



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFECTO BACTERICIDA DEL CLORHIDRATO DE LOPERAMIDA SOBRE EL CRECIMIENTO DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

DIEGO ALFONSO CASTRO VILLEDA

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. SILVIA GUZMAN BELTRAN



CIUDAD DE MÉXICO

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:



Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” por prestar sus instalaciones, así como la oportunidad para la elaboración de este proyecto.



A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido ser parte de esta gran casa de estudio, espero y sé firmemente que después de esfuerzos, sacrificios y dedicación podré regresarle un poco de todo lo que me otorgó esta institución.

A la Dra. Silvia Guzmán, por compartir sus conocimientos y observaciones que ayudaron a enriquecer el presente trabajo además de intervenir en mi desarrollo profesional.

A mis asesores QFB Patricia Vidal Millán y QFB Gildardo Herrera por su apoyo en la realización de mi tesis.

A grandes profesores que tuve durante el trascurso de toda mi carrera pues la manera de presentar su clase sin duda alguna hicieron apreciar y estar enamorado aún más la carrera de QFB, además de ser ejemplos a seguir gracias QFB Patricia Vidal, QFB Pablo Juárez, Dr José Luis Mora, QFB Gabriel Romero Díaz (QEPD) y QFB María del Pilar Cedillo.

A mis amigos especialmente al *team Locomia (Mary, Viri y Suas)*, porque mi último año de la carrera no hubiera sido el mismo sin ustedes.

A aquellas personas que estuvieron conmigo a lo largo de mi estancia en la FES Zaragoza, pero que por algún motivo u otro no permanecieron hasta el final... aprendí de cada uno de ustedes.

Dedicatoria

A mi madre y mi padre por los valores y principios que me inculcaron, por su gran apoyo y confiar en mí ciegamente durante toda mi vida, pues sin ellos este momento no hubiera sido posible.

A mis hermanas para demostrarles que "si se pudo burro... si se pudo" y aguantarme durante todos estos años incluyendo todos mis ensayos de las exposiciones durante la carrera. Las quiero.

*“Duda siempre de ti mismo,
hasta que los datos no dejen lugar a dudas”*

-Louis Pasteur-

ABREVIATURAS

ADC	Albúmina bovina, dextrosa, catalasa
ADN	Acido desoxirribonucleico
AG	Arabinogalactano
AM	Arabinomanano
ATCC	American Type Culture Collection
cMAP	Complejo ácido micólico-arabinogalactano-peptidoglicano
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and Drug Administration
FQ	Fibrosis quística
GlcNaC	N-acetil glucosamina
LAM	Lipoarabinomanana
LM	Lipomanano
MA	Ácido micólico
MDR	Multidrogo resistente
MmpL	Membrane mycobacteria protein Large
MNT	Micobacterias no tuberculosas
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

MurNaC	Acido N.acetilmurámico
MurNGlyC	Acido N-glicolilmurámico
OADC	Ácido oleico, albumina bovina, dextrosa, catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFS	Pruebas de sensibilidad a los fármacos
PG	Peptidoglicano
REMA	Ensayo de microtitulación de resazurina
RND	Resistance-nodulacion-division
RR	Resistente a rifampicina
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
TB	Tuberculosis
TBA	Tuberculosis activa
TBL	Tuberculosis latente
TDM	Trehalosa dimicolato
TMM	Trehalosa monomicolato
UFC	Unidad formadora de colonia
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia humana
XDR	Extensamente drogoresistente

INDICE

Introducción	1
Marco teórico	2
TB Fármaco-Resistente	4
Etiología de la tuberculosis	5
Infecciones causadas por bacterias no tuberculosas	5
Contagio de la TB	6
Género <i>Mycobacterium</i>	7
Características microscópicas.....	7
Condiciones de cultivo	7
Características macroscópicas	8
Loperamida	15
Mecanismo de acción	15
Clorhidrato de loperamida.....	16
Efectos adversos	17
Contraindicaciones.....	17
Posología.....	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	19
Características microscópicas.....	19
Características de cultivo	19
Pared celular	20
<i>Escherichia coli</i>	21
<i>E. coli</i> Enterohemorrágica.....	22
Pared celular	23
Planteamiento del Problema:	24
Preguntas de investigación:	24

Hipótesis	24
Objetivos:	24
Metodología:	25
1. Crecimiento y condiciones de cultivo:	25
1.1 <i>Cultivo de cepas micobacterianas tuberculosas</i>	25
1.2 <i>Cultivo de cepas micobacterianas no tuberculosas MNT</i>	26
1.3 <i>Cultivo de Staphylococcus aureus (ATCC 25923)</i>	26
1.4 <i>Cultivo de Escherichia coli (ATCC 25922 y 43895 DQ)</i>	26
2. Efecto bactericida del clorhidrato de loperamida.	26
2.1 <i>Preparación de soluciones de clorhidrato de loperamida</i>	26
2.2 <i>Preparación de suspensiones bacterianas</i>	27
2.3 <i>Determinación de la actividad bacteriana</i>	27
2.4 <i>Ensayo de la resazurina</i>	29
2.5 <i>Determinación de las unidades formadoras de colonia</i>	30
3. Análisis Estadístico	32
Resultados	33
<i>Efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento de las cepas de Mycobacterium por el ensayo de la resazurina</i>	33
<i>Efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento de E. coli y S. aureus por el ensayo de la resazurina</i>	34
<i>Efecto del clorhidrato de loperamida frente a diferentes microorganismos. (Ensayo UFC)</i>	35
Discusión	39
Conclusiones:	45
Referencias:	46
ANEXOS	52

Introducción

La tuberculosis (TB) es una de las 10 causas principales de mortalidad y la primera por muerte por un agente infeccioso específico ^[1]. Es una de las enfermedades infecciosas más antiguas conocidas, se cree que el género *Mycobacterium* apareció hace 150 millones de años. En estudios genéticos se documenta que *M. tuberculosis* tal cual se conoce en la actualidad ha estado presente en los últimos 15,000 a 20,000 años ^[2], siendo así probablemente el microorganismo que ha matado a más personas en la historia de la humanidad.

La Organización Mundial de la Salud declara a la TB como una enfermedad reemergente debido a su asociación con el VIH/SIDA y a la aparición de cepas multiresistentes a fármacos de primera línea, por lo que el realizar investigaciones dedicadas al reposicionamiento de medicamentos puede ser una estrategia útil y más rápida para tratar la TB.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre cultivos de micobacterias tuberculosas y no tuberculosas causantes de infecciones respiratorias.

Marco teórico

A nivel mundial, se estima que aproximadamente 10 millones de personas enfermaron de TB en 2019, un número que ha sido relativamente estable en los últimos años, la tuberculosis ocasionó 1.4 millones de muertes entre personas VIH negativas (2 millones más que el 2018) y 208,000 muertes adicionales entre personas VIH positivas ^[3] (251,000 en el 2018). En la figura 1 se muestran los países más afectados por esta enfermedad.

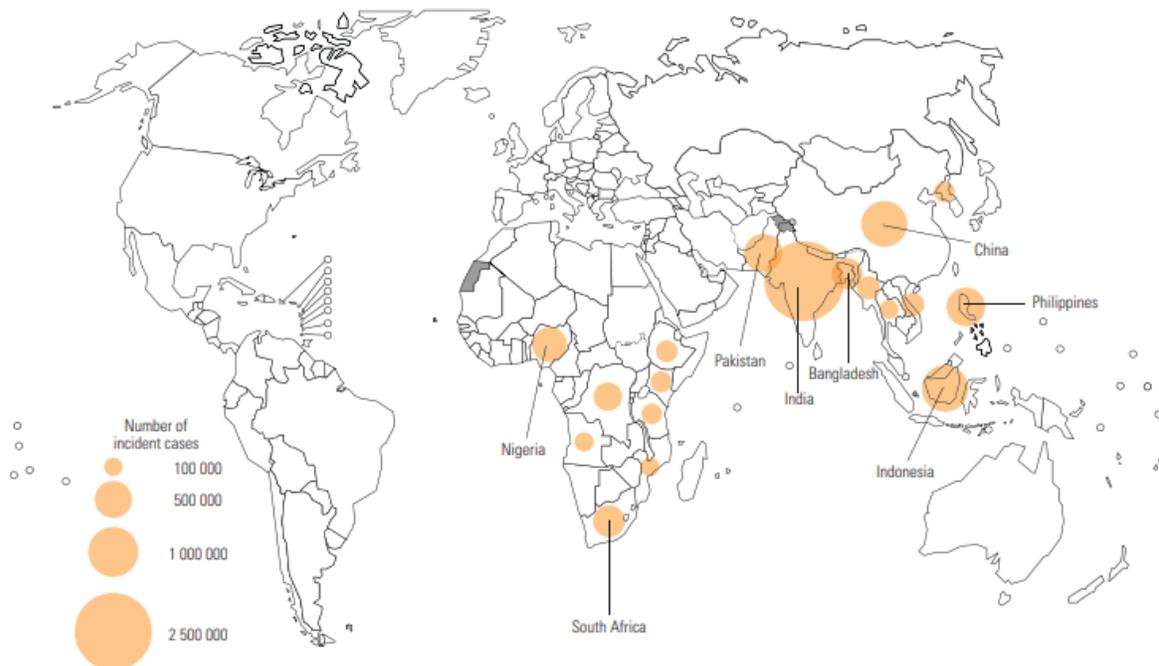


Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis en el 2018. Tomada de [3]

De acuerdo a la OMS, cerca del 67% de los nuevos casos de tuberculosis a nivel mundial se concentra en 8 principales países: India (26%), Indonesia (9%), China (8%), Filipinas (6%), Pakistán (6%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) y Sudáfrica (4%) ^[3]. En la tabla 1 se reportan los casos de TB en los países más afectados a nivel global.

Tabla 1. Países con mayor carga epidemiológica de TB en 2019

País	Casos en miles	Casos por cada 100,000 habitantes
India	2640	193
Indonesia	845	312
China	833	58
Filipinas	599	554
Pakistán	570	263
Nigeria	440	219
Bangladesh	361	221
Sudáfrica	360	615

Por otro lado, en el continente americano se reportaron 235,345 casos nuevos y recaídas de TB en el año 2018, siendo los principales países Brasil, Perú y México, (este último con un aproximado de 29 mil casos,) donde se concentró poco más de la mitad de los casos reportados. Sin embargo los que tuvieron una mayor incidencia por cada 100,000 habitantes fueron Haití, Perú, Bolivia, Guyana y República Dominicana [4].

La tasa estimada de incidencia en TB en México en el 2017 fue de 21,697 nuevos casos de TB, de los cuales 17,104 (el 78.8%) fueron de TB pulmonar, a pesar de los esfuerzos en materia de prevención, la tasa de incidencia se ha mantenido constante desde la última década [5]. Los estados con el mayor número de casos fueron: Veracruz, Baja California, Chiapas, Nuevo León, Guerrero, Tamaulipas, Sonora y Sinaloa [5]. En la tabla 2 se reporta el número de casos de los estados con mayor incidencia.

Tabla 2. Incidencia de TB pulmonar por estado en México de 2017

Estado	Casos	Porcentaje (%)
Veracruz	1950	11.4
Baja california	1594	9.32
Chiapas	1217	7.12
Nuevo León	1215	7.10
Guerrero	1062	6.21
Tamaulipas	1061	6.20
Sonora	930	5.44
Sinaloa	828	4.84

TB Fármaco-Resistente

En los últimos años se ha observado un incremento en casos de TB resistente a fármacos. Este fenómeno se atribuye principalmente a fallas técnico operativas entre las que se incluyen: aquellas personas que no toman sus medicamentos de acuerdo a las indicaciones médicas o que no completan su tratamiento; así como médicos que prescriben el tratamiento de forma incorrecta; cuando las dosis y/o duración del tratamiento no es la correcta y; cuando no hay disponibilidad permanente de medicamentos o estos son de mala calidad.

Durante los años de 2010 al 2018 se han registrado en México un promedio de 950 casos al año de TB resistente a fármacos (ingresando a tratamiento el 86%) con esquemas de tratamiento específico con fármacos antituberculosis de segunda línea, con una conversión bacteriológica de 79% a los seis meses de haber iniciado su tratamiento y un éxito terapéutico del 71% [6].

El 70% de TB resistente a fármacos se concentra en ocho entidades federativas: Nuevo León, Veracruz, Baja California, Guerrero, Tamaulipas, Puebla, Estado de México y Chiapas [6].

La fármaco-resistencia se clasifica en función de las pruebas de sensibilidad a los fármacos (PFS):

- Mono-resistencia: Cuando existe resistencia a sólo un medicamento antituberculosis de primera línea.
- Poli-resistencia: Hay resistencia a más de un medicamento antituberculosis de primera línea (que no sea isoniacida y rifampicina de forma simultánea).
- Multidrogo-resistencia (MDR): resistencia al menos a la isoniacida y a rifampicina pero en forma simultánea.
- Extensamente resistente (XDR): resistencia a isoniacida, rifampicina, a cualquier fluoroquinolona y al menos uno de los tres medicamentos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina).

- Resistencia a la Rifampicina (RR): detectada utilizando métodos *fenotípicos* y *genotípicos*, con o sin resistencia a otros medicamentos antituberculosis^[6, 7].

Etiología de la tuberculosis

El principal agente causal de la TB es *Mycobacterium tuberculosis*, perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* conformado además por *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis* y *M. murgii*, caracterizados por tener una divergencia en su genoma del 0,05% ^[8]. En la tabla 3 se describe la ubicación taxonómica de *M. tuberculosis*.

Tabla 3. Clasificación taxonómica del género *Mycobacterium tuberculosis*.

Dominio	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Actinobacteria</i>
Orden	<i>Actinomycetales</i>
Familia	<i>Mycobacteriaceae</i>
Género	<i>Mycobacterium</i>
especie	<i>tuberculosis</i>

Libro: Atlas de micobacterias pag. 4 ^[9]

Infecciones causadas por bacterias no tuberculosas

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) se refiere a las especies micobacterianas que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis* y *M. leprae*. Son bacterias extensamente distribuidas en el ambiente que pueden aislarse de tierra, agua, e incluso varios animales y pueden ser patógenos oportunistas para el ser humano produciendo micobacteriosis ^[10, 11].

Las infecciones por MNT son comunes en individuos que presentan susceptibilidad inmunológica por ejemplo son recurrentes en sujetos con VIH. Sin embargo en los últimos 25 años se ha considerado una enfermedad re-emergente, ya que ha existido un incremento en pacientes con alguna otra enfermedad pulmonar existente e inclusive en personas sin factores de riesgo específico (fibrosis quística, FQ) e infección por VIH.

La información precisa de la incidencia y prevalencia de las infecciones causadas por MNT es limitada debido a que no es de reporte obligatorio a las autoridades de salud, pero en las últimas décadas ha sido evidente el incremento de estas infecciones por estos microorganismos con una incidencia de 16.6% en 1999 y 2000 en enfermedades pulmonares, que representa un incremento de 11.2% con respecto a lo encontrado en 1971 y 1972 en Estados Unidos de América. En Canadá, la prevalencia de aislamientos de MNT ha incrementado anualmente 8.4% entre 1997 y 2003 [12].

Las especies de MNT más asociadas a esta enfermedad son aquellas que pertenecen al complejo *M. avium* (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. arosiense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. bouchedurhonense* y *M. ituriense*), seguidos por *M. kansasii*, *M. marinum*, algunas más de crecimiento rápido como *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* [11, 12].

Contagio de la TB

La principal fuente de transmisión de TB es por la diseminación aérea del bacilo, los cuales son aerolizados en pequeñas gotas del tamaño de 1-5µm (denominadas gotitas de pflügge), generadas al toser o estornudar por personas que padecen la enfermedad. Las gotas de un mayor tamaño quedan retenidas en la mucosa de las vías respiratorias altas y son eliminadas, mientras que las de un menor tamaño pueden llegar al pulmón [7].

De los pacientes expuestos cerca del 70% de los individuos no se infectan, mientras que el 30% desarrollan infección primaria. El hospedero responde inmediatamente a la infección primaria e inicia la respuesta inmune innata de los macrófagos y neutrófilos que fagocitan al patógeno e inician la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) para eliminarlo. Seguido de una presentación de antígeno por células dendríticas, inmunidad celular y la infiltración de células inmunes. Todo lo anterior restringe la replicación y la diseminación bacteriana formando un granuloma. La micobacteria permanece en el granuloma en un estado

latente no replicativo produciendo TB latente (TBL), en la cual el 90% de los casos las personas son asintomáticas mientras que alrededor del 5 % desarrolla TB activa (TBA) caracterizada por hemoptisis masiva, respuesta inmune desregulada y daño tisular extenso [13].

Los principales factores que elevan la tasa de contagio es la alta carga bacilar del paciente enfermo, las formas en que las personas viven, trabajan o están en contacto (espacios cerrados y circulación de aire limitada) al igual que el tiempo de exposición con los enfermos, además de la capacidad de los sistemas de salud para identificar y tratar de manera efectiva a estas personas [14]. Es por esto que una forma efectiva de evitar la transmisión es detectando al paciente y otorgarle el tratamiento adecuado, al igual que disminuir el contacto estrecho con estos pacientes.

Género *Mycobacterium*

Características microscópicas.

Las micobacterias son bacilos delgados rectos o ligeramente curvos, de un tamaño de 1-10 micras de largo por 0.2-0.6 micras de ancho. Son bacilos aerobios estrictos, no esporulados, no móviles y se tiñen con dificultad con la tinción de Gram, esto debido a su pared celular tan gruesa y con un alto contenido rico de lípidos, por lo que resisten la decoloración acido-alcohol otorgándoles el nombre de bacterias acido-alcohol resistentes [15].

Condiciones de cultivo

Las micobacterias pueden crecer utilizando glicerol como fuente de carbono, exceptuando a *M. bovis* ya que no puede procesar este compuesto o lo hace con dificultad, por lo que es recomendado usar para este microorganismo, medios con piruvato o glutamato de sodio; asparagina e iones de amonio como una fuente de nitrógeno y; albumina que es incorporada en los medios con seroalbumina bovina [16].

El bacilo de la tuberculosis tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37°C, muy difícilmente crece a 34°C e incluso puede morir a temperaturas superiores a los 40°C. El pH óptimo es el neutro o muy cercano a este tanto para micobacterias

tuberculosas como MNT. Referente a estas últimas, (las MNT) prefieren temperaturas un poco más bajas ^[16] siendo desde los 28°C a los 37°C, aunque la mayoría de las MNT con significancia clínica crecen en el rango de 35-37°C ^[12,15] exceptuando *M. haemophilum* y *M. marinum* cuya temperatura óptima es de 28-30°C y *M. ulcerans* la cual crece entre 25-33°C ^[12].

Aquellas micobacterias que crecen en medios sólidos en los primeros 3-7 días se conocen como micobacterias de crecimiento rápido y en las que se observan colonias después de 7 días son denominadas de crecimiento lento ^[12].

Características macroscópicas

La morfología colonial varía entre las especies, además del medio en el que se cultivan, por ejemplo en la figura 2. Mtb en medio Middlebrook 7H10 presenta colonias grandes, compactas, secas, ásperas, con un borde comúnmente regular y una coloración blanquecina/ crema, mientras que en el medio Löwestein Jensen (LJ) tienen un aspecto rugoso, granular, seco, con una apariencia de “migajas de pan”. Por otro lado *M. smegmatis*, presenta en medio LJ colonias rugosas de bordes irregulares, con una característica de festones hacia el centro.

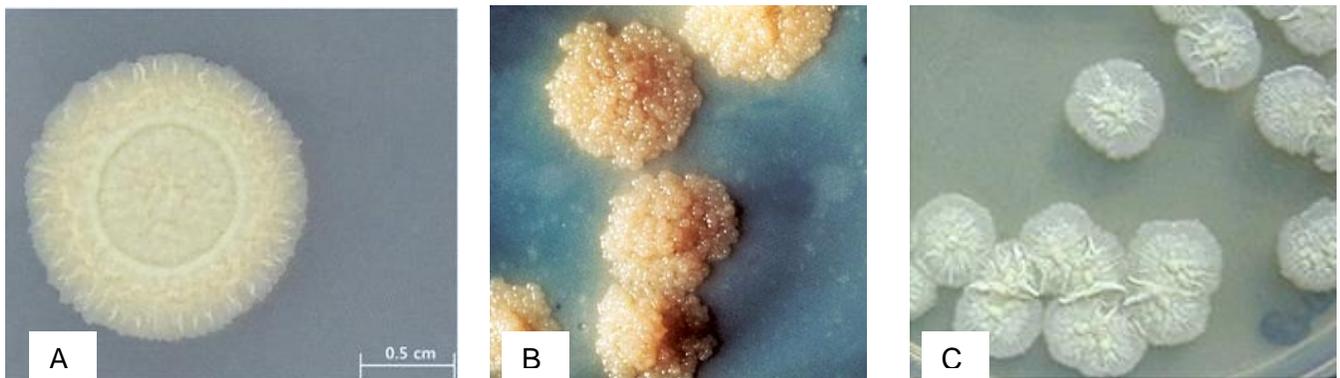


Figura 2. Colonias de: A) *Mtb* en medio Middlebrook 7H10-OADC, B) *Mtb* en medio Löwestein Jensen, C) *M. smegmatis* en medio Middlebrook 7H10-OADC. Tomada de Han SJ, 2015; George Kubica/CDC; Kumar A, 2017.

En 1950, Timpe y Runyon propusieron una clasificación de *Mycobacterium sp* en 4 grandes grupos con base a su capacidad de producir pigmentaciones en presencia o ausencia de luz y en su tiempo de crecimiento. En la tabla 4 se reportan la clasificación de las micobacterias más frecuentes: aquellas no pigmentadas se les conoce como no foto cromógenas; las pigmentadas son ligeramente amarillas, aunque pueden ser anaranjadas o raramente rosadas, debido principalmente a los pigmentos carotenoides; algunas especies requieren luz para formar pigmento (llamada fotocromógenas); mientras que otras especies pueden formar pigmento en la luz o en la oscuridad (escoto cromógenas) [15]. La figura 3 muestra algunos ejemplos de las diferentes características de acuerdo a la clasificación de Timpe y Runyon.

Tabla 4. Clasificación de Runyon de las Micobacterias más frecuentes aisladas en muestras clínicas

Micobacterias de crecimiento Lento			<i>Micobacterias de crecimiento rápido</i>
Grupo I Fotocromógenas	<i>Grupo II Escotocromógenas</i>	<i>Grupo III No cromógenas</i>	Grupo IV Crecimiento rápido
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. mucogenicum</i>
	<i>M. xenopi</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. peregrinum</i>
		<i>M. haemophilum</i>	<i>M. porcinum</i>
		<i>M. intracellulare</i>	<i>M. smegmatis</i>
		<i>M. malmcense</i>	
		<i>M. shimoidei</i>	
		<i>M. terrae</i>	
		<i>M. triviale</i>	
		<i>M. tuberculosis</i>	
		<i>M. ulcerans</i>	

Tomada y editada de [14]

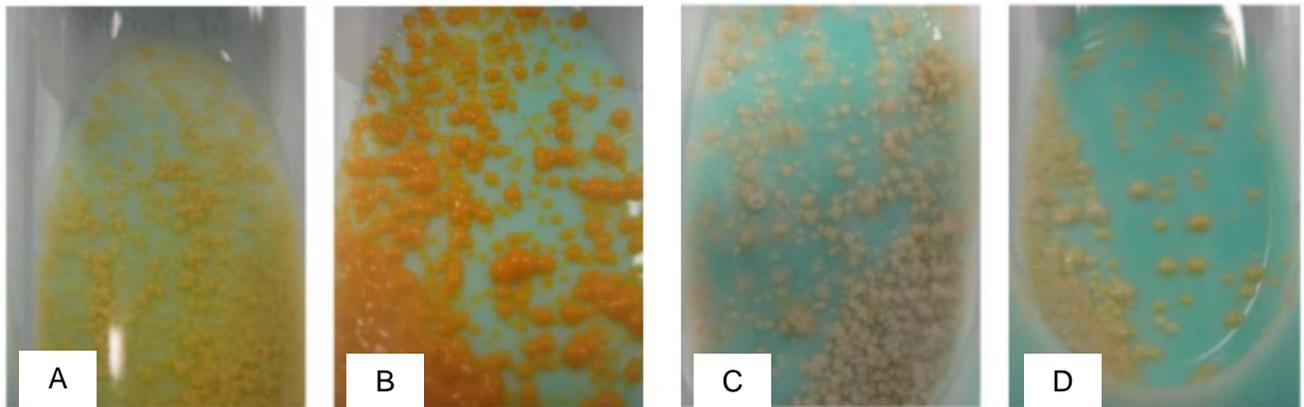


Figura 3. Micobacterias cultivadas en medio Ogawa. A) *M. kansasii* (Grupo I Fotocromógena), B) *M. goodii* (Grupo II Escotocromógena), C) *M. tuberculosis* (Grupo III No cromógena), D) *M. avium* (Grupo III No cromógena) Tomada de The Research Institute of Tuberculosis, Japon Anti-tuberculosis Association.

Envoltura celular de *Mycobacterium*

La envoltura de *M. tuberculosis* es una estructura compleja la cual está constituida por “cápsula” (formada de polisacáridos unidos a lípidos y proteínas), pared celular y membrana plasmática [17]. En la figura 4 se ilustra la complejidad de la pared de las micobacterias.

Los componentes principales de la pared celular micobacteriana es la capa de peptidoglicano (PG), ácido micólico (MA) y arabinogalactano (AG). La pared celular micobacteriana se asemeja a la de las bacterias grampositivas por tener una capa de PG casi tan gruesa y a las gramnegativas al tener una capa cerosa externa que imita una “membrana externa”.

La pared celular de las micobacterias juega un papel clave en la resistencia intrínseca a los antibióticos y la virulencia, pero no está claro por qué y cómo evolucionó su compleja estructura [18]. Su alto porcentaje de lípidos le otorga las características ácido-alcohol resistente, resistencia a la desecación y a la acción de los descontaminantes tanto ácidos como alcalinos.

En su lado interno contiene una capa de PG (siendo un polímero de gran tamaño cuyo papel principal es mantener la estabilidad osmótica), la cual se une covalentemente a AG que a su vez sirve como sitio de fijación para AM de cadena larga. A esto se le conoce como el núcleo de la pared celular “core” o como el complejo MA-AG-PG (cMAP).

Más allá del cMAP en la parte exterior de la pared, hay lípidos libres, fosfatidil inositol manósidos, lipomananos (LM) y lipoarabimananos (LAM) [18].

El glucolípido más abundante de Mtb es la 6-6'-dimetiltrehalosa (TDM), conocido como factor cordón debido a que provoca que los bacilos se dispongan de manera paralela y en forma de cadenas observándose microscópicamente como un cordón y como una red de filamentos en medios líquidos. Este compuesto es tóxico para los leucocitos inhibiendo la función de la succinato deshidrogenasa actuando específicamente en el segmento entre el complejo II y el complejo III de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, provocando una inflamación y ruptura de las mismas disminuyendo la actividad respiratoria y fosforilativa [19, 20]. El TDM además está relacionado con la capacidad de producir granulomas caseosos [21].

Los lípidos de la pared celular vuelven hidrófoba a las micobacterias, esta capacidad hace que estos microorganismos sean resistentes a la coloración con tinciones básicas de anilina, a menos que éstas se apliquen durante periodos prolongados o con la presencia de calor o detergentes [22].

Si bien la estructura básica de PG se conserva, es importante mencionar que la PG en micobacterias sufre algunas modificaciones. El PG aislado de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* además del N-acetil glucosamina (GlcNaC), contiene tanto ácido N-acetil murámico (MurNaC) como ácido N-glicolilmurámico (MurNGlyc), mientras que en otras bacterias solo contiene MurNaC (como es el caso de *M. leprae*), la presencia de MurNGlyc aumenta la resistencia de micobacterias a lisozimas [18].

La membrana celular presenta las mismas características que cualquier otra membrana, sin embargo en micobacterias los derivados de fosfolípidos son altamente glicosilados formando moléculas como LAM (lipoarabinomanano) [17].

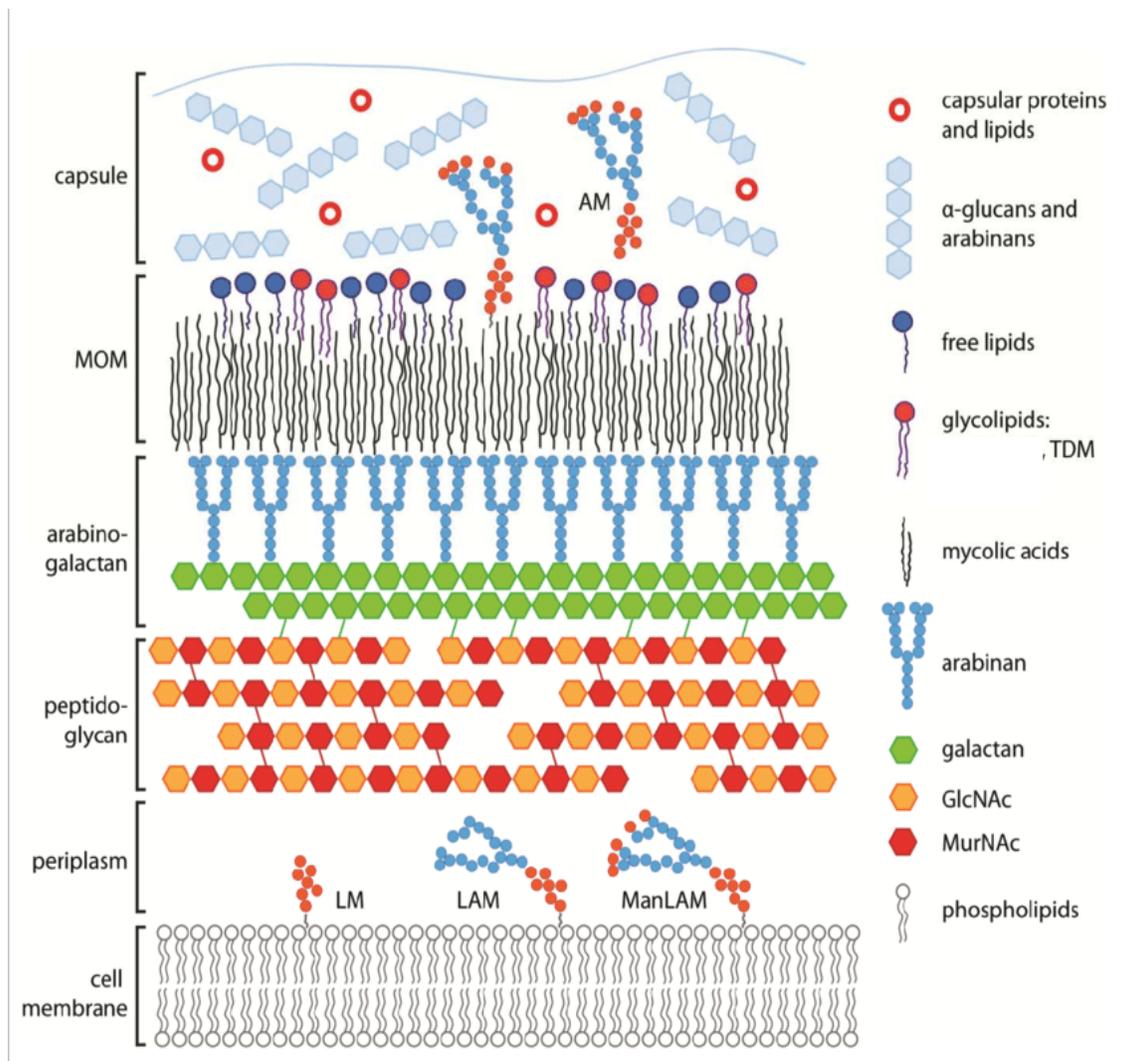


Figura 4. Representación de la pared celular de *M. tuberculosis*. MOM= membrana externa de la micobacteria, LM= lipomanano, AM= arabinomanano, LAM= lipoarabinomanano, ManLaM= manosa-LAM, GlcNac = N-acetilglucosamina, MurNA= ácido N-acetil murámico, TDM= 6-6'-dimetiltehalosa. Tomada de Raffetseder J. 2016 DOI: 10.3384/diss.diva-132321

Tratamiento:

La enfermedad se puede tratar tomando varios medicamentos durante un periodo mínimo de 6 meses. Para tratar la TB sensible a todos los fármacos, se utiliza la combinación de 4 antibióticos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol). Después de 2 meses de este tratamiento, se continúa con isoniazida y rifampicina por un periodo adicional de 4 meses.

Debido a esta larga terapia los pacientes se sienten abrumados por la carga de fármacos o sufren algunos efectos secundarios a la medicación y abandonan el tratamiento antes de que culmine, produciendo la recaída de la infección y la aparición de micobacterias resistentes a estos fármacos, lo que resulta en un tratamiento más extenso (18-24 meses) utilizando otra clase de medicamentos menos efectivo y más tóxico que el primero [23].

Para pacientes con TB resistente a todos los fármacos utilizados para tratar esta enfermedad, se recomienda fármacos de 3era línea, los cuales presentan una mayor toxicidad y el tratamiento es más largo que para uno con multidrogo resistente [24]. En la tabla siguiente se enlistan los fármacos utilizados para tratar la TB y los efectos adversos.

Tabla 5. Clasificación de fármacos antituberculosos y sus efectos adversos

<i>Clasificación</i>	<i>Fármacos pertenecientes</i>		<i>Efectos adversos</i>	<i>Características</i>
Primera Línea	Isoniacida	INH	Hepatitis, Hipersensibilid ad	Se recomienda la combinación de 4 fármacos. Administración por 6 meses.
	Rifampicina	RIF	Hepatitis, neuritis periférica	
	Piraziamida	PZA	Hepatitis. hiperuricemia	
	Etambutol	EMB	Neuritis óptica	

Segunda línea	Estreptomina	STM	Nefrotoxicidad	Constituida por amino glucósidos, fluoroquinolonas orales e inyectables.
	Kanamicina	KM	Ototoxicidad, nefrotoxicidad	
	Amikacina	AMK	Ototoxicidad, nefrotoxicidad	
	Capreomicina	CM	Ototoxicidad, nefrotoxicidad	
	Levofloxacin	LFX	Tenosinovitis	
	Moxifloxacin	MXF	Tenosinovitis	

Tabla 5.(continuación) Clasificación de fármacos antituberculosos y sus efectos adversos

Segunda línea	Ácido paraaminosalicílico	PAS	Gastroenteritis, hepatitis	Tratamiento de 18-24 meses, consiste en una combinación de 4-6 fármacos
	Cicloserina	DCS	Alteraciones personalidad, depresión	
	Etionamida	ETO	Gastroenteritis	
	Protionamida	PTO	Hepatitis	
	Linezolid	LZD	Pancitopenia, polineuritis	
Tercera línea	Clofazimina	ZLC	Enteritis eosinofila	Recomendados en pacientes XMDR-TB. tiempo de administración superior a los 24 meses
	Amoxicilina con ácido clavulánico	AMX/CLV		
	Meropenem	IPM/CLN	Alteraciones hematológicas	
	Claritromicina	CLR		

Tomada y editada de [24, 25]

Loperamida

Loperamida(4-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-1-piperidil]-N,N-dimetil-2,2-difenil butanamida) es un derivado de fenilpiperidina sintetizado en 1969 y aprobado por por la agencia Food and Drug Administration (FDA) en 1976. Es un antidiarreico sintético relacionado químicamente con los opiáceos, está indicado para el control y alivio sintomático de diarrea aguda y la diarrea crónica inespecífica asociada con la enfermedad inflamatoria intestinal [26]. La Figura 5 muestra la estructura química de este fármaco.

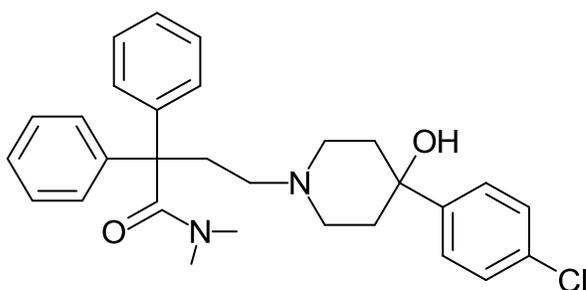


Figura 5. Estructura química de loperamida.

Mecanismo de acción

Actúa sobre receptores opioides μ del intestino grueso en el plexo mientérico. Como consecuencia, inhibe la liberación de acetilcolina y prostaglandinas, disminuyendo la actividad del plexo mientérico, lo que disminuye la motilidad de los músculos lisos circulares y longitudinales de la pared intestinal. Esto aumenta la cantidad de tiempo que las sustancias permanecen en el intestino, por lo que se modifica el transporte intestinal de agua y electrolitos estimulando su absorción. El clorhidrato de loperamida también disminuye los movimientos de la masa del colon además de aumentar el tono del esfínter anal, lo que reduce la incontinencia y la urgencia [27, 28].

Paradójicamente, la loperamida reduce la absorción de glucosa y otros nutrientes dependiente del sodio en el intestino delgado [28].

Clorhidrato de loperamida

Es la forma generalmente como se puede obtener la loperamida, en la mayoría de los países está disponible genéricamente bajo marcas como Lopex ®, Imodium ®, Dimor ® y Pepto Diarrhea Control [26-28].

Farmacocinética: [26-28]

Biodisponibilidad. La biodisponibilidad sistémica es aproximadamente del 0.3% debido al metabolismo de primer paso que ocurre antes de la absorción sistémica.

Absorción. Las concentraciones plasmáticas de Clorhidrato de loperamida son más altas aproximadamente 5 horas después de su administración de la cápsula y 2.5 horas después del líquido.

Distribución. La unión a proteínas plasmáticas del clorhidrato de loperamida es del 95-97%, este fármaco no cruza la barrera hematoencefálica, en parte esto se debe a que es un sustrato para la glicoproteína P, el transportador de membrana de flujo de salida en esta barrera, y aunque la loperamida es altamente lipofílica se excluye activamente del Sistema Nervioso Central (SNC), en consecuencia a diferencia de la morfina (que tiene efectos de estreñimiento tanto centrales como periféricos), el clorhidrato de loperamida actúa solo de manera periférica. Aunado a esto el resultado de la alta área de la sección transversal en la interfaz hidrofílica/hidrofóbica que presenta este fármaco.

Metabolismo. Se metaboliza, conjuga y excreta por vía biliar. Su principal vía de metabolismo es la N-desmetilación oxidativa, mediada por isoenzimas del citocromo P450 (CYP450), CYP2C8 y CPYP3A4, y en menor cantidad CYP2B6 y CYP2D6 formando N-demetil loperamida.

Excreción

La excreción del clorhidrato de loperamida inalterada y de sus metabolitos ocurre principalmente a través de las heces (30-40%) y orina (2-10%) con una vida media de 10.8 horas.

Efectos adversos

Puede incluir calambres, náuseas, dispepsia, somnolencia, fatiga, cansancio, mareos, dolor de cabeza y boca seca, sin embargo, estas reacciones adversas son autolimitados por el corto plazo de la administración del fármaco.

Contraindicaciones

El tratamiento debe evitarse en presencia de fiebre o si las heces son sanguinolentas. El tratamiento no se recomienda para pacientes que podrían sufrir efectos perjudiciales por el estreñimiento de rebote. Si existe sospecha de diarrea asociada con organismos que pueden penetrar las paredes intestinales, como *E. coli O157: H7* o salmonella, el clorhidrato de loperamida está contraindicada.

Posología

Para adultos y adolescentes se recomienda una dosis de 4mg después de la primera evacuación. Si se requiere dosis adicionales debe de administrarse una dosis de 2mg posterior a cada evacuación intestinal, sin superar los 8mg administrados en cualquier periodo de 24 horas (máximo 16mg al día con receta médica). Para pacientes pediátricos (9-11 años) es recomendada una dosis de 2mg en la primera evacuación y 1 mg en las siguientes hasta 6mg/24 horas y para pacientes de 6-8 años se recomienda 2mg en la primera evacuación y 1mg en las siguientes hasta un máximo de 4mg/24horas.

Nuevos conocimientos sobre el clorhidrato de loperamida

Este fármaco es eficaz en el tratamiento de la diarrea aguda, la diarrea asociada al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la diarrea inducida por quimioterapia y el síndrome del intestino irritable, la loperamida regula los niveles de calcio intracelular bloqueando los canales de calcio tipo L, los cuales son dependientes de voltaje. Se han descrito otros efectos bioactivos de la loperamida por ejemplo: para aliviar el dolor, para el control de la ansiedad, ayuda a reducir la resistencia a la insulina y la inhibición de la replicación de coronavirus [26,29].

Recientemente se demostró que el clorhidrato de loperamida tiene efecto inmunomodulador pues induce la expresión de péptidos antimicrobianos en macrófagos infectados con *M. tuberculosis* o *M. smegmatis* y en menor medida *M. bovis*, observando reducción significativa en el crecimiento bacteriano intracelular en los tres casos [29].

Existen varios estudios que sugieren que el clorhidrato de loperamida puede ser utilizada para inhibir el crecimiento de *Salmonella entérica*. De hecho se ha demostrado que este fármaco tiene efecto sinérgico con antibióticos como miociclina y otras tetraciclinas. Inhibió el crecimiento de patógenos gramnegativos; y en menor cantidad un panel de grampositivos [30]. También se ha demostrado que presenta efecto sinérgico cuando se utilizan extractos de plantas medicinales, inhibiendo el crecimiento de *E.coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* [31].

Desde el momento en que se demostró el efecto bactericida que varios medicamentos no antibióticos ejercen, es importante determinar si diferentes fármacos como el clorhidrato de loperamida además de ser un antidiarreico, *per se* presentar un efecto bactericida sobre varios patógenos principalmente multidrogo resistentes como *Staphylococcus aureus* quien tiene una prioridad elevada de acuerdo a la OMS [32] y patotipos de *E. coli* un microorganismo de importancia en salud pública.

Staphylococcus aureus

Características microscópicas

Son cocos grampositivos que tienen un diámetro entre 0.5 y 1.5 μm su nombre deriva de las palabras griegas “*staphyle*” (racimo de uvas) y “*coccus*” (grano), siendo su principal agrupación aunque se pueden agrupar también como células únicas, pares o tétradas [33,34].

Las bacterias no son móviles, no esporuladas y anaerobias facultativas. *S. aureus* es catalasa positiva (enzima capaz de transformar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre) al igual que la mayoría de los estafilococo. Esta característica es utilizada para diferenciar al género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. Además de eso, la actividad enzimática típica de *S. aureus* incluye producción de coagulasa, fosfatasa alcalina, proteasa, lipasas y esterases [35].

Características de cultivo

S. aureus es un organismo mesófilo cuya temperatura óptima de crecimiento está en el rango de 37 a 40°C. Con respecto al pH, este puede crecer en un rango de 4 a 9.8 siendo el pH óptimo de pH 6 a 7. Otro rasgo característico es su tolerancia alta a concentraciones de sal, hasta el 20% de NaCl, catalogada como una bacteria halo-tolerante.

La pigmentación de sus colonias depende del medio y de las condiciones de crecimiento, por ejemplo, la coloración puede variar de gris, blanco grisáceo con tonos amarillos a anaranjados con presencia de hemólisis en agar sangre [33].

Pared celular

La pared está conformada por una capa homogénea de 20 a 40 nm de grosor de mureina o peptidoglicano, en microfotografías electrónicas no se llega a observar un espacio periplásmico. Secretan enzimas denominadas exoenzimas, que serían similares a las periplásmicas por las bacterias gramnegativas [34]. También contiene ácidos teicoicos y proteínas de superficie. En la figura 6 se ilustra la estructura general de una bacteria grampositiva.

El peptidoglicano es un polímero compuesto por subunidades idénticas, conteniendo dos aminoazúcares: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Una cadena peptídica de cuatro aminoácidos D' y L' alternantes está conectada a un grupo carboxilo del ácido N-acetilmurámico. Los tetrapeptidos de una y otra cadena de peptidoglicano se unen entre sí por puentes de peptaglicina por la sustitución del grupo amino de la lisina [36]. En *S. aureus*, el peptidoglicano representa la mitad del peso seco de la pared celular, confiriéndole características de resistencia y tolerancia osmótica.

Los ácidos teicoicos o polisacárido "A" están constituidos por polímeros de ribitol fosfato entrecruzado con N-acetilglucosamina, puede estar unido covalentemente al peptidoglicano de la pared celular y ligados a los lípidos de la membrana citoplasmática. Su función es mediar la unión a las superficies de las mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina.

Los ácidos lipoteicoicos se encuentran unidos a membrana plasmática, contienen una estructura similar a los ácidos teicoicos pero contienen fosfatos de poliglicerol. Estos ácidos están involucrados en la inflamación y liberación de citosinas por macrófagos [35].

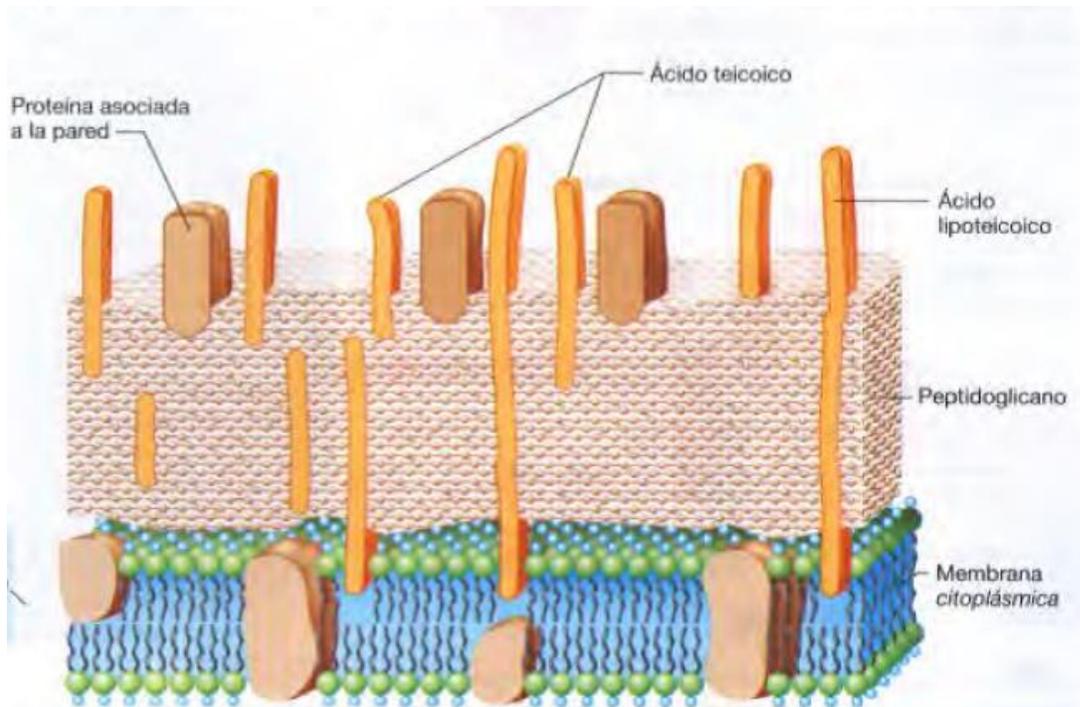


Figura 6. Ilustración que representa la pared celular de una bacteria grampositiva. Tomada de Brock Biología de los microorganismos, 2015.

Escherichia coli

Es un microorganismo en forma de bastón (bacilo) gramnegativo, mide entre 1.1 a 1.5 μm por 2 a 6 μm de largo. Son anaerobios facultativos usualmente móviles por flagelos peritricos, ciertas cepas poseen cápsula y flagelo y no se han encontrado formas esporuladas [37].

Principalmente son encontradas en la microbiota del tubo digestivo de animales y humanos, siendo parte de la biota normal. Sin embargo, existen infecciones entéricas por *E. coli* debido a 6 patótipos de esta ya que poseen diferentes factores de virulencia ya sean toxinas, adhesinas, entre otros. Presentan estructura antigénica caracterizada por antígenos K (capsulares), H (flagelares), y O (somáticos) siendo estos últimos los responsables de la virulencia de las cepas invasivas.

Los 6 patotipos más comunes son: [38]

- a. *E. coli enteropatogenica (ECEP)*
- b. *E. coli enterohemorrágica (ECEH)*
- c. *E. coli enteroinvasiva (ECEI)*
- d. *E. coli enteroagregativa (ECEA)*
- e. *E. coli enterotoxigenica (ECET)*
- f. *E. coli adherente difusa (ECAD)*

E. coli Enterohemorrágica

Este biotipo de *E. coli* puede causar diarrea o colitis hemorrágica. Esta cepa es una ECVT (*E. coli verocitotoxigenica*) con factores de virulencia adicionales como el gen *eae* [39] que se asocia a la adherencia del bacilo a los enterocitos y destrucción de microvellosidades en el lugar de adherencia (Lesiones "ataching and effacing" o A/E) y el plásmido pO157 (de 93.6 a 104 kb) que codifica una enterohemolisina. Además, ya que esta verocitotoxina es homóloga a la toxina shiga de *Shigella dysenteriae*, también son denominadas *E. coli shigatoxigenicas* [39, 40].

El serotipo O157:H7 es el más reconocido que contiene ECEH, a pesar de que existen otros miembros de otros serotipos como O26, O103, O111, O145, O91, O104, O113, O117, O118, O121, O128, el serotipo *E. coli* O157:H7 son relativamente homogéneas, y casi todos los tipos llevan factores de virulencia asociados a colitis hemorrágica [40].

La cepa *E. coli* ATCC 43895 mantiene estas características de serotipado, y producen toxinas shiga I y II [41]. Por otro lado, la cepa *E. coli* ATCC 25922 no produce verotoxina. Es un microorganismo control para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (neomicina, colistina, kanamicina, cefalexina, gentamicina, tetraciclina, ácido nalidixico y cloranfenicol). Se utiliza comúnmente para pruebas de medios selectivos, como cepa control negativo en la producción de toxina LT [42].

Pared celular

La pared de una célula gramnegativa es más compleja que la grampositiva, en la figura 7 se aprecia la estructura general de una bacteria gramnegativa. Su capa de peptidoglucano mide de 2 a 7nm de grosor (al contener muy poco aumenta la susceptibilidad a la ruptura mecánica) rodeada por una membrana externa. Según las recientes mediciones de perfil de densidad de criotomografía electrónica reveló que el grosor de la pared celular de *E. coli* es de 4nm [43].

Existe un espacio periplásmico denominado periplasma, el cual contiene varias enzimas hidrolíticas como son proteasas, lipasas, fosfatasas, beta-lactamasas que funcionan para degradar macromoléculas en productos que pueden ser metabolizados por la bacteria. En bacterias patógenas también se encuentran factores de virulencia como colagenasas y hialuronidasas.

La membrana externa está conformada por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos. Los lipopolisacáridos de la membrana externa son responsables de dos características principales, la fracción polisacárida está compuesta por el polisacárido O que actúa como antígeno y la porción lipídica, denominada lípido A se conoce como endotoxina y ejerce efecto tóxico sobre la circulación sanguínea o el aparato digestivo del huésped [44-46].

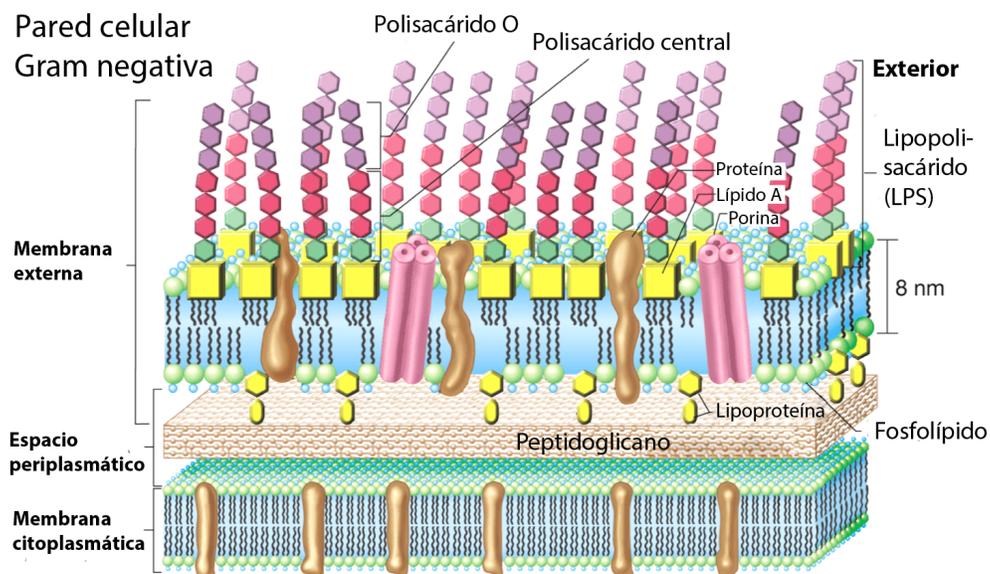


Figura 7. Ilustración que representa la pared celular de una bacteria gramnegativa.

Tomada de Brock Biología de los microorganismos, 2015.

Planteamiento del Problema:

La tuberculosis es una enfermedad re-emergente debido a un aumento en los casos de tuberculosis MDR lo que obliga la búsqueda de nuevas terapias o terapias complementarias. La reutilización/reposicionamiento de fármacos existentes y aprobados actualmente por la FDA, incluiría una reducción considerable en el tiempo y en los costos para descubrir nuevos enfoques terapéuticos.

Preguntas de investigación:

¿Un fármaco no tuberculoso como el clorhidrato de loperamida podría tener efecto bactericida directo sobre *M. tuberculosis*? ¿Podría ser igual de efectivo sobre MNT y algunos otros patógenos grampositivos y gramnegativos?

Hipótesis

La loperamida tiene efecto inmunomodulador en macrófagos humanos infectados con micobacterias y posee efecto sinérgico con antibióticos contra *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Eschechichia*, es probable que la loperamida presente un efecto bactericida directo sobre micobacterias tuberculosas y MNT además de presentar el mismo efecto con otros microorganismos patógenos de importancia clínica como *S. aureus* y *E. coli*.

Objetivos:

- 1.-Determinar el efecto bactericida del clorhidrato de clorhidrato de loperamida sobre micobacterias tuberculosas y no tuberculosas.
- 2.- Evaluar el espectro bactericida sobre otras bacterias grampositivas y gramnegativas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Metodología:

Se realizó un estudio experimental-proyectivo-longitudinal-comparativo, utilizando diversas cepas como: micobacterias tuberculosas (*M. tuberculosis H37 Rv*, *M. tuberculosis H37 Ra* y *M. bovis BCG*), no tuberculosas (*M. terrae* y *M. smegmatis*), *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ATCC 25922 y ATCC 43895

Variables

Independientes

- Concentración de Clorhidrato de Loperamida.
- Carga bacteriana (asegurando cultivos en fase exponencial temprana).

Dependientes

- Efecto bactericida del Clorhidrato de Loperamida sobre el crecimiento bacteriano.

1. Crecimiento y condiciones de cultivo:

Las diferentes cepas bacterianas se mantuvieron en 1 mL de medio de conservación (ver anexo 1), se almacenaron a -70 °C. Cada cepa se centrifugó a 8000 rpm durante 8 min, se deshecho el sobrenadante y se añadió 1 mL del medio de cultivo fresco específico para cada cepa. El pellet se resuspendió en medio fresco, obteniendo los diferentes stock. Se cultivaron hasta fase exponencial temprana como lo mencionan los siguientes puntos para asegurar la viabilidad y crecimiento.

1.1 Cultivo de cepas micobacterianas tuberculosas: M. tuberculosis H37 Rv (ATCC 25618), M. tuberculosis H37 Ra (ATCC 25177), M. bovis BCG (ATCC 35743).

Es importante señalar que los procedimientos realizados con *M. tuberculosis Rv* se llevaron a cabo en un laboratorio de bioseguridad nivel 3.

El stock completo (1mL) fue disgregado pasando por una jeringa 31G, 30 veces y se sonicó por 3 min. De esa suspensión se adicionó 50µL a un matraz Erlenmeyer con 50mL de Medio 7H9 (Difco, MI, EUA) complementado con ADC (Beckton, Dickinson, NJ, EUA), 0.2% de glicerol y 0.05% de Tween-80 (Sigma-Aldrich, MO,EUA). El cultivo se incubó a 37°C durante 7 días con agitación constante (180 rpm) y perlas de vidrio para evitar la formación de conglomerados.

1.2 Cultivo de cepas micobacterianas no tuberculosas MNT (*M. terrae* (ATCC 15755), *M. smegmatis* (ATCC 700084))

Se tomaron 900µL de un stock de *M. terrae* y 200µL de un stock de *M. smegmatis* y cada una se colocó en matraces Erlenmeyer con 50mL de Medio 7H9 complementado con ADC, se incubaron 37°C durante 3 días con agitación constante (180 rpm).

1.3 Cultivo de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Se tomó un inóculo de 100µL de un stock y se transfirió a 10mL de medio de Soya Tripticasa (Sigma-Aldrich) en un matraz Erlenmeyer de 25 mL. Se incubó durante 3 horas a una temperatura de 37°C con agitación constante.

1.4 Cultivo de *Escherichia coli* (ATCC 25922 y 43895 DQ)

Se tomó un inóculo de 100µL de un stock y fueron añadidos a un matraz con 10 mL de medio LB caldo (Difco, MI, EUA) en un matraz Erlenmeyer de 25 mL. Se incubó overnight (16 horas) a temperatura de 37°C con agitación constante.

2. Efecto bactericida del clorhidrato de loperamida.

2.1 Preparación de soluciones de clorhidrato de loperamida

Se realizaron alícuotas a partir de una solución stock de clorhidrato de loperamida (Sigma-Aldrich) de 10 mg/mL en DMSO. A partir de estas se generaron soluciones variadas desde 24 a 1000 µg/mL con medio de cultivo específico para cada cepa bacteriana.

2.2 Preparación de suspensiones bacterianas

A partir de los cultivos mencionados en los puntos 1.1 a 1.4 se realizaron suspensiones bacterianas empleando diluciones 1:50 para micobacterias tuberculosas y *M.terrae*; 1:200 para *M. smegmatis* y *S. aureus*; y por ultimo 1:25 para *E.coli* (o hasta alcanzar una densidad óptica de 0.2-0.3 a 600nm de longitud de onda) la cual representa crecimiento en fase exponencial temprana. Empleando en cada caso el medio fresco específico para cada cepa.

2.3 Determinación de la actividad bacteriana

La actividad bactericida se realizó en cultivos bacterianos en fase exponencial temprana, esto con el fin de asegurar los cultivos viables y homogéneos. Posteriormente 100µL de las suspensiones de bacterias descritas en el punto 2.2 se transfirieron a placas de 96 pozos y se adicionó 100µL de las diferentes soluciones de clorhidrato de loperamida y se incubaron hasta fase exponencial tardía. Es importante señalar que se incluyeron controles experimentales. El cultivo de bacterias sin ningún tratamiento (control del crecimiento) y el cultivo de bacterias en presencia de un antibiótico (control bactericida). En la tabla siguiente se informa de los antibioticos utilizados para cada una de las cepas utilizadas. Luego se cuantificó el crecimiento bacteriano, primero monitoreando indirectamente la actividad metabólica por la resazurina y posteriormente por unidades formadoras de colonia (UFC). La figura 8 ilustra la estrategia general para deteminar el efecto bactericida del clorohidrato de loperamida sobre varias cepas bacterianas.

Tabla 6. Antibiótico utilizado como control bactericida

Cepa	Antibiótico control
<i>M. tuberculosis</i> H37 Ra y Rv	Rifampicina
<i>M. bovis</i>	Rifampicina
<i>M. smegmatis</i>	Kanamicina
<i>M. terrae</i>	Kanamicina
<i>S. aureus</i>	Kanamicina
<i>E. coli</i> (dos cepas)	Ampicilina

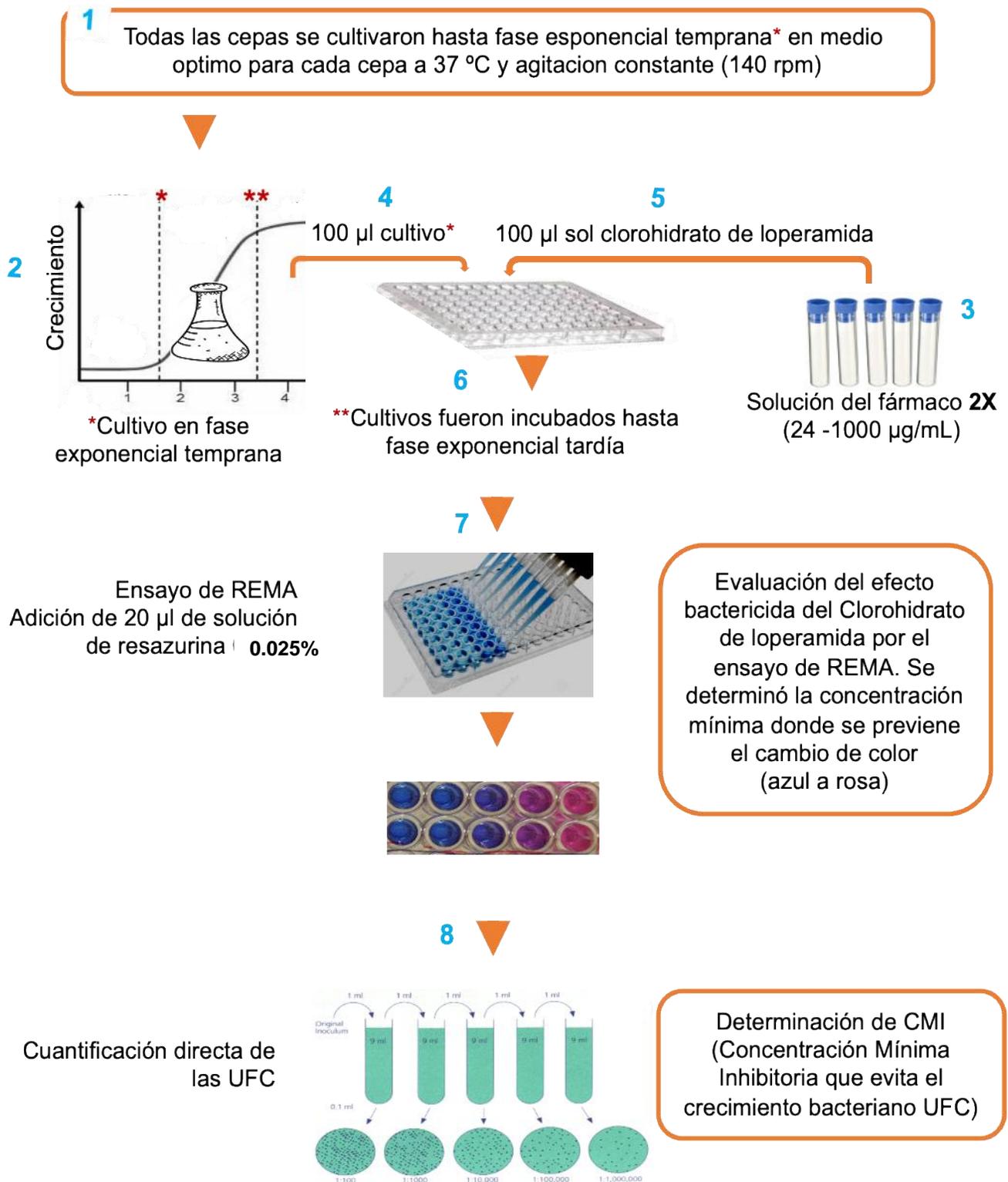


Figura 8. Estrategia experimental que se llevó a cabo para la realización de este proyecto.

2.4 Ensayo de la resazurina

Es una técnica indirecta, colorimétrica, rápido, confiable y reproducible, el cual indica la actividad metabólica (actividad enzimática de óxido-reducción). La resazurina, es un colorante heterocíclico de baja fluorescencia que puede ser reducido intracelularmente por enzimas que participan en el sistema de transporte de electrones en la membrana citosólica de las bacterias durante la respiración celular en dos pasos, en el primero de manera irreversible dando como resultado su cambio a resorufina (tonalidad rosa), la cual presenta una mayor intensidad de fluorescencia que la resazurina. Y una segunda etapa reversible, a dihidroresorufina, que es un compuesto incoloro (este último proceso se asocia principalmente con la mitocondria de células eucariotas viables). La figura 9 explica estas dos reacciones sobre la resazurina. Esta propiedad del par RedOx permite diferenciar a las bacterias viables, ya que son capaces de metabolizar la resazurina, aumentando la intensidad de fluorescencia a través del tiempo, a diferencia de las bacterias muertas, incapaces de metabolizar la resazurina y cuya intensidad de fluorescencia sería estacionaria [47,48].

La resazurina es un indicador fluorescente que no se queda retenido dentro de las bacterias, por lo que puede cruzar la envoltura celular, quedando disuelta en el medio. Además la resazurina no es tóxica, permitiendo realizar otras determinaciones con las bacterias sin que afecte la evaluación. Es un ensayo sencillo es un solo paso y otorga resultados rápidos y absolutos [48,49].

La principal desventaja es que no puede diferenciar a las bacterias muertas de las que se encuentran en estado de dormancia.

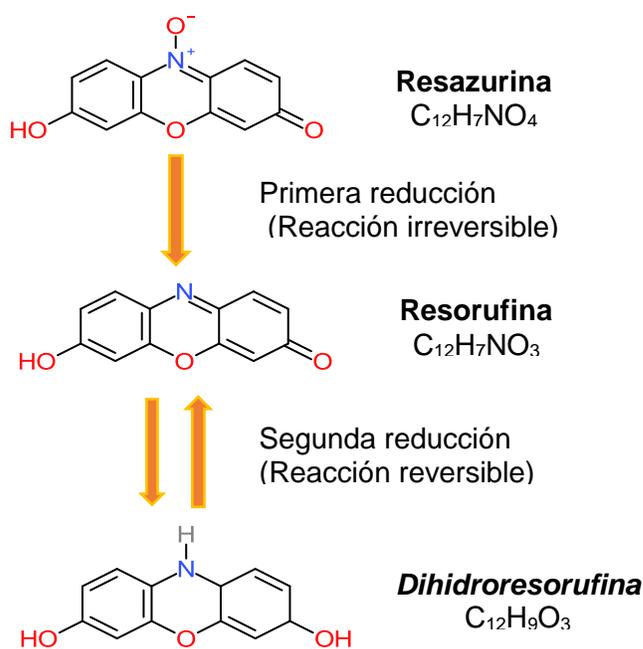


Figura 9. La resazurina (compuesto de color azul) se reduce de forma irreversible a un compuesto altamente fluorescente resorufina (compuesto de color rosa), este último producto en una posterior reacción reversible se reduce a hidioresorufina (incolora). Tomada y editada de [49]

En este ensayo la concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como aquella concentración mínima de clorhidrato de loperamida, en la cual no se presenta un cambio de color en el medio cultivado.

2.5 Determinación de las unidades formadoras de colonia

Esta técnica se basa en contar las UFC (Unidades Formadoras de Colonia) presentes por mililitro de muestra. Cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo seleccionado después de cierto tiempo y temperatura de incubación proviene de uno o un agregado de microorganismos capaces de formar una colonia [50].

Esta metodología tiene la ventaja de tener un buen límite de detección, sin embargo, consume mucho tiempo durante los plaqueos, la preparación de las diluciones e incubación además de un gasto de material.

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad de resazurina se tomaron 100µL de un pozo de cada solución de clorhidrato de loperamida y se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta tener diluciones 10⁻⁶ utilizando como

diluyente el medio de cultivo correspondiente a cada cepa. Cada dilución se plotea en medio sólido correspondiente a cada cepa y se incubaron hasta que las colonias fueron apreciables para el conteo de UFC, siendo los siguientes:

- *M. tuberculosis*: 16-21 días
- *M. smegmatis*: 3 días
- *M. terrae*: 7 días
- *S. aureus* y *E. coli*: 1 día

La figura siguiente (Fig. 10) presenta el esquema general utilizado para el procedimiento de las UFC.

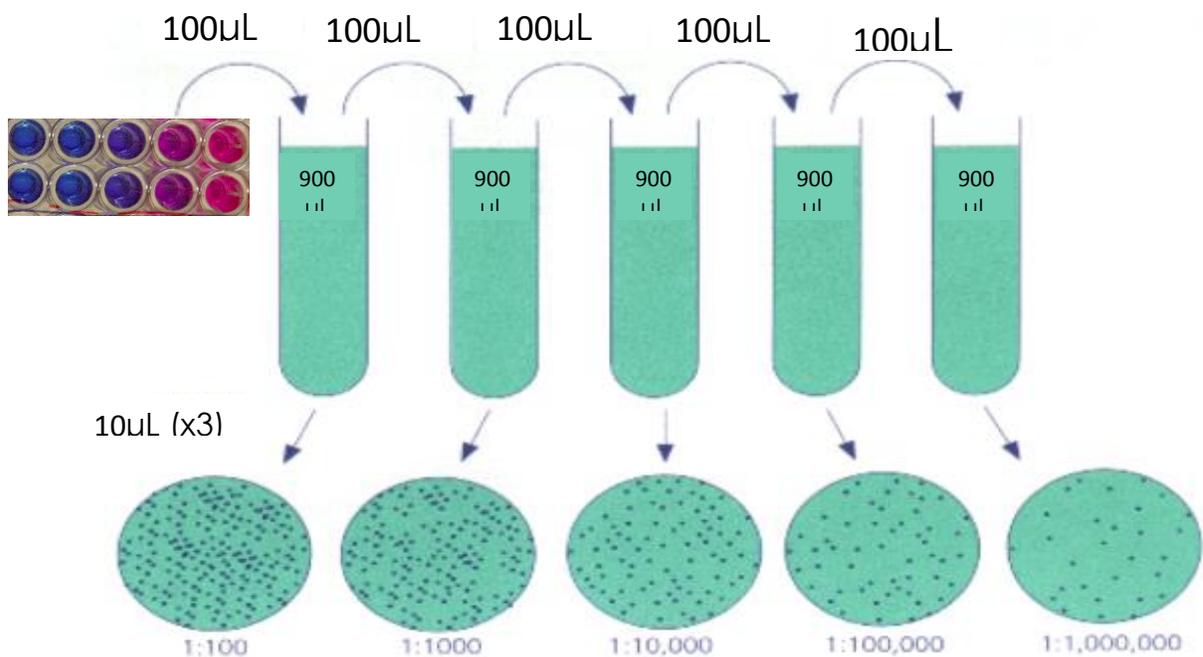


Figura 10. Esquema general del procedimiento para UFC de cada una de las cepas utilizadas.

En esta técnica la CMI se define como aquella concentración más baja de clorhidrato de loperamida que puede inhibir totalmente el crecimiento visible de un microorganismo.

3. Análisis Estadístico

Para determinar el efecto del tratamiento sobre los cultivos bacterianos, se comparó las UFC obtenidas en cada tratamiento con respecto a las UFC obtenidas sin tratamiento, realizando una ANOVA con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett utilizando el programa IBM SPSS statistics 2.0 considerando un valor de $p \leq 0.05$ estadísticamente significativo.

Resultados

Efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento de las cepas de Mycobacterium por el ensayo de la resazurina

El ensayo de la resazurina es un método absoluto para determinar rápidamente el efecto de un compuesto sobre el crecimiento bacteriano, la ausencia del cambio de color determina que no hubo crecimiento y por lo tanto hubo inhibición del mismo. En la figura 11 se muestra el efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre bacterias del complejo *M. tuberculosis* y sobre micobacterias no tuberculosas.

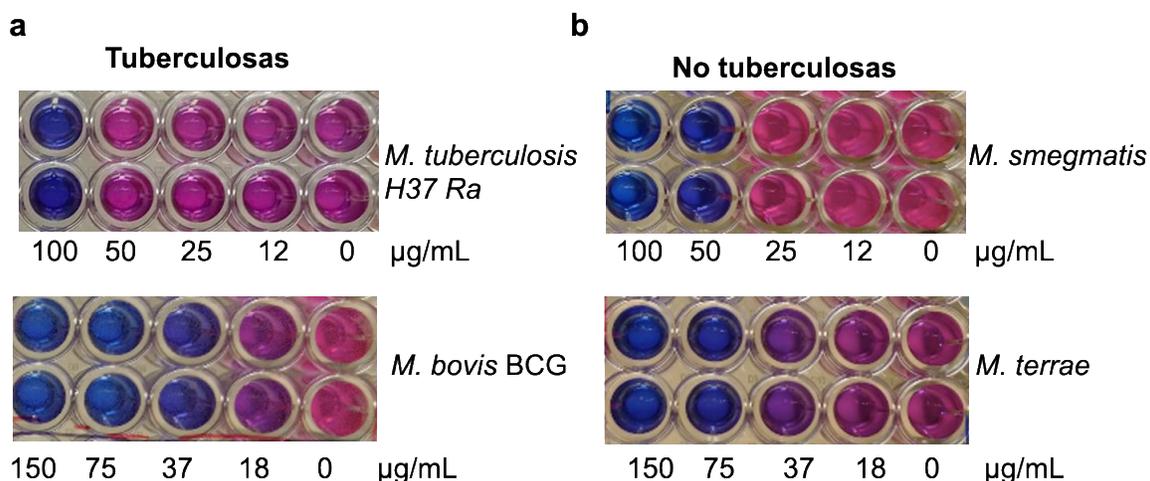


Figura 11. Efecto inhibitorio del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento de *Mycobacterium*. (a) Efecto sobre cepas tuberculosas y (b) cepas no tuberculosas. Las cepas se cultivaron en presencia de loperamida durante 5 días para las tuberculosas y 2 días para las no tuberculosas a 37 °C. Luego, se añadió la solución de resazurina, y las placas se incubaron adicionalmente durante toda la noche. Un cambio de color de azul a rosa indicó crecimiento bacteriano. Foto representativa de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Se pudo observar que en el cultivo de *M. tuberculosis* H37 Ra en presencia de 100 µg/mL de clorhidrato de loperamida, no hubo cambio de color y a partir de 50 µg/mL hay cambio de color a rosa con intensidad similar al control (0 µg/mL). Para *M. bovis* BCG se observa que desde 37.5 µg/mL no hay cambio de color. En las bacterias no tuberculosas se observó un patrón de color distinto, en *M. smegmatis* a partir de 50 µg/mL no hay cambio de color, mientras que *M. terrae* no hay cambio de color desde 75 µg/mL. Todas las cepas evaluadas mostraron un patrón distinto de cambio de color y por tanto de sensibilidad al clorhidrato de loperamida.

Efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* por el ensayo de la resazurina

Con el fin de determinar el espectro bactericida de este fármaco, se evaluó su efecto sobre *E. coli* y *S. aureus*, bacterias gramnegativa y grampositiva respectivamente. En la figura 12 se muestra el patrón de inhibición del crecimiento entre las cepas evaluadas.

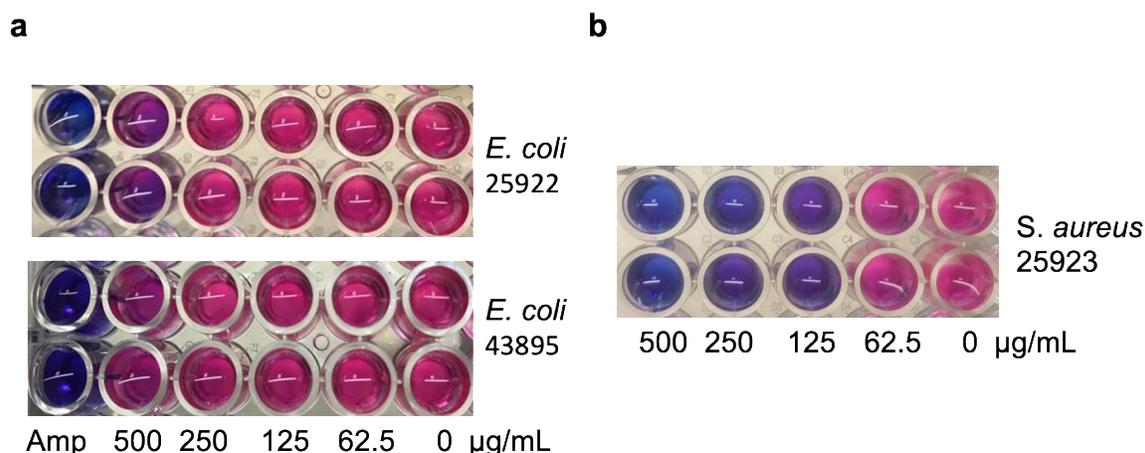


Figura 12. Efecto inhibitorio del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas. (a) *E. coli* y (b) *S. aureus*. Las cepas se cultivaron en presencia de loperamida durante 2 h a 37 °C, luego se añadió la solución de resazurina y se incubaron 30 min más. *E. coli* se empleó un control de AMP (ampicilina) a una concentración final de 500 µg/mL. Un cambio de color de azul a rosa indicó crecimiento

bacteriano. Foto representativa de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Respecto a las cepas de *E.coli* (ATCC 43895 y 25922) presentaron cambio de color a rosa a todas las concentraciones de clorhidrato de loperamida similar al control. Se añadió ampicilina como control bactericida y se observó que este antibiótico evitó el cambio de color, lo que demuestra que es sensible y el ensayo de la resazurina esta validado. Por otro lado, *S. aureus* mantuvo la coloración azul hasta la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$, a partir de 125 $\mu\text{g/mL}$ hubo un ligero cambio de color, mientras que a 62.5 $\mu\text{g/mL}$ el color obtenido fue similar al control.

Efecto del clorhidrato de loperamida frente a diferentes microorganismos. (Ensayo UFC)

Debido a que el método de resazurina es un método absoluto y cualitativo, fue necesario corroborar los resultados por el conteo de bacterias viables, monitoreando las unidades formadoras de colonia (UFC). En la figura 13 se muestra el efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento de micobacterias tuberculosas.

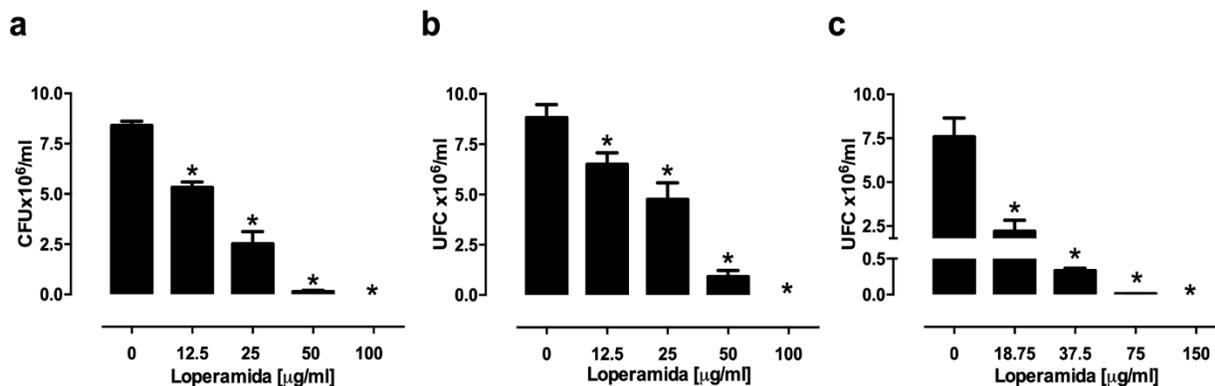


Figura 13. Efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento de cepas tuberculosas. *M. tuberculosis* H37Ra (a); *M. tuberculosis* H37Rv (b); *M. bovis* BCG (c). Las

cepas se cultivaron en presencia del clorhidrato de loperamida durante 5 días a 37 °C. Luego las UFC se cuantificaron por triplicado. Se representan las medias± DEST de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado * p <0.05 vs control (0 µg/mL).

El fármaco tuvo efecto bactericida dependiente de la concentración en todas las cepas utilizadas. En las gráficas de *M. tuberculosis* H37 Ra (Fig 13a) y *M. tuberculosis* H37 Rv (Fig 13b), el efecto bactericida significativo ejercido por el clorhidrato de loperamida inició a partir de 12.5 µg/mL pero es hasta 100 µg/mL donde el efecto bactericida es total. A diferencia de *M. bovis* BCG que, a pesar de presentar efecto similar, es hasta 150 µg/mL donde el efecto bactericida es total.

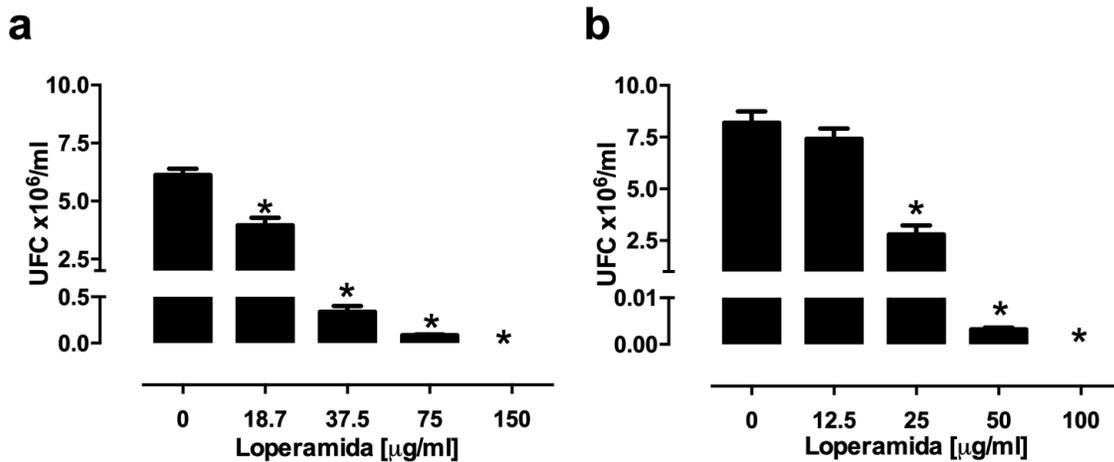


Figura 14. Efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento cepas MNT. *M. terrae* (a) y *M. smegmatis* (b). Las cepas se cultivaron en presencia del clorhidrato de loperamida durante 5 días a 37 °C. Luego las UFC se cuantificaron por triplicado. Se representan las medias± DEST de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado * p <0.05 vs control (0 µg/mL).

El clorhidrato de loperamida también actuó sobre MNT, en este caso para *M. terrae* (Fig 14a) se observó efecto bactericida significativo a partir de 18.7 µg/mL mientras que el efecto total fue 150 µg/mL. En *M. smegmatis* (Fig 14b) presentó un efecto bactericida significativo a partir de 25 µg/mL con un efecto total a los 100 µg/mL.

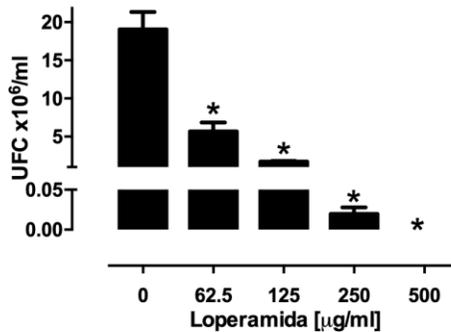


Figura 15. Efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento *S. aureus*. Se cultivó en presencia del clorhidrato de loperamida durante 2h a 37 °C. Luego las UFC se cuantificaron por triplicado. Se representan las medias ± DEST de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado * $p < 0.05$ vs control (0 µg/mL).

El efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre *S. aureus* (Fig 15) es dependiente de la concentración al igual que las micobacterias, sin embargo, requiere de concentraciones mayores, pues es hasta 62.5 µg/mL donde ejerce significativamente su efecto, siendo a 500 µg/mL la muerte total de las bacterias.

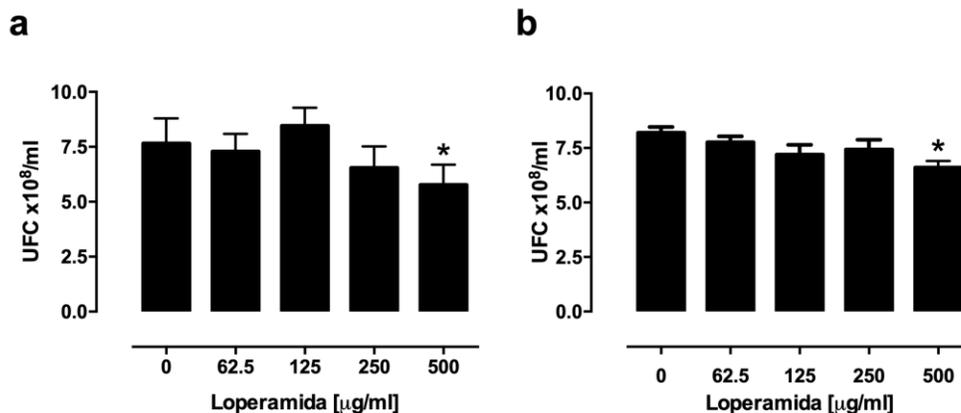


Figura 16. Efecto bactericida del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento de cepas de *E.coli*. *E.coli* ATCC 25922 (a) y *E.coli* ATCC 43895 (b). Las cepas se cultivaron en presencia del clorhidrato de loperamida durante 2 h a 37 °C. Luego las UFC se cuantificaron por triplicado. Se representan las medias \pm DEST de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado * p <0.05 vs control (0 μ g/mL).

Las cepas de *E. coli* presentan crecimiento en todas las concentraciones de clorhidrato de loperamida, solo se muestra que a 500 μ g/mL hay una disminución significativa sobre el crecimiento. A pesar de las concentraciones altas del fármaco no se observó un efecto bactericida total.

Se evaluó la actividad bactericida del clorhidrato de loperamida sobre el crecimiento de 8 distintas cepas (la tabla 7 muestra las CMI de todas las cepas evaluadas). En micobacterias mostró un efecto bactericida más potente, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 100 y 150 μ g/mL, mientras que para *S. aureus* inhibió totalmente su crecimiento hasta 500 μ g/mL, mientras que en las cepas de *E. coli* en la cepa ATCC 25922 y en la cepa ATCC 43895 no mostró efecto a concentraciones menores de 500 μ g/mL e incluso a esta concentración de clorhidrato de loperamida no mató totalmente a las cepas entéricas.

Tabla 7. CMI de clorhidrato de loperamida

Microorganismo	*CMI (μg/mL)
<i>M. tuberculosis H37 Rv</i>	100
<i>M. tuberculosis H37 Ra</i>	100
<i>M. bovis BCG</i>	150
<i>M. terrae</i>	150
<i>M. smegmatis</i>	100
<i>S. aureus</i>	500
<i>E.coli</i> ATCC 25922	Resistente
<i>E.coli</i> ATCC 43895	Resistente

*CMI se define como la concentración mínima inhibitoria necesaria para eliminar completamente el crecimiento bacteriano

Discusión

El método de REMA nos proporciona resultados en menos de 24 h, requiere poca manipulación y es de fácil automatización. Sin embargo, este método es indirecto, ya que sirve para indicar principalmente actividad metabólica y no crecimiento bacteriano ^[47,48] por lo que los resultados obtenidos se corroboraron por medio de la cuenta directa de las UFC. El método UFC es tedioso y requiere de mayor tiempo para obtener el resultado, ya que es necesario incubar varios días más, pero nos permite conocer el efecto de cualquier compuesto sobre el crecimiento bacteriano en forma directa.

Con base en los resultados obtenidos por REMA se determinó que el clorhidrato de loperamida presenta actividad bactericida contra las cepas de *Mycobacterium* y *S. aureus*, sin embargo, no mostró efecto sobre las cepas de *E. coli*.

En los resultados de REMA se aprecian colores intermedios al azul intenso (control positivo de muerte) y rosa (control negativo de muerte) esto debido a que aún hay algunas bacterias vivas en los pozos y éstas reducen la resazurina a resorufina, pero no reducen toda molécula de resazurina, por lo que se generan estos tonos intermedios cercanos al morado (ver fig. 11 y 12).

Con base en el conteo de células viables (UFC) se corroboró que el clorhidrato de loperamida disminuye el crecimiento de todas las cepas de *Mycobacterium*. Se estableció que la CMI para las micobacterias es entre 100 y 150 µg/mL, para *S. aureus* es de 500 µg/mL, mientras que *E. coli* es resistente, mostrando solo disminución del 20% en el crecimiento a 500 µg/mL con respecto al control (sin tratamiento).

Por otro lado, para evaluar el potencial de las moléculas como fármacos antituberculosos, es fundamental considerar el modo de acción. Por ejemplo, se puede inhibir la replicación del DNA ^[51] y la síntesis de proteínas ^[52, 53]. Otros mecanismos están enfocados a bloquear el potencial de membrana como la pérdida de la fuerza protón motriz o la inhibición de la síntesis de ATP ^[54]. Y existen

compuestos capaces de inhibir la síntesis de la envoltura micobacteriana [55], inhibiendo la síntesis de peptidoglicanos o evitando la síntesis de ácidos micólicos.

Este último enfoque lograría una mayor especificidad debido a la estructura distintiva de las micobacterias que poseen una pared celular muy gruesa y ácido-alcohol resistente. Una proteína blanco que podría ser prometedora para inhibir el crecimiento micobacteriano es la proteína MmpL3 (por sus siglas en inglés “membrane mycobacteria protein large”) [56]. Esta proteína es esencial para la replicación y la viabilidad bacteriana, ya que es responsable del transporte de trehalosa monomicolato (TMM) del citoplasma (donde se produce) hacia el espacio periplásmico donde se une a otro TMM para formar factor cordón (TDM) o al arabinogalactano. Estas uniones conforman el revestimiento exterior grueso, ceroso y difícil de penetrar característico de las micobacterias [57].

La MmpL3 pertenece a la superfamilia de proteínas de resistencia, nodulación y división (RND por sus siglas en inglés “resistance-nodulation-division family”). El genoma de *M. tuberculosis* codifica 13 proteínas tipo MmpL y se sabe que éstas realizan exportaciones de sustratos dependientes de protones a través de la membrana celular [56- 58].

Por este motivo, el bloqueo de la MmpL3 inhibiría un paso fundamental en la síntesis de ácidos micólicos. El sitio de unión de los bloqueadores de MmpL3 se ha encontrado en la región transmembranal (ver figura 17 y 18) y se puede dividir en cinco subsitios (S1, S2, S3, S4 y S5), donde S4 tiene características hidrofílicas y los demás subsitios hidrofóbicos [57].

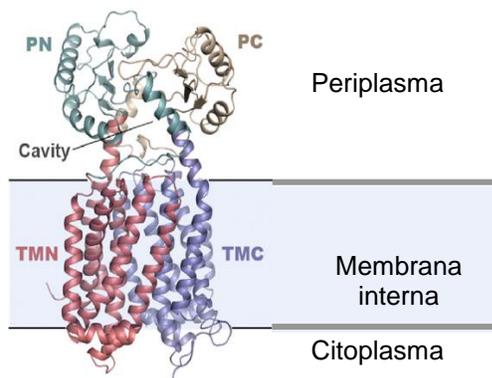


Figura 17. Estructura cristalina de la MmpL3. El saco o bolsa de unión se encuentra en la zona de la membrana interna ubicada entre TMN (dominio transmembranal N-terminal) y TMC (dominio transmembranal C-terminal).

Tomada y editada de [57].

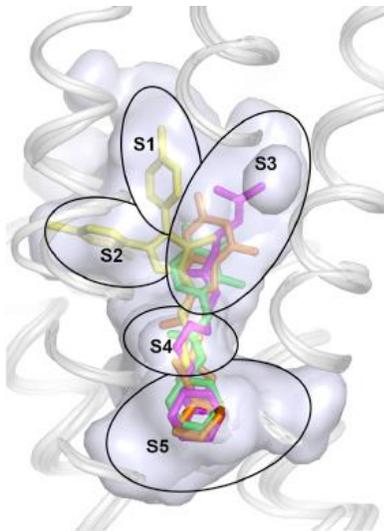


Figura 18. La imagen muestra la superposición de 4 diferentes bloqueadores (morado: SQ109; verde: AU1235; naranja: ICA38; amarillo: rimonabant), en la cual dependiendo de su estructura es como se une a los diferentes sitios de unión: S1, S2, S3, S5 se unen compuestos hidrófobos mientras que S4 es hidrolítico. Tomada de [57].

Una de las características peculiares de los bloqueadores de MmpL3 es que se tienen una gran diversidad estructural, su espectro incluye derivados de adamantilo (compuestos sintéticos SQ109, DA5, AU1235), derivados de difenil-pirrol (compuesto BM635) y derivados de bencimidazol (compuesto C215). Recientemente se demostró que el compuesto PIPD1 (ver figura 19) actúa como inhibidor de MmpL3 [58, 59]. Este compuesto es un derivado de piperidinol y presenta una estructura química relativamente similar al clorhidrato de loperamida. Por ello,

es posible que el clorhidrato de loperamida tenga un mecanismo de acción similar a los bloqueadores de MmpL3.

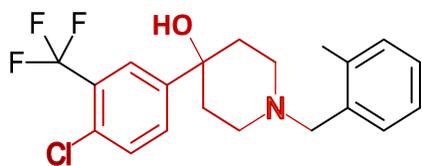


Figura 19. Estructura de PIPD1 (4-(4-cloro-3-(trifluorometil) fenil)-1-(2-metilbenzil) piperidin-4-ol) Aquello marcado en rojo es la similitud que representa con el clorhidrato de loperamida.

El clorhidrato de loperamida es una sustancia lipofílica debido a la presencia de sus diferentes grupos funcionales, como las aminas terciarias, anillos aromáticos y amidas, este carácter químico le permiten ingresar por difusión hasta el espacio periplásmico donde se encuentra la MmpL3 (ver figura 20), y al unirse a esta, podría provocar cambios conformacionales en la proteína evitando así el transporte o liberación de TMM del citoplasma hacia el espacio periplásmico, estos cambios son explicados por Bing Zhang y colaboradores utilizando el compuesto sintético SQ109 [57].

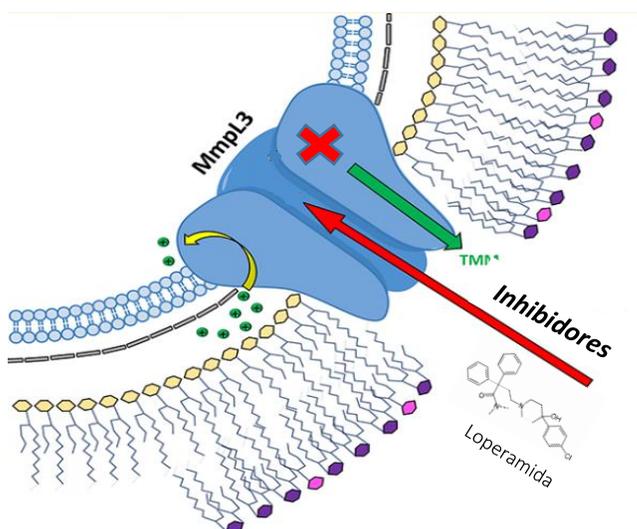


Figura 20. El clorhidrato de loperamida, podría atravesar la capa cerosa de las micobacterias y evitar el correcto funcionamiento de la MmpL3. Esto inhibiría el transporte de TMM hacia el exterior, y la síntesis de ácidos micólicos. Tomada y editada de [56].

El clorhidrato de loperamida podría ajustarse o anclarse a la MmpL3 a los subsitios de unión S3 y S5 puesto que son más grandes y se podrían acomodar los grupos funcionales más hidrófobos del fármaco como lo son los grupos aromáticos, del mismo modo se anclaría a S4 la zona hidrofílica del fármaco.

La MmpL3 contiene 23 cadenas laterales de aminoácidos donde se unen los inhibidores y solo han encontrado 4 diferencias entre los sitios de unión para *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* ^[57], sin embargo en los experimentos realizados en este trabajo, se observó que el clorhidrato de loperamida ejerce el mismo efecto bactericida en estas dos micobacterias a la misma concentración, por lo que podemos deducir que estas diferencias no son significantes por lo menos con este fármaco. Es probable que existan algunas otras diferencias en los sitios de unión para *M. bovis BCG* y *M. terrae* ya que se requirió de mayor concentración de clorhidrato de loperamida para ejercer su efecto bactericida.

Por otro lado, en el caso de *S. aureus* también presentó un efecto bactericida, aunque se requirió de concentraciones de 4 a 5 veces más. Sin embargo, no podemos otorgar el mismo modo de acción para este microorganismo (la inhibición de la MmpL3) debido a que esta proteína se conserva en micobacterias y no se encuentran en otros microorganismos ^[60].

Al respecto de esto se ha demostrado que compuestos similares al clorhidrato de loperamida como los derivados de fenilpiperidina bloquean la función de las bombas de eflujo de NorA (tipo MFS por sus siglas en inglés “major facilitator superfamily”) y MepA (tipo MATE por sus siglas en inglés “Multidrug Efflux Transporter family”) de *S. aureus*. Se demostró que “3- (2-ariletil)-piperidinas” matan a *S. aureus* con CMI que van desde 62.5 a 500 mg/L, pero logran hacer sinergismo con otros antibióticos porque promueve la acumulación de dichos antibióticos y potencia su actividad bactericida contra *S. aureus* ^[61].

Referente a *E. coli*, el clorhidrato de loperamida no mostró efecto alguno a concentraciones de 500 µg/mL por lo que se consideró como resistente, este microorganismo expresa un sistema de secreción ACrAB (tipo RND) que la utiliza para expulsar fármacos. Se ha evaluado el efecto sinérgico de varios derivados de fenilpiperidina con antibióticos y se observó que éstos reducen la CMI de antibióticos como la tetraciclina hasta 2 veces [61]. Paradójicamente a esto, al utilizar solo el clorhidrato de loperamida (un fenilpiperidina derivado) no ejerció un efecto bactericida directo, posiblemente solo presente efecto sinérgico bactericida con antibióticos. Con relación a esto se ha evidenciado que *E. coli* presenta resistencia sobre derivados de piperidinol, por lo que concuerda con nuestros resultados [62].

La principal ventaja con el clorhidrato de loperamida es que ya tiene claros ensayos clínicos, farmacovigilancia y biodisponibilidad, donde se conocen los efectos secundarios y los problemas relacionados de ellos, además de una posología ya establecida.

A pesar de ser efectivo contra las micobacterias su principal desventaja es su baja biodisponibilidad pues es del 0.3% debido a su efecto de metabolismo de primer paso, por lo que se requerirían cantidades mayores a las máximas de clorhidrato de loperamida al día para que este llegase al órgano diana (los pulmones). Una alternativa es determinar efecto sinérgico con otros fármacos antituberculosos, esto ayudaría a reducir las concentraciones necesarias para ejercer su función bactericida.

Por otro lado, se podría emplear loperamida sublingual pues de esta forma se evita el efecto del primer paso aumentando la biodisponibilidad, también nuevas técnicas como lo son Liquisolid [63] o Extrusión de Fusión en Caliente (HME por sus siglas en inglés “hot melt extrusion”) [64] han aumentado la velocidad de disolución de la tableta de clorhidrato de loperamida aumentando a su vez su biodisponibilidad.

Conclusiones:

El presente experimento sobre el efecto del clorhidrato de loperamida, reveló ciertos puntos de importancia que se pueden clasificar en dos rubros: especificidad del efecto bactericida e importancia de investigaciones con fármacos que se encuentran en el mercado.

Respecto al primer rubro:

El clorhidrato de loperamida:

- Posee actividad bactericida sobre micobacterias tuberculosas (*M. tuberculosis* H37 Ra, H37 Rv y *M. bovis* BCG), micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento y rápido como *M. terrae* y *M. smegmatis*, respectivamente, utilizando concentraciones de 100-150 µg/mL.
- Presentó actividad bactericida sobre *S. aureus* a una CMI de 500 µg/ mL
- Tuvo una mayor especificidad hacia las micobacterias, en menor grado a *S. aureus* mientras que las cepas de *E. coli* fueron resistentes al clorhidrato de loperamida ya que hubo crecimiento bacteriano a una concentración de 500 µg/mL.

Esto implica que el clorhidrato de loperamida tuvo una mayor especificidad contra las micobacterias que contra grampositivos y gramnegativos.

En relación con el segundo rubro:

Los bloqueadores de la MmpL3 (como posiblemente lo sea clorhidrato de loperamida) se caracterizan al tener diferentes formas químicas, por lo que fácilmente pueden existir medicamentos cuyos principios activos seas similares a estos bloqueadores, abriendo una gran brecha de oportunidades para utilizar otros medicamentos contra la tuberculosis en el tiempo que conlleva la elaboración de nuevos fármacos y sus posteriores ensayos clínicos.

Aunado a todo lo anterior, se necesitan más estudios para determinar si clorhidrato de loperamida mata a *M. tuberculosis* en estado de dormancia y si se puede obtener

una reducción de la CMI de los medicamentos antituberculosos, funcionando como terapia complementaria.

Perspectiva

Determinar si existe presencia de sinergismo del clorhidrato de loperamida con otros medicamentos antituberculosos siguiendo con ensayos REMA y observar si existe una reducción de la CMI. Además determinar si el clorhidrato de loperamida mata a *M. tuberculosis* en estado de dormancia mediante un modelo animal de infección por aerosol o inoculación intravenosa en ratones con su posterior dosificación del fármaco y obtención de UFC.

Referencias:

1. WHO: Tuberculosis [Internet]. 24 de marzo del 2020. *Tuberculosis. Key facts*. [Citado el 25 de marzo del 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
2. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg*. 2017; 58(1):E9–12.
3. Paulista UE. Global Tuberculosis Report. France; 2020.
4. Paulista UE. Tuberculosis en las Américas 2019. Washington; 2019.
5. Secretaría de Salud. DIRECCION DE MICOBACTERIOSIS Casos nuevos de Tuberculosis Pulmonar Estados Unidos Mexicanos 1990-2017 [Internet]. 2018 [citado el 17 de enero del 2020]. p. 1. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/331814/Casos_nuevos_de_Tuberculosis_Pulmonar_Estados_Unidos_Mexicanos_1990-2017.pdf
6. Secretaría de Salud. Micobacteriosis: Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Tuberculosis y Lepra [Internet]. Ciudad de México; 2019 [citado el 17 de enero del 2020]. Disponible en: http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/18_Manual_Micobacteriosis.pdf

7. CDC. Chapter 2 Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis. En: CDC. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know. 6ª ed; 2013. p19-43
8. Yruela I, Contreras B, Magalhã C, Osó N, Gonzalo J. Mycobacterium tuberculosis complex exhibits lineage-specific variations affecting protein ductility and epitope recognition. *Genome Biol Evol.* 2016;8(12):3751–64.
9. Velayati A, Farnia P. Atlas of Mycobacterium tuberculosis. London: Elsevier; 2017.
10. Altet N. Micobacterias no tuberculosas: ¿una infección emergente? *An Pediatría.* Septiembre 2009;71(3):185-8.
11. Johnson MM, Odell JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis.* Marzo 2014;6(3):210–20.
12. Secretaría de Salud. Diagnóstico y tratamiento de las Infecciones por Micobacterias no tuberculosas [Internet]. Ciudad de México; 2014. Disponible en:
<http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS-650-14-MicobacteriosisNotuberculosa/650GER.pdf>
13. Chinta KC, Saini V, Glasgow JN, Mazorodze JH, Rahman MA, Reddy D, et al. The emerging role of gasotransmitters in the pathogenesis of tuberculosis. *Elsevier Nitric Oxide.* Septiembre 2016;59(1):28–41.
14. Mathema B, Andrews JR, Cohen T, Borgdorff MW, Behr M, Glynn JR, et al. Drivers of Tuberculosis Transmission. *J Infect Dis.* Noviembre 2017; 3:216(suplemento 6):S644–53.
15. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures In: *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition* [Internet]. American Society of Microbiology; 2011. p. 472–502. Disponible en:
<http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816728.chap28>
16. Barrera L, Malbran C. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. PArtell: cultivo. Organización Panamericana de la salud; 2008
17. Brennan PJ. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev Infect Dis* 1989;11 Suppl 2:420–430.
18. Maitra A, Munshi T, Healy J, Martin LT, Vollmer W, Keep NH, et al. Cell wall peptidoglycan in Mycobacterium tuberculosis: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiol Rev.* Septiembre 2009;43(5):548–75.
19. Masahiko K. Mechanism of action of cord factor (trehalose-6, 6'-dimycolate) of *Mycobacterium tuberculosis*. *J-STAGE.* 1972;47(4):93-101
20. Thoen C, Steele J, Gilsdorf M. *Mycobacterium bovis* in Animals and Humans. 2a ed. UK: Blackwell Publishing; 2006.
21. Hunter RL, Olsen MR, Jagannath C, Actor JK. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitory tuberculosis, including

- a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann Clin Lab Sci.* 2006;36(4):371–86.
22. Biología de las micobacterias [internet] Facultad de Ciencias Químicas [citado el 17 de enero del 2020] Disponible en: http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/DOCENCIA/MATERIAL-DE-ESTUDIO/micobacterias/biologia/biologia_de_las_micobacterias.html
 23. Dartois V. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Marzo 2014;12(3):159–67.
 24. Chang K-C, Yew W-W, Tam C-M, Leung C-C. WHO Group 5 Drugs and Difficult Multidrug-Resistant Tuberculosis: a Systematic Review with Cohort Analysis and Meta-Analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* Septiembre 2013;57(9):4097–104.
 25. Caminero JA, Cayla JA, García JM, García FJ, Palacios JJ, Ruiz-Manzano J. Diagnosis and Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. *Arch Bronconeumol.* Septiembre 2017;53(9):501–9.
 26. Baker DE. Loperamide: A Pharmacological Review. *MedReviews.* 2007;7(3):11-18.
 27. Johnson & Johnson Consumer Inc. Immodium (loperamide). IMODIUM CAPSULES Rx WARNING: TORSADES DE POINTES AND SUDDEN DEATH [Internet]. 2016. p. 1–13. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/017694s052lbl.pdf
 28. Wilcock A, Tuycross R. Therapeutic Reviews. *Journal of Pain and Symptom Management* [internet]. Agosto 2011: 42 (3): 319-23
 29. Juárez E, Ruiz A, Cortez O, Sada E, Torres M. International Immunopharmacology Antimicrobial and immunomodulatory activity induced by loperamide in mycobacterial infections. *Int Immunopharmacol.* Junio 2018;65:29–36
 30. Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nat Chem Biol* [Internet]. Junio 2011;7(6):348–50.
 31. Tarek E, Mohamed M. Jouda AM. the Antimicrobial Effect of Some Medicinal Plant, and Interactions With Non-Antibiotics. *World J Pharm Pharm Sci.* 2016;5(12):159–68.
 32. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [internet]. Who international 2017 [citado el 27 de enero del 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
 33. Medveov A, Valk U. *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese

- Production. In: Structure and Function of Food Engineering [Internet]. InTech; 2012 [citado el 4 de febrero del 2020]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/structure-and-function-of-food-engineering/staphylococcus-aureus-characterisation-and-quantitative-growth-description-in-milk-and-artisanal-raw>
34. Harris L, Foster S, Richards R. An introduction to staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying s. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur Cells Mater*. Diciembre 2002;4:39–60.
 35. Cervantes E, García R. Características generales del Staphylococcus aureus. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 2014;61(1):28–40.
 36. Dmitriev BA, Toukach FV, Holst O, Rietschel ET, Ehlers S. Tertiary Structure of Staphylococcus aureus Cell Wall Murein. *J Bacteriol*. Noviembre 2004;186(21):7141–8.
 37. Percival SL, Williams DW. Escherichia coli. In: *Microbiology of Waterborne Diseases* [Internet]. Elsevier; 2014. p. 89–117. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124158467000068>
 38. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic Escherichia coli. *Gut Microbes*. 2012;3(2):71–87.
 39. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(1): 142-201
 40. E. Coli enterohemorrágica [Internet]. the Center for Food Security & Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics. 2010 [citado el 18 de enero del 2020]. p. 1–12. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/ecoli-es.pdf>
 41. Escherichia coli (ATCC® 43895™)
 42. Escherichia coli (ATCC® 25922™)
 43. Huang KC, Mukhopadhyay R, Wen B, Gitai Z, Wingreen NS. Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci*. Diciembre 2008;105(49):19282–7.
 44. Holst O. The structures of core regions from enterobacterial lipopolysaccharides. *FEMS Microbiol Lett*. Junio 2007;271(1):3–11.
 45. Beveridge T. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(16):4725-33.
 46. Denyer SP, Maillard Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 2002; 92(1): 35S-45S
 47. Fai P, Grant A. A Rapid Resazurin Bioassay for Assessing the Toxicity or Fungicides. *Chemosphere*. 2009;74(9):1165-70.
 48. Guerrero O. Desarrollo de una plataforma de microfluídica basada en microgotas para ensayos con E.coli utilizando el par redox resazurina-resorufina. Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.

49. Escobar L, Alfonso P, Aristizábal F. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Julio 2009; 11(2): 49-56
50. Camacho A, Giles M, Ortegón A, Palao M, Serrano B, Velázquez O. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México; 2009.
51. Bloom BR, Atun R, Cohen T, Dye C, Fraser H, Gomez GB, et al. *Disease Control Priorities, (Volume 6): Major Infectious Diseases*. 3° ed. The World Bank; 2017.
52. Drummond WK, Kasperbauer SH. Nontuberculous Mycobacteria: Epidemiology and the Impact on Pulmonary and Cardiac Disease. *Thorac Surg Clin*. 2019;29:59–64.
53. CDC Treatment for TB Disease [internet]. U.S Department of health & Human services [consultado el 30 de marzo del 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/tb/topic/treatment/tbdisease.htm>
54. Parenti F, Lancini G. Rifamycins. *Antibiotic and Chemotherapy*. Saunders; 2010, p. 326–33.
55. MacNeil A, Glaziou P, Sismanidis C, Date A, Maloney S, Floyd K. Global Epidemiology of Tuberculosis and Progress Toward Meeting Global Targets Worldwide, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020;69(11):281–5.
56. Li W, Stevens CM, Pandya AN, Darzynkiewicz Z, Bhattarai P, Tong W, et al. Direct Inhibition of MmpL3 by Novel Antitubercular Compounds. *ACS Infect Dis*. Junio 2019;5(6):1001–12.
57. Zhang B, Li J, Yang X, Wu L, Zhang J, Yang Y, et al. Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. *Cell*. Enero 2019;176(3):636-648.
58. Dupont C, Chen Y, Xu Z, Roquet-Banères F, Blaise M, Witt AK, et al. A piperidinol-containing molecule is active against *Mycobacterium tuberculosis* by inhibiting the mycolic acid flippase activity of MmpL3. *J Biol Chem*. Noviembre 2019;294(46):17512–23.
59. Dupont C, Viljoen A, Dubar F, Blaise M, Bernut A, Pawlik A, et al. A new piperidinol derivative targeting mycolic acid transport in *Mycobacterium abscessus*. *Mol Microbiol*. Agosto 2016;101(3):515–29.
60. Williams J, Haiderer E, Coulson G, Conner K, Ellsworth E, Chen C, et al. Identification of new MmpL3 Inhibitors by untargeted and targeted mutant screens defines MmpL3 domains with differential resistance. *bioRxiv*. Febrero 2019: article under review. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/564245v1.full.pdf>
61. Kaatz GW, Moudgal VV., Seo SM, Hansen JB, Kristiansen JE. Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with

- multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22:254–61.
62. Guy CS, Tichauer E, Kay GL, Phillips DJ, Bailey TL, Harrison J, et al. Identification of the anti-mycobacterial functional properties of piperidinol derivatives. *Br J Pharmacol*. Julio 2017;174(14):2183–93.
63. Burra S, Yamsani M, Vobalaboina V. The Liquisolid technique: an overview. *Brazilian J Pharm Sci*. Septiembre 2011;47(3):475–82.
64. Suwardie H, Wang P, Todd DB, Panchal V, Yang M, Gogos CG. Rheological study of the mixture of acetaminophen and polyethylene oxide for hot-melt extrusion application. *Eur J Pharm Biopharm*. Agosto 2011;78(3):506–12.

ANEXOS

Anexo 1. Medio de conservación

Dependiendo la bacteria será el medio de conservación: *E.coli* con medio LB, *S.aureus* con medio Soya Tripticaseina, Micobacterias medio TH9 implementado con ADC. Cada uno de estos medios tendrá en su concentración además DMSO, lo necesario para mantener una concentración al 7% por lo que para 1mL de medio de conservación serán 930µL de medio correspondiente y 70µL de DMSO. Estas cepas se colocaran en ultracongelador a -70°C.

Anexo 2. Composición de los medios de cultivo aproximadamente para 1L

Tabla8. Composición de los medios de cultivo para micobacterias

Componente	Medio 7H10 (gramos)	Medio 7H9 (gramos)
Ácido L-glutamico	0.5	0.5
Agar	15	----
Biotina	0.0005	0.0005
Citrato de amonio férrico	0.04	0.04
Citrato de sodio	0.4	0.1
Clorhidrato de piridoxina	0.001	-----
Cloruro de calcio	0.0005	0.0006
Fosfato disódico	1.5	2.5
Fosfato monopotásico	1.5	1.0
Piridoxina	----	0.001
Sulfato de amonio	0.5	0.5
Sulfato de cobre	0.001	0.001
Sulfato de magnesio	0.025	0.05
Sulfato de zinc	0.001	0.001
Verde de malaquita	0.00025	-----

Tabla9. Composición de los medios Middlebrook enriquecimiento para para micobacterias

Componente	ADC (gramos)	OADC (gramos o mL según sea el caso)
Albúmina bovina (Fracción V)	50.0	50.0
Catalasa	0.03	0.03
Cloruro de sodio	8.5	8.5
Dextrosa	20.0	20
Ácido Oleico	-----	0.6 mL

Tabla10. Composición de los medios de cultivo para Staphylococcus aureus

Componente	Agar Soya Trypticosa (gramos)	Caldo Soya tripticosa (gramos)
Agar	15	----
Cloruro de sodio	5	5
Fosfato dipotásico	----	2.5
Glucosa	----	2.5
Peptona de soya (digerido de papaína)	5	3
Peptona de caseína (pancreática)	15	17

Tabla11. Composición de los medios de cultivo para E. coli

Componente	Agar Luria (LB de Miller) (gramos)	Caldo LB (gramos)
Agar	15	----
Cloruro de sodio	10	10
Extracto de levadura	5	5
Triptona	10	10

Anexo 3. Elaboración de medios de cultivo para micobacterias

Placas de Agar 7H10 (para ≈28 placas)

Con ayuda de una probeta medir 247mL de agua desionizada y trasvasar en un matraz Erlenmeyer de 500mL, agregar 5.7g de Agar 7H10 junto con 1.25g de asparagina y 3mL de glicerol, agitar hasta que se presente una coloración verde opaco. Después colocar el matraz en el microondas y calentar poco a poco en lapsos de 30s, sin dejar que hierva para evitar que se proyecte, en el momento en que cambie de verde opaco a translucido pasar a lapsos de 5-10s, hasta que se hayan disuelto por completo los reactivos. Tapar el matraz con tapón de algodón y gasa y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min. Enfriar a 55-50°C hasta que la temperatura sea soportable en el dorso de la mano y añadir 30mL de OADC filtrado con ayuda de una jeringa y un filtro de pirinola de 0.22µm. Agitar suavemente para homogeneizar y vaciar 10mL en cajas Petri estériles.

Medio 7H9

Medir con ayuda de una probeta 50mL de agua desionizada y añadir 1 mL de glicerol, disolver y llevar a 450mL con agua desionizada. Trasvasar en un frasco estéril de vidrio de boca ancha con tapa de rosca con capacidad de 500mL y adicionar 2.35g de medio 7H9. Sin tapar el frasco por completo, es decir sin apretar la rosca, colocar un gorro de papel Kraft y esterilizar por autoclave a 121°C por 10 min. Enfriar a 50-55°C hasta que la temperatura sea soportable en el dorso de la mano y añadir 50mL de ADC filtrado con ayuda de una jeringa y un filtro de pirinola de 0.22 µm. Agitar suavemente para homogenizar y utilizar o esperar a que llegue a temperatura ambiente para guardar en refrigeración.