

# MODELO BACTERIANO RESISTENTE A MÚLTIPLES FÁRMACOS PARA LA EVALUACIÓN DE DERIVADOS DE MALEIMIDAS CON POTENCIAL EFECTO REVERSOR DE LA RESISTENCIA

Aguilar Granados Aidee Guadalupe (1), Reyes Gualito Arturo (2), Solorio Alvarado César Rogelio (3), Mendoza Macías Claudia Leticia (4)

1 Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. | Dirección de correo electrónico: [aideeaguilar\\_24@hotmail.com](mailto:aideeaguilar_24@hotmail.com)

2 Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. | Dirección de correo electrónico: [a.reyesgualito@gmail.com](mailto:a.reyesgualito@gmail.com)

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

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

## Resumen

Diversas investigaciones han demostrado que, la sobre expresión de P-gp, en varios tipos de tumores malignos, provoca que actúe como una bomba de membrana extrayendo de la célula agentes empleados como antineoplásicos. La importancia clínica de este hecho ha llevado a múltiples estrategias para evitar o revertir los efectos de la resistencia a las drogas antineoplásicas. En el presente trabajo se llevo a cabo la evaluación de un grupo de Aril-maleimidias N- sustituidas, las cuales se ha encontrado poseen efecto inhibitor sobre glicoproteína P (P-gp). La inhibición de esta bomba de eflujo, empleando fármacos inhibidores, se ha propuesto como método para mejorar la administración de agentes terapéuticos. La bacteria *Bacillus subtilis* presenta un mecanismo de resistencia a múltiples drogas similar al presentado por células tumorales de mamíferos, por lo que en el ensayo realizado se empleó como modelo biológico de estudio y se comprobó que esta actúa de manera similar en el eflujo de fármacos y presenta sensibilidad a los mismos inhibidores, por lo que resulta un medio viable para el estudio de nuevas moléculas con posible efecto inhibitor de P-gp. En el modelo de estudio se determinó la CMI de cada una de las moléculas empleadas y se evaluó su efecto inhibitor a distintas concentraciones (2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml y 20 µg/ml).

## Abstract

Everal investigations have shown that the overexpression of P-gp in various types of malignant tumors causes it to act as a membrane pump by extracting agents used as antineoplastics from the cell. The clinical importance of this fact has led to multiple strategies to avoid or reverse the effects of resistance to antineoplastic drugs. In the present work, a group of N-substituted Aryl maleimides which have been found inhibitory effect of P-glycoprotein. Inhibition of this efflux pump, has been proposed as a method for improving the delivery of therapeutic agents. *B. subtilis* presents a mechanism of resistance to multiple drugs like that presented by mammalian tumor cells. In the test performed was used as a biological model of study and it was verified that it acts similarly in the efflux of drugs and presents sensitivity to the same inhibitors in the study model the MIC of each of the molecules used it was determined and its inhibitor at different concentrations (2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml and 20 µg/ml) was evaluated.

### Palabras Clave

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

## INTRODUCCIÓN

### Fenotipo MDR una barrera para el cáncer

El cáncer es una de las principales enfermedades que preocupan a la sociedad en la actualidad y la resistencia intrínseca o adquirida a los citotóxicos empleados sigue siendo un gran obstáculo en el tratamiento y curación de los pacientes que la padecen. Se han identificado varias causas implicadas en este fenómeno de resistencia, una de las más estudiadas es el del gen *mdr1* y su producto, la glicoproteína P, la cual se sabe ahora actúa como bomba de eflujo de fármacos dependiente de energía y provoca un fenotipo de resistencia simultánea a múltiples drogas (MDR). [1]

Este fenotipo 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 [1]

### Inhibición de la bomba de eflujo (P-gp)

Existen diversos tipos de moduladores que pueden revertir el fenotipo MDR, se han descubierto distintos inhibidores farmacológicos de la proteína codificada por el gen MDR, el mecanismo de inhibición se puede llevar a cabo por competencia en los sitios de unión de la droga entre fármacos e inhibidores, o bien por el bloqueo de la hidrólisis del ATP necesario para su función de transporte. [2]

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. [3]

Por lo general, un inhibidor de P-gp se administra junto con el fármaco para mejorar la absorción del mismo. Cuando se coadministran un medicamento y un inhibidor, el mecanismo de transporte mediado por P-gp es el mismo tanto para el fármaco como para el inhibidor. En este proceso, el fármaco y el inhibidor deben ser diferenciados por P-gp y los fármacos no deben ser extruidos [3]

### 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. [4]

Diversos compuestos de origen natural y sintético han sido descubiertos con efecto inhibitor en bombas de eflujo. Dentro de los fármacos de origen sintético, existen diversas clases de compuestos orgánicos, de las cuales resaltan la imidas cíclicas. [5]

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 hidrógeno, un grupo alquilo o un arilo, siendo la mayoría de estos compuestos un sistema cíclico con menos de siete átomos de carbono. [6]

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

Los efectos biológicos de maleimidadas y compuestos relacionados han sido estudiados durante muchos años, estos compuestos han demostrado recientemente jugar un papel importante en la reversión del fenotipo MDR. [6]

### Modelos biológicos de estudio.

La P-gp sobre expresada en células de mamíferos comparte una gran homología con los transportadores sobre expresados en sistemas bacterianos, por lo tanto el uso de modelos bacterianos resulta ser un método viable de estudio del eflujo activo de fármacos en las células.[7]

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. [7]

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Bacterias y condiciones de cultivo empleadas.

A partir de un cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 33608, se obtuvo un cultivo resistente a 2 µg/mL de Rodamina 6G (R6G, SIGMA), denominada BS-2, obtenido previamente por exposición a concentraciones crecientes de R6G. El cultivo fue almacenado 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 2µg/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 siete 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 la cepa antes mencionada, 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 µg/mL a 128 µg/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 capacidad de reversión de la resistencia 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 µg/mL, 5.0 µg/mL, 10 µg/mL y 20 µg/mL), empleando la cepa resistente BS-2 de *B. subtilis*. Se incluyeron dos compuestos descritos como inhibidores de P-gp, reserpina y verapamil a 5 y 25 µg/ml respectivamente como controles positivos

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad presentada por las moléculas JGC-1, JGC-2, JGC-3, JGC-4 fue reportada en el estudio realizado por Aguilar y col., 2016 [8], al que ahora se le agrega los resultados de 3 moléculas mas, por lo que se determinó la sensibilidad de la bacteria a cada una de las moléculas derivadas de N-maleimidias como se muestra en las figuras 1. Las moléculas mostraron una CMI entre 32-128 µg/ml. Las molécula JGC-1, JGC-3, JGC-4 y JGC-11 presentaron una CMI de 64 µg/ml aproximadamente; mientras que JGC-2 y JGC-10 presentaron una CMI de 32 µg/ml y JGC-12 de 128 µg/ml. Se ha reportado que la CMI de compuestos derivados de maleimidias se encuentra entre los 16 µg/ml y los 256 µg/ml predominando las concentraciones de 64 µg/ml y 128 µg/ml según las características de cada compuesto. [9]

### Evaluación del efecto inhibidor de derivados de N-maleimidias

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Imagen 2, 6 de las 7 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 µg/ml de la molécula, por su parte JGC-2 logro reducir la CMI de la cepa un orden, de 8 µg/ml a 4 µg/ml, sin embargo este efecto se observa a una concentración de 20 µg/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 µg/ml de la molécula, JGC-10 actúa a concentraciones de 5 µg/ml y 10 µg/ml al lograr revertir la resistencia un orden de

magnitud, JGC-11 por su parte revierte la resistencia en todas las concentraciones evaluadas y finalmente en JGC-12 no se observa efecto. El rango de concentraciones empleadas para evaluar el efecto inhibitorio de las moléculas, no interfiere 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. 1

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

Los derivados de maleimidias fueron capaces de revertir la resistencia del cultivo. Seis de las siete moléculas presentaron la capacidad de revertir la resistencia adquirida por la cepa BS-2 comparable al efecto logrado por inhibidores ya descritos de P-gp. 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 secretaria de innovación, ciencia y educación superior, por el financiamiento parcial para la realización de este trabajo mediante los convenios del proyecto 02-02EX-16, a través de la convocatoria incentivos a la investigación y desarrollo tecnológico otorgados a la Dra. Claudia Leticia Mendoza Macías.

Al Dr Felipe Padilla Vaca por todas las facilidades prestadas para la realización de los ensayos

bacteriológicos y a mi compañero de laboratorio Arturo Reyes Gualito por todas sus aportaciones al proyecto y ayuda constante en el trabajo experimental.

## REFERENCIAS

- [1] 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.
- [2] Gros, P., Neriah, Y. B., Croop, J. M., & Housman, D. E. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance.
- [3] Amin, M. L. (2013). P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug target insights*, 7(1)
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Hargreaves, M. K., Pritchard, J. G., & Dave, H. R. (1970). Cyclic carboxylic monoimides. *Chemical Reviews*, 70(4), 439-469.
- [7] 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.
- [8] Granados, A. G. A., Alvarado, C. R. S., & Macías, C. L. M. (2017). Evaluación de nuevas moléculas con potencial efecto inhibitorio sobre glicoproteína p. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 2(1), 200-204.
- [9] Orzeszko, A., Kamińska, B., & Starościk, B. J. (2002). Synthesis and antimicrobial activity of new adamantane derivatives III. // *Farmaco*, 57(8), 619-624.

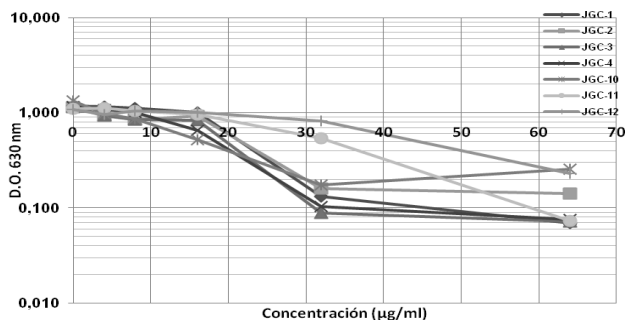


Imagen 1.- Efecto de los derivados de N-maleimidias en la proliferación bacteriana de *B.subtilis* Bs-2, resistente a R6G. se muestra el crecimiento bacteriano como densidad óptica (d.o.) del cultivo de *B. subtilis* Bs-2 en presencia de concentraciones crecientes de 7 derivados de N-maleimidias.

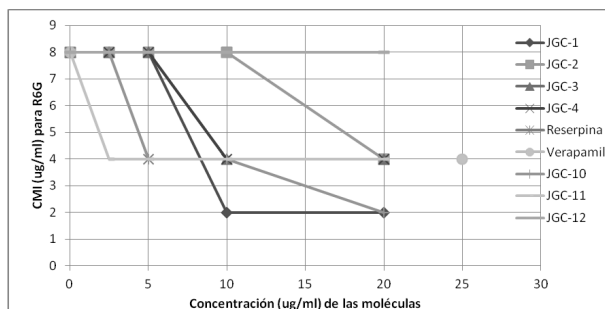
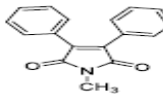
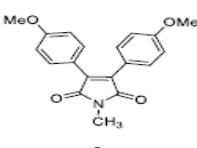
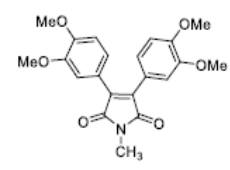
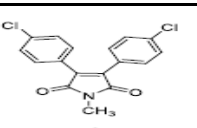
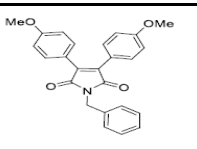
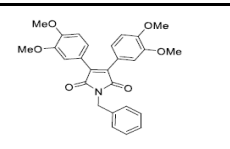
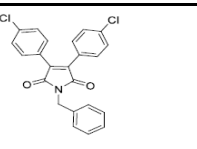


Imagen 2.- Efecto de los derivados de N-maleimidias a distintas concentraciones como moduladores de la resistencia adquirida por BS-2. Se muestra la CMI de *B. subtilis* BS-2, en R6G, en presencia y ausencia de derivados de N-maleimidias, así como el efecto modulador de reserpina y verapamil.

Tabla 1: Familia de las Aril-maleimidias N-sustituidas evaluadas durante el ensayo

Nombre	Estructura
JGC-1 1-methyl-3,4-diphenyl-1H-pyrrole-2,5-dione	 <b>1</b>
JGC-2 3,4-bis(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrole-2,5-dione	 <b>2</b>
JGC-3 3,4-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrrole-2,5-dione	 <b>3</b>
JGC-4 3,4-bis(4-chlorophenyl)-1-methyl-1H-pyrrole-2,5-dione	 <b>4</b>
JGC-10 1-benzyl-3,4-bis(4-methoxyphenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione	 <b>10</b>
JGC-11 1-benzyl-3,4-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione	 <b>11</b>
JGC-12 1-benzyl-3,4-bis(4-chlorophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione	 <b>12</b>