

# EVALUACIÓN DE UN MODELO BACTERIANO RESISTENTE A RODAMINA 6G PARA BÚSQUEDA DE NUEVOS INHIBIDORES DE GLICOPROTEÍNA P (PGP)

Reyes Gualito, Arturo Nombre (1), Solorio Alvarado César Rogelio (2), Mendoza Macías Claudia Leticia (3),

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [a.reyesgualito@gmail.com]

2 [Departamento de Química, División de Ciencias 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

La bacteria *Bacillus subtilis* presenta un mecanismo de resistencia a múltiples drogas similar al presentado por células tumorales de mamíferos, principalmente las relacionadas al carcinoma del seno. Este es un mecanismo de eflujo altamente activo mediado por una glicoproteína de membrana, llamada glicoproteína P. Se ha descrito en la literatura el efecto inhibitor sobre la actividad de esta glicoproteína utilizando una amplia variedad de compuestos, entre ellos la reserpina y el verapamil, destacando la necesidad de nuevas moléculas. En este trabajo se presenta la evaluación de un modelo biológico basado en el uso de estos dos inhibidores, en cepas de *B. subtilis* resistentes a Rodamina 6G. Los resultados confirman el efecto inhibitor de ambos compuestos y la utilidad del modelo biológico.

## Abstract

*Bacillus subtilis* presents a multi-drug resistance mechanism like the one presented by mammalian tumoral cells, mainly the related with breast carcinoma. This is a highly active efflux mechanism mediated by a membrane protein called P glycoprotein (Pgp), whose inhibition is proposed as an optimization of antineoplastic response. Various compounds have been described as Pgp inhibitors, among them reserpine and verapamil, highlighting the necessity of new molecules. In this paper, evaluation of a biological model based on the use of these two inhibitors in Rhodamine 6G resistant *B. subtilis* strains it is presented. The results confirm the inhibitor effect of both molecules and the biological model usefulness.

## Palabras Clave

Glicoproteína P; *Bacillus subtilis*; Verapamil; Reserpina; MDR.

## INTRODUCCIÓN

La MDR (Resistencia Múltiple a Fármacos, por sus siglas en inglés) es un fenómeno donde las células tumorales adquieren resistencia a un amplio rango de drogas quimioterapéuticas diversas estructural y funcionalmente. [1]

Se estima que la resistencia a las drogas utilizadas contribuye a más del 90% de las muertes por cáncer; por lo que es éste un problema importante que requiere ser abordado con la mayor eficacia posible. [2]

En dichas células tumorales con resistencia a múltiples drogas ha sido demostrado que tienen un mecanismo de eflujo altamente activo para agentes antineoplásicos, lo cual previene la acumulación de estas drogas en su citoplasma. El producto del gen MDR, la glicoproteína P (Pgp) tiene la función de transportar los agentes antineoplásicos hacia el exterior de estas células tumorales. [3]

Esta proteína es un componente importante de la membrana celular que bombea sustancias ajenas a la célula hacia el espacio extra celular. Existe tanto en animales, hongos y bacterias; se cree que es un mecanismo de defensa que evolucionó en contra de sustancias dañinas a la célula. [4]

Otros modelos donde se ha descrito un sistema de eflujo relacionado con la resistencia a drogas, y realizado la modulación de una proteína similar a Pgp es en cepas de *Leishmania donovani* resistente a arsenito [5], *Lactococcus lactis* [6], y *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina. [7]

Recientes investigaciones han demostrado, que una sobreexpresión de Pgp en varios tipos de tumores, es capaz de extraer de la célula agentes antineoplásicos tales como, doxorubicina, vincristina y actinomicina D, etc. Esta sobreexpresión podría ser responsable no sólo de lo refractario al tratamiento quimioterapéutico, sino también a la progresión de la enfermedad. [8]

Se ha descrito en *Bacillus subtilis* un gen llamado *bmr* (*Bacillus* multiresistent por sus siglas en inglés) el cual expresa la proteína Bmr, análoga en funciones a Pgp. Así mismo, se ha descrito que ambos transportadores comparten los mismos sustratos y pueden ser inhibidos por los mismos

compuestos, destacando entre los inhibidores el verapamil y la reserpina. [9]

Dado que potencialmente es más sencillo realizar los ensayos de inhibición en cultivos bacterianos que en células de mamífero, éste modelo bacteriano podría ser empleado para evaluar posibles inhibidores de la Pgp que permitan una optimización de la terapia antineoplásica en el humano dado la analogía funcional con los transportadores bacterianos. En este trabajo se desarrollaron ensayos para evaluar el efecto inhibitorio de verapamil y reserpina sobre la resistencia a Rodamina 6 G (R6G) en *B. subtilis*. Además se corroboró la resistencia cruzada a bromuro de etidio. Lo anterior permite proponer el modelo en *B. subtilis* para la evaluación de nuevas moléculas con potencial uso como inhibidores de Pgp.

## 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. Las bacterias se lavaron con solución salina y centrifugación a 1200 rpm durante 5 min., después se ajustaron a una densidad óptica (D.O.) a 630 nm de 0.04 en medio D3G.

Para los ensayos de evaluación de compuestos inhibidores, las bacterias recibieron un pretratamiento por 15 min a temperatura ambiente en medio D3G con inhibidores de Pgp, verapamil (25 µg/mL), o reserpina (5 µg/mL).

### Inducción de resistencia a R6G

Las cepas resistentes fueron seleccionadas con rodamina 6G (R6G) (SIGMA). Las bacterias se cultivaron en medio líquido D3G suplementado con R6G a 0.5, 1, 2, 3 y 4 µg/ml, consecutivamente. Los cultivos se diluyeron 1:100 con medio fresco y R6G cada 24-48. La concentración de R6G se

incrementó cada 4 cambios de medio. Se obtuvieron 6 cultivos resistentes, los cuales se muestran en la Tabla 1.

### Evaluación de la sensibilidad a R6G y Bromuro de etidio en los cultivos obtenidos.

Se evaluó la sensibilidad a R6G y Bromuro de etidio de los bacterias resistentes a partir de cultivos de 18 h de incubación y ajustados a una D.O.<sub>630 nm</sub> de 0.04, en placas de 96 pozos que contenían diluciones seriadas 1:2 del compuesto en medio líquido. La concentración mínima de R6G que inhibió completamente el crecimiento bacteriano se evaluó observando la turbidez del medio después de 18 h de incubación a 37°C y 180 rpm mediante un lectura a una D.O.<sub>630 nm</sub>.

### Evaluación de inhibidores de Pgp en los cultivos de *Bacillus subtilis*

Se evaluó la sensibilidad de la cepa silvestre y los cultivos resistentes en presencia de los inhibidores verapamil y reserpina. Se determinó la CMI para cada cepa siguiendo la metodología ya mencionada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención de cultivos de *Bacillus subtilis* resistentes a R6G.

Se observó la inducción de resistencia a R6G en *B. subtilis* en los cultivos continuos en presencia de este compuesto comparados con la cepa silvestre, desde la concentración más baja 0.5 µg/ml (2X) y el mayor efecto (8X), en los cultivos a 2 y 3 µg/ml de R6G, como se aprecia en la Imagen 1. Así mismo los cultivos resistentes observaron resistencia cruzada a Bromuro de Etidio (Imagen 1), lo anterior confirma lo previamente descrito para el modelo de resistencia en *B. subtilis* basado en la sobreexpresión del gen *bmr* que codifica para un transportador de amplio rango de sustratos [9].

### Efecto de inhibidores de Pgp en la susceptibilidad de los cultivos resistentes a R6G.

Para valorar la utilidad del modelo de resistencia bacteriano en la búsqueda de inhibidores de Pgp, se evaluó el efecto de dos inhibidores ya descritos en Pgp, verapamil y reserpina, en la susceptibilidad a R6G de los cultivos resistentes a 2 µg/ml, observándose una mayor sensibilidad de los cultivos a R6G al reducir un 50% la CMI luego del tratamiento con el inhibidor como se observa en la imagen 2.

Así mismo, se calculó el porcentaje de inhibición en el crecimiento bacteriano para cada compuesto, para evaluar el efecto inhibitorio en las concentraciones crecientes de R6G, lo que se muestra en la Imagen 3 e Imagen 4.

Para la cepa silvestre se observó que el efecto inhibitorio es mínimo, pues además de que el valor de CMI no se redujo, al comparar los porcentajes de inhibición se observa que no hay una diferencia significativa en el medio de cultivo sin la presencia de inhibidores. Esto se atribuye a que posiblemente en la cepa silvestre la cantidad de proteína bmr expresada se mantiene en un nivel basal, que al ser inhibida no permite observar diferencias significativas en la sensibilidad a la R6G; por el contrario, la sobreexpresión de *bmr* asociada a la resistencia, resulta en una mayor cantidad de transportador Bmr en el cultivo resistente que permite ver las diferencias en la CMI cuando es tratada por los inhibidores.

En la cepa resistente se observó que el efecto inhibidor es diferente para los dos compuestos, ya que, aunque ambos reducen la CMI a la mitad, reserpina muestra una inhibición gradual creciente, mientras que verapamil muestra un efecto inhibitorio sin variaciones marcadas. Esto se atribuye a los distintos mecanismos de acción de los compuestos sobre Bmr; el cual para reserpina consiste en una unión irreversible en un sitio de unión específico de Bmr mediante la interacción con residuos de aminoácidos; [10] mientras que para verapamil, el mecanismo consiste en la

competencia directa por sitios de unión muy relacionados entre sí. [11]

## CONCLUSIONES

El modelo de *Bacillus subtilis* resistente a 2 µg/ml de Rodamina 6 G permitió evaluar inhibidores de glicoproteína P, debido a la sobreexpresión del gen bmr análogo a Pgp de mamíferos, lo cual facilitará el estudio de la resistencia medida por el eflujo de fármacos por la sobreexpresión de la Pgp, y se puede adaptar su uso en la búsqueda de nuevas moléculas inhibitoras de dicha resistencia.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado de la Universidad de Guanajuato por su contribución al desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Felipe Padilla Vaca del Departamento de Biología de la DCNE por el apoyo técnico y logístico proporcionado.

## REFERENCIAS

[1] Larkin, A., O'Driscoll, L., Kennedy, S., Purcell, R., Moran, E., Crown, J., ... & Clynes, M. (2004). Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 P-glycoprotein expression in invasive breast cancer: A prognostic study. *International journal of cancer*, 112(2), 286-294.

[2] Ruiz Gómez, M. J., Souviron Rodríguez, A., & Martínez Morillo, M. (2002, September). La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. In *Anales de Medicina Interna* (Vol. 19, No. 9, pp. 49-57).

[3] Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I., & Willingham, M. C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7735-7738.

[4] Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., ... & Chang, G. (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 323(5922), 1718-1722.

[5] Kaur, J., & Dey, C. S. (2000). Putative P-glycoprotein expression in arsenite-resistant *Leishmania donovani* down-regulated by verapamil. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(3), 615-619.

[6] Lubelski, J., De Jong, A., Van Merkerk, R., Agustiandari, H., Kuipers, O. P., Kok, J., & Driessen, A. J. (2006). LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. *Molecular microbiology*, 61(3), 771-781.

[7] Bray, P. G., Howells, R. E., Ritchie, G. Y., & Ward, S. A. (1992). Rapid chloroquine efflux phenotype in both chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*: a correlation of chloroquine sensitivity with energy-dependent drug accumulation. *Biochemical pharmacology*, 44(7), 1317-1324.

[8] Mora, E. V., Mosquera, J. L., & Reigosa, A. (2007). Estudio de la expresión de la P-Glicoproteína y del P53 en osteosarcomas humanos. *Rev. venez. oncol*, 19(2), 96-104.

[9] 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.

[10] Ahmed, M. A. O. B. O. L., Borsch, C. M., Neyfakh, A. A., & Schuldiner, S. (1993). Mutants of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr with altered sensitivity to the antihypertensive alkaloid reserpine. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15), 11086-11089.

[11] Yusa, K., & Tsuruo, T. (1989). Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Research*, 49(18), 5002-5006.

Tabla 1: Cepas de *Bacillus subtilis* obtenidas

Nombre de la cepa	No. subcultivos de	Descripción
1. BS-A	15	Cepa Control
2. BS-B	12	Cepa Control en Etanol
3. BS-0.5	12	Cultivo a 0.5 µg/mL
4. BS-1	12	Cultivo a 1 µg/mL
5. BS-2	26	Cultivo a 2 µg/mL
6. BS-3	9	Cultivo a 3 µg/mL

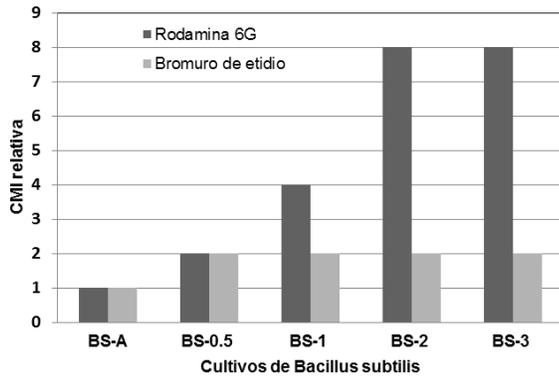


IMAGEN 1: Sensibilidad a Rodamina 6 G y Bromuro de etidio en *B. subtilis*. Se muestra la CMI relativa para los cultivos resistentes obtenidos a 0.5, 1, 2 y 3  $\mu\text{g/ml}$  respecto la CMI para la cepa silvestre con Rodamina 6G (1  $\mu\text{g/ml}$ ) y Bromuro de etidio (4  $\mu\text{g/ml}$ ). {+

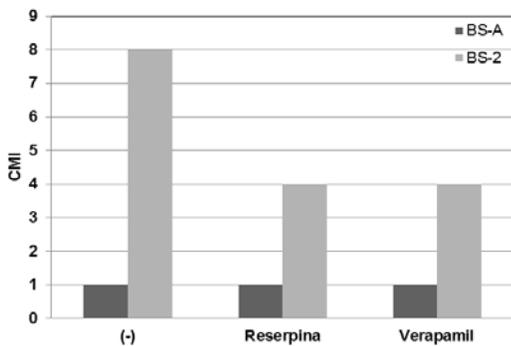


IMAGEN 2 Efecto de Verapamil y Reserpina en la sensibilidad a R6G de los cultivos de *B. subtilis*. Se muestra la CMI para *B. subtilis* del cultivo resistente obtenido 2  $\mu\text{g/ml}$  y la cepa silvestre en presencia de Verapamil (25  $\mu\text{g/ml}$ ) y Reserpina (5  $\mu\text{g/ml}$ ).

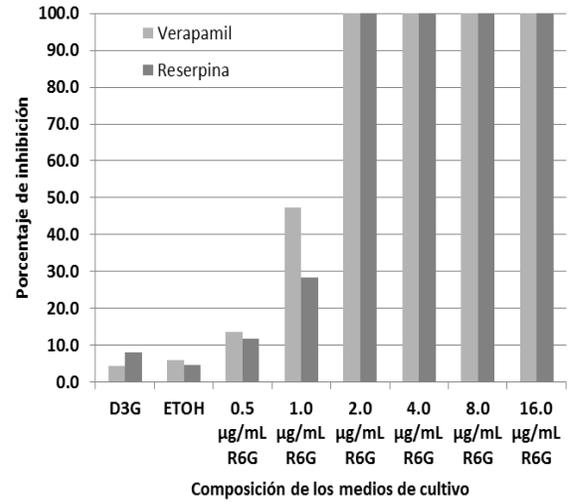


IMAGEN 3: Porcentaje de inhibición de verapamil y reserpina en el crecimiento de la cepa BS-A. Se muestra la diferencia entre el porcentaje de crecimiento sin la presencia de inhibidor en cada medio de cultivo observada al adicionar cada inhibidor en las suspensiones bacterianas en presencia de R6G a diferentes concentraciones.

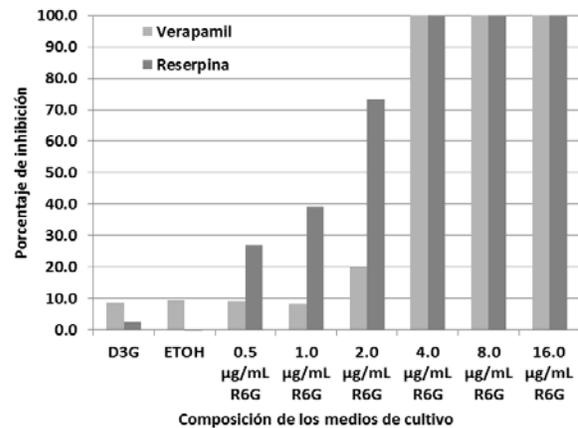


IMAGEN 4: Porcentaje de inhibición de verapamil y reserpina en el crecimiento de la cepa BS-2. Se muestra la diferencia entre el porcentaje de crecimiento sin la presencia de inhibidor en cada medio de cultivo observada al adicionar cada inhibidor en las suspensiones bacterianas en presencia de R6G a diferentes concentraciones.