

EVALUACIÓN DE NUEVAS MOLÉCULAS CON POTENCIAL EFECTO INHIBITORIO SOBRE GLICOPROTEÍNA P

Aguilar Granados Aidee Guadalupe (1), Solorio Alvarado César Rogelio (2), Mendoza Macías Claudia Leticia (3)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. | Dirección de correo electrónico: aideeaguilar_24@hotmail.com]

2 [Departamento de Química, División de Ciencia Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad De Guanajuato. | Dirección de correo electrónico: csolorio@ugto.mx]

3 [Departamento De Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. | Dirección de correo electrónico: cl.mendoza@ugto.mx]

Resumen

Se evaluó un pequeño grupo de arilmaleimidias N sustituidas que se ha encontrado poseen efecto inhibidor de glicoproteína P, la cual actúa como bomba extrusora de fármacos a través de la membrana plasmática de las células que presentan el fenotipo MDR. Este fenotipo se considera una de las mayores causas de fallo clínico en el tratamiento quimioterapéutico. En el ensayo se empleó un modelo biológico en *Bacillus subtilis* resistente a Rodamina 6G, para determinar la CMI de cada una de las moléculas y se evaluó su efecto inhibidor a distintas concentraciones. Las cuatro moléculas presentaron la capacidad de revertir la resistencia adquirida por la cepa a concentraciones de 10 µg/ml y 20 µg/ml.

Abstract

A small group of N-substituted aryl maleimides which have been found inhibitory effect of P-glycoprotein, which acts as a drug pump extruder through the plasma membrane of cells exhibiting the MDR phenotype was evaluated. This phenotype is considered a major cause of clinical failure in chemotherapeutic treatment. A biological model, resistant *Bacillus subtilis* to Rhodamine 6G, was used to determine MIC of each of the molecules and inhibitor effect at different concentrations was evaluated. The four molecules had the ability to reverse acquired resistance by the strain at concentrations of 10 µg / ml and 20 µg / ml.

Palabras Clave

Inhibidor de P-gp; MDR; Aril maleimidias N-sustituidas; *Bacillus subtilis*; Gen mdr1

INTRODUCCIÓN

La resistencia a múltiples fármacos una barrera para el cáncer

El fracaso en el tratamiento quimioterapéutico de diversos tumores cancerígenos se debe principalmente a la presencia o desarrollo de resistencia celular a los fármacos empleados, por lo que actualmente las investigaciones contra el cáncer son orientadas a la búsqueda de tratamientos efectivos que a su vez no generen efectos secundarios en el paciente. [1]

Uno de los mecanismos más estudiados hoy en día es el del gen *mdr1*, y su producto, la P-gp, la cual parece ser la responsable de la disminución de los niveles de fármacos dentro de las células tumorales, motivo por el cual algunos cánceres no responden al tratamiento con múltiples fármacos antineoplásicos [2]

Inhibición de la bomba de eflujo

La inhibición de esta bomba de eflujo se ha propuesto para mejorar la administración de agentes terapéuticos y lograr una mejor biodisponibilidad del fármaco, absorción de este en el órgano diana, y una quimioterapia contra el cáncer más eficaz a través de la capacidad de bloquear selectivamente la acción de P-gp. Cabe mencionar que los inhibidores descritos actualmente son estructuralmente distintos entre sí, lo que refuerza que la glicoproteína no es selectiva a estructuras químicas específicas. [4]

Nuevos Inhibidores

La identificación y descubrimiento de inhibidores de la bomba de eflujo seguros y eficaces es de gran importancia, por lo que se espera que estas moléculas presenten ciertas características, como la de revertir la resistencia adquirida en cepas que presenten el fenotipo MDR. [5]

Diversos compuestos de origen natural y sintético han sido descubiertos con efecto inhibidor en bombas de eflujo. Dentro de los fármacos de

origen sintético, existen diversas clases de compuestos orgánicos, de las cuales resaltan la imidas cíclicas. [6]

Las imidas cíclicas son moléculas sintéticas obtenidas por la reacción entre ácido carboxílico y amoníaco. Contienen un grupo (-CO-N(R)-CO-), siendo R un átomo de hidrogeno, un grupo alquilo o un arilo, siendo la mayoría de estos compuestos un sistema cíclico con menos de siete átomos de carbono. [7]

Entre las principales subclases de imidas se encuentran las maleimidas, las cuales en los últimos años estos compuestos han atraído la atención principalmente por sus propiedades terapéuticas.

Los efectos biológicos de maleimidas y compuestos relacionados han sido estudiados durante muchos años, estos compuestos han demostrado recientemente jugar un papel importante en la reversión del fenotipo MDR. [7]

Modelos biológicos de estudio

En distintos casos se ha reportado la sobreexpresión de genes que codifican para otras proteínas pertenecientes a la familia de transportadores ABC y con mecanismo similares a la P-gp de mamíferos. Por lo tanto el uso de modelos bacterianos resulta ser un método viable de estudio del eflujo activo de fármacos en las células.[8]

Un estudio donde se empleó *Bacillus subtilis* resistente a rodamina 6G, ha demostrado las similitudes del eflujo activo de fármacos entre el sistema de mamíferos y un modelo bacteriano, pero sobre todo se comprobó la sensibilidad en ambos casos a los mismos fármacos inhibidores. Por lo anterior este modelo bacteriano permite evaluar nuevos fármacos con posible efecto inhibidor de la P-gp. [8]

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias y condiciones de cultivo empleadas

Se empleó una cepa silvestre de *Bacillus subtilis* ATCC 33608, denominada BS-A y un cultivo resistente a 2 µg/mL de Rodamina 6G (R6G, SIGMA), denominada BS-2, obtenido previamente por exposición a concentraciones crecientes de

R6G. Ambos cultivos fueron almacenados a -70°C con glicerol al 10%.

Previo a cada ensayo las bacterias se recuperaron en medio para antibióticos 3 (Difco) adicionado con 0.4% de glucosa (D3G) por 18h a 37°C y 180 rpm. Posteriormente se realizó un cambio de medio con una dilución 1:100 del cultivo en medio D3G y se incubaron por 18 h más bajo las mismas condiciones. Para el caso del cultivo resistente, el medio se suplementó con $2\mu\text{g/ml}$ de R6G. Finalmente las bacterias se lavaron con solución salina y se ajustaron en medio D3G a una densidad óptica (D.O.) de 0.04 a 630 nm.

Derivados de aril maleimidias N-sustituidas

En la Tabla 1 se muestran los cuatro miembros del grupo de las aril maleimidias N sustituidas empleadas en el presente trabajo.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a R6G

Se partió de cultivos de 18 horas de incubación de las cepas antes mencionadas, empleando la técnica de microdilución en placa de 96 pozos, y se evaluaron concentraciones dobles seriadas para cada una de las moléculas en medio D3G, empleando concentraciones de $4\mu\text{g/mL}$ a $128\mu\text{g/mL}$ para cada una de las moléculas evaluadas.

La CMI fue definida como la menor concentración que inhibe totalmente el crecimiento bacteriano después de 18 horas de incubación a 37°C a 180 rpm.

Evaluación de la actividad moduladora de resistencia a fármacos de las Aril maleimidias N-sustituidas

Para evaluar la actividad moduladora de los derivados de maleimidias, se determinó la CMI de R6G, con el método antes descrito, en presencia y ausencia de cada una de las moléculas a diferentes concentraciones ($2.5\mu\text{g/mL}$, $5.0\mu\text{g/mL}$, $10\mu\text{g/mL}$ y $20\mu\text{g/mL}$), empleando la cepa BS-2 de *B. subtilis*. Se incluyeron dos compuestos descritos como inhibidores de P-gp, reserpina y verapamil a 5 y $25\mu\text{g/ml}$ respectivamente como controles positivos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de establecer un rango de concentraciones que no afecten el crecimiento bacteriano y que puedan ser evaluadas para búsqueda de efecto modulador en la sensibilidad de *B. subtilis* BS-A y BS-2 a R6G. Se determinó la sensibilidad de la bacteria a cada una de las moléculas derivadas de N-maleimidias como se muestra en las figuras 1 y 2.

Las moléculas JGC-1, JGC-2 Y JGC-3 presentaron una CMI de $64\mu\text{g/ml}$ en ambas cepas; mientras que JGC-2 presentó una CMI de $64\mu\text{g/ml}$ para BS-A y de $32\mu\text{g/ml}$ para BS-2. Se ha reportado que la CMI de compuestos derivados de maleimidias se encuentra entre los $16\mu\text{g/ml}$ y los $256\mu\text{g/ml}$ predominando las concentraciones de $64\mu\text{g/ml}$ y $128\mu\text{g/ml}$ según las características de cada compuesto. [9]

Evaluación del efecto inhibitor de derivados de N-maleimidias

Para determinar el efecto inhibitor se empleó la cepa resistente BS-2. De acuerdo a los resultados obtenidos en la Imagen 3, las 4 moléculas evaluadas fueron capaces de modular la resistencia del cultivo a R6G. JGC-1, presentó una reducción de dos veces la CMI de la cepa, esto a una concentración de $10\mu\text{g/ml}$ de la molécula, por su parte JGC-2 logró reducir la CMI de la cepa un orden, de $8\mu\text{g/ml}$ a $4\mu\text{g/ml}$, sin embargo este efecto se observa a una concentración de $20\mu\text{g/ml}$ de la molécula, JGC-3 y JGC-4 se comportan de la misma forma en todas las concentraciones evaluadas y redujeron la CMI de BS-2 un orden, este efecto se observó a $10\mu\text{g/ml}$ de la molécula. El rango de concentraciones empleadas para evaluar el efecto inhibitor de las moléculas, no interfieren directamente en el crecimiento de la bacteria, ya que se encuentran en una concentración por debajo de sus mínimas inhibitorias y dentro de un margen seguro de evaluación de acuerdo a lo observado en la Fig. 2. El derivado maleimídico que presentó una mejor actividad moduladora de la resistencia fue la molécula JGC-1, que resultó mejor en la reversión de la resistencia incluso que los controles descritos en la bibliografía, como verapamil y reserpina, los cuales solo reducen la resistencia un orden empleando el mismo modelo biológico de

estudio, y JGC-1 lo hace dos veces, sin embargo actúa a una concentración mayor con respecto a reserpina, pero a una menor con respecto a verapamil.

CONCLUSIONES

Todas las moléculas presentaron la capacidad de revertir la resistencia adquirida por la cepa BS-2 comparable al efecto logrado por inhibidores de P-gp. Las concentraciones empleadas para las cuatro moléculas no afectan el crecimiento bacteriano, ya que están por debajo de sus CMI respectivas. El derivado maleimídico JGC-1 presentó la mejor actividad moduladora de la resistencia a R6G, disminuyendo la CMI hasta 2 µg/ml, este resultado es mejor con respecto a otros inhibidores descritos en la bibliografía, como verapamil y reserpina, los cuales solo reducen la resistencia un orden de magnitud (4 µg/ml) empleando el mismo modelo biológico de estudio.

AGRADECIMIENTOS

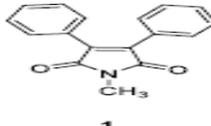
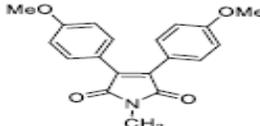
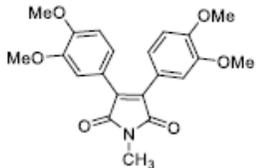
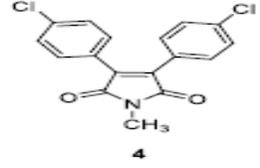
A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado y al Programa de Veranos de Investigación Científica UG por la oportunidad y los apoyos otorgados para la realización de esta estancia. Al Dr. Felipe Padilla Vaca por las facilidades prestadas para la realización de los ensayos bacteriológicos. A mi compañero de laboratorio Arturo Reyes Gualito por todas sus aportaciones y ayuda constante.

REFERENCIAS

- [1] Ruiz, G. M., Souvion, 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.
- [2] Di Pietro, A., Dayan, G., Conseil, G., Steinfels, E., Krell, T., Trompier, D., & Jault, J. M. (1999). P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. *Brazilian journal of medical and biological research*, 32(8), 925-939.

- [3] Gros, P., Neriah, Y. B., Croop, J. M., & Housman, D. E. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance.
- [4] Amin, M. L. (2013). P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug target insights*, 7(1)
- [5] Lomovskaya, O., & Bostian, K. A. (2006). Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic—a vision for applied use. *Biochemical pharmacology*, 71(7), 910-918.
- [6] Reynolds, D. J., Wong, O. T., Simlot, R., Chang, J. J., & Hall, I. H. (1994). Acute toxic and teratogenic effects of cyclic imides in rodents. *Archiv der Pharmazie*, 327(4), 237-245.
- [7] Hargreaves, M. K., Pritchard, J. G., & Dave, H. R. (1970). Cyclic carboxylic monoimides. *Chemical Reviews*, 70(4), 439-469.
- [8] Neyfakh, A. A., Bidnenko, V. E., & Chen, L. B. (1991). Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), 4781-4785.
- [9] Orzeszko, A., Kamińska, B., & Starościk, B. J. (2002). Synthesis and antimicrobial activity of new adamantane derivatives III. *Farmaco*, 57(8), 619-624

Tabla 1: Familia de 3,4-diarilmaleimidias N-sustituidas evaluadas durante el ensayo

Nombre	Estructura
JGC-1 1-methyl-3,4-diphenyl-1H-pyrrole-2,5-dione	 1
JGC-2 3,4-bis(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrole-2,5-dione	 2
JGC-3 3,4-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrole-2,5-dione	 3
JGC-4 3,4-bis(4-chlorophenyl)-1-methyl-1H-pyrrole-2,5-dione	 4

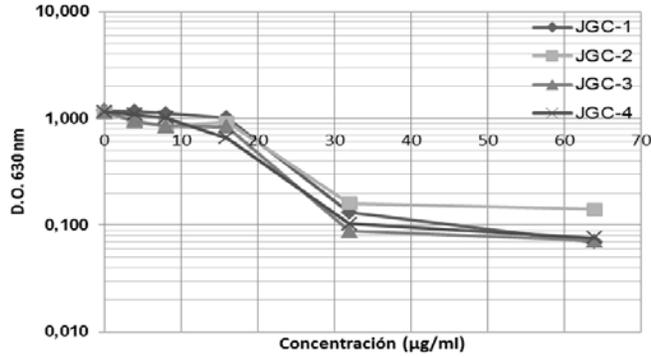


Imagen 1. Efecto de los derivados de N-maleimidias en la proliferación bacteriana de *B. subtilis* BS-A. Se muestra el crecimiento bacteriano como Densidad óptica (D.O.) del cultivo de *B. subtilis* BS-A en presencia de concentraciones crecientes de 4 derivados de N-maleimidias.

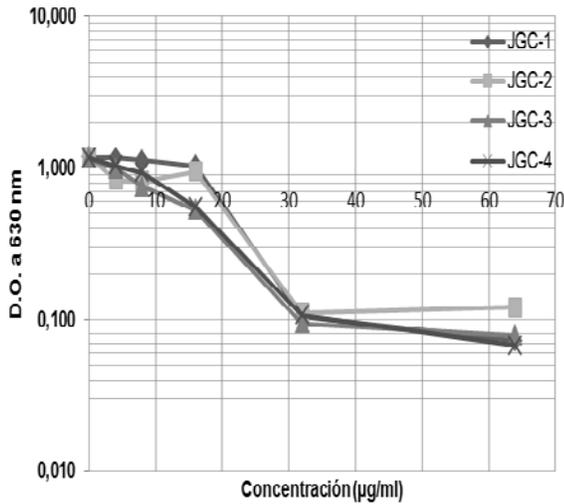


Imagen 2. Efecto de los derivados de N-maleimidias en la proliferación bacteriana de *B. subtilis* BS-2, resistente a R6G. Se muestra el crecimiento bacteriano como densidad óptica (D.O.) del cultivo de *B. subtilis* BS-2 en presencia de concentraciones crecientes de 4 derivados de N-maleimidias.

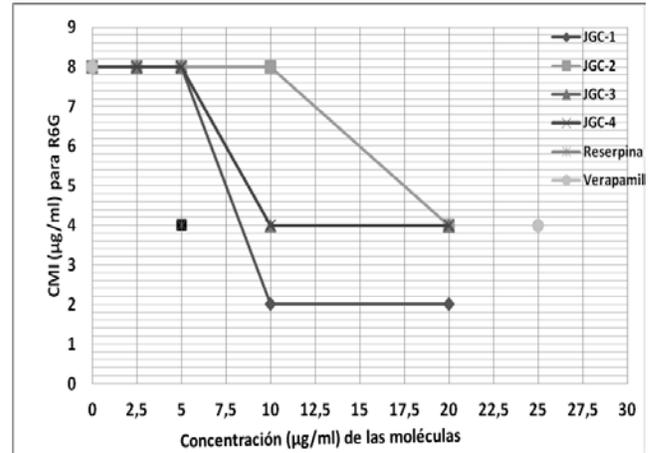


Imagen 3.- Efecto de los derivados de N-maleimidias a distintas concentraciones como moduladores de la resistencia adquirida por BS-2. Se muestra la CMI de *B. subtilis* BS-2, en R6G, en presencia y ausencia de derivados de N-maleimidias, así como el efecto modulador de reserpina y verapamil.