



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del inhibidor de la xantino oxidasa “Alopurinol”

Julio César Fajardo Quintana

Universidad Nacional de Colombia
Facultad De Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2012

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana In-Vitro del Inhibidor de la xantina oxidasa
"Alopurinol"

Julio César Fajardo Quintana

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias- Farmacología

Director (a):

Ph.D. Milton Josue Crosby Granados

Línea de Investigación:

Farmacología Experimental

Grupo de Investigación:

Unidad de Investigaciones en Farmacología Molecular UNIMOL

Universidad Nacional de Colombia

Facultad De Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2012

Hacer y descubrir cosas nuevas implica un gran esfuerzo por dejar de temer a algo que realmente no era desconocido: la realidad.

Anónimo

Agradecimientos

A mi padre, por sembrar la semilla que motiva mi vida.

A mi madre, por tener fe y demostrarme su apoyo.

A mi familia, quienes me han tendido su mano en todos los momentos y situaciones.

A la Universidad Nacional de Colombia, alma máter que me ha ayudado a comprender el significado de la realidad y me ha dado las herramientas para sobrevivir en este universo que evoluciona.

Al Departamento de Farmacia y la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, por permitir la formación de nuevos estudiantes en los campos propios de su ciencia.

Al Dr. Milton Josué Crosby Granados, Profesor Asociado de la Universidad Nacional, por compartir su sabiduría y conocimientos, darme la oportunidad de experimentar nuevos retos y cambiar mi forma de pensar ante el análisis del mundo.

Resumen

Las células bacterianas y animales comparten algunas propiedades estructurales y metabólicas para el mantenimiento de las funciones fisiológicas basales, claro ejemplo es el de la membrana celular. Esta estructura posee una composición química comparable entre los diferentes organismos vivos con algunas pequeñas diferencias, pero fisiológicamente desempeña las mismas tareas para mantener la viabilidad y regular la respuesta celular al medio ambiente. Es así como agentes químicos externos (xenobioticos), que pueden interactuar con la membrana, pueden interferir en principio con las propiedades fisiológicas y bioquímicas de esta estructura y de esta forma pueden inducir una descompensación en el metabolismo de membrana afectando la viabilidad celular.

El presente trabajo fue una aproximación para evaluar la actividad de algunos medicamentos no-antibióticos sobre microorganismos Gram negativos y Gram positivos de referencia ATCC, con el fin de determinar su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano bajo condiciones in-vitro y seleccionar cuál de ellos permite aproximar una alternativa para disminuir la resistencia adquirida por microorganismos a los antibióticos. Los resultados encontrados en este trabajo, muestran claramente que, bajo las condiciones experimentales empleadas en nuestro laboratorio y en contraposición a trabajos reportados previamente, la actividad de los medicamentos no-antibióticos como antimicrobianos es ejercida principalmente sobre microorganismos gram positivos y en menor grado contra gram negativos y muestra dependencia del perfil de resistencia a los antibióticos por parte de estos microorganismos. Además, parece que estas diferencias en la sensibilidad a medicamentos no-antibióticos guarda una relación con diferencias estructurales entre estos patógenos.

La actividad antimicrobiana de todos los medicamentos no-antibióticos ensayados sobre microorganismo gram positivos como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, fue lograda a concentraciones entre 100 y 250 µg. El mejor efecto antimicrobiano fue observado para flucetrina, timolol, haloperidol, diclofenaco y lidocaína, siendo el microorganismo más sensible *Enterococcus faecalis*. Para microorganismos gram negativos, tan solo flucetrin, timolol, metil-digoxina y diclofenaco presentaron actividad contra *Escherichia coli* y en menor grado contra *Pseudomonas aeruginosa*. El efecto combinado medicamento ni-antibiótico/ampicilina evaluado sobre *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina en relación 10:1 (100 µg/10 µg y 50 µg/5 µg), permite restablecer el efecto antimicrobiano de la ampicilina para los medicamentos no-antibióticos con especial interés para la mezcla diclofenaco/ampicilina.

Palabras clave: Alopurinol, Xenobioticos, Bacterias, Antiinfecciosos.

Abstract

The human and animal cells share some structural and metabolic properties to maintain minimal physiological functions. One of the most conserved cell structures is cell membrane. This structure is almost chemically comparable between all living organisms with some minimal differences, but physiologically behaves in the same way to maintain the viability and regulate cell response to the environment. So, any xenobiotic substance that could interact with cell membrane could in theory interfere with its physiology or biochemical properties and so, may render a cell membrane metabolic imbalance affecting cell viability.

The present work it was an approximation to evaluate the antimicrobial activity of some no-antibiotics drugs over Gram negative and Gram positive bacteria belonging to ATCC, in order to determine their ability to inhibit bacterial growth properties on in-vitro conditions and also to select which of them allow to launch and alternative for diminish the acquired bacteria resistance to antibiotics. The facts found in this work, show clearly that under experimental conditions used in our laboratory and in opposition to pervious reports, that activity of non-antibiotic drugs as antimicrobial is directed mainly on gram positive bacteria and in less degree on gram negatives and display a its activity depending of their antibiotic profile resistance. Also, it seems that differences between antimicrobial of all drug evaluated from bacteria to bacteria, were probably due to structural differences between them.

The main bactericidal activity of all no-antibiotic drugs tested were exerted mainly over Gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* at concentration between 200 to 250 µg. The best antimicrobial effect was observed for flucetrina, timolol, aloperidol, diclofenaco y lidocaina, being better the antibiotic effect on *E. faecalis*. For Gram negative bacteria, only flucetrin, timolol, metal-digoxina and diclofenac, were effective; the more susceptible bacteria was *Escherichia coli* and the less *Pseudomona aeruginosa*. The combined effect, no-antibiotic drug /ampicilline, was evaluated over *Staphylococcus aureus* with intermediary sensibility to ampicillin at ration concentration of 100µg/10µg and 50µg/5µg. The synergic effect was observed for all non-drugs evaluated, being of special interest the combination diclofenac/ampicilline.

Keywords: Allopurinol, Xenobiotics, Bacteria, Anti Infective Agents

Contenido

Resumen	IX
Lista de Figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Introducción	17
1. Marco teorico	19
1.1 Generalidades	19
1.2 Utilización de antibióticos y desarrollo de resisitencia en microorganismos.....	20
1.3 Resistencia a los antimicrobianos como porblema mundial de salud pública	21
1.4 Mecanismos de resistencia bacteriana.....	22
1.5 Blancos terapéuticos	23
1.6 Medicamentos no antibióticos y actividad antimicrobiana.....	24
1.6.1 Alopurinol.....	25
1.6.2 Haloperidol.....	26
1.6.3 Propanolol y Timolol.....	26
1.6.4 Antihistamínicos.....	27
1.6.5 Clonazepam.....	27
1.6.6 Antiinflamatorios no esteriodales	27
1.6.7 Anestésicos.....	28
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivo general.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30

3. Metodología.....	32
3.1 Tipo de estudio.....	32
3.2 Período de estudio.....	32
3.3 Valoración de la eficacia antimicrobiana por el método de difusión en gel.....	32
3.4 Selección de microorganismos testigo	32
3.5 Preparación y estandarización del inóculo	33
4. Resultados	
4.1 Control de pureza de los cultivos bacterianos	35
4.2 Ensayo de susceptibilidad a antibióticos	35
4.3 Actividad antimicrobiana de medicamentos no antibióticos	37
5. Análisis de Resultados	45
6. Conclusiones	49
Bibliografía	51

!

Lista de figuras

Pág.

Figura 1: Diferencias en la estructura y composición química de la envoltura de los principales grupos de bacterias que causan infecciones en humanos. **Error! Marcador no definido.**5

Figura 2: Variación del sitio blanco de acción de los diferentes antibióticos inhibidores de síntesis de pared en bacterias.....16

Figura 3: Sitio blanco de acción de los diferentes antibióticos.....20

Figura 4: Metabolismo de las purinas y formación de ácido úrico.....21

Figura 5. Perfil de sensibilidad a antibióticos de bacterias gram negativas.....31

Figura 6. Perfil de sensibilidad a antibióticos de bacterias gram positivas.....32

Figura 7. Perfil de sensibilidad a medicamentos no-antibióticos de bacterias gram negativas.....34

Figura 8. Perfil de sensibilidad a medicamentos no-antibióticos de bacterias gram positivas.....35

Figura 9. Ensayo de medicamentos no-antibióticos sobre microorganismo testigo Gram negativos.....36

Figura 10. Ensayo de medicamentos no-antibióticos sobre microorganismo testigo Gram positivos.....37

Figura 11. Medicamentos no-antibióticos en posiciones (1-8) a concentración de 200µg/mL.....37

Figura 12. Medicamentos no-antibióticos en posiciones (1-8) a concentración de 50µg/mL.....38

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4.3.1: Halos de inhibición en mm de medicamentos no antibióticos.....	33
Tabla 4.3.2: Halos de inhibición en mm de medicamentos no antibióticos.....	33

Introducción

El principio de “*bala mágica*” acuñado por el médico alemán Paul Erlich y padre de la quimioterapia hace referencia al efecto terapéutico selectivo y específico, principio deseable de medicamentos, siendo esta propiedad la más destacable en los antibióticos. El estudio comparativo de la estructura y fisiología celular entre procariotes y eucariotes es el principio fundamental en quimioterapia y la base sobre la cual se desarrollan medicamentos para el tratamiento de infección por patógenos y más aun, en cáncer.

Uno de los problemas más notorios en farmacología, es la cercanía filogenética entre los patógenos y el hospedero humano; esta relación incrementa en relación con el grado de evolución (bacterias < hongos < protozooario < célula humana), y se asocia con la toxicidad relativa de los medicamentos por disminución de la selectividad sobre el blanco terapéutico. Por lo general, la disminución de la selectividad se encuentra asociada a la existencia de rutas metabólicas comunes tanto en el hospedero como en el patógeno, ejemplo de ello es la ruta metabólica de síntesis de precursores de nucleótidos asociados a dehidro folato reductasa (DHFR), o similitud en la composición química entre las estructuras de ambos (membrana celular). Dentro de este rango de medicamentos encontramos los agentes antivirales, anti-tumorales y antiparasitarios y con algunos antibióticos como sulfas y quinolonas.

Si bien las semejanzas a nivel estructural pueden ser una desventaja desde el punto de vista terapéutico, las diferencias en composición química de las diferentes estructuras celulares y su función en la fisiología celular, es un aspecto importante para el efecto farmacológico selectivo. En este aspecto, el conocimiento de la composición química de la membrana celular, el ribosoma y la pared celular, son importantes en la selectividad y el efecto farmacológico y es así, como el conocimiento de las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de estas estructuras permite la identificación de blancos terapéuticos selectivos (mycobacterias y hongos no son sensibles a antibióticos beta lactámicos) (1).

Así mismo, en la línea evolutiva, existen características fisiológicas altamente conservadas entre las diferentes especies (mecanismos de transporte a través de membrana, algunas rutas metabólicas). Dentro de las rutas metabólicas conservadas entre especies, encontramos la detoxificación de xenobióticos. El mecanismo más simple dentro de la detoxificación de xenobióticos es la eliminación del compuesto químico del interior de la célula mediante intercambio de protones (2-4), dentro de los más complejos, la modificación química y degradación del xenobiótico mediante la expresión de enzimas indecibles, como es el caso de las beta lactamasas, acetilasas y fosforilasas (1).

Así, las semejanzas en estructura celular, rutas metabólicas, sistemas de transporte, etc., entre los diferentes seres vivos, es una característica llamativa en farmacología en lo referente a la posibilidad de que medicamentos utilizados corrientemente en el

tratamiento de patologías no infecciosas en humanos, presenten un efecto farmacológico sobre microorganismos causantes de infecciones en humanos, los cuales podrían en teoría ayudar en el tratamiento de procesos infecciosos, bien se por sinergismo con el antibiótico o restableciendo el efecto del mismo frente a bacterias con perfiles de resistencia por alteración de una propiedad fisiológica del patógeno.

El presente trabajo, pretende hacer una valoración de tipo cualitativa y semi-cuantitativa de la actividad antimicrobiana de algunos medicamentos tipo no antibióticos con mecanismos de actividad diferente, y utilizados en el tratamiento de diferentes patologías humanas a fin de determinar, si estos poseen actividad antibiótica frente a microorganismo testigo Gram negativos y Gram positivos.

1.Marco Teórico

1.1. Generalidades

Las variaciones en estructura y composición química de la envoltura de los diferentes microorganismos (figura 1) afecta en forma importante el efecto de antibióticos y otras sustancias por variación en la permeabilidad.

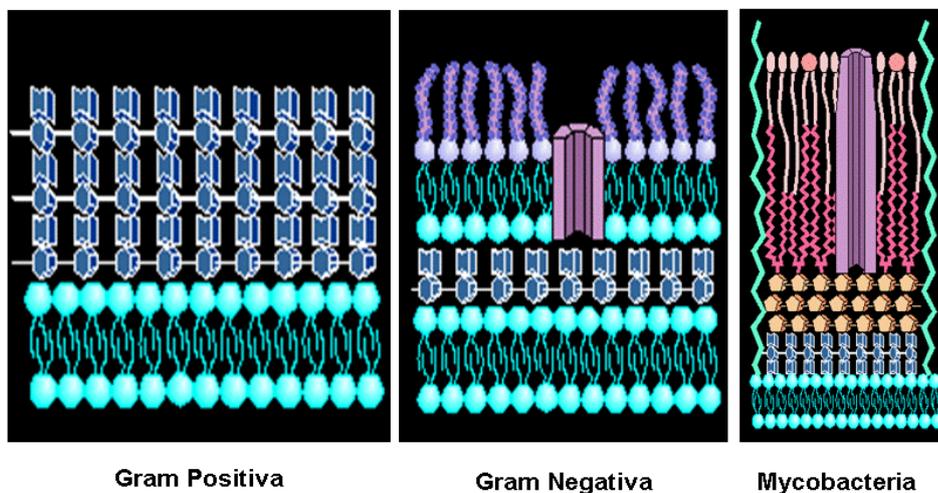


Figura 1. Diferencias en la estructura y composición química de la envoltura de los principales grupos de bacterias que causan infecciones en humanos

La estructura más simple, pero de carácter hidrofóbico es la envoltura de microorganismo Gram positivos (p.e. *Staphylococcus aureus*), la cual está constituida por una pared conformada por peptidoglicano en un 70% y una membrana citoplasmática; la complejidad intermedia representada por microorganismos Gram negativos (p.e. *Escherichia coli*), cuya envoltura está constituida por dos membranas, una citoplasmática y otra extracelular que contiene adicionalmente cadenas de lipopolisacárido (LPS) y la más compleja la de alcohol ácido resistentes (p.e. *Mycobacterium tuberculosis*), conformada por una membrana, una capa de peptidoglicano y polímeros de lipoarabino mamano y galactano, con cadenas de ácidos grasos de cadena larga inmersos en esta estructura, más próxima en composición química a la de los hongos.

Estas características, hacen que no todos los antibióticos sean igualmente efectivos en el tratamiento de las diversas infecciones causadas por estos patógenos, siendo el más resistente el *Mycobacterium tuberculosis* a los antibióticos convencionales. Las diferencias estructurales entre las diferentes células, hacen que tan solo algunos antibióticos puedan ejercer su efecto sobre un cierto tipo de microorganismos, siempre y cuando el blanco terapéutico esté presente en todos. Este es el caso de la vancomicina,

quien es tan solo efectiva en tratamiento de infecciones por microorganismos Gram positivos.

Si bien el blanco terapéutico puede ser la misma ruta metabólica, los antibióticos que actúan sobre esta ruta, pueden inhibir un proceso en un paso diferente de la misma (figura 2).

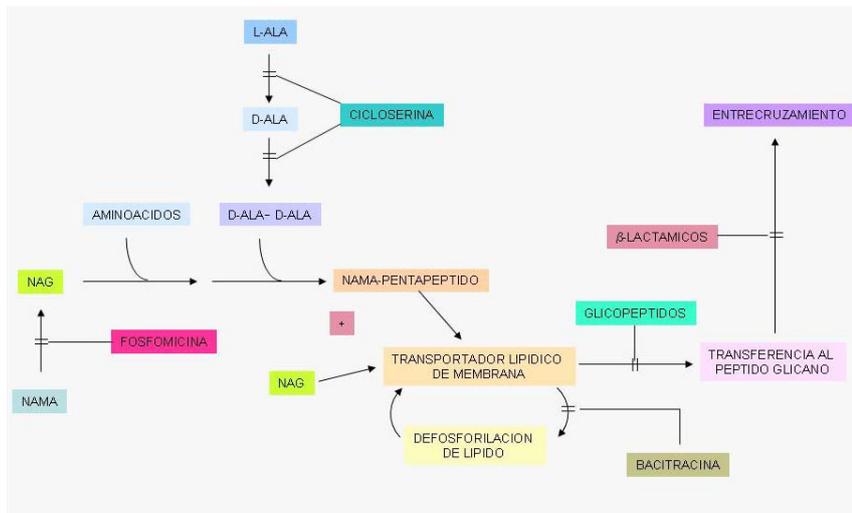


Figura 2. Variación del sitio blanco de acción de los diferentes antibióticos inhibidores de síntesis de pared en bacterias.

Otro factor importante en la actividad antimicrobiana de un medicamento, es la estructura química del mismo. La estructura química de un medicamento determina sus propiedades físico-químicas, dentro de las cuales se puede mencionar: solubilidad, pKa, etc. Estas propiedades determinan a su vez la facilidad o no para atravesar estructuras celulares y a su vez la afinidad por una u otra estructura celular. La figura 3, muestra los diferentes sitios de acción de los las diferentes familias de antibióticos.

1.2. Utilización de antibióticos y desarrollo de resistencia en microorganismos

No puede negarse que con el descubrimiento de los agentes quimio-terapéuticos por Paul Earlich y de la penicilina por Lexander Fleming se dio solución en parte uno de los

mayores flagelos de la humanidad, la mortalidad por enfermedad infecciosa. Sin embargo, con el paso del tiempo han surgido microorganismos capaces de resistir la exposición a los antibióticos, lo que supuso un nuevo reto para la ciencia: a saber, la creación de nuevas y mejores alternativas capaces de disminuir la resistencia a los antimicrobianos.

La creación de nuevas clases de fármacos antimicrobianos, algunos de ellos utilizados en combinación para mejorar su potencia o espectro de actividad, como respuesta a la aparición de microorganismos resistentes. Sustancias inhibitoras de enzimas involucradas en la resistencia como es el caso de las β -lactamasas, dio lugar al diseño de inhibidores de dichas enzimas, que aunque carecen (habitualmente) de acción antibacteriana intrínseca, contribuyen a restablecer la acción del antibiótico. Algunos de estos inhibidores como el ácido clavulánico, el sulbactam y tazobactam, se unen irreversiblemente a algunas β -lactamasas, protegiendo de su acción a los antibióticos β -lactámicos (2). A pesar de estos adelantos en terapéutica, los esfuerzos, cada vez son más los microorganismos que evolucionan e incrementan la resistencia a la acción de los antimicrobianos, y por lo tanto, es más urgente la creación o búsqueda de nuevas moléculas capaces de actuar sobre estos agentes patógenos. La búsqueda de nuevas moléculas con potencial actividad antimicrobiana, no sólo han conducido a la exploración de nuevas alternativas terapéuticas, sino a la reevaluación de fármacos existentes cuyo mecanismo de acción guarda similitudes con el metabolismo bacteriano.

El mecanismo inductor de la resistencia a los antibióticos es la exposición del microorganismo al xenobiotico, el cual, incrementa la selección natural de las formas resistentes y activa o incrementa la expresión de cierto numero de genes encaminados a disminuir el efecto toxico del antibiótico.

Por la facilidad como el uso de antibióticos induce aparición de resistencia en diversos microorganismos, el reto en terapéutica no sólo incluye disminuir o evitar la posibilidad de generar resistencia por uso de antimicrobianos, sino además propone el diseño de nuevas y mas versátiles moléculas para sobre llevar la multi-resistencia de algunos patógenos de interés en salud publica como el *Staphylococcus aureus* MRSA.

1.3 Resistencia a los antimicrobianos como problema mundial de salud pública

Hablar acerca de resistencia microbiana no es hablar de un fenómeno nuevo. Muchas son las causas que generan este fenómeno: culturales, sociales, económicas (se destacan la prescripción inadecuada, falta de políticas públicas de control, uso indiscriminado, etc). Las consecuencias del abuso de antibióticos en humanos, crianza de animales y agricultura, ha sido catastrófico para la terapéutica antimicrobiana debido al incremento en la mortalidad por esta causa, sin dejar de mencionar el costo para los sistemas de salud y en general para la comunidad científica que cada vez ve más reducido el espectro útil de antimicrobianos. La crisis se agudiza por la dificultad de desarrollo de nuevos antimicrobianos (8). Sin embargo, se cree que las posibilidades de

éxito son bajas para detener el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos, puesto que su aparición es inevitable desde una perspectiva evolutiva(9).

La resistencia a los agentes quimio-terapéuticos se produce en virus, bacterias, hongos y parásitos como manifestación natural e inevitable de sus capacidades evolutivas. El descenso en la efectividad de los medicamentos existentes es consecuencia de una compleja interacción entre la selección natural, el medio ambiente, y los patrones de consumo de fármacos. Gracias a ello, la resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un problema de salud pública mundial, al incrementar el reporte de nuevas cepas que desafían el tratamiento con terapias comúnmente disponibles(10).

Como consecuencia de esto, para el 2005, 94.360 personas en los Estados Unidos desarrollaron una infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA), de las cuales 18.650 murieron(11). De igual forma, existen reportes provenientes de unidades de cuidados intensivos en donde las infecciones del torrente sanguíneo por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente se incrementó del 4% en 1993 a 14% en 2002, lo que significa que los microorganismos se adaptan paulatinamente a los tratamientos convencionales y evitan la acción de los antibióticos (10).

Según los reportes de la Organización Mundial de la Salud, en 2004 se presentaron 424.203 casos de tuberculosis (TB) multirresistentes (MDR-TB) (10). Una encuesta entre 2001-2004 a un grupo internacional de laboratorios de TB reveló que de todos los casos de tuberculosis alrededor del mundo un 20% presentó multiresistencia, y de éstos un 10% de casos fueron ampliamente resistentes a medicamentos de primera y segunda línea contra la enfermedad(12) (13)(14).

Así mismo, enfermedades parasitarias también empiezan a mostrar un comportamiento similar, es decir, la terapia farmacológica convencional en ocasiones resulta ineficaz. Por ejemplo, se han descrito cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina, situación que ha contribuido al resurgimiento de la enfermedad a lo largo del mundo, existiendo reportes que indican aparición de resistencia incluso a terapias de segunda línea como artemisinina(15).

En este contexto, las razones para pensar en soluciones urgentes para resolver el problema de resistencia a antimicrobianos están bien fundadas. El incremento de agentes patógenos resistentes ha plasmado la necesidad perentoria no sólo de racionalizar el uso de fármacos, sino además de promover la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que eviten o disminuyan la posibilidad de formación de resistencia. O, por otro lado, la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas que en combinación con los antibióticos ya existentes mejoren el espectro antimicrobiano o disminuyan el perfil de resistencia.

1.4 Mecanismos de Resistencia bacteriana

Los mecanismos de resistencia bacteriana, han sido estudiados extensivamente encontrándose similitud entre los descritos para bacterias, parásitos, y células tumorales. Puede decirse que existen cinco principales:

- a. Inactivación o modificación de los medicamentos. Por ejemplo, la desactivación enzimática de la penicilina G en algunas bacterias resistentes a la penicilina mediante la producción de beta-lactamasas(16)(17) .
- b. Alteración del blanco de acción. Por ejemplo, la alteración de la proteína del punto de enlace de la penicilina en las bacterias como *Staphilococcus Aureus* Meticilino Resistente y otras resistentes a la penicilina(18).
- c. Incremento en la actividad de la ruta metabólica. Por ejemplo, algunas bacterias resistentes a la sulfonamida no precisan ácido p-aminobenzoico (PABA), un precursor importante para la síntesis de ácido fólico y de ácidos nucleicos en las bacterias inhibidas por sulfonamidas. En lugar de ello, como las células de los mamíferos, utilizan ácido fólico pre-elaborado(19).
- d. Eliminación citoplasmática del medicamento. Disminución en la permeabilidad al medicamento de la membrana y/o incrementando el bombeo al exterior del medicamento a través de la superficie de la célula(20).
- e. Transferencia horizontal de genes procedentes de plásmidos. No explica el origen de los genes de resistencia, solo su difusión entre las bacterias. Las mutaciones, explican la aparición de resistencia a antibióticos por alteración del sitio blanco y son de tipo espontáneo(21).

Hay una gran variedad de mecanismos de resistencia observados en las bacterias. Varios mecanismos pueden operar simultáneamente en contra de un solo antibiótico, y no existen mecanismos específicos. En muchos casos, la resistencia está mediada por elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones y fagos), difundiendo entre los diferentes géneros de bacterias, llevando en muchos casos los factores determinantes de multi-resistencia (20).

1.5 Blancos terapéuticos

Dentro de los blancos terapéuticos mas distintivos de la quimioterapia anti microbiana se tienen, la ruta metabólica de síntesis de pared bacteriana, actividad de membrana celular, ruta de biosíntesis de lípidos, inactivación de síntesis de proteínas, alteración de ruta de biosíntesis de precursores de síntesis de RNA y DNA, bloqueo procesos de transcripción y duplicación de DNA.

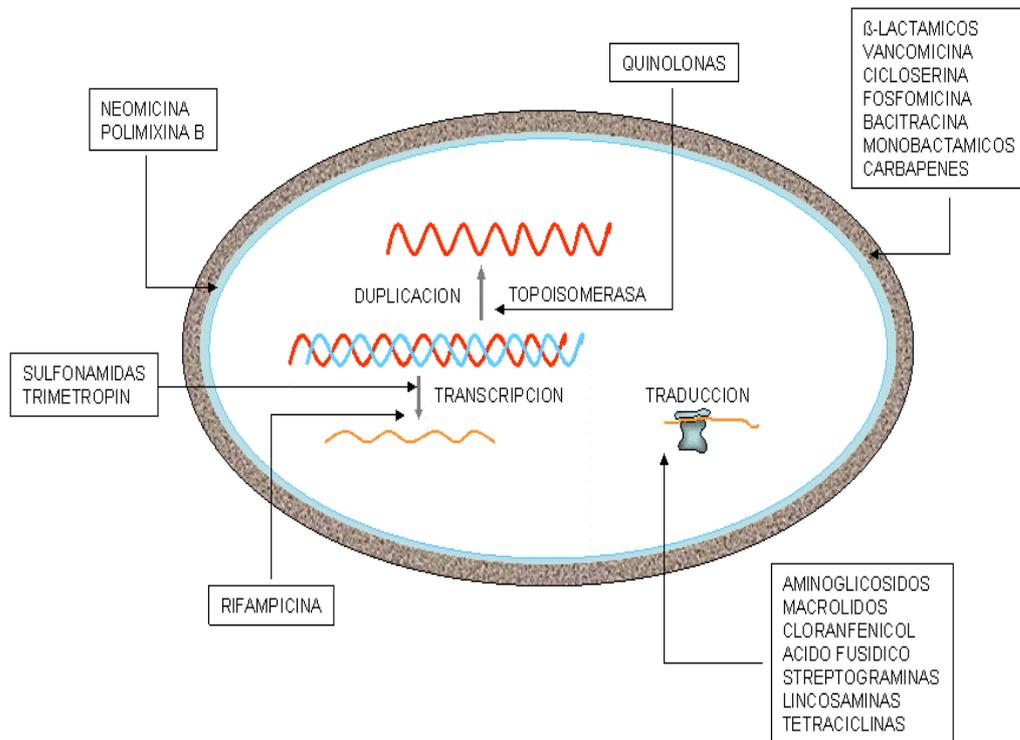


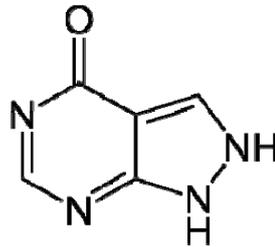
Figura 3. Sitio blanco de acción de los diferentes antibióticos.

Al observar las estructuras blanco de la actividad antimicrobiana, estas de una u otra forma, también son rutas metabólicas utilizadas como blanco terapéutico en tratamiento de cáncer y otras patologías como las hiperlipidemias y gota, para las cuales se emplean medicamentos como el metotrexato, inhibidor de la ruta de biosíntesis acoplada a dehidrofolato reductasa (DHFR), estatinas en la ruta de biosíntesis de lípidos y el alopurinol, quien interfiere con la ruta de biosíntesis de nucleótidos de-novo en la ruta xantina-hipoxantina timidina acoplada a la xantina oxidasa.

1.6. Medicamentos no antibióticos y actividad antimicrobiana

La actividad de compuestos no antibióticos como colorantes y fenotiazinas fue puesta de manifiesto desde principios del siglo pasado y estudios posteriores, hacia los años 60, fue puesto de manifiesto y demostrado que algunos medicamentos no antibióticos exhibían actividad antimicrobiana (36, 37). Dentro de las familias de fármacos no-antibióticos que han mostrado actividad antimicrobiana se encuentran: anestésicos generales, anestésicos locales, antihipertensivos, diuréticos, anti-inflamatorios, agentes mucolíticos e inhibidores de bomba de protones (38).

1.6.1. Alopurinol



Una de las moléculas mas utilizadas por su mecanismo de acción es el alopurinol un inhibidor de la xantino-oxidasa empleado comúnmente para el tratamiento de la gota. Al existir inhibición de la producción de ácido úrico mediante la acción sobre la xantino-oxidasa también se induce incremento en los niveles de xantina e hipoxantina, que se convierten a [ribonucleótidos guanosina](#) y [adenosina](#) monofosfato. Estos ribonucleótidos inhiben la [amidofosforribosil transferasa](#), la enzima inicial de la biosíntesis de las purinas y elemento limitante en la velocidad de la ruta metabólica razón por la cual el alopurinol disminuye la formación de ácido úrico y de purinas(4).

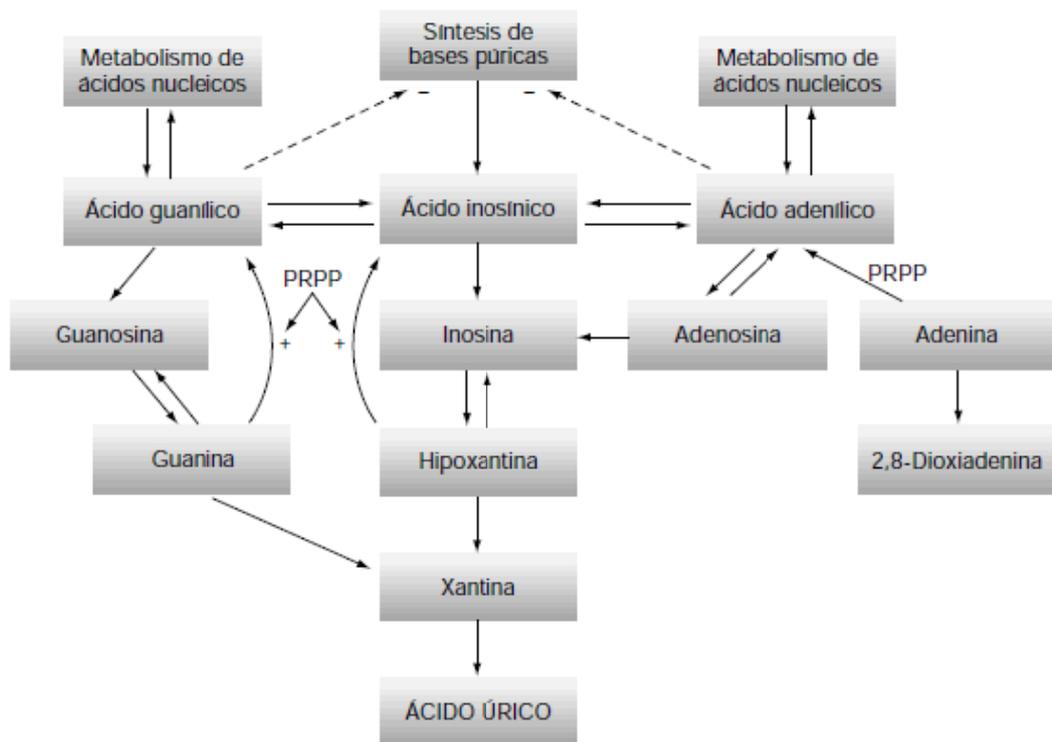


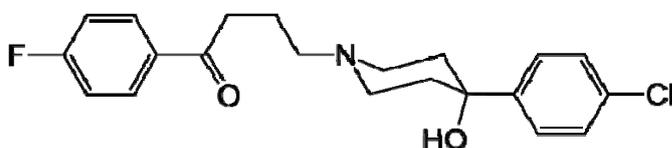
Figura 4. Metabolismo de las purinas y formación de ácido úrico. El fosforribosilpirofosfato (PRPP) facilita la síntesis de nucleótidos a partir de sus respectivas bases.

De esta manera, se podría inferir que la acción del alopurinol sobre las purinas como sustrato biológico, podría contribuir al tratamiento de las enfermedades infecciosas, asumiendo que los microorganismos utilizan purinas y pirimidinas como sustrato

biológico, en una vía metabólica conocida como la ruta de salvamento(5). Esta ruta metabólica ha sido extensivamente estudiada y el alopurinol ha sido utilizado como medicamento para terapia de procesos infecciosos causados por parásitos intracelulares de importancia clínica y en salud pública (28-31)

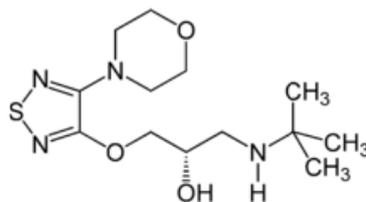
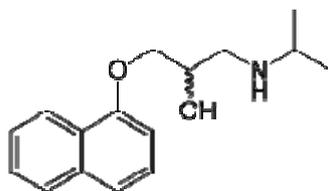
Adicionalmente, en diversos estudios sea indicado que existen secuencias genómicas capaces de inducir respuestas metabólicas a partir de las purinas o sus precursores como sustrato para tal efecto y que estas están asociadas con el control de respuestas fisiológicas sobre el estrés oxidativo, mejorando la fisiología cardíaca en las cuales el alopurinol podría tener un efecto farmacológico (6,7,22,23).

1.6.2. Haloperidol



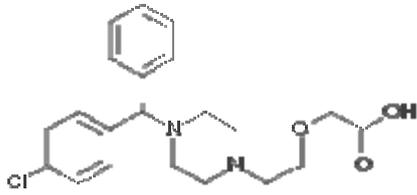
Este fármaco es un antipsicótico de la familia de las butirofenonas de fuerte acción dopaminérgica. Este medicamento bloquea el receptor de dopamina. Posee adicionalmente acción antihistaminica y anticolinérgica.

1.6.3. Propranolol y Timolol

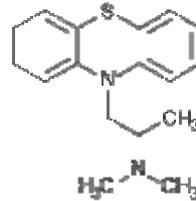


Los beta bloquadores impiden la interacción de catecolaminas endógenas, epinefrina y norepinefrina con su receptor β -adrenérgico el cual corresponde al sistema simpático. En el organismo existen tres tipos de receptores, β_1 , β_2 y β_3 . Los receptores β_1 están localizados principalmente en corazón y riñón, los receptores β_2 están localizados en pulmón, tracto gastrointestinal, hígado, útero, músculo liso y estriado y los receptores β_3 en tejido adiposo. Dentro de las alteraciones metabólicas de interés causadas por este tipo de medicamentos se encuentra alteración del metabolismo de carbohidratos y lípidos y aquellos con baja solubilidad pueden atravesar barrera hematoencefálica causando alteraciones del sistema nervioso central.

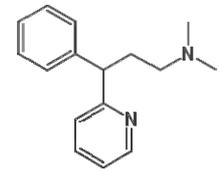
1.6.4. Anti-Histaminicos



CETERIZINA



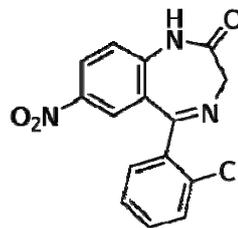
PROMETAZINA



CLORFENIRAMINA

Utilizados normalmente para tratamiento de reacciones alérgicas al interactuar con receptores de histamina tipo H1 y pueden presentar como efecto secundario efecto central causando sedación por lo cual son utilizados para tratamiento del insomnio (difenhidramina). Los antihistaminicos tipo H2 actúan sobre receptores ubicados en células parietales del estomago y son utilizados para tratamiento de ulcera péptica y reflujo gastroesofágico.

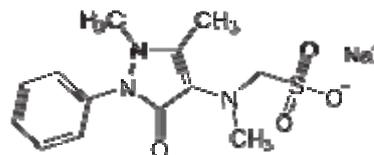
1.6.5. Clonazepam



Este tipo de medicamento de la familia de las benzodiazepinas potencia el efecto de neurotransmisores gabaérgicos como el GABA, incrementado su afinidad por el receptor, acción que provoca apertura de canales iónicos de cloruro induciendo salida de este ión y provocando el efecto inhibitorio en asociación a la disminución del efecto de la serotonina. La familia de las benzodiazepinas son un grupo de medicamento altamente lipofílicos que atraviesa con facilidad barrera hemato-encefálica.

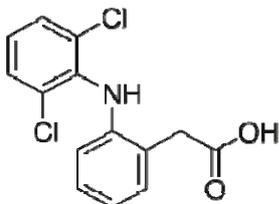
1.6.6. Antinflamatorios no-esteroidales

- Dipirona



El metamizol o dipirona es un anti-inflamatorio no esteroide utilizado en el tratamiento de procesos febriles y dolorosos, el mecanismo de acción de este medicamento es la inhibición irreversible de la ciclooxigenasa enzima involucrada en el proceso de biosíntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. Posee acción antioxidante como todos los medicamentos de este grupo y posee actividad periférica y central.

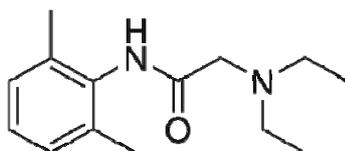
- **Diclofenaco sodico**



Anti-inflamatorio no esteroide utilizado para el tratamiento de procesos dolorosos agudos y crónicos. Es un inhibidor de ciclooxigenasa de tipo 1 y 2, es un agente uricosurico y ha demostrado poseer capacidad antimicrobiana al parecer por inhibir la síntesis de DNA bacteriano.

1.6.7. Anestésicos

- **Lidocaina**



Anestésico utilizado en el tratamiento de procesos dolorosos, interactúa con las membranas celulares debido a su alta liposolubilidad alterando la permeabilidad de las mismas. Administrado por vía intravenosa induce alteración de frecuencia cardíaca y posee efectos sobre el sistema nervioso central.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana in-vitro de medicamentos no antibióticos y establecer si el “alopurinol” presenta actividad inhibitoria sobre cultivos bacterianos de cepas Gram positivas y Gram negativas solo o en combinación con antibióticos

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Determinar la actividad antimicrobiana in vitro de medicamentos no antibióticos Gram negativos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.2. Demostrar la actividad antimicrobiana in vitro de medicamentos no antibióticos Gram positivos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*

2.2.3. Determinar si la sensibilidad o resistencia al alopurinol sobre microorganismos Gram negativos y Gram positivos.

2.2.4. Establecer si existe efecto sinérgico de medicamentos no antibióticos y alopurinol al ser utilizado en combinación de antibióticos frente a cepas resistentes

3. Metodología

3.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo experimental

3.2. Período de estudio

Realización de tesis de maestría entre Enero 2010-Junio 2011

3.3. Valoración de la eficacia antimicrobiana por el método de difusión en gel

El método Kirby-Bauer es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un microorganismo testigo y es uno de los métodos más utilizados para valoración de sustancias con actividad antimicrobiana (32).

El método de difusión en gel, según las recomendaciones y el método oficial descrito en la USP XXXII (33-35), ha sido ampliamente valorado como técnica microbiológica, para valorar la susceptibilidad de patógenos a los antibióticos y el cual se encuentra validado en el laboratorio de microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional.

3.4. Selección de microorganismos testigo

Los microorganismos seleccionados para este trabajo, son bacterias gram positivas y gram negativas pertenecientes al American Type Culture Colección (ATCC) y donadas por el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Estos microorganismos crecidos en agar sangre, fueron transferidos directamente a placas de agar selectivo a saber: Agar EMB, Agar bilis Esculina, Agar Simons Citrato, Agar Cetrimide, y Agar Manitol Salado. Dos colonias de cada uno de los cultivos de

microorganismos testigo fue transferida a tubos que contiene 10mL de caldo Muller Hinton estéril e incubadas a 37°C por cinco horas; 1 mL de este cultivo fue colocado en cajas de petri estériles para preparación de las placas utilizada en el ensayo de susceptibilidad a medicamentos.

3.5. Preparación y estandarización del inóculo

Las densidades ópticas a 620 nm para diluciones en el rango de la dilución 0.5 oscilan entre 0.1 y 0.2. La concentración de microorganismo gram positivos y gram negativos a estos valores fluctúa entre 2 y 7 por 10^8 UFC por mL.

- (i). Preparar diluciones seriadas del microorganismo testigo ente 101 y 1010.
- (ii). Sembrar 0.1 mL de c/u de las diluciones por duplicado en cajas de petri vacías.
- (iii). Adicionar 20 mL de medio de cultivo fundido a 45°C por caja de petri.
- (iv). Homogenizar por agitación en forma de ocho, seis veces a la derecha, seis veces a la izquierda.
- (v). Dejas melificar por 15 a 20 min. a temperatura de cuarto.
- (vi). Realizar perforaciones con sacabocado estéril numero tres y retirar los discos de agar con aguja de cultivo estéril.
- (vii). Adicionar con micropipeta 100µlit de cada uno de las sustancias a evaluar.

Para la determinación del perfil de susceptibilidad de los micoorganismos testigo al diferentes antibióticos el procedimiento es el referido en los numerales (i) a (v); los sensidisos de antibiótico se colocan sobre la superficie del agar y se procede a la incubación del las placas a 37°C por 24 horas. Los sensidisco utilizados para determinar la sensibilidad de los microorganismos testigos en este proyecto fueron adquiridos al a casa comercial Difco (Ampicilina 10µg, Ampicilina/Sulbactam 20µg, Ciprofloxacina 5µg, Kanamicina 30µg, Meropenem, Acido Nalidixico, Carbencilina 100µg, Piperacilina/Tazobactam 110µg y Trimetropin sulfa)

4. Resultados

4.1. Control de pureza de los cultivos bacterianos

Los cultivos de los microorganismos testigo crecidos en medios de cultivos selectivos y diferenciales, enumerados en el aparte 4.4., presentaron crecimiento característico, con coloración y morfología celular típica a la descrita en manuales de laboratorio (Merck/Difco); las colonias fueron homogéneas en cuanto a morfología y coloración. La tinción de gram revelo morfología celular y coloración uniforme lo cual certifica la pureza de los inóculos.

4.2. Ensayo de susceptibilidad a antibióticos

Las figura 5 y 6 muestran los efectos de los antibióticos de referencia utilizados para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a diferentes antibióticos de uso clínico. La figura 5 muestra los perfiles de resistencia de (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

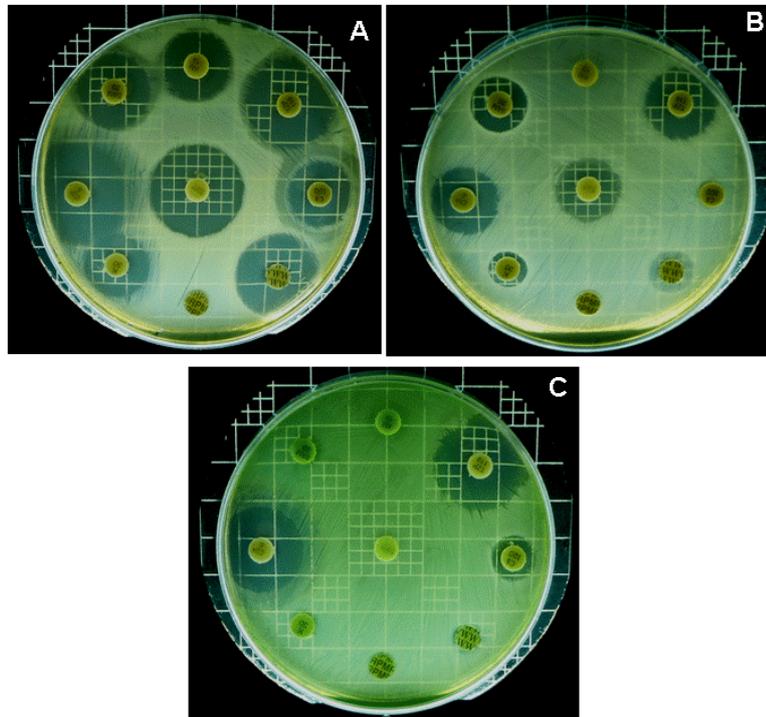


Figura 5. Perfil de sensibilidad a antibióticos de bacterias gram negativas (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. En sentido de las manecillas de reloj: ampicilina, piperacilina/tazobactam, carbenicilina, ácido nalidixico, meropenem, kanamicina, ciprofloxacina, ampicilina/sulbactam.

Escherichia coli foto (A), presenta sensibilidad intermedia a ampicilina, carbenicilina y kanamicina, siendo sensible a ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam y ciprofloxacina; *Klebsiella pneumoniae*, foto (B), mostró resistencia a todos los antibióticos ensayados presentado halos de inhibición entre 1.2 y 1.5 mm., y *Pseudomonas aeruginosa* Foto (C), exhibe sensibilidad tan solo frente Piperacilina/tazobactam y Ciprofloxacina

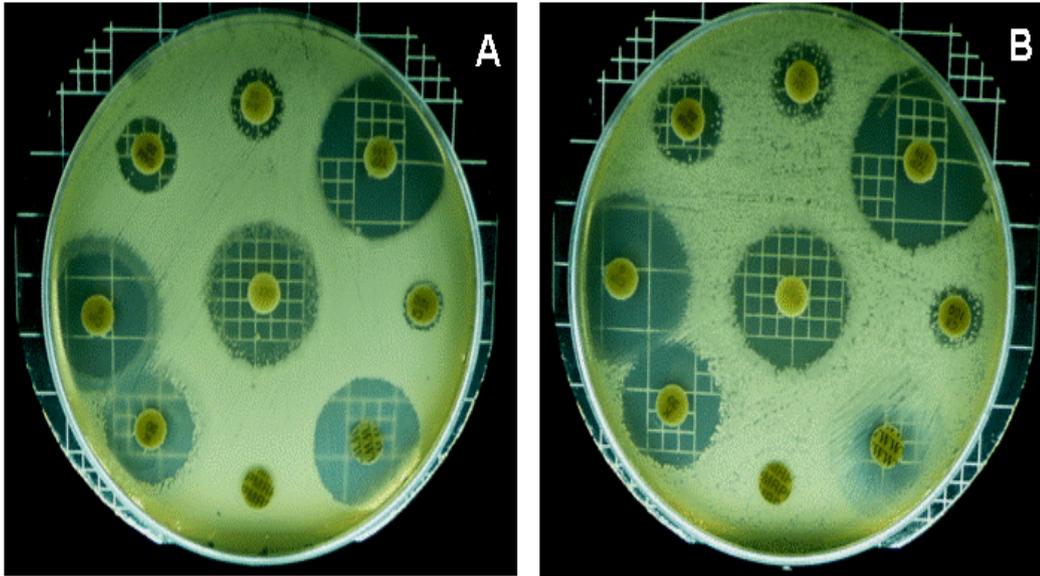


Figura 6. Perfil de sensibilidad a antibióticos de bacterias gram positivas (A) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, y (B) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. En sentido de las manecillas de reloj: ampicilina, piperacilina/tazobactam, carbenicilina, acidonalidixico, meropenem, kanamicina, ciprofloxacina, ampicilina/sulbactam.

Los perfiles de susceptibilidad para microorganismos gram positivos, figura 6, muestran sensibilidad de *Enterococcus faecalis* a piperacilina/tazobactam, ácido nalidixico y ciprofloxacina, con sensibilidad intermedia a kanamicina; por su parte el *Staphylococcus aureus* mostró sensibilidad a piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina y sensibilidad intermedia a kanamicina.

4.3. Actividad antimicrobiana de medicamentos no-antibióticos

Los medicamentos no-antibióticos ensayados frente a microorganismos gram negativos y gram positivos, fueron ensayados a concentraciones de 200µg/mL. Los halos de inhibición de cada uno de los medicamentos se tabulan en las tablas 1 y 2:

Tabla 1									
Halo de inhibición en mm de medicamentos no antibióticos									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Escherichia coli</i> - ATCC 25922	17	10	11	18	-	-	-	12	22
<i>Enterococcus faecalis</i> - ATCC 29212	17	16	17	16	-	-	16	18	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - ATCC 700603	12	-	8	13	-	-	-	11	21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ATCC 27853	11	-	9	-	-	-	-	-	18
<i>Staphylococcus aureus</i> - ATCC 29213	9	15	16	12	-	-	22	13	18

A – Fluzetrin, B -Timolol, C - Alloperidol, D - Propranolol, E – Buciclina, F – Metil digoxina, G – Diclofenaco, H – Lidocaina, I – Neomicina/polimixinaB

Tabla 2									
Halo de inhibición en mm de medicamentos no antibióticos									
	J	K	L	M	N	O	P	Q	I
<i>Escherichia coli</i> - ATCC 25922	-	11	9	-	10	13	12	10	22
<i>Enterococcus faecalis</i> - ATCC 29212	-	10	18	-	21	-	-	10	29
<i>Klebsiella pneumoniae</i> - ATCC 700603	8	8	-	-	10	-	-	15	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ATCC 27853	-	-	-	-	10	-	-	10	20
<i>Staphylococcus aureus</i> - ATCC 29213	-	-	-	16	-	17	-	14	26

J – Barbitol, K -Fenilamina, L – Dipirona, M - Marihuana, N – Zeterizina, O – Teofilina, P – Dehidrommorfona, Q – Clomazepanm, I – Neomicina/polimixinaB

Dentro de los medicamentos no-antibióticos, que no presentaron actividad antimicrobiana de interés se encontraron la buclina y la metil digoxina, teofilina y dehidromorfona; de estos tan solo se observo un efecto débil con halo de inhibición de 12-13 mm sobre *Escherichia coli*, para los dos últimos. El extracto total de marihuana ensayado mostró actividad antimicrobiana únicamente sobre *Staphylococcus aureus*. Las figuras 7 y 8 muestran el efecto antimicrobiano de los diferentes medicamentos sobre los microorganismos testigo.

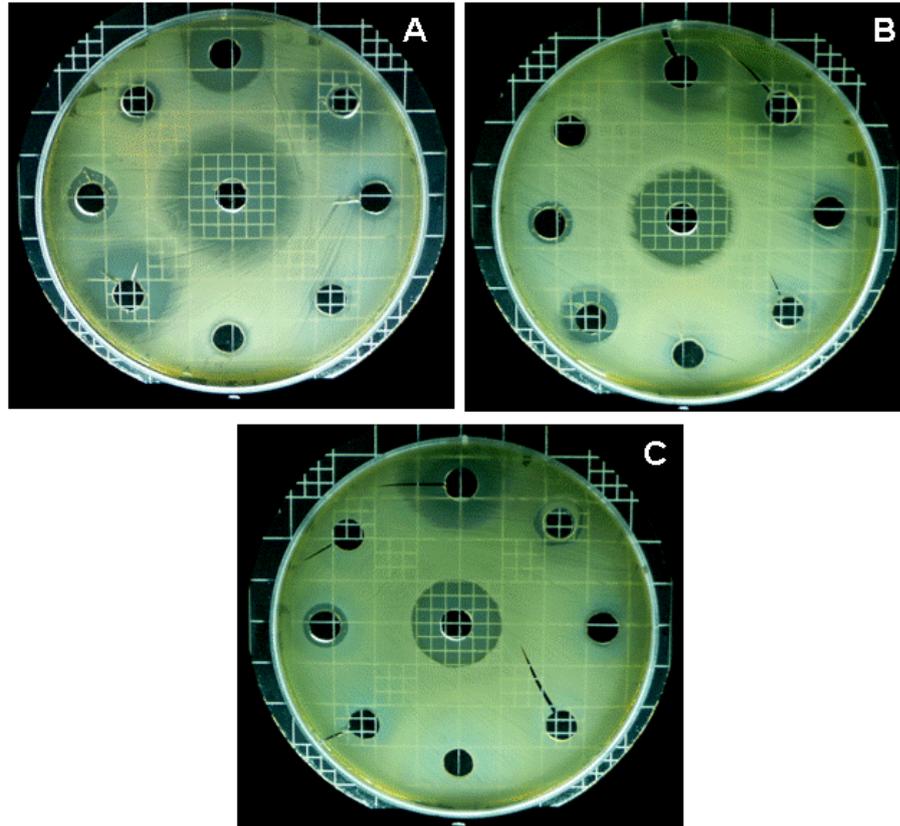


Figura 7. Perfil de sensibilidad a medicamentos no-antibióticos de bacterias gram negativas (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. En sentido de las manecillas de reloj: **flucetrina**, **timolol**, haloperidol, propranolol, bucilina, **metil-digoxina**, **diclofenaco**, lidocaina. En el centro antibiótico control Polimixina B.

Puede observarse que tan solo la flucetrina presenta actividad antimicrobiana de interés sobre los tres microorganismos testigo; el timolol presenta baja actividad sobre *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, seguido de la metil-digoxina. El diclofenaco no presenta actividad sobre microorganismos gram negativos. El microorganismo de mayor resistencia tanto antibióticos como medicamentos no-antibióticos en los ensayos efectuados es *Pseudomonas aeruginosa*.

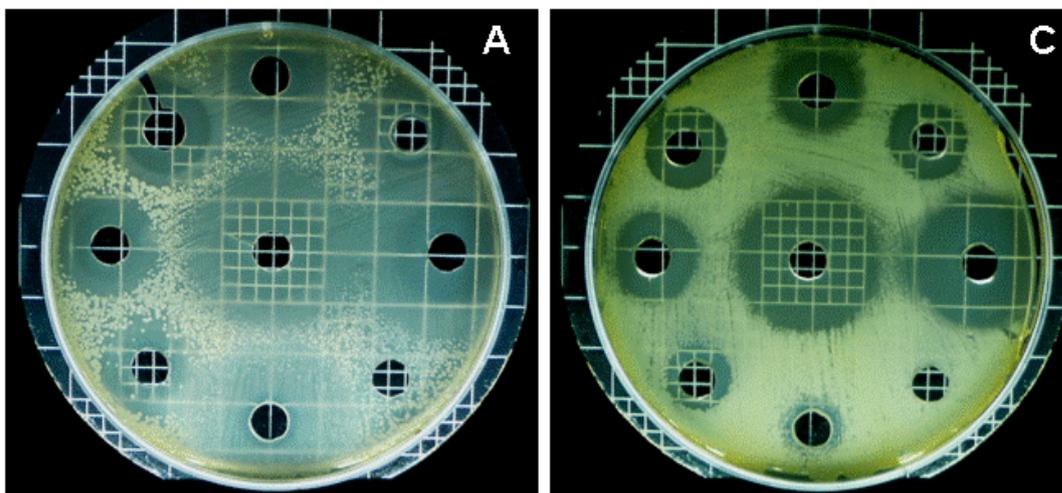


Figura 8. Perfil de sensibilidad a medicamentos no-antibióticos de bacterias gram positivas (A) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, y (B) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. En sentido de las manecillas de reloj: **flucetrina, timolol, aloperidol**, propranolol, bucilina, **metil-digoxina, diclofenaco, lidocaina**. En el centro antibiótico control Polimixina B.

La figura 8 muestra la susceptibilidad de los microorganismos gram positivos frente a medicamentos no-antibióticos. El microorganismos que presenta mayor sensibilidad al efecto de estos medicamentos es el *Enterococcus faecalis* (foto A); el medicamento que no muestra actividad antimicrobiana sobre estos microorganismos es el propranolol. A diferencia de de los microorganismos gram negativos los microorganismo gram positivos presentan mayor susceptibilidad a medicamentos no-antibióticos.

La figura 9, muestra el efecto de otro grupo de medicamentos no-antibióticos sobre las cepas de microorganismos Gram negativo testigo de (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los medicamentos utilizados para esta evaluación fueron: Barbital, Fenilamina, Dipirona, Marihuana, Zetericina, Teofilina, Dehidromorfona, Clomazepan y ciprofloxacina como antibiótico control de la actividad antimicrobiana. La distribución de los medicamentos no-antibióticos en las placas de petri, fue realizada en sentido de las manecillas del reloj.

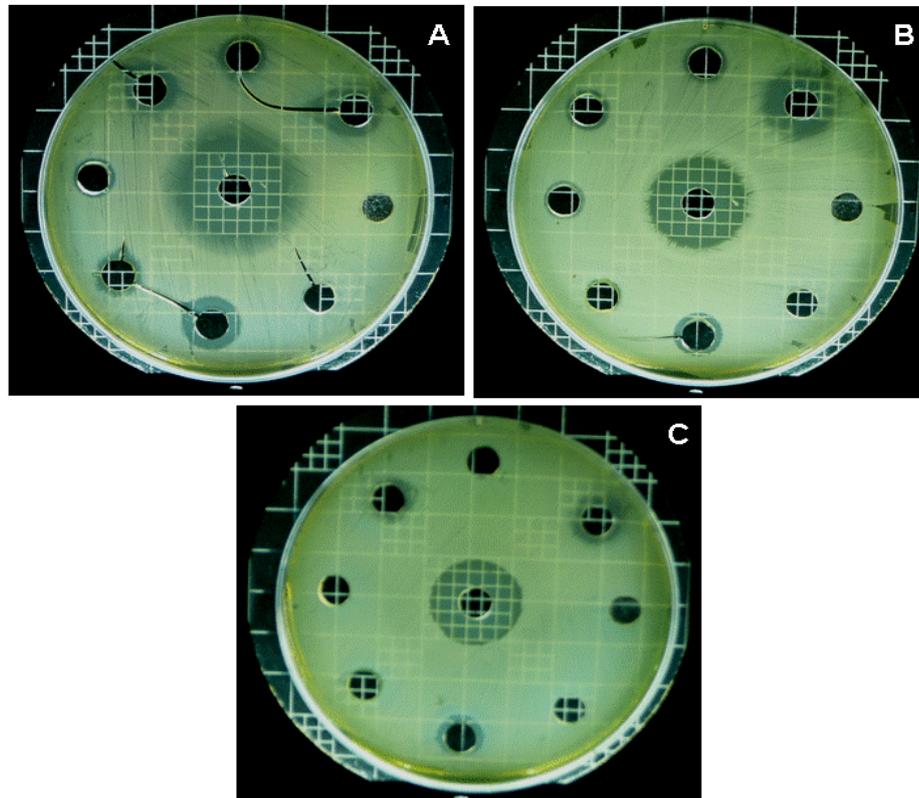


Figura 9. Ensayo de medicamentos no-antibióticos sobre microorganismo testigo Gram negativos de (A) *Escherichia coli* ATCC 25922, (B) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los medicamentos no-antibióticos en sentido de las manecillas del reloj: Barbitol, **Fenilamina**, Dipirona, Marihuana, **Zetericina**, Teofilina, Dehidrommorfona, Clomazepan y ciprofloxacina

La figura 10, muestra el efecto de los medicamentos no-antibióticos utilizados en el ensayo descrito en la figura 9 sobre los microorganismo Gram positivos: (A) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, y (B) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. La distribución de los medicamentos no-antibióticos en la placa de petri se realizó en sentido de las manecillas del reloj.

Los resultados encontrados para la evaluación de medicamentos no-antibióticos, como el perfil de resistencia a los antibióticos utilizados en le presente estudio y descritos en las figuras 5-10, muestran que los microorganismos mas sensibles a los medicamentos no-antibióticos son los Gram positivos (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213). Así mismo, los microorganismos que presentan menor susceptibilidad a los antibióticos ensayados son *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

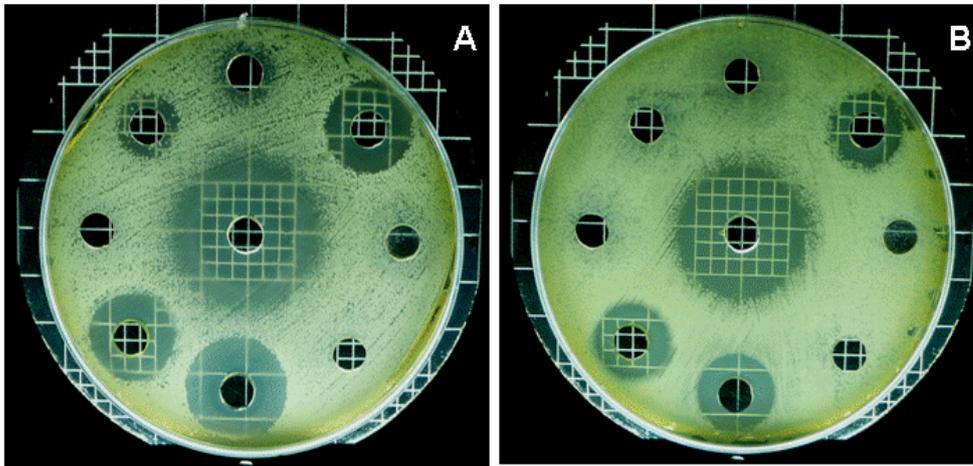


Figura 10 Ensayo de medicamento no-antibióticos sobre microorganismo Gram positivos: (A) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y (B) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. La distribución de los medicamentos no-antibióticos en las placas de petri, en sentido de las manecillas del reloj: Los medicamentos no-antibióticos en sentido de las manecillas del reloj: Barbital, **Fenilamina**, Dipirona, Marihuana, **Zetericina**, **Teofilina**, Dehidromorfona, Clomazepan y ciprofloxacina

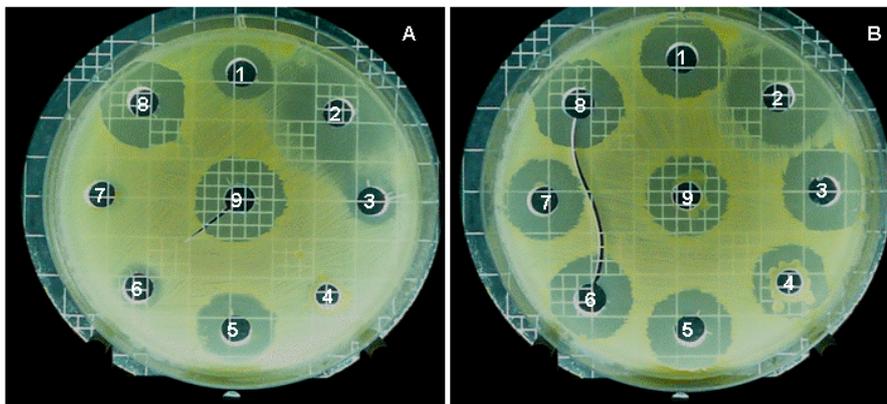


Figura 11. Medicamentos no-antibióticos en posiciones (1-8) a concentración de 200µg/mL. Placa **A**, pozo. 1. Clonazepan, 2. Diclofenaco, 3. Haloperidol, 4. Alopurinol, 5. Marihuana, 6. Midazolam, 7. Ranitidina, 8. Timolol 9. Ampicilina 20µ/mL Microorganismo testigo *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 29213. Placa **B**. medicamentos no-antibióticos pozos (1-8) a concentración 100µg/mL, mezclados con ampicilina en concentración 20µg/mL, pozo 9 ampicilina 20µg/mL

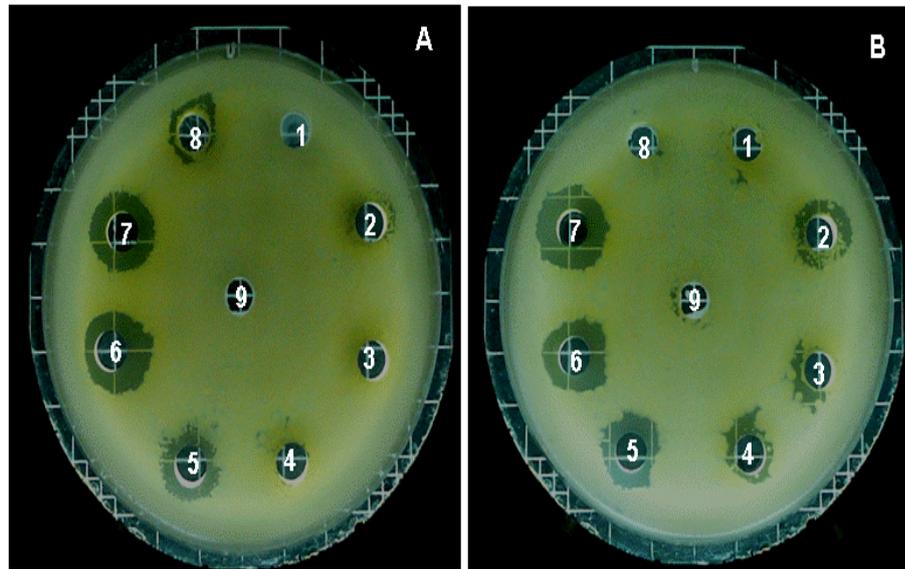


Figura 12. Medicamentos no-antibióticos en posiciones (1-8) a concentración de $50\mu\text{g/mL}$. Placa **A**, pozo. 1. Clonazepan, 2. Diclofenaco, 3. Haloperidol, 4. Halopurinol, 5. Marihuana, 6. Midazolam, 7. Ranitidina, 8. Timolol 9. Ampicilina $20\mu\text{g/mL}$ Microorganismo testigo *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923. Placa **B**. mmedicamentos no-antibióticos pozos (1-8) a concentración $100\mu\text{g/mL}$, mezclados con ampicilina en concentración $5\mu\text{g/mL}$. En el pozo 9 ampicilina a concentración $5\mu\text{g/mL}$ como control de actividad antimicrobiana.

5. Análisis de resultados

Reportes previos en la literatura ya habían puesto de manifiesto la capacidad de algunos medicamentos no-antibióticos para inducir inhibición del crecimiento tanto de microorganismos Gram positivos como Gram negativos (39-44). El efecto de estos medicamentos sobre la fisiología microbiana ha sido adscrito principalmente a la alteración de las propiedades de membrana.

Si bien todas las células comparten rutas metabólicas esenciales para metabolismo de proteínas, carbohidratos, lípidos, etc., los medicamentos no-antibióticos son incapaces de reconocer un blanco específico sobre la estructura bacteriana, como si lo hace los antibióticos tradicionales (β -lactámicos, macrólidos, amino-glucósidos) debido a la diferencia en composición química, y/o a la ausencia de moléculas receptoras específicas sobre este tipo de células. Sin embargo, esta afirmación no puede ser tomada como regla general, ya que algunos antibióticos como las quinonas y sulfas y la polimixina, actúan sobre rutas metabólicas compartidas por todas las células y estructuras celulares como la membrana celular. Esto hace que los antibióticos de esta familia sean considerados moderadamente tóxicos y los dos primeros teratogénicos, razón por la cual presentan cierto riesgo para los seres humanos.

Así, la única justificación razonable para dar explicación a la actividad antimicrobiana observada para medicamentos no-antibióticos, es el efecto que estos medicamentos puedan tener sobre la función de membrana, ya que esta, es la estructura celular de mayor semejanza entre todos los seres vivos en cuanto a función y composición química. Además, la producción de energía en microorganismos está ligada a esta estructura así, como los mecanismos de expulsión de medicamentos a través de bomba de protones (48,49).

Desde el punto de vista físico-químico, una membrana puede ser considerada como un sistema ternario, es decir conformado por tres tipos diferentes de moléculas con propiedades químicas diferentes (moléculas polares como el agua, medianamente polares como las proteínas y no polares como los lípidos). Esta propiedad de las membranas hace que un medicamento dependiendo de su estructura química y propiedades físico-químicas, pueda interactuar con la membrana celular de manera un tanto inespecífica alterando algunas de sus propiedades fisiológicas.

Al carecer de organelos presentes en eucariotas, quienes poseen funciones metabólicas importantes (p.e. aparato de golgi, mitocondria y retículo endoplásmico), los microorganismos han desarrollado estrategias celulares que permiten a estos utilizar sus pocas estructuras para cumplir con sus funciones vitales basales; este es el caso de la ruta metabólica de respiración celular adscrita a la mitocondria en eucariotas y que en procariotas está confinada a la membrana celular.

A diferencia de otros trabajos publicados con anterioridad (50,51,52), la actividad antimicrobiana de los medicamentos no antibióticos utilizados en esta investigación presenta actividad preferencial sobre microorganismos Gram positivos, mas no sobre Gram negativos. Este resultado podría estar en parte justificado por la diferencia en concentraciones, que para nuestro caso fue mucho menor a la reportada en estas investigaciones.

Los ensayos preliminares para determinación del perfil de resistencia a los antibióticos, mostró que el microorganismo con mayor perfil de resistencia a los antibióticos en utilizados es la *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 seguido de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. El microorganismo de mayor susceptibilidad a los antibióticos seleccionados fue *Escherichia coli* ATCC 25922, (figura 5). Para el caso de los microorganismos Gram positivos *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, ambos exhiben perfiles de resistencia similar a excepción del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 quien muestra sensibilidad al ácido nalidixico (figura 6).

La evaluación de las propiedades antimicrobianas del Alopurinol, no arrojo resultados prometedores bajo ninguna de las condiciones de estudio sobre los microorganismos testigo utilizado. En un principio se especuló que la composición del agar Muller Hinton, el cual contiene material animal dentro de su composición podría ser el responsable de este efecto, debido a que la ruta de salvamento en la síntesis de purinas depende de los intermediarios metabólicos y los constituyentes animales del medio podrían suministrar estos nucleótidos.

Con el fin de resolver este inconveniente se procedió a preparar un medio de cultivo sintético a base de glucosa, sulfato de amonio, casaminoácidos, cloruro de sodio y buffer fosfato 50mM pH7.2 y agar al 1.2%. Los ensayos sobre este medio de cultivos para los diferentes microorganismos ensayados no mostraron indicios de actividad antimicrobiana del Alopurinol.

Otro factor que pudo afectar el efecto antimicrobiano del Aliopurinol, puede estar asociado a su casi nula solubilidad en agua. Si bien este medicamento fue solubilizado en dimetil sulfoxido (DMSO), el Alopurinol es tan solo soluble a razón de 3mg/mL.

En el presente estudio se encontró que los medicamentos no-antibióticos que poseen mejor actividad contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, siendo mas sensible el E. faecalis, los medicamentos que exhibieron mejor actividad antimicrobiana fueron diclofenaco, timolol, Fenilamina, Zetericina, Teofilina y en menor grado haloperidol, midazolam y clonazepan. Para el caso de microorganismos Gram negativos, el microorganismo mas sensible al efecto de medicamentos no-antibióticos fue *Escherichia coli* ATCC 25922, siendo susceptible a fluzetrina, timolol, metil-digoxina, pero paradójicamente no presento sensibilidad de Diclofenaco. El efecto de estos medicamentos esta relacionado con la inducción de alteraciones a nivel de la membrana celular, principalmente alteración de la permeabilidad.

La diferencia entre el efecto antimicrobiano observado para microorganismo Gram positivos y Gram negativos frente a los medicamentos utilizados en el presente estudio puede estar relacionado con la presencia de membrana externa en los microorganismos

Gram negativos. Como ha sido escrito, la presencia de lipopolisacarido, en especial la longitud del lípido A, la densidad del mismo sobre la membrana y la longitud de la cadena afectan la permeabilidad de la membrana a medicamentos.

Al mezclar ampicilina con Diclofenaco, Haloperidol, Midazolam y Timolol, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, resistente a ampicilina (figura 6 posición 1). La mezcla antibiótico/medicamento no-antibiótico, mostró un incremento en la actividad de antimicrobiana de la ampicilina sobre este microorganismo (figura 11). Al disminuir la concentración de penicilina a 5µg/mL en la mezcla, se observa claramente el efecto sensibilizador de la penicilina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (figura 11 pozos 2, 3, 4), para medicamentos como Diclofenaco, Haloperidol, Halopurinol.

6. Conclusiones

Los perfiles de sensibilidad a medicamentos no-antibióticos observados bajo las condiciones de estudio, difiere de un microorganismo a otro dependiendo de la composición química de la envoltura celular y el perfil de resistencia a los antibióticos.

El *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 es el microorganismo más sensible a la acción de medicamentos no antibióticos que el *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Los resultados encontrados permiten afirmar que el diclofenaco es el medicamento más efectivo para el restablecimiento de la sensibilidad a la penicilina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Dentro de los microorganismo Gram negativos utilizados en este estudio, la *Escherichia coli* ATCC 25922, mostró la mayor sensibilidad a medicamentos no-antibióticos.

En el presente estudio se observa que bajo las condiciones de experimentación, la sensibilidad de los microorganismos Gram negativos y Gram positivos a medicamentos no-antibióticos se encuentra relacionada con el perfil de resistencia a antibióticos.

Dentro de los medicamentos betabloqueadores ensayados, propranolol y timolol, este último mostró poseer una actividad antimicrobiana de interés, que puede estar relacionada con la compleja estructura química de este medicamento.

Bajo las condiciones de estudio, el Alopurinol no presentó actividad antimicrobiana sobre los microorganismos testigo utilizados en este estudio.

Bibliografía

1. Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American*. 1998; 278:32-9.
2. Locher, K. P. Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology* 2004, 14:426–431
3. Holland, I.B., Blight, M.A. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* 1999, 293:381-399.
4. Chang, G., Roth, C.B., Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 2001, 293:1793-1800.
5. Georgopapadakou NH. Beta-lactamase inhibitors: evolving compounds for evolving resistance targets. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004;13: 1307–18
6. Florez, J. *Farmacología Humana*. Tercera edición. Masson.1997
7. Pacher, Pal. Nivorozhkin, Alex. Szabo, Csaba. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews*. 58:87–114, 2006.
8. Gherardi, Arnaud. Sarciron, Marie E. Molecules targeting the purine salvage pathway in Apicomplexan parasites. *TRENDS in Parasitology* Vol.23 No.8. 2007
9. Pettersson, J. Schrupf, M. Raffel, S. Porcella, S. et al. Purine Salvage Pathways among *Borrelia* Species. *Infection and Immunity*. Aug. 2007. Vol 75. No 8. p. 3877–3884
10. Al-Salabi, Mohammed. P. de Koning, Harry. Purine Nucleobase Transport in Amastigotes of *Leishmania mexicana*: Involvement in Allopurinol Uptake. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Sept. 2005. Vol. 49. No 9. p 3682–3689
11. Gérvás, J. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. *Aten Primaria* 2000; 25: 589-596

12. Harbarth, S. Samore, M. Antimicrobial Resistance Determinants and Future Control. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 11, No. 6, June 2005
13. N. Kent Peters, Dennis M. Dixon, Steven M. Holland, and Anthony S. Fauci. The Research Agenda of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases for Antimicrobial Resistance. *Perspective. JID* 2008;197. p 1087-1093.
14. Cardo D, Horan T, Andrus M, et al. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470–85.
15. Zignol M, Hosseini MS, Wright A, et al. Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis* 2006; 194:479–85.
16. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs: worldwide, 2000–2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55:301–5.
17. Shah NS, Wright A, Bai GH, et al. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:380 -387.
18. Jambou R, Legrand E, Niang M, et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 2005; 366:1960 –3.
19. Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*. 1994;264:388-93.
20. Dowson CG, Coffey TJ, Spratt BG. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Trends Microbiol* 1994;2:361-6.
21. Brumfitt W, Hamilton-Miller JMT. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *New England Journal of Medicine*. 1989. 320:1188-96.
22. Gold, Howard. Moellering, Robert. Antimicrobial Drug resistance. *New England Journal of Medicine*. 1996. Vol 335. No 19- pp 1445-1453.
23. Kapil, A. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. *Indian J Med Res* 121, February 2005, pp 83-91
24. Rubens CE, McNeill WF, Farrar WE Jr. Evolution of multiple antibiotic resistance plasmids mediated by transposable plasmid deoxyribonucleic acid sequences. *J Bacteriol* 1979; 140 : 713-9.
25. Tosi P, Barosi G, Lazzaro C, Liso V, Marchetti M, Morra E, Pession A, Rosti G, Santoro A, Zinzani PL, and Tura S. Consensus conference on the management of tumor lysis syndrome. *Haematologica* 2008; 93:1877-1885.

26. George, J. Struthers, A. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vascular Health and Risk Management* 2009;5 265–272
27. Foley, David P. Chari, Ravi S. Ischemia-reperfusion injury in transplantation: novel mechanisms and protective strategies. *Transplantation Reviews* 2007. 21 (1). 43-53.
28. Park DA, Bulkley GB, and Granger DN (1983) Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and organ preservation. *Surgery* 94:428–432.
29. Yamakawa Y, Takano M, Patel M, Tien N, Takada T, Bulkley GB. Interaction of platelet activating factor, reactive oxygen species generated by xanthine oxidase, and leukocytes in the generation of hepatic injury after shock/resuscitation. *Ann Surg.* 2000 Mar; 231(3):387-98.
30. Martinez S, Marr JJ, 1992. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med* 326: 741–744.
31. Werner Apt B., Ingrid Heitmann G., M. Isabel Jercic L., Leonor Jofré M., Patricia Muñoz C. del V., Isabel Noemí H., Ana M. San Martín V., Jorge Sapunar P., Marisa Torres H. e Inés Zulantay A. Part VI. Antiparasitic treatment for Chagas disease. *Rev Chilena Infectol.* 2008 Oct; 25(5):384-9
32. Amato, V. S. ;Tuon, F. F. ;Siqueira, A. M. ;Nicodemo, A. C. ;Neto, V. A. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(2), 2007, pp. 266–274
33. Berens, R. Marr, J. Da Cruz F. Nelson, D. Effect of Allopurinol on *Trypanosoma cruzi*: Metabolism and Biological Activity in Intracellular and Bloodstream Forms. *Antimicrob. Agents chemother.* Oct. 1982, Vol. 22, No. 4. p. 657-661
34. Al-Salabi, M. Koning, H. Purine Nucleobase Transport in Amastigotes of *Leishmania mexicana*: Involvement in Allopurinol Uptake. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, sept. 2005: 49 (9). p. 3682–3689
35. Qin,X. Weissman, S. Chesnut,M. Zhang, B. Shen, L. Kirby-Bauer disc approximation to detect inducible third-generation cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2004, 3:13
36. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 25. “biological test and assays”. Ed Pharmacopeial Convention Inc. Bronx. New York. USA. Pp 358. 1853-89
37. Gonzalez Castillo, P. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro Parte I. Universidad nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. 2003. Catalogo local 1.2 G643es

38. Serrato Alvarado, Numael. . Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro Parte III. Universidad nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. 2004. Catalogo local 1.2 S487es.
39. Bourdon, J.L.: Contribution a l'étude des propriétés antibiotiques de la chlorpromazin. Ann. Inst. Pasteur (1961) 101: 876 – 886.
40. Dastidar SH, Saha PK, Sanyamat B, Chakrabarty AN: Antibacterial activity of ambodryl and benadryl. J of applied Bacteriology (1976) 41 209-214.
41. Kristiansen, J.E. and Amaral, L. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1997) 40, 319–327
42. Kristiansen, J. E. Antimicrobial activity of nonantibiotics. ASM NEWS (1991). 57, 135–139.
43. Cederlund, H. & Mardh, P. A. Antibacterial activities of non-antibiotic drugs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1993). 32, 355–365.
44. Schmidt, R. M. & Rosenkranz, H. S. Antimicrobial activity of local anaesthetics: lidocaine and procaine. Journal of Infectious Disease 121, 596–607.
45. Parry, M. F. & Neu, H. C. (1977). Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. Journal of Clinical Microbiology (1970). 5, 58–61.
46. Amaral, L. & Lorian, V. Effects of chlorpromazine on the cell envelope proteins of Escherichia coli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1991).35, 1923–1924.
47. Amaral, L., Kristiansen, J. E. & Lorian, V.. Synergic effect of chlorpromazine on the activity of some antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1992). 30, 556–558.
48. Kaatz, G. W., Moudgal, V.V., Seo, S.M.and Kristiansen, J. E. 2003. Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 47: 719–726
49. Paulsen, I. T., Brown, M. H. and Skurray, R. A.. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Reviews. 60:575–608.
50. Kristiansen, J. E., and L. Amaral. 1997. The potential management of resistant infections with non-antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemother. 40:319–327.
51. Martins, M., Dastidar, S.G., Fanning, D., Kristiansen, J.E., Schelz, Z., et al 2008. Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-

Bibliografia

resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31:198–208

52. Tyski, S. 2003. Non-antibiotics – drugs with additional antimicrobial activity. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 60: 401-404