



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Fisiología y Farmacología

Efecto tóxico de la metformina, insulina y glibenclamida sobre la expresión de péptidos antimicrobianos en macrófagos y células epiteliales infectadas

con *Mycobacterium tuberculosis*

MVZ. Shinji Alcalá Okayasu

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE
TOXICOLOGÍA

Co-tutores

Dr. Bruno Rivas Santiago

Dra. Eva María Salinas Miralles

Asesora

Dra. Yolanda Romo Lozano

Aguascalientes, Ags., Noviembre 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **SHINJI ALCALÁ OKAYASU** con ID número 117540 quien realizó la tesis titulada: **EFFECTO TÓXICO DE LA METFORMINA, INSULINA Y GLIBENCLAMIDA SOBRE LA EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN MACRÓFAGOS Y CÉLULAS EPITELIALES INFECTADAS CON MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 15 de Noviembre de 2016


Dr. Bruno Rivas Santiago
Tutor de tesis


Dra. Eva María Salinas Miralles
Tutora de tesis

c.c.p. - Shinji Alcalá Okayasu
c.c.p. - Dr. Juan Jauregui Rincón - Secretaria de Investigación y Posgrado
c.c.p. - Dr. Martín Gerardo Rodríguez - Consejero Académico para área terminal Toxicología
c.c.p. - Dr. Eugenio Pérez Moliné Balch - Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Asesor designado del estudiante **SHINJI ALCALÁ OKAYASU** con ID número 117540 quien realizó la tesis titulada: **EFECTO TÓXICO DE LA METFORMINA, INSULINA Y GLIBENCLAMIDA SOBRE LA EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN MACRÓFAGOS Y CÉLULAS EPITELIALES INFECTADAS CON MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 15 de Noviembre de 2016


Dra. Yolanda Romo Lozano
Comité Tutorial

c.c.p.- Shinji Alcalá Okayasu
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaria de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Dr. Martín Gerardo Rodríguez - Consejero Académico para área terminal Toxicología
c.c.p.- Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch - Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

SHINJI ALCALÁ OKAYASU
MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA TOXICOLOGÍA
PRESENTE.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Efecto tóxico de la Metformina, Insulina y Glibenclamida sobre la expresión de péptidos antimicrobianos en macrófagos y células epiteliales infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 22 de noviembre de 2016

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruíz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

Agradecimientos

En primera instancia me gustaría agradecer a mi mamá Etsuko Okayasu por ser un ejemplo en mi vida, demostrándome día con día que siempre debemos de tener hambre de más, me mostró que el estudio es el pilar de todo y que nunca debo de quedarme atrás.

A mi padre Pedro Alcalá Martínez por siempre apoyarme en todas la decisiones que he tomado en mi vida y reprenderme cuando lo requería, es un ejemplo a seguir, ya que todos los días él se esfuerza entregando todo sin pedir nada a cambio.

A mis tíos Elva y Rubén por acogerme de una manera espléndida en su hogar, que lo volví mío, me mostraron lo que es amar y dar parte de ellos sin esperar algo de vuelta.

A mis abuelos Koji y Saeko que a pesar de los continentes que nos separan siempre están en mi corazón, ya que los pocos momentos que he compartido con ellos son invaluable para mí.

A mis compañeros de laboratorio que se volvieron grandes amigos con los que podía contar en todo momento, por apoyarme y estar conmigo en las buenas y en las malas, especialmente a Valentín que más que un amigo en mi vida se convirtió en un hermano.

A CONACYT y al IMSS, instituciones que me apoyaron y abrieron sus puertas haciendo posible esto.

A mi tutora Eva y Yolanda que a pesar de la distancia siempre estuvieron al pendiente de mi trabajo sin dejarme a un lado, poniendo siempre un granito que volvieron posible este trabajo.

Y por último quisiera agradecer a mi querido tutor Bruno Rivas, mi padre de la investigación ya que nunca se tentó el corazón para exigirme resultados y me enseñó que por más estudios que tengas no te hacen más que nadie, al contrario tienes que poner todo de ti para que los que están a tu alrededor aprendan más, y no solo conocimientos del ramo, un todólogo en el arte de la vida y la felicidad.

Dedicatoria

Este trabajo me gustaría dedicárselo a mis padres, que gracias a su esfuerzo me llevaron por este camino, convirtiéndome con lo que soy ahora, me siento orgulloso de decir que ellos son mis papas y que mis primeros pasos fueron tomándolos de la mano. Me llevaron por un camino por el cual no sabía que esperar, pero ahora que tengo la suficiente madurez sé que me llevaron por el mejor sendero posible. A nadie le enseñan a ser padres y yo personalmente les pondría una nota excelente, ya que me gusta quien soy y los valores que inculcaron en mí, no soy perfecto pero para mí ellos lo son.

También me gustaría dedicarles esto a mis abuelos Koji y Saeko, que a pesar de la distancia entre continentes que nos separan siempre he sentido su amor, los pocos momentos que he compartido a su lado son invaluable para mí.

Por último y no menos importante dedico esto a mí mismo, no fue fácil y me costó más de lo que imagine pero esto me enseña que el vivir no es sencillo, y eso, me agrada demasiado, el mundo es gigante y me lo quiero comer todo.

1. Índice General

1. Índice General	1
2. Índice de Tablas	4
3. Índice de Gráficas	5
4. Acrónimos	6
5. Resumen	8
6. Abstract	9
7. Introducción	10
7.1. <i>Diabetes mellitus</i>	10
7.1.2. Tipos de <i>Diabetes mellitus</i>	11
7.1.2.1. <i>Diabetes mellitus tipo 1</i>	11
7.1.2.2. Diabetes gestacional	12
7.1.2.3. Diabetes idiopática	12
7.1.2.4. Diabetes Monogénica	13
7.1.2.5. Diabetes Poligénica	13
7.1.2.6. <i>Diabetes mellitus tipo II</i>	14
8. Antecedentes	16
8.1. Patogenia de DM2	16
8.1.1. Epidemiología de <i>Diabetes mellitus</i> tipo II	18
8.1.2. Principales tratamientos en la <i>Diabetes mellitus 2</i>	20
8.1.2.1. Insulina	21
8.1.2.1.1. Mecanismo de acción	22
8.1.2.1.2. Farmacocinética	23
8.1.2.1.3. Efectos clínicos	24
8.1.2.2. Metformina	25
8.1.2.2.1. Mecanismo de acción	25
8.1.2.2.3. Farmacocinética	27
8.1.2.2.4. Efectos clínicos de la metformina	27
8.1.2.3. Glibenclamida	28
8.1.2.3.1. Mecanismo de acción	28
8.1.2.3.2. Efectos clínicos	29
8.2. Tuberculosis	32
8.2.1. Epidemiología de la tuberculosis	36
8.2.2. DM2 y tuberculosis	37
8.2.2.1. Relación epidemiológica entre DM2 y TB	39
8.2.3. Inmunidad innata y adaptativa en la TB	41
8.2.4. Inmunidad innata y adaptativa disfuncional frente a MTB en pacientes con DM	44
8.3. Péptidos Antimicrobianos	47
8.3.1. Defensinas	48
8.3.1.1. Mecanismo antimicrobiano de las defensinas	49
8.3.2. Catelicidina	50
8.3.2.1. Mecanismo antimicrobiano de la catelicidina	50
8.3.3. Péptidos antimicrobianos en TB	51

9. Justificación	53
10. Hipótesis del trabajo	54
11. Objetivos	55
11.1. Objetivo general	55
11.2. Objetivos particulares	55
12. Metodología	56
12.1. Crecimiento línea celular NCI-H292 (ATCC® CRL-1848™) y A549 (ATCC® CCL185™)	56
12.1.1. Descongelamiento NCI-H292 y A549	56
12.1.2. Disgregación enzimática	57
12.1.3. Adherencia de células	57
12.2. Crecimiento de la línea celular THP1 (ATCC® TIB-202™)	58
12.2.1. Descongelamiento THP1	58
12.2.2. Congelamiento células THP1	58
12.2.3. Adherencia de células THP1	58
12.3. Tratamiento de las líneas celulares	59
12.3.1. Ensayo de viabilidad con resazurina	59
12.3.2. Tratamientos de las líneas celulares A549 y NCI-H292	60
12.3.3. Tratamientos de la línea celular THP1	60
12.3. Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA)	61
12.4.1. Determinación de HBD-2, HBD-3 y HBD-4 por ELISA	61
12.4.2. Determinación de LL-37 por LL-37	61
12.5. Crecimiento de cepa de Mycobacterium tuberculosis H37Rv y obtención de su fase logarítmica	62
12.5.1. Realización de alícuotas de la cepa de trabajo M. tuberculosis H37Rv	63
12.5.2. Unidades formadoras de colonias (UFC)	64
12.6. Infección de línea celular A549	65
12.6.1. Determinación del crecimiento de Mycobacterium tuberculosis en líneas celulares A549	66
12.6.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA	66
12.7. Análisis de los datos	69
13. Resultados	70
13.1. Evaluación de la toxicidad de metformina, insulina y glibenclamida	70
13.1.1. Evaluación de toxicidad de metformina, insulina y glibenclamida en Neumocitos tipo II (A549)	71
13.1.2. Evaluación de toxicidad de metformina, insulina y glibenclamida en células broncoepiteliales (NCI-H292)	73

13.1.3.	Evaluación de toxicidad de metformina, insulina y glibenclamida en macrófagos (THP1)	75
13.2.	Determinación de HBD2, HBD3, HBD4 y LL-37 por ELISA en sobrenadantes de células tratadas con metformina, insulina y glibenclamida	76
13.2.1.	Determinación de las curvas estándar para los ELISA de HBD2, HBD3, HBD4 y LL-37	77
13.2.2.	Determinación de péptidos antimicrobianos en sobrenadantes de células tratadas con metformina, insulina y glibenclamida	78
13.3.	Expresión de HBD4 en células A549 infectadas con Mycobacterium tuberculosis y tratadas con metformina, insulina y glibenclamida	83
13.4.	Crecimiento de Mycobacterium tuberculosis en células A549 tratadas con metformina, insulina y glibenclamida	84
14.	Discusión	86
15.	Conclusión	90
16.	Perspectivas	91
17.	Glosario	92
18.	Bibliografías	93

2. Índice de Tablas

Tabla 1. Hipoglucemiantes autorizados por el IMSS, características generales	30
Tabla 2. Características de las Insulinas	32
Tabla 3. Esquema de tratamiento de líneas celulares	59



3. Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos patogénicos de DM2.	17
Figura 2. Mecanismo acción de insulina.	23
Figura 3. Mecanismo de acción de la metformina.	26
Figura 4. Mecanismo de acción de la glibenclamida.	29
Figura 5. Mycobacterium tuberculosis.	33
Figura 6. Persistencia de tuberculosis.	35
Figura 7. Tuberculosis y sus co-morbilidades.	40
Figura 8. Respuesta inmune efectora frente a tuberculosis.	42
Figura 9. Mecanismos inmunológicos que contribuyen a la susceptibilidad del diabético a Mycobacterium tuberculosis.	45
Figura 10. Mecanismo acción péptidos antimicrobianos.	49
Figura 11. Viabilidad en línea celular A549 tratada con a) metformina, b) insulina y c) glibenclamida.	71
Figura 12. Viabilidad de línea celular NCI-H292 tratadas con a) metformina, b) insulina y c) glibenclamida.	73
Figura 13. Viabilidad de línea celular THP1 tratadas con a) metformina, b) insulina y c) glibenclamida.	75
Figura 14. Curva estándar de a) beta defensina humana 2, b) beta defensina humana 3, c) beta defensina humana 4 y d) LL-37	77
Figura 15. Concentración de HBD2.	78
Figura 16. Concentración de HBD3	80
Figura 17. Concentración de HBD4.	82
Gráfica 1. Expresión relativa de HBD4 en línea celular A549 infectada y tratada con metformina (2 mM), insulina (10^{-8} M) y glibenclamida ($1 \mu\text{M}$).	84
Grafica 2. Unidades Formadoras de Colonias en células A549 infectadas con H37Rv y tratadas con metformina (2 mM), insulina (10^{-8} M) y glibenclamida ($1 \mu\text{M}$) durante 24 horas.	85

4. Acrónimos

AMPK	Protein quinasa activada por AMP
ATP	Adenin Trifosfato
DEFA	α -defensinas
DEFB	β -defensinas
DM	Diabetes mellitus
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición
FFA	Ácidos grasos libres
GLUT	Transportador de glucosa
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HBD2	Beta defensina humana 2
HBD3	Beta defensina humana 3
HBD4	Beta defensina humana 4
IFN- γ	Interferón gamma
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INF- γ	Interferón gamma
IRS	Sustrato de receptor de insulina

MA Macrófagos alveolares

MCH Complejo principal de histocompatibilidad

MODY Diabetes en el inicio de la madurez

MTB Mycobaterium tuberculosis

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ND Diabetes neonatal

NK Natural Killer

OCT Transportador orgánico

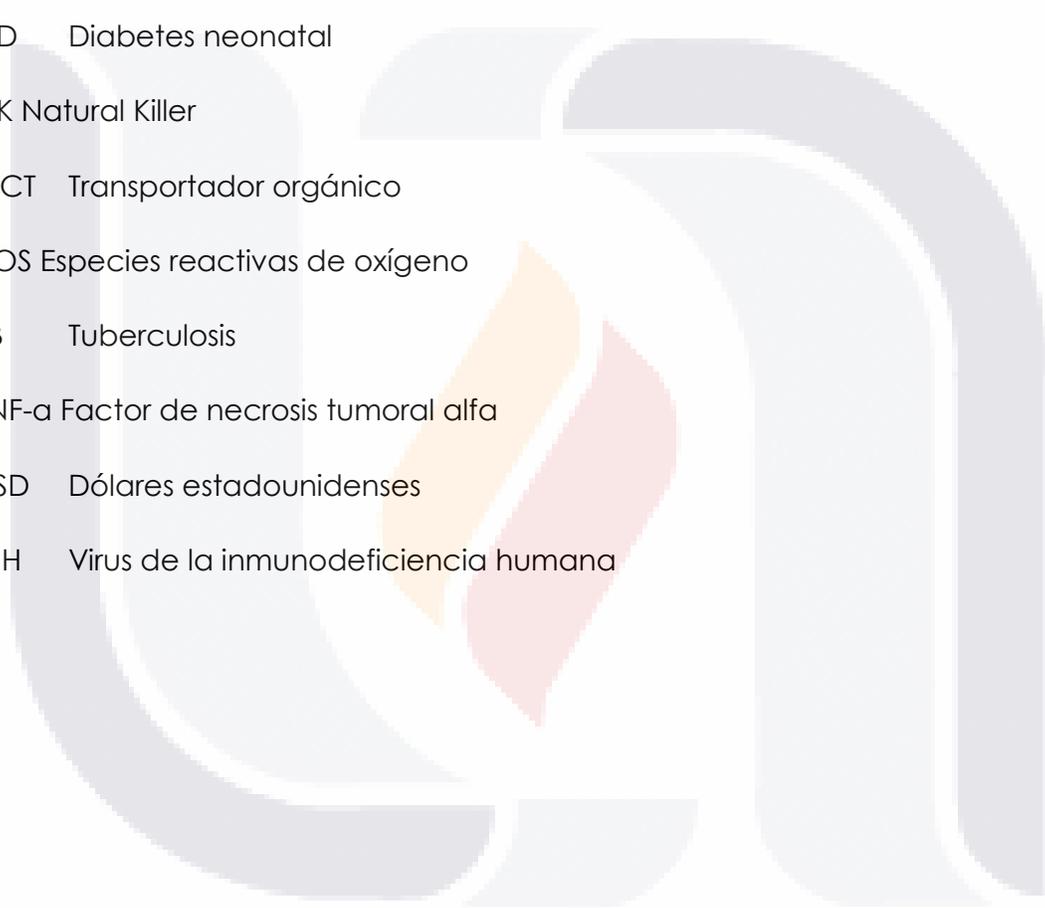
ROS Especies reactivas de oxígeno

TB Tuberculosis

TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa

USD Dólares estadounidenses

VIH Virus de la inmunodeficiencia humana



5. Resumen

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto de la metformina, insulina y glibenclamida sobre la expresión de péptidos antimicrobianos (HBD2, HBD3, HBD4 y LL-37) en las líneas celulares A459 (neumocitos tipo II), NCI-H292 (células broncoepiteliales) y THP1 (monocitos/macrófagos) infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv).

Se evaluó si las diferentes concentraciones de los fármacos presentaban un efecto tóxico sobre la viabilidad de las líneas celulares y se encontró que la viabilidad de estas no se modificó a las 24 horas de tratamiento. Posteriormente se determinó si los fármacos alteraban la expresión de los péptidos antimicrobianos, encontrándose que la insulina y glibenclamida disminuían el péptido HBD4 en la línea celular A549.

Posteriormente se evaluó si la disminución de HBD4 en esta línea celular afectaba su capacidad para controlar el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. Por lo que se realizó la infección de las células con la micobacteria, posteriormente fueran tratadas con metformina, insulina y glibenclamida y se evaluó el mRNA de HBD4 así como Unidades Formadoras de Colonias. Para la expresión genética del mRNA se encontró disminuido el péptido antimicrobiano HBD-4 en las células tratadas con insulina y glibenclamida. En las UFC no se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar los diferentes grupos. El presente trabajo concluye que insulina y glibenclamida disminuyen la expresión de péptido HBD4 en la línea celular A549, pero esto no influye en el control de la micobacteria.

6. Abstract

In the present investigation work we evaluated the effect of metformin, insulin and glibenclamide on the expression of antimicrobial peptides (HBD2, HBD3, HBD4 and LL-37) in the cell lines A459 (type II pneumocytes), NCI-H292 (Bronchoepithelial cells) and THP1 (monocytes / macrophages) infected with *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv).

We assessed whether the different concentrations of the drugs had a toxic effect on the viability of the cell lines and found that the viability of these did not change after 24 hours of treatment. It was later determined whether the drugs altered the expression of the antimicrobial peptides. Insulin and glibenclamide decrease the HBD4 peptide in the A549 cell line.

It was subsequently assessed whether the decrease in HBD4 in this cell line affected its ability to control the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. As the cells were infected with the mycobacterium, they were subsequently treated with metformin, insulin and glibenclamide, and the HBD4 mRNA was evaluated as well as Colony Forming Units. For the mRNA gene expression, the antimicrobial peptide HBD-4 was found to be decreased in cells treated with insulin and glibenclamide. In the CFU, we did not find statistically significant difference when comparing the different groups. The present study concludes that insulin and glibenclamide decrease the expression of peptide HBD4 in the cell line A549, but this does not influence the control of the mycobacteria.

7. Introducción

7.1. *Diabetes mellitus*

La *Diabetes mellitus* (DM) es una enfermedad común en la que se tienen niveles excesivos de glucosa en sangre. En términos sencillos, la diabetes es generalmente dada por un fallo en la funcionalidad de la insulina (Hassali, Nazir et al. 2015). Por definición entendemos que la DM es aquella alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, en mayor o menor medida, de modificaciones en el metabolismo de los carbohidratos, de las proteínas y de los lípidos. El origen y la etiología de la DM son diversos, pero conllevan a la alteración en la secreción de la insulina, en la sensibilidad de acción de la hormona o bien en ambas (Conget 2002).

La hiperglucemia crónica está asociada con el daño a largo plazo, disfunción y fallo de diferentes órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Los síntomas marcados de la hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces polifagia y visión borrosa. Las consecuencias de no controlar este desorden nos puede llevar a cetoacidosis o estado hiperosmolar hiperglucémico. Las complicaciones a largo plazo incluyen la retinopatía con pérdida de la visión, nefropatía que conduce a un fallo renal, neuropatía periférica con riesgo de úlceras en el pie, amputaciones e involuntariamente las neuropatías causan síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares, así como disfunción sexual. Los pacientes con DM tienen una incidencia aumentada de arteroesclerosis cardiovascular, en arterias periféricas, y desordenes cerebrovasculares. La hipertensión y anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas son encontradas en personas diabéticas (American Diabetes 2012).

7.1.2. Tipos de *Diabetes mellitus*

7.1.2.1 *Diabetes mellitus* tipo 1 (Destrucción de células Beta, usualmente con una deficiencia absoluta de insulina o diabetes inmuno-mediada)

Esta forma de diabetes, abarca aproximadamente del 5-10% de los pacientes con DM. Resulta de una destrucción autoinmune de las células Beta del páncreas. Marcadores de la destrucción autoinmune de este tipo de células, incluye autoanticuerpos anti-islotas, autoanticuerpos anti-insulina, autoanticuerpos anti- Glutamato descarboxilasa 65 (GAD65), y autoanticuerpos de tirosina fosfatasas IA-2 e IA-2Beta. Uno y usualmente más de uno de estos autoanticuerpos está presente en el 85-90% de los casos cuando la hiperglucemia es detectada inicialmente. En esta forma de DM, el rango de la destrucción de las células Beta es muy variable, empezando rápidamente en algunos pacientes (infantes y niños). Algunos pacientes, regularmente niños y adolescentes, presentan cetoacidosis como primera manifestación de la enfermedad. Otros tienen hiperglucemia moderada en el ayuno que puede cambiar rápidamente a una hiperglucemia grave y/o cetoacidosis en presencia de infección u otro factor de estrés. Otros, particularmente adultos, pueden mantener la función de las células beta, lo suficiente para prevenir la cetoacidosis por muchos años aunque eventualmente se convierten en insulino dependientes y están en riesgo de presentar cetoacidosis. Aunque los pacientes rara vez presentan obesidad con este tipo de diabetes, la presencia de la obesidad no es incompatible con el diagnóstico. Estos pacientes también son propensos a otros trastornos autoinmunes como: la enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, vitíligo, hepatitis autoinmune, miastenia gravis, y la anemia perniciosa (American Diabetes 2012).

7.1.2.2. Diabetes gestacional

La diabetes gestacional es una intolerancia a los hidratos de carbono que puede ser de diferente severidad, esta es diagnosticada durante el embarazo. Este tipo de diabetes no es causada por la carencia de insulina, sino por los efectos bloqueadores de las otras hormonas en la insulina que es producida (resistencia a la insulina) la cual se presenta normalmente en las primeras 20 semanas de gestación. La respuesta normal ante esta patología es el aumento en la secreción de insulina en el organismo, cuando esto no ocurre se produce la diabetes gestacional (Almirón, Gamarra et al. 2005)

7.1.2.3. Diabetes Idiopática

No es muy conocida la etiología de algunas formas de diabetes tipo 1. Algunos pacientes presentan de manera permanente insulinopenia y son propensos a la cetoacidosis, pero no se tiene evidencia de que sea algo autoinmune. Solo una parte minoritaria de pacientes entran dentro de esta clasificación, siendo la mayoría de éstos descendientes de africanos o asiáticos. Individuos con esta forma de diabetes sufren de cetoacidosis episódica y exhiben varios grados de deficiencia a la insulina entre episodios. Esta forma de diabetes es fuertemente heredada, se carece de evidencia de autoinmunidad de las células Beta, y no está asociada a HLA. Estos pacientes presentan un requerimiento absoluto de insulina terapia que va y viene (American Diabetes 2012).

7.1.2.4. Diabetes monogénica

Un incremento en el número de distintas formas de diabetes clínicas y genéticas resulta de la mutación de genes. Convencionalmente, la diabetes monogénica que se ha desarrollado en los primeros 6 meses de vida se conoce como diabetes neonatal (ND), y el cual evoluciona en adultos jóvenes y se refiere a la diabetes en el inicio de madurez de los jóvenes (MODY). ND, es diagnosticada a los primeros 6 meses de vida. Se sabe que es un desorden monogénico que causa la mutación de genes claves que juegan un papel importante dentro de la función y el desarrollo de las células beta, incluyendo a la glucocinasa, el canal K-ATP, y la misma insulina. Su incidencia es baja (alrededor de 1 en 200,000 nacimientos). Puede ser permanente (PNDM) o trascendente (TNDM) o seguir un curso temporal remitente-recidivante. Este desorden está usualmente asociado con retraso de crecimiento intrauterino y bajo peso al nacimiento. La mutación en los genes que codifican Kir6.2 (*KNCJ11*) y SUR1 (*ABCC8*) subunidades del canal K-ATP son los casos más comunes de PNDM, siendo un aproximado el 50% de los casos (Ashcroft and Rorsman 2012). Los canales de K ATP juegan un papel clave en la regulación de la secreción de insulina a través de los potenciales de acción. Un aumentado número de estos canales puede conducir a una hiperinsulinemia congénita, ya que se vería exacerbado el estímulo de las células Beta pancreáticas y la excreción de la insulina (Smith, Taneja et al. 2007).

7.1.2.5. Diabetes poligénica

Uno de los cambios más radicales en la pasada década fue el reconocimiento de los genes que reducen la función de las células Beta, siendo este el problema clave en la DM2. Actualmente se han identificado a más de 40 genes involucrados con el aumento de riesgo de DM2. El gen más importante identificado para la susceptibilidad de la diabetes es el TCF7L2, con el cual el riesgo de diabetes incrementa un 1.7 veces más. Genes del genoma completo

(GWAS) están implicados en la regulación del ciclo celular, y por lo tanto es sugerido que van a actuar influyendo en la cantidad de células Beta durante el desarrollo. Esto no está completamente entendido porque se ve disminuida la capacidad de las células Beta pancreáticas predisponiendo a la DM2 por la reducción de la capacidad para hacerle frente con el incremento de la demanda de insulina, como la que es impuesta por la edad y/u obesidad. Los efectos funcionales de otros genes no están muy entendidos. El transportador de zinc *Znt8 (SLC30A8)* es necesario para la entrada del zinc dentro de los gránulos de insulina y la formación del Complejo-Zn de cristales de insulina. *KCNQ1* codifica el canal K voltaje-sensitivo, una mutación en esta función podría conllevar a una reducción de la duración del potencial de acción y de ese modo la secreción de insulina. Un polimorfismo común en *Kir6.2 (E23K)* predispone a DM2. El riesgo a padecer la enfermedad es menor del 1.2 veces más aproximadamente. Tomando esto en consideración, los genes GWAS en conjunto explican del 5-10% de DM2 (Ashcroft and Rorsman 2012).

7.1.2.6. Diabetes mellitus tipo II

La DM2, también conocida como no-insulino-independiente o diabetes de los adultos. Estos individuos tienen resistencia a la insulina y usualmente tienen una relativa (no absoluta) deficiencia de insulina al menos inicialmente, y con frecuencia durante toda su vida. Estas personas no necesitan tratamiento de insulina para sobrevivir. La mayoría de los pacientes con esta forma de diabetes están obesos, y la obesidad por sí misma causa cierta resistencia a la insulina (American Diabetes 2012). La obesidad incrementa la masa tisular de adipocitos y está asociada con resistencia a la insulina, hiperglicemia, dislipidemia, hipertensión y otros componentes del síndrome metabólico (Sell and Eckel 2009). La inflamación es un componente de la obesidad asociado a la resistencia a la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

insulina. Los macrófagos están presentes en una mayor cantidad en el tejido adiposo de sujetos con obesidad que en sujetos delgados y parecen ser fuente de mediadores inflamatorios que están vinculados a la resistencia a la insulina, como TNF- α y IL-6.

La obesidad induce la insulino-resistencia en solo tres blancos tisulares, resultando en la reducción de la glucosa estimulada por la insulina en el músculo, deterioro de la supresión de la producción de glucosa en el hígado, y el incremento de ácidos grasos liberados del adipocito (Olefsky and Glass 2010). Pacientes que no están obesos en criterios del peso tradicional, pueden tener un mayor porcentaje de grasa corporal distribuida predominantemente en el abdomen. La cetoacidosis ocurre espontáneamente en este tipo de diabetes. Cuando ocurre, va acompañada generalmente por una infección. Estos pacientes pueden tener los niveles de insulina normales o elevados. Los niveles elevados de glucosa en sangre suponen un aumento en la secreción de insulina ya que la función Beta celular es normal. Por lo tanto, la secreción de insulina es deficiente en estos pacientes e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina. Esto puede mejorar con la reducción de peso y/o el tratamiento farmacológico para la hiperglucemia, aunque rara vez es restaurado a valores normales. El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. Se produce con mayor frecuencia en las mujeres con *Diabetes mellitus* gestacional previa y en individuos con hipertensión o dislipidemia, y su frecuencia varía en diferentes subgrupos raciales (American Diabetes 2012).

Recientemente, estudios en Asia encontraron que los pacientes con el polimorfismo rs7903146 variante de TCF7L2 el cual va a codificar un factor de transcripción que juega un papel en la vía de señalización Wnt, tienen mayor prevalencia de complicaciones diabéticas como enfermedades de arterias coronarias, retinopatías, neuropatías y nefropatías (Sousa, Marquezine et al. 2009). La distribución de esta patología está en aumento día con día.

8. Antecedentes

8.1. Patogenia de la DM2

Pacientes con DM2 manifiestan anomalías en la acción de la insulina y en su secreción. Está ampliamente aceptado que la resistencia a la insulina es un hallazgo temprano, evidencia posterior a la hiperglucemia y un subsecuente desarrollo a la diabetes (Pratley and Weyer 2001).

Se tiene evidencia importante que involucran trastornos en el metabolismo de los adipocitos y alteración en la topografía grasa sobre la patogénesis de la intolerancia a la glucosa dentro de la DM2 (Figura 1). Resumiéndose en 3 importantes puntos: 1) Los adipocitos son resistentes al efecto de la insulina, causando niveles elevados ácidos grasos libres (FFA) en plasma. Niveles elevados en plasma de FFA estimulan la glucogénesis, induce la resistencia a la insulina muscular/hepática. La ineficiente secreción de insulina es una predisposición genética individual. Esos FFA inducen trastornos que son referidos como citotoxicidad. 2) Adipocitos disfuncionales producen una excesiva cantidad de resistencia a la insulina, inflamación, y arteroesclerosis provocando citocinas y fallo en la cantidad de adipocitocinas sensibles a la insulina. 3) Alargados adipocitos son resistentes a la insulina y tienen una capacidad disminuida en el acúmulo de grasa. Cuando la capacidad de almacenamiento es excedida, los lípidos se acumulan dentro del músculo, hígado y a veces en las células Beta, causando resistencia a la insulina muscular/hepática y la secreción deficiente de insulina. La fisiopatología de la intolerancia a glucosa de la DM2 es compleja y envuelve factores genéticos como los mencionados en párrafos anteriores, y adquiridos. Acerca de los factores adquiridos, la ganancia de peso y la inactividad física son los de mayor importancia (Bays, Mandarinó et al. 2004).

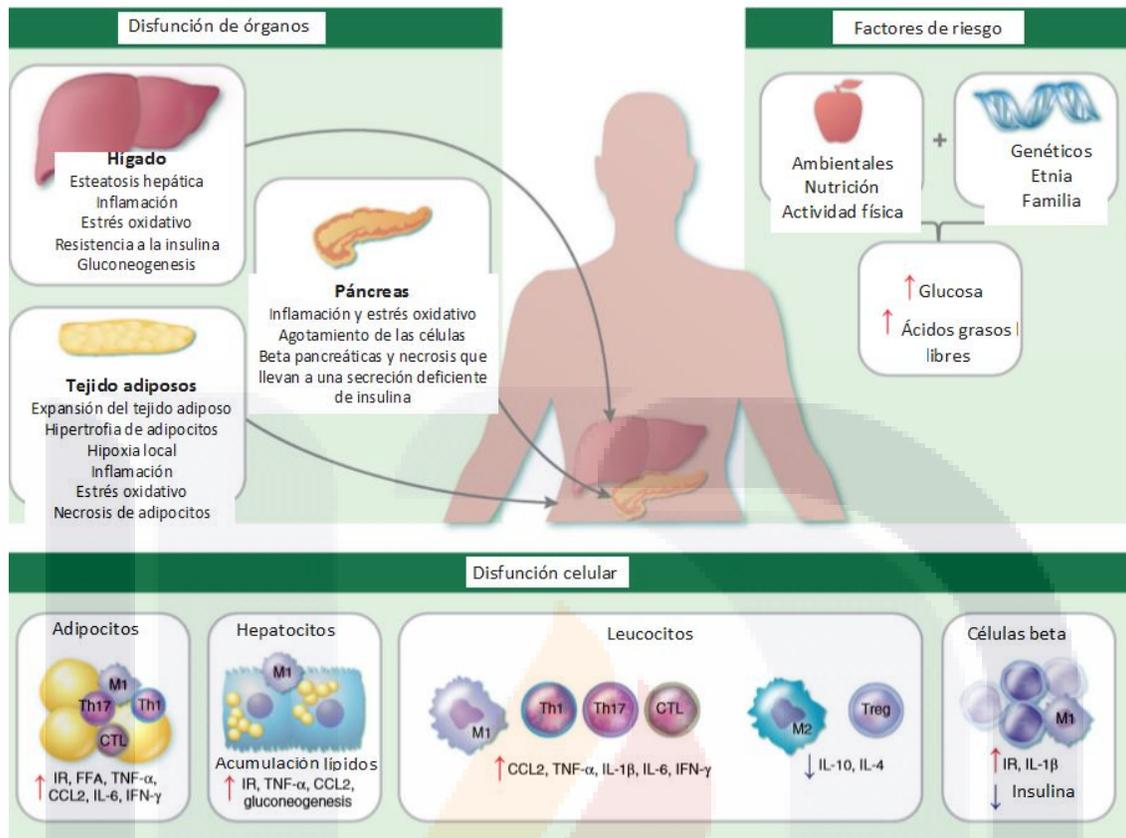


Figura 1. Mecanismos patogénicos de DM2. El consumo excesivo de carbohidratos y ácidos grasos saturados, combinados con la predisposición genética, conllevan a la pérdida de la homeostasis de lípidos y glucosa. Esto está asociado con anomalías metabólicas, que incluyen el incremento de la resistencia a la insulina, lipólisis y la gluconeogénesis hepática, esto contribuye en los niveles de glucosa y FFA en sangre que van a afectar diferentes órganos. La inflamación y el estrés oxidativo inducido por FFA y la glicación lleva al reclutamiento de macrófagos M1, células Th1, Th17 y CD8+ citotóxicas, y a una disminución en las células anti-inflamatorias macrófagos M2, células Th2 y T reguladoras. Esta inflamación crónica exacerba la resistencia a la insulina, el daño a las células Beta y complicaciones del paciente diabético. Factor de necrosis tisular alfa (TNF-α), Citocina quimioatrayente de monocitos 1 (CCL2), Interleucina 1 beta (IL-1β), Interleucina 6 (IL-6), Interferón gamma (INF-γ), Interleucina 10 (IL-10), Ácidos grasos libres (FFA), Receptor de insulina (IR), Interleucina 4 (IL-4). Modificado de: (Hodgson, Morris et al. 2015).

8.1.1. Epidemiología de *Diabetes mellitus* tipo II

Las condiciones sociales, el proceso de urbanización de los últimos 50 años, han condicionado el incremento de la incidencia y prevalencia de las enfermedades crónico degenerativas (Olvera 2000).

El incremento del número de adultos mayores en la población general, es consecuencia de la disminución de su morbilidad, mortalidad y tasa de la natalidad, debido a los avances médicos, tecnológicos y socioeconómicos. En la actualidad la población mundial de personas mayores a sesenta años en las regiones en desarrollo, es del 7% y para el 2025 se estima que será del 12% (Alfaro, Carothers et al. 2006).

La DM2 compromete al 90% de la población con diabetes alrededor del mundo (OMS 2014). En 2012, la OMS estimó que más de 371 millones de habitantes vivían con esta enfermedad y que 4.8 millones de personas mueren por su causa (SSA 2013). En 2012 la diabetes fue la causa directa de 1.5 millones de muertes y más del 80% ocurrió en zonas de bajos y medios recursos. (OMS 2014). A nivel mundial se espera que para el año 2030 el número de personas diabéticas se incremente a 439 millones, lo que representa el 7.7% de la población adulta (SSA 2013) .

En la mayoría de los países de Latinoamérica la tasa anual de la población mayor a 60 años es del 3-4%, mientras que Estados Unidos no pasa el 0.5%. La prevalencia de DM2 en menores de 30 años es menor del 5% y después de los 60 sube a más del 20%. La DM2 se diagnostica tarde. Alrededor de un 30-50% de las personas desconocen su enfermedad por meses o años (esto ocurre casi el 100% en zonas rurales) y en los estudios de sujetos con DM2 recién diagnosticada, la prevalencia de retinopatía oscila entre 16 y 21%, la de nefropatía entre 12 y 23% y la de neuropatía entre 25 y 40%. La DM2 ocupa uno de los primeros 10 lugares como causa de consulta y de mortalidad en la población adulta (ALAD 2006).

En México a nivel nacional durante 2001, 9 de cada 100 personas no aseguradas que se realizaron la prueba de la diabetes salió positiva. Este mismo año, el estado

de Morelos fue quien presentó el mayor número de casos nuevos siendo 655 hombres y 746 mujeres por cada 100 mil personas de cada sexo. En México la incidencia de esta enfermedad se incrementa con la edad, con la población de 60-64 años presentando la más alta incidencia en 2011 (1 788 por cada 100 mil habitantes del grupo de la misma edad). Las defunciones por diabetes se concentran en la de tipo II. En 2011 representaron 62% en mujeres y 61% en varones (INEGI 2013).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2012, la DM2 se encuentra entre las primeras causas de muerte en México, 6.4 millones de personas refirieron haber sido diagnosticadas con diabetes. La proporción de adultos con diagnóstico previo de diabetes es de 9.2% (ENSANUT 2000 fue de 4.6%; ENSANUT 2006 fue de 7.3%). La cifra de diagnóstico previo aumenta después de los 50 años. Los estados con prevalencias más altas son: Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí. Representa un gasto de 3,430 millones de dólares al año en su atención y complicaciones. El incremento en actividad física, dieta adecuada y reducción de peso, disminuyen el riesgo de desarrollar diabetes entre 34% y 43%, efecto que puede durar de 10 a 20 años después de concluida la intervención (ENSANUT 2012).

A pesar de que la mortalidad entre las personas diagnosticadas con DM2 está disminuyendo debido a la atención médica que reciben, esta sigue siendo alta. Cabe mencionar que si bien la disminución de la mortalidad significa un aumento en la longevidad, no conduce necesariamente a un aumento del número de años saludables en la vida de una persona, ya que estos pacientes presentan una disminución en su calidad de vida y un aumento en el uso de los servicios de salud a largo plazo. La Federación Internacional de Diabetes (IFD, por sus siglas en inglés), reportó en el año 2012 un gasto sanitario de 471 miles de millones dólares estadounidenses (USD) (SSA 2013).

Por otro lado, las complicaciones crónicas de la DM2 representan la primera causa de mortalidad general. Cuando un paciente es diagnosticado con DM2, ya han pasado varios años desde el inicio de la enfermedad, que pasa por un

periodo latente o silencioso desde el punto de vista clínico, pero no micro o macrovascular. Además, el gasto que representa para el sistema de salud nacional es muy alto. En México, para el año 2010 se había proyectado un costo directo anual (medicamentos, consultas, hospitalizaciones y tratamiento de complicaciones) en la atención de pacientes con DM2, tanto en instituciones de salud pública como de seguridad privada, de \$343, 226,541 (USD); y costos indirectos (mortalidad, discapacidad temporal y permanente) de USD \$435,200,934, para un gran total de USD \$778,427,4755 (Salmón, Sánchez-Reyes et al. 2011).

8.1.2. Principales tratamientos en DM2

En la estrategia para el tratamiento de DM2 en pacientes, es importante recordar que la intolerancia a la glucosa no ocurre de manera aislada sino que es parte de un complejo síndrome metabólico-cardiovascular que incluye dislipidemia, hipertensión, obesidad, anomalías en la coagulación, microalbuminuria y acelerada arteroesclerosis, aunque no todos ocurren en pacientes diabéticos (DeFronzo 1999).

Cómo la resistencia a la insulina conduce a la hiperglicemia e hiperlipidemia es una compleja cuestión por su importancia clínica. El tratamiento para el hígado graso está pobremente establecido, pero drogas que mejoran la sensibilidad hepática de la insulina y la tolerancia a la glucosa, incluyen la metformina (N, N-di-methylimidodicarbonimidico diamida), sulfonilureas, thiazlidenediones, insulinas, inhibidor de dipeptidyl peptidasa-4 y gliburida. (White 2009).

8.1.2.1. Insulina

Algunos diabetólogos prefieren iniciar la terapia con insulina en pacientes con el diagnóstico reciente de DM2. Numerosos estudios han demostrado que se puede lograr un excelente control glucémico con una terapia intensiva en pacientes con DM tipo 2. El régimen utilizado más comúnmente en los pacientes diabéticos consiste en una dosis única de 80 U/d, la cual rara vez es excedida (DeFronzo 1999). La insulina juega un rol clave en el control de la hiperglicemia. Se han tenido varios avances en las formas de aplicación de la insulina, siendo el más utilizado la aplicación subcutánea. Actualmente los sistemas de administración de insulina disponibles incluyen jeringas de insulina, bombas de infusión, inyectores de chorro, y plumas.

El principal inconveniente de la terapia con insulina es su naturaleza invasiva, por lo que se estudian diferentes formas de aplicación que incluyen insulina en inhaladores y spray bucales entre otros (Shahani and Shahani 2015). Para 2009 los pacientes tratados con insulina en México era notablemente menor comparado con otros países (5 vs 20%). La insulina es indicada de forma tardía, la dosis no es modificada con la frecuencia debida, tomando en cuenta la alimentación, actividad física y el estatus del paciente. Por ende, su empleo inadecuado es causa de hipoglucemias frecuentes, aumento de peso y persistencia de la hiperglucemia (Endocrinología 2009). Actualmente los criterios más usados para elegir la insulina como tratamiento son, que el paciente no haya logrado un control de la glicemia con dos o más hipoglucemiantes orales, cuando los niveles en plasma de glucosa sean mayores que 250 mg/dl , los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) sean mayores del 10% y/o síntomas de hiperglicemia (Wallia and Molitch 2014).

8.1.2.1.1. Mecanismo de acción

La insulina es la hormona anabólica más potente identificada hasta la fecha. Como otras hormonas la insulina hace sus efectos entrando en contacto con su receptor específico, dando una señalización para diferentes rutas (Figura 2). Esta unión con el sitio específico inicia con una cascada intracelular de señalización, causando cambios en el transporte de la glucosa, glucógeno, la síntesis de lípidos y la expresión específica de genes. Durante el estímulo de la insulina, esta se va a unir a su receptor y va a dar señalización a IRS (sustrato de receptor de la insulina) lo cual vuelve activo a fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3) en asociación con la vía Ras-MAPK se va a activar el transporte de la glucosa a partir del GLUT-4 (Fulop, Larbi et al. 2003).

Los GLUT (transportadores de glucosa) son conocidos por su papel primordial dentro del metabolismo de energía. Existen 6 isoformas identificadas de GLUT en los eucariotas. Poseen 12 segmentos transmembranales helicoidales con las regiones N- y C-terminales y un lazo central expuestos hacia el citoplasma. Tienen diferentes regiones C-terminales, y están sujetos a diferentes metabolitos y regulaciones de desarrollo. GLUT 2 es expresado principalmente dentro de las células Beta pancreáticas, hígado y membranas de los enterocitos. GLUT 4 está encontrado en los tejidos sensibles a la insulina, como en el tejido hepático, adiposo, cardiaco y del musculo esquelético. GLUT-5 es actualmente un transportador de fructosa detectado dentro de los enterocitos en la membrana luminal, adipocitos, musculo esquelético y esperma. GLUT 6 está localizado en los microsomas del hígado (Broydell, Mazzuca et al. 1998).

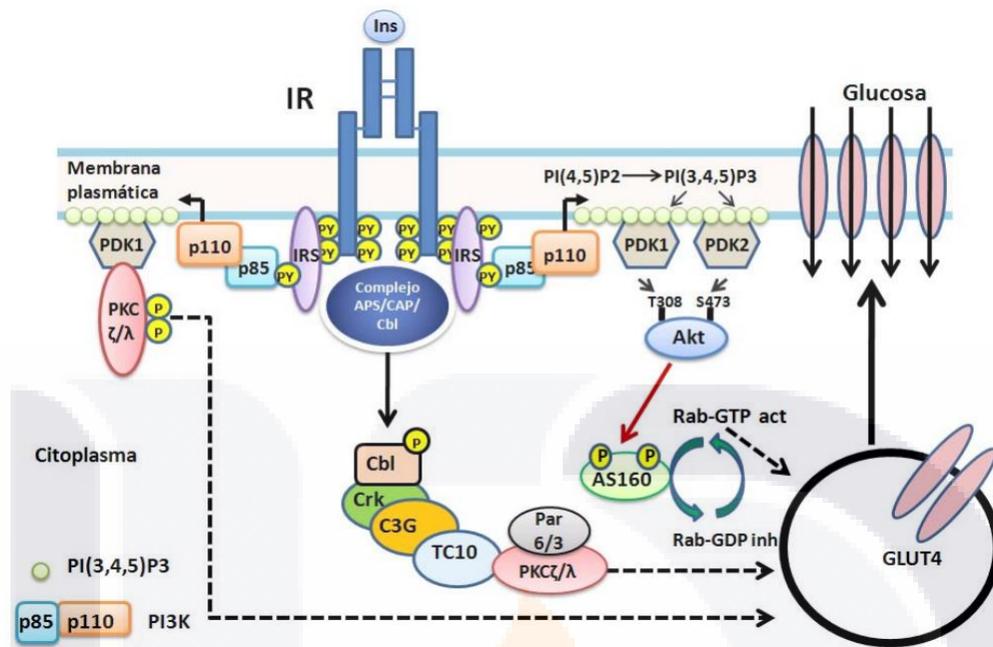


Figura 2. Mecanismo acción de insulina. La insulina promueve la translocación del transportador GLUT4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática. La proteína AS160 en su estado no fosforilado y activo regula negativamente a las proteínas G pequeñas Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4. AS160 estimula la hidrólisis del GTP unido a las Rab (generando Rab-GDP, inactivo) e inhibiendo el tráfico vesicular. Cuando AS160 es fosforilada por Akt se inhibe, por lo que se incrementa el tráfico-dependiente de Rab-GTP (activo) de GLUT4 a la membrana plasmática. Por otra parte, Piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) induce también la fosforilación de sitios críticos en el asa de activación de dos formas atípicas de la Proteín quinasa C (PKC) (PKCλ/ξ), que contribuyen de manera significativa a la translocación de GLUT4 inducida por la insulina. Recientemente se describió un modelo alternativo independiente de PI3K/PDK1/Akt, mediante el cual la unión de insulina a su receptor activa la proteína G pequeña TC10 vía el complejo de Proteína adaptadora que contiene dominios de homología a pleckstrina (APS)/Proteína asociada a Cbl (CAP)/Cbl. TC10 participa en la activación de las PKC-λ/ξ que produce la translocación de GLUT4 (Reyes and Plancarte)

8.1.2.1.2. Farmacocinética

La insulina regular de corta acción es presentada como una solución que forma hexámeros. Su acción inicia a los 15-30 minutos de aplicación posterior a la inyección subcutánea. Las concentraciones en plasma llegan a un pico después de 1-2 horas y va decayendo a las 4-8 horas.

Insulina glargine (análogo de larga duración), es producido por la sustitución de asparagina con glicina en la posición A21 y por la adición de 2 moléculas de arginina en las posiciones B31 y B32 de las moléculas de insulina humana. Posterior a su aplicación subcutánea, su rango de absorción provee niveles constantes en plasma por al menos 24 horas. Su media para iniciar su acción es de 1.5 horas, el efecto metabólico aumenta a una meseta en las primeras 4 horas y se mantiene constante al menos hasta las 24 horas (Guerci and Sauvanet 2005).

La insulina degludec (IDeg) es una nueva generación de insulina basal con una ultra larga duración de acción. En la inyección subcutánea, IDeg forma largas cadenas de multihexámeros que resultan en el depósito dentro del tejido celular, donde los monómeros son gradualmente separados. Esta insulina tiene una absorción baja y continua dentro de la circulación, dando un efecto largo y estable en la disminución de la glucosa. Esta presenta una acción que supera las 42 horas y una vida media aproximada de 2.5 horas, lo cual es lo doble para la insulina glargina (Hompeesch, Morrow et al. 2014).

8.1.2.1.3. Efectos clínicos

La terapia con insulina está asociada con grandes beneficios metabólicos que incluyen la mejora en la sensibilidad a la insulina, disminuye la producción nocturna de glucosa, disminuye los niveles postprandiales de glucosa en sangre y mejora los niveles lipídicos. Sin embargo, dosis extensas de insulina requieren que el organismo alcance los niveles normales en sangre de glucosa y está asociado con la ganancias de peso y el riesgo de hipoglucemia (Strowig, Aviles-Santa et al. 2002).

8.1.2.2. Metformina

La metformina es una biguanida que aumenta la sensibilidad periférica y hepática de la insulina, mejora el perfil glucémico en ayunas y postprandial (Calvo, Esteban et al. 2005). Es considerada como una terapia farmacológica dentro de la DM2. Esta recomendación fue recientemente confirmada por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Asociación Europea para el estudio de la diabetes (EASD) (Scheen and Paquot 2013). Es una droga prescrita al menos a 120 millones de personas alrededor del mundo (Viollet and Foretz 2013).

8.1.2.2.1. Mecanismo de acción

Desde hace años se ha tratado de demostrar que la molécula objetivo de la metformina es la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). La activación de la AMPK requiere fosforilación en Thr172 con la activación de la subunidad catalítica por cinasas. La AMPK activada cambia las células de un estado anabólico a un estado catabólico, bajando el ATP consumido por vías sintéticas y restableciendo el balance de energía. Esta regulación envuelve la fosforilación por el AMPK como la clave de enzimas metabólicas y la transcripción de factores/cofactores que modulan la expresión genética. Como resultado, la síntesis de lípidos y proteínas, así como el crecimiento celular son inhibidos mientras que la oxidación de ácidos grasos y la absorción de la glucosa son estimuladas. El entendimiento del mecanismo de la metformina es complicado. Estudios recientes establecen que la actividad de ambas proteína quinasa treonina/serina (LKB1) y AMPK son indispensables para la inhibición de salida de glucosa o la glucogénesis (Viollet and Foretz 2013). El principal efecto de la metformina es por inhibición de complejo 1 de la cadena respiratoria mitocondrial que conlleva a un estrés energético disminuyendo los niveles de ATP. Esto es por

8.1.2.2.3. Farmacocinética

Después de la administración oral la metformina es absorbida lentamente. La absorción es aparentemente completada 6 horas posteriores a la toma del fármaco. Esta es rápidamente distribuida y no se une a proteínas plasmáticas. La eliminación después de la administración oral es de aproximadamente 4.0 a 8.7 horas. Es eliminada completamente por el hígado, no sufre biotransformación hepática ni excreción biliar. La metformina pasa a través de la membrana plasmática por difusión pasiva y transportadores orgánicos, tales como OCT1, 2 y 3, los cuales han demostrado su importancia en el transporte de la metformina en el intestino, hígado y riñones (Viollet and Foretz 2013).

8.1.2.2.4. Efectos clínicos de la metformina

La metformina tiene sus ventajas y es el único en evitar el aumento de peso asociado con otros tratamientos farmacológicos de la DM2. Se ha demostrado que reduce los niveles de glucosa en la sangre por sensibilizar al hígado a los efectos de la insulina, suprimiendo la producción hepática de glucosa. También promueve la utilización de la glucosa. La metformina ha demostrado que baja los niveles de colesterol y triglicéridos, para reducir la hiperinsulinemia y mejorar la sensibilidad a la insulina, y para ayudar en la reducción del peso (Strowig, Aviles-Santa et al. 2002). Este aumento en la sensibilidad a la insulina puede estar causado por los posibles efectos en la expresión de los receptores de la insulina y la actividad de la Tirosina-cinasa (Viollet and Foretz 2013).

Los efectos secundarios que se pueden observar están asociados con desordenes gastrointestinales principalmente, dolor abdominal, náuseas, vómito y diarrea, lo cual ocurre en un 20-30% de los pacientes. Raramente la metformina causa acidosis láctica y el riesgo de muerte es menor a 0.015 casos por 1000 pacientes al año (Wang, Ni et al. 2013). El riesgo de acidosis láctica ha sido el principal freno

a la utilización de este fármaco, a pesar de estar disponible desde 1957. Los casos reportados se han dado en pacientes con insuficiencia renal y en situaciones de hipoxemia, como el shock, en las que la mortalidad es de hasta un 50% (Cases 2008).

8.1.2.3. Glibenclamida

Mejor conocida como gliburida es una sulfonilurea oral de segunda generación que estimula la secreción en los islotes Beta pancreáticos de insulina, a través de la despolarización de la membrana celular. Ha sido demostrado que la glibenclamida es más efectiva que los agentes de primera generación y tiene un mejor perfil de seguridad (Saiiri and Moslehi 2011). Las sulfonilureas son usadas en los casos de pacientes que no responden a la metformina. Pero estas pueden poner a los pacientes en riesgo de hipoglucemia, ganancia de peso y ataques al corazón (George and Joseph 2014). En un estudio realizado en pacientes con el diagnóstico reciente de DM2 se ha observado que a los 6 meses del uso de glibenclamida no ha habido ganancia de peso significativa en comparación con la metformina y arcabosa (George and Joseph 2014).

8.1.2.3.1. Mecanismo de acción

Su mecanismo primario de acción es en la mejora de la secreción de insulina. Su acción inicia con la unión al receptor de la sulfonilurea en las células Beta pancreáticas (Figura 3). Esto cierra el canal ATP-K, que lleva al decremento de la entrada de potasio, despolarizando las membranas de las células Beta, activando el sistema del citoesqueleto que causa la translocación de los gránulos secretores hacia la superficie celular y la expulsión de insulina a partir de la exocitosis. La insulina liberada por el páncreas pasa a la vena porta. La hiperinsulinemia portal resultante suprime la tasa basal elevada de la producción de glucosa hepática. Adicionalmente, los elevados niveles arteriales de insulina mejoran la absorción de

glucosa en los músculos, llevando a una reducción en los niveles de glucosa postprandial en plasma (DeFronzo 1999).

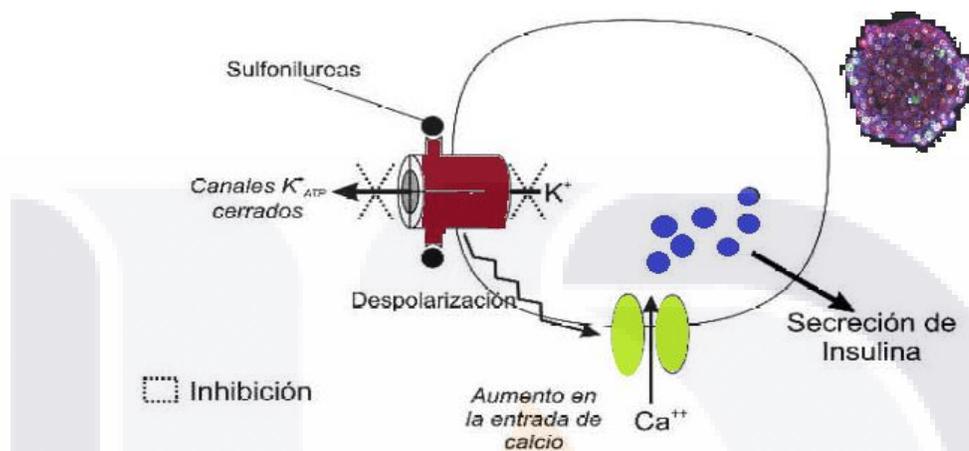


Figura 4. Mecanismo de acción de la glibenclamida. La glibenclamida se une al canal de ATP-K, causando su cierre y despolarizando la membrana, lo que libera calcio y se estimula la secreción de la insulina (Contreras, Romero et al. 2002).

8.1.2.3.2. Efectos clínicos

La potencia hipoglucémica de las sulfonilureas está directamente relacionada con la velocidad inicial de la glucosa en plasma. En algunos estudios se ha reportado que tiene efectos neutrales o benéficos en los niveles de los lípidos en plasma. Los niveles de triglicéridos en plasma disminuyen en algunos estudios. Estos efectos hipolipidémicos probablemente representan un efecto directo sobre el metabolismo de lipoproteínas de baja densidad y una acción indirecta de la droga secundaria a la reducción de los niveles de glucosa en plasma. La terapia con sulfonilureas está asociadas usualmente a ganancias de peso. Sin embargo, algunos estudios demuestran que la gliburida no está asociada con ganancias de peso (DeFronzo 1999).

Los principales tratamientos utilizados por el IMSS son descritos en la siguiente tabla.

Tabla 1. Hipoglucemiantes autorizados por el IMSS, características generales (IMSS 2012) (IMSS 2015).

Hipoglucemiante	Dosis Inicial	Dosis Máxima	Presentación	Efectos Adversos	Contraindicaciones
Insulina			Inyectado, Oral	Hipoglucemia y ganancia de peso	
metformina (biguanidas)	500 - 850 mg	2550 mg	Tabletas: 850 mg de Clorhidrato de metformina	Efectos gastrointestinales (acidez, náuseas, sabor metálico, diarrea), acidosis láctica. Interfiere en la absorción de vitamina B12	Enfermedad renal etapa 3-4 Insuficiencia hepática Insuficiencia cardíaca severa Enfermedad pulmonar obstructiva crónica Embarazo y lactancia Alcoholismo Empleo de contrastes yodados

Glibenclamid a (sulfonilurea)	5 mg	20 mg	Tabletas: Glibenclami da 5mg. Envase 50 tabletas.	Hipoglucemia Aumento de peso Alteraciones gastrointestinales Rash/hipersensibiliza ción Leucopenia	Diabetes mellitus 1 Hipersensibili dad Embarazo y lactancia Cetoacidosis diabética Alergia a sulfamidas
Arcabosa	20- 50 mg	100 mg tres veces al día	Tabletas: 50 mg, envase con 30 tabletas	Distensión abdominal, flatulencia, diarrea. El uso conjunto con antiácidos disminuye su efecto, disminuye absorción de digoxina. Hepatotoxicidad	Enfermedad renal etapa 4 Insuficiencia hepática Enfermedad inflamatoria intestinal

Tabla 2. Características de las Insulinas (IMSS 2012).

Insulinas	Inicio	Pico máximo	Duración efectiva
Ultrarrápida	5-15 m	30-90 m	<5 h
Análogo acción corta (Lispro, aspártica)	0.15-0.25	1-1.5 h	3-4.5
Rápida (regular)	30-60 m	2-3 h	4-8 h
Intermedia (NPH)	2-4 h	4-10 h	10-16 h
Análogo acción larga (Glargina)	2-4 h	No	20-.24 h
Análogo acción larga (Detemir)	-	-	24 h

8.2. Tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis (MTB) (figura 5) es uno de los patógenos más exitosos que afectan al ser humano, infectando a un tercio de la población global y matando a dos millones cada año. La habilidad de esta bacteria para persistir de manera asintomática, refiriéndose a la tuberculosis latente, es el centro de la biología de esta enfermedad (Stewart, Robertson et al. 2003). La virulencia de la combinación de tuberculosis (TB) con VIH y el riesgo de los organismos multifármaco resistentes son un problema amenazante (Hunter, Jagannath et al. 2007). Actualmente se considera que cada paciente tuberculoso infectante puede transmitir la bacteria a 20 contactos aproximadamente. El hacinamiento es uno de los factores más importantes para su transmisión. Los factores más aceptados para determinar la susceptibilidad son: el socio-económico, la edad y la predisposición genética. Entre las enfermedades que favorecen el desarrollo de la TB activa a causa de la alteración en la inmunidad tenemos a la silicosis, linfomas, leucemia y otras neoplasias malignas, hemofilia, insuficiencia renal crónica, DM y VIH/SIDA (Rivas-Santiago, Vieyra-Reyes et al. 2005).

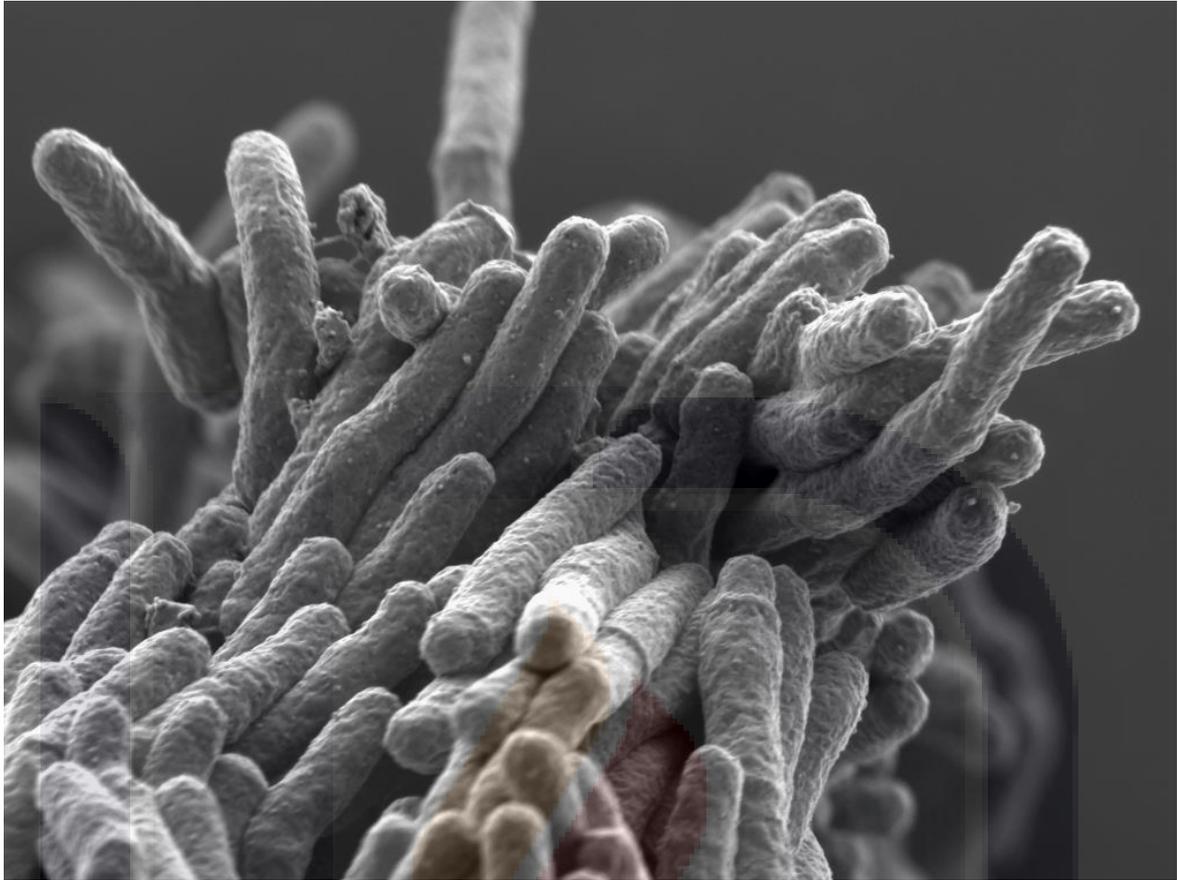


Figura 5. *Mycobacterium tuberculosis*. Es una bacteria ácido-alcohol resistente, frecuentemente incolora y aerobia estricta, Stewart Cole/EPFL (Alvin 2016).

MTB puede infectar a la mayoría de los mamíferos y su existencia continua depende de la transmisión que se da entre humanos (Hunter 2011). MTB es una bacteria intracelular que se ha adaptado a su hospedero el humano gracias a su habilidad para sobrevivir dentro de los fagocitos mononucleares. Estas células pueden limitar a la micobacteria intracelularmente solo bajo ciertas circunstancias. La habilidad para sobrevivir dentro del fagocito tal vez depende de la estrategia que usa para entrar a la célula del hospedero, i.e. la interacción receptor-ligando que esta mediada por la fagocitosis (Gomez, Twahirwa et al. 2013). En individuos resistentes, el control de la infección que se localiza en la región alveolar requiere principalmente del desarrollo de una respuesta de inmunidad celular del tipo Th1. En la cual participan macrófagos alveolares, linfocitos T CD4+ y CD8+, principalmente los linfocitos T $\gamma\delta$ y citocinas como

interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN- γ), interleucina 12 (IL-12), interleucina 18 (IL-18) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Se incluyen también quimiocinas como: Regulado en la activación Normal de las células T expresan y secretan (RANTES), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α) e IL-8 que juegan un papel importante en la migración de diferentes células hacia el sitio de infección para la formación del granuloma. Cabe mencionar la importancia de las células natural killer (NK), y de las células epiteliales como adjuntos de la respuesta inmunológica innata (Rivas-Santiago, Vieyra-Reyes et al. 2005).

MTB ha evolucionado a un complejo ciclo de vida que persiste de manera indefinida dentro de las comunidades. Este ciclo incluye dos distintos tipos de infección: TB primaria y postprimaria (Figura 6), agregándose a este tipo de tuberculosis la latente, la cual puede presentar periodos prolongados de inactividad. La típica infección inicia con la TB primaria que llega espontáneamente con la evolución de una respuesta inmune. Posterior a 10-30 años, el microorganismo puede emerger de su latencia para evolucionar a la TB postprimaria (aunque esto va a depender del estado en el que se encuentre el sistema inmune del sujeto) que produce cavidades dentro de los pulmones que apoya la proliferación de masivos números de organismos que están siendo expulsados dentro de la viremia para facilitar la transmisión a nuevos hospederos. Este tipo de TB se puede diseminar a cualquier órgano una vez que está en sangre. Los signos serán dependientes del órgano en cual sea diseminada la micobacteria. Los que son infectados más comúnmente son los nódulos linfáticos y pleura. La tuberculosis postprimaria o secundaria, también es conocida como de los adultos o secundaria, está presentación ocurre en personas que han desarrollado inmunidad para la tuberculosis primaria. La tuberculosis primaria normalmente está restringida solamente a los lóbulos superiores de los pulmones y no va hacia los ganglios linfáticos ni otros órganos (Hunter 2011).

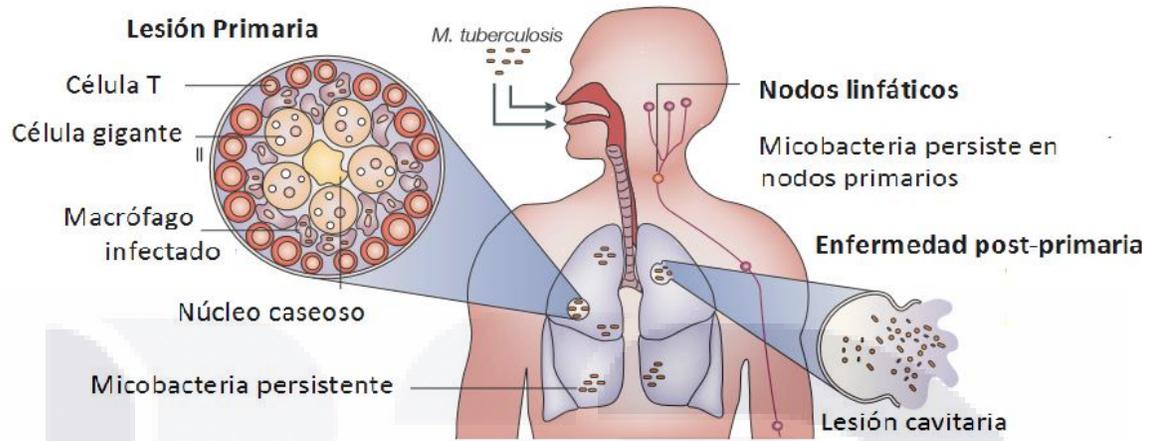


Figura 6. Persistencia de tuberculosis. La micobacteria puede estar alojada en un granuloma en el área pulmonar (lesión primaria). Cuando esta se disemina a torrente sanguíneo causando una lesión cavitaria es conocida como post-primaria. Modificado de: (Stewart, Robertson et al. 2003).

La tuberculosis pulmonar es la principal forma de la enfermedad ya que MTB entra a través de las vías aéreas y se establece mayoritariamente en los pulmones, debido a su naturaleza aerobia estricta. (Rivas-Santiago, Vieyra-Reyes et al. 2005). Los pacientes con tuberculosis activa pulmonar se pueden mantener asintomáticos con tos leve o seca progresiva, o presentar múltiples síntomas, que incluyen fiebre, fatiga, pérdida de peso, sudoración nocturna y tos que produce esputo con sangre (Jeong and Lee 2008). La progresión de la infección depende de la capacidad del sistema inmunológico de cada paciente para contener o eliminar al bacilo (Marino and Kirschner 2004).

8.2.1. Epidemiología de la tuberculosis

La TB sigue siendo un importante problema sanitario a escala mundial (OMS 2013). En 2014 se presentaron 9.6 millones de nuevos casos de tuberculosis: 5.4 millones son hombres, 3.2 millones mujeres y 1 millón de niños. Se reportan 1.5 millones de muertes por causa de esta enfermedad (1.1 millones aproximadamente negativos a VIH y 0.4 millones positivos a VIH). El número de muertes es inaceptablemente alto: con el diagnóstico temprano y el tratamiento correcto, la mayoría de las personas con esta enfermedad pueden ser curadas (WHO. 2015).

La TB es la segunda causa mundial de mortalidad, después del VIH. Más del 95% de las muertes por tuberculosis ocurrieron en países donde la población de ingresos bajos y medianos predomina. TB es una de las cinco causas principales de muerte en las mujeres entre los 15 y los 44 años. Se calcula que 480 000 personas desarrollaron TB multirresistente a nivel mundial en 2013. El número aproximado de personas que enferman de TB cada año está disminuyendo aunque muy despacio. La tasa de mortalidad por tuberculosis disminuyó un 45% entre 1990 y 2013 (OMS 2015).

En 2013 en México se reportaron 21,381 nuevos casos de tuberculosis. Siendo el 81.7 % pulmonar, 5.3 % ganglionar, 1.4 % meníngea y el 11.7 % en otras formas. En 2007 se presentó un 83.6 % de éxito terapéutico y al 2013 este aumentó en un 87.1%. Doscientos veinticinco casos con farmacoresistencia, 20.9% asociados con DM2, 5.6% en relación TB/VIH, 8.4 % casos pediátricos (<19 años) y 1761 defunciones por TB pulmonar (SINAVE 2012). La tasa de defunción para 1990 fue del 7.4 %, en 2000 está disminuyó al 3.3% y en 2012 presentamos una tasa del 1.9%. La tendencia de la prevalencia de TB/DM nos presenta del 2000-2013 un incremento del 177% (SSA 2013).

Se estima que 8 billones de dólares US son requeridos para tener una respuesta completa contra la epidemia de TB: aproximadamente dos tercios para la

detección y tratamiento de TB susceptibles a las drogas, 20% para el tratamiento de TB multidrogo resistente, 10% para el diagnóstico por TEST rápidos y asociados a estudios de laboratorio, y 5% para la colaboración VIH/TB. Esta cantidad excluye lo requerido para la búsqueda y el desarrollo de nuevos diagnósticos para la TB, fármacos y vacunas, que se estima en 2 billones de dólares US por año. Basados en reportes de 122 países que acumulan el 95% de los casos reportados, el financiamiento para la prevención, diagnóstico y tratamiento osciló en 6.3 billones de dólares US en 2014. Esto dejó una brecha de al menos 2 billones de dólares US por año comparado con los 8 billones requeridos. Brasil, Rusia, India, China y Sudáfrica, cada uno colectivamente llegan a superar el 50% de los casos a nivel mundial. El costo por paciente tratado por TB susceptibles a las drogas es de 100-500 dólares US en los países con un alto índice de TB. El costo de paciente tratado por TB multidrogo resistente tiene un costo de 9,235 dólares US en países de bajos ingresos y 48, 553 dólares US en países que están arriba de la media (OMS 2014).

8.2.2. DM2 y tuberculosis

En lugares donde se encuentra la población con mayor incidencia o casos ya reportados con signos de TB, es prioritario realizar pruebas para el diagnóstico de DM2. El nivel de población se incrementó enormemente entre 1990 y 2000, se ha observado substancialmente que los lugares donde se tiene un incremento en la incidencia de TB también se tiene un aumento en los casos de DM2 (Goldhaber-Fiebert, Jeon et al. 2011).

Recientemente se ha visto que la población con diabetes tienen aproximadamente 3 veces más probabilidades de desarrollar TB activa (Koo 2013) . El mecanismo directo no ha sido claramente descrito, la reducción en la inmunidad dentro de los pacientes diabéticos debe jugar un rol importante en el riesgo de esta enfermedad: personas con diabetes presentan una reducción en la quimiotaxis y en el potencial de destrucción oxidativa en comparación de los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

controles no diabéticos. Estudios en modelos animales mostraron que el diabético infectado con MTB tiene una mayor carga bacteriana, y reduce la respuesta de las células T, en comparación de los ratones control. La hiperglucemia está asociada con la baja producción de IFN- γ e IL-12 y los niveles del IFN- γ son negativamente correlativos con los niveles de hemoglobina glicosada (HbA1c) (Koo 2013).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) no son la única arma clave usada por los leucocitos fagocitarios para matar los microorganismos pero también sirven como mediadores para coordinar la respuesta inmunológica innata y adaptativa. Estudios recientes han demostrado que los ROS regulan importantes funciones en los macrófagos incluyendo la apoptosis, autofagocitosis, y producción de quimiocinas durante la infección por MTB y puede afectar la evolución de la inmunidad de las células T contra MTB. La producción de ROS por los leucocitos puede ser abundante y jugar un rol central en la defensa contra la TB dentro de los tejidos infectados. El inflammasoma está conformado de complejos multiprotéicos responsables de la activación de la caspasa-1 y el subsecuente proceso proteolítico y la secreción de la IL-1 β (Chao, Yen et al. 2015). En una reciente investigación se encontró que la resistina sérica está presente en niveles mayores en TB severa y en pacientes con diabetes. Está inhibe la producción de ROS por NADPH oxidasa y puede suprimir la actividad del inflammasoma en los macrófagos humanos. Estos hallazgos proveen un nuevo mecanismo de la debilitada defensa inmune contra la micobacteria y sugiere que enfoques terapéuticos nos pueden disminuir la resistina y así posiblemente revertir el estado de inmunodeficiencia dentro de los pacientes DM2 (Chao, Yen et al. 2015).

8.2.2.1. Relación epidemiológica entre DM2 y TB

Los pacientes con DM2 tienen mayor riesgo de TB (Arnold, Licea et al. 2012). La mortalidad es mayor en pacientes con TB y DM2, que sin DM2, particularmente en el primer mes de tratamiento (Dooley, Tang et al. 2009). La comorbilidad que se tiene entre TB y DM2 se ha estado describiendo desde principios del siglo XX, ya que en los países desarrollados que han pasado de una disminución de las enfermedades infecciosas a un incremento en enfermedades no transmisibles, la tendencia que se ha estado observando es el aumento de estas dos enfermedades en co-morbilidad (Ugarte-Gil and Moore 2014). Los factores más comúnmente relacionados con esta comorbilidad son la baja o nula educación, la relación con el sexo masculino, el bajo estatus socio económico, la desnutrición, el sobrepeso y el escaso control de los niveles de glucosa. (Perez-Navarro, Fuentes-Dominguez et al. 2015).

Hispanos, especialmente mexicanos, presentan altos rangos de esta comorbilidad en comparación con los no hispanos blancos. Se propone que la causa por la cual existe un mayor riesgo es el pobre control de la diabetes, por lo cual el riesgo es mayor y la comorbilidad se presenta más (Pablos-Mendez, Blustein et al. 1997).

Estudios asiáticos han presentado que la edad parece ser un factor fuerte de riesgo para la TB. La asociación es encontrada en personas menores a 40 años de edad y esta tasa disminuye en mayores de 40 años (Kuo, Lin et al. 2013).

La OMS para el 2010 reportó 8.8 millones de casos nuevos de TB: 59% en Asia, 26% en África, 7% en países del Mediterráneo 7%, 5% en Europa, 3% en América 3%. Se notificaron 5.7 millones de casos nuevos y recurrentes. Para 2011 se reportaron 15, 843 casos nuevos de TB de los cuales 20.8% estaba asociado con DM2, 7.8 % relación de TB/SIDA y 9.3% casos en Pediatría (<19 años) (figura 7) (SSA 2012).



Figura 7. Tuberculosis y sus co-morbilidades. De los nuevos casos que se presentaron en México se encontró que al menos el 63.5 % tenía una enfermedad asociada, siendo DM la que presento mayor porcentaje (20.9%) (SSA 2013).

Según los antecedentes epidemiológicos de la TB, se han reconocido grupos de población en riesgo, que por sus características han presentado desde siempre tasas de morbi-mortalidad más elevadas que otros grupos, entre ellos se ubican los adultos jóvenes, mayores de 20 años. El rápido crecimiento de la población mexicana (que ha sido gradual desde el año 1950 a la actualidad), ha sido a expensas del grupo de la población joven, por lo cual, es importante reconocerlo como un grupo vulnerable. Hasta el 2010 se tienen datos de un registro muestral del grupo de 15-59 años, correspondientes al 60.1% (SINAVE 2012).

En 2013 se presentaron 19,703 casos nuevos de TB en todas sus formas y todos los grupos de edad. El 84% del total de los casos tienen al menos una comorbilidad. Siendo el 49% DM2, 15% desnutrición, 8% alcoholismo, 6% otras, 5% usuarios de drogas, 4% hipertensión Arterial Sistémica, 3% tabaquismo, 3% SIDA y 2% de insuficiencia renal crónica (IRC) (SSA 2014). En este mismo año se realizaron 10,968 pruebas para la detección de DM en pacientes con TB, de las cuales el 21.9% salieron positivas (2,401) (SSA 2014) .

En un estudio se concluyó que la DM2 aumenta el riesgo de muerte en pacientes con TB, pero no se encontró una asociación clínicamente significativa entre DM2 y el riesgo de mortalidad por cualquier otra causa después de ajustar por edad, VIH y otros factores potenciales. Sin embargo se menciona que es necesario la realización de más estudios para ver la repercusión de los tratamientos en sus comorbilidades (Magee, Foote et al. 2014). Los casos de esta comorbilidad están creciendo, y es de suma importancia la realización de más estudios de investigación y que los países lleven un mejor control de su población para ayudar a disminuir estas cifras.

8.2.3. Inmunidad innata y adaptativa en la TB

El pulmón es un órgano que es expuesto directa y continuamente a diferentes patógenos, por lo que ha desarrollado fuertes mecanismos de defensa, que incluyen respuestas inmunes innatas y adaptativas. Barreras mecánicas, secreción de mucosas bronquiales, constituyentes antimicrobianos, así como el sistema de complemento, leucocitos y fagocitos que forman parte de la inmunidad innata. Dentro de la inmunidad adaptativa se han desarrollado diferentes mecanismos, como los que son mediados por células T, células B y los anticuerpos que son producidos (Samitas, Vittorakis et al. 2007).

Durante la infección por MTB, los macrófagos y células dendríticas juegan diferentes funciones: los macrófagos secretan citocinas proinflamatorias que inducen la respuesta inflamatoria, mientras que las células dendríticas están principalmente envueltas en la inmunomodulación del desarrollo en la inducción de células T anti-micobacteriana (figura 8) (Marino and Kirschner 2004). La fagocitosis de la bacteria es llevada a cabo por los macrófagos a través de múltiples mecanismos y se ve favorecida por el surfactante A que es producido por las células epiteliales alveolares tipo 2 ya que aumenta la interacción entre la MTB y los macrófagos.

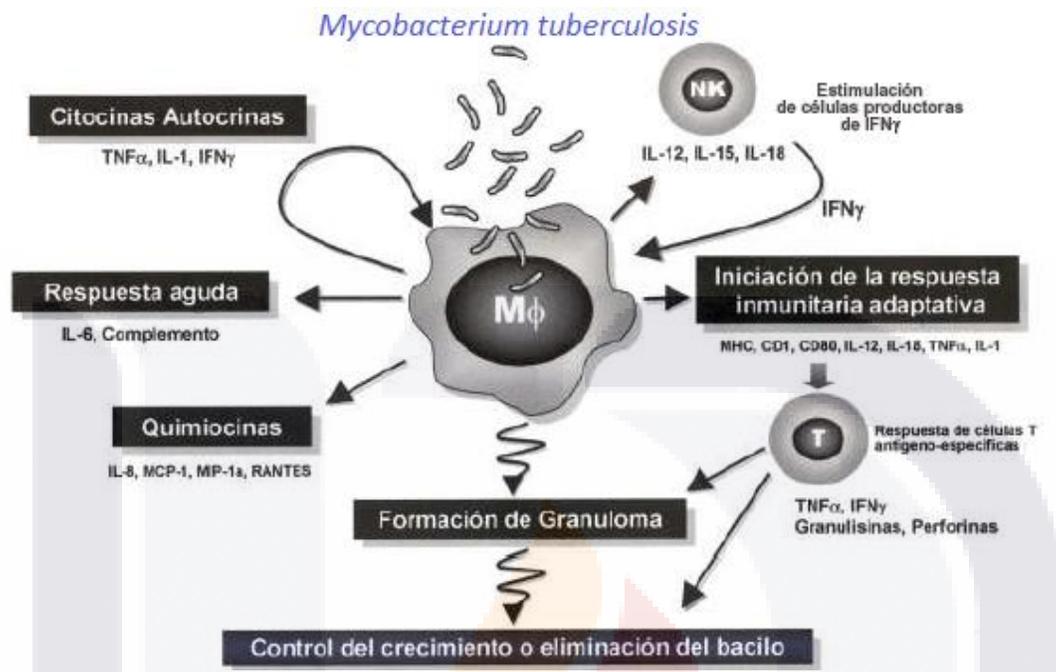


Figura 8. Respuesta inmune efectora frente a tuberculosis. Respuesta inflamatoria de los macrófagos durante la primo-infección por *Mycobacterium tuberculosis*. La micobacteria es reconocida y fagocitada, esto va a desencadenar una respuesta proinflamatoria donde las citocinas que actúan de manera autocrina o paracrina juegan el papel más importante. La producción de estas dará lugar a la activación del macrófago con la consecuente muerte del bacilo o bien su control. Esta producción de citocinas es acompañada por otro tipo de moléculas de la respuesta inmune innata tales como quimiocinas (Rivas-Santiago, Vieyra-Reyes et al. 2005).

Durante la fagocitosis, la MTB es destruida en el fagolisosoma por enzimas lisosomales y algunos de sus antígenos son procesados y presentados a linfocitos T CD4+ (en el contexto de MCH II) y CD8+ (en el contexto de MCH I), por lo que los macrófagos también funcionan como presentadoras de antígenos y pueden definir el curso que tomará la respuesta de inmunidad adaptativa, siendo este el paso de transición entre una y otra. La respuesta de inmunidad adaptativa es específica y el desarrollo de esta depende en gran medida de la respuesta de la inmunidad innata. Ha sido establecido que IL-12 es una de las citocinas que

conecta las respuestas inmunitarias innata y adaptativa contra la micobacteria, principalmente porque ejerce su efecto protector a través del IFN- γ (Rivas-Santiago, Vieyra-Reyes et al. 2005).

La presentación de los antígenos de la micobacteria por los macrófagos y células dendríticas involucra distintos mecanismos. Primero, moléculas del MHC II presenta los antígenos a las células T CD4+. Estos antígenos deben ser procesados en los compartimentos fagosomales dentro de las células presentadoras de antígenos. Segundo, las moléculas del MHC I, expresadas en todas las células nucleadas, están capacitadas para presentar las proteínas micobacterianas a las células antígeno-específicas CD8+. Tercero, moléculas tipo CD1 están capacitadas para presentar lipoproteínas micobacterianas a las células T restringidas por CD1. Este mecanismo de presentación de antígenos hace posible que una fracción de células T reaccionen en una etapa temprana de la infección, antes de que la especificidad del antígeno haya sido desarrollada. Un cuarto camino, el cual es una vía independiente involucra a las moléculas del MHC clase IB. Importantes citocinas son producidas por la activación de macrófagos y células dendríticas que son esenciales para la estimulación de linfocitos T. Macrófagos y células dendríticas producen citocinas tipo 1 (IL-12, IL-18 y IL-23). Adicionalmente, citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α las cuales tiene propiedades importantes para la estimulación de células T (van Crevel, Ottenhoff et al. 2002).

8.2.4. Inmunidad innata y adaptativa disfuncional frente a MBT en pacientes con DM

El enfoque que se ha dado desde una perspectiva inmunológica para identificar las diferencias inmunes entre pacientes con DM2, TB y DM2-TB ha sido arrojada mediante varios estudios (figura 9) (Stew, Martinez et al. 2013). Estudios han encontrado la relación que existe con DM2-TB, los cuales sugieren un inmunocompromiso fagocitario, los cuales incluyen anomalías en la quimiotaxis, fagocitosis, irrupción respiratoria y la expresión alterada de citocinas, adhesinas y receptores (receptor de complemento 3, receptores toll-like) (CR3, TLR'S) (Gomez, Twahirwa et al. 2013).

Estudios recientes muestran que Linfocitos T provenientes de pacientes con DM-TB secretan mayor cantidad de citocinas Th1 y Th17, por lo que la respuesta frente a MTB produce células CD4+ frente a antígenos de MTB. Estos hallazgos sugieren que estos pacientes presentan una respuesta hiperreactiva proinflamatoria frente al patógeno, aunque aún no están muy claras las consecuencias o la causa que conlleva a que pacientes con DM2 tengan una mayor susceptibilidad a este bacilo, y si esta inmunidad es efectiva contra la micobacteria. Los monocitos juegan un rol importante en el pulmón frente a la infección inicial en donde se diferencian en macrófagos y células dendríticas para la presentación de antígenos y la secreción de citocinas (Stew, Martinez et al. 2013).

Se ha encontrado en estudios realizados *in vitro* que los macrófagos en diabéticos presentan una reducida asociación (unión y fagocitosis) con la micobacteria, defecto que parece relacionarse a la alteración en monocitos así como en las opsoninas séricas por MTB, particularmente en el componente C3b del complemento con el cual puede medirse la fagocitosis de MBT. La asociación que se encuentra en modelos de DM2 crónica es en la retrasada respuesta de la inmunidad innata frente a la micobacteria, con la presentación tardía del antígeno por las células presentadoras de antígenos a los nódulos linfáticos

pulmonares. La eficiente fagocitosis y la respuesta del sistema inmune adaptativo son necesarias para la activación de la respuesta de las células mediadoras que restringen el desarrollo inicial de la micobacteria, y las deficiencias contribuyen a aumentar el riesgo de que pacientes con DM contraigan la infección por MTB y aumenten su persistencia.

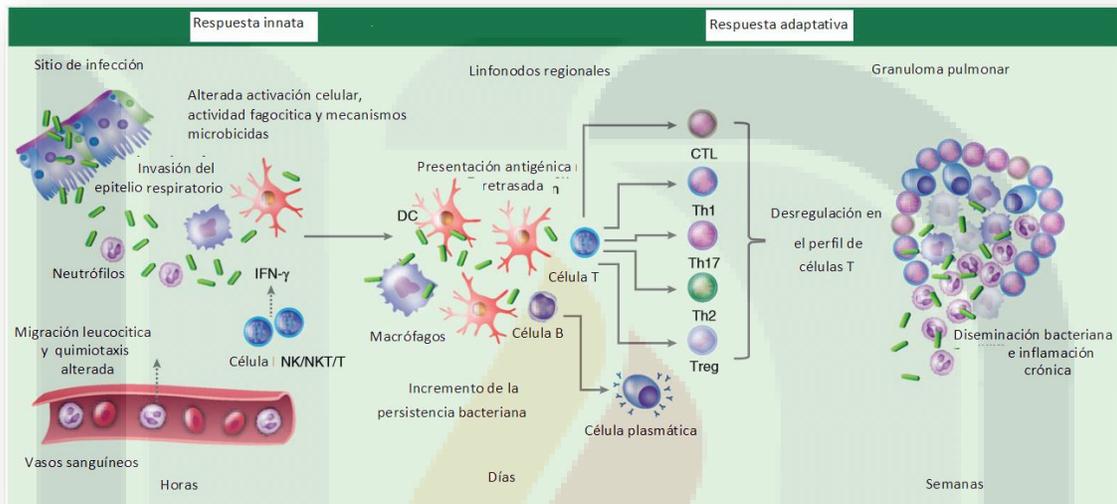


Figura 9. Mecanismos inmunológicos que contribuyen a la susceptibilidad del diabético a *Mycobacterium tuberculosis*. La invasión del epitelio respiratorio requiere de la respuesta inflamatoria temprana necesaria para el rápido reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y células dendríticas al sitio de la infección. Por lo tanto defectos en el reconocimiento bacteriano, la actividad fagocítica y la activación celular libera citocinas y quimiocinas deficientes (CCL2, factor de necrosis tumoral- α , interleucina 1- β , interleucina-12) en diabéticos. La alterada activación de células NK (natural killer), una importante fuente de interferón- γ (INF- γ) para la activación de macrófagos con un papel importante antimicrobica, facilita la persistencia de la bacteria. Dentro de la iniciación de la inmunidad adaptativa las células presentadoras de antígenos son deficientes en el reclutamiento así como en su función, el irregular perfil de citocinas altera la activación y diferenciación de los subtipos de células T. La activación de las células B y la producción de anticuerpos también son deficientes. La inflamación no regulada que envuelve a las células T y su capacidad disminuida para eliminar la bacteria intracelular afecta la formación del granuloma, contribuyendo al incremento del reclutamiento de neutrófilos y la necrosis central que facilita el escape de la bacteria. Modificado de: (Hodgson, Morris et al. 2015).

Se ha reportado que los tratamientos antimicobacterianos son menos efectivos en pacientes con DM, dado que la eficiencia del antibiótico para la eliminación del patógeno requiere de la cooperación del adecuado funcionamiento del sistema inmunológico. Así mismo, la mayor frecuencia de problemas adversos se tiene en pacientes diabéticos lo que sugiere que la aumentada respuesta inmunológica mediada por la gran secreción de citosinas frente al antígeno micobacteriano en pacientes con TB-DM2 no es efectiva para la eliminación de MTB. Esto tiene algunas explicaciones que pueden contribuir a la deficiente inmunidad para estos resultados adversos a los tratamientos. Primero, la elevada respuesta de Th1 y Th2 está solo presente en la sangre periférica en pacientes con TB-DM, aunque la respuesta antiinflamatoria que facilita el desarrollo de MTB está localizada en el sitio de infección, los pulmones. Alternativamente, esto es una elevada inmunomodulación celular en los pulmones, pero esto no es efectivo para matar a la micobacteria. Por otra parte, esta hiperreacción a los antígeno MTB pueden ser perjudiciales y contribuir al daño en el tejido pulmonar, por lo tanto, la frecuencia de muerte es mayor en estos pacientes. Dos factores son los principales sospechosos del fallo del tratamiento antimicobacteriano en pacientes con DM.

- a) El pobre control de la glucosa. La hiperglicemia puede comprometer a la eliminación de MTB afectando la microvasculatura y reduciendo la perfusión tisular para una óptima respuesta inmune.
- b) Niveles subóptimos de antibióticos antimicobacterianos en plasma de paciente diabéticos contra los que no son diabéticos, aunque los hallazgos encontrados en estudios no está fuertemente validados, es un tema que necesita más estudio. Pero se ha encontrado que deficiencia en la biodisponibilidad en plasma del antibiótico va a ayudar a la evolución de la MTB en pacientes con DM2 (Restrepo and Schlesinger 2014).

También se ha encontrado el importante papel que juegan los péptidos antimicrobianos tales como catelicidina y defensinas como parte del sistema

inmunológico innato tanto en la eliminación de la micobacteria así como alterando su patogenicidad. Estudios recientes muestran que los péptidos antimicrobianos LL-37 y defensinas se encuentran disminuidos en plasma de pacientes diabéticos con tuberculosis (Gonzalez-Curiel, Castaneda-Delgado et al. 2011), además se ha encontrado que en monocitos de pacientes diabéticos el receptor de la vitamina D (VDR) está disminuido, y si estas células se suplementan con vitamina D recuperaban su capacidad de eliminar a la micobacteria, ya que el VDR estimula la expresión de LL-37 (Lopez-Lopez, Gonzalez-Curiel et al. 2014).

8.3. Péptidos Antimicrobianos

La mayoría de los organismos vivos están expuestos constantemente al contacto con patógenos, a su ingestión o inhalación. La sobrevivencia de estos organismos depende de la respuesta de su sistema inmunológico que depende de varios componentes (Reddy, Yedery et al. 2004). Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son un abundante y diverso grupo de moléculas producidas y distribuidas en una gran variedad de especies de invertebrados, plantas y animales (Sun, Xia et al. 2014). Los AMPs son un componente central de la inmunidad innata que protegen a los animales de microbios, virus, o células intrusas (Hiemstra and Zaat 2013). Estudios recientes sugieren que los AMPs inhiben la formación de la pared celular, la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Sun, Xia et al. 2014). A pesar de la enorme diversidad en sus secuencias y estructuras, la mayoría de los AMPs comparten las siguientes características: carga positiva y alto contenido de residuos hidrofóbicos y porción anfipática (Nijnik and Hancock 2009). En humanos tenemos tres familias de AMPs, que incluyen las defensinas, catelicidina y las histatinas. Sin embargo, hay otros péptidos antimicrobianos e inmunomoduladores que no están incluidos con esas familias, granulicina, lactoferrina y hepcidina (Téllez and Castaño 2010).

Los AMPs se pueden clasificar según su estructura secundaria y su composición, como: lineales, de hélice alfa (cecropinas, magaininas y mellitinas),

caracterizados por el enriquecimiento de uno o dos aminoácidos, que contienen puentes disulfuro (defensinas, protegrinas) y fragmentos de otras proteínas más grandes con actividad antibacteriana (Téllez and Castaño 2010).

Hans G. Boman, un pionero en el campo de los AMPs, los dividió en cinco grupos estructurales i) lineal, mayormente helicoidal, péptidos sin cisteínas, con o sin bisagra; ii) péptidos lineales sin cisteína y con una alta proporción de residuos reales, iii) péptidos con un enlace disulfuro, iv) péptidos con dos o más enlaces disulfuro o con solo estructuras beta, y v) péptidos antibacterianos derivados de largos polipéptidos con otras funciones conocidas (Hiemstra and Zaat 2013).

8.3.1. Defensinas

En los mamíferos los encontramos en el epitelio del intestino, tracto respiratorio o la piel. Es decir, en la primera línea de defensa protegiendo la función y la homeostasis del organismo al colindar directamente con el entorno externo. Las defensinas son los AMPs mejor establecidos, consisten de 30-40 aminoácidos que contienen 6 residuos de cisteína. Se divide en dos grandes grupos β -defensinas y α -defensinas (Lee and Lee 2015).

Se han realizado trabajos para estudiar los genes asociados a β -defensinas y α -defensinas (DEFA) de humanos y roedores en los cuales se demuestra su agrupación y replicación molecular. Se han descritos cinco genes de α -defensinas, los cuales incluyen (DEFA1 y DEFA3), para DEFB1 (gen humano de la Beta-defensina 1) su localización es dentro del cromosoma humano 8p23. Basados en investigaciones de los genes de DEFA y DEFB1, se propuso que los genes de α -defensinas mieloidea (DEFA1, DEFA3 y DEFA4) codifican para beta defensina humana 5 (HBD5) y 6, α -defensinas que son expresadas en las células de Paneth del intestino delgado (Nijnik and Hancock 2009). Las α -defensinas son expresadas mayormente en el intestino delgado. Defensina alfa humana 5 (DEFA5) y defensina alfa humana 6 (DEFA6) son péptidos representativos en

humanos de las α -defensinas, mientras que en ratones las criptidinas son las α -defensinas murinas. Las α -defensinas son pequeños péptidos que contienen estructuras con carga positiva/residuos hidrofóbicos. Esta característica estructural, permite que se unan de manera electroquímica a la membrana de patógenos invasores que presenten carga negativa, y de esta manera puedan insertarse dentro de la membrana y eliminar al patógeno por choque osmótico. Las β -defensinas son secretadas por el epitelio de la piel (queratinocitos), tracto respiratorio (células epiteliales respiratorias) y por el intestino grueso (mayormente enterocitos) (Lee and Lee 2015).

8.3.1.1. Mecanismo antimicrobiano de las defensinas

La interacción entre el péptido catiónico y la membrana aniónica de un microorganismo es llevada por la atracción electrostática. Posterior a esto se lleva a cabo la permeabilización de la membrana. Por último la lisis celular por choque osmótico. Una característica importante es que solo producen daño en la membrana celular bacteriana, pues solo existe afinidad a esto por la gran cantidad de fosfolípidos que estos contienen con carga negativa exclusivamente en la capa externa de su membrana (figura 10) (Rivas-Santiago, Sada et al. 2006).

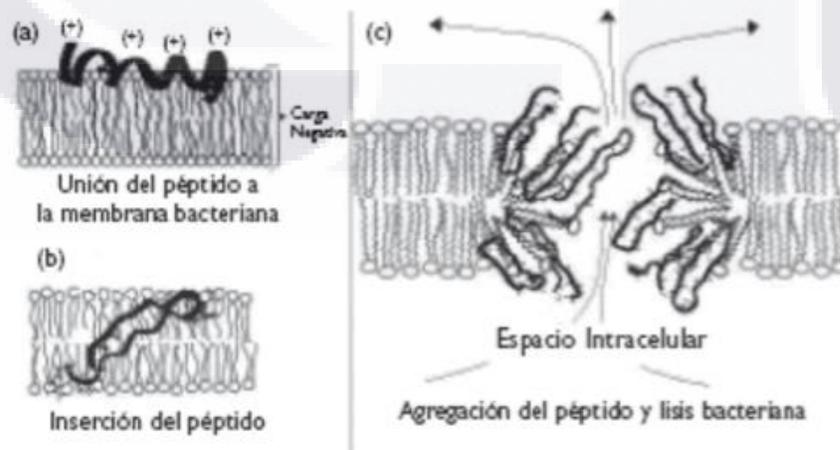


Figura 10. Mecanismo acción péptidos antimicrobianos. (a) Por atracción electrostática se une el péptido antimicrobiano catiónico a la membrana

bacteriana de carga aniónica, (b) posteriormente el péptido se inserta de la membrana y (b) finalmente ocurre la lisis de la bacteria y esta es eliminada (Rivas-Santiago, 2006).

8.3.2. Catelicidina

La catelicidina (LL-37) se origina a partir de un precursor denominado hCAP-18 que es una molécula de 18 kD. Las catelicidina fueron inicialmente identificadas en los neutrófilos y ahora se sabe que se expresan en los leucocitos. En el epitelio existe una gran demanda de este péptido, como en procesos de inflamación, lesiones o infecciones. LL-37 presenta efectos de actividad antimicrobiana, quimiotaxis, angiogénesis, apoptosis, efecto antiendotóxico, eliminación de células muertas, modulación de citocinas, aumento de polimorfonucleares y regeneración tisular (Hiemstra and Zaat 2013).

8.3.2.1. Mecanismo antimicrobiano de la catelicidina

Se ha reportado el efecto antimicrobiano de LL-37 con un amplio espectro de bacterias gram-positivas y gram-negativas entre las que están incluidas a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli.*, además inhibe la formación de biofilms de *P. aeruginosa*. En estudios *in vitro* se ha observado su efecto contra el VIH, virus de la influenza y virus sincital respiratorio, lo cual conlleva a presentar un espectro amplio frente a diferentes agentes patógenos (Téllez and Castaño 2010, Hiemstra and Zaat 2013). Se ha demostrado que LL-37 utiliza el Receptor del péptido formilo tipo 1 (FPRL1) para mediar la quimiotaxis de neutrófilos, monocitos y células T (De, Chen et al. 2000). También ha sido asociado su efecto angiogénico mediado por células epiteliales al unirse con el FPRL1 (Koczulla, von Degenfeld et al. 2003). LL-37 activa células dendríticas (Davidson, Currie et al. 2004), estimula degranulación de mastocitos y la liberación de histamina así como IL-2, IL4 e IL-6 (Vandamme,

Landuyt et al. 2012), también se ha observado que macrófagos tratado con LL-37 disminuyen su producción de TNF- α y los niveles de óxido nítrico, causando un efecto antiinflamatorio (Scott, Davidson et al. 2002). Mediante receptor de péptido formil (FPR2) y purireceptor 7 (P2X7) se ha visto que modulan la apoptosis y aumentan la sobrevivencia de los neutrófilos (Vandamme, Landuyt et al. 2012). Frente a MTB ha sido demostrado en células epiteliales y macrófagos que al ser infectadas incrementan la expresión de LL-37 así como la asociación de este péptido con la micobacteria, representando por lo tanto una fuerte arma de la inmunidad innata frente a la infección aguda de esta bacteria (Rivas-Santiago, Hernandez-Pando et al. 2008). Se ha reportado que en macrófagos tratados con LL-37 e infectados con MTB había un aumento en la expresión de IL-10 y TGF- β , y un decremento en los niveles de la IL-17, observando una fuerte actividad antiinflamatoria, lo cual puede resultar protector frente a esta infección ya que la inflamación se ha visto que contribuye a la persistencia de la micobacteria, diseminación y transmisión (Torres-Juarez, Cardenas-Vargas et al. 2015). También se ha visto que LL-37 es fundamental para la autofagia de la micobacteria por la vía de P2X7 en macrófagos y que el tratamiento con fenilbutirato estimula este proceso (Rekha, Rao Muvva et al. 2015).

8.3.3. Péptidos Antimicrobianos en TB

El rol que juegan los AMPs durante la patogenia de la tuberculosis primaria ya ha sido estudiado, demostrando que participan en la infección y la resistencia a esta enfermedad (Rivas-Santiago, Serrano et al. 2009). Las defensinas epiteliales se involucran como la primera línea de defensa contra el desarrollo de infecciones y en el mantenimiento de la integridad celular. El epitelio alveolar por sí mismo es un importante componente del sistema inmune innato y es el primer sitio donde se da la primera respuesta del sistema inmune. Diversos estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han reforzado lo anterior. En un estudio *in vitro* se demostró que la producción de HBD2 por las células A549 ocurre en la infección por micobacterias (Rivas-Santiago, Schwander et al. 2005). También se comprobó

que los macrófagos alveolares son los más eficientes en la producción de LL-37 después de la infección por MTB, proponiendo que la catelicidina proveniente de los macrófagos alveolares tienen una participación importante en la infección temprana por esta bacteria, probablemente después de la activación de TLR-9 provocada por el DNA de MTB (Rivas-Santiago, Hernandez-Pando et al. 2008). En un modelo murino se encontró que los péptidos sintéticos catiónicos IDR-1002, IDR-HH2 y la IDR-1018 presentan actividad antimicrobiana frente a dos cepas de MTB, una sensible a fármacos y otra multifármaco resistente (Rivas-Santiago, Castaneda-Delgado et al. 2013). Otro estudio hecho por el grupo de investigación encontró que la fase importante de acción de CRAMP (LL-37 en ratones) es en la fase aguda de infección por MTB, pero en la enfermedad crónica no tiene una acción importante, reforzando que estos péptidos funcionan en la respuesta aguda a la infección por la micobacteria (Castaneda-Delgado, Hernandez-Pando et al. 2010). Estos estudios nos dan información acerca de la importancia que tienen los péptidos antimicrobianos en la eliminación de la micobacteria, así como la actividad inmunomoduladora de los mismos, sin embargo no se sabe qué papel podrían desempeñar los fármacos utilizados en el control de la glicemia de pacientes diabéticos sobre los péptidos antimicrobianos y de qué manera pueden repercutir estos en el crecimiento de la bacteria. Por lo que es de suma importancia ver qué papel están jugando estos fármacos en la inmunidad innata del diabético.

9. Justificación

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2012, la DM2 se encuentra entre las primeras causas de muerte en México (6.4 millones de personas). Es la mayor comorbilidad en pacientes con TB siendo del 21%. Las comorbilidad que existe entre DM2 y la TB ha ido incrementando. Se sabe que el tener DM 2 incrementa de 2-3 veces el riesgo de contraer TB. Se han explicado diferentes mecanismos fisiológicos por el cual la propia DM2 causa un grado de inmunodepresión lo que provoca que la respuesta inmunológica frente a agentes patógenos sea deficiente. Se conoce el papel importante que juegan los péptidos antimicrobianos en el control de diferentes patógenos incluyendo a MTB como parte de la respuesta del sistema inmunológico innato. Actualmente no existen estudios del efecto que pueden desempeñar la insulina, metformina y glibenclamida en la inmunidad innata (péptidos antimicrobianos) y si esto va a desempeñar un papel importante en la respuesta inmune frente a diferentes patógenos como la MTB. El fin de este estudio es evaluar el efecto toxicológico que podrían desempeñar estos fármacos en la expresión de los péptidos antimicrobianos, en específico las defensinas y catelicidina. Este estudio nos arrojaría información de suma importancia para conocer desde una perspectiva inmunotoxicológica el efecto que tienen estos fármacos y proporcionarle al clínico las herramientas para poder seleccionar el mejor tratamiento para sus pacientes.

10. Hipótesis del trabajo

Los fármacos de elección utilizados para el control glicémico en pacientes con DM2 altera la expresión de péptidos antimicrobianos y el control del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.



11. Objetivos

11.1. Objetivo general

Determinar la expresión de péptidos antimicrobianos en células epiteliales y macrófagos infectados con *M. tuberculosis* y tratados con metformina, insulina y glibenclamida.

11.2. Objetivos particulares

1) Determinar la expresión de HBD-2, HBD-3, HBD-4 y LL-37 en neumocitos tipo II, broncoepiteliales y macrófagos sin tratar y tratados con glibenclamida, metformina e insulina.

2) Determinar la expresión de HBD-2, HBD-3, HBD-4 y LL-37 en neumocitos tipo II, broncoepiteliales y macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) sin tratar y tratados con glibenclamida, metformina e insulina.

3) Determinar la asociación de los péptidos antimicrobianos con *Mycobacterium tuberculosis* en las células (neumocitos tipo II, broncoepiteliales y macrófagos) no tratadas y tratadas con glibenclamida, metformina e insulina.

12. Metodología

12.1. Crecimiento línea celular NCI-H292 (ATCC® CRL-1848™) y A549 (ATCC® CCL185™)

12.1.1. Descongelamiento NCI-H292 y A549

Se descongeló un vial criogénico que contenía a la línea celular correspondiente y se transfirió a un tubo Corning de 50 mL con 5 mL de medio RPMI 1640 (CORNING, Manassas, USA), penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL (CORNING, Manassas, USA), a 25 mM de glucosa (SIGMA, St. Louis, USA) y al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (CORNING, NY, USA), se centrifugó a 161 g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante con pipeta y se dejó el pellet solo. Este fue resuspendido en 1 mL de medio y se determinó el conteo y la viabilidad con azul de tripano. Para ello se tomaron 10 µL de la muestra y se combinaron con azul de tripano al 0.4% (SIGMA, St. Louis, USA) igual a 10 µL en un parafilm. En la cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Horsham, USA) se agregaron 10 µL de la muestra junto con el azul de tripano preparado anteriormente, y se colocó en el microscopio. Se contaron células vivas y muertas (teñidas con azul) y se saca un promedio tomando como base las 4 cuadrículas de los extremos y promediando el conteo de estas, para determinar el porcentaje de células viables por mililitro, mediante la siguiente fórmula: células vivas*100 / el total de células. Se colocaron a incubar 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ en frascos Corning de 25 cm² (4x10⁵ células) o de 75 cm² (1x10⁶ células). Una vez que tuvieron una confluencia mayor al 95% se realizó disgregación enzimática para posteriormente adherirlas, congelarlas o hacerles un pase.

12.1.2. Disgregación enzimática

Se lavó el frasco del cultivo con PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ con un pH de 7.4) (CORNING, Manassas, USA) cuidadosamente y se agregaron 4 mL de tripsina-EDTA 0.05 %-0.2 mM (Gibco, Carlsbad, CA), se colocó en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂ y se dejó durante 6 minutos, posteriormente se transfirió la suspensión a un tubo nuevo de 15 mL con medio y se centrifugó durante 10 minutos a 161 g. Se decantó teniendo cuidado de no tirar el pellet y se resuspendió en 5 mL de medio, se contó y se determinó viabilidad. Congelación de células

Después de realizar el conteo celular, las células fueron centrifugadas a 161 g durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se colocó el pellet en hielo. Se preparó el medio congelante y se colocó sobre hielo (900 µL de SFB y 100 µL de dimetilsulfoxido (CALEDON, Georgetown, Canadá) (DMSO)). Se preparó una proporción de 2.5×10^6 células aproximadamente en 1 mL de medio congelante. Se dejaron durante 3 minutos sobre hielo y la mezcla se colocó en los crioviales, que se pusieron en hielo para dejarlas congelando en el Myster frosty (Nalgene, NY, USA).

12.1.3 Adherencia de células

Se colocaron 3.5×10^5 células (por pozo) en una placa de 24 pozos (CORNING, NY, USA) con el medio RPMI 1640, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml, a 25 mM de glucosa y al 1% de Suero Fetal Bovino (SFB), durante toda la noche a 37°C y 5% de CO₂, posteriormente se lavaron los pozos 3 veces con PBS para retirar las células que no se adhirieron.

12.2. Crecimiento de la línea celular THP1 (ATCC® TIB-202™)

12.2.1. Descongelar THP1

Se descongeló un vial criogénico que contenía a la línea celular THP1 y se transfirió a un tubo Corning de 50 mL con 5 mL de medio RPMI 1640 RPMI, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL, suplementado con 1mM de L-glutamina (CORNING, Manassas, USA) y al 10% de SFB, se centrifugó a 112 g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante con pipeta y se dejó el pellet solo. Este fue resuspendido en 5 mL de medio y se determinó el conteo y la viabilidad con azul de tripano. Se pusieron a incubar 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ en frascos Corning de 75 cm² a concentración de 2.5x10⁵ células por mililitro. Cada 3er día se tomaban 10 µL de la caja y se realizaba el conteo. Si este excedía 1x10⁶ células por mililitro se agregaba medio para alcanzar una concentración de 2.5x10⁵ células por mililitro.

12.2.2. Congelamiento células THP1

Después de realizar el conteo celular, las células fueron centrifugadas a 112 g durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se colocó en hielo. Se preparó el medio congelante y se colocó sobre hielo (900 µL de SFB y 100 µL de DMSO). Se colocó una proporción aproximadamente de 2.5 millones de células en 1mL de medio congelante. Se dejaron durante 3 minutos y posteriormente se agregó el medio congelante sobre las células y la mezcla se colocó en los crioviales que se colocaron en hielo para su congelación en el Myster Frosty™.

12.2.3. Adherencia de células THP1

Se colocaron 3.5x10⁵ células por pozo en una placa de 24, se dejaron 72 horas con medio RPMI 1640, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml,

suplementado con 1mM de L-glutamina, al 10% de SFB y 10 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), posteriormente se retiró el medio y se agregó 1 mL de medio RPMI Hg, con penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml, suplementado con 1mM de L-glutamina y 10% de SFB durante 4 días, una vez diferenciadas se realizaron los tratamientos.

12.3. Tratamiento de las líneas celulares

12.3.1. Ensayo de viabilidad con resazurina.

Una vez adheridas las células en una placa de 24 pozos se trataron siguiendo el esquema mostrado en la tabla 3 a continuación en una placa de 24 pozos durante 24 horas. Llevando cada una de las concentraciones a 1ml.

Control +	Control -	M1	M2	M3	M4	I1	I2	I3	I4
Control +	Control -	M1	M2	M3	M4	I1	I2	I3	I4
			G1	G2	G3	G4			
			G1	G2	G3	G4			

Control + = Tx 20% DMSO (dimetilsulfoxido)

Control - = sin tratamiento

METFORMINA

M1= 1 mM M2= 2 mM M3= 4 mM M4= 10 Mm

INSULINA

I1= 10⁻⁶ M I2= 10⁻⁷ M I3= 10⁻⁸ M I4= 10⁻⁹ M

GLIBENCLAMIDA

G1= 0.1 µM G2= 1 µM G3= 5 µM G4= 10 µM

Tabla 3. Esquema de tratamiento de líneas celulares

Luego de haber trascurrido el tiempo experimental se agregaron 10 μL de resazurina (SIGMA, St. Louis, USA) 700 μM y se hizo la lectura colorimétrica a 540 nm en el lector de ELISA (Labsystem Scientific, México).

12.3.2. Tratamientos de las líneas celulares A549 y NCI-H292

Se pusieron a adherir en placa de 24 pozos 3.5×10^5 células con su respectivo medio al 1% de SFB durante toda la noche a 37°C al 5% de CO_2 . Posteriormente fueron tratadas con los diferentes tratamientos a diferentes concentraciones de metformina (SIGMA, St. Louis, USA) (1mM, 2mM, 4mM), insulina (SIGMA, St. Louis, USA) (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M) y glibenclamida (SIGMA, St. Louis, USA) (0.1 μM , 1 μM , 5 μM), todo por duplicado y durante 24 horas. Posteriormente los sobrenadantes fueron almacenados con inhibidor de proteasas a -70°C y las células fueron lisadas con trizol y almacenadas a -70°C.

12.3.3. Tratamientos de la línea celular THP1

Una vez diferenciadas a macrófagos (3.5×10^5), estas células fueron sometidas a los diferentes tratamientos y con diferentes concentraciones de metformina (1mM, 2mM, 4mM), insulina (10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M) y glibenclamida (0.1 μM , 1 μM , 5 μM), todo por duplicado y durante 24 horas. Terminada la incubación los sobrenadantes fueron almacenados con inhibidor de proteasas a -70°C y las células fueron lisadas con trizol y almacenadas a -70°C.

12.4. Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

12.4.1. Determinación de HBD-2, HBD-3 y HBD-4 por ELISA

Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante (PeproTech, (Rocky Hill, CT, USA). El anticuerpo de captura se diluyó con PBS a una concentración de 0.25 µg/ml, inmediatamente se agregaron 100µL a cada pozo de la placa de ELISA y esta se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Se retiró el PBS de los pocillos y se lavaron 3 veces con 200 µL de buffer de lavado, y se secaron bien. Se agregaron 200 µL de buffer de bloqueo a cada pozo, se incubaron durante 1 hora y posteriormente se aspiraron y lavaron 3 veces los pozos. Se agregaron 100 µL de cada muestra, incluyendo las diluciones de la curva estándar y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pozos se lavaron 4 veces y luego a cada uno se les agregaron 100µL del anticuerpo de detección a una concentración de 0.50µg/ml, se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron 4 veces y se agregaron 100 µL de Avidina-HRP conjugada y se incubaron durante 30 minutos, se lavaron y se agregaron 50µL del sustrato ABTS (Acido2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico)) (SIGMA, St. Louis, USA). Finalmente, después de una incubación de 30 minutos, se realizó la lectura de la colorimetría a 405nm con corrección a 650nm.

12.4.2. Determinación de LL-37 por ELISA

Para la determinación de LL-37, se realizó una metodología estandarizada y descrita anteriormente por nuestro grupo de investigación (Gonzalez-Curiel, Trujillo et al. 2014). Se sensibilizó la placa de ELISA de 96 pozos (Maxisorb Immunoplate, Nunc and Wiesbaden, Germany), con el anticuerpo anti-LL37 IgG hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology, Delaware, USA) diluido (1:500) en buffer de carbonatos a un pH 9.6. La placa se tapó con aluminio y se dejó incubando a 4°C durante toda la noche. Luego se hicieron 3 lavados con 200 µL de buffer de lavado (PBS 1X-0.05% Tween 20)(SIGMA, St. Louis, USA), y se bloqueó con 200 µL de la solución bloqueadora (PBS 1X-0.05% Tween 20 al 5% de leche) en incubación

por durante 3 horas a temperatura ambiente; Nuevamente se hicieron 4 lavados con buffer de lavado, antes de agregar el estándar de LL-37 (donado por el Dr. Robert Hancock, de la universidad British Columbia, Vancouver, Canada) disuelto en la solución de bloqueo y las muestras, y a las 2 horas de incubación a temperatura ambiente, a cada pozo se le agregaron 100 μ L del anticuerpo el anti-LL-37 hecho en conejo (R&D System, Minneapolis, USA) diluido 1:1000 en solución de bloqueo. La placa se tapó con aluminio antes de incubar toda la noche a 4°C. Los pozos se lavaron y se le agregaron 100 μ L del anticuerpo anti-IgG de conejo biotilnado hecho en burro (R&D System, Minneapolis, USA) diluido 1:500 en solución de bloqueo, se dejó incubando 2 horas a temperatura ambiente, se lavó y se agregaron 100 μ L de estreptavidina (RYP System, Minneapolis, USA) (Dilución 1:100 con solución de bloqueo), se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 50 μ L del sustrato ABTS, se tapó y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, se leyó a 405nm y 620nm en el lector de ELISA (Labsystem Scientific, México).

12.5. Crecimiento de cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y obtención de su fase logarítmica

Para el crecimiento de la cepa H37Rv se preparó el medio 7H9 Middlebrook (DIFCO, Detroit, USA) con el 10% del complejo de ácido oleico, dextrosa y albumina (OADC) (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, USA) como sigue:

Reactivo	Para 1 litro
Bacto Middlebrook 7H9	7.7 gr
Glicerol (GIBCO, Grand island, USA)	2 ml
Agua destilada	898 ml
OADC	100 ml

Se colocaron 20 mL del medio 7H9 Middlebrook (líquido) en dos cajas de 25 cm². Una fue inoculada para el crecimiento de la cepa y la otra fue utilizada como blanco. A la caja que se inoculó, se le agregó una alícuota de la cepa H37Rv, se dejó incubando a 37°C con 5% de CO₂ y cada 48 horas se evaluó la densidad óptica mediante espectrofotometría (utilizando como blanco el medio 7H9 Middlebrook) en el espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, Modelo Biomate 5) a 600nm. Los datos obtenidos fueron graficados en el programa GraphPad Prism 5.0.

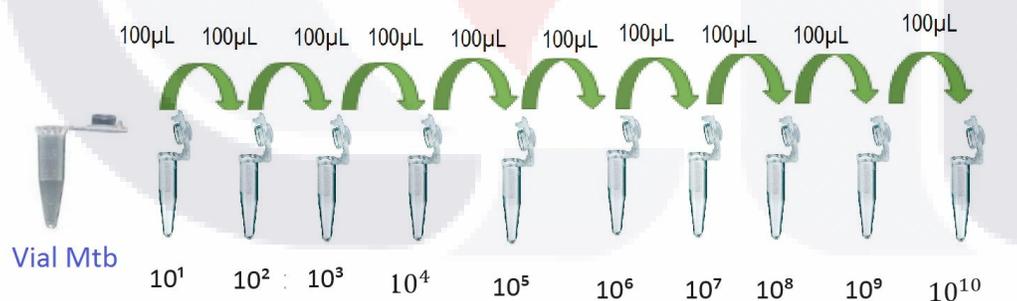
12.5.1. Realización de alícuotas de la cepa de trabajo *M. tuberculosis* H37Rv

Una vez determinada la fase exponencial, se puso a crecer una alícuota de la cepa H37Rv en 20 mL de medio *Middlebrook* 7H9 suplementado al 10% con OADC en una caja de cultivo de 25 cm² y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ hasta que llegó a su fase logarítmica a los 12 días. Las bacterias crecidas se depositaron en un tubo falcon de 50 mL, se centrifugaron a 72 g por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y por pipeteo se resuspendió el pellet en 2 mL de medio Middlebrook 7H9 + 10% OADC, hasta llevarlo a un volumen de 12 mL con medio Middlebrook 7H9 + 10% OADC. Se homogenizó en vórtex durante 3 minutos a máxima velocidad, 3 veces. El tubo se dejó en reposo por 15 segundos para estabilizar la suspensión del cultivo micobacteriano, se tomó 1 mL y se colocó en una celda desechable para determinar su densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm en el espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, Modelo Biomate 5, USA) utilizando como blanco únicamente el medio Middlebrook 7H9. Posteriormente se realizaron los cálculos para determinar la concentración de la suspensión micobacteriana en base al No. de McFarland el cual una absorbancia de 0.762 corresponde a 1.33X10⁸ bacterias/mL (Rivas-Santiago, Hernandez-Pando

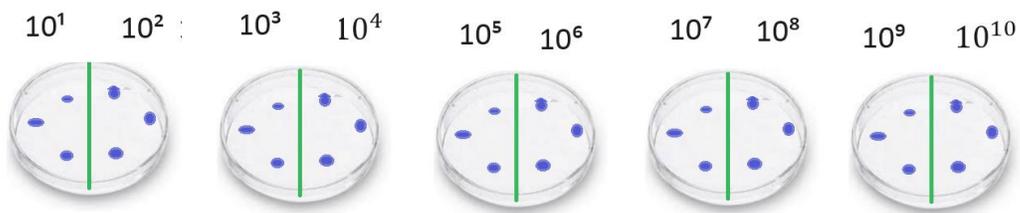
et al. 2008). Se llevaron a una concentración de 1×10^8 bacterias/mL en el medio Middlebrook 7H9 con el 20% de glicerol. Además se confirmó la concentración de las bacterias mediante UFC. Alícuotas de 1 mL se almacenaron en crioviales a -30°C .

12.5.2. Unidades formadoras de colonias (UFC)

Para determinar las UFC se descongelaron viales con la cepa H37Rv, se homogenizaron en vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos a 91 g. Se eliminó el sobrenadante y al pellet se le agregó 1mL de medio 7H9 adicionado con el complejo de catalasa, albumina y dextrosa (ADC) y mediante la técnica de desaglutinación con perlas de vidrio, se separaron las micobacterias que hubiesen formado cúmulos. Para ello en el vial se colocaron 5 perlas de vidrio y se agitaron en vórtex durante 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 72 g durante 2 minutos, el sobrenadante fue transferido a un vial nuevo y fue utilizado para realizar las diluciones decimales para alcanzar la dilución 10^{10} en el medio Middlebrook 7H9, siguiendo el siguiente esquema:



Cada tubo eppendorf contenía 900µL de medio 7H9 (+ADC) y se le colocaron 100 µL de la dilución correspondiente. Se vortexearon perfectamente y por triplicado se agregaron 10µL de cada dilución del medio líquido al solido 7H10 (DIFCO, Sparcks, USA), respetando el siguiente esquema:



Se cerraron las cajas y se dejaron secar sin moverlas y posteriormente se guardaron a 37°C con 5% de CO₂ por 21 días. Al término del tiempo se determinaron las UFC/mL de muestra, considerando el crecimiento en la dilución donde el crecimiento fue homogéneo y el conteo se podía realizar. Todo se repitió por triplicado.

12.6. Infección de línea celular A549

Se pusieron a adherir 3.5×10^5 células por pozo en una placa de 24 pocillos en medio DMEM Hg al 1% de SFB. Una vez adheridas las células se sacó un vial que contenía 2.5×10^6 bacterias Mtb H37Rv, se centrifugó a 2800 g por 5 minutos, el sobrenadante se descartó en fenol y se le agregó 1 mL del medio en el que se cultivaron las células al 1% de SFB, se adicionaron 5 perlas de vidrio de 2mm (SIGMA, St. Louis, USA) y durante 5 minutos el vial fue agitado en vórtex (SCIOGEX, Rocky Hill, USA). La suspensión fue centrifugada a 72 g durante 2 minutos y el sobrenadante fue depositado en otro vial, se realizaron los cálculos para la multiplicidad de infección 5:1 (5 bacterias por célula) y se agregaron las bacterias en cada pozo (llevándolas a 500 μ L del medio al 1% SFB) y se dejaron durante 2 horas. Se lavaron 3 veces con 500 μ L de medio RPMI 1640 para eliminar las bacterias que no fueron internalizadas. Posteriormente se realizaron los tratamientos de metformina (2 mM), insulina (10^{-8} M) y glibenclamida (1 μ M) durante 24 horas. Transcurrido el tiempo el sobrenadante fue descartado en fenol y a una parte se le agregaron 200 μ L de trizol (SIGMA, St. Louis, USA) para extracción de RNA y la otra mitad se utilizó para determinar el crecimiento intracelular de la bacteria.

12.6.1. Determinación del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en líneas celulares A549

Se lisaron las células adicionando 50 μL de Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA) al 0.1 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se neutralizó su acción adicionando 10 μL de medio 7H9 con Albúmina Sérica Bovina (BSA) (SIGMA, St. Louis, USA). Al 20 %, de las bacterias obtenidas se les realizaron 4 diluciones decimales seriadas (1:10) por cada condición, en un volumen final de 1 mL de medio 7H9 por cada pozo. Siempre se homogenizó en vórtex entre cada dilución hasta llegar a la de 1:10000. De cada dilución se tomaron 10 μL y se pusieron a crecer en agar 7H10, todo por duplicado, se incubaron 21 días a 37°C y 5% de CO_2 . Para el cálculo se promedió el número de colonias X dilución X 100.

12.6.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

A las muestras celulares se les agregaron 200 μL de trizol, se homogenizaron en vórtex y se conservaron a -70°C durante 48 horas. Se agregaron 40 μL de la mezcla cloroformo-álcohol isoamílico (SIGMA, St. Louis, USA) y se homogenizó en vórtex, se centrifugaron las muestras 15 minutos a 220 g a 4°C. La fase acuosa fue transferida a otro tubo eppendorf de 0.6 mL y se agregaron 100 μL de isopropanol frío, se mezcló y se dejó 15 minutos en hielo seco. Después fueron las muestras centrifugadas 10 minutos a 220 g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el RNA precipitado con 100 μL de etanol frío al 75% (SIGMA, St. Louis, USA) y mezcló por inmersión 5 veces, Posteriormente fue centrifugado 10 minutos a 220 g a 4°C, el etanol fue eliminado con mucho cuidado de no tocar el pellet y el solvente restante fue eliminado con el SpeedVac (Thermo Fisher, MA, USA). Finalmente las muestras fueron resuspendidas en 11 μL de agua de Dietilpirocarbonato (DEPEC).

Para la síntesis de cDNA se preparó primeramente la mezcla de la reacción, respetando el siguiente orden:

- a) 4 μ L de Buffer 5X para PCR (kit) (Invitrogen, USA)
 - b) 2 μ L $MgCl_2$ 25 Mm (Invitrogen, USA)
 - c) 1 μ L dNTP's 10 mM (Invitrogen, USA)
 - d) 2 μ L DTT 0.1 (kit) (Invitrogen, USA)
- (Esto es por muestra)

Posteriormente en tubos eppendorf de 0.2 mL se colocaron 9 μ L de RNA y 1 μ L del Oligo DT (Invitrogen, USA).

Se programó el termociclador con las siguientes incubaciones

Incubar 10 minutos a 72°C

Incubar 5 minutos a 4°C

Se agregaron 9 μ L de la mezcla de reacción llegando a este paso (el equipo fue pausado)

Incubar 5 minutos a 42°C

Incubar 5 minutos a 4°C

Se agregaron 0.5 μ L de la enzima de retrotranscriptasa (RT) (Invitrogen, Massachusetts, USA) (se paró el equipo llegando a este paso)

Incubar 50 minutos a 42°C

Incubar 15 minutos a 70°C

Colocar en infinito (99.59) a 4°C

5.6.2.1 qPCR en tiempo real

Se limpió perfectamente la campana para realizar la mezcla de reactivos, se preparó el mix que será colocado en cada pozo siguiendo el orden del siguiente esquema:

Reactivo	Concentración Inicial	n= 1
Agua PCR estéril (Roche, Mannheim, Alemania)	-----	2.3 µL
TaqMan (Roche, Mannheim, Alemania)	2X	5 µL
Primer F (Roche, Mannheim, Alemania)	20 µM	0.25 µL
Primer R (Roche, Mannheim, Alemania)	20 µM	0.25 µL
Sonda (Roche, Mannheim, Alemania)	-----	0.2 µL

Proteín a	Gen	Primer F	Primer R	Sonda
HBD-2	DEFB4	tcagccatgagggtcttgta	ggatcgcctataaccacc aaa	tcctcttct
HBD-3	DEB103 a	cagaaatattattgcagagtcag agg	cgatctgttcctccttgga	ctgccttc
HBD-4	DEFB4A	ttatgggactgcccgttg	tgcataggtgttgggaca tc	gccaaaga a
LL-37	CAMP	tcggatgctaacctctaccg	gtctgggtcccatccat	gacctgg a
HPRT	HPRT1	tgacctgattatthtgcatac	cgagcaagacgttcagt cct	gctgagg a

Una vez realizada la mezcla se agregaron 8 μL por pozo de prueba, a los controles negativos se le agregaron 2 μL de agua. Se cubrió la placa para evitar que se contamine y se pasó a cuarto de DNA. A cada uno de los pozos se le agregaron 2 μL de cDNA respetando de manera minuciosa el esquema de ubicación, al final se tapó la placa con la cinta adherible y se centrifugó durante 2 minutos a 252 g. Posteriormente la placa fue pasada al termociclador Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Alemania) y se realizó la lectura. El análisis se realizó utilizando como referencia la expresión de hipoxantina fosforil transferasa como control endógeno. La cuantificación relativa fue calculada con el método comparativo ciclo de cuantificación (Cq), utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ descrita por Livak y Schmittgen (Livak and Schmittgen 2001).

12.7. Análisis de los datos

Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm desviación estándar (DE) y se determinó la normalidad y homogeneidad de varianza con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para evaluar las diferencias entre los grupos, se realizó prueba de ANOVA una sola vía con un post-test de Tukey para las pruebas de toxicidad, qPCR y UFC. En el caso de los Ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas se realizó un ANOVA de una sola vía con post-test de Bonferroni y Dunnett. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$. El análisis se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5.04 para Windows, (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

13. Resultados

13.1. Evaluación de la toxicidad de metformina, insulina y glibenclamida.

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto citotóxico que podrían tener las diferentes concentraciones de metformina (1 mM, 2 mM, 4 mM y 10 mM), insulina (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M) y glibenclamida (0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M) (Binder, Lauritzen et al. 1984, Costa Rosa, Safi et al. 1996, Ohgami, Kuniyasu et al. 2000, Iida, Suzuki et al. 2002, Cernea, Kidron et al. 2004, Rao, Chou et al. 2005, Scholtz, Pretorius et al. 2005, Piwkowska, Rogacka et al. 2010, Mayer, Haas et al. 2011, Kato, Gong et al. 2012, de Sant'Anna, Franco et al. 2015) sobre las diferentes líneas celulares.

13.1.1. Evaluación de toxicidad de meformina, insulina y glibenclamida en Neumocitos tipo II (A549)

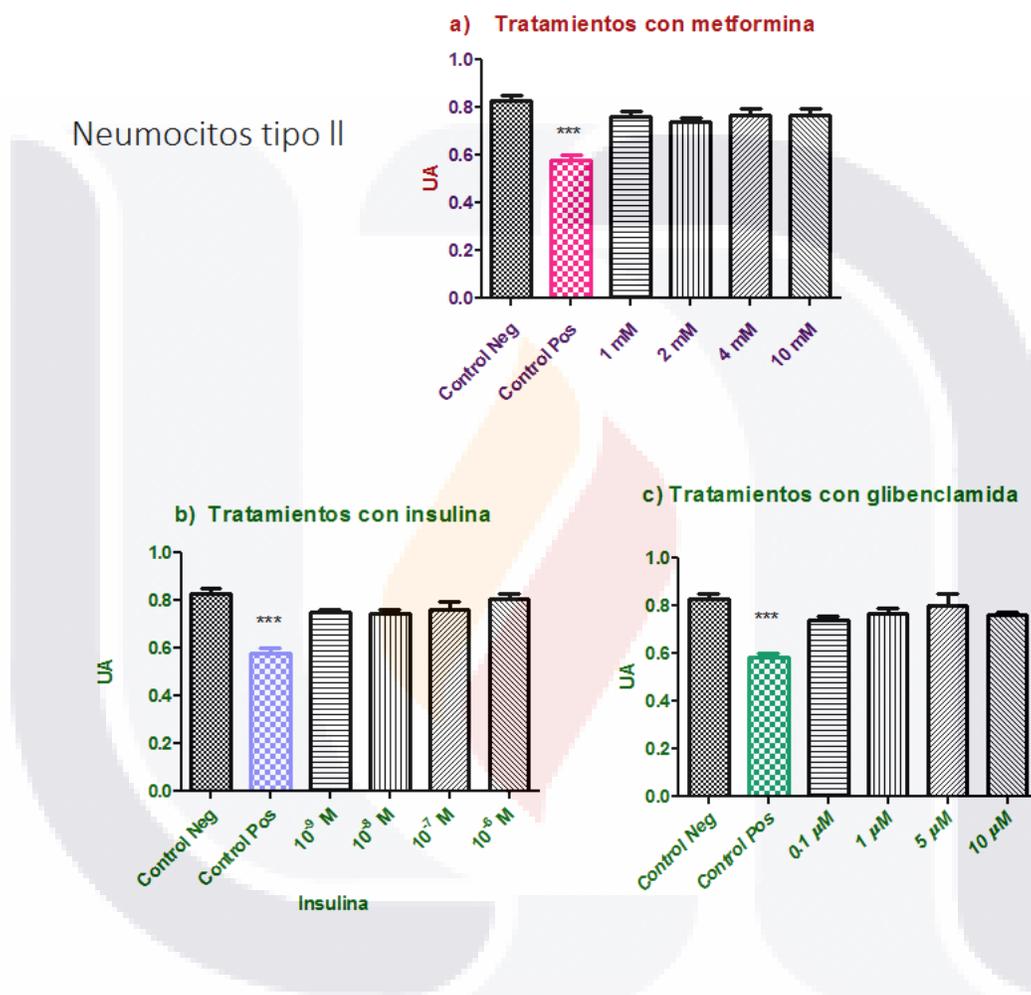


Figura 11. Viabilidad en línea celular A549 tratada con a) meformina, b) insulina y c) glibenclamida. Control negativo=sin tratamiento, Control positivo= tratadas con 20% DMSO. Se compararon los diferentes grupos contra el control positivo que son las células muertas. Valor p < 0.05, Prueba de ANOVA de una vía con un post test de Tukey. n=3 experimentos independientes por duplicado. ***p<0.001

En la figura 11 se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el control positivo (30% de células muertas al ser incubadas con 20% de DMSO) con los grupos tratados con metformina (1a), insulina (1b) y glibenclamida (1c) en sus diferentes concentraciones. Así mismo, no se obtuvieron diferencias significativas entre la viabilidad de las células tratadas a diferentes concentraciones con metformina, insulina, glibenclamida y la de las células que estaban únicamente en medio de cultivo (control negativo).

Este resultado permitió seleccionar las concentraciones a utilizar en los diferentes ensayos, ya que se demuestra que no disminuye ni aumenta la viabilidad de la línea celular A549 con los fármacos y que los resultados que se obtengan serán fiables.

13.1.2. Evaluación de toxicidad de mefformina, insulina y glibenclamida en células broncoepiteliales (NCI-H292)

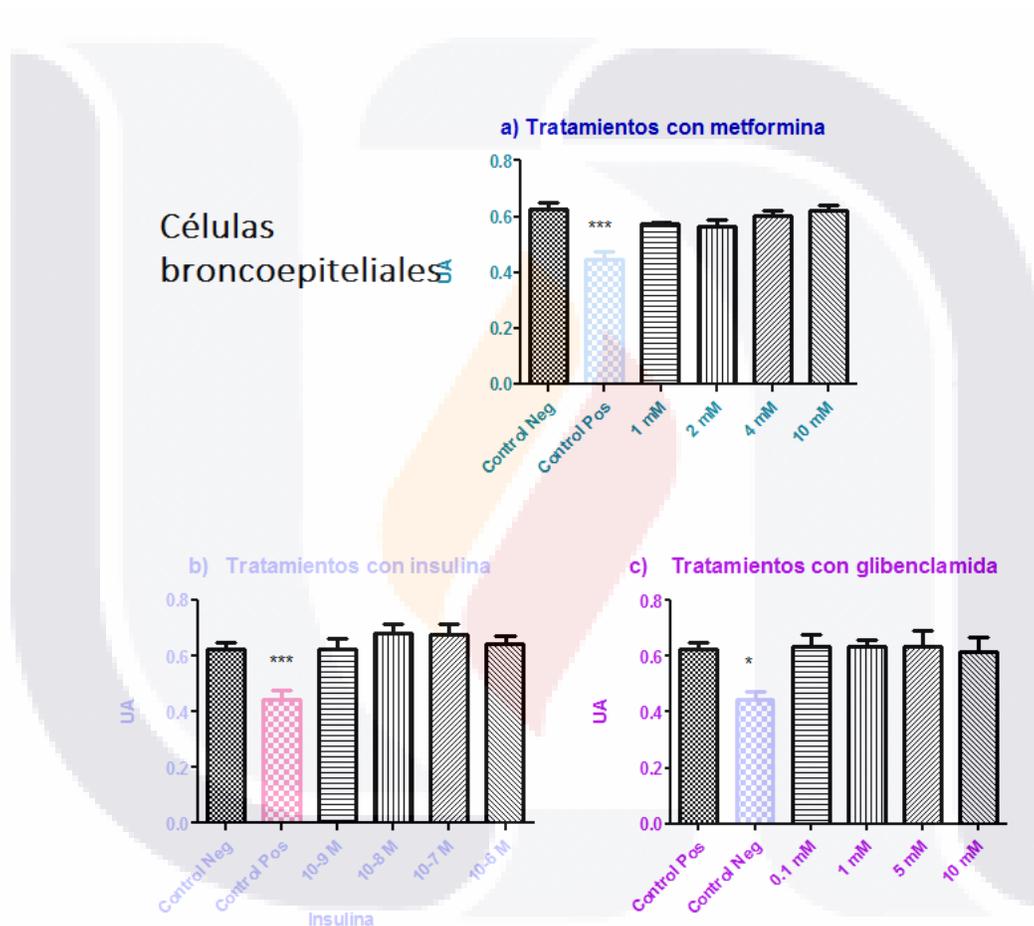
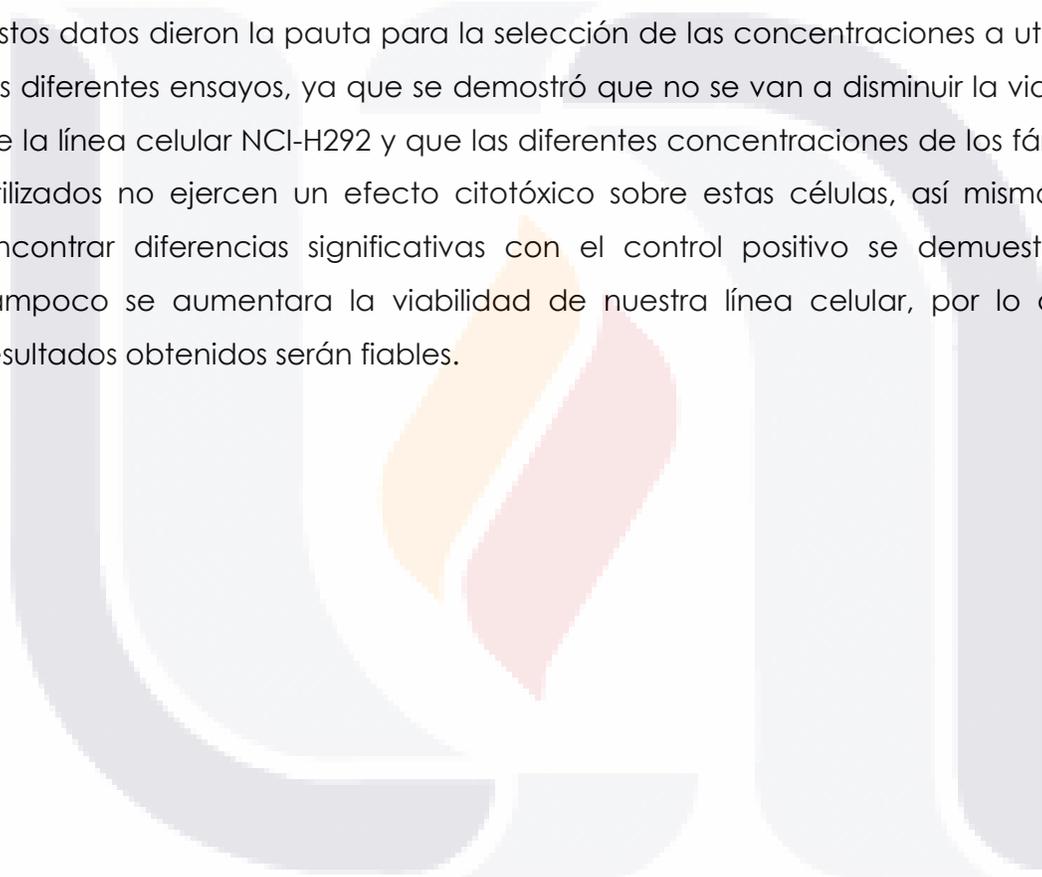


Figura 12. Viabilidad de línea celular NCI-H292 tratadas con a) metformina, b) insulina y c) glibenclamida. Control negativo= sin tratamiento, Control positivo= tratadas con 20% DMSO. Valor $p < 0.05$, Prueba de ANOVA de una vía con un post test de Tukey. $n=3$ experimentos independientes por duplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En la figura 12 (a, b y c) se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el control positivo (30 % de células muertas al ser incubadas con el 20% de DMSO) con los grupos tratados con metformina (a), insulina (b) y 3c) glibenclamida en sus diferentes concentraciones. Así mismo, no se obtuvieron diferencias significativas entre la viabilidad de las células tratadas con los fármacos y las células que estaban únicamente en medio de cultivo (control negativo).

Estos datos dieron la pauta para la selección de las concentraciones a utilizar en los diferentes ensayos, ya que se demostró que no se van a disminuir la viabilidad de la línea celular NCI-H292 y que las diferentes concentraciones de los fármacos utilizados no ejercen un efecto citotóxico sobre estas células, así mismo el no encontrar diferencias significativas con el control positivo se demuestra que tampoco se aumentara la viabilidad de nuestra línea celular, por lo que los resultados obtenidos serán fiables.



13.1.3. Evaluación de toxicidad de metformina, insulina y glibenclamida en macrófagos (THP1)

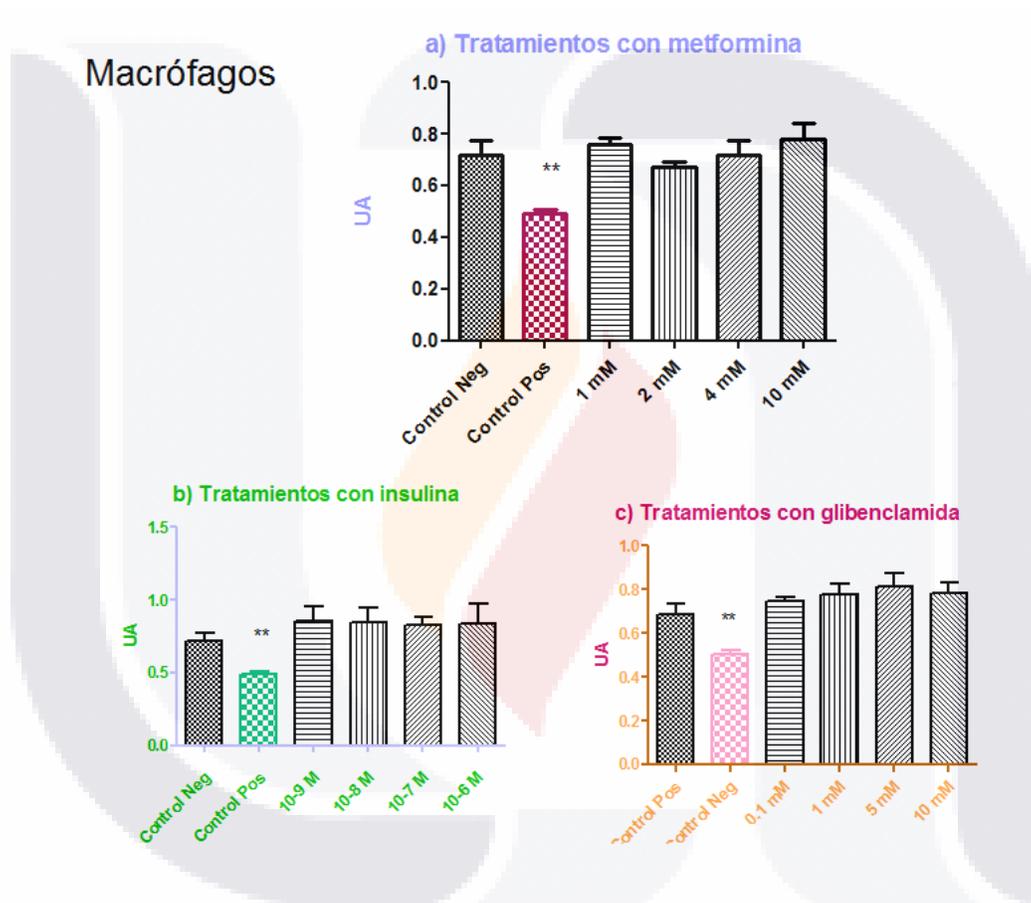


Figura 13. Viabilidad de línea celular THP1 tratadas con a) metformina, b) insulina y c) glibenclamida. Control negativo=sin tratamiento, Control positivo= tratadas con 20% DMSO. Valor $p < 0.05$, Prueba de ANOVA de una vía con un post test de Tukey. $n=3$ experimentos independientes por duplicado. $**p < 0.01$.

En la figura 13 (a, b y c) se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el control positivo (29.5 % de células muertas al ser incubadas con el 20% de DMSO) con los grupos tratados con metformina (a), insulina (b) y (c) glibenclamida en sus diferentes concentraciones. Así mismo no se obtuvieron diferencias significativas entre las células tratadas con los fármacos y el control negativo que solo estuvo en su medio de cultivo.

Los resultados obtenidos nos indican que nuestros tratamientos no disminuyen ni aumentan la viabilidad de nuestra línea celular THP1 por lo que nuestros resultados no se verán influenciados por una modificación en la viabilidad celular.

13.2. Determinación de HBD2, HBD3, HBD4 y LL-37 por ELISA en sobrenadantes de células tratadas con metformina, insulina y glibenclamida

Se realizaron los ensayos de ELISA de los sobrenadantes de las muestras de células tratadas con metformina, insulina y glibenclamida durante 24 horas. Con el objetivo de observar si la expresión de los péptidos HBD2, HBD3, HBD4 y LL-37 se veía modificada con las diferentes concentraciones de los fármacos.

13.2.1. Determinación de las curvas estándar para los ELISA de HBD2, HBD3, HBD4 y LL-37

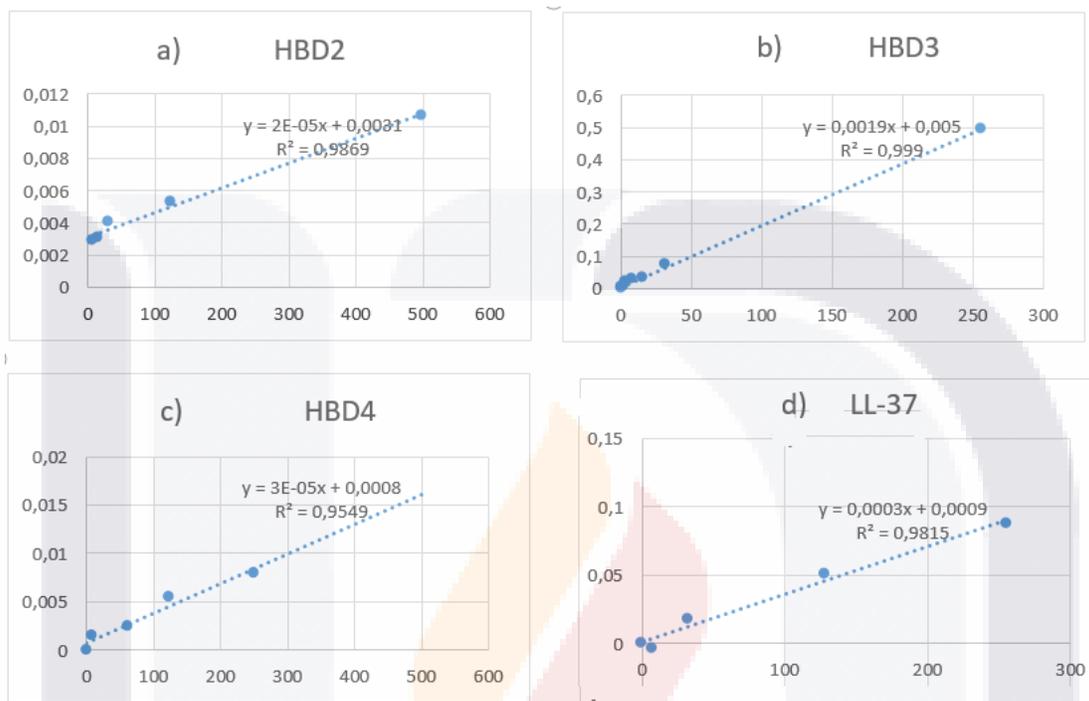


Figura 14. Curva estándar de a) beta defensiva humana 2, b) beta defensiva humana 3, c) beta defensiva humana 4 y d) LL-37, en la cual se observa la relación proporcional entre la concentración del péptido (y) y una determinada señal analítica dada por el lector de ELISA dada en unidades arbitrarias de fluorescencia (x). n= 3 experimentos independientes por duplicado.

Los resultados de las curvas estándar (gráfica 1) cumplieron con los requerimientos para ser validadas como una base para la determinación cuantitativa de las muestras a través de las unidades arbitrarias de fluorescencia. Al menos cuenta con 5 puntos y la R^2 fue mayor a 0.95.

13.2.2. Determinación de péptidos antimicrobianos en sobrenadantes de células tratadas con metformina, insulina y glibenclamida

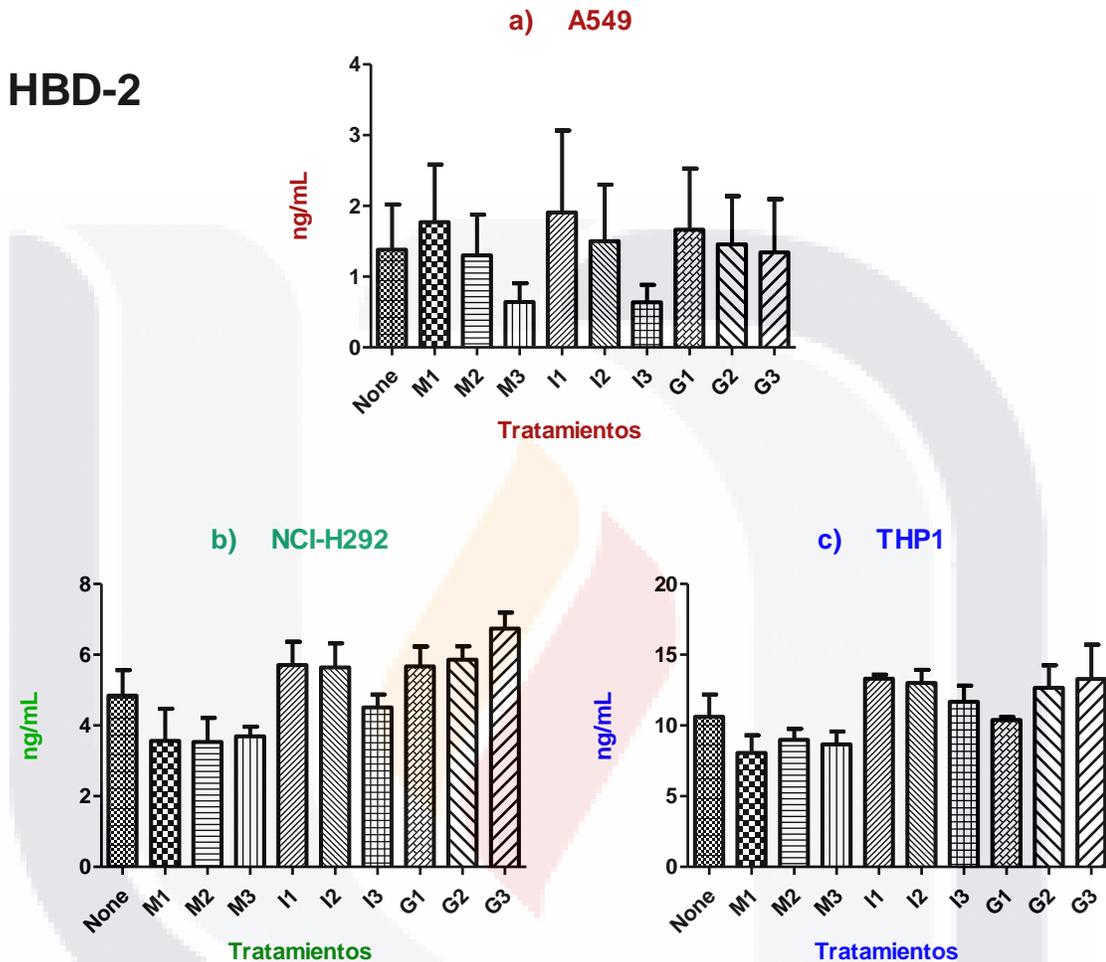
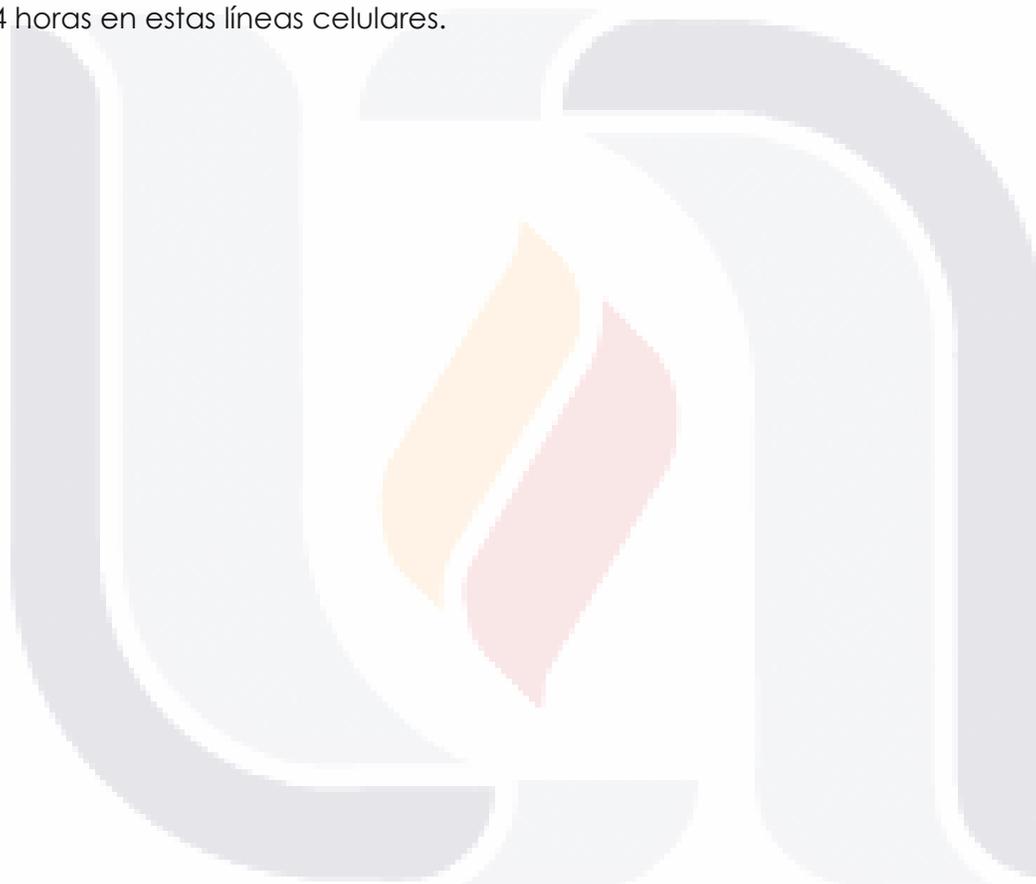


Figura 15. Concentración de HBD2. a) Neumocitos tipo II tratados con metformina, insulina y glibenclamida a sus diferentes concentraciones (baja, media y alta). b) Células broncoepiteliales tratadas con metformina, insulina y glibenclamida a sus diferentes concentraciones (baja, media y alta). c) Macrófagos tratados con metformina, insulina y glibenclamida en sus diferentes concentraciones. M=metformina, M1=1mM, M2=2mM, M3=4mM, I=insulina, I1=10⁻⁹ M, I2=10⁻⁸ M, I3=10⁻⁷ M, G=glibenclamida, G1=0.1µM, G2=1µM, G3=5µM. Cada barra representa la media de 3 experimentos independientes por duplicado. Valor p < 0.05, Prueba de ANOVA de una vía con un post test de Dunnett.

Cómo se aprecia en la figura 14 (a, b y c) no se observaron diferencias estadísticamente significativa en la expresión del péptido antimicrobiano HBD2 entre a) células A549, b) células NCI-H292 y c) THP1 tratados con las concentraciones baja, media y alta de metformina (1mM, 2mM, 4mM), insulina (10-9 M , 10-8 M, 10-7 M) y glibenclamida (0.1µM, 1µM, 5µM) y las que no fueron tratadas con los fármacos. Por lo que a las diferentes concentraciones de los fármacos no se ve afectada la expresión del péptido antimicrobiano HBD2 a las 24 horas en estas líneas celulares.



HBD-3

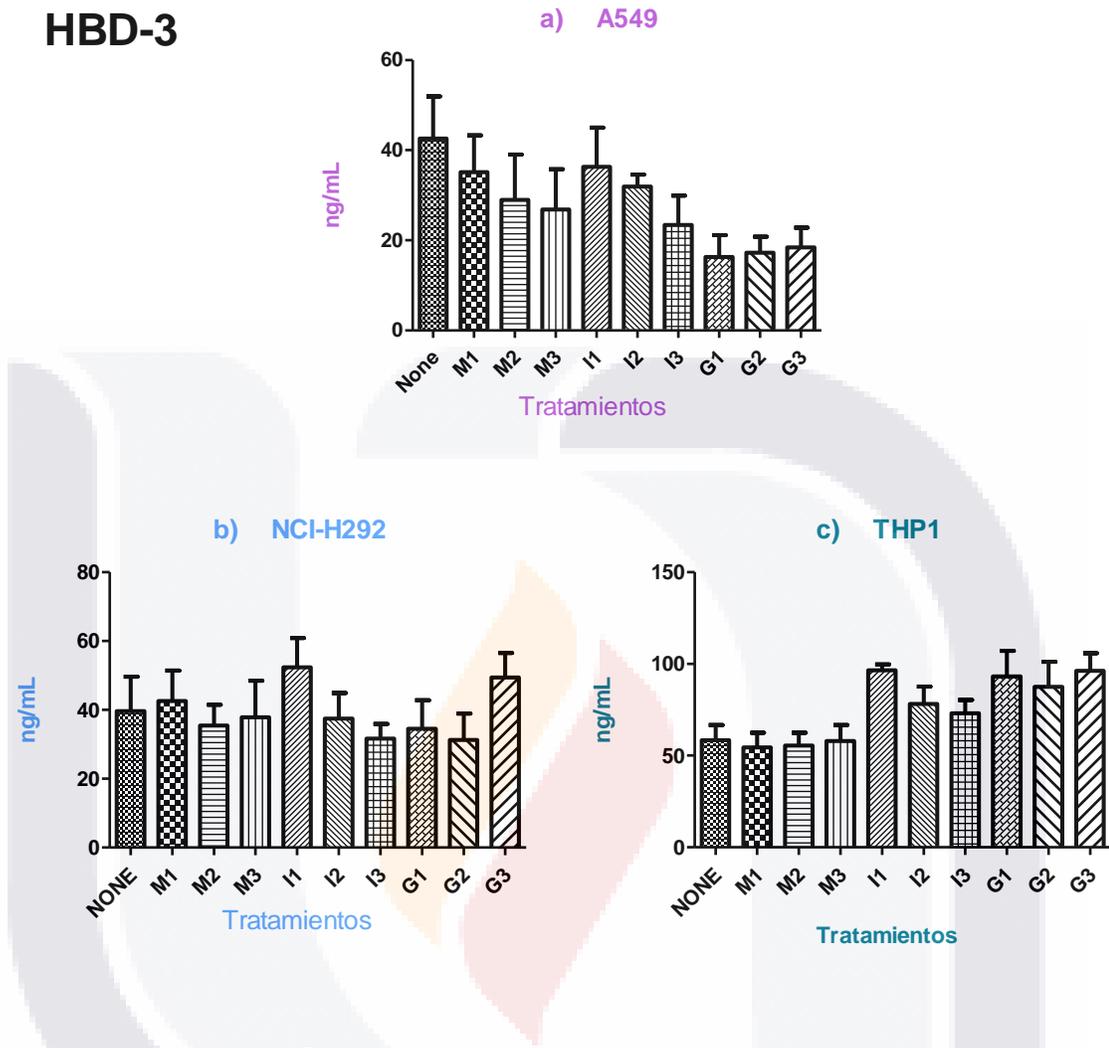


Figura 16. Concentración de HBD3 a) Neumocitos tipo II tratados con metformina, insulina y glibenclamida a sus diferentes concentraciones (baja, media y alta). b) Células broncoepiteliales tratadas con metformina, insulina y glibenclamida a sus diferentes concentraciones (baja, media y alta). c) Macrófagos tratados con metformina, insulina y glibenclamida en sus diferentes concentraciones. M=metformina, M1=1mM, M2=2mM, M3=4mM, I=insulina, I1=10⁻⁹ M, I2=10⁻⁸ M, I3=10⁻⁷ M, G=glibenclamida, G1=0.1μM, G2=1μM, G3=5μM. Valor p < 0.05, Prueba de ANOVA de una vía con un post test de Dunnett. Cada barra representa la media de 3 experimentos independientes por duplicado.

Cómo se puede observar en la figura 15 (a, b y c) no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de HBD3 entre los diferentes grupos a) células A549, b) células NCI-H292 y c) THP1 tratados con las concentraciones baja, media y alta de metformina (1mM, 2mM, 4mM), insulina (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M) y glibenclamida (0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M) y las que no fueron tratadas con estos fármacos. Por lo que a las diferentes concentraciones de los fármacos no se ve afectada la expresión de HBD3 a las 24 horas.



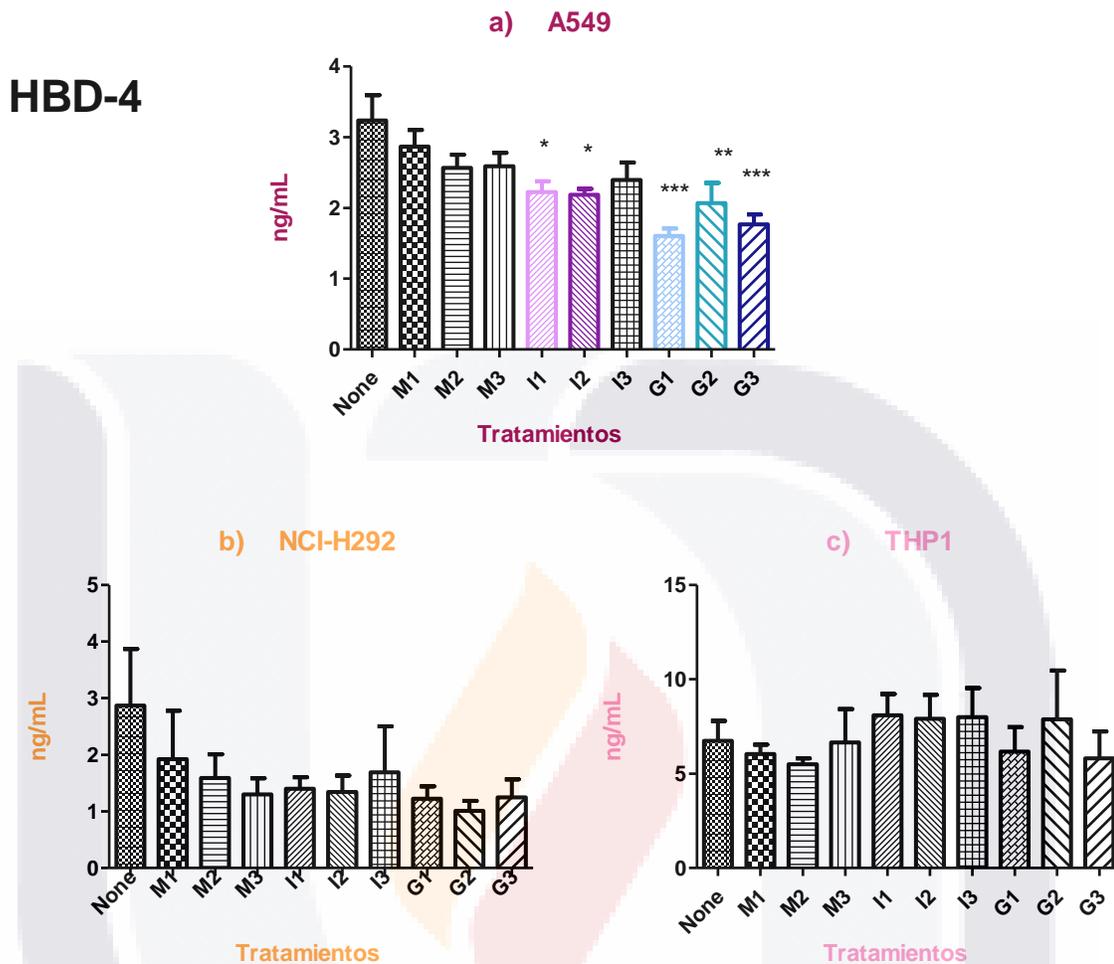
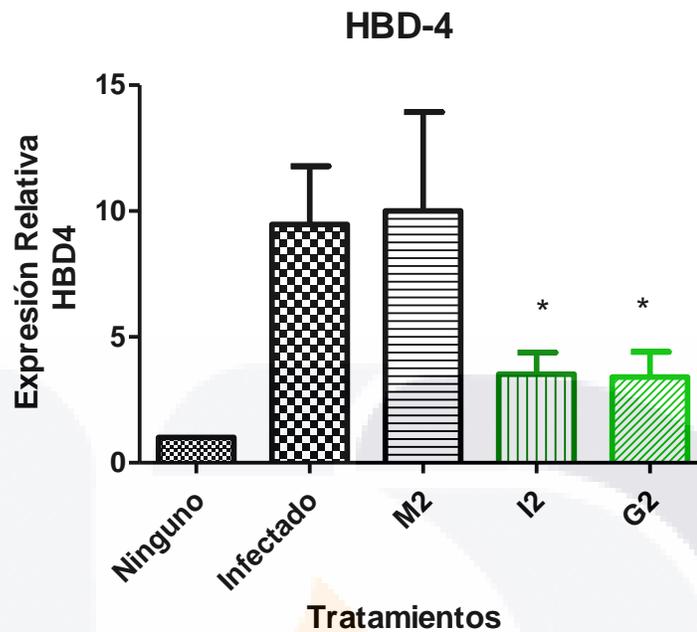


Figura 17. Concentración de HBD4. a) Neumocitos tipo II tratados con metformina, insulina y glibenclamida a sus diferentes concentraciones (baja, media y alta). b) Células broncoepiteliales tratadas con metformina, insulina y glibenclamida a sus diferentes concentraciones (baja, media y alta). c) Macrófagos tratados con metformina, insulina y glibenclamida en sus diferentes concentraciones. M=metformina, M1=1mM, M2=2mM, M3=4mM, I=insulina, I1=10⁻⁹ M, I2=10⁻⁸ M, I3=10⁻⁷ M, G=glibenclamida, G1=0.1μM, G2=1μM, G3=5μM. Valor p < 0.05, Prueba de ANOVA de una vía con un post test de Dunnett. Cada barra representa la media de 3 experimentos independientes por duplicado. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Se obtuvo un resultado interesante y nuevo, en relación a la expresión del péptido antimicrobiano HBD4 en células A549 tratadas con insulina y glibenclamida durante 24 horas. Como se puede apreciar en la figura 16 a) existe una diferencia significativa entre el control y las concentraciones de insulina I1 (10^{-7} M), I2 (10^{-8} M), y las 3 concentraciones de glibenclamida (0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M), observándose una disminución en la producción de HBD4. Para el caso de I1 hubo una inhibición del 31.23%, el 32.46% para I2, el 50.40% para G1, el 36.02% para G2 y 42.30 % para G3. Esto es nuevo, ya que en la actualidad no existe un estudio de como puedan afectar estos fármacos en la producción de péptidos antimicrobianos, y si este efecto va a repercutir en el control de infecciones con diferentes patógenos. Se realizó la prueba de Múltiple comparación de Bonferroni y se observó que entre estas concentraciones no existe diferencia significativa.

13.3. Expresión de HBD4 en células A549 infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* y tratadas con metformina, insulina y glibenclamida

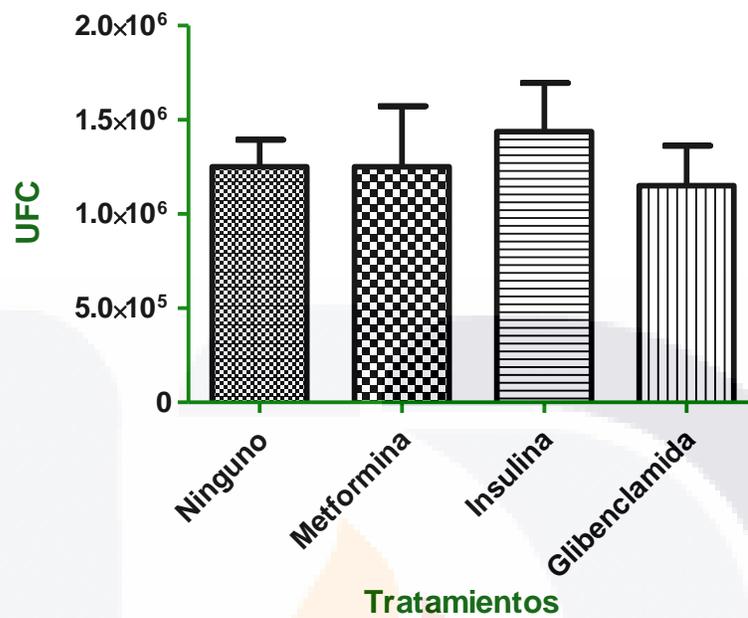
Al encontrar solo cambios en la línea celular A549 en el péptido HBD4 con los tratamientos de insulina y glibenclamida, se evaluó si la disminución de la expresión del péptido también se presentaba al infectar las células con la cepa H37Rv . Y como se observa en la gráfica 2 se encontró que la expresión de HBD4 también disminuyó en las células infectadas y tratadas con insulina un 61.90% y una disminución del 69.91% para la glibenclamida a concentración media en comparación con las células sin tratamiento e infectadas. Efecto que no se apreció al tratar a las células infectadas o no, con metformina. Por lo que se confirma lo encontrado en los ensayos de ELISA mostrados en la figura 16 a).



Gráfica 1. Expresión relativa de HBD4 en línea celular A549 infectada y tratada con metformina (2 mM), insulina (10⁻⁸ M) y glibenclamida (1 μM). El gen endógeno es HPRT y se utilizó la fórmula la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrita por Livak y Schmittgen (Livak and Schmittgen 2001). Las células fueron infectadas y posteriormente se aplicaron los tratamientos durante 24 horas. Valor p < 0.05, Prueba de ANOVA de una vía con un post test de Tukey. n= 3 experimentos independientes por duplicado. *p<0.05.

13.4. Crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en células A549 tratadas con metformina, insulina y glibenclamida

El objetivo fue evaluar la capacidad que mostraba la célula para controlar a la micobacteria al ser tratadas con metformina, insulina y glibenclamida, ya que se encontró que la expresionde HBD4 se encontraba disminuida en los tratamientos de insulina y glibenclamida. Como se observa en la gráfica 3 no se encontró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, por lo cual se concluye que la disminución de HBD4 no influye en el crecimiento de la micobacteria.



Grafica 2. Unidades Formadoras de Colonias en células A549 infectadas con H37Rv y tratadas con metformina (2 mM), insulina (10⁻⁸M) y glibenclamida (1 μM) durante 24 horas. Valor p < 0.05, Prueba de ANOVA de una vía con un post test de Dunett. Cada barra representa la media de una n=3 experimentos independientes por duplicado.

14. Discusión

Los fármacos hipoglucémicos usados para el control de DM2 por el IMSS actualmente son 3: la metformina, insulina y glibenclamida (IMSS 2015). Estudios recientes han propuesto la metformina como una terapia antituberculosa, adjunta a los antibióticos, dado que se ha encontrado una disminución en el daño histopatológico en un modelo murino por inhibición de la expresión de citocinas proinflamatorias (Singhal, Jie et al. 2014). A pesar de los estudios que se tienen de como la hiperglucemia afecta el control de la micobacteria en pacientes diabéticos, no se ha explorado que efecto pueden desempeñar los fármacos utilizados para el control de la hiperglucemia en la inmunidad innata específicamente los péptidos antimicrobianos que son un mecanismo primordial para el control de la micobacteria, como lo ha demostrado nuestro grupo de trabajo (Rivas-Santiago, Serrano et al. 2009). Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar cómo pueden afectar estos fármacos en la expresión de péptidos antimicrobianos (HBD2, HBD3, HBD4 y LL-37 en neumocitos tipo II (A549), células broncoepiteliales (NCI-H292) y macrófagos (THP1), y como esto podría repercutir en el control de MTB.

Para abordar este dilema, lo primero fue evaluar si las diferentes concentraciones que se iban a utilizar en el tratamiento de las anteriores líneas celulares afectarían su viabilidad y con esto, nuestros consiguientes resultados. Se encontró que las concentraciones de 1 mM, 2 mM, 4 mM y 10 mM de metformina no ejercen un efecto citotóxico en las líneas celulares A549, NCI-H292 y THP1 dentro de las primeras 24 horas de tratamiento (Figura q1), lo cual concuerda con lo reportado por Tsuei y Martinus para las células THP1 (Tsuei and Martinus 2012), quienes usaron concentraciones de 1 μ M hasta 10 mM, mientras que para las células A549, Wang y colaboradores reportan efecto tóxico a 25 mM a las 48 horas (Wang, Gao et al. 2015). Sin embargo, para el caso de la línea celular NCI-H292 no se tienen reportes de efecto citotóxico con metformina, y con los resultados obtenidos en este

trabajo se puede decir que hasta con una concentración de 10mM tal efecto tóxico no se presenta y no afecta en la viabilidad de esta línea celular. Con los tratamientos de insulina 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M no se encontró efecto tóxico sobre las líneas celulares A549, NCI-H292 y THP1 (Figura 12), Zdenek Rucka et al, utilizaron concentraciones de 2,500 ng/mL (7.2×10^{-5} M) de insulina en la línea celular A549 y no se reporta efecto tóxico (Rucka, Vanhara et al. 2013), para la línea celular THP1 tratadas con insulina lida et al. no reportaron efecto tóxico a 10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M (lida, Suzuki et al. 2002). En los tratamientos con glibenclamida a 0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M no se encontró un efecto tóxico sobre la viabilidad de las líneas celulares A549, NCI-H292 y THP1 (Figura 13), para la línea celular THP1 Duo-ling lee et al. no reportaron efecto tóxico a 100 μ M de glibenclamida (Li, Ma et al. 2014). Para el caso de las células NCI-H292 se han utilizado hasta concentraciones de 50 μ M sin reportar toxicidad (Hierholzer, Castells et al. 1993), mientras que en las células A549 no se reporta efecto toxico a las 24 horas con 50 μ M (Segovia, Sabbah et al. 2012).

Posteriormente se evaluó la expresión de diferentes péptidos antimicrobianos en las líneas celulares incubadas con diferentes concentraciones de los fármacos mencionados anteriormente (Figura 14, 15 y 16). Y se encontró un resultado por demás interesante. La expresión de HBD4 disminuyó solo en la línea celular A549 tratada con insulina (10^{-8} M, 10^{-7} M) y glibenclamida (0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M) (figura 16). Para el caso de LL-37 no se encontró en los sobrenadantes de las líneas celulares A549, NCI-H292 y THP1 tratadas con metformina, insulina y glibenclamida en sus diferentes concentraciones, esto se deba posiblemente a la concentración de glucosa 25 mM utilizada en los medios de las líneas celulares, ya que se tenía reportado por Rivas Santiago y colaboradores que del mRNA de LL-37 se ve disminuido al incrementar las concentraciones de glucosa en las líneas celulares (Montoya-Rosales, Castro-Garcia et al. 2016). La insulina es el hipoglucemiante más recomendado en pacientes con TB, ya que los agentes orales están contraindicados porque la rifampicina es un potente inductor hepático y con esto se vería acelerado el metabolismo de sulfonilureas y biguanidas, lo cual inhibiría el

efecto hipoglucemiante de estos fármacos y no existiría un control de la glicemia (Niazi and Kalra 2012). Se ha reportado que la glibenclamida disminuye la producción de la citocina IL-1 β , la cual es un mediador inflamatorio importante en la DM2 (Lamkanfi, Mueller et al. 2009, Koh, Weehuizen et al. 2013), y que posiblemente juega un papel inductor en la producción de HBD4, y por eso la disminución en la expresión de este péptido antimicrobiano. Por ello sería importante evaluar la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de esta línea celular para verificar si se disminuye su secreción. Podría ocurrir que la inhibición de HBD4 lleve a una disminución de IL-1 β . Se ha reportado que algunos péptidos antimicrobianos tienen un efecto inmunomodulador (Hiemstra and Zaat 2013), por lo cual también podría estimularse la línea celular con HBD4 y evaluar si encontramos aumentada esta citocina.

La insulina en monocitos promueve la secreción de IL-8/CXCL8 (Jeschke 2013), incrementa la producción de superóxido (Weekers, Giulietti et al. 2003), y regula el metabolismo de los monocitos (De La Rosa, Vasquez et al. 2013). En macrófagos esta reportado que inhibe la secreción de TNF- α , IL-1 e IL-8 (Wurm, Neumeier et al. 2008, Sarigianni, Bekiari et al. 2011), y disminuye la acumulación de macrófagos en el tejido (Iida, Suzuki et al. 2002, Dimitriadis, Maratou et al. 2005), por lo cual sería importante evaluar si estas citocinas juegan un papel en la producción de HBD4 y viceversa. HBD4 es un péptido no tan estudiado, aunque ya se ha demostrado que HBD4 presenta efecto antimicrobiano frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans* (Sharma and Nagaraj 2015), también se tienen reportes del efecto que presenta en la quimiotaxis y degranulación de mastocitos (Chen, Niyonsaba et al. 2007). Aún no se conoce el papel de HBD4 frente a MTB ni si este péptido es estimulado por la micobacteria.

Posteriormente se evaluó si esta disminución de HBD4 repercutiría el control de MTB (H37Rv), por lo que se realizó la infección de la línea celular A549 5:1 durante 2 horas (Rivas-Santiago, Schwander et al. 2005) y se realizaron los tratamientos. Ya que entre las diferentes concentraciones de glibenclamida e insulina no se encontraron diferencias estadísticamente significativas se trataron con las dosis

medias de cada uno de los fármacos durante 24 horas. Se encontró que la expresión de HBD4 estaba disminuida en los tratamientos de insulina y glibenclamida. También se observó el estímulo en la expresión de HBD4 por la cepa H37Rv en esta línea celular, lo cual no estaba reportado (Gráfica 2). Se realizaron ensayos de UFC para evaluar si la disminución de HBD4 iba a afectar el control de H37Rv. Los resultados muestran que el control de la micobacteria no se ve afectado en la línea celular A549 (Gráfica 3), independientemente de la presencia o ausencia de insulina y glibenclamida. Esto posiblemente se deba a que no se modificó la expresión de los otros péptidos antimicrobianos (Figura 14 y 15), así que la célula no perdió la capacidad antimicrobiana de este mecanismo de defensa. Sería importante evaluar si HBD4 presenta un efecto antimicrobiano directo frente a la micobacteria uniéndose a su membrana y cuál es la concentración de este péptido que va a eliminar a la micobacteria de manera eficiente.

15. Conclusión

El presente trabajo concluye que los tratamientos de metformina (1 mM, 2 mM, 4 mM y 10 mM), insulina (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M) y glibenclamida (0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M) no presentan efecto tóxico sobre la línea celular A549, NCI-H292 y THP1 a las 24 horas.

La expresión de HBD4 se ve disminuida en la línea celular A549 tratadas con insulina y glibenclamida sin infección e infectadas con la cepa tuberculosa H37RV.

La disminución de HBD4 no modifica el crecimiento de la micobacteria.

La expresión de HBD4 es inducida por la infección con H37Rv en células A549.

16. Perspectivas

Evaluar si HBD4 presenta un efecto antimicrobiano directo como los péptidos HBD2 y LL-37.

Evaluar si las citocinas TNF- α , IL-1, IL1- β e IL-8 son inducidas o inductoras de HBD4 en la línea celular A549.

Realizar en un modelo murino con diabetes los tratamientos con metformina, insulina y glibenclamida, individualmente así como en combinación con rifampicina sin infección e infectados con MTB y evaluar citocinas como TNF- α , IL-1, IL1- β e IL-8, así como UFC, sobrevivencia, lesiones microscópica y macroscópica del tejido pulmonar.

17. Glosario

Angiogénesis: generación de nuevos vasos.

Apoptosis: muerte celular programada.

Arteroesclerosis: alteración vascular que se caracteriza por el endurecimiento, el aumento del grosor y la pérdida de elasticidad de las paredes arteriales.

Cetoacidosis: elevación en la concentración de los cuerpos cetónicos en la sangre.

Citocinas: proteínas secretadas por células de la inmunidad innata y adaptativa, en respuesta a microorganismo y antígenos.

Dislipidemia: alteración del metabolismo de los lípidos.

Hiperglucemia: concentración elevada de glucosa en sangre.

Hiperinsulinemia: concentración elevada de insulina en sangre.

Hipoxemia: disminución en la difusión de oxígeno en tejidos y células.

Leucopenia: disminución de leucocitos en sangre.

Monogénico: que está determinada por un solo gen.

Polidipsia: exceso en la necesidad y consumo de agua.

Polifagia: aumento anormal en la necesidad de comer.

Poligénico: que envuelve a más de un gen.

Polimorfismo: referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen.

Poliuria: excreción aumentada de orina.

Quimioquinas: proteínas capaces de inducir la quimiotaxis en las inmediaciones de las células sensibles.

Quimiotaxis: reacción de orientación de los organismos celulares libres como respuesta a un estímulo químico.

Silicosis: enfermedad crónica del aparato respiratorio que se produce por haber aspirado polvo de sílice en gran cantidad.

Vitíligo: enfermedad degenerativa cutánea que provoca la desaparición, por placas limitadas, de la pigmentación de la piel.

18. Bibliografías

ALAD (2006). "Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2." Rev Asoc Latinoam Diabetes **14**: 111-116.

Alfaro, N., M. Carothers and Y. González (2006). "Autopercepción de calidad de vida en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2." Investigación en salud **8**: 152-157.

Almirón, M. E., S. C. Gamarra, M. S. González and J. Issler (2005). "Diabetes gestacional." Rev Postgr Vía Cátedr Med **152**: 23-27.

Alvin, F. (2016). Mycobacteria an Corynebacteria. Bacteriology.

American Diabetes, A. (2012). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care **35 Suppl 1**: S64-71.

Arnold, Y., M. Licea and L. Castelo (2012). "Diabetes mellitus y tuberculosis." Revista Peruana de Epidemiología **16**(2): 76-83.

Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (2012). "Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years." Cell **148**(6): 1160-1171.

Bays, H., L. Mandarino and R. A. DeFronzo (2004). "Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach." J Clin Endocrinol Metab **89**(2): 463-478.

Binder, C., T. Lauritzen, O. Faber and S. Pramming (1984). "Insulin pharmacokinetics." Diabetes Care **7**(2): 188-199.

Bridges, H. R., A. J. Jones, M. N. Pollak and J. Hirst (2014). "Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria." Biochem J **462**(3): 475-487.

Broydell, M., D. M. Mazuca, P. A. Kudo and T. C. Lo (1998). "The role of the GLUT 4 transporter in regulating rat myoblast glucose transport processes." Biochim Biophys Acta **1371**(2): 295-308.

Calvo, A. S., I. F. Esteban, A. M. Sanjuán, M. A. Segura, M. Roqué and D. Moher (2005).

"Metformina para la diabetes mellitus tipo 2. Revisión sistemática y metaanálisis." Atención primaria **36**(4): 183-191.

Cases, M. M. (2008). "Metformina y diabetes mellitus tipo 2." Atención Primaria **40**(3): 147-153.

Castaneda-Delgado, J., R. Hernandez-Pando, C. J. Serrano, D. Aguilar-Leon, J. Leon-Contreras, C. Rivas-Santiago, R. Mendez, I. Gonzalez-Curiel, A. Enciso-Moreno and B. Rivas-Santiago (2010).

"Kinetics and cellular sources of cathelicidin during the course of experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis." Clin Exp Immunol **161**(3): 542-550.

Cernea, S., M. Kidron, J. Wohlgelernter, P. Modi and I. Raz (2004). "Comparison of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of single-dose oral insulin spray and subcutaneous insulin injection in healthy subjects using the euglycemic clamp technique." Clin Ther **26**(12): 2084-2091.

Conget, I. (2002). "Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus." Revista Española de Cardiología **55**(05): 528-538.

Contreras, F., B. Romero, N. Suárez, M. González, C. Fouillioux, E. Guevara, M. Betancourt, D. Torres and M. Velasco (2002). "Receptores Sur y Sulfonilureas en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2." Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica **21**: 148-155.

Costa Rosa, L. F., D. A. Safi, Y. Cury and R. Curi (1996). "The effect of insulin on macrophage metabolism and function." Cell Biochem Funct **14**(1): 33-42.

Chao, W. C., C. L. Yen, Y. H. Wu, S. Y. Chen, C. Y. Hsieh, T. C. Chang, H. Y. Ou and C. C. Shieh (2015). "Increased resistin may suppress reactive oxygen species production and inflammasome activation in type 2 diabetic patients with pulmonary tuberculosis infection." Microbes Infect **17**(3): 195-204.

Chen, X., F. Niyonsaba, H. Ushio, M. Hara, H. Yokoi, K. Matsumoto, H. Saito, I. Nagaoka, S. Ikeda, K.

Okumura and H. Ogawa (2007). "Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability." Eur J Immunol **37**(2): 434-444.

Davidson, D. J., A. J. Currie, G. S. Reid, D. M. Bowdish, K. L. MacDonald, R. C. Ma, R. E. Hancock and D. P. Speert (2004). "The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization." J Immunol **172**(2): 1146-1156.

De La Rosa, G., E. M. Vasquez, A. M. Quintero, J. H. Donado, M. Bedoya, A. H. Restrepo, G. Roncancio, C. A. Cadavid, F. A. Jaimes and G.-H. Grupo de Investigacion en Cuidado Intensivo (2013). "The potential impact of admission insulin levels on patient outcome in the intensive care unit." J Trauma Acute Care Surg **74**(1): 270-275.

de Sant'Anna, J. R., C. C. Franco, P. C. Mathias and M. A. de Castro-Prado (2015). "Assessment of in vivo and in vitro genotoxicity of glibenclamide in eukaryotic cells." PLoS One **10**(3): e0120675.

De, Y., Q. Chen, A. P. Schmidt, G. M. Anderson, J. M. Wang, J. Wooters, J. J. Oppenheim and O. Chertov (2000). "LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells." J Exp Med **192**(7): 1069-1074.

DeFronzo, R. A. (1999). "Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus." Ann Intern Med **131**(4): 281-303.

Dimitriadis, G., E. Maratou, E. Boutati, K. Psarra, C. Papasteriades and S. A. Raptis (2005). "Evaluation of glucose transport and its regulation by insulin in human monocytes using flow cytometry." Cytometry A **64**(1): 27-33.

Dooley, K. E., T. Tang, J. E. Golub, S. E. Dorman and W. Cronin (2009). "Impact of diabetes mellitus on treatment outcomes of patients with active tuberculosis." Am J Trop Med Hyg **80**(4): 634-639.

Endocrinología, S. M. d. N. y. (2009). "Guías prácticas para el uso de la insulina".

ENSANUT (2012). ENCUESTA NACIONAL DE LA SALUD Y NUTRICION.

Fulop, T., A. Larbi and N. Douziech (2003). "Insulin receptor and ageing." Pathol Biol (Paris) **51**(10): 574-580.

George, R. E. and S. Joseph (2014). "A review of newer treatment approaches for type-2 diabetes: Focusing safety and efficacy of incretin based therapy." Saudi Pharmaceutical Journal **22**(5): 403-410.

Goldhaber-Fiebert, J. D., C. Y. Jeon, T. Cohen and M. B. Murray (2011). "Diabetes mellitus and tuberculosis in countries with high tuberculosis burdens: individual risks and social determinants." Int J Epidemiol **40**(2): 417-428.

Gomez, D. I., M. Twahirwa, L. S. Schlesinger and B. I. Restrepo (2013). "Reduced Mycobacterium tuberculosis association with monocytes from diabetes patients that have poor glucose control." Tuberculosis (Edinb) **93**(2): 192-197.

Gonzalez-Curiel, I., J. Castaneda-Delgado, N. Lopez-Lopez, Z. Araujo, R. Hernandez-Pando, B.

Gandara-Jasso, N. Macias-Segura, A. Enciso-Moreno and B. Rivas-Santiago (2011). "Differential expression of antimicrobial peptides in active and latent tuberculosis and its relationship with diabetes mellitus." Hum Immunol **72**(8): 656-662.

Guerci, B. and J. P. Sauvanet (2005). "Subcutaneous insulin: pharmacokinetic variability and glycemic variability." Diabetes Metab **31**(4 Pt 2): 4S7-4S24.

Hassali, M. A., S. U. Nazir, F. Saleem and I. Masood (2015). "Literature review: pharmacists' interventions to improve control and management in type 2 diabetes mellitus." Altern Ther Health Med **21**(1): 28-35.

Hiemstra, P. S. and S. A. Zaat (2013). Antimicrobial peptides and innate immunity, Springer Science & Business Media.

Hierholzer, J. C., E. Castells, G. G. Banks, J. A. Bryan and C. T. McEwen (1993). "Sensitivity of NCI-H292 human lung mucoepidermoid cells for respiratory and other human viruses." J Clin Microbiol **31**(6): 1504-1510.

Hodgson, K., J. Morris, T. Bridson, B. Govan, C. Rush and N. Ketheesan (2015). "Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections." Immunology **144**(2): 171-185.

Hompesch, M., L. Morrow, E. Watkins, C. Roepstorff, H. F. Thomsen and H. Haahr (2014). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic responses of insulin degludec in African American, white, and Hispanic/Latino patients with type 2 diabetes mellitus." Clin Ther **36**(4): 507-515.

Hunter, R. L. (2011). "Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review." Tuberculosis (Edinb) **91**(6): 497-509.

Hunter, R. L., C. Jagannath and J. K. Actor (2007). "Pathology of postprimary tuberculosis in humans and mice: contradiction of long-held beliefs." Tuberculosis (Edinb) **87**(4): 267-278.

Iida, K. T., H. Suzuki, H. Sone, H. Shimano, H. Toyoshima, S. Yatoh, T. Asano, Y. Okuda and N. Yamada (2002). "Insulin inhibits apoptosis of macrophage cell line, THP-1 cells, via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(3): 380-386.

IMSS (2012). Diagnóstico y Tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL: 1-23.

IMSS (2015). Cuadro Básico de Medicamentos Instituto Mexicano del Seguro Social

INEGI (2013). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA DIABETES, INEGI: 1-18.

Jeong, Y. J. and K. S. Lee (2008). "Pulmonary tuberculosis: up-to-date imaging and management." AJR Am J Roentgenol **191**(3): 834-844.

Jeschke, M. G. (2013). "Clinical review: Glucose control in severely burned patients - current best practice." Crit Care **17**(4): 232.

Kato, K., J. Gong, H. Iwama, A. Kitanaka, J. Tani, H. Miyoshi, K. Nomura, S. Mimura, M. Kobayashi, Y. Aritomo, H. Kobara, H. Mori, T. Himoto, K. Okano, Y. Suzuki, K. Muraio and T. Masaki (2012). "The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo." Mol Cancer Ther **11**(3): 549-560.

Koczulla, R., G. von Degenfeld, C. Kupatt, F. Krotz, S. Zahler, T. Gloe, K. Issbrucker, P. Unterberger, M. Zaiou, C. Lebherz, A. Karl, P. Raake, A. Pfosser, P. Boekstegers, U. Welsch, P. S. Hiemstra, C. Vogelmeier, R. L. Gallo, M. Clauss and R. Bals (2003). "An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18." J Clin Invest **111**(11): 1665-1672.

Koh, G. C., T. A. Weehuizen, K. Breitbach, K. Krause, H. K. de Jong, L. M. Kager, A. J. Hoogendijk, A. Bast, S. J. Peacock, T. van der Poll, I. Steinmetz and W. J. Wiersinga (2013). "Glyburide reduces bacterial dissemination in a mouse model of melioidosis." PLoS Negl Trop Dis **7**(10): e2500.

Koo, B. K. (2013). "Diabetes mellitus and tuberculosis." Diabetes Metab J **37**(4): 249-251.

Kuo, M. C., S. H. Lin, C. H. Lin, I. C. Mao, S. J. Chang and M. C. Hsieh (2013). "Type 2 diabetes: an independent risk factor for tuberculosis: a nationwide population-based study." PLoS One **8**(11): e78924.

Lamkanfi, M., J. L. Mueller, A. C. Vitari, S. Misaghi, A. Fedorova, K. Deshayes, W. P. Lee, H. M. Hoffman and V. M. Dixit (2009). "Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome." J Cell Biol **187**(1): 61-70.

Lee, J. and D. G. Lee (2015). "Antimicrobial Peptides (AMPs) with Dual Mechanisms: Membrane Disruption and Apoptosis." J Microbiol Biotechnol **25**(6): 759-764.

Li, D. L., Z. Y. Ma, Z. J. Fu, M. Y. Ling, C. Z. Yan and Y. Zhang (2014). "Glibenclamide decreases ATP-induced intracellular calcium transient elevation via inhibiting reactive oxygen species and mitochondrial activity in macrophages." PLoS One **9**(2): e89083.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lopez-Lopez, N., I. Gonzalez-Curiel, J. Castaneda-Delgado, A. Montoya-Rosales, B. Gandara-Jasso, J. A. Enciso-Moreno and B. Rivas-Santiago (2014). "Vitamin D supplementation promotes macrophages' anti-mycobacterial activity in type 2 diabetes mellitus patients with low vitamin D receptor expression." Microbes Infect **16**(9): 755-761.

Magee, M. J., M. Foote, D. M. Maggio, P. P. Howards, K. M. Narayan, H. M. Blumberg, S. M. Ray and R. R. Kempker (2014). "Diabetes mellitus and risk of all-cause mortality among patients with tuberculosis in the state of Georgia, 2009-2012." Ann Epidemiol **24**(5): 369-375.

Marino, S. and D. E. Kirschner (2004). "The human immune response to Mycobacterium tuberculosis in lung and lymph node." J Theor Biol **227**(4): 463-486.

Mayer, P., B. Haas, J. Celner, H. Enzmann and A. Pfeifer (2011). "Glitazone-like action of glimepiride and glibenclamide in primary human adipocytes." Diabetes Obes Metab **13**(9): 791-799.

Montoya-Rosales, A., P. Castro-Garcia, F. Torres-Juarez, J. A. Enciso-Moreno and B. Rivas-Santiago (2016). "Glucose levels affect LL-37 expression in monocyte-derived macrophages altering the Mycobacterium tuberculosis intracellular growth control." Microb Pathog **97**: 148-153.

Niazi, A. K. and S. Kalra (2012). "Diabetes and tuberculosis: a review of the role of optimal glycemic control." J Diabetes Metab Disord **11**(1): 28.

Nijnik, A. and R. Hancock (2009). "Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections." Emerging health threats journal **2**.

Ohgami, N., A. Kuniyasu, K. Furukawa, A. Miyazaki, H. Hakamata, S. Horiuchi and H. Nakayama (2000). "Glibenclamide acts as an inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase enzyme." Biochem Biophys Res Commun **277**(2): 417-422.

Olefsky, J. M. and C. K. Glass (2010). "Macrophages, inflammation, and insulin resistance." Annu Rev Physiol **72**: 219-246.

Olvera, E. (2000). "Panorama Epidemiológico de la diabetes mellitus." Rev Mex Enfermer Cardiol **8**(1-4): 56-59.

OMs (2013). Global tuberculosis report 2013. Executive summary, WHO/HTM/TB/2013.15. Geneva, Switzerland: WHO.

OMs (2014). Diabetes, ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD.

OMs (2014). Global Tuberculosis Report 2014, World Health Organization.

OMs (2015). TUBERCULOSIS, OMs.

Owen, M. R., E. Doran and A. P. Halestrap (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." Biochem J **348 Pt 3**: 607-614.

Pablos-Mendez, A., J. Blustein and C. A. Knirsch (1997). "The role of diabetes mellitus in the higher prevalence of tuberculosis among Hispanics." American Journal of Public Health **87**(4): 574-579.

Perez-Navarro, L. M., F. J. Fuentes-Dominguez and R. Zenteno-Cuevas (2015). "Type 2 diabetes mellitus and its influence in the development of multidrug resistance tuberculosis in patients from southeastern Mexico." J Diabetes Complications **29**(1): 77-82.

Piwkowska, A., D. Rogacka, M. Jankowski, M. H. Dominiczak, J. K. Stepinski and S. Angielski (2010). "Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes." Biochem Biophys Res Commun **393**(2): 268-273.

Pratley, R. E. and C. Weyer (2001). "The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type II diabetes mellitus." Diabetologia **44**(8): 929-945.

Rao, N., T. Chou, D. Ventura and W. Abramowitz (2005). "Investigation of the pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between memantine and glyburide/metformin in healthy young subjects: a single-center, multiple-dose, open-label study." Clin Ther **27**(10): 1596-1606.

Reddy, K. V., R. D. Yedery and C. Aranha (2004). "Antimicrobial peptides: premises and promises." Int J Antimicrob Agents **24**(6): 536-547.

Rekha, R. S., S. S. Rao Muvva, M. Wan, R. Raqib, P. Bergman, S. Brighenti, G. H. Gudmundsson and B. Agerberth (2015). "Phenylbutyrate induces LL-37-dependent autophagy and intracellular killing of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages." Autophagy **11**(9): 1688-1699.

Rena, G., E. R. Pearson and K. Sakamoto (2013). "Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights?" Diabetologia **56**(9): 1898-1906.

Restrepo, B. I. and L. S. Schlesinger (2014). "Impact of diabetes on the natural history of tuberculosis." Diabetes Res Clin Pract **106**(2): 191-199.

Reyes, J. A. O. and A. A. Plancarte "BASES MOLECULARES DE LAS ACCIONES." REB **2008**: 9.

Rivas-Santiago, B., J. E. Castaneda-Delgado, C. E. Rivas Santiago, M. Waldbrook, I. Gonzalez-Curiel, J. C. Leon-Contreras, J. A. Enciso-Moreno, V. del Villar, J. Mendez-Ramos, R. E. Hancock and R.

Hernandez-Pando (2013). "Ability of innate defence regulator peptides IDR-1002, IDR-HH2 and IDR-1018 to protect against Mycobacterium tuberculosis infections in animal models." PLoS One **8**(3): e59119.

Rivas-Santiago, B., R. Hernandez-Pando, C. Carranza, E. Juarez, J. L. Contreras, D. Aguilar-Leon, M. Torres and E. Sada (2008). "Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells." Infect Immun **76**(3): 935-941.

Rivas-Santiago, B., E. Sada, R. Hernández-Pando and V. Tsutsumi (2006). "Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas." Salud Pública de México **48**: 62-71.

Rivas-Santiago, B., S. K. Schwander, C. Sarabia, G. Diamond, M. E. Klein-Patel, R. Hernandez-Pando, J. J. Ellner and E. Sada (2005). "Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells." Infect Immun **73**(8): 4505-4511.

Rivas-Santiago, B., C. J. Serrano and J. A. Enciso-Moreno (2009). "Susceptibility to infectious diseases based on antimicrobial peptide production." Infect Immun **77**(11): 4690-4695.

Rivas-Santiago, B., P. Vieyra-Reyes and Z. Araujo (2005). "Respuesta de inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar: Revisión." Investigación Clínica **46**: 391-412.

Rucka, Z., P. Vanhara, I. Koutna, L. Tesarova, M. Potesilova, S. Stejskal, P. Simara, J. Dolezel, V. Zvonicek, O. Coufal and I. Capov (2013). "Differential effects of insulin and dexamethasone on pulmonary surfactant-associated genes and proteins in A549 and H441 cells and lung tissue." Int J Mol Med **32**(1): 211-218.

Saiiri, A. and M. Moslehi (2011). "Interactive effects of sulfonylurea drugs, aerobic and strength training on Glycemic control in type II diabetes." Procedia-Social and Behavioral Sciences **15**: 1792-1797.

Salmón, G. F., L. Sánchez-Reyes, E. Chiquete, J. De La Luz and A. E. Herrera (2011). "Registro multicéntrico internacional para evaluar la práctica clínica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2: subanálisis de la experiencia en México." Órgano Oficial de la Academia Nacional de Medicina de México, AC **147**: 226-233.

Samitas, K., S. Vittorakis, D. Chorianopoulos, E. Oikonomidou and M. Gaga (2007). "Immunological mechanisms in the lung." Pneumon **20**: 274-278.

Sarigianni, M., E. Bekiari, A. Tsapas, K. Topouridou, M. Kaloyianni, G. Koliakos and K. Paletas (2011). "Effect of glucose and insulin on oxidized low-density lipoprotein phagocytosis by human monocytes: a pilot study." Angiology **62**(2): 163-166.

Scott, M. G., D. J. Davidson, M. R. Gold, D. Bowdish and R. E. Hancock (2002). "The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses." J Immunol **169**(7): 3883-3891.

Scheen, A. J. and N. Paquot (2013). "Metformin revisited: a critical review of the benefit-risk balance in at-risk patients with type 2 diabetes." Diabetes Metab **39**(3): 179-190.

Scholtz, H. E., S. G. Pretorius, D. H. Wessels and R. H. Becker (2005). "Pharmacokinetic and glucodynamic variability: assessment of insulin glargine, NPH insulin and insulin ultralente in healthy volunteers using a euglycaemic clamp technique." Diabetologia **48**(10): 1988-1995.

Segovia, J., A. Sabbah, V. Mgbemena, S. Y. Tsai, T. H. Chang, M. T. Berton, I. R. Morris, I. C. Allen, J. P. Ting and S. Bose (2012). "TLR2/MyD88/NF-kappaB pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection." PLoS One **7**(1): e29695.

Sell, H. and J. Eckel (2009). "Chemotactic cytokines, obesity and type 2 diabetes: in vivo and in vitro evidence for a possible causal correlation?" Proc Nutr Soc **68**(4): 378-384.

Shahani, S. and L. Shahani (2015). "Use of insulin in diabetes: a century of treatment." Hong Kong Med J.

Sharma, H. and R. Nagaraj (2015). "Human beta-defensin 4 with non-native disulfide bridges exhibit antimicrobial activity." PLoS One **10**(3): e0119525.

SINAVE (2012). Perfil epidemiológico de tuberculosis en México, SINAVE/DGE/SALUD/.
Singhal, A., L. Jie, P. Kumar, G. S. Hong, M. K. Leow, B. Paleja, L. Tsenova, N. Kurepina, J. Chen, F. Zolezzi, B. Kreiswirth, M. Poidinger, C. Chee, G. Kaplan, Y. T. Wang and G. De Libero (2014). "Metformin as adjunct antituberculosis therapy." Sci Transl Med **6**(263): 263ra159.

Smith, A. J., T. K. Taneja, J. Mankouri and A. Sivaprasadarao (2007). "Molecular cell biology of KATP channels: implications for neonatal diabetes." Expert Rev Mol Med **9**(21): 1-17.

Sousa, A. G., G. F. Marquezine, P. A. Lemos, E. Martinez, N. Lopes, W. A. Hueb, J. E. Krieger and A. C. Pereira (2009). "TCF7L2 polymorphism rs7903146 is associated with coronary artery disease severity and mortality." PLoS One **4**(11): e7697.

SSA (2012). Situación actual de la tuberculosis en el Mundo, México y Veracruz. Avances y Desafíos, SECRETARIA DE SALUD.

SSA (2013). BOLETÍN EPIDEMIOLOGICO DIABETES MELLITUS TIPO 2 PRIMER TRIMESTRE-2013.

SSA (2013). MISIÓN DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL PROGRAMA DE CONTRÓL DE TUBERCULÓIS, SECRETARÍA DE SALUD DE MÉXICO: 6-115.

SSA (2014). Epidemiología y Determinantes Sociales en tuberculosis, SECRETARIA DE SALUD.

Stew, S. S., P. J. Martinez, L. S. Schlesinger and B. I. Restrepo (2013). "Differential expression of monocyte surface markers among TB patients with diabetes co-morbidity." Tuberculosis **93**: S78-S82.

Stewart, G. R., B. D. Robertson and D. B. Young (2003). "Tuberculosis: a problem with persistence." Nat Rev Microbiol **1**(2): 97-105.

Strowig, S. M., M. L. Aviles-Santa and P. Raskin (2002). "Comparison of insulin monotherapy and combination therapy with insulin and metformin or insulin and troglitazone in type 2 diabetes." Diabetes Care **25**(10): 1691-1698.

Sun, J., Y. Xia, D. Li, Q. Du and D. Liang (2014). "Relationship between peptide structure and antimicrobial activity as studied by de novo designed peptides." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1838**(12): 2985-2993.

Téllez, G. A. and J. C. Castaño (2010). "Péptidos antimicrobianos." Infectio **14**(1): 55-67.

Torres-Juarez, F., A. Cardenas-Vargas, A. Montoya-Rosales, I. Gonzalez-Curiel, M. H. Garcia-Hernandez, J. A. Enciso-Moreno, R. E. Hancock and B. Rivas-Santiago (2015). "LL-37 immunomodulatory activity during Mycobacterium tuberculosis infection in macrophages." Infect Immun **83**(12): 4495-4503.

Tsuei, A. C. and R. D. Martinus (2012). "Metformin induced expression of Hsp60 in human THP-1 monocyte cells." Cell Stress Chaperones **17**(1): 23-28.

Ugarte-Gil, C. and D. A. Moore (2014). "[Tuberculosis and diabetes co-morbidity: an unresolved problem]." Rev Peru Med Exp Salud Publica **31**(1): 137-142.

van Crevel, R., T. H. Ottenhoff and J. W. van der Meer (2002). "Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis." Clin Microbiol Rev **15**(2): 294-309.

Vandamme, D., B. Landuyt, W. Luyten and L. Schoofs (2012). "A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide." Cell Immunol **280**(1): 22-35.

Viollet, B. and M. Foretz (2013). "Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver." Ann Endocrinol (Paris) **74**(2): 123-129.

Wallia, A. and M. E. Molitch (2014). "Insulin therapy for type 2 diabetes mellitus." JAMA **311**(22): 2315-2325.

Wang, H., Y. Ni, S. Yang, H. Li, X. Li and B. Feng (2013). "The effects of gliclazide, metformin, and acarbose on body composition in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus." Curr Ther Res Clin Exp **75**: 88-92.

Wang, J., Q. Gao, D. Wang, Z. Wang and C. Hu (2015). "Metformin inhibits growth of lung adenocarcinoma cells by inducing apoptosis via the mitochondria-mediated pathway." Oncol Lett **10**(3): 1343-1349.

Weekers, F., A. P. Giulietti, M. Michalaki, W. Coopmans, E. Van Herck, C. Mathieu and G. Van den

Berghe (2003). "Metabolic, endocrine, and immune effects of stress hyperglycemia in a rabbit model of prolonged critical illness." Endocrinology **144**(12): 5329-5338.

White, M. F. (2009). "Metformin and insulin meet in a most atypical way." Cell Metab **9**(6): 485-487.

WHO. (2015). Global tuberculosis report 2015, World Health Organization.

Wurm, S., M. Neumeier, J. Weigert, J. Wanninger, M. Gerl, A. Gindner, A. Schaffler, C. Aslanidis, J.

Scholmerich and C. Buechler (2008). "Insulin induces monocytic CXCL8 secretion by the mitogenic signalling pathway." Cytokine **44**(1): 185-190.

