

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A RODAMINA 6G EN *Bacillus subtilis* COMO MODELO BACTERIANO PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS INHIBIDORES DE PGP.

Villalpando Villegas Christian Daniel (1), Alba Betancourt Clara (2), Ruiz Padilla Alan Joel (2), Solorio Alvarado Cesar Rogelio (2), Mendoza Macías Claudia Leticia (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato] | [qfb.cdanielvv@gmail.com]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [cl.mendoza@ugto.mx]

Resumen

EL fenotipo MDR está dado por diferentes mecanismos, el mejor entendido y ampliamente estudiado, es la sobreexpresión del producto del gen *mdr1*, la glicoproteína-P, la cual confiere a la célula tumoral una amplia resistencia a los agentes antineoplásicos, lo cual representa uno de los mayores obstáculos para el tratamiento quimioterapéutico y su respuesta. En este estudio, se evaluó la resistencia cruzada de Rodamina 6G con otros sustratos de Bmr (análoga de Pgp) mediante ensayos de concentraciones mínimas inhibitorias en placas multipozo. Así mismo, se evaluó mediante citometría de flujo la acumulación de Rodamina 6G y el efecto del verapamil sobre la misma en un cultivo resistente de *Bacillus subtilis*. Los resultados confirman la resistencia cruzada entre Rodamina 6G y otros sustratos de Bmr como Cloranfenicol, y que el cultivo resistente es capaz de acumular Rodamina 6G.

Abstract

MDR phenotype is given by different mechanisms, the best understood and widely studied, is the overexpression of the gene *mdr1* product, the P-glycoprotein (Pgp), which confers to tumoral cell a wide resistance to anti-neoplastic agents, which remains one of the major obstacles to chemotherapeutic treatment and its response. In this study, the cross-resistance of Rhodamine 6G with other substrates of Bmr (analogue of Pgp) was evaluated by means of minimal inhibitory concentrations assays in multiple well plates. Likewise, the Rhodamine 6G accumulation and the effect of verapamil on it in a resistant culture of *Bacillus subtilis* were evaluated by flow cytometry. Results confirm the cross-resistance between Rhodamine 6G and other substrates of Bmr like Chloramphenicol, and that resistant culture is able to accumulate Rhodamine 6G.

Palabras Clave

Cáncer; bombas de Eflujo; Inhibidor de P-gp; MDR; *bacilos*

INTRODUCCIÓN

Fenotipo MDR

El fenotipo de *resistencia múltiple a drogas* (MDR, por sus siglas en inglés) se describe como la resistencia adquirida por las células a una amplia gama de agentes farmacológicos no relacionados entre sí, tanto estructural como funcionalmente [1], [2], [5]. En el caso de las células tumorales, estas van adquiriendo resistencia durante el curso del tratamiento, aun cuando haya habido una respuesta inicial apropiada [7].

Las células tumorales seleccionadas con fenotipo MDR, sobreexpresan el producto del gen *mdr1*, la glicoproteína G (Pgp), una proteína ligada a la membrana que confiere a la célula una actividad de eflujo o extrusión de los agentes quimioterapéuticos altamente activa [1], [7], [8].

Fenotipo MDR y su implicación en el cáncer

El fenotipo MDR, está dado por numerosos mecanismos de resistencia a los efectos citotóxicos de los agentes quimioterapéuticos, siendo la resistencia múltiple mediada por la Pgp el mejor entendido y más estudiado de los mecanismos en mamíferos [1], [2].

El fenotipo MDR, está íntimamente relacionado con el fracaso en la terapia antineoplásica [7], al no mantenerse las concentraciones citoplasmáticas necesarias de los fármacos para que estos cumplan su finalidad, contribuyendo así a lo refractario de la enfermedad y a su progresión, provocando casi el 90% de las defunciones por cáncer [7].

Se ha descrito en otros organismos eucariontes (además de mamíferos) el fenotipo MDR, tal es el caso de hongos y parásitos como *Leishmania spp.* multirresistente, *Plasmodium falciparum* y *Fasciola hepatica* [2]; en procariontes: bacterias de importancia clínica como *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni* [9], y otras como *Lactococcus lactis* [8] y *Bacillus subtilis* [5]. En general, se conoce que aproximadamente del 5 al 10% del genoma de las bacterias codifica para diferentes bombas de eflujo [9].

La actividad de eflujo mediada por Pgp en células tumorales, es extrapolable a un modelo análogo en función y sustratos en *Bacillus subtilis*, donde la sobreexpresión de la proteína bomba denominada Bmr, le otorga a la bacteria el fenotipo MDR [5].

La expresión de la proteína bomba Bmr está regulada a nivel de transcripción por BmrR, una proteína con la capacidad de unirse al promotor de *bmr* (gen que codifica para la bomba Bmr) y codificada inmediatamente río abajo del gen *bmr* [3].

Se ha descrito en *Bacillus subtilis* la existencia de dos proteínas bomba además de Bmr, Blt que es altamente homóloga a Bmr [4], y Bmr3 que es muestra una homología relativamente baja con Bmr y Blt, mientras que la afinidad a los sustratos de estas tres bombas se superpone [6].

En procariontes se identifican cinco importantes familias de bombas de eflujo: MF (a la cual pertenece Bmr), SMR, MATE, RND y ABC [1].

El uso de modelos bacterianos resulta ser un método viable al suponer un bajo costo, crecimiento rápido y confiable en el estudio del eflujo activo de fármacos en las células. *Bacillus subtilis*, al ser una bacteria no patógena, supone un riesgo minimizado en cuanto a su manipulación. Por lo que la caracterización de la resistencia a R6G en *B. subtilis* permitirá una mejor comprensión de sus mecanismos que facilite el diseño de nuevos fármacos inhibidores de bombas de eflujo con potencial uso en mamíferos [8].

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Se empleó *Bacillus subtilis* ATCC 33608 como cepa silvestre cultivada en medio para antibióticos 3 (Difco) suplementado con glucosa al 0.4% (D3G) a 37°C y 180 rpm. Para los ensayos de sensibilidad, se partió de cultivos de 18 horas de incubación de los cultivos obtenidos de acuerdo con lo previamente reportado por Reyes y Col. [8]. Para los ensayos de evaluación de compuestos inhibidores, las bacterias recibieron un pretratamiento por 15 min a temperatura ambiente

en medio D3G con un inhibidor de Pgp, verapamil (25 µg/mL). [8]

Como cultivo resistente a Rodamina 6G (R6G) se utilizó un aislado obtenido por cultivo en presencia de concentraciones crecientes de R6G de la cepa silvestre hasta una concentración de 3 µg/mL de R6G, denominada BS-3, su obtención se describe con detalle en [8].

Evaluación de la resistencia cruzada a otros sustratos de Pgp.

Se partió de cultivos frescos de la cepa silvestre (BS-A) y el cultivo resistente (BS-3) luego de 18 horas de incubación, lavados 3 veces con solución salina y ajustados a una densidad óptica (D.O.) a 630 nm de 0.04 en medio D3G. Las suspensiones bacterianas se inocularon en placas de 96 pozos que contenían diluciones dobles seriadas de los antibióticos a probar en medio D3G a una concentración de 1.0-64.0 µg/ml para Rodamina 6G, 0.6-38.4 µg/ml para Cloranfenicol, 0.5-32.0 mg/ml para Tetraciclina y de 0.03125-2.0 µg/ml para Ciprofloxacino. La concentración mínima inhibitoria para cada antibiótico se consideró aquella más baja que inhibió completamente el crecimiento bacteriano, después de 18 h de incubación a 37°C y 180 rpm mediante una lectura a una D.O._{630 nm}. Los ensayos de concentraciones mínimas inhibitorias para cada sustancia a evaluar se montaron por duplicado.

Evaluación de la acumulación y del efecto de un inhibidor de Pgp en la acumulación de Rodamina 6G.

Para la evaluación de la acumulación se realizaron ensayos de citometría de flujo, para lo cual se partió de cultivos frescos de 18 horas de incubación a 37°C y agitación constante en medio D3G de las cepas silvestre y resistente (a 3 mg/ml de R6G), se centrifugaron, se lavaron con PBS y se ajustó a una D.O._{630 nm} de 0.4 a en PBS estéril y filtrado. Se adicionó R6G a una concentración final de 2 µg/ml y se incubó a diferentes tiempos (30 y 60 minutos). Transcurrido este tiempo se determinó la población de células fluorescentes

mediante el equipo FACS Moflo marca Beckman a 529 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resistencia cruzada a otros sustratos de Pgp.

Con el objetivo de evaluar la resistencia cruzada a otras moléculas sustrato de Bmr en un cultivo silvestre (BS-A) y en otro seleccionado para resistencia a Rodamina 6G (BS-3), se determinaron las sensibilidades mediante ensayos de concentraciones mínimas inhibitorias.

La resistencia cruzada pudo observarse para cloranfenicol (2X), ciprofloxacino (4X) y bromuro de etidio (2X), según se muestra en la Imagen 1, no siendo así para tetraciclina, ya que como está descrito previamente [8], tetraciclina no comparte afinidad a Bmr como muchos otros sustratos, además que posee su propia bomba de extrusión altamente selectiva [4].

Evaluación de la acumulación y del efecto de un inhibidor de Pgp en la acumulación de Rodamina 6G.

Para determinar si la resistencia se asocia a una tolerancia a la R6G o a un eflujo de la misma a través de una bomba, se evaluó la capacidad de acumulación de R6G tanto de la cepa silvestre como del cultivo resistente mediante citometría de flujo. Con objetivo de encontrar las mejores condiciones que permitan la detección de bacterias fluorescentes producto de la acumulación, se probaron dos condiciones de temperatura ambiente (TA) y 4°C, para la interacción con R6G por 30 min; así mismo se evaluó si la pre-incubación con un inhibidor de BMR tenía efecto en la acumulación. Como se aprecia en la Imagen 2 a los 30 min fue posible detectar células fluorescentes tanto en la cepa silvestre (BS-A) como en el cultivo resistente (BS-3) a TA, mientras que a 4°C no se observa fluorescencia, lo que se atribuye a una acumulación dependiente de temperatura y no a la adherencia del compuesto. Debido a que BS-3 es

cultivado en presencia de R6G para su mantenimiento, se evaluó si cultivar a BS-3 previo al ensayo, con y sin R6G presentaba algún efecto sobre la acumulación de R6G. Como se aprecia en la Imagen 2, la fluorescencia observada de fondo en estas dos condiciones es prácticamente la misma, por lo que el cultivo en presencia de R6G no afecta el ensayo.

Para observar el fenómeno de captación en los cultivos silvestre y resistente de R6G con y sin presencia de inhibidor de Pgp (verapamil) se realizó la evaluación a diferentes tiempos. Como se observa en la Imagen 3, tanto la cepa silvestre como el cultivo resistente acumulan R6G y es dependiente del tiempo; se mostró una diferencia en la acumulación de R6G, siendo el cultivo resistente el que aparentemente acumula más R6G que el cultivo silvestre, fenómeno que pudiera atribuirse a una adaptación propia de la exposición continua a R6G que ha sufrido el cultivo resistente. El efecto del verapamil en la acumulación de R6G se observó únicamente en el cultivo silvestre, donde la pre-incubación con el inhibidor incrementa la captación de R6G; para el cultivo resistente es posible con una sobreexpresión de la bomba de eflujo responsable de la resistencia, requiera una mayor concentración de verapamil para lograr inhibir los sitios activos de la bomba y observar un efecto positivo a los tiempos evaluados.

CONCLUSIONES

Bacillus subtilis resistente a R6G muestra resistencia cruzada a otros sustratos de la bomba de eflujo Bmr (Cloranfenicol, Ciprofloxacino y Bromuro de Etidio).

La inhibición por verapamil de la actividad de la bomba Bmr en la cepa silvestre de *B. subtilis*, produce un incremento en la acumulación de R6G, lo que sugiere un eflujo activo de R6G.

El cultivo resistente a R6G mostró una mayor acumulación de R6G, sin embargo, a las concentraciones evaluadas del inhibidor, la actividad de la bomba de eflujo no se modificó, lo que sugiere que la resistencia a R6G se atribuye a una sobreexpresión de la bomba BMR que requiere una mayor concentración de inhibidor para afectar el eflujo activo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Universidad de Guanajuato por la beca recibida. Al Dr. Bernardo Franco Bárcenas, por su contribución y apoyo con los ensayos de Citometría de Flujo, y en el procesamiento e interpretación de los datos.

REFERENCIAS

- [1] Ford, J. M., Yang, J., Hait, W. N. (1996). P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance: Experimental And Clinical Strategies For Its Reversal. Hait, W. N. (Ed), Drug Resistance (pp 3-38). Kluwer Academic Publishers.
- [2] Gráció, M. A. et al. (2003, Septiembre). Since phenotiazines alter antibiotic susceptibility of microorganisms by inhibiting efflux pumps, are these agents useful for evaluating similar pumps in phenotiazine-sensitive parasites? International Journal of Antimicrobial Agents, 22, 347-351.
- [3] Markham, P. N., Maqbool, A., & Neyfakh, A. A. (1996, Marzo). The Drug-Binding Activity of the Multidrug-Responding Transcriptional Regulator BmrR Resides in Its C-Terminal Domain. Journal of Bacteriology, 179(4), 1423-1427.
- [4] Maqbool, A., Ljuba, L., Markham, P. N., Taylor, S. S., Vázquez-Laslop, N. & Neyfakh, A. A. (1995, Julio). Two Highly Similar Multidrug Transporters of *Bacillus subtilis* Whose Expression Is Differentially Regulated. Journal of Bacteriology, 177(14), 3904-3910.
- [5] Neyfakh, A. A., Bidnenko, N. E. & Chen, L. B. (1991, Julio). Efflux mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. Proceedings of the National Academic of Sciences, 88(11), 4781-4785.
- [6] Ohki, R., Murata, M., (1997). bmr3, a Third Multidrug Transporter Gene of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 179(4), 1423-1427.
- [7] Ruiz, G. M., Souviron, R. A., & Martínez, M. M. (2002, September). P-glycoprotein, a membrane pump that represents a barrier to chemotherapy in cancer patients. In Anales de medicina interna, 19 (9), 477-485.
- [8] Reyes Gualito, A., Solorio Alvarado, C. R., Mendoza Macías, C. L. (2016). Evaluación de un modelo bacteriano resistente a Rodamina 6G para la búsqueda de nuevos inhibidores de glicoproteína-P (Pgp). Jóvenes en la ciencia, 2(1), 247-251.
- [9] Webber, M. A., Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51, 9-11.

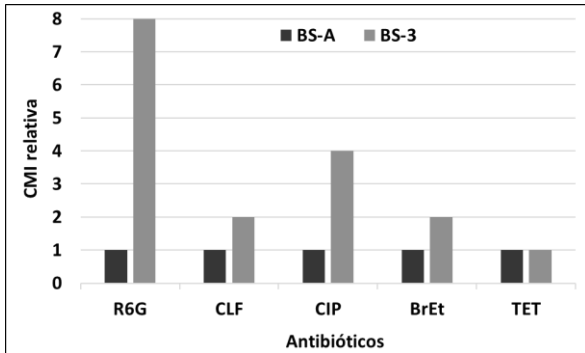


Imagen 1: Sensibilidad del *Bacillus subtilis* a sustratos blanco de la Bmr. Concentración mínima inhibitoria (CMI) relativa a la cepa silvestre BS-A (barras negras) del Cultivo BS-3 (barras grises) de *Bacillus subtilis* a Rodamina 6G (R6G), Cloranenicol (CLF), ciprofloxacino (CIP), bromuro de etidio (BrEt) y tetraciclina (TET). [CMI = 1 µg/mL para R6G, 4.8 µg/mL para CLF, 4 µg/mL para TET, 0.5 µg/mL para CIP y 4 µg/mL para BrEt].

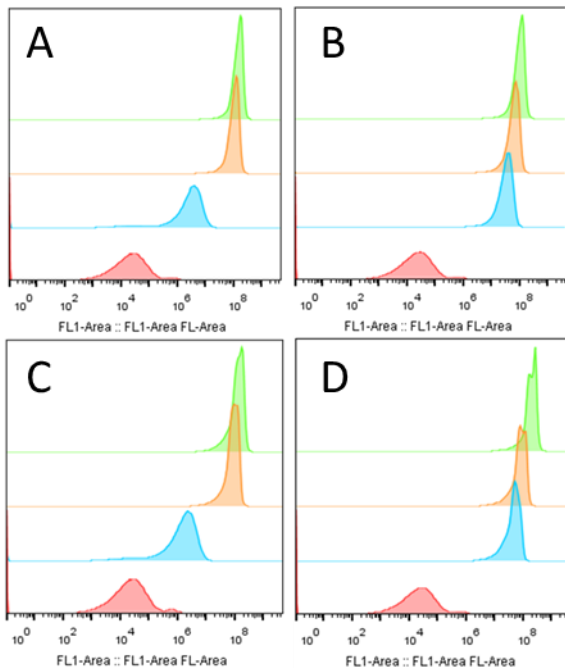
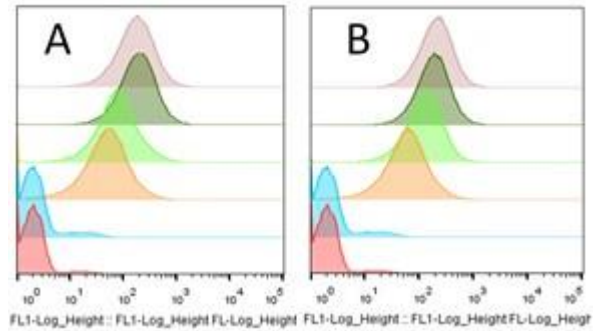


Imagen 3. Acumulación de R6G en *B. subtilis*. Población de células fluorescentes de la cepa silvestre BS-A antes (rojo) y después (naranja) de la exposición por 30 min a 2µg/ml de R6G y del cultivo resistente BS-3 (azul) y (verde) mantenidos sin R6G (panel A y B) o con R6G (panel C y D) previo a la determinación. Se muestran los resultados tanto a TA (panel A y D) como a 4°C (panel B y D).