

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS PÉPTIDOS HH2, 1002, 1018  
Y K9 CONTRA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37Rv *IN VITRO* Y  
BAJO UN MODELO MURINO**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA

VÍCTOR MANUEL DEL VILLAR PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS

PhD. ALMA ROSSANA TAMAYO SOSA

MEXICALI, B.C., MÉXICO

ENERO 2012

## **AGRADECIMIENTOS**

Un sincero agradecimiento a los doctores Bruno Rivas Santiago, Tonatiuh Melgarejo, Héctor Orozco y al Doctor Hernández- Pando por permitirme realizar mis experimentos en sus instalaciones, pero muy en especial a la Doctora Alma Tamayo por confiar en mí, por brindarme todo el apoyo, consejos, regaños todo con el único objetivo de formarme profesionalmente y culminar así mis estudios para usted mi más sincero y enorme agradecimiento.

A los docentes que a través de su cátedra me prepararon y me permitieron realizar cada uno de las partes de mi proyecto.

A cada uno de los amigos ya que sin su valioso apoyo hubiese cometido muchos errores en los experimentos. A mis amigos de la Unidad de Investigación Médica de Zacatecas en especial a Vasti, ya que sin su ayuda mi estancia hubiese sido muy pesada.

A mis tíos de Zacatecas por brindarme su apoyo y alojamiento.

A mi querida amiga Diana Portilla por su enorme ayuda incondicional y tanta paciencia.

Gracias a Dios y a ustedes ahora soy lo que ayer soñé.

## **DEDICATORIA**

Primeramente dedicar esta tesis a Dios por caminar a mi lado conmigo siempre y permitirme concluir una etapa más de mi vida.

A mis padres quienes me han conducido por la vida con amor y paciencia. Gracias por los consejos siempre oportunos, por sus oraciones y por su apoyo incondicional.

Infinitamente mi agradecimiento ya que mi triunfo y mi cariño son suyos. Que Dios los bendiga y los guarde para siempre.

**Actividad antimicrobiana de los péptidos hh2, 1002, 1018 y k9 contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro* y bajo un modelo murino. Tesis presentada por MVZ. Víctor Manuel Del Villar Pérez como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el Comité Particular indicado:**

---

PhD. Alma Rossana Tamayo Sosa

Director

---

M.C. Laura Elena Silva Paz

Asesor

---

Dr. José Ángel Olivas Valdéz

Asesor

---

Dr. Luis Tinoco Gracia

Asesor

Mexicali Baja California México.

Enero 2012

# CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	i
RESUMEN .....	ii
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
Problema actual de la tuberculosis.....	4
Estrategias actuales para su control .....	5
Tratamiento .....	6
Multifármaco- Resistencia .....	8
Nuevos fármacos .....	10
Péptidos antimicrobianos .....	11
Propiedades estructurales.....	12
Mecanismo de acción microbicida de los péptidos antimicrobianos.....	13
Funciones Inmunomoduladoras de los péptidos antimicrobianos .....	15
Aplicaciones clínicas de los péptidos antimicrobianos .....	16
MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
Localización del área de estudio .....	20
Duración del estudio.....	20
Origen de la información .....	20
Variables evaluadas .....	21
Metodología.....	21
Ensayo colorimétrico de azul alamar.....	21
Péptidos antimicrobianos .....	22
Preparación de la microplaca .....	22
Ensayo de citotoxicidad .....	24
Microscopia electrónica .....	25
Modelo experimental de infección de tuberculosis en ratones .....	26
Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmón ...	28
Preparación de tejido pulmonar para histología y morfometría .....	29
Análisis estadístico .....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
CONCLUSIONES.....	48
LITERATURA CITADA.....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pág</b>
1	MIC obtenido de cada uno de los péptidos así como del antibiótico frente a <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por el método colorimétrico de azul alamar.....	32
2	Resultado de viabilidad celular en la línea A549, obtenido para cada uno de los péptidos a 3 diferentes concentraciones.....	34
3	Efecto de los péptidos sobre <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	36
4	Efecto del péptido K9 .....	37
5	UFC contabilizadas al primer tiempo de sacrificio (30 días)	39
6	UFC contabilizadas al segundo tiempo de sacrificio (60 días).....	41
7	Análisis de los datos de UFC a los 30 y 60 días de tratamiento.....	42
8	Porcentaje del área neumónica al primer tiempo de sacrificio (30 días).....	44
9	Porcentaje del área neumónica al segundo tiempo de sacrificio (60 días).....	46
10	Análisis de los datos de porcentaje de área neumónica a los 30 y 60 días de tratamiento.....	47

## RESUMEN

Los péptidos HH2, 1002, 1018 y K9, fueron evaluados contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *in vitro* e *in vivo*. En el ensayo colorimétrico de azul alamar el péptido K9 fue el que mostró el MIC más bajo de 10.66 µg/ml. Al evaluar la citotoxicidad de los péptidos a una concentración de 32 µg/ml, el porcentaje de viabilidad osciló el 75% y 95%. En imágenes de microscopía electrónica se observaron marcadas interrupciones de la membrana y condensación del contenido citoplasmático. En el modelo murino de tuberculosis progresiva, a los 30 días de tratamiento con los péptidos se observó una disminución en la carga bacteriana en pulmón para los ratones tratados con los péptidos HH2, 1018 y K9, mientras que los tratados con el péptido 1002 mostraron un aumento de la carga bacilar, en comparación con el grupo testigo. A los 60 días de tratamiento el conteo de unidades formadoras de colonia resultó en una disminución de la carga bacteriana en todos los animales tratados con todos los péptidos. A fin de determinar si estos péptidos inducen inflamación se evaluó el porcentaje de área neumónica y se observó que al primer y segundo tiempo de sacrificio hubo una disminución en comparación con el grupo de ratones testigo, cuando los ratones fueron tratados con los péptidos HH2, 1002 y K9. Sin embargo, los ratones tratados con el péptido 1002 mostraron un mayor porcentaje de neumonía en el primer tiempo de sacrificio el cual disminuyó en el segundo tiempo. De los péptidos

evaluados, el K9 fue el único que mostró diferencias significativas pudiendo ser el mejor candidato en la terapéutica farmacológica de la tuberculosis.

**Palabras Claves:** Péptidos Antimicrobianos; *Mycobacterium tuberculosis*; Modelo Murino.

## ABSTRACT

The peptides HH2, 1002, 1918 and K9 were evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro* and *in vivo*. The peptide K9 showed the lowest MIC (10.66 µg/ml), by the alamar blue colorimetric assay. Moreover, no cytotoxic effects were shown by any of the peptides at 32 µg/ml, since the viability of lung cells (strain A549) oscillated between 75% to 95%. Electron microscopy images obtained of *M. tuberculosis* treated with the peptides showed disruption of the membrane and condensation of the cytoplasmic content. In a murine model of progressive tuberculosis after 30 days of treatment a decrease in the number of bacteria counts was observed in the lungs of mice treated with the peptides HH2, 1018 and K9, while mice treated with the peptide 1002 showed an increase in the number of bacteria when compared with the control group. Meanwhile, mice treated for 60 days with all the peptides showed a decrease in bacterial lung counts. Moreover, in order to determine if these peptides induce an inflammatory response the percentage of pneumonia was evaluated after 30 and 60 days of treatment and it was observed that mice treated with HH2, 1018 and K9 showed a decrease of pneumonic area. However, mice treated with the peptide 1002 showed a higher percentage of pneumonia at 30 days of treatment but decreased at 60 days. Of the four peptides evaluated in this study only K9 showed statistically significant differences and can be considered as a potential candidate for the treatment of tuberculosis.

**Keywords:** Antimicrobial peptides; *Mycobacterium tuberculosis*; Murine model.

.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis continúa siendo un problema de salud a lo largo del mundo con una inaceptable tasa de nuevos casos que oscila entre los 233 413 pacientes y más de 2 mil millones de muertes al año. La Organización Mundial de la Salud estima que 2 millones de personas o un tercio de la población global, están actualmente infectados con bacilos de tuberculosis. De los infectados se estima que 1 de 10 desarrollará la forma activa en algún punto de sus vidas y estos infectaran a un promedio de 10 a 15 personas por año sino son tratados (Guzmán- Montes et al., 2009).

A la fecha la Organización Mundial de la Salud ha elaborado varios métodos para el control de la tuberculosis, de los cuales se ha implementando el Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES), el cual consiste en medicar a los pacientes tuberculosos con los fármacos comunes y supervisar la correcta administración de éstos (Frothingham et al., 2005). Los tratamientos más comunes contra la tuberculosis están basados en el uso de rifampizina, isoniazida, pirazinamida y etambutol, sin embargo a la fecha y desde hace 30 años no han surgido medicamentos nuevos para el tratamiento de la tuberculosis. Con la implementación de nuevos medicamentos se espera acortar el tiempo de tratamiento y que los nuevos antibióticos tengan idealmente la capacidad de interactuar con el sistema inmune del individuo infectado, además de ofrecer nuevos mecanismos de acción para eliminar a la

micobacteria. A la fecha y desde la implementación de la rifampicina en 1966 no ha habido nuevos medicamentos contra la tuberculosis y las empresas farmacéuticas han demostrado poco interés en combatir este grave problema mundial. Así mismo, la aparición de cepas multi- fármaco resistentes a las drogas convencionales ha obligado a varios grupos de investigación a que desarrollen nuevas terapéuticas farmacológicas contra la tuberculosis, las cuales tienen como meta poder acortar los tiempos de la terapia farmacológica y del mismo modo evitar el surgimiento de cepas multi-fármaco resistentes (MDR).

Entre los candidatos más prometedores se encuentran los péptidos antimicrobianos los cuales son componentes de bajo peso molecular, catiónicos, anfipáticos y son producidos por las células del organismo como parte fundamental de la respuesta inmune innata en contra de muchas enfermedades infecciosas. Además, se sabe que tienen un efecto microbicida sobre una amplia gama de bacterias, hongos, virus y protozoarios (Gutiérrez y Orduz. 2003).

Recientemente, se ha evaluado el potencial de los péptidos antimicrobianos para el tratamiento de la tuberculosis. A partir del 2011 a la fecha se han publicado resultados de trabajos *in vitro* y en diferentes modelos animales que sugieren la posible utilización de los péptidos antimicrobianos como alternativas de tratamiento para la tuberculosis.

**Por lo anterior, el objetivo del presente estudio es evaluar la actividad antimicrobiana de los péptidos HH2, 1002, 1018 y K9 contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *in vitro* y bajo un modelo murino.**

# REVISIÓN DE LITERATURA

## Problema actual de la tuberculosis

La tuberculosis (Tb) del latín *tuberculum*, que significa pequeña protuberancia, pequeño nódulo, es una enfermedad que afecta principalmente a los pulmones y es causada por un bacilo con tinción ácido-alcohol resistente al cual se le conoce como *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (Dye et al., 1999). Es la enfermedad infecciosa que representa uno de los principales problemas para la salud pública, de ahí que requiere atención urgente. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su informe del 2009 señala que existen en todo el mundo alrededor de 9.4 millones de casos nuevos de Mtb y se registran 1.3 millones de defunciones por esta causa, de las cuales 0.38 millones de pacientes presentaban infección por el VIH (WHO, 2010). Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada y de estos tan solo entre el 5 y 10% desarrollarán la enfermedad en algún momento de su vida, sobre todo si existen factores de riesgo como diabetes y VIH (Harries y Dye, 2006).

Aunque se ha registrado una disminución en la tasa mundial de casos de Tb, existen regiones donde el número de casos ha ido en aumento, específicamente en África y Asia Suroriental, donde se presentan casi dos terceras partes de los casos en el mundo. En México, los desafíos actuales en el control de la Tb son diferentes debido a la heterogeneidad de la población,

los niveles socioeconómicos, la inequidad en los servicios y una pobre cultura en cuanto a salud (SINAVE, 2009).

En este sentido, el balance para México en el 2008 arrojó que el éxito del tratamiento es del 84.04%, lo que sitúa al país más cerca de la meta del 85% que se planteó en el Plan Mundial para detener la Tb e indica que hay pocos fracasos. El abandono del régimen terapéutico fue de 4.9% y se registró una mortalidad de 1.7 habitantes por cada 100 mil habitantes. De acuerdo con la Plataforma Única de Información Nacional en su módulo de tuberculosis, en el 2008 se notificaron alrededor de 18, 210 casos nuevos en todas sus formas, de las cuales el 82.5 % (15 035 casos) corresponden a Tb pulmonar y la asociación de la tuberculosis con otras enfermedades fue de: diabetes mellitus (21.4%), desnutrición (15.6), alcoholismo (6.8%) y VHI/SIDA (6%) (SINAVE, 2009).

### **Estrategias actuales para su control**

Desde 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha implementado nuevas estrategias para el combate de la tuberculosis basada en los trabajos del Dr. Karen Styblo en Tanzania, la cual se ha nombrado TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado). El TAES esencialmente consiste en que el medicamento debe ser estrictamente supervisado por personal de salud o personal debidamente capacitado, quien verificará la

ingesta y deglución del medicamento (WHO, 1994). En 1990 solo 10 países en el mundo tenían un sistema apropiado para el control de la tuberculosis, sin embargo al 2003 hay 182 países que cuentan con el TAES (WHO, 2005). Aunque la implementación del programa TAES en el mundo ha reducido visiblemente la incidencia de casos, el surgimiento de cepas multidrogoresistente (MDR) y la asociación con el virus de inmunodeficiencia Humana (VIH) han acentuado el problema.

## **Tratamiento**

Las metas del tratamiento anti-tuberculoso son minimizar la duración de la enfermedad, asegurar la cura, prevenir la muerte, prevenir la transmisión y además prevenir el surgimiento de cepas multifármaco-resistentes (Panickar y Hoskyns, 2006). En las lesiones tuberculosas se pueden encontrar micobacterias metabólicamente activas, con bajo metabolismo e inclusive bacilos en estado de latencia (Frothingham et al., 2005), por lo tanto, es necesario establecer una terapia que incluya antibióticos variados a fin de eliminar a todas las bacterias en los diferentes estados metabólicos.

Selman Waksman recibió el premio Nobel en 1952 por el descubrimiento del antibiótico estreptomina y proclamó que las drogas brindarían el camino para la eliminación de la “Gran Plaga Blanca”, denominada así a la tuberculosis (Jassal y Bishai, 2009). Sin embargo, en los primeros meses del uso masivo de

la estreptomina se encontraron cepas de *M. tuberculosis* resistentes a dicho antibiótico. Esto fue corroborado por el British Medical Research Council en un ensayo clínico en el que se usó únicamente estreptomina durante cinco años y se observó sólo un pequeño beneficio de la estreptomina comparado con el grupo control (British Medical Research Council, 1948).

Posteriormente se demostró que la administración simultánea de estreptomina y el ácido p-aminosalicílico, reducía la producción de cepas resistentes a estreptomina (Ryan, 1992). La isoniacida sintetizada en 1952, mostró ser más potente que la estreptomina y el ácido p-aminosalicílico. Hasta la mitad de los años sesenta se realizaron ensayos de combinaciones de estreptomina, ácido p-aminosalicílico e isoniacida, resultando un esquema efectivo a 12 meses, con terapia de los tres fármacos en los 3 primeros meses y continuando solo con 2 fármacos el resto del tratamiento. Desafortunadamente su elevado costo y alta tasa de abandonos no permitió su uso en forma masiva (Mitchison, 2005).

La rifampicina, obtenida a partir de la rifamicina B aislada del *Streptomyces mediterranei*, se usó en los modernos regímenes de quimioterapia acortados basados en rifampicina por 6 meses, los dos primeros meses acompañado de los tres fármacos: estreptomina, isoniacida y el ácido p-aminosalicílico y los cuatro últimos meses acompañado únicamente de isoniacida; este régimen ha demostrado ser el más eficaz y mejor tolerado,

pero debido al riesgo de transmisión del VIH, se decide cambiar la estreptomina que es de administración parenteral por el etambutol que es de administración oral (Hart, 1946).

A medida que se buscaban los mejores protocolos para el tratamiento de la Tb se reportaban un creciente número de casos resistentes a las drogas antituberculosas, principalmente como resultado de esquemas de tratamiento inadecuados y el mal apego a los esquemas de tratamiento por los pacientes (Frieden et al., 1993).

### **Multifármaco–Resistencia**

Como otros microorganismos, la base de la resistencia del bacilo de Koch es la selección de bacterias mutantes con resistencia innata a las drogas antituberculosas existentes. Las epidemias de cepas resistentes pueden deberse a tres mecanismos: a) conversión de cepas salvajes susceptibles durante el tratamiento (resistencia adquirida), b) incremento del desarrollo de la resistencia en cepas ya resistentes a las drogas debido a una quimioterapia inapropiada (resistencia amplificada) y c) transmisión de cepas mutantes a personas susceptibles produciendo casos nuevos o recaídas de tuberculosis resistente (resistencia transmitida) (Jassal y Bishai, 2009). La transmisión de cepas resistentes depende de la virulencia del organismo, si bien las mutaciones de resistencia pueden disminuir la capacidad de transmisión y su

potencial reproductivo, pueden producirse también mutaciones que restablezcan su capacidad virulenta como las cepas salvajes (Gillespie, 2002).

Aproximadamente el 95% de todos los aislamientos clínicos resistentes a rifampicina se deben a una mutación del gen *rpoB* que codifica la cadena  $\beta$  del DNA dependiente de la RNA polimerasa del *M. tuberculosis*. En cambio la resistencia a isoniacida es más compleja, existiendo por lo menos cinco genes implicados entre ellos, algunos de los genes de resistencia que se han descrito para drogas de primera y segunda línea (Gillespie, 2002).

Pacientes con tuberculosis sin complicaciones que reciben tratamiento inadecuado, proveen una selección favorable para las cepas mutantes resistentes porque la bacteria puede estar expuesta a un régimen monoterapéutico permitiendo la aparición de resistencia a agentes simples, por lo que la terapia combinada es necesaria como protección. Las complicaciones clínicas como el enfisema y la formación de granulomas permiten que una gran población de bacilos permanezca en un compartimiento en donde los fármacos no pueden penetrar o penetran en dosis muy bajas (Kisich et al., 2001).

La adquisición de resistencia a las drogas es casi siempre causado por un tratamiento inadecuado, esto puede incluir: que el paciente suspenda el tratamiento, errores en la prescripción de medicamentos, ineficiencia de los

sistemas de salud para suministrar las drogas de forma efectiva, o raramente una mala absorción de las drogas (Valore et al., 1998).

En pacientes infectados con un organismo que ha adquirido resistencia a un agente, es más probable que adquiriera resistencia a otro antibiótico. Una vez que un determinante de resistencia se ha adquirido, un segundo es más fácil de adquirir, y si el paciente continúa interrumpiendo su terapia y hay poca concentración de fármaco activo disponible para suprimir la aparición de mutantes resistentes, éstos emergerán (Kisich et al., 2001).

### **Nuevos Fármacos**

El principio Darwiniano de la selección natural predice que las cepas de tuberculosis resistentes a fármacos continuarán aumentando. Es por ello que la investigación en nuevas formas de tratamiento es de suma importancia. Las fluoroquinolonas son los nuevos agentes más promisorios para el tratamiento de la tuberculosis. Otros agentes terapéuticos incluyen otras clases de fármacos como las oxalidionas (Brogden et al., 2001).

Los cambios inmediatos para el control de la tuberculosis incluyen el uso de regímenes que sean más cortos o que requieran que los pacientes tomen los fármacos menos frecuentemente. Idealmente, futuros regímenes tendrán ambas características, esto es, un régimen de una toma semanal que

solamente dure 4 meses. Es crucial que fármacos nuevos, más eficientes y menos tóxicos sean descubiertos para reemplazar a aquellos que ya no resultan eficientes debido a la resistencia (Jia et al., 2001).

A pesar de que la tuberculosis es un serio problema de salud pública, la industria farmacéutica no ha mostrado un interés profundo para desarrollar nuevos fármacos en contra de esta importante enfermedad y como resultado de esto ningún nuevo agente antifímico se ha implementado desde el lanzamiento de la rifampicina en 1966. Como consecuencia, se está impulsando a grupos de investigación para la creación de nuevos tratamientos que puedan reducir el tiempo de administración y de este modo reducir el riesgo del surgimiento de nuevas cepas MDR (Jia et al., 2001).

A pesar de que existen algunos avances en el desarrollo de nuevos fármacos, se ha explorado muy poco el papel de los péptidos antimicrobianos en el tratamiento de la tuberculosis. Este tipo de péptidos podrían actuar directamente sobre la bacteria, actuar de forma sinérgica con los fármacos convencionales, o bien trabajar como inmunomoduladores de la respuesta inmune.

### **Péptidos antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés) son los principales componentes del sistema inmune innato, los cuales están bien conservados a lo largo de la evolución y no representan toxicidad para el huésped (Raj y Dentino, 2002). Representan una defensa potente ya que atacan a diversos microorganismos, entre las que se incluyen: bacterias gram negativas, gram positivas, hongos, parásitos, virus e inclusive células tumorales. El espectro de acción de los péptidos antimicrobianos esta determinado únicamente por la secuencia de aminoácidos con que esté constituido el péptido que por lo regular son menos de 100 (Zasloff, 2002).

En términos generales los péptidos antimicrobianos se pueden definir como cadenas cortas de entre 12 y 50 aminoácidos, de bajo peso molecular, codificados en el genoma. Por lo general son moléculas catiónicas debido a su alto contenido de lisina y arginina, además son anfipáticos, por lo que tienen estabilidad en ambientes acuosos como hidrofóbico y permite alterar la bicapa lipídica de los microorganismos (Boman, 1995).

### **Propiedades estructurales**

Los péptidos antimicrobianos conforman un grupo heterogéneo de moléculas de difícil clasificación, sin embargo existen tres características principales que las distinguen: su tamaño, la mayoría posee carga neta positiva y adoptan estructuras anfipáticas (Gutiérrez y Orduz, 2003). A pesar de su gran

variabilidad se le puede agrupar en cuatro categorías: a) Péptidos alfa-helicoidales, son los más conocidos y estudiados, su estructura es casi exclusivamente helicoidal y por su simplicidad es el que ha recibido mayor atención por su potencial de síntesis industrial y sus aplicaciones comerciales. Ejemplo de éstos son la maganinas, dermaseptinas y melitina (Benachir y Lafleur, 1995), b) Péptidos de estructura extendida, son péptidos que en su mayoría tienen alto contenido de hojas beta. Se clasifican aquí las defensinas, protegrinas y lactoferrinas (Lehrer y Ganz, 2002), c) Péptidos de composición irregular, son aquellos que tienen una composición inusual de aminoácidos, los más comunes poseen alto contenido de histidinas como las histatinas, o triptófano como la indolicina y triptisina (Brewer et al., 1998; Selsted et al., 1992). En un cuarto grupo se pueden incluir una serie de péptidos con grupos químicos atípicos en las proteínas, como la presencia de enlaces tioester en los antibióticos (Breukink y De Kruijff, 1999) o los pentaiboles que contienen altas proporciones de  $\alpha$ - aminoácido isobutírico (Sansom, 1993).

### **Mecanismo de acción microbicida de los péptidos antimicrobianos**

El preciso mecanismo de acción no se conoce completamente para todos los AMP. Varias teorías han sido planteadas para explicar los procesos moleculares inducidos por los péptidos, pero ninguna asegura que sea lo más cercano a la realidad, varios autores proponen la formación de canales o interrupciones en la membranas bacterianas (Dawson y Liu, 2008).

Los AMP tienen un efecto rápido, del orden de minutos bajo condiciones *in vitro* (Giangaspero et al., 2001). La gran variedad estructural de los AMP sugiere que su actividad no está dirigida a blancos celulares concretos como enzimas o receptores, sino más bien a características comunes de la membrana bacteriana (Wade et al., 1990).

En las bacterias gram negativas, tanto la membrana externa como la interna poseen moléculas aniónicas orientadas hacia el exterior de la célula, mientras que la mayoría de los péptidos son catiónicos. Su interacción con fosfolípidos cargados negativamente explicaría su especificidad por las membranas bacterianas y no por los lípidos zwitteriónicos de la capa extracelular de las células eucarióticas (Lenner et al., 1989). Respecto a la forma como los péptidos destruyen la membrana, es posible que induzcan lisis completa de la bacteria, o que la perturben de manera tal que permita la salida de componentes celulares esenciales, a la vez que se disipa el potencial de membrana (Park et al., 1998).

Se han creado 4 modelos para explicar el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos los cuales son: el mecanismo de barril, el mecanismo forma anular, mecanismo de alfombra y el mecanismo de agregado, donde el mecanismo similar en los cuatro es el daño a la membrana, pero tienen

variación en la interacción y ubicación de los péptidos en la superficie de la membrana (Gutiérrez y Orduz, 2003).

Además del daño a las membranas, se han reportado que los péptidos poseen otros mecanismos de acción, los cuales están relacionados con los ácidos nucleicos, la síntesis, translocación y plegamiento de proteínas (Park et al., 1998). Por ejemplo, la indolicina derivada de los neutrofilos de los bovinos puede alterar la permeabilidad de la membrana, pero también tienen mecanismo alternativos al unirse al ADN o a algunas enzimas asociadas a éste, como la topoisomerasa I y la ARN polimerasa, encontrándose que estos péptidos pueden inhibir el crecimiento bacteriano mediante la interacción con los ácidos nucleicos (Marchand et al., 2006).

### **Funciones inmunomoduladoras de los péptidos antimicrobianos**

Los péptidos tienen un amplio rango de funciones inmunomoduladoras, como controlar de alguna manera la expresión de cientos de genes en monocitos y células epiteliales, como quimiotáctico sobre las células del sistema inmune, en la inducción de citocinas y diferenciación celular promoviendo la angiogenesis, la curación de las heridas y la resolución de las infecciones (Oppenheim y Yang, 2005).

Algunos fragmentos de péptidos antimicrobianos, a pesar de no tener actividad sobre bacterias exhiben mecanismos inmunomoduladores sobre el proceso de cicatrización, al inhibir la expresión de interleucinas como la IL8, estimular la proliferación de queratocitos y aumentar la infiltración leucocitaria (Lee et al., 2004). Otros son capaces de inhibir la actividad de la oxidasa de los neutrofilos e inducir sindecanos, proteoglucanos y heparansulfatos, moléculas importantes en el proceso de cicatrización (Shi et al., 1996).

### **Aplicaciones clínicas de los péptidos antimicrobianos**

El problema de resistencia al uso de los antibióticos convencionales ha despertado el interés del desarrollo de péptidos antimicrobianos como agentes terapéuticos. El principal impedimento del desarrollo de los péptidos antimicrobianos como terapia sistémica es que algunos péptidos como la magainina (péptido obtenido de la mucosa de la piel de rana) es efectiva únicamente a altas concentraciones, causando toxicidad. Sin embargo, se han desarrollado agentes de aplicación tópica como la pexiganana (análogo de la magainina) que muestra resultados relativamente satisfactorios sin causar toxicidad (Zasloff, 2002).

Pexiganana demostró tener una excelente actividad antimicrobiana y un amplio espectro *in vitro* en 3,109 aislamientos bacteriológicos clínicos. Además, en 2 ensayos de fase III en 835 pacientes afectados por úlceras del pie

diabético, se uso tópicamente acetato de pexiganana al 1% en espray y se observó que el 66% de los pacientes lograron mejoría al final de la terapia (Lamb y Wiseman, 1998).

El Isegran es una péptido antimicrobiano sintético derivado de una protegrina natural en los leucocitos del cerdo, del cual se ha descrito un amplio espectro *in vitro* ante bacterias y hongos. Sin embargo, en un estudio realizado con 502 pacientes que recibieron un tratamiento con enjuague bucal de isegran a una dosis de 9mg, seis veces al día para reducir la estomatitis, mucositis ulcerativa oral, no demostró ningún beneficio en la reducción de la severidad de los daños (Trotti et al., 2004).

Omiganan es un análogo de la indolicidina, un péptido catiónico originalmente purificado a partir de gránulos de neutrofilos de la especie bovina, que tiene una amplia actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* (Sader et al., 2004). En un ensayo clínico fase III realizado en 22 sitios del Reino Unido y USA en 393 niños con meningococcemia severa, además de recibir su terapia con antibióticos convencionales se les administró la terapia adyuvante con Omiganan parenteral (2mg/ kg durante 30 minutos seguida de 2mg/ kg durante 24 horas) y se logró reducir la mortalidad de 9.9 % a 7.4 % (Levin et al., 2000).

Por otra parte, se ha observado que la  $\beta$  defensina 2 (HBD2) inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori in vitro* sugiriendo que HBD2 tiene una función importante en la prevención de gastritis inducida por *H. pylori*. Así mismo, en otro estudio se observó que el péptido antimicrobiano procariótico nisina (producido por bacterias), inhibe el crecimiento de *H. pylori* y pudiera considerarse como posible agente terapéutico para el tratamiento de úlceras gástricas causadas por *H. pylori* (Jenssen et al., 2006).

Es importante mencionar que el desarrollo de péptidos modificados, ofrecen una perspectiva interesante, sin embargo es indispensable no perder de vista que en algunos casos las modificaciones pueden conducir a la inducción de efectos impredecibles e indeseables sobre otros patógenos. Tal es el caso de los péptidos derivados de la histatina que tuvo mejor actividad en contra de *Candida albicans*, pero demostró incrementar la replicación del virus de VIH-1 (Groot et al., 2006).

Se ha demostrado que las células epiteliales al ser infectadas por *M. tuberculosis* producen abundantes cantidades de beta defensinas 2 (HBD-2) la cual además de unirse a la micobacteria produce su lisis (Rivas- Santiago et al., 2005). Por otro lado se reportó que ratones susceptibles a *M. tuberculosis* expresaron una menor producción de  $\beta$ -defensinas y que ratones resistentes producen altas cantidades del péptido, lo que probablemente les ayuda a controlar la infección (Rivas- Santiago et al., 2006).

En un modelo experimental de infección latente en ratones, las defensinas probablemente controlan el crecimiento de *M. tuberculosis* tanto en macrófagos como en células epiteliales durante el estado de latencia de la bacteria. Así mismo, se ha demostrado que *M. tuberculosis* es susceptible a la catelicidina LL-37 *in vitro*, ya que la catelicidina LL-37 se expresa ampliamente en macrófagos alveolares humanos durante la infección con *M. tuberculosis* uniéndose a ésta y provocando su lisis. Estos datos sugieren que los péptidos antimicrobianos son muy importantes durante la infección con Mtb y que por lo tanto pueden ser propuestos como terapéuticos en la tuberculosis pulmonar (Rivas- Santiago et al. 2006).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización del área de estudio**

El presente trabajo se dividió en dos etapas: 1) La etapa de ensayos *in vitro* que se realizó en la Unidad de Investigación Médica- IMSS de la ciudad de Zacatecas, Zacatecas, 2) Los trabajos en el modelo murino que se realizaron en el Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición “Salvador Zubirán” de la Ciudad de México, DF.

### **Duración del estudio**

El periodo de experimentación *in vitro*, el desarrollo del modelo murino y el análisis de las muestras en el laboratorio comprendió los meses de Julio del 2010 al mes de Mayo del 2011.

### **Origen de la información**

Para los ensayos *in vitro* se utilizaron la línea celular A549 (Neumocitos alveolares tipo II) y la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Para el desarrollo del modelo murino se emplearon ratones machos BALB/c de 6- 8 semanas de edad.

## **Variables evaluadas**

En los ensayos *in vitro* se evaluó la citotoxicidad de los péptidos en la línea celular A549 mediante el conteo de células muertas, así como la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los péptidos frente a *M. tuberculosis* H37Rv. En el modelo murino se evaluaron el porcentaje de área neumónica y la cuantificación de bacterias vivas en pulmón de ratones infectados con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv.

## **Metodología**

### **Ensayo colorimétrico de azul alamar**

Se utilizó la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv procedente de la Unidad de Investigación Médica –IMSS de Zacatecas. La cepa se mantuvo a -70°C en medio MSTA (Sauton Tween Albumina Modificado; Becton Dickinson, France) hasta el momento de su uso. Posteriormente se realizó una siembra en 15 ml de caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, France) enriquecido con OADC (ácido oleico, fracción V de albumina bovina, dextrosa, catalasa y cloruro de sodio; Becton Dickinson, France) y se incubó durante 15 días. De este cultivo se hizo una suspensión la cual se igualó al tubo No.1 de la escala de McFarland ( $300 \times 10^6$  bacterias por ml), y a partir de esta suspensión se

realizó una dilución 1:20, utilizandó como diluyente el medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC.

**Péptidos antimicrobianos:** se utilizaron los siguientes péptidos antimicrobianos sintéticos: HH2, 1002, 1018 (provenientes de modificaciones del peptido LL-37) los cuales fueron donados por el laboratorio de Inmunología de la Universidad de British Columbia, Vancouver Canadá. Así mismo, se utilizó el péptido K9 CATCH (proveniente de medula ósea de perro), que fue donado por el laboratorio de Inmunología Comparada de Kansas State University U.S.A. Los péptidos fueron pesados y diluídos en 500  $\mu$ l de agua desionizada y estéril, se calculó su concentración quedando de la siguiente manera: HH2 (8.5 $\mu$ g/ $\mu$ l), 1002 (10.8 $\mu$ g/ $\mu$ l), 1018 (6  $\mu$ g/ $\mu$ l) y K9CATCH (7.2 $\mu$ g/ $\mu$ l), a esta solución se le denominó solución stock, los cuales se conservaron -70°C. A partir de esta solución se preparó una solución de trabajo, la cual estaba cuatro veces más concentrada (512  $\mu$ g/ml) que la concentración máxima a utilizar (128  $\mu$ g/ml) en las pruebas. A partir de la solución de trabajo de cada uno de los péptidos se prepararon seis diluciones progresivas en base dos en caldo Middlebrook 7H9. Los rangos de concentración estudiadas fueron 128  $\mu$ g/ml, 64 $\mu$ g/ml, 32  $\mu$ g/ml, 16 $\mu$ g/ml, 8 $\mu$ g/ml y 4 $\mu$ g/ml.

**Preparación de la microplaca:** se utilizaron microplacas de 96 pozos estériles de fondo plano (Costar, Ontario Canadá), las cuales estaban

numeradas en la parte superior de 1-12 y por la parte lateral izquierda con las letras de A–H. A los pozos de la periferia al igual que a los pozos 2B:2G, 3B:3G, 10B:10G y 11B:11G se les adicionaron 200  $\mu$ l de agua destilada estéril, para evitar la evaporación. A las filas B a la G y columnas 4 a 9, se les adicionaron 100  $\mu$ l de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC. A los pozos de la columnas 4 a 7 de la fila B se les adicionaron 100  $\mu$ l de la solución de trabajo de cada péptido. Además, en la columna 8 de la fila B se le agregó el antibiótico rifampicina como control interno de inhibición a una concentración de 2 $\mu$ g/ml. Con la pipeta multicanal, se mezcló y transfirió 100  $\mu$ l al siguiente pozo y así sucesivamente hasta terminar en la dilución de la fila G y se descartaron 100  $\mu$ l de la última dilución. Se adicionaron 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana de *M. tuberculosis* H37Rv a cada pozo que contenía la droga.

También a los pozos de la fila 9 de la columna C a la F se les adicionó la suspensión bacteriana a fin de servir como controles de viabilidad bacteriana. Al pozo G9 se le adicionaron 100  $\mu$ l de medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC y 2  $\mu$ l de la suspensión bacteriana, la cual correspondió al control diluído 1: 100 con un contenido del 1% de la población total de micobacterias y que se utilizó para la lectura de la prueba. Los rangos de las concentraciones finales de las diluciones de los péptidos fueron de 4 $\mu$ g/ml a 128  $\mu$ g/ml mientras que para la rifampicina fue de 0.062  $\mu$ g/ml a 2.0  $\mu$ g/ml. Al pozo B9 se le adicionaron 200 $\mu$ l de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC y se utilizó como control de medio de cultivo.

La placa se incubó a 37°C por 5 días. Al quinto día se adicionaron 30 µl de resazurina al 0.1% a los pozos C9 al F9 y se incubó durante 24 horas más. Al notar el cambio de color de azul a rosa intenso, se adicionaron 30 µl de resazurina al 0.1% al resto de la placa y se incubó a 37 °C por 24 horas más.

La lectura se realizó teniendo como referencia los controles. Primero se interpretó el control de medio de cultivo, el cual debió permanecer azul, indicando la ausencia de contaminación. Posteriormente se evaluaron los pozos correspondientes a los péptidos y se determinó el MIC, esto se hizo comparando con el color del pozo diluído 1:100. El MIC correspondió al pozo de más baja concentración del péptido en el cual la intensidad del color fué menor o igual al pozo de control diluído.

### **Ensayo de citotoxicidad**

Para determinar si los péptidos antimicrobianos tienen efecto citotóxico sobre las células, se sembraron neumocitos alveolares de humano tipo II (A549; American Type Culture Colection (ATCC) reference number CCL185) en una botella de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Costar, Ontario, Canadá). Una vez que se encontraron en confluencia de 90%, se desprendieron siguiendo el protocolo del fabricante (A549; American Type Culture Colection (ATCC) reference number CCL185). Luego se sembraron las células en una placa de 48 pozos y

se incubaron por 24 horas a 37 °C. Una vez adheridas las células, el medio de cultivo fue removido y se agregaron 300µl de RPMI con 1% de suero fetal bovino. Además se añadieron 100 µl de la solución de trabajo de cada péptido. Con la pipeta multicanal se mezcló y transfirieron 100 µl al siguiente pozo hasta llegar a la fila C donde se descartaron 100 µl. A la fila D no se le aplicó ningún tratamiento ya que fue el pozo testigo. De esta manera se probaron 3 concentraciones de los péptidos, las cuales fueron 128 µg/ml, 64µg/ml y 32 µg/ml, por un tiempo de exposición de 18 horas.

Una vez transcurrido el tiempo, se le agregaron 30 µl de azul de tripano y se observaron en el microscopio invertido a 40X. Se contaron 3 campos, se obtuvo el número de células teñidas (células muertas) y células no teñidas (células vivas). Se calculó el promedio de células vivas y células muertas en base a los 3 campos y con estos datos se obtuvo el porcentaje de células muertas.

### **Microscopia electrónica**

Se utilizó un cultivo de *M. tuberculosis H37Rv* en fase logarítmica crecido en medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC. Se prepararon 4 alícuotas de 1.5 ml que fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 5 minutos y resuspendidas en agua peptonada. Se utilizó una alícuota por cada péptido, a la cual se le agregaron 100 µl de la solución de trabajo de cada péptido y se

incubaron a 37 °C por 18 horas. Transcurrido el tiempo las alícuotas fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 5 minutos para remover el agua peptonada. Una vez removida el agua peptonada se agregaron 100 µl de la solución de glutaraldehído al 2% disuelto en cacodilato al 0.1M y fueron incubados a 4°C por una hora. Transcurrida la hora de incubación se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm para remover el glutaraldehído, se lavó el pellet formado con buffer de fosfato al 0.1M en dos ocasiones.

Una vez lavado el pellet se le agregó tetraóxido de osmio al 1% y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, los pellets fueron deshidratados con soluciones de alcohol en grado creciente (30% de etanol por 10 min, 60% de etanol por 10 min, 90% de etanol por 10 min, 100% de etanol por 10 min y 100% de etanol por una hora). Una vez deshidratados los pellets fueron embebidos en resina Procure 812 y se dejaron polimerizar. Una vez formado el bloque se realizó un corte aproximado de 100 nm, utilizando un micrótomo con punta diamante. Los cortes fueron teñidos con acetato de uranio. Se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM201 donde las imágenes fueron tomadas con una cámara de 35-mm.

### **Modelo experimental de infección de tuberculosis en ratones**

Todos los animales fueron tratados conforme a la regulación del Comité de Ética de Animales de Experimentación de México. El modelo de infección se basa en lo descrito previamente por Hernández Pando (1996) en el cual se usaron ratones machos BALB/c de 6- 8 semanas de edad. La cepa virulenta de *M. tuberculosis H37Rv* fue cultivada en medio Proskauer y Beck modificado de Youman`s. Después de cuatro semanas de cultivo las colonias fueron suspendidas en buffer salino de fosfatos (PBS) conteniendo 0.05% Tween-80 y colocadas en agitación durante 10 minutos con perlas de vidrio. La suspensión se centrifugó durante un minuto a 350 g para eliminar los grupos grandes de bacilos. A continuación la suspensión fue diluída hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  bacterias en 100  $\mu$ l de PBS y se guardaron en alícuotas de 1.5ml a  $-70^\circ\text{C}$ . Antes de utilizar las bacterias fueron contadas y comprobada su viabilidad según lo descrito por Hernández- Pando (1996).

Para lograr la infección intratraqueal, los ratones fueron anestesiados de la siguiente manera: se colocaron 10 animales en una caja hermética de 30cm x 10cm x 15cm y se depositó 1 ml de sevoflurano. Una vez anestesiado el animal, se colocó en posición ventro dorsal y se le introdujo una cánula flushing, dentro de la tráquea, moviendo la protuberancia que se encuentra en la cánula y sintiendo los anillos traqueales. Una vez en la tráquea se depositaron 100  $\mu$ l de PBS conteniendo una concentración de  $1 \times 10^6$  bacterias. Los ratones fueron mantenidos en posición vertical hasta que pasara el efecto de la anestesia. Los animales infectados fueron mantenidos en grupos

de 10 animales en cajas con micro aisladores por 60 días. Transcurrido el tiempo los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos experimentales con 10 ratones cada uno y a los cuales se les aplicaron los siguientes tratamientos:

**Grupo 1:** 10 ratones que recibieron 32  $\mu$ g del péptido HH2 en 100 $\mu$ l de agua estéril; **grupo 2:** 10 ratones que recibieron 32  $\mu$ g del péptido 1002 en 100 $\mu$ l de agua estéril; **grupo 3:** 10 ratones que recibieron 32  $\mu$ g del péptido 1018 en 100 $\mu$ l de agua estéril; **grupo 4:** 10 ratones que recibieron 32  $\mu$ g del péptido K9 en 100 $\mu$ l de agua estéril y **grupo 5:** 10 ratones que recibieron 100 $\mu$ l de agua estéril.

Los tratamientos se iniciaron a los 60 días postinfección tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). El sacrificio de los animales se dividió en dos tiempos; el primer tiempo fue a los 30 días postratamiento, y el segundo tiempo fue a los 60 días postratamiento. Cada tiempo de sacrificio tuvo 4 animales. El método de sacrificio fue apegado a la NOM-033-ZOO-1995 (Sacrificio humanitario de animales domésticos y silvestres). Todos los procedimientos y sacrificios se realizaron en campanas de bioseguridad biológica tipo 3.

#### **Determinación de Unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmón**

Inicialmente se preparó medio de cultivo Middlebrook 7H11 (Difco Labs, Detroit, MI, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante, se esterilizó y se enriqueció con OADC para finalmente colocarlo en cajas petri (13 ml aprox.). Se dejó gelificar y se sometieron a prueba de esterilidad a 37°C por 24 horas. Se guardaron en refrigeración a 4°C hasta su uso (no más de una semana).

Para cuantificar el número de bacterias viables se utilizaron los pulmones derechos de cuatro ratones después de uno y dos meses de tratamiento. Los pulmones se homogenizaron con un politrón (Kinematica, Luzern, Switzerland) en tubos Falcón estériles con solución salina. Se lavó la punta del politrón antes y después de homogeneizar cada muestra. Una vez homogenizados los tejidos se tomaron alícuotas de 450 µL, haciendo una dilución 1:10 en forma seriada ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) de cada dilución en tubos Eppendorf, y del concentrado se tomaron 20 µl y se colocaron en las cajas petri con agar, todo por duplicado. Una vez absorbida la gota de cada dilución colocada en el agar, las cajas fueron invertidas e incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 21 días, posteriormente se cuantificó las UFC.

### **Preparación de tejido pulmonar para histología y morfometría**

Para el estudio histológico, los pulmones izquierdos de cuatro ratones de uno y dos meses de tratamiento fueron fijados por perfusión intratraqueal con alcohol absoluto. El tejido fue deshidratado con alcoholes de concentración

creciente. Se incluyeron en parafina, se cortaron a 5  $\mu\text{m}$  de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina. En estas laminillas histológicas se determinó la superficie pulmonar afectada por neumonía, utilizando un equipo automatizado de análisis de imagen Zidas Zeiss (Carl Zeiss Ltd, Herts, UK) y Q500IW Leica.

### **Análisis estadísticos**

Para la obtención del MIC y la citotoxicidad, se realizó una sumatoria de los resultados y se obtuvo la media. Mientras que para comparar los efectos de los péptidos utilizados respecto al grupo testigo en la determinación de unidades formadoras de colonias en pulmón y análisis morfométrico, los resultados obtenidos se analizaron con la prueba para datos no paramétricos utilizando Kruskal- Wallis y una prueba de comparación múltiple de Dunn`s, utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.03.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayo colorimétrico de azul alamar

En el ensayo colorimétrico la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv resultó sensible a los cuatro péptidos antimicrobianos con un MIC de 29.33  $\mu\text{g/ml}$  para el péptido 1002, 29.33  $\mu\text{g/ml}$  para el péptido HH2, 16  $\mu\text{g/ml}$  para 1018 y 10.66  $\mu\text{g/ml}$  para el péptido K9. Para el antibiótico de referencia que se utilizó en el ensayo, rifampicina, el MIC fué de 0.1043  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 1). El resultado de la rifampicina coincide con lo publicado por Acosta et al., (2004) que obtuvo 0.11  $\mu\text{g/ml}$  lo que demuestra que la dilución de los péptidos y el fármaco fue adecuada en el ensayo. De la misma manera otros péptidos probados por el método colorimétrico, como los son el PR-39 (aislado de intestino de cerdo) (Linde et al., 2001), el péptido siringopeptinas (producido por bacterias) (Grgurina et al., 2005) y el péptido sintético Nisin S (Carroll et al., 2010) han demostrado ser activos contra *M. tuberculosis*, pero otros como la cepronina y melitina mostraron nula actividad antimicrobiana frente a cepas de *M. tuberculosis* (Zerbini et al., 2006).

El ensayo realizado de azul alamar además de ser un método colorimétrico se ha reportado que los resultados tienen buena concordancia con los métodos de las proporciones (Yakjo et al., 1995), además de una sensibilidad de 98% y una especificidad de 97.5% (Luna- Herrera et al., 2003),

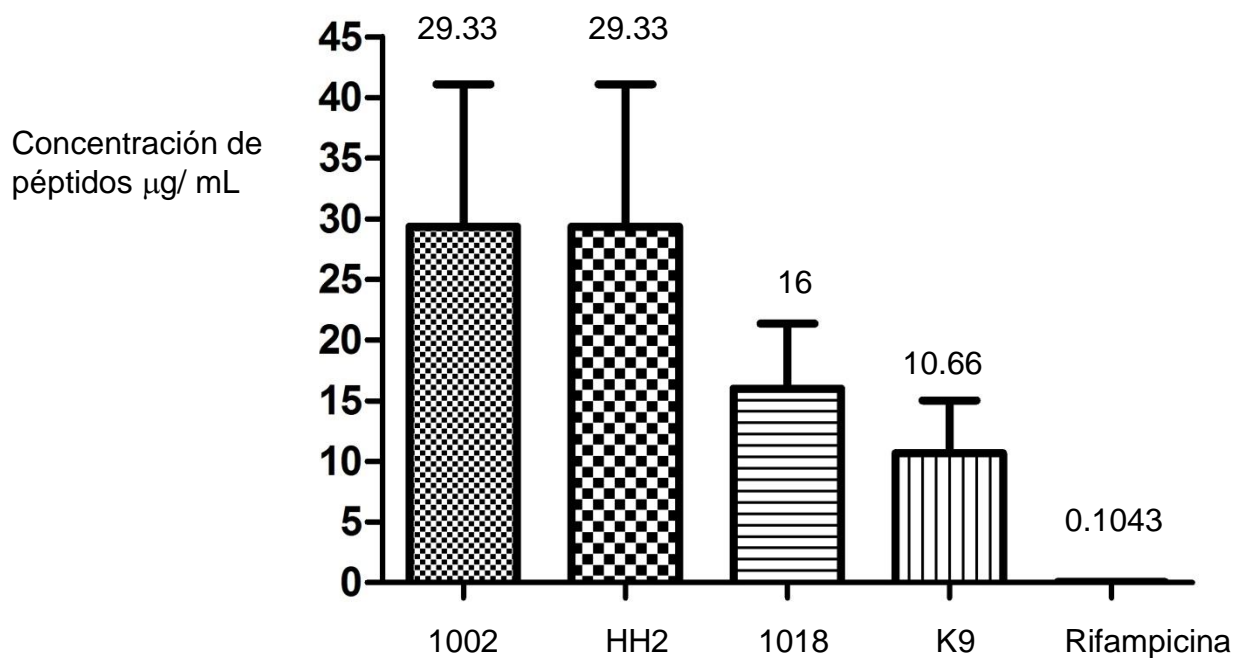


Figura 1. MIC obtenido de cada uno de los péptidos así como del antibiótico rifampicina frente a *M. tuberculosis* H37Rv por el método colorimétrico de azul alamar.

la única desventaja de esta técnica es la bioseguridad requerida, ya que requiere de medios líquidos y esto genera aerosoles que pueden dispersar la micobacteria (Abate et al., 1998).

### **Ensayo de citotoxicidad**

Al exponer los neumocitos A549 a una concentración de 32  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los péptidos se obtuvieron los siguientes datos: para los péptidos HH2, K9 y 1002 fue de 95% de viabilidad y para el péptido 1018 la viabilidad fue de 75%. Mientras que a una concentración de 128  $\mu\text{g/ml}$  el péptido 1018 presentó la menor viabilidad celular con un porcentaje de 60% (Figura 2). Estudios *in vitro* previos con los péptidos cepronina, PR-39 y NK-lisina, no mostraron efectos citotóxicos en las líneas celulares 3B6, K562, U932 y EL-4 (Catrina et al., 2009). En modelos murinos se ha probado el péptido P34 en ratones BALB/C, y no se observaron reacciones de hipersensibilidad o aumento significativo de los títulos de anticuerpos (Vaucher de almeria et al., 2011), por lo tanto se demuestra que los péptidos no son citotóxicos para las células eucariotas. Boman (1995) por los resultados de sus experimentos, propone que los péptidos antimicrobianos no atacan a las células propias por el hecho de que a diferencia de las células procariotas las células eucariotas normales tienen colesterol en su membrana, lo cual impide el reconocimiento de los péptidos antimicrobianos sobre ellas.

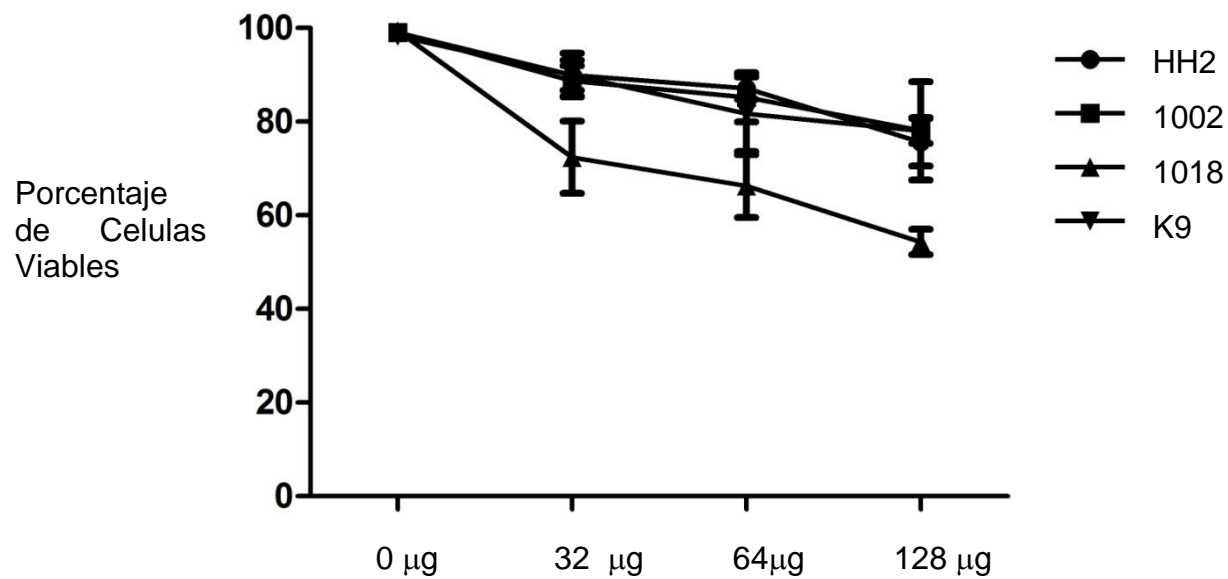


Figura 2. Resultado de viabilidad celular en la línea A549, obtenido para cada uno de los péptidos a 3 diferentes concentraciones.

## Microscopia electrónica

En las imágenes obtenidas de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv expuesta a los péptidos 1018, 1002 y HH2 se observaron marcadas interrupciones de la membrana (Figura 3 inciso B y C), así como algunas malformaciones bacterianas como engrosamiento de la membrana bacteriana (inciso A), invaginaciones (inciso D), vacuolaciones (inciso C) y cambios morfológicos (inciso D). Mientras que con el péptido K9 se observó además del daño en la membrana una condensación del contenido citoplasmático y malformaciones en la forma típica de la bacteria (Figura 3). Estos resultados coinciden con los mecanismos de acción reportados para los péptidos B1 y SMAP29 los cuales inducen cambios en la morfología de la membrana (Chen et al., 2011). Esto puede deberse a que las cargas de los péptidos son positivas y son atraídas electrostáticamente hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos, lipoteicoicos o por los lipopolisacáridos de las bacterias (Téllez y Castaño, 2010), y al causar daños en la membrana forman poros y hay una liberación de contenido citoplasmático, lo que causa trastornos en el metabolismo bacteriano provocando la lisis celular (Boman, 1996). Además del daño a la membrana se pueden observar daños en el interior de la bacteria, como es el caso del péptido K9 (Figura 4), cuyo mecanismo de acción pudiera compararse con lo que Park y colaboradores (1998) afirman, que algunos péptidos son capaces de traspasar la membrana y acumularse dentro del citoplasma, y que, como lo

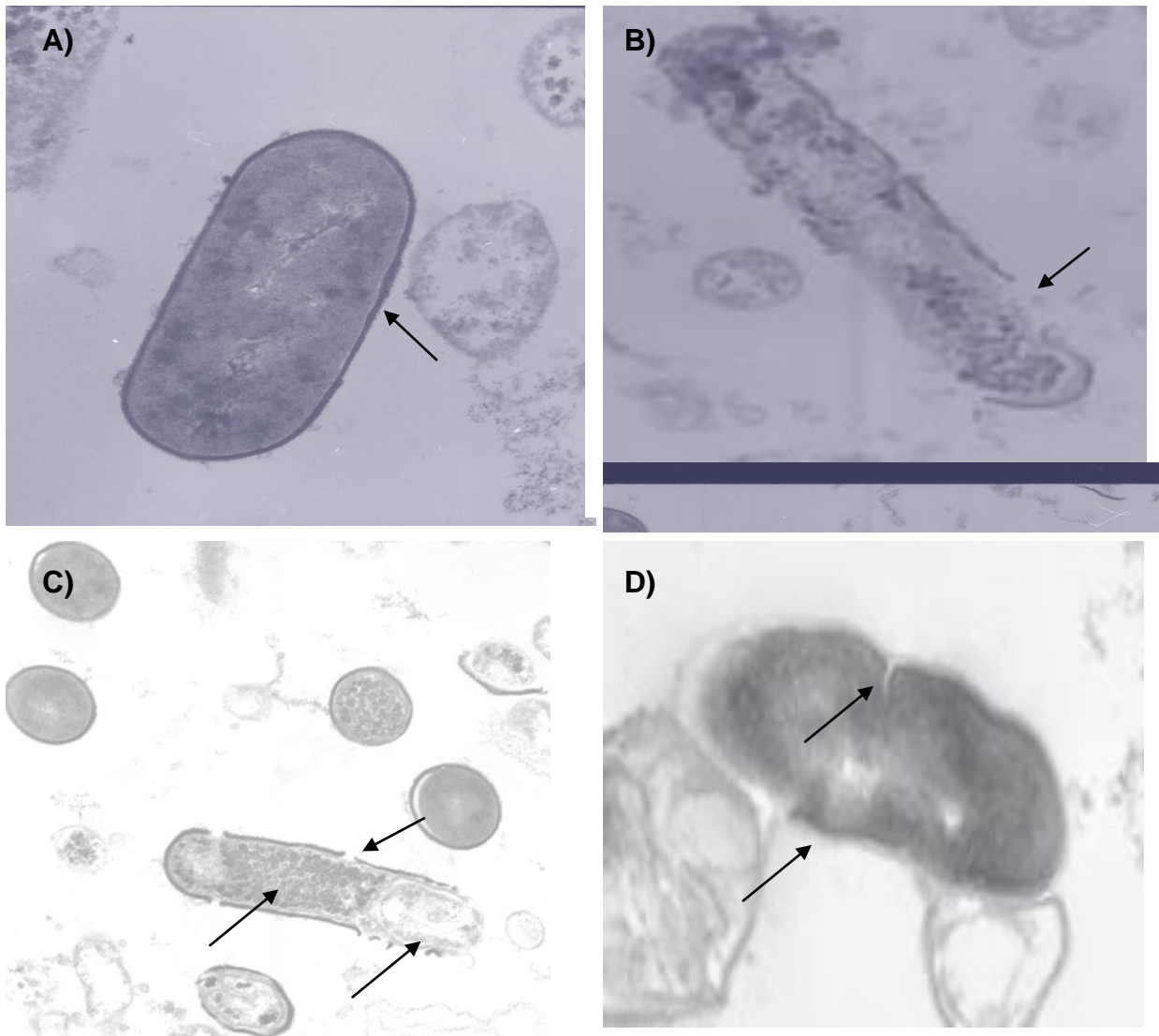


Figura 3. Efecto de los péptidos sobre *M. tuberculosis* H37Rv, A) Cepa expuesta al péptido HH2 donde se observa un marcado engrosamiento de la membrana 25 000X B) Cepa expuesta al péptido 1002, se observa marcada ruptura de membrana bacteriana 40,000x C) Cepa expuesta al péptido K9, nótese la vacuolaciones, condensación del contenido citoplasmático y daño en la membrana 25, 000x D) Cepa expuesta al péptido 1018 nótese las invaginaciones en la membrana y malformaciones 40 000x.



Figura 4. Efecto del péptido K9, nótese que además del daño a las membranas (A) se presenta una condensación del contenido citoplasmático (B).

Afirman Kragol y colaboradores (2001), interfieran en la síntesis proteica de las bacterias al unirse al ADN y/o enzimas asociadas a este.

### **Unidades formadoras de colonias**

Después de 30 días de tratamiento con los péptidos a los ratones, esto es al primer tiempo de sacrificio, se observó una disminución en la carga bacteriana en pulmón comparado con los del grupo testigo para los tratados con los péptidos HH2, 1018 y K9. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: para los animales tratados con el péptido HH2 se obtuvo  $14.18 \times 10^6$  UFC, para los animales que recibieron el péptido 1018 se contabilizaron  $13.08 \times 10^6$  UFC y para los tratados con el péptido K9 se obtuvieron  $11.41 \times 10^6$  UFC. Este último mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 7) respecto al grupo testigo donde se contabilizaron  $17.2 \times 10^6$  UFC. Solamente aquellos animales tratados con el péptido 1002 mostraron un conteo de unidades formadoras de colonias de  $22.58 \times 10^6$ , que fue inclusive mayor que los animales del grupo testigo (Figura 5).

A los 60 días de tratamiento, correspondiente al segundo tiempo de sacrificio, el conteo de unidades formadoras de colonia resultó en una disminución de la carga bacteriana, obteniendo que los animales tratados con el péptido HH2 registraron  $0.122 \times 10^6$  UFC mientras que los animales tratados

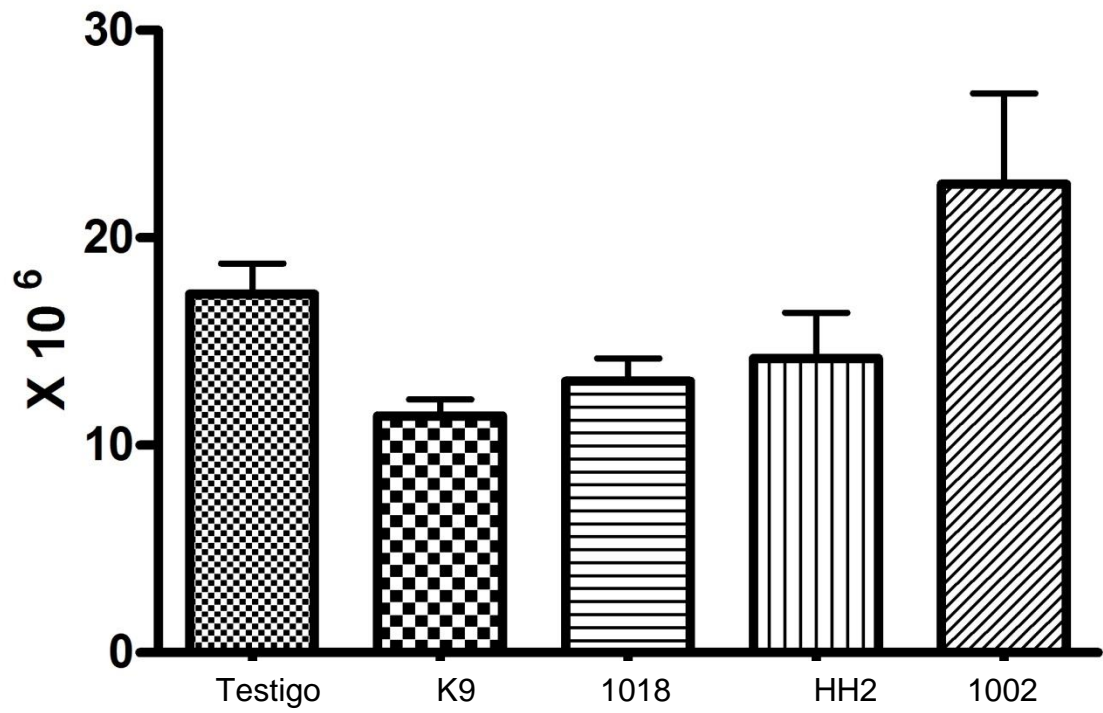


Figura 5. UFC contabilizadas al primer tiempo de sacrificio (30 días).

con el péptido 1018 mostraron  $0.125 \times 10^6$  UFC. A diferencia del primer tiempo de sacrificio, aquí los animales tratados con el péptido 1002 mostraron una disminución en la carga bacteriana en pulmón de  $0.094 \times 10^6$  UFC. Además, los ratones tratados con el péptido K9 mostraron UFC de  $0.058 \times 10^6$  y fue el único que mostró diferencias significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 7) respecto al grupo testigo donde se contabilizaron  $5.11 \times 10^6$  UFC (Figura 6).

El elevado conteo de unidades formadoras de colonias registrado en el primer tiempo de sacrificio en los animales tratados con el péptido 1002, se puede deber a que este péptido es una modificación del péptido original LL-37, el cual se ha reportado que favorece el crecimiento de *M. tuberculosis*, no siendo así para los péptidos HH2, 1018 y K9 que obtuvieron una carga bacilar menor, mientras que otros péptidos como los HNP-1 y HNP-3 sí eliminan al microorganismo (Martineau et al., 2007). Otros estudios señalan que el uso de los péptidos en sinergia con los fármacos convencionales reducen las UFC, tal es el caso del péptido Protegrin-1 en sinergia con la isoniazida que eliminaron al 100% las UFC viables (Fattorini et al., 2004). Por lo que el uso de cualquiera de estos péptidos evaluados en este estudio en combinación con fármacos convencionales pudiera tener un efecto sinérgico y eliminar completamente a *M. tuberculosis*. Además, se ha reportado que algunos péptidos muestran actividad tiempo-dosis dependiente contra los bacilos en los pulmones, tal es el caso del péptido HNP-1 que requiere mayor dosis conforme aumenta el tiempo de tratamiento (Kalita et al., 2004). Razón que pudiera provocar lo observado

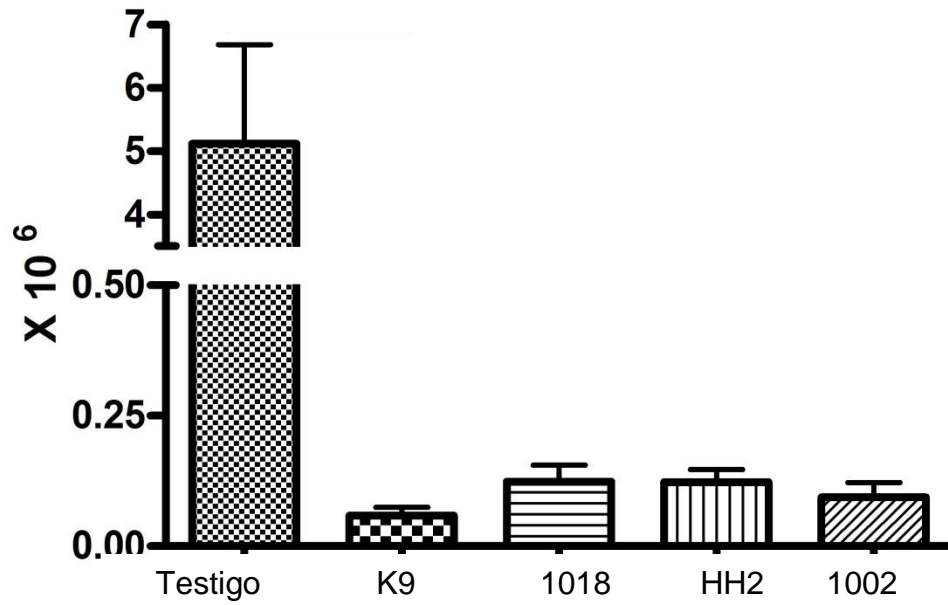


Figura 6. UFC contabilizadas al segundo tiempo de sacrificio (60 días).

<b>Días de Tratamiento</b>	<b>Valor de P</b>	
<b>60 Días</b>		
Kruskal Wallis 30 días	0.0124	*
Prueba de Dunn´s.		
Control vs K9	19.52	*
Control vs 1018	5.870	NS
Control vs HH2	5.870	NS
Control vs 1002	-3.600	NS
<b>60 Días</b>		
Kruskal Wallis 60 días	0.0108	*
Prueba de Dunn´s.		
Control vs K9	17.92	**
Control vs 1018	9.583	NS
Control vs HH2	9.667	NS
Control vs 1002	12.42	NS

Figura 7. Análisis de los datos de UFC a los 30 y 60 días de tratamiento utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple por la prueba de Dunn´s. \*P<0.05, \*\* P<0.01 , NS = No Significativo

en el segundo tiempo de sacrificio respecto a la disminución en la carga bacilar.

### **Análisis morfométrico del área neumónica**

El porcentaje de área neumónica al primer tiempo de sacrificio mostró una disminución comparada con el grupo de animales testigos que fue de 17.29%. Para los animales tratados con el péptido HH2 el área neumónica fue de 14.18%, en los animales que recibieron el péptido 1018 fue de 13.08%, mientras que para el péptido K9 fue de 11.41%. Este último mostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 10) en comparación con el grupo testigo. Sin embargo para los animales tratados con el péptido 1002, el porcentaje de neumonía fue de 22.58% lo cual concuerda con la alta carga bacilar que se observa en las UFC al primer tiempo de sacrificio (Figura 7).

Al segundo tiempo de sacrificio se observó una disminución en el área neumónica de los animales tratados con todos los péptidos respecto al grupo testigo que mostró un área neumónica de 28.10%. Para los ratones tratados con el péptido HH2 se observó un área neumónica de 16.5%, mientras que para los tratados con el péptido 1018 fue de 13.10% y para los tratados con el péptido K9 el área neumónica fue de 8.31%, siendo este último el único que mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 10) comparado con el grupo testigo.

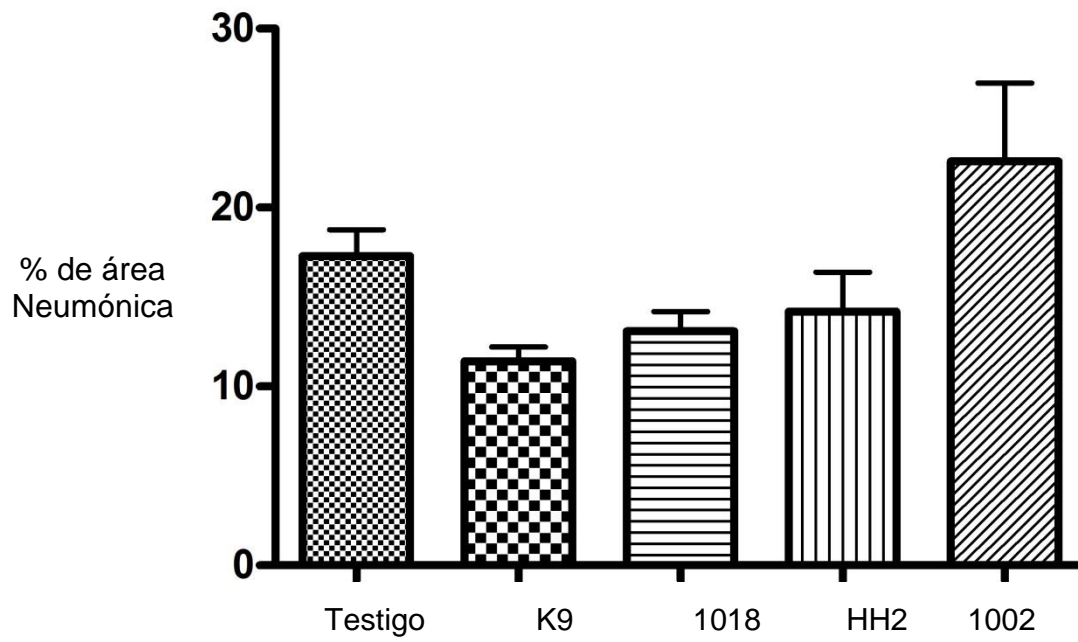


Figura 8. Porcentaje del área neumónica al primer tiempo de sacrificio (30 días).

En el caso particular del péptido 1002 se observó un área neumónica de 13.35% la cual disminuyó en comparación con el porcentaje neumónico obtenido en el primer tiempo de sacrificio, esto concuerda con la disminución de las UFC obtenidas en el segundo tiempo de sacrificio (Figura 8).

Un aumento en el área neumónica se puede deber a que a pesar de que la interacción con la membrana bacteriana es uno de los principales mecanismos de acción de los péptidos, no es el único (Gutiérrez y Orduz, 2003). También poseen funciones inmunomoduladoras como lo son la migración de los leucocitos y la activación de las vías de la señalización, ya que se ha demostrado que algunos péptidos protegen contra infecciones a pesar de no tener actividad directa contra las bacterias (Gallo et al., 1994). Otros péptidos como el HNP-1 posee una alta actividad *in vivo* por sus efectos potenciadores como quimiotaxis de células T y monocitos (Kalita et al., 2004).

Se puede deducir que en el caso del péptido 1002 mostró un porcentaje mayor de área neumónica debido a que el péptido original LL-37 (del cual éste es precursor) induce la liberación de citoquinas proinflamatorias, además, los péptidos que causaron poca neumonía se puede deber a que promovieron la ingestión de bacilos por los macrófagos alveolares, a la síntesis de sustancias anti-inflamatorias y/o, a su participación en la reparación de tejidos al promover la proliferación celular (Elsbach, 2003).

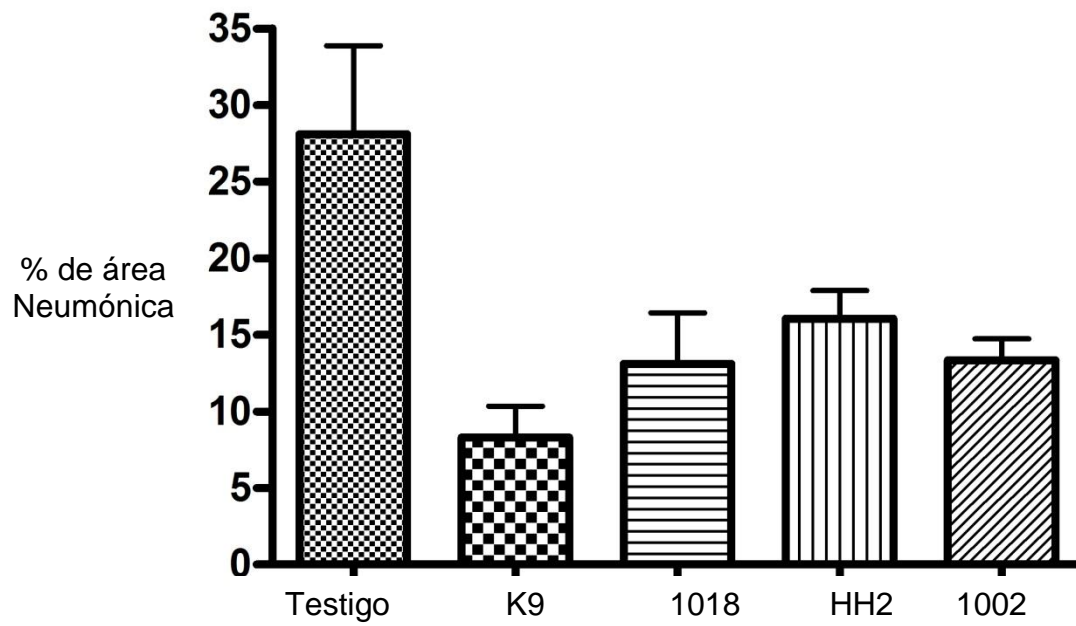


Figura 9. Porcentaje del área neumónica al segundo tiempo de sacrificio (60 días)

<b>Días de Tratamiento</b>	<b>Valor de P</b>	
<b>30 Días</b>		
Kruskal Wallis	0.0115	*
Prueba de Dunn's.		
Control vs K9	11.80	*
Control vs 1018	7.400	NS
Control vs HH2	7.400	NS
Control vs 1002	-2.600	NS
<b>60 Días</b>		
Kruskal Wallis 60 días	0.0544	*
Prueba de Dunn's.		
Control vs K9	13.40	*
Control vs 1018	9.000	NS
Control vs HH2	4.400	NS
Control vs 1002	7.200	NS

Figura 10. Análisis de los datos de porcentaje de área neumónica a los 30 y 60 días de tratamiento utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple por la prueba de Dunn's. \*P<0.05,\*\* P<0.01, NS = No Significativo

## CONCLUSIONES

Con este trabajo se determinó el efecto terapéutico de los péptidos antimicrobianos HH2, 1002, 1018 y K9 en la tuberculosis pulmonar tanto *in vitro* como en el modelo murino.

En los ensayos *in vitro* los péptidos mostraron que inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv y en los ensayos de citotoxicidad ninguno de los péptidos mostro daño a los neumocitos A549.

De los péptidos HH2, 1002, 1018 y K9, el péptido K9 pudiera ser considerado un candidato potencial como terapéutico en la tuberculosis pulmonar experimental. Además debido a que solo se evaluó el efecto de estos péptidos con la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, es necesario exponer los péptidos a cepas MDR o hipervirulentas como la cepa Beijing. Al igual que evaluar el efecto de estos péptidos en sinergia con los antifímicos convencionales.

## LITERATURA CITADA

- Abate G, R. N. Mshana and H. Miörner. 1998. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2(12):1011-1016
- Acosta S., C. León and A. Leal. 2004. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínima en cepas de *M. tuberculosis* mediante la técnica colorimétrica de alamar azul. Asociación colombiana de infectología. 8:194-202.
- Benachir, T. and M. Lafleur. 1995. Study of vesicle leakage induced by melittin. Biochim. Biophys. Acta. 1(121):130-136.
- Boman H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Amm. Rev. Immunol. 13:61- 92.
- Boman H. G. 1996. [Man's own antibiotics--an innate immune system]. Nord. Med. 6:176-179.
- Breukink E. and B. De Kruijff. 1999. The lantibiotic nisin, a special case or not?. Biochim. Biophys. Acta. 1(462):223-234.
- Brewer, D., H. Hunter and G. Lajoice. 1998. NMR studies of the antimicrobial salivary peptides histatina 3 and histatina 5 in aqueous and nonaqueous solutions. Biochem. Cell. Biol. 76:247- 256.

- British Medical Research Council. 1948. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council Tuberculosis Units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 3(2):S231-S279
- Brogden, K. A., V .C. Kalfa, M. R. Ackermann, D. E. Palmquist, P. B. Jr. McCray and B. F. Tack. 2001. The ovine cathelicidin SMAP29 kills ovine respiratory pathogens in vitro and in an ovine model of pulmonary infection. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45(1):331-334.
- Carroll J, D. Field, P. M. O'Connor, P. D. Cotter, A. Coffey, C. Hill, R. P Ross and O. Mahony. 2010. Gene encoded antimicrobial peptides, a template for the design of novel anti-mycobacterial drugs. *J. Bioeng. Bugs*. 1(6):408-412.
- Catrina S. B., E. Refai and M. Andersson. 2009. The cytotoxic effects of the anti-bacterial peptides on leukocytes. *J. Pept. Sci*. 15(12):842-848.
- Chen Y. J., B. R. Liu, Y. H. Dai, C. Y. Lee, M. H. Chan, H. H. Chen, H. J. Chiang and H.J. Lee. 2011. A gene delivery system for insect cells mediated by arginine-rich cell-penetrating peptides. *Gene*. 8:100-107
- Dawson R. M. and G. Liu. 2008. Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents. *Crit. Rev. Microbiol*. 34:89- 107.
- Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania and M. C. Raviglione. 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama*. 282(7):677-686.

Elsbach P. 2003. What is the role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *J. Clin. Invest.* 111:1643-1645.

Fattorini L., R. Gennaro, M. Zanetti, D. Tan, L. Brunori, F. Giannoni, M. Pardini and G. Orefici. 2004. In vitro activity of protegrin-1 and beta-defensin-1, alone and in combination with isoniazid, against *Mycobacterium tuberculosis*. *Peptides*. 25(7):1075-1077.

Frieden T.R., T. Sterling, A. Pablos-Mendez, O. James, G. M. Cauthen and S. W. Dooley. 1993. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N. Engl. J. Med.* 328:521-526.

Frothingham, R., J. E. Stout and C. D. Hamilton. 2005. Current issues in global tuberculosis control. *Int. J. Infect. Dis.* 9(6):297-311.

Gallo, R.L., M. Ono, T. Povsic, C. Page, E. Eriksson, M. Klagsbrun and M. Bernfield. 1994. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:11035-11036.

Giangaspero A., L. Sandri and A. Tossi. 2001. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *Eur. J. Biochem.* 268:5589-5600.

Gillespie, S.H. 2002. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(2):267-274.

Grgurina I., M. Bensaci, G. Pocsfalvi, L. Mannina, O. Cruciani and A. Fiore. 2005. Novel cyclic lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*

strain 508 and syringopeptin antimicrobial activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 5037-5045.

Groot F., R. W. Sanders, O. ter Brake, K. Nazmi, E. C. I Veerman, J. G. M. Bolscher and B. Berhout. 2006. Histatin 5- derived peptides with improved fungicidal properties enhances human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting viral entry. *J. Virol.* 80:9236- 9243.

Gutiérrez, P. y S. Orduz. 2003. Péptidos antimicrobianos: Estructura, funcion y aplicaciones. *Actual Biol.* 25(78):5-15.

Guzmán-Montes, G.Y., R.H. Ovalles and R. Laniado-Laborin. 2009. Indirect patient expenses for antituberculosis treatment in Tijuana, Mexico: is treatment really free?. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 3(10):778-782.

Harries, A.D. and C. Dye. 2006. Tuberculosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100(5-6):415-431.

Hart, P. D .1946. The role of the host in the chemotherapy of tuberculosis. *British Medical Journal.* 2:805- 810.

Hernández-Pando R, H. Orozco, A. Sampieri, L. Pavón, C. Velasquillo, J. Larriva-Sahd, J. M. Alcocer and M. V. Madrid. 1996. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.*89(1):26-33.

Jassal, M. and W. R. Bishai. 2009. Extensively drug resistant tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases.* 9(1):19 – 30.

Jenssen H., P. Hamill and R. E. W Hancock. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:491- 511.

- Jia, H.P., B.C Schutte, A. Schudy, R. Linzmeier, J. M. Guthmiller, G. K. Johnson, B. F. Tack, J. P. Mitros, A. Rosenthal, T. Ganz and P. B. Jr. McCray. 2001. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*. 263(1-2):211-218.
- Kalita A., I. Verma, and G. K. Khuller. 2004. Role of Human Neutrophil Peptide-1 as a Possible Adjunct to Antituberculosis Chemotherapy. *JID*:190-191.
- Kragol G., S. Lovas, G. Varadi, B. A. Condie, R. Hoffmann and L. Otvos. 2001. The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 40(10):3016-26.
- Kisich, K. O., L. Heifets, M. Higgins. and G. Diamond. 2001. Antimycobacterial Agent Based on mRNA Encoding Human  $\beta$ -Defensin 2 Enables Primary Macrophages To Restrict Growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 69(4):2692-2699.
- Lamb H. M. and L. R. Wiseman. 1998. Pexiganan acetate. *Drugs*.56:1047-1052.
- Lee P.H., J. A. Rudisill, K. H. Lin, L. Zhang, S. M. Harris and T. J. Falla . 2004. HB-107, a nonbacteriostatic fragment of the antimicrobial peptide cecropin B, accelerates murine wound repair. *Wound Repair Regen*.12:351-358.
- Lehrer R. I. and T. Ganz. 2002. Defensins of vertebrates animals. *Curr. Opin. Immunol.* 14:96-102.

- Lehrer R. I., A. Barton, K. A. Daher, S. S. Harwig, T. Ganz and M. E. Selsted. 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* 84:553- 561.
- Levin M., P. A. Quint, B. Goldstein, P. Barton, J. S. Bradley, S. D. Shemie, T. Yeh, S. S. Kim, D. P. Cafaro and P. J. Scannon. 2000. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. rBPI21 Meningococcal Sepsis Study Group. *Lancet.* 356:961–967.
- Linde C., S. Hoffner, E. Refai and M. Andersson. 2001. In vitro activity of PR-39, a proline- arginine- rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob Chemother.* 47: 575-580.
- Luna-Herrera J, G. Martínez-Cabrera, R. Parra-Maldonado, J. A. Enciso-Moreno, J. Torres-López, F. Quesada-Pascual, R. Delgadillo-Polanco and Franzblau SG. 2003. Use of receiver operating characteristic curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22(1):21-27.
- Marchand C, K. Krajewski, H. F. Lee, S. Antony, A. A. Johnson, R. Amin, P. Roller, M. Kvaratskhelia and Y Pommier. 2006. Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicin to DNA abasic sites. *Nucl. Acids. Res.* 34:5157-5165.
- Martineau A. R. , S. M. Newton, K. A. Wilkinson, B. Kampmann, B. M. Hall, N. Nawroly, G. E. Packe, R. N. Davidson, C. J. Griffiths and R. J. Wilkinson. 2007. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J. Clin. Invest.* 117(7):1988-1994.

Mitchison, D.A. 2005. The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171(7):699-706 .

NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

Oppenheim, J. J., and D. Yang. 2005. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 17:359-365.

Panickar, J. R. and H. Hoskyns. 2006. Treatment failure in tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 9(6):297-311.

Park C. B., H. S. Kim and S. C. Kim. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:253- 257.

Raj P. A. and A. R. Dentino. 2002. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS. Microbiol.* 206:9-18.

Rivas- Santiago B., S. K. Schwander and C. Sarabia. 2005. Human beta defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* 73:4505-4511.

Rivas–Santiago B., E. Sada, V. Tsutsumi, D. Aguilar-León, J. L Contreras and Hernández- Pando R.2006. Beta defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J. Infect. Dis.* 194:697-701.

Ryan, F. 1992. *Tuberculosis: the Greatest Story Never Told.* Swift Publishers, Worcestershire. *Br. Med. J.* 679:23-25.

- Sader H .S., K. A. Fedler, R. P. Rennie, S. Stevens, and R. N. Jones. 2004. Omiganan pentahydrochloride (MBI 226), a topical 12-amino-acid cationic peptide: spectrum of antimicrobial activity and measurements of bactericidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3112–3118.
- Sansom M. S. 1993. Alamethicin and related pentaibols- model ion channels. *Eur. Biophys. J.* 22:105- 124.
- Selsted M. E., D. Szklarek and R. I. Lehrer. 1992. Purification and antibacterial activities of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.* 45:150- 154.
- Shi J, C. R. Ross, T. L. Leto and F. Blecha. 1996. PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:6014-6018.
- SINAVE.2009.Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica home page.Available at: <http://www.sinave.gob.mx/> . Accessed Nov.5, 2011.
- Tellez G. A. and J.C. Castaño. 2010. Péptidos Antimicrobianos. *Infectio.* 14:55-67.
- Trotti A., A. Garden, P. Warde, P. Symonds, C. Langer, R. Redman, T. F Pajak , T. R. Fleming, M. Henke and J. Bourhis. 2004. A multinational, randomized phase III trial of iseganan HCl oral solution for reducing the severity of oral mucositis in patients receiving radiotherapy for head-and-neck malignancy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58:674–681
- Valore, E.V., C.H Park, A. J. Quayle, K. R. Wiles, P. B. Jr. McCray and T. Ganz. 1998. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest.* 101(8):1633-1642.

- Vaucher de armelia, C.de C. Velho Gewehr , A.P. Correa , V. Sant'Anna , J. Ferreira and A .Brandelli 2011. Evaluation of the immunogenicity and in vivo toxicity of the antimicrobial peptide P34. *Int. J. Pharm.*421(1):94-8.
- Wade D., A. Boman, B. Wahlin, C. M. Drain, D. Andreu, H. G. Boman and R. B Merrifield.1990. all-D amino acid- containing cannell – forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA.* 87:4761- 4765.
- WHO. 2005. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. Geneva:WHO.
- WHO. 2010. Global Tuberculosis Program. Framework for effective tuberculosis control. Geneva:WHO.
- WHO.1994. Global Tuberculosis Program. Framework for effective tuberculosis control. Geneva:WHO.
- Yajko, D. M., J. J. Madej, M. V. Lancaster, C. A. Sanders, V. L. Cawthon, B. Gee, A. Babst, and W. K. Hadley. 1995. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 33:2324–2327.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicelular organisms. *Nature.* 415:389 – 395.
- Zerbini E., D. Andreu, G. Tonarelli and M. D Sequeira. 2006. Sensibilidad in vitro de micobacterias a dos péptidos sintéticos híbridos con actividad antimicrobiana. *Revista Argentina de Microbiología* 38: 221-223.