

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

TÍTULO DE LA TESIS

**EFFECTO DE LA SILIMARINA EN LAS CÉLULAS EPITELIALES
PULMONARES A549 DURANTE LA INFECCIÓN CON
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS H37Ra**

TESIS

QUÉ PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

NORMA LIZET HERNÁNDEZ MAGAÑA

DIRECTOR DE TESIS

MAURICIO CASTAÑÓN ARREOLA Dr. en C.

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, abril, 2024

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DE JURADO

Presidente: Dra. Lilia López Canovas.

Posgrado en Ciencias Genómicas. UACM

Secretario: Dr. Mauricio Castañón Arreola.

Posgrado en Ciencias Genómicas. UACM

Vocal: Dra. Anahí Chavarría Krauser.

Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM

DIRECTOR

Dr. Mauricio Castañón Arreola
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
Posgrado en Ciencias Genómicas

Agradecimientos

Le agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por brindarme la oportunidad de ampliar mi conocimiento y forjarme como científica. Adicionalmente, se extiende el agradecimiento al Colegio de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado mediante el proyecto CCyT-2024-CON-15.

Al Dr. Mauricio Castañón por su dedicación y mucha paciencia, sin sus críticas constructivas no sólo han mejorado la calidad de mi trabajo, sino que también me han ayudado a crecer como investigadora. Gracias por su guía y todos sus consejos.

A la Dra. Olga Nohemí Hernández, su experiencia y sus conocimientos han sido increíblemente valiosos para mí y estoy realmente agradecido por el tiempo y el esfuerzo que ha dedicado para ayudarme. Trabajar con usted ha sido una experiencia enriquecedora y he aprendido mucho. Gracias por su paciencia, sabiduría y apoyo.

A mis padres, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad. Su fe en mí, junto con su constante aliento, ha sido una fuente de fortaleza durante este proceso. Su paciencia, comprensión y sabias palabras me han ayudado a mantenerme concentrado y motivado, especialmente durante los momentos más difíciles. A mi mamá, te agradezco por siempre confiar en mí, sé que el camino que pasamos no fue fácil y te agradezco por cuidarme y guiarme hasta este momento, eres un ejemplo a seguir, te admiro por todo lo que has hecho por mi hermano y por mí, eres una gran mujer y mamá.

A mi hermano Aarón, gracias por estar ahí para mí cada vez que necesitaba a alguien con quien hablar, por escuchar mis ideas y por animarme siempre. Tu apoyo ha marcado la diferencia y estoy muy agradecido de tenerte como mi hermano. Eres mi mayor ejemplo para seguir y te admiro mucho.

A mi mejor amiga, Ivonne, gracias por ser parte de este proceso y estar en cada paso del camino. Quiero agradecerte por haberme acompañado siempre de la mano en este duro camino, no has dudado de mí y te has mantenido siempre dispuesta a ayudarme y animarme, eres más que una amiga, una hermana y dedico este momento especial a esa increíble amistad que nos une y espero se mantenga siempre.

A mis compañeros y amigos Mario Garibay y Kevin López, sin su ayuda, compañía y amistad mi estancia no hubiera sido la misma. Estoy agradecida por su presencia en mi vida, por su apoyo, amistad, y sobre todo por los innumerables recuerdos que hemos creado.

A Jorge C, por escucharme, entenderme, ayudarme y amarme tal como soy. Te admiro y agradezco todo lo que has hecho por mí. Desde el primer día que nos conocimos, me has apoyado en todo lo que hago. Siempre has estado a mi lado, ya sea en los momentos buenos como en los momentos difíciles, brindándome todo tu amor, paciencia y dedicación incondicional. Gracias por ser mi fuerza cuándo la mía era insuficiente, por la inspiración que me has brindado y por motivarme a ser una mejor versión de mí misma.

Y a todas las personas que no mencione, pero estuvieron en este proceso importante que creyeron en mi y me brindaron su apoyo.

Dedicatoria

A mis padres:

A través de estas palabras quiero expresar mi más sincera gratitud por el amor, la sabiduría y el apoyo que siempre me han brindado. Su presencia y enseñanzas en mi vida han sido fundamentales para mi formación como persona y, especialmente, como estudiante. Agradezco que hayan sido un modelo para seguir, por sus valiosas experiencias, por ser siempre un ejemplo de perseverancia y superación ante las adversidades. Ustedes son una inspiración para mí y me han motivado a esforzarme cada día.

Esta tesis es el resultado de años de trabajo y dedicación, pero también es el producto de su amor y apoyo incondicional. Espero que sientan un gran orgullo al verme graduado, sabiendo que su sacrificio y dedicación han sido un factor clave en este logro.

Les agradezco infinitamente todo lo que han hecho por mí, sus palabras de ánimo y sus bendiciones. Los quiero con todo mi corazón y siempre llevaré sus enseñanzas conmigo.

A mi hermano:

No sé si llegará algún día en el que pueda devolverte todo lo que has hecho por mí. Eres una de las personas más importantes en mi vida y siempre has estado ahí para apoyarme y alentarme en cada una de mis decisiones. Gracias por ser mi hermano y por compartir conmigo los momentos más importantes de mi vida. Espero que sigamos creciendo juntos y apoyándonos mutuamente en cada proyecto.

A mi mejor amiga Ivonne Méndez:

Me siento honrada de compartir mi éxito con alguien tan especial en mi vida, como lo eres tú, mi mejor amiga. Tu presencia ha sido una gran bendición en mi vida, me has demostrado lo que es la verdadera amistad con tu amor y apoyo incondicional en todos los momentos. Has sido una fuente de fuerza para mí en los momentos de estrés y dudas. Este logro es un resultado directo de tu amor y apoyo, y por eso quiero dedicarte mi tesis.

Índice

Abreviaturas	X
Resumen	XI
1. Introducción.....	12
1.1 Tuberculosis	12
1.1.1 Clasificación de la TB	13
1.1.2 Patogénesis de la TB	14
1.1.3 Epidemiología de la tuberculosis	16
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
1.2.1 Clasificación.....	18
1.2.2 Pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	19
1.2.3 Factores de virulencia.....	21
1.3 Respuesta inmune contra <i>M. tuberculosis</i>	22
1.3.1 Activación de NF- κ B durante la infección por <i>M. tuberculosis</i>	23
1.3.2 Pulmón	27
1.3.3 Epitelio alveolar	27
1.4 <i>Silybum marianum</i>	29
2. Antecedentes	31
3. Justificación	36
4. Hipótesis	37
5. Objetivos	38
5.1 Objetivo general	38
5.2 Objetivos particulares	38
6. Estrategia experimental.....	39
7. Materiales y Métodos	40

7.1	Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	40
7.2	Cultivo celular.....	40
7.3	Ensayo de citotoxicidad	41
7.4	Ensayo de apoptosis	41
7.5	Ensayo de infección	42
7.6	Evaluación de actividad microbicida de la SM y SB.....	43
7.7	Extracción de RNA.....	43
7.8	Arreglos de baja densidad de sondas TaqMan (TLDA)	43
7.9	Determinación de la expresión de NF- κ B por Western blot	46
7.10	Análisis estadístico	47
8.	Resultados.....	48
8.1	Ensayo de citotoxicidad celular	48
8.2	Ensayo de apoptosis.....	50
8.3	Ensayos de infección	54
8.4	Evaluación de la actividad microbicida de la SM y la SB	55
8.5	Análisis de miRNAs.....	56
8.6	Extracción de proteínas	59
8.7	Western Blot	60
9.	Discusión	61
10.	Conclusiones	64
11.	Bibliografía.....	65
12.	Anexos	72

Índice de figuras

Figura 1. Espectro clínico de la tuberculosis

Figura 2. Ciclo de transmisión de *Mycobacterium tuberculosis*

Figura 3. Número de casos nuevos de TB notificadas de 2017-2023

Figura 4. Tinción de Ziehl-Neelsen donde se observa a *M. tuberculosis*

Figura 5. Pared celular de *M. tuberculosis*.

Figura 6. Respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis* en el pulmón

Figura 7. Eventos tempranos en el alveolo cuando es infectado por *M. tuberculosis*.

Figura 8. Silimarina y sus diversas funciones

Figura 9. Efecto de la silimarina y silibinina en la viabilidad de macrófagos derivados de monocitos humanos

Figura 10. Efecto de la SM sola y combinada con fármacos de segunda línea antituberculosa en ratones infectados con la cepa de *M. tuberculosis* resistente a medicamentos

Figura 11. Flujograma para el análisis de microarreglos.

Figura 12. Microscopias de la línea celular A549 de células epiteliales alveolares humanas

Figura 13. Efecto de la silimarina y silibinina en la viabilidad celular.

Figura 14. Determinación de apoptosis en células tratadas con SM y SB a 50 y 100 μM

Figura 15. Porcentaje de células

Figura 16. Actividad microbicida de la SM y SB.

Figura 17. Actividad microbicida de la silimarina contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

Figura 18. Predicción de las vías y procesos biológicos sobreexpresados en células A549 tratadas con silimarina

Figura 19. Predicción de las vías y procesos biológicos sobreexpresados en células A549 tratadas con silimarina

Figura 20. Integridad de las proteínas de las células tratadas con SM y SB 50 μ M

Figura 21. Análisis de las Densitometrías de la proteína NF- κ B

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de *M. tuberculosis*

Tabla 2. miRNAs subexpresados y sobreexpresados

Abreviaturas

kDa	Kilo Daltones
miRNA	microRNA
MOI	Multiplicidad de infección
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NFκβ	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las Células B activadas
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Yoduro de propidio
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
SM	Silimarina
SB	Silibinina
TB	Tuberculosis
TBL	Tuberculosis latente
TBS	Tris-buffered saline
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tx	Tratamiento
T20	Tween 20
UFC	Unidades formadoras de colonia
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
WB	Western blot
μL	Microlitro
μM	Micromolar

Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. A pesar de que la TB es tratable y curable, el tratamiento es prolongado y muchas veces se desarrolla resistencia a los medicamentos por abandono al tratamiento o una mala administración de este, por lo que se ha explorado el uso de compuestos nuevos para el tratamiento de la enfermedad. Por más de 2000 años se ha utilizado el extracto de las semillas del cardo mariano (*Silybum marianum*) para tratar diversas enfermedades y, recientemente, se ha demostrado que la silimarina (SM) tiene efecto inmunomodulador, neuroprotector y antimicrobiano. En estudios recientes, se reportó que la administración de 50 μ M o 100 μ M de SM, junto con los antibióticos usados en el tratamiento de la TB disminuye significativamente la carga bacilar de *M. tuberculosis* en macrófagos infectados. Durante la tuberculosis las células epiteliales alveolares juegan un papel fundamental en la respuesta y el control de la infección. El objetivo de este proyecto es evaluar el efecto de la SM en el control de la infección por *M. tuberculosis* H37Ra en la línea celular A549. En cinéticas de dosis-tiempo-respuesta se evaluó si la SM y la silibinina (SB) son citotóxicas para la línea celular A549. Los resultados mostraron que la SM es citotóxica a concentraciones mayores a 250 μ M. La SM 50 μ M induce un menor porcentaje de apoptosis, con respecto a SB. La silimarina también presenta actividad antimicrobiana contra *M. tuberculosis* H37Ra. El tratamiento de las células A549 con SM 50 μ M induce la expresión de más de 11 miRNAs que participan en vías de señalización importantes para el control de la infección como las vías MAPK, y TGF- β . Adicionalmente, las células tratadas con SM a 50 μ M mostraron una disminución de la expresión de NF- κ B, probablemente debido a los efectos antiinflamatorios de la SM. En conclusión, la SM y SB podrían ser buenos candidatos como adyuvantes para el tratamiento de la TB ya que presentan actividad bactericida y ayudan a reducir de forma significativa el número de bacilos en las células A549 infectadas.

1. Introducción

1.1 Tuberculosis

En el año de 1882, Robert Koch notificó que el agente causal de la tuberculosis (TB) era una micobacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) o también conocido como bacilo de Koch (Sakula, 1982).

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas más antiguas de la humanidad. La principal forma de transmitir la TB es por vía aérea, donde la fuente principal de infección son las personas con TB pulmonar activa. La principal forma de contagio es cuando una persona con TB expulsa bacilos en gotículas cuando tose, estornuda o habla, y éstas son inhaladas por una persona sana (Hershkovitz *et al*, 2015).

Aunque este bacilo puede afectar cualquier órgano se ha descrito que el más afectado es el pulmón. Los principales síntomas que caracterizan a una persona con TB pulmonar son: tos, dolor torácico, pérdida de peso, fiebre, debilidad y sudoración nocturna, aunque al inicio de la enfermedad los síntomas pueden llegar a ser leves y confundirse con los síntomas de otras enfermedades. Una de las desventajas que hay en el diagnóstico de esta enfermedad es que es tardío y, debido a esto, aumenta el índice de la transmisión de la enfermedad (Sosa *et al*, 2022).

A pesar de que la TB es una enfermedad tratable y curable, el tratamiento estándar para tratar la TB pulmonar consta de una fase intensiva de dos meses de terapia cuádruple con isoniazida (INH), rifampicina (RPM), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA), seguida de la fase de mantenimiento que consiste en 4 meses adicionales de administración de RPM e INH. La administración de estos medicamentos puede causar daños hepáticos o causar resistencia si no son administrados de manera adecuada (Horsburgh *et al*, 2015).

1.1.1 Clasificación de la TB

A pesar de que la TB afecta principalmente a los pulmones, se considera que esta enfermedad es dinámica, esto quiere decir que el paciente puede no presentar síntomas hasta que se desarrolla una enfermedad potencialmente mortal. Por lo tanto, desde una perspectiva clínica existen tres afecciones relacionadas con la tuberculosis (Figura 1): la TB latente (TBL), la TB subclínica y la TB activa (Bolscher *et al*, 2007).

La TBL es un estado de la infección latente se refiere a un estado persistente en el que hay una respuesta inmune a la estimulación por antígenos de *M. tuberculosis*. Es una afección que se mantiene en las personas que se infectan con el bacilo pero no se enferman. La TBL también se ha denominado como “TB quiescente”, debido a que *M. tuberculosis* está inactiva en el cuerpo, no crece y por lo tanto el paciente no puede propagar al bacilo (Sterling *et al*, 2020).

La TB activa es la afección en la que *M. tuberculosis*, puede dañar cualquier órgano, siendo el más afectado el pulmón. Esta afección puede ser TB primaria o reactivación de la tuberculosis latente. La TB primaria se da cuando el sistema inmune es incapaz de defenderse contra la infección por *M. tuberculosis*. Y la TB reactiva es básicamente como su nombre lo indica, la reactivación de una infección previa provocada por la pérdida del control de la infección por el sistema inmunológico, siendo esta última la forma más común de TB activa (Jilani *et al*, 2018).

Finalmente, la TB subclínica Enfermedad que provoca *M. tuberculosis*, que no causa síntomas clínicos relacionados con la TB, aunque provoca otras anomalías que puedan detectarse mediante los diversos ensayos radiológicos o microbiológicos (Kendall *et al*, 2021). Esta forma de infección también es transmisible y difícil de diagnosticar, dada la ausencia de síntomas.

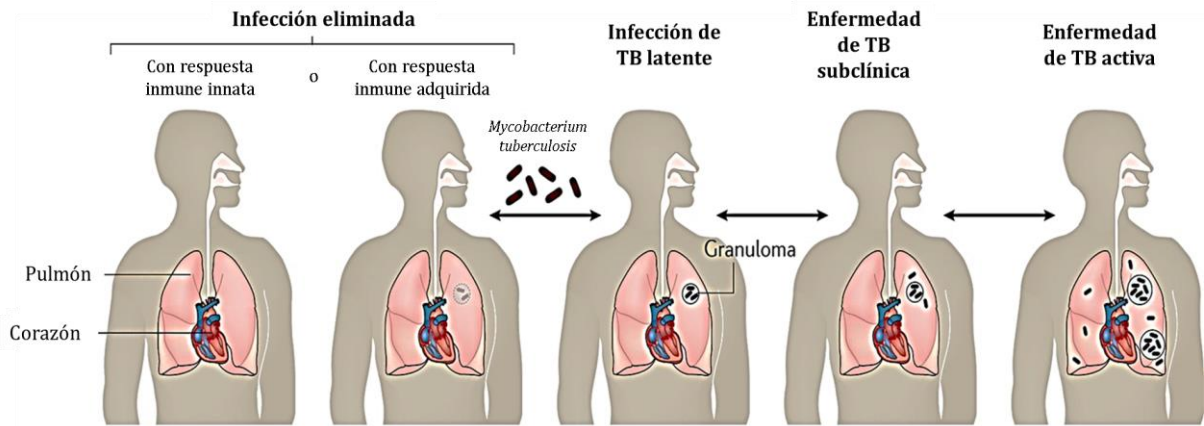


Fig.1. Espectro clínico de la tuberculosis. La TB es una enfermedad causada por *M. tuberculosis* y es denominada dinámica. Los pacientes se clasifican en infección de tuberculosis latente, activa y subclínica (Tomado y modificado de Pai, 2016).

1.1.2 Patogénesis de la TB

Cuando un individuo se infecta con *M. tuberculosis* pueden ocurrir tres casos:

A) el sistema inmune del hospedero es capaz de eliminar por completo al bacilo; B) si el bacilo logra entrar y no logra ser controlado por el sistema inmune, éste tendrá la capacidad de producir la enfermedad primaria; y C) por último el sistema inmune del hospedero tiene la capacidad de retener o controlar el crecimiento del bacilo, aunque no logran eliminarlo por completo. Sin embargo, algunos bacilos pueden escapar de este control y generar la enfermedad, la que es conocida como tuberculosis post-primaria (Rodríguez, 2014).

El ciclo de transmisión de la TB se divide principalmente en 4 etapas (Figura 2). La primera etapa comienza cuando la persona se contagia al inhalar gotículas, posteriormente, los bacilos viajan a través del tracto respiratorio y alcanzan los alveolos pulmonares. A continuación, los macrófagos alveolares (MA) fagocitan a los bacilos para destruirlos. Sin embargo, la capacidad de los MA de eliminar al bacilo va a depender de los factores de virulencia y el estado sistema inmune de cada individuo. En la segunda etapa, las micobacterias escapan de la destrucción inicial, y se multiplican dentro de los

macrófagos. Si esto llega a suceder, los monocitos y otras células proinflamatorias son reclutadas hacia el pulmón (Cardona, 2018).

En la tercera etapa o TBL, el bacilo se puede ser contenido dentro de los granulomas por años. Aunque se cree que la latencia puede abarcar diversos estados, desde las personas que tienen controlada la enfermedad hasta los casos de enfermedad subclínica.

Por último, en la cuarta etapa, si el sistema inmune se debilita por múltiples factores como la vejez, la infección por VIH, desnutrición, diabetes, uso de tratamientos inmunosupresores, la bacteria puede vencer al sistema inmune y, por lo tanto, los bacilos escapan del granuloma y de esta forma la enfermedad se reactiva y causa los signos y síntomas característicos de la enfermedad (Ottenhoff *et al*, 2002).

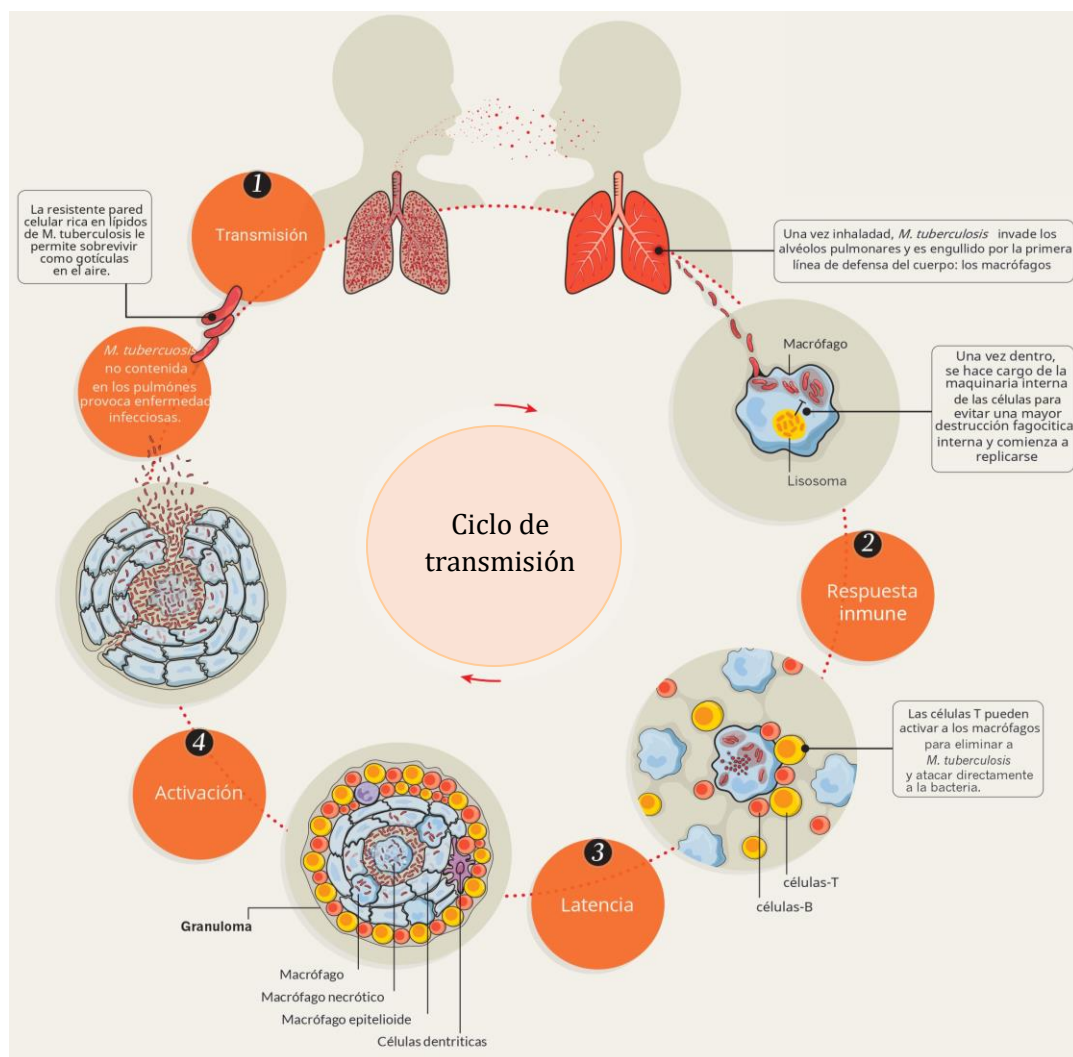


Fig.2. Ciclo de transmisión de *M. tuberculosis*. El ciclo de transmisión de *M. tuberculosis* consta de 4 etapas: 1) Transmisión: Ocurre cuando una persona enferma con TB transmite al bacilo a través de gotículas. 2) Respuesta inmune: Tener un buen sistema inmune va a ser un factor importante para poder combatir a este bacilo. 3) Latencia: Es denominada latencia ya que, Mtb va a estar contenido dentro de los granulomas, esta contención puede estar presente por años. Y 4) Activación: Algunos de los factores de la activación del bacilo es la edad, o tener el sistema inmunológico bajo. (Tomado y modificado de Paulson, 2013).

1.1.3 Epidemiología de la tuberculosis

Desde 1997, la Organización mundial de la salud (OMS) publica anualmente un informe mundial sobre la TB. De acuerdo con dicho informe, la OMS estima que una cuarta parte de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* y causa alrededor de 1.5 millones de muertes por año, lo cual, la convierte en la segunda causa de muerte por un solo agente infeccioso en los últimos años (OMS, 2021). Las personas con VIH son las más afectadas por TB, ya que, en el año 2021 fallecieron 214,000 personas con HIV por tuberculosis.

En el año 2021 se estimó que esta enfermedad afecta más a los hombres, representando el 54.5% de la carga de TB, las mujeres un 32.5% y los niños el 11% de los casos (PAHO, 2022).

En México, en el año 2022 se registraron más de 28 mil casos totales de TB y en el 2023 disminuyó el número de casos, ya que se registraron 16,916, de los cuales 10,948 personas fueron hombres y 5,968 mujeres (DGE, 2023).

En los datos recopilados del número de nuevos casos de TB desde el año 2017-2023 (Figura 3), se observa que hubo una disminución de casos en el año 2020, esta reducción se dio tras la pandemia por COVID-19, debido a diversos factores, uno de ellos fue que los casos de TB no fueron reportados o los síntomas fueron confundidos con otras enfermedades respiratorias. Sin embargo, el número de casos fue incrementando a partir del 2021 al 2023.

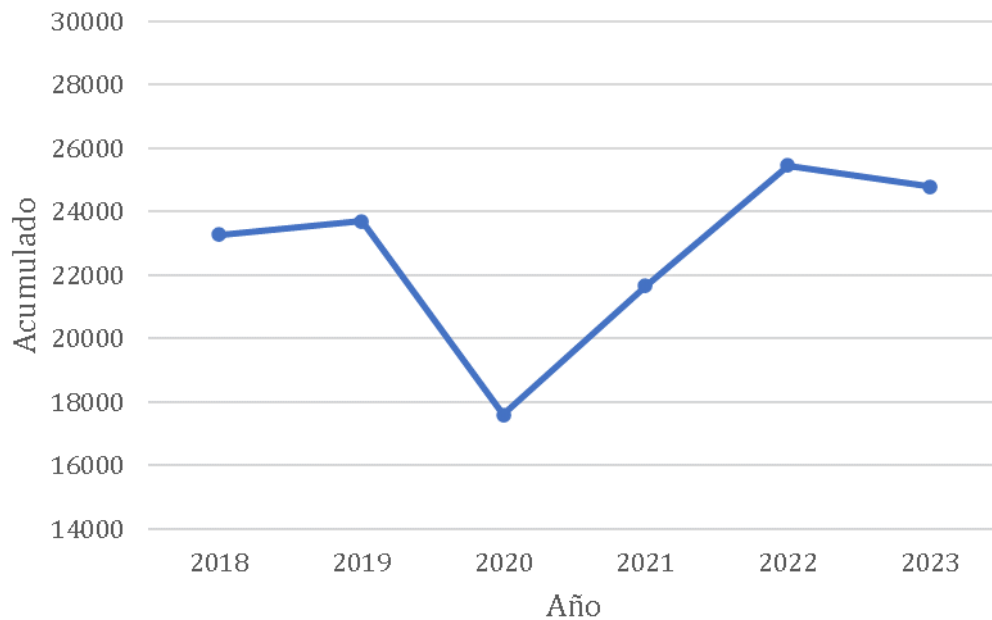


Fig.3. Número de casos nuevos de TB notificadas de 2017 - 2023. Se observa que en el año 2022 hubo un decremento de casos, esto se debe a que varios casos de TB no fueron diagnosticados debido a la pandemia de COVID-19 (Tomado y modificado de Version 1.4, Source code on Github. Data collected and published by the World Health Organization).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis, es un bacilo aerobio estricto, no móvil, no formador de esporas, pleomórfico, ácido-alcohol-resistente, que tienen un crecimiento lento y se clasifica como una bacteria Gram-positiva, aunque tiene una estructura similar a la bacterias Gram-negativas (Barksdale & Kim, 1977). Estos bacilos son delgados, de forma recta o algunos son ligeramente curvos (Figura 5), miden entre 1-10µm de largo por 0.2-0,6 µm (Pérez del Molino *et al*, 2002).

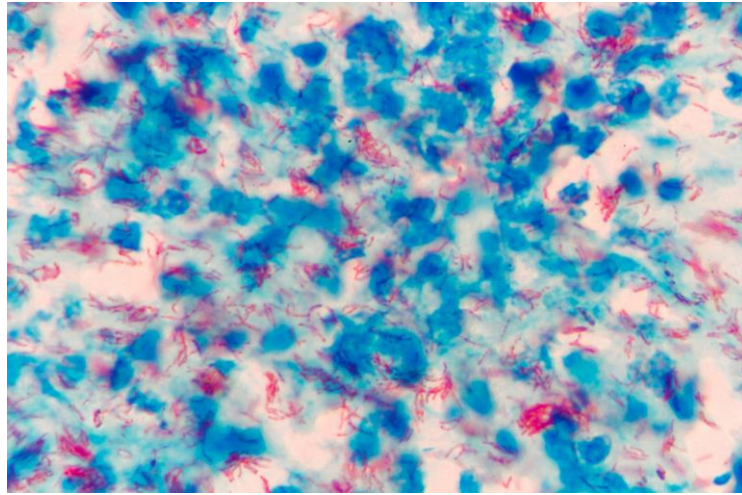


Fig. 4. Tinción de Ziehl-Neelsen donde se observa a *M. tuberculosis*. En la imagen se pueden observar los bacilos teñidos de color rojo en una muestra de esputo de un paciente con TB. (Tomado y recuperado de: <https://www.istockphoto.com/es/foto/tm-gm582312266-99831521>)

1.2.1 Clasificación

Actualmente el género *Mycobacterium* incluye más de 170 especies, y se dividen en dos grupos: Organismos de crecimiento rápido y organismos de crecimiento lento, donde *M. tuberculosis* pertenece a este último grupo (Guerrero *et al*, 2003).

Tabla 1. Taxonomía de *M. tuberculosis*.

Dominio	Bacteria
Filo	Actinobacteria
Clase	Actinobacteria
Orden	Actinomycetales
Familia	Mycobacteriaceae
Género	Mycobacterium
Especie	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

M. tuberculosis es miembro del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC, por sus siglas en inglés), este complejo incluye otras seis especies estrechamente relacionadas: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium canetti*. Todos los miembros del MTBC son patógenos obligados y, por lo tanto, capaces de causar tuberculosis (Bandaru *et al*, 2020).

1.2.2 Pared celular de *M. tuberculosis*

La pared celular de *M. tuberculosis* se dice que es única, ya que la composición de su pared celular es una de las más complejas (Figura 5). Aproximadamente el 60% de la masa total de la pared celular está constituida por lípidos complejos como los lipoarabinogalactano, lipoarabinomanano (LAM) lo cuales, le confiere una gran hidrofobicidad extrema (Ghazaei, 2018).

La membrana plasmática es muy similar a la de otras bacterias ya que ésta le da integridad, estructura, soporte y está rodeada por una capa de peptidoglicano (PG) que forma complejos de forma covalente con arabinogalactano. Se dice que el PG es dinámico y confiere características como un espesor y una barrera que protege a las bacterias de posibles daños que puedan sufrir en el microambiente (Maitra *et al*, 2019).

Otro componente de la pared celular son los ácidos micólicos intercalados con los lípidos libres, los cuales son esenciales para la viabilidad. Por otro lado, el ácido micólico se une a la al PG plasmático, esta característica le da una estabilidad muy alta y esto hace que sea una estructura compacta (Grzegorzewicz *et al*, 2016).

La membrana externa está compuesta principalmente por ácido micólico y glicolípidos complejos como: monomicolato de trehalosa, dimicolato de trehalosa (TDM), fosfolípidos, glicopeptidolípidos, dimicocerosato de fticerol, manposidos de fosfatidilinositol, ftioceroldimicocerosatos, lipomanano, lipoarabinomano (LAM) y sulfolípidos. Todas las características de la pared celular como la resistencia y virulencia de las micobacterias se deben a las complejas relaciones y entrelazamientos entre sus componentes (Jacobo *et al*, 2023).

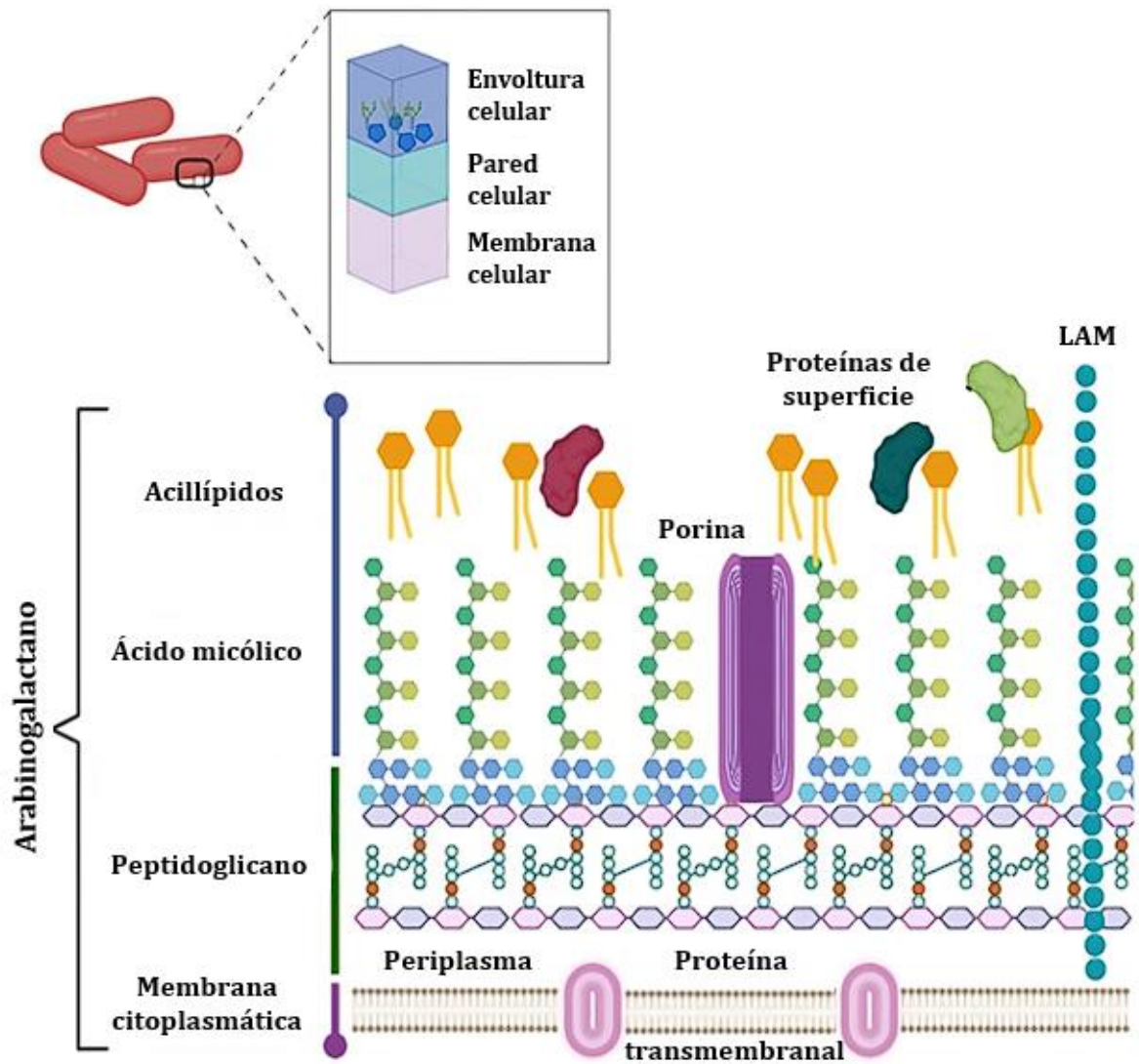


Fig.5. Pared celular de *M. tuberculosis*. La pared celular de *M. tuberculosis* está compuesta por envoltura celular, pared y membrana celulares. También, las diversas capas que componen a esta pared tienen diversos lípidos y peptidoglicanos (Tomado y modificado de Delgado, *et al*, 2023).

1.2.3 Factores de virulencia

Existen diversas condiciones para determinar los factores de virulencia de *M. tuberculosis*, sin embargo, en la actualidad sigue sin ser claro que es lo que constituye a un factor de virulencia. Una de las características importantes que deben cumplir estos factores es que su ausencia pueda atenuar la virulencia del microorganismo en un modelo *in vivo* (Forrellad *et al*, 2013).

Se han detectado una gran diversidad de antígenos, los cuales, son importantes para la patogenicidad de *M. tuberculosis*, éstos se agrupan basados en su función: envoltura (componentes de superficie celular) y secreción (enzimas del metabolismo celular, incorporación de metales y reguladores transcripcionales (Maulén, 2011). A continuación, se muestran algunos de los componentes de *M. tuberculosis* que han sido considerados como factores de virulencia:

Componentes de la pared celular:

- Ácidos micólicos: Este tipo de ácidos grasos de cadena larga son un componente importante de la pared celular de las micobacterias, ya que contribuyen a la impermeabilidad de la envoltura celular, esta característica es importante, ya que permite que la micobacteria sea resistente a diversos antibióticos y factores inmunes del hospedero (Jackson, 2014).
- Lipoarabinomano (LAM): LAM es un glicolípido que se encuentra en la superficie de las micobacterias, se ha descrito que modula la respuesta inmune del hoperdo y desempeña un papel fundamental en la formación de granulomas (Correia *et al*, 2019).

Sulfolípidos:

- Los sulfolípidos son lípidos que está expuestos en la superficie que contribuyen a que *M. tuberculosis* persista dentro de los tejidos del hospedero al inhibir la fusión fagolisosomal en los macrófagos (Ly & Liu, 2020).

Proteínas cinasas de serina/treonina:

- *M. tuberculosis* posee varias proteínas quinasas de serina/treonina, las cuales desempeñan funciones en la transducción de señales y la modulación de las

funciones celulares del hospedero. Por lo tanto, la transducción de señales es fundamental para poder adaptación celular a los cambios que puedan existir en el entorno extracelular. En el caso de *M. tuberculosis*, las respuestas adaptativas van a permitir el crecimiento y/o la supervivencia durante la infección en el hospedero humano (Prisic & Husson, 2014).

- **Proteínas de secreción:**

Todas las bacterias incluidas las micobacterias cuentan con un sistema para exportar proteínas más allá de la membrana citoplasmática, incluso más allá de la pared celular. Además de la exportación interna, las micobacterias usan este sistema de secreción en la virulencia y patogénesis de la enfermedad. Por lo tanto, las proteínas secretoras de *M. tuberculosis*, son consideradas las principales herramientas que tiene este bacilo para establecer una infección bacteriana de forma exitosa. Algunas de las vías de secreción que poseen los bacilos son: la vía sec (vía secretora conservada) y la vía de translocación de arginina gemela (TAT). (Pal *et al*, 2022).

1.3 Respuesta inmune contra *M. tuberculosis*

La TB puede afectar cualquier órgano del cuerpo, aunque generalmente el pulmón es el más afectado, debido a que *M. tuberculosis* es un bacilo aerobio que prefiere áreas con altas concentraciones de oxígeno (Rivas *et al*, 2005).

La respuesta inmune generada por la infección por *M. tuberculosis*, por lo general, es insuficiente para eliminar totalmente el bacilo, por lo que éste permanece en el cuerpo. La reactivación de la TB activa es causada por diversos factores, tales como la infección con el virus del VIH, el uso de corticosteroides, el envejecimiento, el uso indebido de alcohol y drogas. Sin embargo, la causa principal de la reactivación de la TB es la falta de una respuesta inmune generada por el organismo (Flynn & Chan, 2001).

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del cuerpo contra los patógenos, pero tiene una especificidad limitada (Toche, 2012). La respuesta inmune innata se caracteriza por el reconocimiento de estructuras moleculares comunes entre los

patógenos, gracias al uso de receptores conocidos como Toll-like Receptores o TLR. La unión de estos receptores a los patógenos induce la producción de factores proinflamatorios, como el TNF- α y el óxido nítrico (NO). Estos factores, de forma directa o también indirectamente, pueden contribuir a la eliminación de los microorganismos (Iwasaki & Medzhitov, 2004).

Además de los Toll-like Receptors, existen otros componentes importantes en la respuesta innata del cuerpo, los cuales incluyen macrófagos alveolares (MA), células dendríticas, neutrófilos, células epiteliales, así como células alveolares tipo I y II. También se producen factores solubles, tales como mucina, lisozima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasas A2 y proteínas del complemento. Estos tipos celulares y factores solubles juegan un papel importante en la homeostasis pulmonar y en la eliminación de cualquier material extraño, como bacterias o partículas, que puedan ingresar al tracto respiratorio (Herrera *et al*, 2005).

La presentación de antígenos es un paso crucial para la evolución de una respuesta inmune innata a la respuesta adaptativa. Este proceso se basa en la identificación específica de los antígenos por los distintos tipos celulares, que se activan y producen principalmente factores solubles como citocinas y quimiocinas (Herrera *et al*, 2005). El control de la inmunidad contra *M. tuberculosis* se basa en la respuesta de células T. Esta respuesta celular se caracteriza por la producción de citocinas y quimiocinas como las IL-2, INF- γ (Interferón gamma), IL-12, IL-18, TNF- α , RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-18. La diversidad de poblaciones celulares y mediadores solubles se combinan para formar una complicada red de señales que participan en el control de la TB causada por *M. tuberculosis*. (Chandra *et al*, 2022).

1.3.1 Activación de NF- κ β durante la infección por *M. tuberculosis*

El factor de transcripción NF- κ β es un intermediario crucial que regula la supervivencia, activación y diferenciación de las células inmunitarias innatas y de las células T inflamatorias (Liu *et al*, 2017). Se ha verificado que NF- κ β se activa debido a distintos estímulos como son: endotoxinas, virus, bacterias, mitógenos, entre otros. A su vez, NF-

$\kappa\beta$ favorece la expresión de una amplia variedad de genes que están implicados en la inflamación en respuesta a patógenos, tal es el caso de las citocinas y moléculas de adhesión (Guijarro & Egida, 2002). La vía de señalización de NF- $\kappa\beta$ tiene dos vías de señalización principales: la canónica y la no canónica. La vía de NF- $\kappa\beta$ se regula a través de I κ B (un inhibidor de NF- $\kappa\beta$), el cual está regulado por el complejo IKK a nivel de fosforilación. Por lo tanto, una de las citocinas más importantes es el TNF- α , ya que es un regulador clave para la respuesta inmune de la persona frente cualquier infección, en particular la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. Además, el TNF- α afecta a *M. tuberculosis* a través de diversos mecanismos como: inducción de la activación de macrófagos (para eliminar bacterias de manera eficiente), inducción de la expresión de citocinas y quimiocinas, así como inducción de apoptosis (Gutiérrez *et al*, 2008). La vía de señalización de NF- $\kappa\beta$ inducida por el TNF- α es importante para la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. También, la dinámica de señalización de este factor intracelular es fundamental para controlar la infección provocada por el bacilo (Davis & Ramakrishnan, 2008).

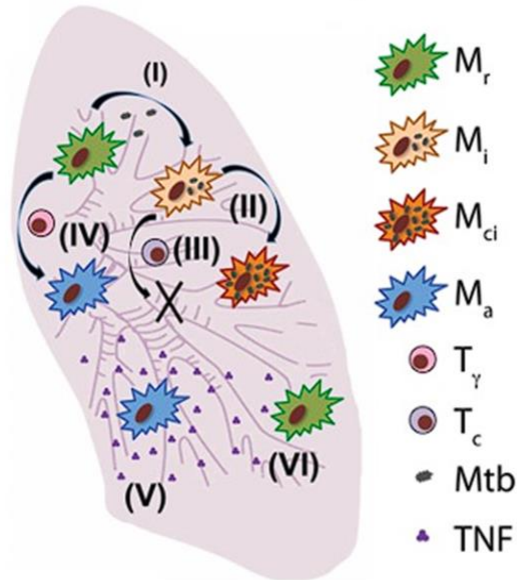
La interacción entre NF- $\kappa\beta$ y *M. tuberculosis* durante la infección es un proceso complejo, que involucra una variedad de mecanismos moleculares y celulares. En primer lugar, se produce el reconocimiento de *M. tuberculosis* por las células del huésped y esto sucede cuando *M. tuberculosis* infecta a las células del huésped, varios receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en la superficie celular como las lipoproteínas, como los receptores tipo Toll (TLR) especialmente los TLR4 y TLR2, reconocen moléculas específicas en la superficie de *M. tuberculosis* conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Este reconocimiento va a desencadenar vías de señalización que activan a NF- $\kappa\beta$ (Mortaz *et al*, 2015).

Durante la infección provocada por *M. tuberculosis*, una de las principales citocinas que se produce es el TNF- α , ya que este permite la formación y el mantenimiento de los granulomas. Además, TNF- α se va a unir al receptor de TNF tipo 1 (TNFR1); para poder producir una señal intracelular para activar a la quinasa I κ B (IKK), la cual va a fosforilar a las proteínas I κ B, esto resulta en su degradación mediada por proteasoma (Hayden & Ghosh, 2008). Por lo tanto, cuando una persona se encuentra sana, NF- κ B va a estar de forma latente unido a proteínas I κ B en el citoplasma de las células en reposo, entonces

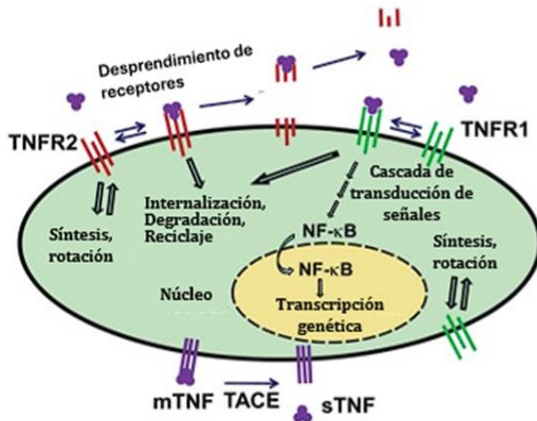
una vez que se liberan, van a acumularse y entran al núcleo para poder regular la transcripción de genes importantes (Baltimore, 2011).

Para comprobar el alcance del efecto de todas las moléculas que interactúan contra *M. tuberculosis* se realizó un modelo computacional (Figura 6) para ver si esta vía afectaba de manera significativa la resolución de la infección causada por el bacilo. Donde concluyeron que esta vía tenía un papel fundamental al momento de restringir el crecimiento bacteriano en los granulomas, sin embargo, si esta vía se activa en exceso puede provocar que haya un aumento de la inflamación del tejido (Fallahi *et al*, 2012). Por lo que es importante mantener un equilibrio en la activación de esta vía, ya que puede contribuir en contener al bacilo dentro del granuloma y puede permitir una respuesta mediada por células T para posiblemente eliminar la infección bacteriana (Poladian *et al*, 2023).

A. Interacciones celulares en el pulmón



B. Macrófago individual



C. Detalles de las señales NF-κB

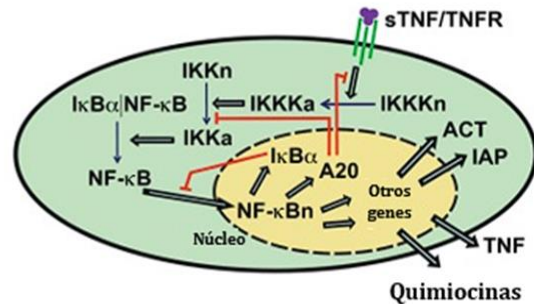


Fig.6. Respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis* en el pulmón. A) Se presentan interacciones celulares en el pulmón: I) Un macrófago en reposo se infecta después de la fagocitar a *M. tuberculosis* extracelular, II) Crecimiento intracelular del bacilo dentro de un macrófago infectado, III) Las células T citotóxicas eliminan a los macrófagos infectados, IV) Activación del macrófago como resultado de la interacción con células T y de $IFN-\gamma$ y TNF, V) secreción de TNF (y quimiocinas) de un macrófago activado y difusión en el tejido, VI) interacciones de TNF con un macrófago inducen un mecanismo de retroalimentación que controlan la respuesta celular mediadas por TNF. B) Además, se hace una descripción general de las interacciones y reacciones de unión y tráfico de TNF/TNFR y se explica la cascada de transducción de señales de NF- κ B a nivel de célula individual (Tomado de Fallahi *et al*, 2012).

1.3.2 Pulmón

El pulmón es el órgano, encargado del intercambio de gases y proporcionar oxígeno a la sangre, esta acción es llevada a cabo en los alveolos.

Este órgano está expuesto a diversos microorganismos como bacterias, hongos y virus. Sin embargo, se ha demostrado que no importa la cantidad de microorganismo que entren al pulmón, ya que las células epiteliales, la inmunidad innata, adaptativa y el microbioma eliminan a la mayoría de los patógenos respiratorios. Aunque, si estas defensas fallan, se pueden presentar daños severos en el pulmón (Khan *et al*, 2019).

1.3.3 Epitelio alveolar

Las células epiteliales alveolares son un tipo de células que forman el revestimiento de los alveolos, los cuales, son pequeños sacos de aire que se encuentran en los pulmones. El epitelio alveolar está compuesto por células epiteliales alveolares tipo I (AEC-I), responsables del intercambio de gases y células epiteliales alveolares tipo II (AEC-II), responsables de la reparación del epitelio tras sufrir una lesión y de funciones secretoras. También, las AEC-II son importantes ya que contribuyen en la defensa de los pulmones al secretar productos antimicrobianos como la lisozima y proteínas tensioactivas. AEC-I y II sirven como barrera física, la cual, está involucrada en la modulación de la inmunidad innata y la rápida eliminación de agentes ambientales (Pai & Kupz, 2020).

Aunque ACE-I y AEC-II son importantes porque contribuyen de manera constante a la defensa de las vías respiratorias, se ha demostrado que AEC-II tiene más relevancia debido a que estas células son más activas inmunológicamente, ya que secretan una variedad de factores como quimiocinas; y citocinas, las cuales están involucradas en la activación y diferenciación de las células inmunes y se ha visto que pueden presentar antígenos a células T específicas (Fehrenbach, 2001). Por lo tanto, las AEC, otras células como los macrófagos; participan en la defensa del tracto respiratorio (Chuquimia *et al*, 2013). Entonces, cuando el bacilo alcanza los alveolos puede infectar a las células AEC-II, en respuesta a la infección la célula va a producir citocinas, quimiocinas y

antimicrobianos que van a activar a los macrófagos alveolares (MA). Posteriormente, los MA se van a dirigir hacia los bacilos y los va a fagocitar a los bacilos y es de esta forma que llegan al tejido subyacente. Después, el macrófago atrae más macrófagos, monocitos, neutrófilos, células T, células B y células dendríticas del torrente sanguíneo. Estos pasos son el inicio de la formación del granuloma y por lo tanto el inicio de la LITB (Figura 7).

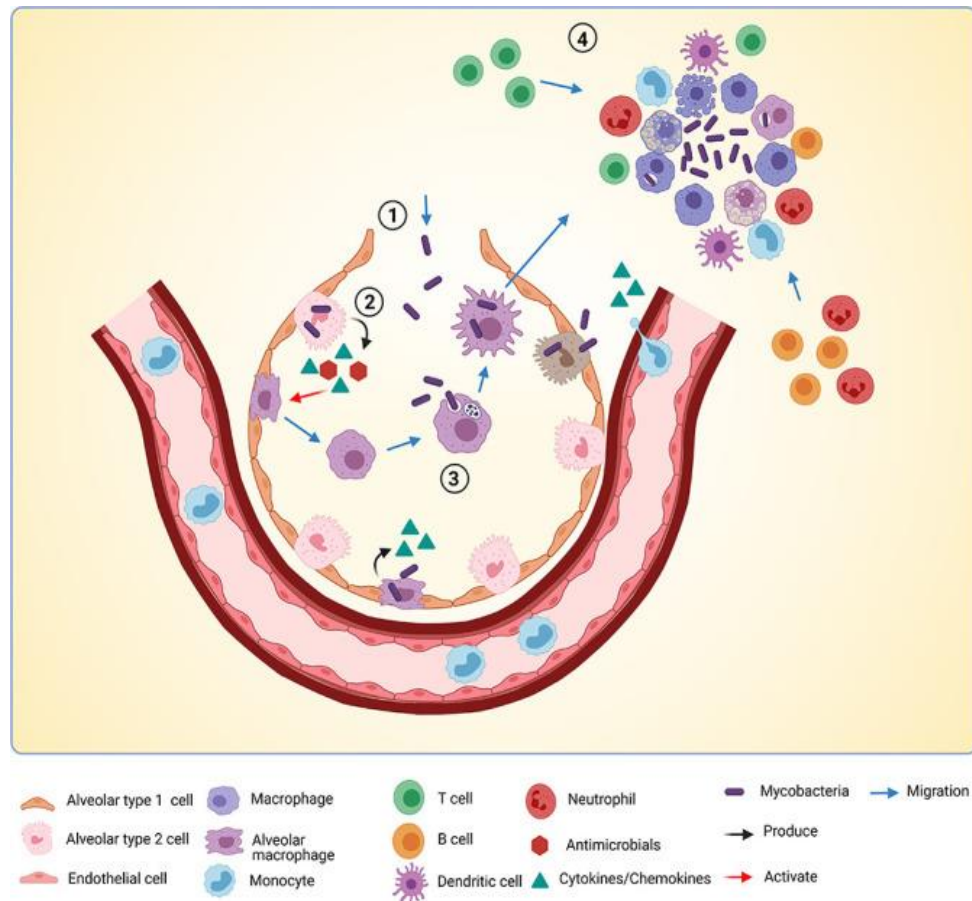


Fig. 7. Eventos tempranos en el alveolo cuando es infectado por *M. tuberculosis*.

Las células epiteliales pulmonares son importantes para las vías respiratorias y están expuestas directamente a patógenos como el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Waal et al, 2022). También, el EA es donde se produce la interacción entre el huésped y el bacilo y el EA juega un papel importante en la progresión de la enfermedad. Entonces, es importante buscar tratamientos naturales para fortalecer esta barrera y ayudar a combatir la resistencia a los antibióticos principalmente para tratar la TB (Brune et al,

2015). Tal es el caso de silimarina (sm), derivado de una planta denominada como cardo mariano. Se ha visto que puede actuar como hepatoprotector, inmunomodulador, microbicida, antioxidante, etc (Esmail *et al*, 2010). Estudios anteriores han demostrado que la silimarina (sm) tiene propiedades antimicrobianas y puede reducir la carga bacteriana en los pulmones, lo que puede convertirla en una herramienta útil en la lucha contra la TB (Rodríguez *et al*, 2019). Además, se ha demostrado que la sm tiene efectos inmunomoduladores que pueden ayudar a proteger las células epiteliales pulmonares de los efectos dañinos de la infección por TB (Gogh *et al*, 2010). Aunque la eficacia de la sm como tratamiento para la TB aún no se ha evaluado totalmente, se considera una posible opción en la protección de las células epiteliales pulmonares para prevenir daños. Por lo tanto, se requiere búsqueda adicional para entender mejor el potencial de la silimarina en el tratamiento de la TB y cómo se puede mejorar su uso para proteger las células epiteliales pulmonares.

1.4 *Silybum marianum*

El cardo mariano o *Silybum marianum*, es una planta herbácea que se da anual o bianualmente, pertenece a la familia Asteraceae, crece en Europa meridional, al norte de África, este de Asia y América del Norte (Abenavoli *et al*, 2010). Los extractos de las semillas de esta planta se han utilizado por más de 2000 años para tratar diversas enfermedades principalmente del hígado. También se ha utilizado para tratar hepatitis, cirrosis, ictericia, entre otras enfermedades hepáticas. Aunque, también se le atribuyen efectos protectores para el hígado y contra el envenenamiento ya sea por toxinas químicas o ambientales (Křen & Walterová, 2005).

La silimarina (SM) es el compuesto bioactivo extraído de las semillas de esta planta y está compuesto por 7 flavonolignanos (Anexo 1), del 70-80% son silibinina (silibinina A y B), isosilibinina (isosilibinina A y B) silidianina, silicristina y flavonoides (taxifolina y quercetina). El resto corresponde a compuestos polifenólicos poliméricos y oxidados (Javed *et al*, 2011).

La SM tiene diversos efectos; como antioxidante que actúa en los radicales libres e impide la formación de los mismos, antiinflamatorio, antifibrótico, inmunomodulador, regenerador hepático, antioleostático, regenerador hepático, protector a tóxicos, antiviral, neuroprotector, actividad antimicrobiana, etc (Vallejo, 2019).

Sin embargo, la SM también puede actuar como inmunomodulador, sensibilizador de insulina, regulador del transporte intracelular de fármacos, entre otras, como se observa en la Figura 7 (Federico *et al*, 2017).

El principal compuesto activo de la silimarina es silibinina (SB), este extracto está compuesto por una mezcla de dos diastereómeros de silibinina A y silibinina B (Bosch & Menéndez, 2015).

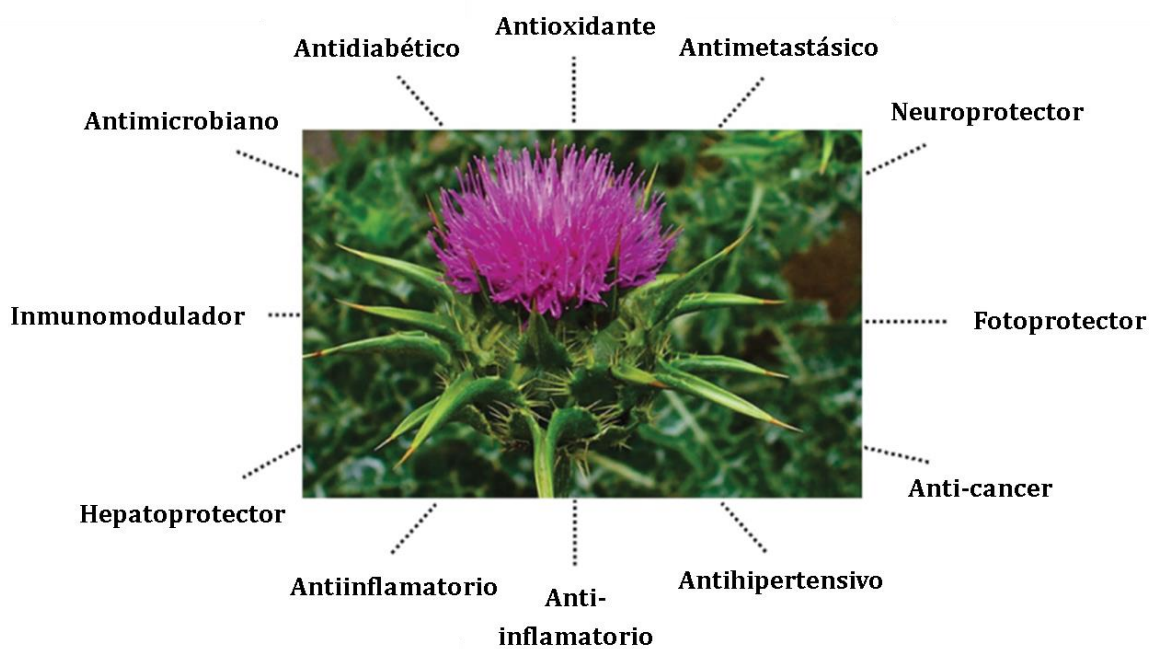


Fig.8. Silimarina y sus diversas funciones (Tomada y modificada de Camini & Costa, 2020).

2. Antecedentes

En los últimos años, el uso de productos derivados de plantas se ha utilizado para tratar diversas enfermedades y ha sido de gran importancia para la investigación científica (Federico *et al*, 2017). Como es el caso de *Silybum marianum*, que ha sido usado por más de 2000 años para tratar distintas afecciones como enfermedades del hígado, vesícula biliar, etc. El compuesto activo de esta planta denominado silimarina, se ha visto como un compuesto farmacológico y médico controversial, ya que puede llegar a ser tóxico, sin embargo, la literatura muestra que es un compuesto que tiene evidencia de ser seguro y efectivo (Křen & Walterová, 2005).

Se ha reportado que la silimarina muestra actividad antimicrobiana. Por sí sola tiene resultados bajos como antimicrobiano, sin embargo, se demostró que muestra una actividad sinérgica con los medicamentos antibacterianos (Hao, 2015).

Asimismo, en China son utilizados distintos extractos de plantas, entre ellas la SM, para prevenir la aparición de lesión hepática causada por los tratamientos antituberculosos (Hu *et al*, 2008). Sin embargo, no ha sido claro el mecanismo biológico y los efectos preventivos que los extractos del cardo mariano puedan tener, ya que se ha demostrado que algunos hepatoprotectores naturales pueden llegar a causar daño hepático (Lai *et al*, 2012). Por lo tanto, se realizó un estudio que tenía como objetivo evaluar los efectos del uso preventivo del hepatoprotector del compuesto activo del cardo mariano, contra la lesión hepático-inducida por fármacos a pacientes con TB. Se evaluaron dos grupos, el grupo control de pacientes tratados con los tratamientos antituberculosos y vitamina C (n=187) y el grupo experimental tratado con los tratamientos antituberculosos y 200 mg de SM (n=183). Los resultados mostraron que no había diferencia significativa entre los grupos (Zhang *et al*, 2016), por lo tanto, eso sugiere que la vitamina C y la SM pueden estar actuando de la misma forma.

De acuerdo con diferentes estudios, la silimarina tiene la capacidad de suprimir la vía de señalización NF- κ B y la activación del TNF- α . También, se ha demostrado que la silimarina actúa como agente inmunomodulador, ya que en dosis bajas inhibe la función

de los linfocitos T y, en dosis altas, estimula los procesos inflamatorios (Esmail *et al*, 2017). La SM no tiene o tiene efectos secundarios muy bajos. *In vitro* es un inmunoestimulante que puede inducir la secreción del INF- γ , IL-4 e IL-10, las cuales son citocinas polarizantes y reguladoras importantes de la respuesta inmune (Wilasrusmee *et al*, 2002).

El tratamiento antituberculoso se ha administrado desde hace más de 60 años, consiste en la administración de cuatro fármacos (isoniacida, rifampicina, pirazinamida y fluoroquinolonas) por 6 meses o más, lo cual es un problema a largo plazo, ya que pueden llegar a causar efectos secundarios como alteraciones gástricas, neurológicas y hepatotoxicidad, que es el daño más común en personas que llevan este tratamiento (Metushi *et al*, 2016). En un estudio realizado en conejos, se demostró que la coadministración de SM reduce de manera significativa las alteraciones bioquímicas producidas por los efectos tóxicos de los tratamientos antituberculosos, y puede actuar como un agente hepatoprotector de la toxicidad producida por los fármacos antituberculosos (Jahan *et al*, 2015). En otro estudio realizado en ratas, probaron la SM junto con los tratamientos de primera línea para investigar cual era el efecto de la SM contra la hepatotoxicidad causada por la administración de estos tratamientos y concluyeron que la administración simultánea de SM disminuye de manera significativa los cambios bioquímicos en las enzimas que se producen en el hígado e histológicos, concluyendo que hay un efecto protector (Eminzade *et al*, 2008).

Para evaluar que tan citotóxico podía ser la SM y SB, se evaluó el porcentaje de viabilidad a través del ensayo de rojo neutro en macrófagos derivados de monocitos humanos estimulados con distintas concentraciones (50, 100, 150, 150 y 200 μM) de SM y SB (Rodríguez *et al*, 2019). Los resultados mostraron que la viabilidad de los macrófagos no se ve afectada cuando son estimulados con 50 y 100 μM de SM, sin embargo, después de 24h con el tratamiento, ambos compuestos mostraron tener efectos citotóxicos a concentraciones mayores de 150 μM , estos resultados son mostrados en la Figura 8.

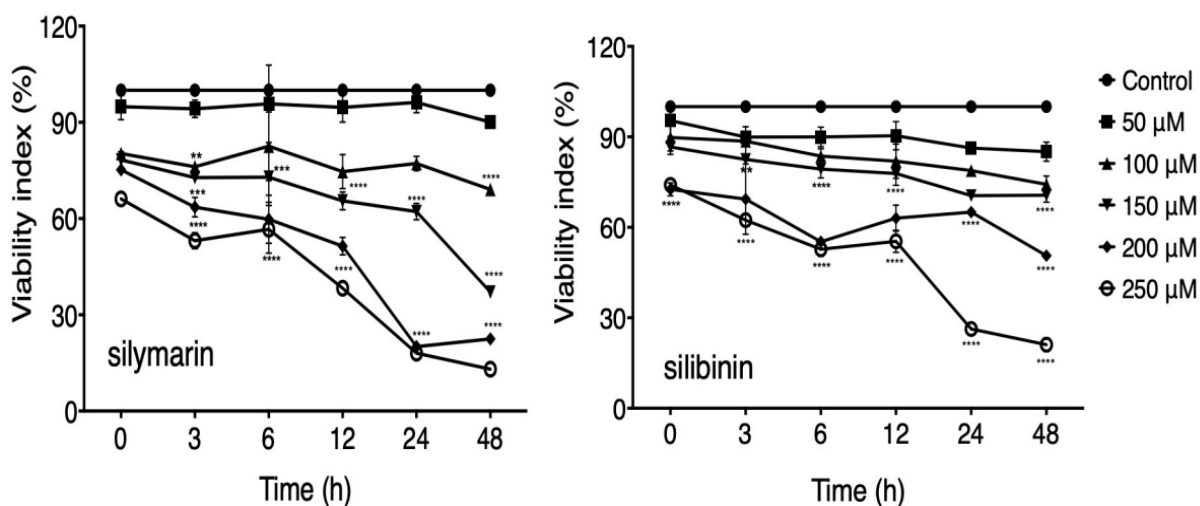


Fig.9. Efecto de la silimarina y silibinina en la viabilidad de macrófagos derivados de monocitos humanos. Se evaluó la viabilidad de la SM y SB a distintas concentraciones, se determinó la viabilidad celular a distintos tiempos, a través del ensayo de rojo neutro. Se observó un efecto citotóxico del tratamiento dependiente de la dosis y el tiempo. En los macrófagos estimulados con SM se observó mayor este efecto que en SB. (Tomada de Rodríguez, 2019).

Por otro lado, los mismos autores realizaron experimentos *in vivo*, donde querían evaluar el efecto de terapéutico de la SM en ratones infectados con dos cepas (cepas sensibles a fármacos y MDR), posteriormente, estos ratones fueron tratados con SM y SB combinada con el tratamiento antituberculosos (Rodríguez *et al*, 2019). La SM es eficaz cuando se administran con el tratamiento antituberculosos, ya que reduce en mayor porcentaje respecto a las que solo fueron tratadas con los tratamientos antituberculosos (Figura 9). Demostrando que la SM puede ser una buena opción para usarse como complemento de los tratamientos antituberculosos.

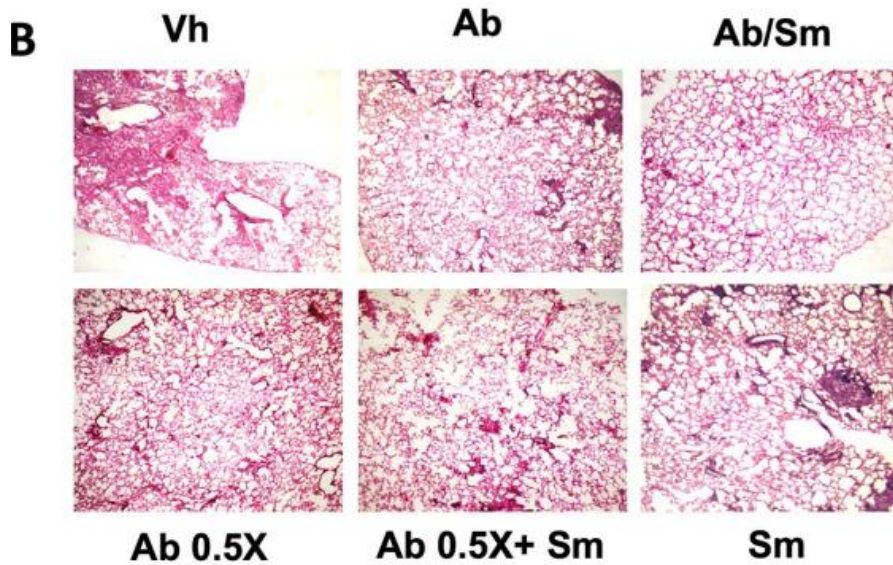
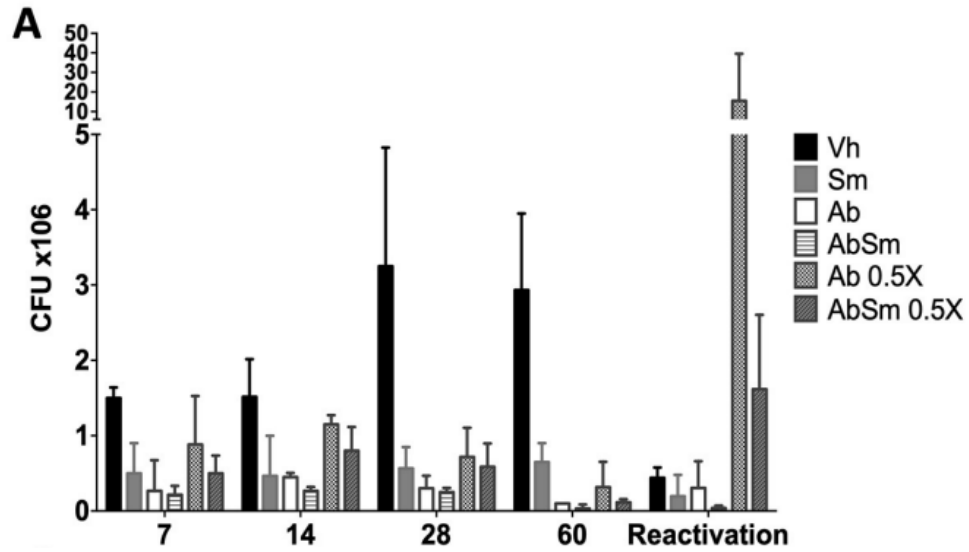


Fig.10. Efecto de la SM sola y combinada con fármacos de segunda línea antituberculosa en ratones infectados con la cepa de *M. tuberculosis* resistente a medicamentos. A) Se trataron grupos de ratones después de 60 días de infección con silimarina (barras grises), vehículo (control, barras negras), los antibióticos de segunda línea moxifloxacino, etionamida y pirazinamida (barras blancas), silimarina más antibióticos (barras rayadas), la mitad de las dosis recomendadas de antibióticos de segunda línea (barras punteadas) o con silimarina más la mitad de las dosis recomendadas de antibióticos (barras punteadas). B) Porcentaje del área neumónica (pulmón). Micrografías representativas de baja potencia a los 60 días después del tratamiento. (Tomada de Rodríguez, 2019).

En un estudio realizado en diversas líneas celulares entre ellas las células epiteliales (Hela), los resultados demostraron que la SM es un inhibidor potente de la activación de NF- κ B inducida por una variedad de agentes antiinflamatorios. Por lo tanto, la inhibición de la activación de NF- κ B con el tratamiento de la SM se correlaciona con la supresión de la fosforilación y degradación de I κ B α , la translocación de p65 y la transcripción del gen informador dependiente de NF- κ B (Manna *et al*, 1999). Por lo tanto, la inhibición de NF- κ B podría ser potencialmente beneficiosa en el tratamiento de la TB debido a su papel en la regulación de la respuesta inmune.

3. Justificación

La TB es una enfermedad que necesita un tratamiento riguroso en los tiempos y dosis de medicamentos que se administren, lo que puede tener algunas desventajas. Debido a la mala administración puede llegar a generar resistencia contra los medicamentos y los tratamientos pueden llegar a generar efectos secundarios. Por lo tanto, en los últimos años se han planteado otro tipo de alternativas para tratar la TB, como es el caso de los extractos de plantas. Tal es el caso de la SM, la cual tiene diversos beneficios entre ellos, tiene función como inmunoregulador, antiinflamatorio, antioxidante, microbicida, entre otras. Con base en todos los beneficios reportados que puede tener la SM, en este proyecto se busca ver cómo actúa este extracto individualmente y cuando las células epiteliales pulmonares son infectadas con una cepa de *M. tuberculosis*, ya que estas células actúan como barrera directa contra *M. tuberculosis* y actúa junto con los alveolos como primera línea de defensa durante la infección.

4. Hipótesis

La silimarina tiene un efecto inmunomodulador en las células epiteliales pulmonares A549 que favorece el control de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

5. Objetivos

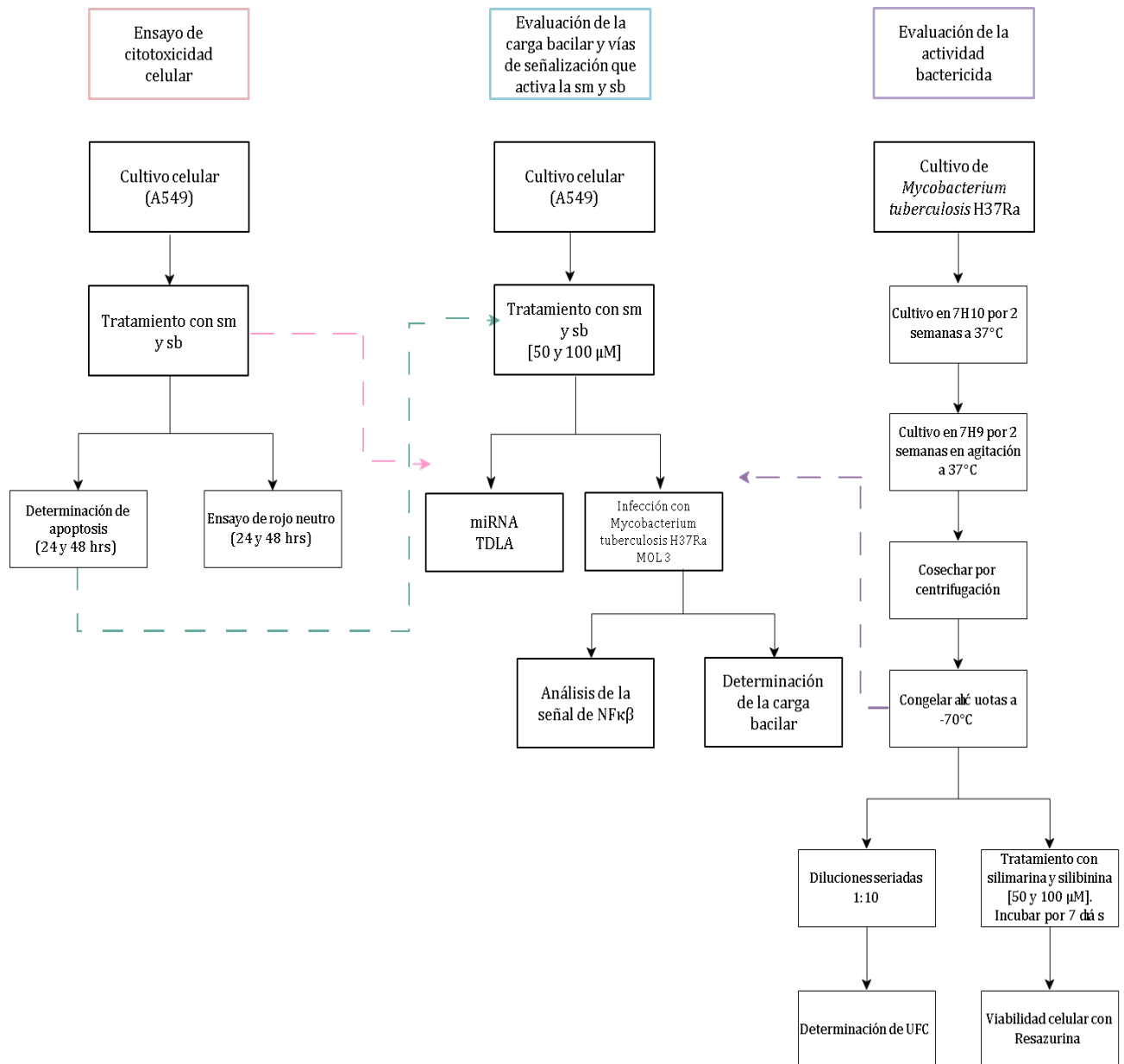
5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la silimarina en el control de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra en las células epiteliales alveolares humanas A549.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar la citotoxicidad de la silimarina en células epiteliales alveolares A549.
- Evaluar el efecto inmunoregulador de la silimarina en las células A549.
- Determinar si la silimarina tiene actividad microbicida en contra de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra
- Evaluar el efecto de la silimarina en el control de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra en las células epiteliales A549.

6. Estrategia experimental



7. Materiales y Métodos

7.1 Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

Para el cultivo de *M. tuberculosis* H37Ra se inocularon tres colonias de *M. tuberculosis* H37Ra crecidas en placas de agar Middlebrook 7H9 en 250mL de Medio Sauton, y se incubaron a 37°C con agitación constante de 180 rpm durante dos semanas.

Transcurrido el tiempo se cosecharon las bacterias en tubos Falcon de 50 mL por centrifugación a 5,000 rpm por 10 minutos. Después de centrifugar y decantar todo el medio se añadieron 10mL de PBS + Tween 80 (0.05%). Se mezcló suavemente hasta homogeneizar. Posteriormente se almacenó en crioviales en alícuotas de 1mL a -70°C hasta su uso.

Para cuantificar las unidades formadoras de colonia en las alícuotas se descongeló un vial de células. Posteriormente el vial fue centrifugado por 5 minutos a 5,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se añadió 1mL de medio RPMI-1640 + Tween 80 (0.05%) y tres perlas de vidrio grandes, se vortexeó por 5 minutos y después se sónico durante dos minutos. Se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 1,500 rpm y se recuperaron 700µL del sobrenadante en un tubo nuevo. Los 700 µL previamente recuperados se centrifugaron por 5 minutos a 1,500 rpm, se recuperó el 90% del sobrenadante y se tomaron 100 µL y se realizaron diluciones seriadas 1:10. Se tomaron 20µL de cada dilución y se colocaron por triplicado en las placas con agar Middlebrook 7H10 suplementado con OADC. Las placas fueron incubadas de 15-20 días a 37°C con 5% de CO₂ y 90% de humedad. Pasado el tiempo de incubación, se realizó el conteo de UFC.

7.2 Cultivo celular

Para este proyecto se utilizaron las células epiteliales alveolares humanas A549 de carcinoma de pulmón humano. Las células se descongelaron y se transfirieron a un tubo falcón estéril de 15 mL que contenía 9 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) y se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, la

pastilla se resuspendió en 10 mL de medio RPMI-1640 y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Se repitió el procedimiento anterior dos veces más para finalmente decantar el medio y se agregaron 10 mL de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), se resuspendió suavemente la pastilla para colocar las células en una botella de 75 cm² a la que se agregaron otros 5 mL de medio completo. El cultivo celular se incubó a 37°C con 5% de CO₂ y 90% de humedad hasta obtener un 80% de confluencia.

7.3 Ensayo de citotoxicidad

Para realizar este ensayo se utilizaron placas de cultivo P48 en las que se depositaron 20,000 células/pozo (30% de confluencia) en medio RPMI-1640. Después de 24 horas, se cambia el medio por medio completo (suplementado con 10% de SFB) y se añadió el tratamiento (SM y SB a las concentraciones de 50, 100, 200 y 250 µM). Como control se utilizaron células sin tratamiento y la concentración más alta del vehículo utilizado para disolver la SM y SB (DMSO 250). Pasadas 20 horas con el tratamiento, se retiró la placa de la incubadora y se añadió 10% del volumen del pozo de la solución de rojo neutro previamente filtrada. Se incubó por 4 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y 90% de humedad. Posteriormente, se retiró de los pozos el medio con el colorante y se realizan dos lavados con 150 µL de PBS /pozo. Finalmente se añadieron 150 µL de la solución de solubilización a cada pozo y a placa se coloca en un agitador de placas por al menos 10 minutos o hasta que se haya formado una solución homogénea. La OD se midió en un espectrofotómetro a λ_{540} y λ_{690} nm. El procedimiento descrito anteriormente se realizó de la misma forma para la placa de 48 horas, añadiendo la solución de rojo neutro tras 44h de incubación. Este ensayo se realizó por triplicado.

7.4 Ensayo de apoptosis

Para realizar este ensayo se utilizaron placas P12, a las cuales previamente se les colocaron cubreobjetos circulares estériles, posteriormente se depositaron 150,000 células/pozo (30% confluencia) en medio RPMI-1640 sin suero. Después de 24 horas se sustituyó el medio por medio RPMI-1640 suplementado al 10% con SFB y se adicionó el

tratamiento con SM y SB (50 y 100 μM). Como control negativo se utilizaron células sin tratamiento y células tratadas con el vehículo (100 μM de DMSO), mientras que el control positivo son las células tratadas con camptotecina 2 μM . Pasadas las 24 horas de tratamiento se retiró la placa de la incubadora, se decantó el medio de cultivo y se hicieron dos lavados con 500 μL de PBS estéril y frío. Posteriormente, se añadieron 0.5 μL de PI (1.0 mg/mL) y 0.25 μL de Hoechst (5.0 mg/mL), dejando como volumen final 500 μL /pozo. La placa se cubrió de la luz y se incubó a 4°C por 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación los cubreobjetos se colocaron en portaobjetos para ser observados en el microscopio de epifluorescencia utilizando los filtros I3 (azul) y N 2.1 (rojo). Los pasos descritos anteriormente se repitieron de la misma forma con las células tratadas por 48h. Los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos obtenidos fueron graficados en Graph Prism 8.

7.5 Ensayo de infección

Para los ensayos de infección se utilizaron placas P12. Se cultivaron 150,000 células por pozo (30% de confluencia) y se infectaron durante 4 h con *M. tuberculosis* H37Ra en una multiplicidad de infección (MOI) 3:1. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 500 μM de PBS estéril para eliminar las bacterias no fagocitadas. Después, las células fueron tratadas con silimarina y silibinina a 50 y 100 μM y se incubaron durante 24 h y 48h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación se retiró el medio y se añadieron 300 μL de solución de lisis (PBS y 0.02% de SDS). Los lisados se almacenaron una semana a -70°C antes de determinar las CFU.

Las UFC se determinaron sembrando diluciones seriadas 1:10 de los lisados en placas con agar Middlebrook 7H10 suplementado con OADC, las placas fueron incubadas 21 días a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación se contaron las UFC. El procedimiento descrito anteriormente se repitió con las muestras correspondientes a las 48h de tratamiento e infección. Estos ensayos se realizaron por triplicado y los datos obtenidos fueron graficados en Graph Prism 8.

7.6 Evaluación de actividad microbicida de la SM y SB

Se preparó una suspensión de 1×10^6 bacterias en caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con ADC y se colocaron 100 μl /pozo en placas de P96. Inmediatamente, se adicionaron los tratamientos de SM y SB a las concentraciones de 50 y 100 μM . Se utilizaron como control bacterias sin tratamiento y medio con el vehículo (DMSO). Posteriormente, la placa se incubó por 7 días a 37°C de en atmósfera humedad con 5% de CO_2 . Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 15 μL de resazurina al 0.04% y 12.5 μL de Tween 80 al 20%. Se incubó la placa por 4 horas más y se midió la OD de las placas en el espectrofotómetro a λ_{570} . Estos ensayos se realizaron por triplicado y los datos obtenidos fueron graficados en Graph Prism 8.

7.7 Extracción de RNA

Para realizar la extracción de RNA se utilizaron cultivos en placas P24, en las que se depositaron 72,000 células/pozo (30% de confluencia) en medio RPMI-1640. Después de 24 horas, se cambió el medio a RPMI-1640 suplementado al 10% con SFB, y se añadió el tratamiento de SM a 50 μM y se dejó incubando por 24 horas 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Pasado el tiempo de incubación, se realizó la extracción de RNA de las células control y las células tratadas con SM con el kit comercial Ultraclean Tissue and cells RNA isolation kit de MO-Bio siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de extraer el RNA se cuantificaron las muestras y se realizó un gel de agarosa al 2% para verificar la integridad de las muestras.

7.8 Arreglos de baja densidad de sondas TaqMan (TLDA)

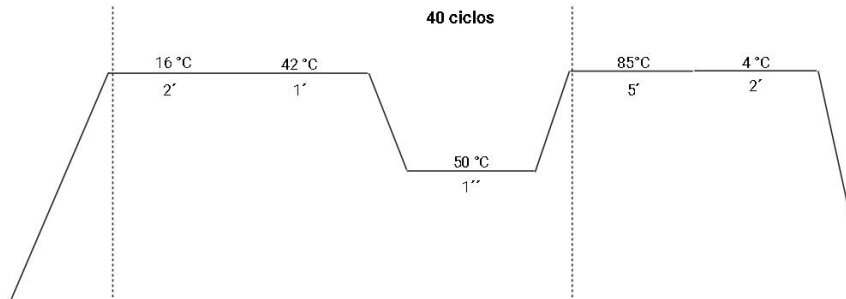
Para determinar los miRNAs desregulados cuando las células A549 son tratadas con silimarina 50 μM , se utilizaron TaqMan® Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0, siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se observa en la figura 11.



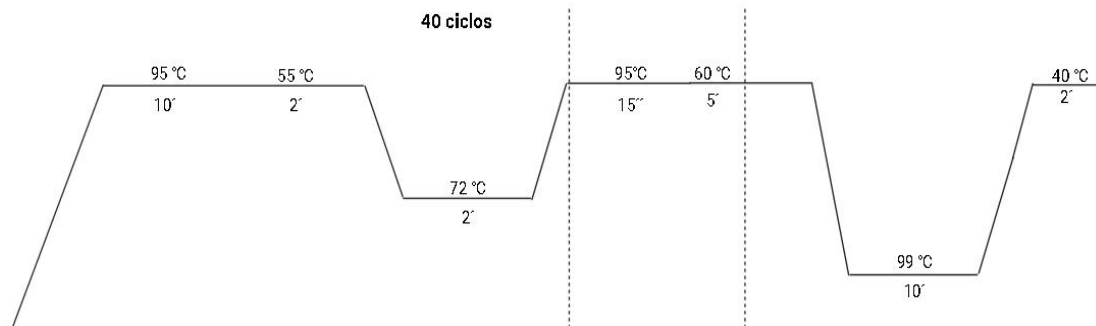
Fig.11. Flujoograma para el análisis de microarreglos. Procedimiento para analizar las placas A+B. Tomado y modificado de Applied Biosystem.

Para las placas se usaron 600 ng del RNA total de las células tratadas con 50 μ M y 600 ng de las células sin tratamiento. Para realizar la retro-transcripción (RT) se utilizaron 300 ng y se realizaron 2 reacciones por cada condición (con tratamiento y sin tratamiento), utilizando las mezclas de oligonucleótidos MegaPlex™ PreAmp Primers, Human Pool Set v3.0 A y B. La mezcla de reacción se preparó en tubos de 1mL y se añadieron 0.8 μ M de Buffer RT 10x, 0.9 μ L de MgCL2, 0.1 μ L de inhibidor de RNAsa y 0.2 μ L de agua libre de nucleasas. Por último, a la mezcla de reacción se adicionaron los 300ng de RNA total,

se mezcló y se incubó por 5 minutos en hielo, posteriormente, se metió la reacción en el termociclador utilizando las siguientes condiciones de ciclado:



Para la pre-amplificación, se usaron 2.5 μ L del producto de la RT y se preparó la reacción de 22.5 μ L, el cuál consistió en 12.5 μ L de mastermix Taqman preamp (2x), 2.5 μ L de MegaPlex preamp primers (10x) y agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó 5 minutos en hielo y posteriormente se colocó la mezcla en el termociclador utilizando las siguientes condiciones de ciclado:



Posteriormente el cDNA se diluyó 1:4 añadiendo 75 μ L de agua libre de nucleasas y se almacenó a 20° C hasta su uso, sin pasar de 5 días de almacenamiento. Para realizar el arreglo de baja densidad se preparó una mezcla de reacción con 450 μ L de TaqMan Universal PCR Mastermix no AmpErase UNG 2X, 9 μ L de la dilución del producto pre amplificado y 441 μ L de agua libre de nucleasas. Se cargaron 100 μ L de la mezcla de reacción de PCR en cada contenedor de la placa del arreglo, se centrifugó a 2,000 x g por 2 min, se selló la placa, se cortó la parte superior y se realizó la amplificación en un termociclador 7900HT siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante.

Para determinar los cambios en el perfil de expresión de miRNAs, en consecuencia, del tratamiento con silimarina 50 μM de la línea celular A549 se analizó la expresión de miRNAs mediante el programa QuantStudio™ Real-Time PCR Software y RQ Manager 1.2.1. Posteriormente, se buscaron los blancos confirmados y putativos de estos miRNAs y se analizaron las vías y procesos en los que participan en programa mirPath (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/>).

7.9 Determinación de la expresión de NF- κ B por Western blot

Se utilizaron placas de cultivo P12, en las que se depositaron 150,000 células/pozo (30% de confluencia) en medio RPMI-1640. Pasadas 24 horas de incubación la mitad de la placa fue infectada durante 4 h con la cepa de *M. tuberculosis* H37Ra con una multiplicidad de infección (MOI) 3:1 y la otra mitad de la placa se dejó con medio RPMI-1640 suplementado al 10% con SFB. Posteriormente, del lado que se infectaron las células se retiró el medio y se realizaron 4 lavados con 500 μL de PBS estéril para eliminar las bacterias no fagocitadas. Posteriormente, las células infectadas y no infectadas fueron tratadas con silimarina y silibinina a 50 y 100 μM , y 100 μM de DMSO, se incubaron durante 24 h y 48 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación se retiró el medio y se realizaron dos lavados con 500 μL de PBS. A continuación, se añadieron 300 μL de buffer RIPA por pozo (Radio Immuno Precipitation Assay, por sus siglas en inglés) y 2 mM del inhibidor de proteasa PMFS (Phenylmethylsulfonyl fluoride, por sus siglas en inglés); las muestras fueron recolectadas en tubos eppendorf de 1.5 mL, se sonicaron por dos minutos y se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante para colocarlo en tubos nuevos de 1.5 mL. Este mismo procedimiento se realizó para las placas de 48h con las condiciones y tratamientos previamente descritos.

Los extractos proteínicos fueron cuantificados por ensayo de Bradford en placa P96. Después de la cuantificación se evaluó la integridad de las proteínas en un gel de poliacrilamida al 10%. Al finalizar la electroforesis el gel y se colocó en solución de azul de Coomassie, se incubó a TA por 24h con agitación lenta. A continuación, el gel se

enjuagó con agua y se le añadió solución desteñidora y se dejó en agitación lenta hasta que se eliminó el fondo y se visualizaron las bandas.

Se realizó una nueva electroforesis y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Una vez transferidas las proteínas, la membrana se enjuagó y se le agregó rojo de ponceau para observar si la transferencia se realizó correctamente, luego se lavadó con PBS para quitar el colorante y la membrana se colocó en solución de bloqueo (30mL de PBS 1x y 1.5g de leche en polvo) de 1-2 horas a 37°C en agitación. Pasado el tiempo de incubación, la membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario anti-NF- κ B, en una dilución 1:3000 a 4°C en agitación.

Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS + Tween 20 (0.05%). Después se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo, en una dilución 1:2000 y se adicionaron 2 μ L de StrepTactin-HRP. Se incubó a 37°C en agitación de 1-2 horas. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS + Tween 20 (0.05%) y se adicionaron 500 μ L del sustrato Luminata Crescendo Western HRP. Las imágenes fueron tomadas y analizadas en un Chemidoc. Como control de carga se determinó tubulina utilizando el anticuerpo primario anti-tubulina en una dilución 1:5000. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las imágenes fueron analizadas en los programas QuantityOne 4.6.7, ImagenLab y los datos obtenidos fueron graficados en Graph Prism 8.

7.10 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por la prueba de ANOVA de dos vías y la post-prueba de Tukey para múltiples comparaciones. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Los análisis y las gráficas obtuvieron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.

8. Resultados

8.1 Ensayo de citotoxicidad celular

Para determinar si la silimarina y silibinina tienen efectos citotóxicos en las células A549 (Figura 11 A) se evaluó el porcentaje de viabilidad mediante el ensayo de rojo neutro (Figura 11 B) en cinéticas de dosis-tiempo-respuesta. Las células A549 se estimularon a distintas concentraciones de SM y SB (50, 100, 150, 200 y 250 μM) por 24 y 48h respectivamente.

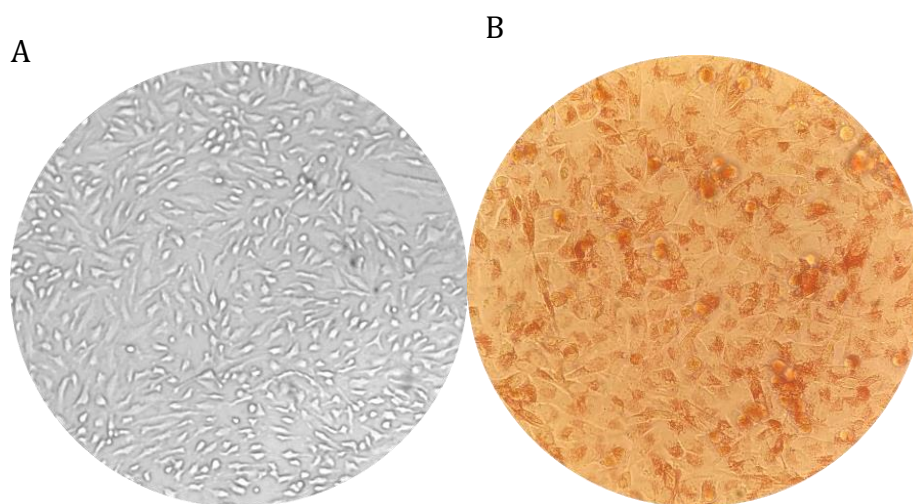


Fig.12. Microscopías de la línea celular A549 de células epiteliales alveolares humanas. A) Morfología de las células A549 después de 2-3 días de crecimiento con aumento 400x. **B)** A549 después de ser teñidas con Rojo neutro por 4 h se observa con aumento 400x.

Las células fueron tratadas con SM a las concentraciones de 100, 150, 200 y 250 μM por 24 y 48 h. Los resultados mostraron que el tratamiento con SM no afecta la viabilidad en las células tratadas con 50 y 100 μM , mientras que la viabilidad comienza a disminuir a partir de 150 μM , observando un efecto citotóxico significativo en los cultivos tratados con SM 250 μM (Figura 12 A). Por otro lado, en las células tratadas con SB a concentraciones mayores a 100 μM el porcentaje de viabilidad comienza a disminuir a las 48 horas de tratamiento (Figura 12 B). En contraste, el porcentaje de citotoxicidad de

las células tratadas a concentraciones mayores a 100 μM de SM y SB comienza a aumentar, mostrando un mayor efecto citotóxico la SB.

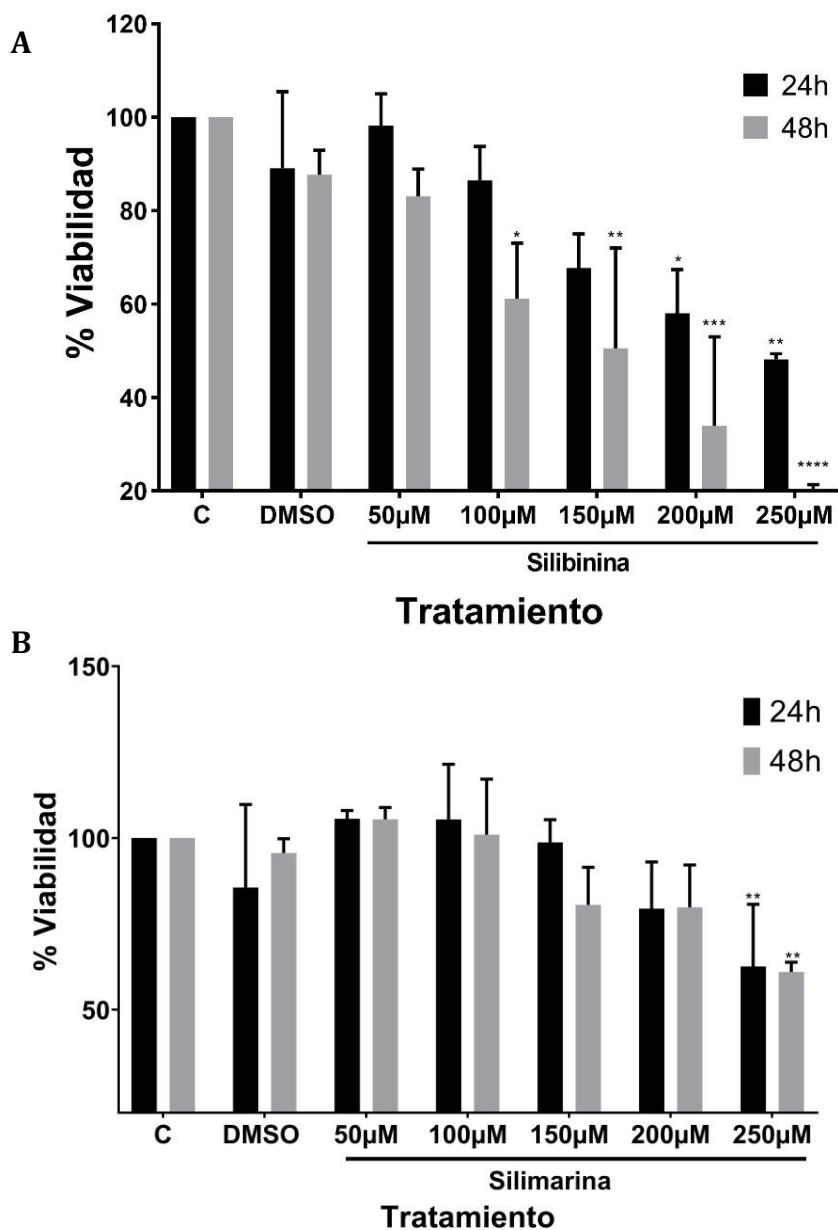
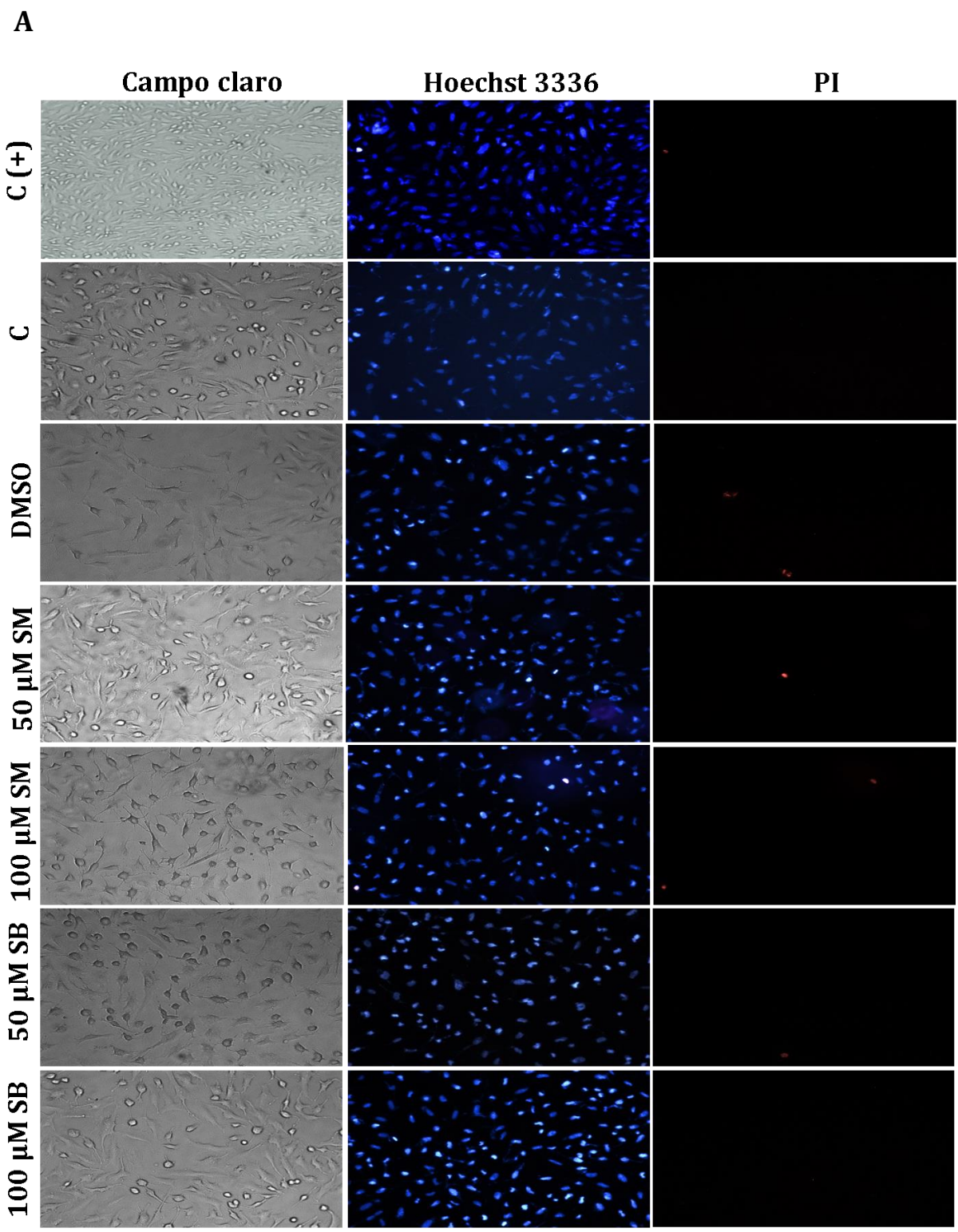


Fig.13. Efecto de la silimarina y silibinina en la viabilidad celular. Las células A549 fueron estimuladas con silimarina (A) y silibinina (B) a concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 μM . Los datos representan la media \pm SEM de determinaciones individuales de tres experimentos independientes. * $p \leq 0.05$.

8.2 Ensayo de apoptosis

Para probar si la silimarina y silibinina inducen apoptosis en las células A549, las células fueron tratadas con SM y SB a 50 y 100 μM por 24 y 48 h. Pasado el tiempo de incubación con los tratamientos, las células se tiñeron con Hoechst 33342 y yoduro de propidio para determinar el porcentaje de células en apoptosis. Las células fueron observadas bajo el microscopio de epifluorescencia y en campo claro. La población de células teñidas se clasificó en tres grupos: células vivas que muestran un nivel bajo de fluorescencia azul, células apoptóticas que muestran un nivel alto de fluorescencia azul, y células necróticas que se observan con la fluorescencia roja (Figura 13). Como se puede observar (Figura 14 A) hay un menor número de células apoptóticas cuando las células son tratadas con SM a 50 y 100 μM . Por el contrario, cuando las células son tratadas con SB a 100 μM aumenta un 10% el número de células apoptóticas respecto a las células tratadas con silimarina a la misma concentración (Figura 14 A). También se puede observar en la gráfica que tanto a las 24 como a las 48 h de tratamiento con silimarina a 50 y 100 μM , hay un mayor número de células necróticas respecto al tratamiento con silibinina (Figura 14 B).



B

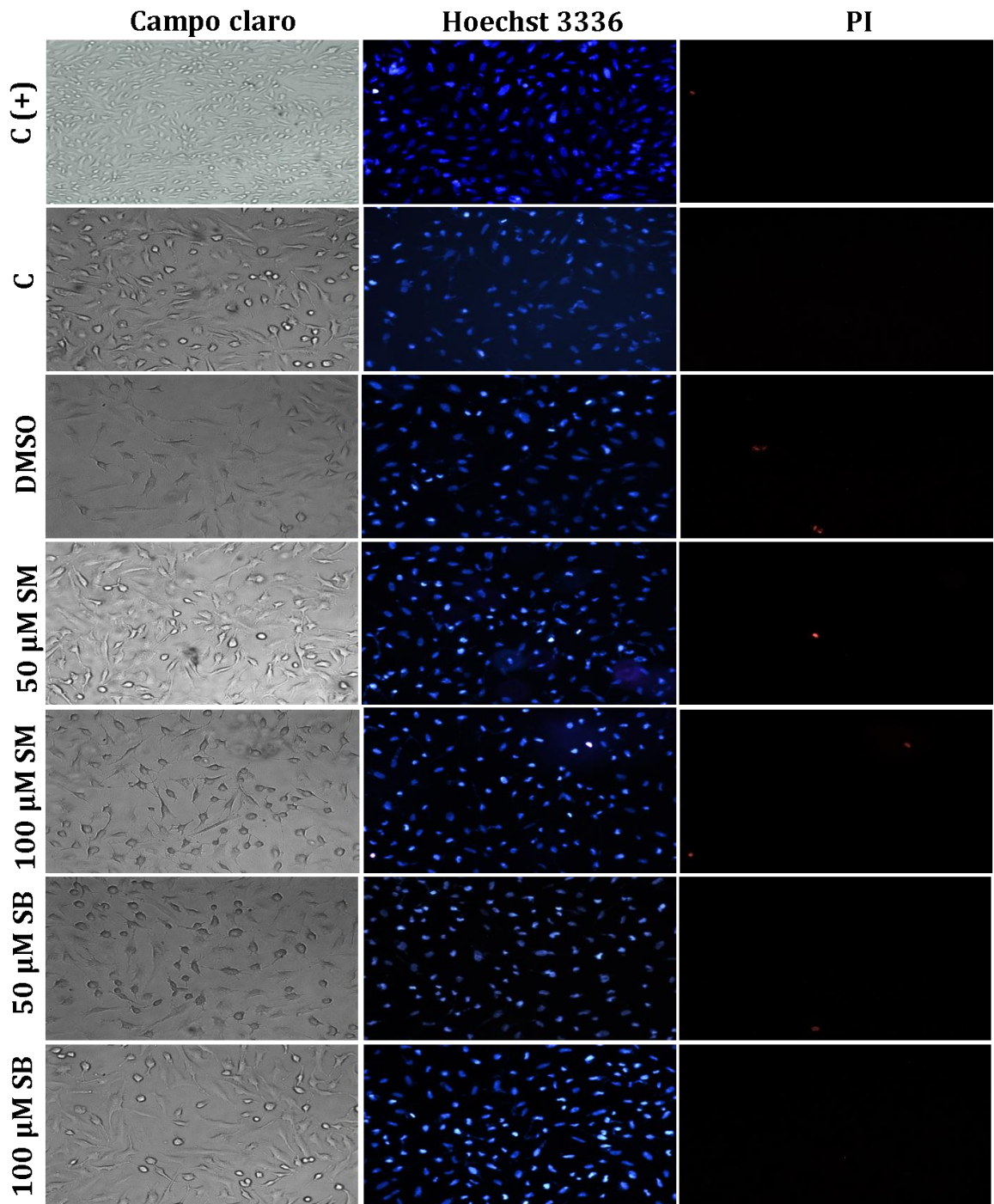


Fig.14. Determinación de apoptosis en células tratadas con SM y SB a 50 y 100 μM . Las células A549 fueron tratadas con SM y SB por 24 y 48 h. Posteriormente fueron teñidas con Hoechst y PI. Las células teñidas de azul que se muestran con más intensidad son las células que se encuentran en apoptosis. Por otro lado, las células teñidas de rojo marcadas con una flecha son las células necróticas. Las células fueron observadas en el microscopio de epifluorescencia.

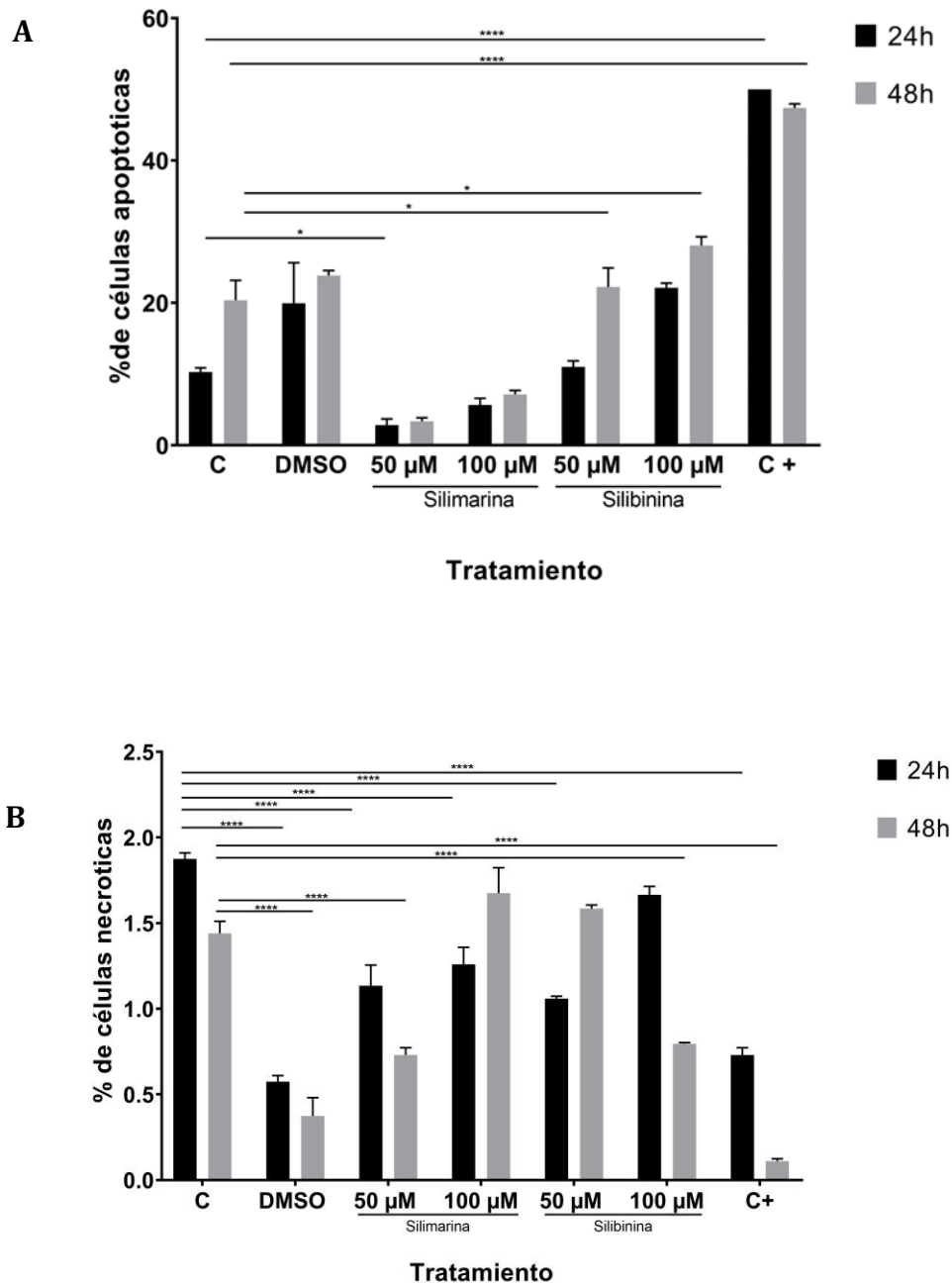


Fig.15. Porcentaje de células. A) Se observa el porcentaje de células apoptóticas donde las células que menos tienden a someterse a apoptosis son las que están siendo tratadas con sm. B) Conteo de las células tratadas con PI, se observa el porcentaje de células necróticas, observando efectos significativos mayormente a las 24h. Los datos representan la media \pm SEM de determinaciones individuales de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los asteriscos denotan la significancia estadística. $p \leq 0.05$.

8.3 Ensayos de infección

Al determinar la carga bacilar en células epiteliales pulmonares A549 infectadas con *M. tuberculosis* H37Ra y tratadas con SM y SB, se observó que con una dosis de 50 μM y tras 24 h de tratamiento, disminuyó significativamente la carga bacilar cuando las células son tratadas con ambos compuestos (Figura 15). Por otro lado, la misma dosis y concentración, pero tras 48 horas de tratamiento, se observa una disminución significativa de la carga bacilar, pero menor al observada a las 24 h de tratamiento

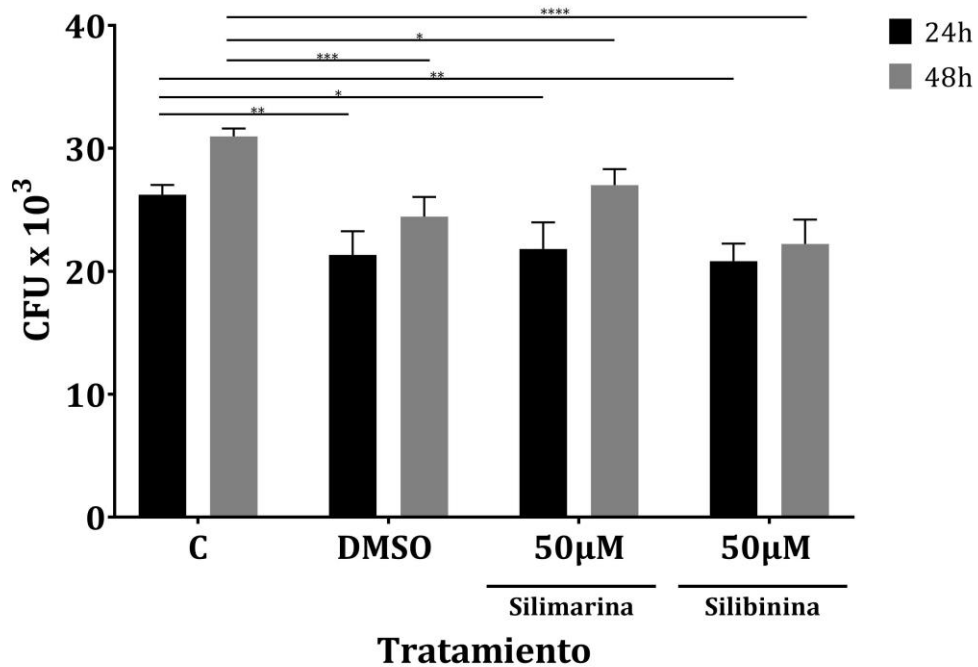


Fig.16. Actividad microbicida de la SM y SB. Las células A549 fueron infectadas con *M. tuberculosis* H37Ra y tratadas con 50 μM de SM y SB, donde las bacterias se eliminan de manera eficiente a las 24 h. Los datos representan la media \pm SEM de determinaciones individuales de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los asteriscos denotan la significancia estadística. $p \leq 0.05$.

8.4 Evaluación de la actividad microbicida de la SM y la SB

Se evaluó si la SM y SB tenían un efecto microbicida contra *M. tuberculosis* H37Ra. Los bacilos fueron tratados con SM y SB 50 y 100 μM durante 7 días. Los resultados mostraron que hay disminución del porcentaje de viabilidad de los bacilos tratados con SM y SB (Figura 16). El efecto de las células que fueron tratadas con SM y SB a 50 μM mostró un decremento de la viabilidad de los bacilos de manera significativa. Mientras que las células tratadas con SB a 50 y 100 μM mostraron el mismo efecto, bajando la viabilidad de las micobacterias de manera significativa.

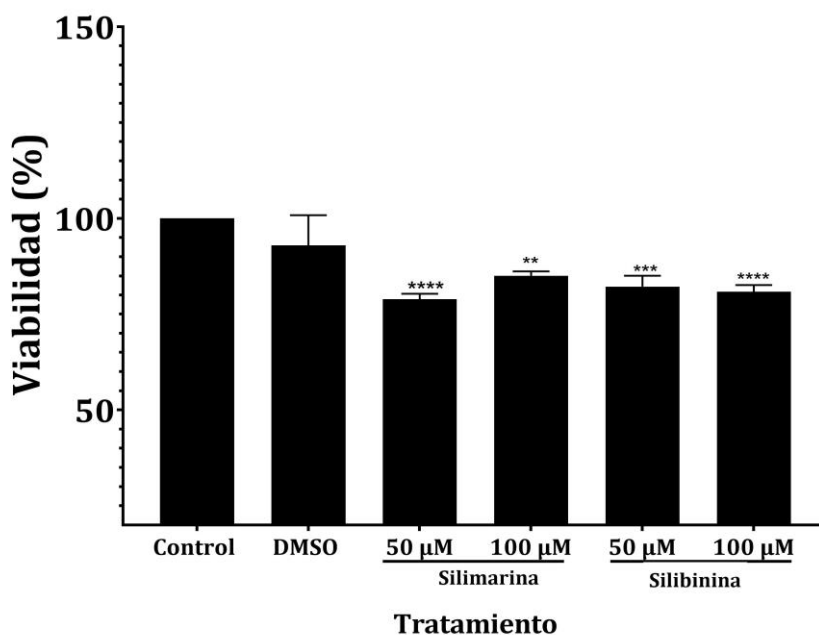


Fig.17. Actividad microbicida de la silimarina contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Después de los 7 días de incubación de los bacilos tratados con SM y SB a las concentraciones de 50-100 μM se observó que ambos tratamientos y concentraciones bajaron la viabilidad del bacilo, sin embargo, el mayor cambio se observa cuando las células son tratadas a 50 μM de SM y 50 y 100 μM de SB. Los datos representan la media \pm SEM de determinaciones individuales de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los asteriscos denotan la significancia estadística. $p \leq 0.05$.

8.5 Análisis de miRNAs

Después de haber obtenido las Ct del programa RQ manager de los 384 miRNAs de las placas TLDA A y B, se calculó la $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se analizaron los miRNAs que tuvieron una $2^{-\Delta\Delta CT}$ mayor a 1.0 (se encontraron 36 miRNAs) y mayor a 2.0 (se encontraron 32 miRNAs), utilizando el miRNA RNU44 como control endógeno (Tabla 2. miRNAs subexpresados y sobreexpresados). Posteriormente, se realizó el análisis de las vías de señalización en las que tiene blancos putativos los miRNAs desregulados utilizando el programa mirPath, estas vías se muestran en la Figura 1 y 2. Se muestran las vías que se encontraban relacionadas con la respuesta inmune innata.

Tabla 2. miRNAs subexpresados y sobreexpresados en células A549 tratadas con SM

miRNAs subexpresados	miRNAs sobreexpresados
miR-20b-3p	miR-223-3p
miR-92a-2-5p	miR-340-3p
miR-182-3p	miR-155-5p
miR-191-3p	miR-365b-3p
miR-223-3p	miR-483-5p
miR-340-3p	miR-642a-3p
miR-155-5p	miR-200a-3p
miR-365b-5p	miR-629-3p
miR-483-5p	miR-766-5p
miR-642a-3p	miR-769-5p
miR-200a-3p	miR-770-5p
miR-629-3p	miR-222-3p
miR-766-5p	miR-34b-3p
miR-769-5p	miR-27b-3p
miR-770-5p	miR-935
miR-222-3p	miR-335-5p
miR-34b-3p	miR-99b-3p
miR-27b-3p	miR-151a-3p
miR-935	miR-22-3p
miR-335-5p	miR-34a-5p
miR-99b-3p	miR-409-3p
miR-151a-3p	miR-193b-3p
miR-22-3p	miR-625-3p
miR-34a-5p	miR-628-3p
miR-409-3p	miR-26a-1-3p
miR-193b-3p	miR-1226-3p
miR-625-3p	miR-1227-3p
miR-628-3p	miR-1253
miR-26a-1-3p	miR-4720-3p
miR-1226-3p	miR-1260a
miR-1227-3p	miR-664a-3p
miR-1256	
miR-720	
miR-1260a	
miR-664-5p	

Figura 18. Vías y procesos inmunológicos regulados por miRNAs subexpresados en células A549 tratadas con silimarina

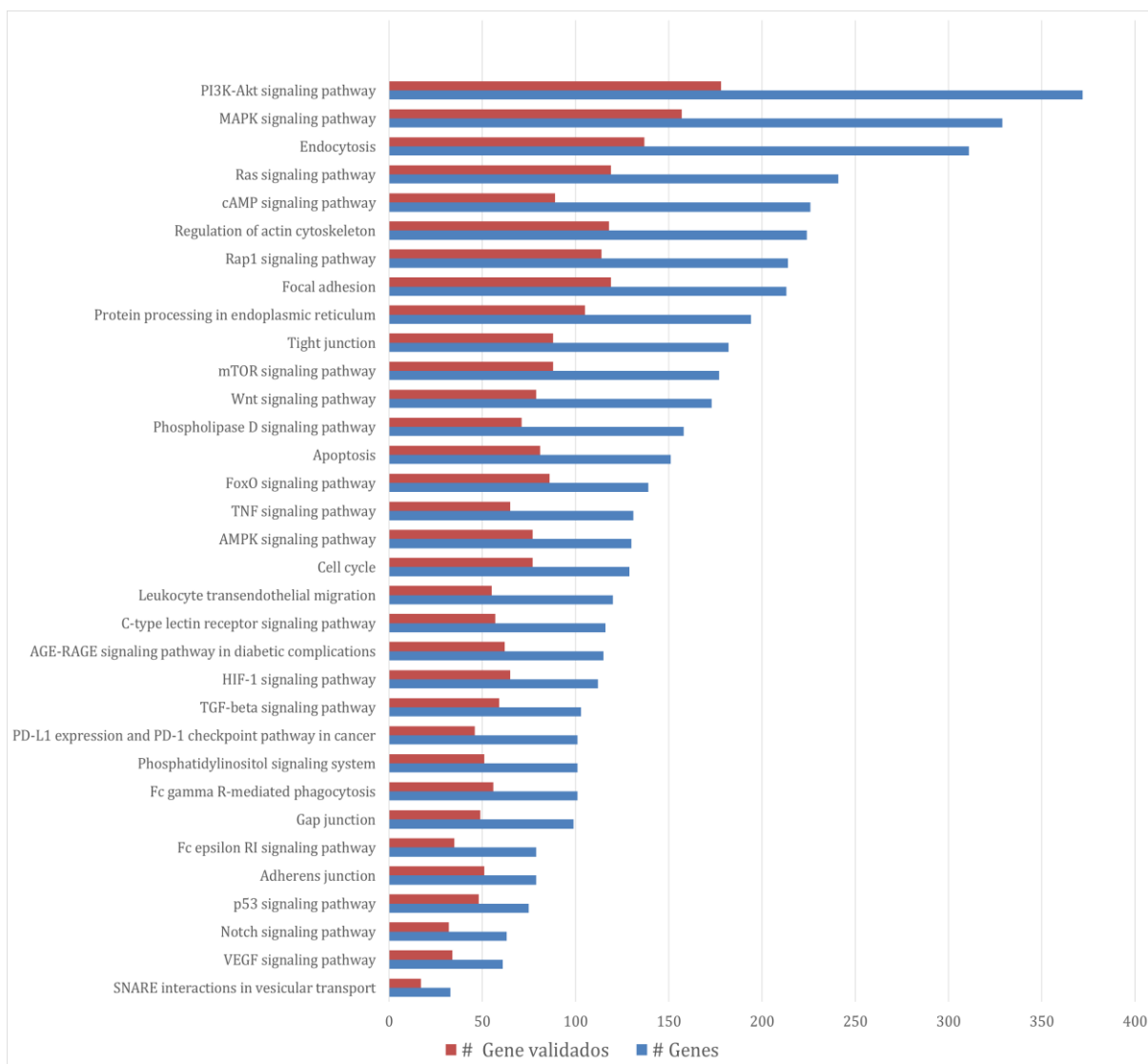
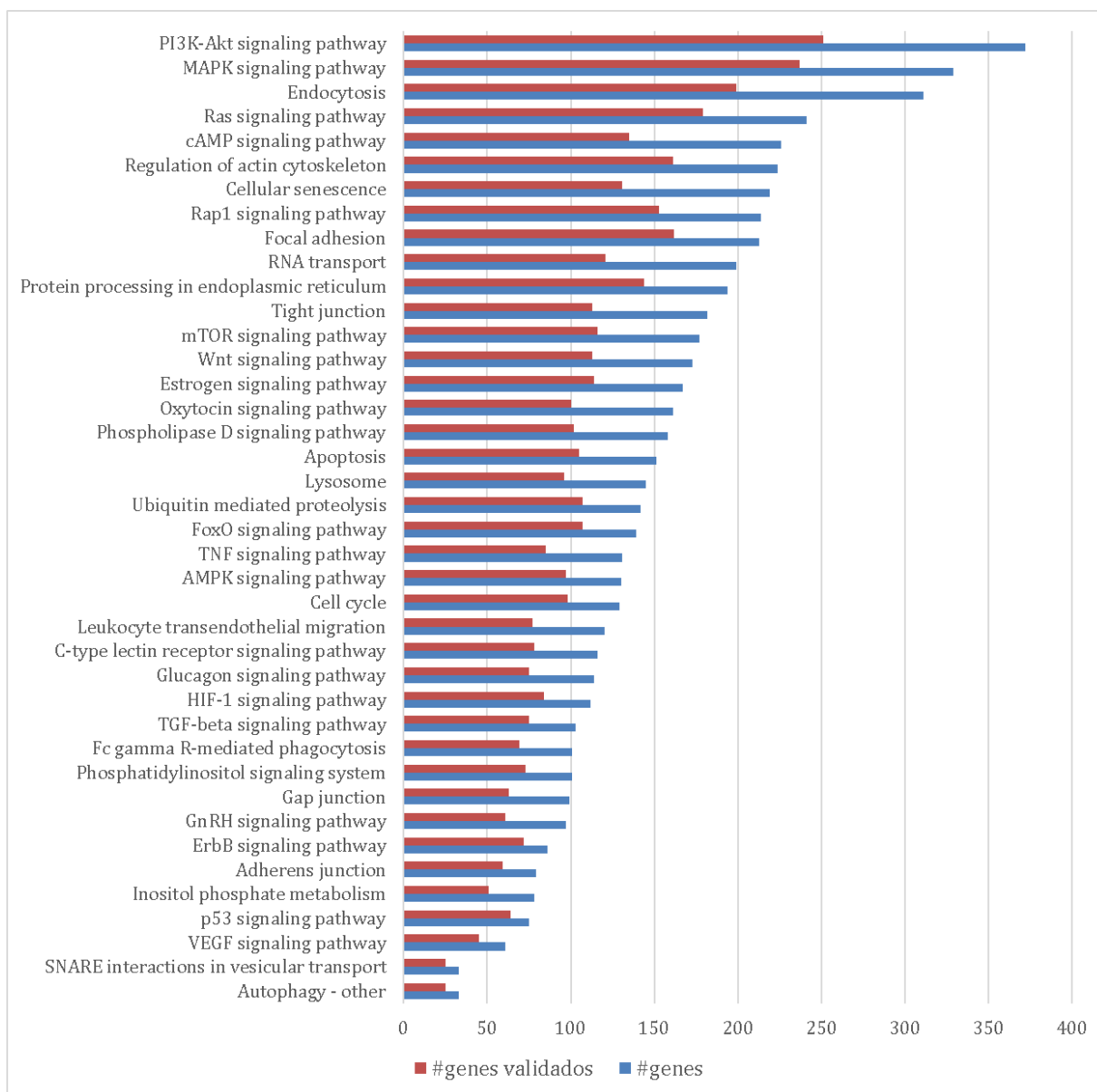


Figura 19. Figura 18. Vías y procesos inmunológicos regulados por miRNAs sobreexpresados en células A549 tratadas con silimarina



8.6 Extracción de proteínas

Las proteínas de las siguientes muestras se extrajeron y cuantificaron: Control, infección de las células por 24 y 48 h del control 50 y 100 μM de SM y SB. Posteriormente, se verificó la integridad de las proteínas en un gel de poliacrilamida al 10% y posteriormente teñido con Coomassie. El gel que muestra la integridad de las proteínas se muestra en la Figura 19.

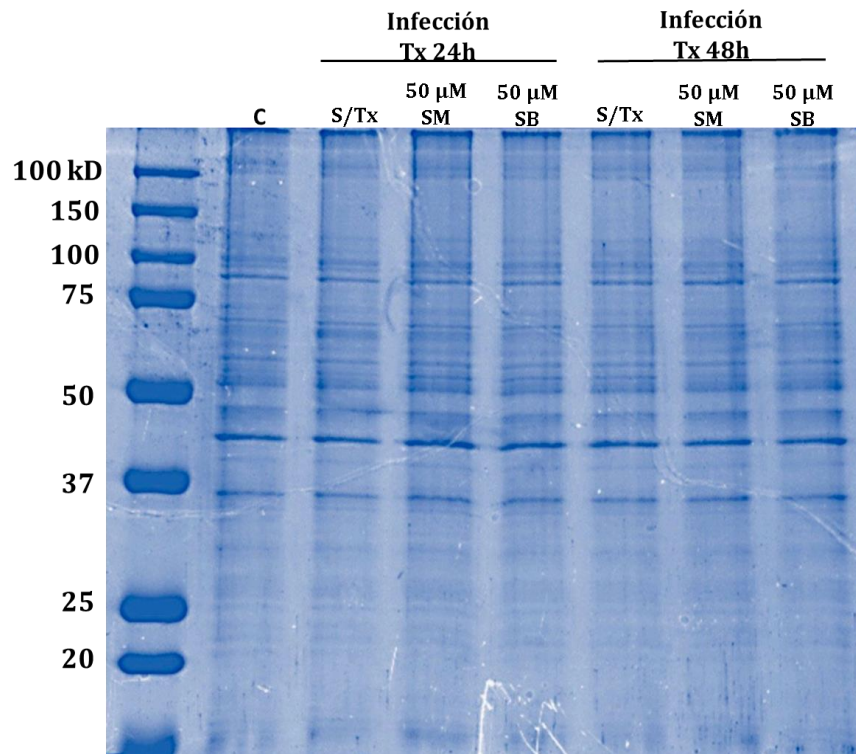


Fig.20. Integridad de las proteínas de las células tratadas con SM y SB 50 μM . Las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE al 10% y se tiñó con azul de Coomassie.

8.7 Western Blot

Para determinar la expresión NF- κ B en células A549 infectadas con *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 1:3) y tratadas con SM y SB a 50 y 100 μ M por 24 y 48h. Se realizó la extracción de proteínas de las muestras y se realizó un WB para identificar los niveles de expresión de la proteína NF- κ B. Los datos fueron graficados de acuerdo con la densidad de pixeles encontrados en la imagen. Como se puede observar en el gráfico, hay una menor detección de NF- κ B cuando las células son tratadas con SM y SB 50 μ M por 24 h. La señal se ve disminuida en menor porcentaje a las 48 h de tratamiento.

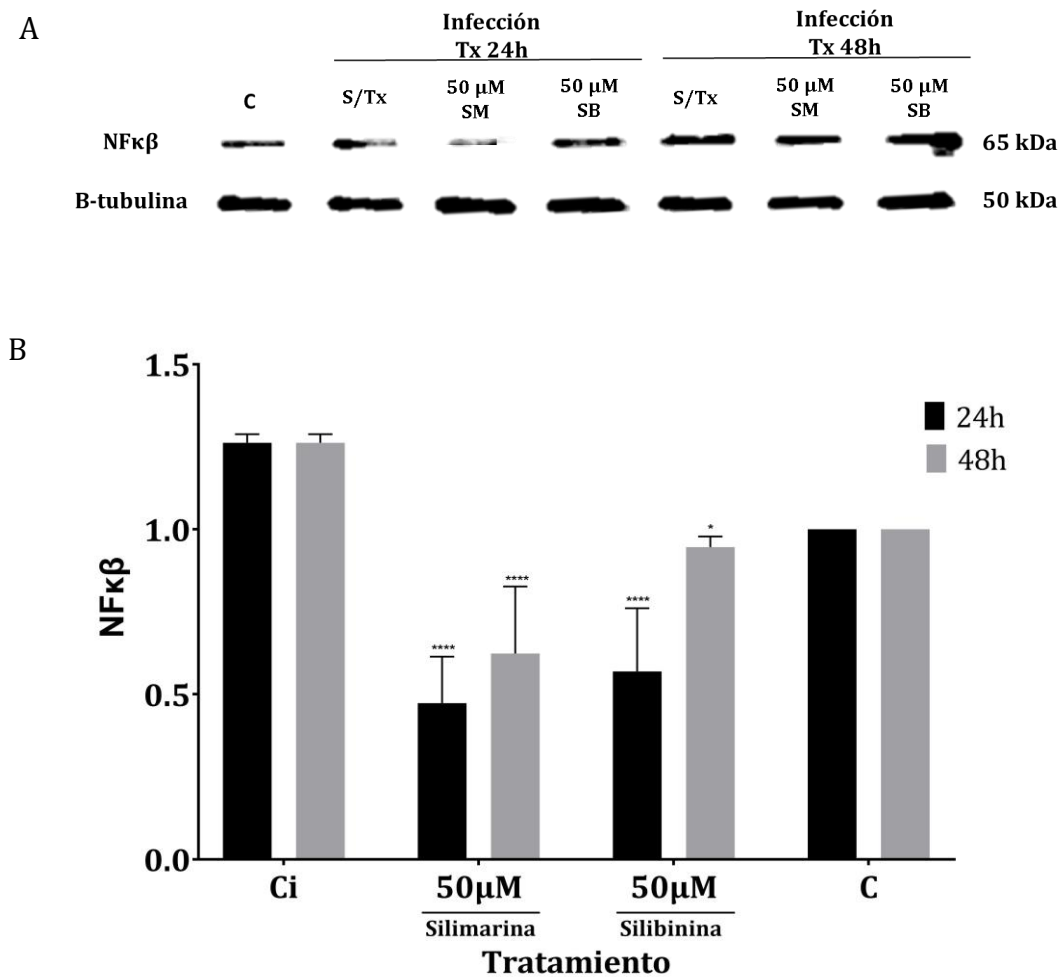


Fig.21. Análisis de las Densitometrías de la proteína NF- κ B total. Se graficaron los datos de las densitometrías de las células infectadas y tratadas con SM y SB a 50 μ M por 24 y 48h. Los datos representan la media \pm SEM de determinaciones individuales de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los asteriscos denotan la significancia estadística. $p \leq 0.05$.

9. Discusión

La TB es la segunda enfermedad infecciosa que causa un mayor número de muertes al año, la cual, se trasmite de forma aérea a partir de gotículas que contienen al bacilo (González, 2014). Para tratar la TB se necesita administrar medicamentos de primera línea, los cuales son: INH, RPM, EMB y PZA. Sin embargo, a pesar de ser un tratamiento eficaz, una de las desventajas que tienen es que la administración de estos medicamentos puede causar daños hepáticos o causar resistencia si no son administrados de manera adecuada (Horsburgh *et al*, 2015). Por lo tanto, es importante encontrar compuestos que puedan administrarse en tiempos cortos, no sean tóxicos y puedan prevenir algunos de los efectos secundarios de la enfermedad (Matteelli *et al*, 2017).

Una alternativa de nuevos medicamentos con efectos microbicidas son los extractos naturales, ya que estos tratamientos podrían ser una opción para tratar la TB. Tal es el caso de la SM que ha sido utilizada como hepatoprotector, como agente antioxidante y ha demostrado que es un extracto seguro, eficaz y con pocos efectos secundarios (Saller *et al*, 2007). La silimarina es obtenida de la planta *Silybum marianum*, su extracto se ha usado por más de 2000 años para tratar enfermedades relacionadas con el hígado, ya que en estudios se ve que disminuye la lesión hepática, aunque también se vio que tiene muchos beneficios además ser usado como hepatoprotector.

En este proyecto se encontró que la SM y SB no son citotóxicos para las células epiteliales pulmonares de la línea celular A549 a concentraciones inferiores a 150 μM . Otros autores realizaron el mismo ensayo, pero en macrófagos humanos no infectados y estimulados con SM y SB a distintas concentraciones, y reportaron que a concentraciones mayores y a más de 24 h ambos compuestos tuvieron un mayor efecto citotóxico (Rodríguez *et al*, 2019).

Por otro lado, se evaluó si la disminución de la viabilidad en las células A549 tras el tratamiento con SM y SB es por inducción de apoptosis. Las células A549, fueron tratadas con 50 y 150 μM de SM y SB durante 24 y 48 h y luego se sometieron a tinción con Hoechst para identificar células apoptóticas a partir de los niveles de fluorescencia observados en las células. Al cuantificar las células apoptóticas se observó que había un mayor número de células en apoptosis mientras mayor era la concentración de SM y SB.

Este ensayo sirvió para poder confirmar los datos obtenidos del ensayo de citotoxicidad. Está información ha sido corroborada en células de cáncer epidérmico, donde las células fueron tratadas con SM e informaron que había un incremento de cuerpos apoptóticos dependiente de la concentración de SM (Katiyar *et al*, 2005).

Al evaluar el efecto de la SM y SB en la carga bacilar de las células A549 infectadas con *M. tuberculosis* H37Ra, se observó que con una dosis de 50 μ M disminuyó significativamente la carga bacilar cuando las células son tratadas con ambos compuestos. La actividad antimicrobiana de la SM se ha demostrado previamente en *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis* (Lee *et al*, 2003). Sin embargo, el mecanismo de acción microbicida que tiene la SM no se ha identificado, aunque se dice que la presencia de grupos hidroxifenólicos presente en los flavonoides podría estar interfiriendo con algunas enzimas bacterianas, como el efecto inhibidor sobre la actividad de la DNA topoisomerasa (Rakelly *et al*, 2015). Por consiguiente, se evaluó la actividad microbicida de la SM y SB 50 y 100 μ M, encontrándose un efecto dosis-dependiente. Previamente se reportó que la SM y SB actúan de una mejor manera cuando están en sinergia con los medicamentos para tratar la TB (Rodríguez *et al*, 2019).

Para determinar el efecto de la SM y SB en la respuesta inmune en las células epiteliales alveolares, se determinó la abundancia relativa del NF- κ B de las células A549 infectadas con *M. tuberculosis* H37Ra, observándose menos NF- κ B cuando las células fueron infectadas y tratadas con SM y SB a 50 μ M por 24 y 48h. Esta disminución se notó más en las células tratadas con SM. Así mismo, esta disminución del NF- κ B se debe a que la silimarina tiene efectos antiinflamatorios, y la inhibición de la activación de este factor se puede dar por muchos factores, sin embargo, siguen sin ser completamente claros. Sin embargo, algunos estudios proponen que la SM puede inhibir la IKK previniendo así la fosforilación y degradación de I κ B y posteriormente inhibiendo la activación de NF- κ B (Gupta *et al*, 2010).

El tratamiento de las células A549 con SM a 50 μ M induce la expresión de más de 11 miRNAs que participan en la vía de señalizaciones importantes para el control de la infección como las vías de TGF- β y MAPK (Kim & Choi, 2012). Algunos estudios señalan que la SM regula de forma negativa a TGF- β . La SM también puede afectar otras vías además de aquellas ya mencionadas. Se ha demostrado que la SM tiene un efecto sobre

el ciclo celular y también sobre la vía de mTOR, esto se ha comprobado a través de investigaciones en linfocitos T activados (Gharagozloo *et al*, 2013). Principalmente, se dice que la SM puede afectar el ciclo celular en diferentes etapas incluyendo la fase G1 y G2/M. Esto se debe a la regulación de proteínas las cuales son importantes ya que controlan la transición del ciclo celular en las células (Wang, 2021). Esto sugiere que la SM puede tener propiedades terapéuticas con diversos beneficios para distintas enfermedades o procesos patológicos en los que la regulación de la vía de mTOR o del ciclo celular es esencial, reduciendo algunos de los efectos adversos asociados con otros tratamientos. De esta manera, podrían ser necesarios más estudios en el futuro para investigar el papel potencial de la silimarina en estas vías, y así poder optimizar su uso para aplicaciones medicinales y terapéuticas específicas.

10. Conclusiones

- La SM y SB a dosis 50 y 100 μM no son citotóxicas en las células A549.
- La SM y SB podrían ser buenos candidatos para el tratamiento de la TB ya que presentan actividad bactericida y coadyuvan para reducir de forma significativa el número de bacilos en las células A549 infectadas.
- Los miRNAs expresados diferencialmente tras el tratamiento de las células A549 con silimarina a 50 μM pueden afectar vías importantes para el control de la infección y la respuesta inmune como la vía de las MAP cinasas y, la del TGF-beta.

11. Bibliografía

1. Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., & Capasso, F. (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1423-1432.
2. Baltimore, D. (2011). NF- κ B is 25. *Nature immunology*, 12(8), 683-685.
3. Bandaru, R., Sahoo, D., Naik, R., Kesharwani, P., & Dandela, R. (2020). Pathogenesis, biology, and immunology of tuberculosis. In *Nanotechnology Based Approaches for Tuberculosis Treatment* (pp. 1-25). Academic Press.
4. Barksdale, L., & Kim, K. S. (1977). *Mycobacterium*. *Bacteriological reviews*, 41(1), 217.
5. Bolscher, N., Hoppenbrouwers, K., & Burgmeijer, R. (2016). Tuberculose.
6. Cardona, P. J. (2018). Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 36(1), 38-46.
7. Davis, J. M., & Ramakrishnan, L. (2008). “The very pulse of the machine”: the tuberculous granuloma in motion. *Immunity*, 28(2), 146-148.
8. Jacobo-Delgado, Y. M., Rodríguez-Carlos, A., Serrano, C. J., & Rivas-Santiago, B. (2023). Mycobacterium tuberculosis cell-wall and antimicrobial peptides: a mission impossible?. *Frontiers in Immunology*, 14, 1194923.
9. Jackson, M. (2014). The mycobacterial cell envelope—lipids. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(10).
10. Eminzade, S., Uras, F., & Izzettin, F. V. (2008). Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. *Nutrition & Metabolism*, 5, 1-8.
11. Esmaeil, N., Anaraki, S. B., Gharagozloo, M., & Moayedi, B. (2017). Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. *International immunopharmacology*, 50, 194-201.
12. Federico, A., Dallio, M., & Loguercio, C. (2017). Silymarin/silybin and chronic liver disease: a marriage of many years. *Molecules*, 22(2), 191.
13. Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory research*, 2, 1-20.

14. Flynn, J. L., & Chan, J. (2001). Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and immunity*, 69(7), 4195-4201.
15. Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A. A., & Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4(1), 3-66.
16. Gharagozloo, M., Javid, E. N., Rezaei, A., & Mousavizadeh, K. (2013). Silymarin inhibits cell cycle progression and m TOR activity in activated human T cells: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 112(4), 251-256.
17. Ghazaei, C. (2018). *Mycobacterium tuberculosis* and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 23.
18. González-Martin, J. (2014). Microbiología de la tuberculosis. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*, 15(1), 25-33.
19. Grzegorzewicz, AE, De Sousa-D'Auria, C., McNeil, MR, Huc-Claustre, E., Jones, V., Petit, C., y Jackson, M. (2016). Ensamblaje del núcleo de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista de Química Biológica*, 291 (36), 18867-18879.
20. Guerrero, A., Martín, N., Moreno, S., & Nogales, M. C. (2003). Procedimientos en microbiología clínica.
21. Guijarro, C., & Egido, J. (2002). Aterosclerosis e inflamación: papel central del factor de transcripción NF- κ B. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 14(2), 77-84.
22. Gupta, S. C., Sundaram, C., Reuter, S., & Aggarwal, B. B. (2010). Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(10-12), 775-787.
23. Gutierrez, M. G., Mishra, B. B., Jordao, L., Elliott, E., Anes, E., & Griffiths, G. (2008). NF- κ B activation controls phagolysosome fusion-mediated killing of mycobacteria by macrophages. *The Journal of Immunology*, 181(4), 2651-2663.
24. Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, 132(3), 344-362.

25. Herrera Barrios, M. T., Torres Rojas, M., Juárez Carvajal, E., & Sada Díaz, E. (2005). Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(4), 327-336.
26. Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., May, H., Lee, O. Y. C., Feldman, M., & Bar-Gal, G. K. (2015). Tuberculosis origin: the Neolithic scenario. *Tuberculosis*, 95, S122-S126.
27. Hao, Z. (2015). A review on antimicrobial activity of silymarin. *Int. J. Sci. Res*, 6, 2113-2115.
28. Horsburgh, C. R., Jr, Barry, C. E., 3rd, & Lange, C. (2015). Treatment of Tuberculosis. *The New England journal of medicine*, 373(22), 2149–2160.
29. Jahan, S., Khan, M., Imran, S., & Sair, M. (2015). The hepatoprotective role of Silymarin in isoniazid induced liver damage of rabbits. *J Pak Med Assoc*, 65(6), 620-2.
30. Javed, S., Kohli, K., & Ali, M. (2011). Reassessing bioavailability of silymarin. *Alternative medicine review*, 16(3), 239.
31. Jilani, T. N., Avula, A., Gondal, Z., & Siddiqui, A. H. (2018). Active tuberculosis.
32. Katiyar, S. K., Roy, A. M., & Baliga, M. S. (2005). Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving Bcl-2/Bax, cytochrome c release, and caspase activation. *Molecular cancer therapeutics*, 4(2), 207-216.
33. Khan, R., Petersen, F. C., & Shekhar, S. (2019). Commensal bacteria: an emerging player in defense against respiratory pathogens. *Frontiers in immunology*, 10, 1203.
34. Křen, V., & Walterová, D. (2005). Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomed papers*, 149(1), 29-41.
35. Lai, R. T., Wang, H., Gui, H. L., Ye, M. Z., Dai, W. J., Xiang, X. G., ... & Xie, Q. (2012). Clinical and pathological features in 138 cases of drug-induced liver injury. *Zhonghua gan Zang Bing za zhi Zhonghua Ganzangbing Zazhi Chinese Journal of Hepatology*, 20(3), 185-189.
36. Lee, D. G., Kim, H. K., Park, Y., Park, S. C., Woo, E. R., Jeong, H. G., & Hahm, K. S. (2003). Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from *Silybum marianum*. *Archives of pharmacal research*, 26, 597-600.

37. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2(1), 1-9.
38. Ly, A., & Liu, J. (2020). Mycobacterial virulence factors: Surface-exposed lipids and secreted proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3985.
39. Maitra, A., Munshi, T., Healy, J., Martin, L. T., Vollmer, W., Keep, N. H., & Bhakta, S. (2019). Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 548-575.
40. Matteelli, A., Sulis, G., Capone, S., D'Ambrosio, L., Migliori, G. B., & Getahun, H. (2017). Tuberculosis elimination and the challenge of latent tuberculosis. *La Presse Médicale*, 46(2), e13-e21.
41. Maulén, N. P. (2011). Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista médica de Chile*, 139(12), 1605-1610.
42. Metushi, I., Uetrecht, J., & Phillips, E. (2016). Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. *British journal of clinical pharmacology*, 81(6), 1030-1036.
43. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2022). Informe mundial sobre la tuberculosis.
44. Ottenhoff, T. H., & Van der Meer, J. W. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*, 15(April (2)), 294-309.
45. Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., & Boehme, C. C. (2016). Nature reviews disease primers. *Tuberculosis*, 2, 16076.
46. Pai, S., Muruganandah, V., & Kupz, A. (2020). What lies beneath the airway mucosal barrier? Throwing the spotlight on antigen-presenting cell function in the lower respiratory tract. *Clinical & Translational Immunology*, 9(7), e1158.
47. Pal, R., Bisht, M. K., & Mukhopadhyay, S. (2022). Secretory proteins of *Mycobacterium tuberculosis* and their roles in modulation of host immune responses: focus on therapeutic targets. *The FEBS Journal*, 289(14), 4146-4171.
48. Paulson, T. (2013). Epidemiology: a mortal foe. *Nature*, 502(7470), S2-S3.
49. Pérez del Molino, M. L., Tuñez Bastida, V., García Ramos, M. R., & Lado, F. L. (2002). Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. *Med. integral (Ed. impr.)*, 39(5), 207-215.

50. Poladian, N., Orujyan, D., Narinyan, W., Oganyan, A. K., Navasardyan, I., Velpuri, P., & Venketaraman, V. (2023). Role of NF- κ B during Mycobacterium tuberculosis Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1772.
51. Pu, W., Zhao, C., Wazir, J., Su, Z., Niu, M., Song, S., Wei, L., Li, L., Zhang, X., Shi, X., & Wang, H. (2021). Comparative transcriptomic analysis of THP-1-derived macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis H37Rv, H37Ra and BCG. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(22), 10504–10520.
52. Kim, S. I., & Choi, M. E. (2012). TGF- β -activated kinase-1: New insights into the mechanism of TGF- β signaling and kidney disease. *Kidney research and clinical practice*, 31(2), 94–105.
53. Rakelly de Oliveira, D., Relison Tintino, S., Morais Braga, M. F. B., Boligon, A. A., Linde Athayde, M., Douglas Melo Coutinho, H., ... & Fachinetto, R. (2015). In vitro antimicrobial and modulatory activity of the natural products silymarin and silibinin. *BioMed research international*, 2015.
54. Kendellen, M. F., Bradford, J. W., Lawrence, C. L., Clark, K. S., & Baldwin, A. S. (2014). Canonical and non-canonical NF- κ B signaling promotes breast cancer tumor-initiating cells. *Oncogene*, 33(10), 1297-1305.
55. Rivas-Santiago, B., Vieyra-Reyes, P., & Araujo, Z. (2005). Respuesta de inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar: Revisión. *Investigación Clínica*, 46(4), 391-412.
56. Rodríguez-Flores, E. M., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payan, J., Marquina-Castillo, B., Castañón-Arreola, M., & Hernández-Pando, R. (2019). A significant therapeutic effect of silymarin administered alone, or in combination with chemotherapy, in experimental pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive or drug-resistant strains: In vitro and in vivo studies. *Plos one*, 14(5), e0217457.
57. Rodríguez, J. (2014). Tuberculosis. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 547–552.
58. Saller, R., Melzer, J., Reichling, J., Brignoli, R., & Meier, R. (2007). An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. *Complementary Medicine Research*, 14(2), 70-80.

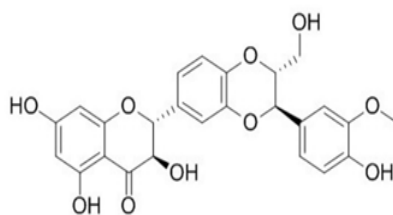
59. Sosa-Hernández, Ó., García-Padilla, E., Avella-Gutiérrez, G. J., López-Flores, V. J., & Martínez-Ramírez, Z. Y. (2022). Retraso en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar: reporte de caso. *Atención Familiar*, 29(3), 191-195.
60. Sterling, T. R., Njie, G., Zenner, D., Cohn, D. L., Reves, R., Ahmed, A., ... & Belknap, R. (2020). Guidelines for the treatment of latent tuberculosis infection: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2020. *American Journal of Transplantation*, 20(4), 1196-1206.
61. Suárez, I., Fünfer, S. M., Kröger, S., Rademacher, J., Fätkenheuer, G., & Rybniker, J. (2019). The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Deutsches Arzteblatt international*, 116(43), 729-735.
62. Toche, T. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446-457.
63. Vallejo, M. C. (2019). Trabajo fin de grado título: Actividad farmacológica de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. y sus componentes aislados (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID).
64. Wang Z. (2021). Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells*, 10(12), 3327.
65. Wilasrusmee, C., Kittur, S., Shah, G., Siddiqui, J., Bruch, D., Wilasrusmee, S., & Kittur, D. S. (2002). Immunostimulatory effect of *Silybum Marianum* (milk thistle) extract. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 8(11), BR439-43.
66. Welin, A. (2011). Survival strategies of *Mycobacterium tuberculosis* inside the human macrophage (Doctoral dissertation, Linköping University Electronic Press).
67. Wolf, A. J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2008). Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *The Journal of experimental medicine*, 205(1), 105-115.
68. Wu, S., Xia, Y., Lv, X., Tang, S., Yang, Z., Zhang, Y., & Zhan, S. (2015). Preventive use of hepatoprotectors yields limited efficacy on the liver toxicity of anti-tuberculosis agents in a large cohort of Chinese patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 30(3), 540-545.

69. Zhang, S., Pan, H., Peng, X., Lu, H., Fan, H., Zheng, X., & Wang, J. (2016). Preventive use of a hepatoprotectant against anti-tuberculosis drug-induced liver injury: A randomized controlled trial. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 31(2), 409-416.

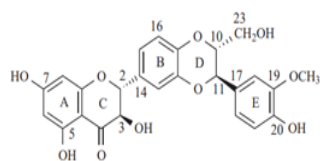
12. Anexos

Anexo 1

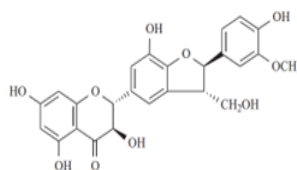
Flavanolignanos y otros flavonoides contenidos en el complejo de
silymarina



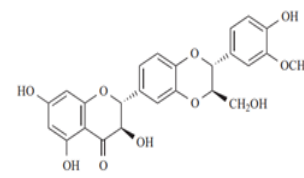
Silymarin



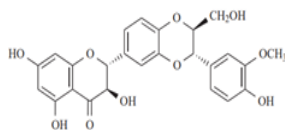
Silybin A (2*R*, 3*R*, 10*R*, 11*R*)



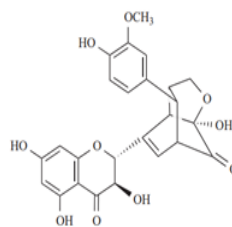
Silychristin



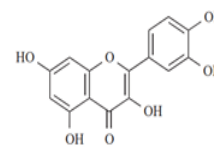
Isosilybin A



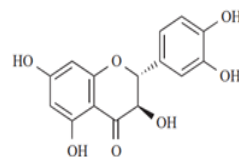
Silybin B (2*R*, 3*R*, 10*S*, 11*S*)



Silydianin



Quercetin

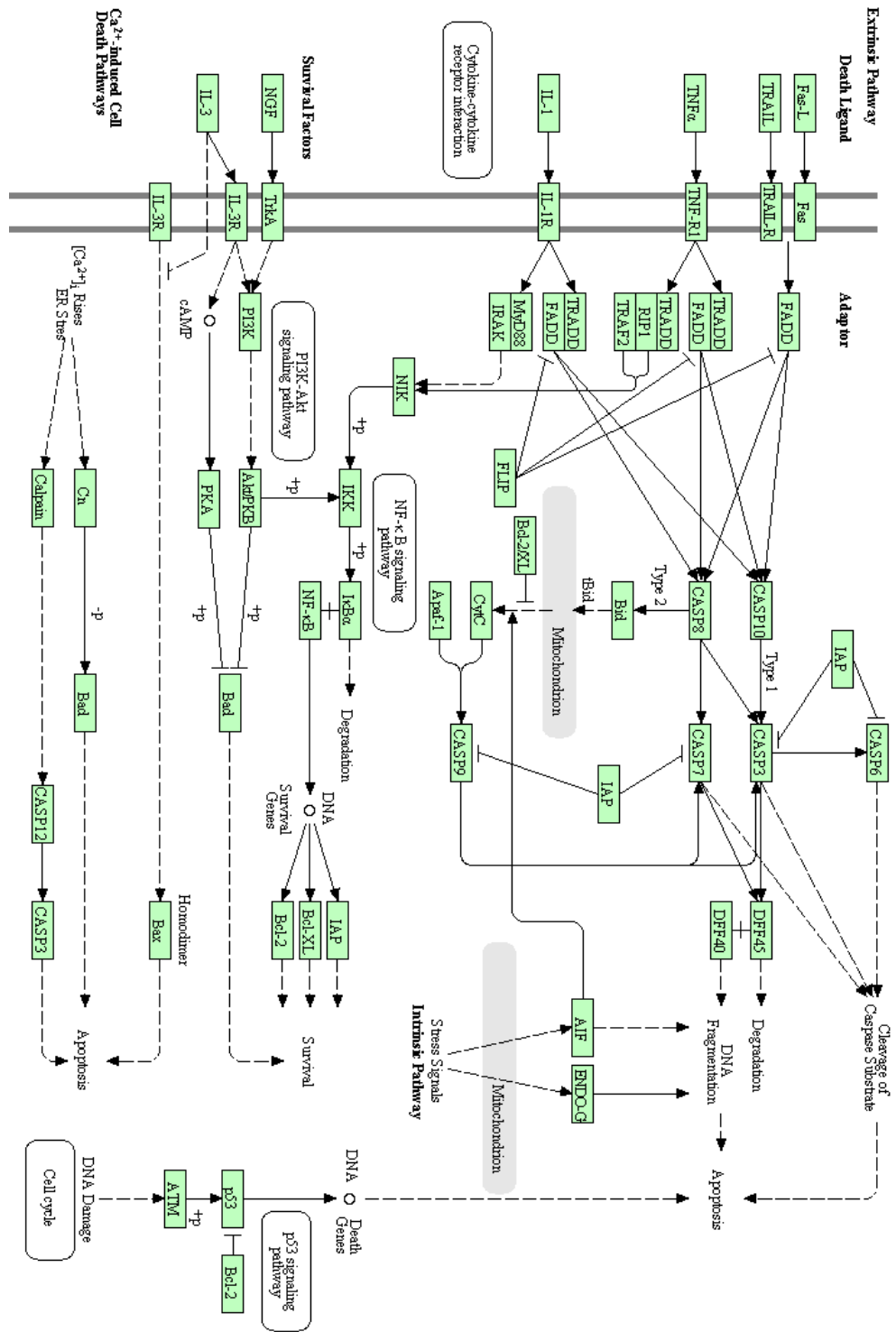


(+)-Taxifolin

Anexo 3

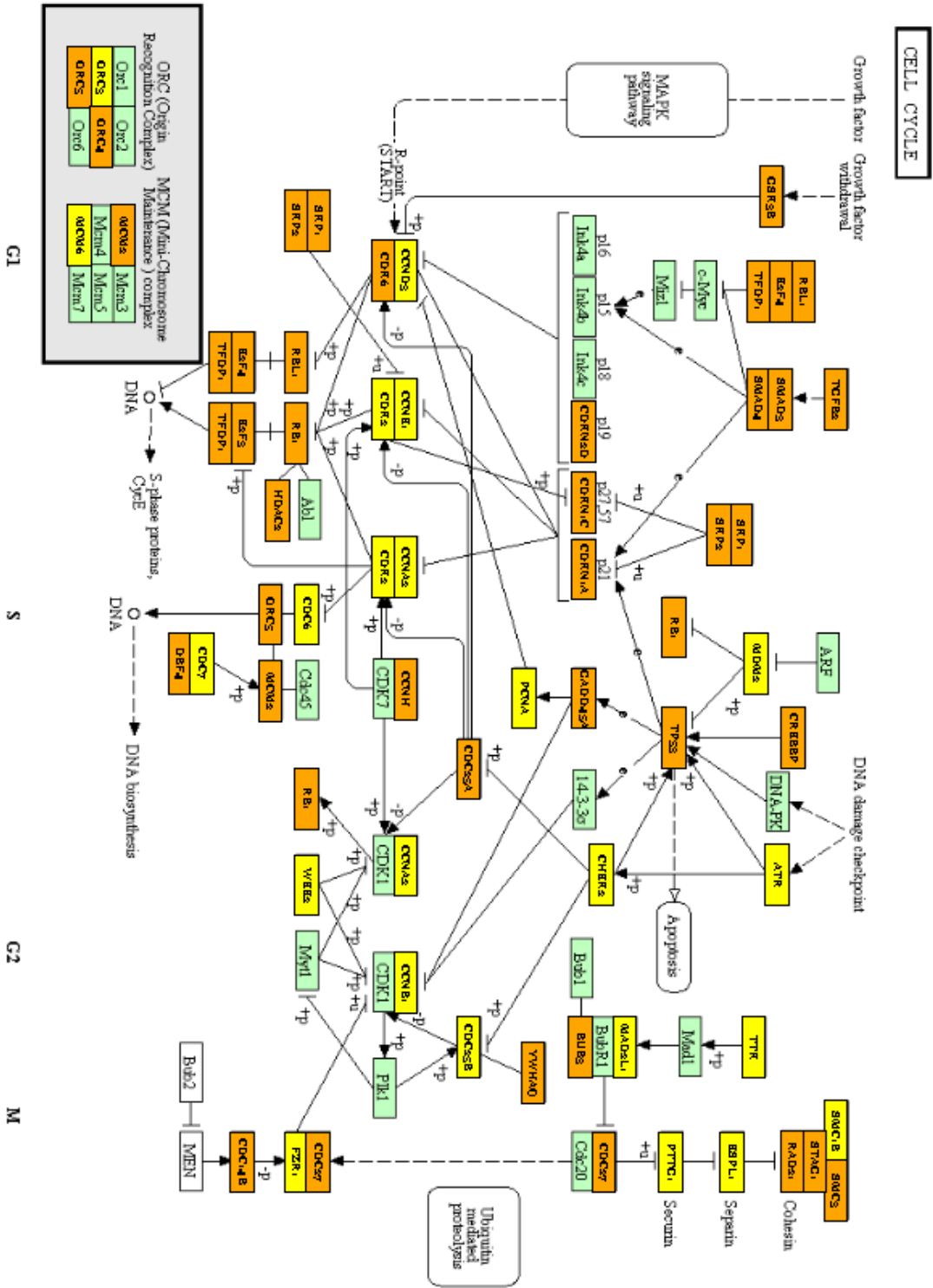
Apoptosis

APOPTOSIS



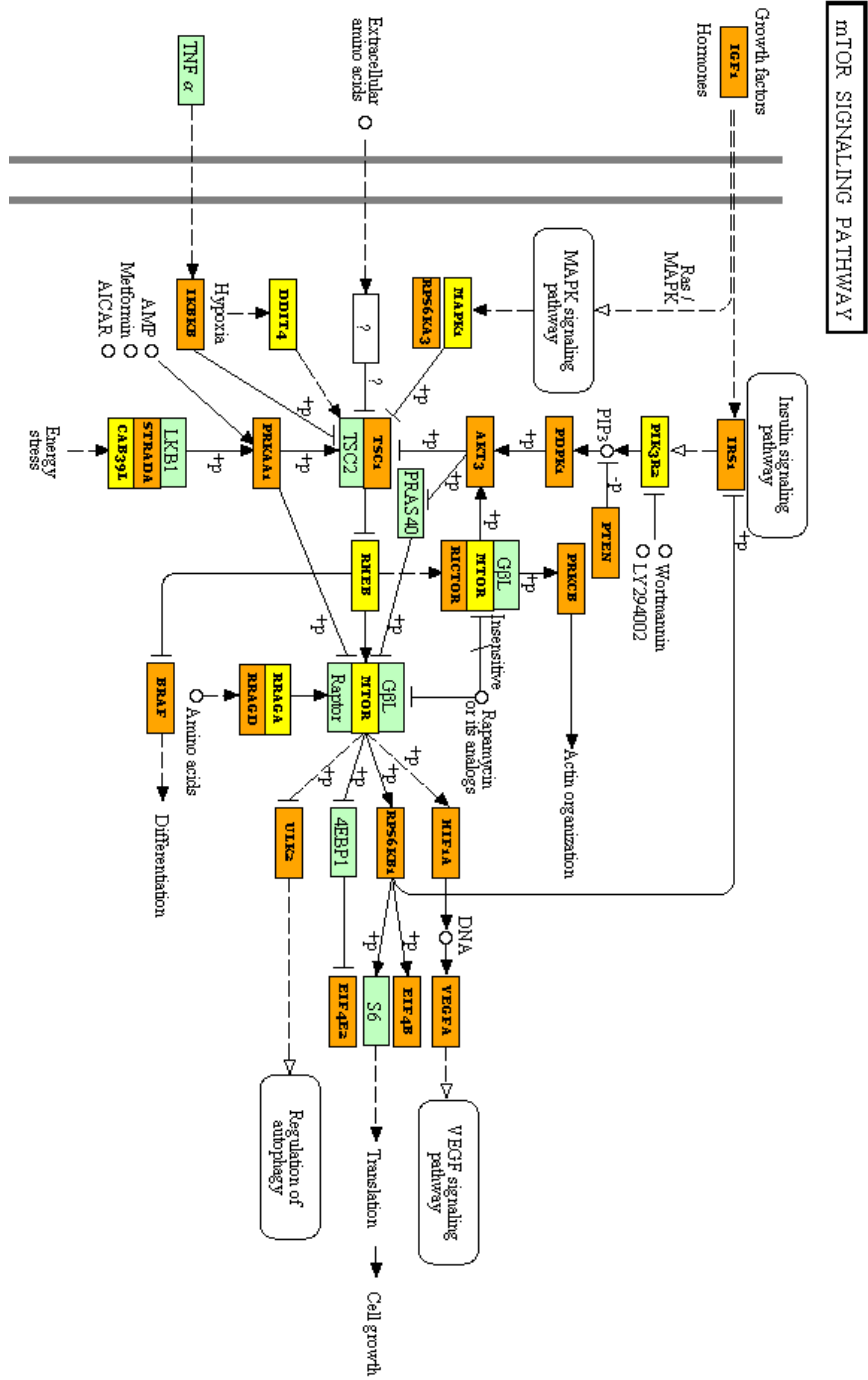
Anexo 4

Ciclo celular



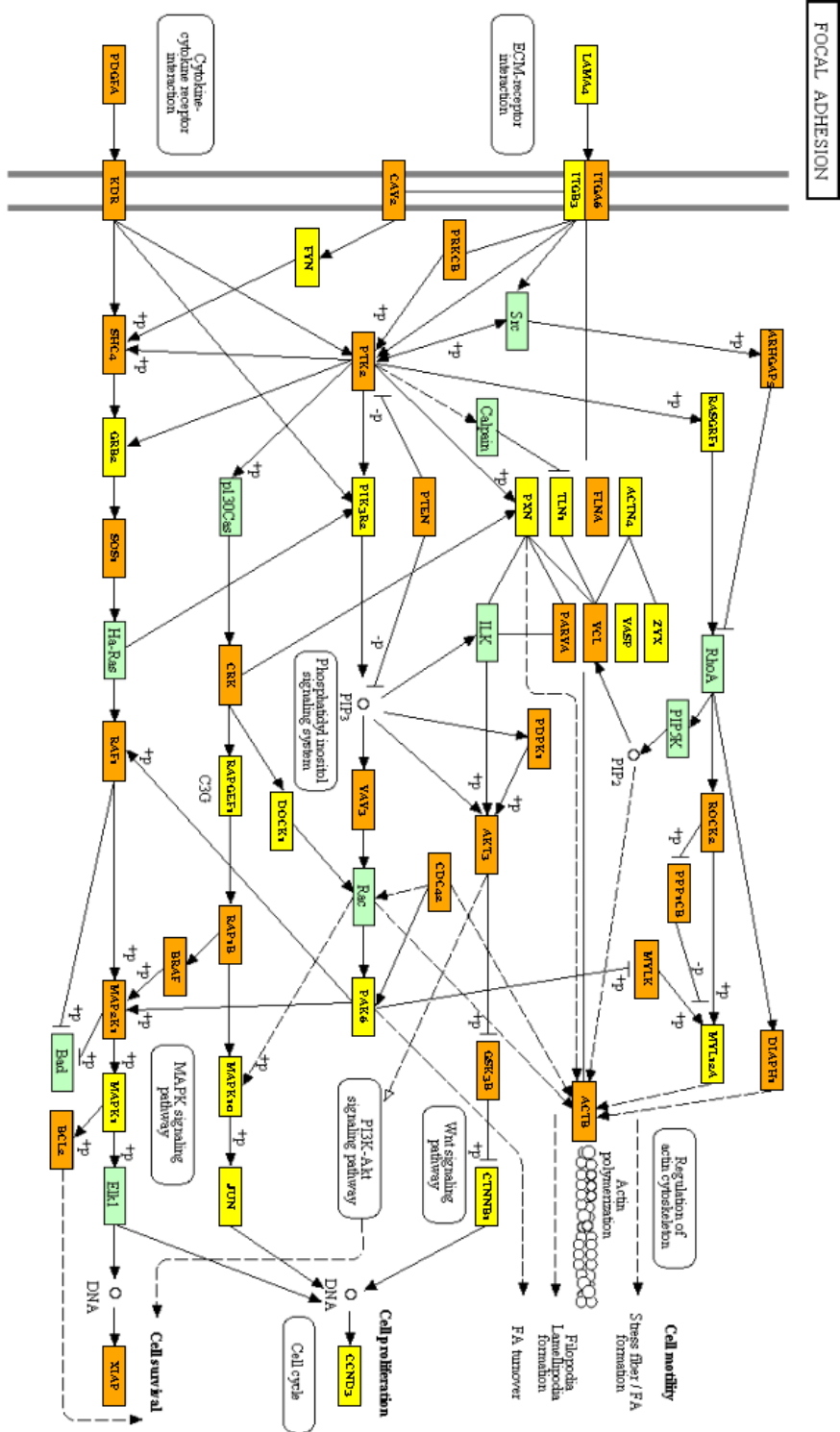
ANEXO 6

Vía de señalización de mTOR



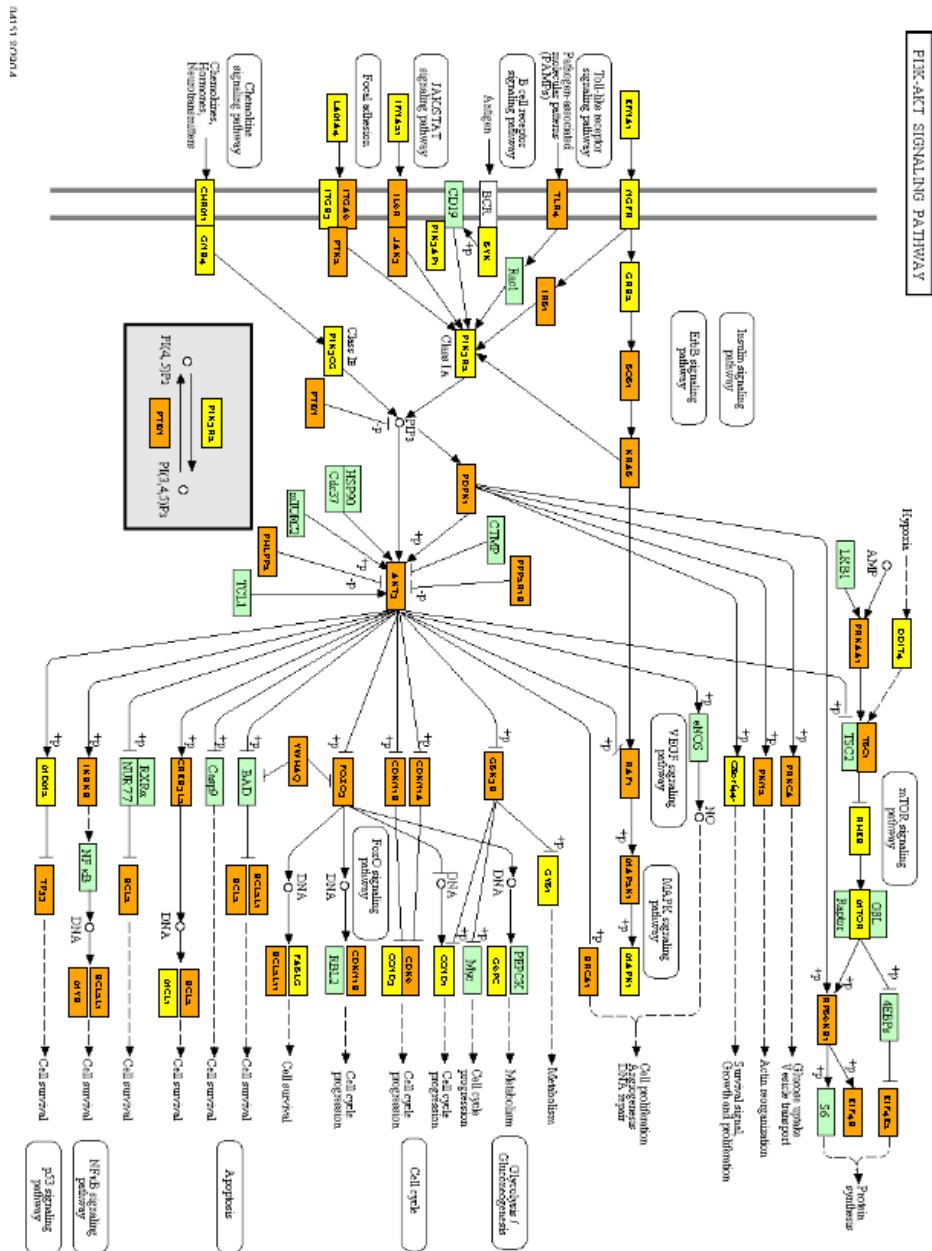
ANEXO 9

Adhesión focal



ANEXO 10

Vía de señalización PI3k-AKT



04/11/2004

