). Global burden and epidemiology of tuberculosis. *Clin Chest Med* *30*, 621-636, vii.
- Gomez-Quiroz, L.E., Factor, V.M., Kaposi-Novak, P., Coulouarn, C., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2008). Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* *283*, 14581-14589.
- Gorocica, P. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* *18*, 142-153.
- Hernandez-Pando, R., Orozco, H., Sampieri, A., Pavon, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., Alcocer, J.M., and Madrid, M.V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* *89*, 26-33.
- Huang, Y.S., Chern, H.D., Su, W.J., Wu, J.C., Chang, S.C., Chiang, C.H., Chang, F.Y., and Lee, S.D. (2003). Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* *37*, 924-930.

Idilman, R., Ersoz, S., Coban, S., Kumbasar, O., and Bozkaya, H. (2006). Antituberculous therapy-induced fulminant hepatic failure: successful treatment with liver transplantation and nonstandard antituberculous therapy. *Liver Transpl* *12*, 1427-1430.

Ishizawa, K., Kubo, H., Yamada, M., Kobayashi, S., Suzuki, T., Mizuno, S., Nakamura, T., and Sasaki, H. (2004). Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* *324*, 276-280.

Kaposi-Novak, P., Lee, J.S., Gomez-Quiroz, L., Coulouarn, C., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. (2006). Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *The Journal of clinical investigation* *116*, 1582-1595.

Kaufmann, S.H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* *1*, 20-30.

Keshavjee, S., and Farmer, P.E. (2012). Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. *N Engl J Med* *367*, 931-936.

Knowles, M.R., and Boucher, R.C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* *109*, 571-577.

Marquardt, J.U., Seo, D., Gomez-Quiroz, L.E., Uchida, K., Gillen, M.C., Kitade, M., Kaposi-Novak, P., Conner, E.A., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. (2012). Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl(4) exposure through deregulation of multiple molecular pathways. *Biochimica et biophysica acta* *1822*, 942-951.

Martino, A. (2008). Mycobacteria and innate cells: critical encounter for immunogenicity. *J Biosci* *33*, 137-144.

Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1992). Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. *Crit Rev Oncog* *3*, 27-54.

Mizuno, S., Matsumoto, K., Li, M.Y., and Nakamura, T. (2005). HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis. *FASEB J* *19*, 580-582.

Moumen, A., Ieraci, A., Patane, S., Sole, C., Comella, J.X., Dono, R., and Maina, F. (2007). Met signals hepatocyte survival by preventing Fas-triggered FLIP degradation in a PI3k-Akt-dependent manner. *Hepatology* 45, 1210-1217.

Nakagami, H., Morishita, R., Yamamoto, K., Taniyama, Y., Aoki, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaneda, Y., Horiuchi, M., and Ogihara, T. (2001). Mitogenic and antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3, and AKT in endothelial cells. *Hypertension* 37, 581-586.

Nakamura, T., and Mizuno, S. (2010). The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86, 588-610.

Ng, V.H., Cox, J.S., Sousa, A.O., MacMicking, J.D., and McKinney, J.D. (2004). Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol* 52, 1291-1302.

OMS (2013). Global Tuberculosis Report.

Palestino-Dominguez, M. (2012). El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor c-Met en la protección contra el daño hepático inducido por el alcohol. *REB* 31, 118-126.

Panganiban, R.A., and Day, R.M. (2011). Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis. *Acta Pharmacol Sin* 32, 12-20.

Rolo, A.P., Teodoro, J.S., and Palmeira, C.M. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free radical biology & medicine* 52, 59-69.

Sakamaki, Y., Matsumoto, K., Mizuno, S., Miyoshi, S., Matsuda, H., and Nakamura, T. (2002). Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumonectomy compensatory lung growth in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 525-533.

Sande, M.A. (1983). The use of rifampin in the treatment of nontuberculous infections: an overview. *Rev Infect Dis* 5 *Suppl* 3, S399-401.

Schluger, N.W. (2001). Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res* 2, 157-163.

Segura-Flores, A. (2004). Factor de crecimiento de hepatocitos y sus aplicaciones terapéuticas *Rev. Gastroenterol. Mex.* 69.

SINAVE (2013). Resultados de la misión de evaluación del programa de control de la tuberculosis en México. 2da Reunión Operativa, SS, DGVE. .

Singh-Kaw, P., Zarnegar, R., and Siegfried, J.M. (1995). Stimulatory effects of hepatocyte growth factor on normal and neoplastic human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 268, L1012-1020.

Singh, R., Wiseman, B., Deemagarn, T., Donald, L.J., Duckworth, H.W., Carpena, X., Fita, I., and Loewen, P.C. (2004). Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. *The Journal of biological chemistry* 279, 43098-43106.

Sotsuka, T., Sasaki, Y., Hirai, S., Yamagishi, F., and Ueno, K. (2011). Association of isoniazid-metabolizing enzyme genotypes and isoniazid-induced hepatotoxicity in tuberculosis patients. *In Vivo* 25, 803-812.

Suk, K.T., and Kim, D.J. (2011). Drug-induced liver injury: present and future. *Clin Mol Hepatol* 18, 249-257.

Suk, K.T., and Kim, D.J. (2012). Drug-induced liver injury: present and future. *Clin Mol Hepatol* 18, 249-257.

Tafazoli, S., Mashregi, M., and O'Brien, P.J. (2008). Role of hydrazine in isoniazid-induced hepatotoxicity in a hepatocyte inflammation model. *Toxicol Appl Pharmacol* 229, 94-101.

Takami, T., Kaposi-Novak, P., Uchida, K., Gomez-Quiroz, L.E., Conner, E.A., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. (2007). Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer research* 67, 9844-9851.

Tostmann, A., Boeree, M.J., Aarnoutse, R.E., de Lange, W.C., van der Ven, A.J., and Dekhuijzen, R. (2008). Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *J Gastroenterol Hepatol* 23, 192-202.

Valdes-Arzate, A., Luna, A., Bucio, L., Licona, C., Clemens, D.L., Souza, V., Hernandez, E., Kershenobich, D., Gutierrez-Ruiz, M.C., and Gomez-Quiroz, L.E. (2009). Hepatocyte

growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free radical biology & medicine* *47*, 424-430.

van Crevel, R., Ottenhoff, T.H., and van der Meer, J.W. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* *15*, 294-309.

Walubo, A., Smith, P., and Folb, P.I. (1998). The role of oxygen free radicals in isoniazid-induced hepatotoxicity. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* *20*, 649-655.

Wang, X., Zhou, Y., Kim, H.P., Song, R., Zarnegar, R., Ryter, S.W., and Choi, A.M. (2004). Hepatocyte growth factor protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* *279*, 5237-5243.

Yanagita, K., Nagaike, M., Ishibashi, H., Niho, Y., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1992). Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. *Biochem Biophys Res Commun* *182*, 802-809.

Yee, D., Valiquette, C., Pelletier, M., Parisien, I., Rocher, I., and Menzies, D. (2003). Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* *167*, 1472-1477.