

TÍTULO DEL PROYECTO

Validación de la esparteína como bacteriostática de *Mycobacterium tuberculosis*

SIGLAS

VEBMT

TIPO DE PROYECTO

Aplicada

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Enfermedades Infecciosas y Tropicales

DURACIÓN ESTIMADA

Fecha de inicio: 04/04/2016 Fecha de término: 30/03/2017

PARTICIPANTES

- ASMAT MARRUFO PERCY ESTEBAN (INVESTIGADOR) — 000070551
- GASTÓN ENRIQUE ZOLLA BENITES (INVESTIGADOR) — 07999863
- CRUZ CELI JUNIOR DAVID (ESTUDIANTE) — 000102094
- HIDALGO RODRIGUEZ JOSE ERNESTO (COORDINADOR(INV. PRINCIPAL)) — 000080418
- LEZAMA ASENCIO PEDRO BERNARDO (INVESTIGADOR) — 000000214

INSTITUCIÓN O LUGAR A EJECUCARSE

- LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL LA LIBERTAD (Laboratorio de Referencia Regional La Libertad)

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis (TB) es una enfermedad de prioridad sanitaria nacional debido a que *Mycobacterium tuberculosis* se ha vuelto fármaco-resistente. Según la OMS la resistencia ha sido clasificada como ultrarresistente (TB-XR) y multirresistente (TB-MR). Ante lo cual, se hace necesario priorizar la búsqueda de nuevos fármacos para contrarrestar la resistencia en *M. tuberculosis*. Derivados de lupinina han mostrado buena actividad anti-tuberculosis. Sin embargo, la esparteína, un alcaloide relacionado, puede ser un buen candidato para combatir este patógeno ya que ha mostrado actividad bacteriostática en *M. phlei*, microorganismo relacionado con el causante de la TB. Por ello, el problema planteado en esta investigación es: ¿Es la esparteína un bacteriostático de *Mycobacterium tuberculosis*?

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

A nivel mundial, los expertos estiman 1.7 millones de muertes por año debido a la TB-XR. Más de nueve millones de nuevos casos se diagnostican cada año cada año y al menos 2 billones de personas tienen una infección latente (Sanjay *et al.*, 2008). La TB tiene una alta tasa de incidencia

en países en desarrollo como el nuestro, especialmente entre las poblaciones vulnerables, cuya situación es agravada por la presencia de coinfección TB/VIH y multidrogorresistencia. En Perú, solo durante 2010 se diagnosticaron treinta y un mil nuevos casos, de los cuales unas 1800 personas en promedio ingresan al tratamiento de TB-MDR (Asencios *et al.*, 2012). La tuberculosis pulmonar multidrogorresistente (TB-MDR) es un serio problema de Salud Pública en la Región La Libertad sobre todo en los distritos de Trujillo y el Porvenir (Rodríguez, 2012). Esto ha determinado que la TB sea considerada como una enfermedad de prioridad sanitaria nacional (Del Castillo *et al.*, 2009).

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS)

El Perú es el país con mayor número de personas afectadas con TB-MDR y uno de los 20 países con mayor severidad de la enfermedad en el mundo (Asencios *et al.*, 2012). Solo en La Libertad, entre enero de 2008 y diciembre del 2009 se diagnosticaron 11.7% de pacientes con resistencia a diversos fármacos. El creciente problema de resistencia hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos para realizar el tratamiento efectivo de esta enfermedad, y apoyar a las poblaciones vulnerables, ya que un país sin salud es un país sin futuro.

IV. OBJETIVOS

Validar la acción de la esparteína sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (TB).

Determinar los perfiles de los alcaloides en los extractos acuosos y metanólicos de semillas de *Lupinus*.

Evaluar el efecto inhibitorio del extracto acuoso y del extracto metanólico sobre el crecimiento de TB en vitro.

Evaluar el efecto de la esparteína sobre el crecimiento de TB in vitro.

V. MARCO TEÓRICO

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno humano altamente persistente y a menudo letal. Cada año se registran 220 000 nuevos casos de tuberculosis (TB) en la Región de las Américas y mueren más de 50 000 personas a consecuencia de esta enfermedad. En Perú se diagnosticaron 31 000 casos nuevos en 2010. Esto ha determinado que la TB sea considerada como una prioridad sanitaria nacional (Del Castillo *et al.*, 2009). La difusión de la TB se debe a que *M. tuberculosis* se ha vuelto fármaco-resistente. La OMS ha clasificado la resistencia a la TB como

ultrarresistente (TB-XR) y multirresistente (TB-MR).

Por tal motivo, el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para combatir la TB se vuelve crucial para controlar la fármaco-resistencia (Jain, 2008). Esto abre nuevas oportunidades para aplicación de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran los alcaloides quinolizidínicos, que han demostrado actividad anti-TB (Vazzana, 1994). Estos compuestos son producidos por *Lupinus spp.* Los que han sido postulados como parte del sistema de defensa de las plantas contra el ataque de diversos patógenos (Wink, 1984; Michael 2007).

Se ha encontrado que Lupanina, Esparteína y 13-tugloil-oxilupanina han presentado actividad bacteriostática en *Mycobacterium phlei* (Wink, 1984). Donde esparteína presentó la mayor actividad bacteriostática (Wink, 1984). Esta bacteria presenta similitud filogenética con el agente causal de TB, evidenciada por el análisis de secuencia del ARN ribosomal 23S de *Mycobacterium phlei* (accesión X74493.1), que revela alta homología con *Mycobacterium tuberculosis*. Estos resultados tienen una identidad entre el 90% al 100% y un E-value de cero (Zolla 2015). Al tener en cuenta que en *Mycobacterium* el ARN ribosomal 23S es un marcador genético (Shojaei, 2011) que además está relacionado con mecanismos de resistencia a antibióticos (Maurer, 2012), puede inferirse con sustento molecular que ambos organismos presentan alta similitud genética y por lo tanto, mecanismos comunes de susceptibilidad.

VI. HIPÓTESIS

La esparteína inhibirá el crecimiento *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis* al presentar acción bacteriostática.

VII. METODOLOGÍA

Material biológico. a) Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogo resistentes serán provistas por el Laboratorio de Referencia Regional en Salud Pública – La Libertad. b) Se trabajará con semillas de tarwi pertenecientes a la colección de germoplasma del Programa de Investigación y Proyección Social en Cereales y Granos Nativos provistas por el Dr. Jorge Jiménez Dávalos (UNALM).

Extractos de semillas de *Lupinus sp.* Se preparará el extracto metanólico de las semillas de *Lupinus sp.* Para lo cual, estas serán molidas y desecadas en estufa durante 20 h a 40°C. Posteriormente, se mezclarán 100g en 400 ml de metanol. Se dejará reposar por 7 días a temperatura de ambiente, y luego se pervaporará el agua hasta obtener el extracto.

Perfiles de alcaloides. El extracto será concentrado con un rotavapor, tras lo cual se procederá a realizar la extracción, purificación y perfiles de alcaloides según Muzquiz *et al.*, 1994.

Efecto bacteriostático de los extractos y esparteína sobre Mycobacterium tuberculosis:

La evaluación del efecto de la esparteína se realizará en el según el Método de las Proporciones considerado como Gold Standard. Para ello se realizará la reactivación de las cepas multirresistentes y luego se procederá a realizar el método de las Proporciones agar en placa (Kent *et al.*, 1995). Las concentraciones críticas para Isoniacida y Rifampicina serán de 1,0 ug/mL. Las cepas provenientes de medio sólido Lowenstein-Jensen (LJ) serán sembradas en medio Middlebrook 7H11 e incubadas a 37°C durante siete días. Luego se realizará la siembra en placas con los tratamientos establecidos el mismo medio y se incubará a 37°C por 21 días.

Los tratamientos serán: Control + (Rifampicina e Isoniacida). Control – (usando solo el solvente de los antibióticos. Alcaloides (medio con extracto metanólico de *Lupinus sp.*). Esparteína (alcaloide disuelto en el medio). Se evaluarán 5 cepas multirresistentes del Laboratorio de Referencia Regional en Salud Pública – La Libertad, contando cada una con 5 repeticiones dispuestas en un diseño completamente al azar, tomando cada placa Petri como una unidad experimental.

La evaluación se realizará contando las colonias en las placas control, frente a las placas conteniendo las drogas, y el alcaloide. Cuando la proporción crítica sea menor a 1%, se tomará como sensibilidad al compuesto disuelto en el medio de cultivo.

Efecto bacteriostático de los extractos y esparteína sobre Mycobacterium tuberculosis:

Tras la evaluación, los datos serán trabajados en tablas con el programa SAS. Se realizará el Análisis de Varianza para determinar si hubo actividad antituberculosis de los alcaloides en estudio.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Asencios L., Galarza M., Quispe N., et al. 2012. Prueba molecular Genotype® MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de Tuberculosis multidrogorresistente. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública. 29(1):92-98.

Castillo H., Mendoza-Ticona A., Saravia JC. & Somocursio JG. 2009. Epidemia de tuberculosis multidrogo resistente y extensiva, emte resistente a drogas (TB MDR/XDR) en el Peru: situación y

propuesta para su control. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 26(3):380-86

Florian P. Maurer*, Vera Ruegger, Claudia Ritter, Guido V. Bloemberg and Erik C. Bottger. Acquisition of clarithromycin resistance mutations in the 23S rRNA gene of *Mycobacterium abscessus* in the presence of inducible erm (41). *J Antimicrob Chemother* 2012; 67 : 2606–2611.

Hasan Shojaei, 1Abodolrazagh Hashemi, 2Parvin Heidarieh, 3Fazel Pourahmad, 4,5Abass Daei Naser. Molecular Identification of Rare Clinical Mycobacteria by Application of

16S-23S Spacer Region Sequencing. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*

Vol. 15, No. 1, Jan-Feb 2012, 661-668. 2011.

Kent, P., Kubica G., Centers for Disease Control (U.S.). (1985). *Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory*. Atlanta, Ga: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control.

Michael Joseph. 2007. Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Natural Products Reports* 2008, 25, 139–165.

Sanjay K. Jain, Gyanu Lamichhane, Sridhar Nimmagadda, Martin G. Pomper, and William R. Bishai. 2008. Antibiotic Treatment of Tuberculosis: Old Problems, New Solutions. *Microbe Volume* 3, Number 6, 2008 / 285-292.

Vazzana I, Novelli F, Sparatore F, Sparatore A, Fadda G, Manca C. 1994. Quinolizidine derivatives with antitubercular activity. *Farmaco (Societa Chimica Italiana : 1989)* 49(2):105-110.

Wink Michael. 1984. Chemical defense of leguminosae. Are quinolizidine alkaloids part of the antimicrobial defense system of Lupins?. *Z. Naturforsch.* 39c, 548-552.

Wink Michael. 1987. Quinolizidine alkaloids: biochemistry, metabolism, and function in plants and cell suspension cultures. *Planta medica* 509-514.

Zolla G. 2015. Comunicación personal.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	INICIO	FIN
Adquisición de materiales	31/03/2016	29/07/2016
Preparación de los sistemas	30/06/2016	30/09/2016
Reactivación de las cepas de M. tuberculosis	30/06/2016	30/09/2016
Ejecución del experimento de efecto bacteriostático	30/09/2016	31/12/2016
Informe Parcial del Proyecto	15/12/2016	15/01/2017
Evaluación de resultados	01/01/2017	28/02/2017
Análisis de datos y preparación del informe final	28/02/2017	30/03/2017
Informe Final del Proyecto	27/03/2017	30/03/2017

PRESUPUESTO

DESCRIPCION	CANTIDAD	PRECIO_UNITARIO	PRECIO_PARCIAL
APOYO	8 UNI	500	4000
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	1500	1500
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	80	160
REACTIVOS E INSUMOS	1200 UNI	2	2400
REACTIVOS E INSUMOS	50 UNI	25	1250
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	200	1000
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	200	200
REACTIVOS E INSUMOS	5000 UNI	0.30	1500
MATERIAL DE VIDRIO	100 UNI	15	1500
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	200	1000
REACTIVOS E INSUMOS	200 UNI	3.50	700
REACTIVOS E INSUMOS	5000 UNI	0.30	1500
REACTIVOS E INSUMOS	5000 UNI	0.25	1250
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	800	1600

Total 19560