

Estandarización del método para medir el efecto diferencial de los Antibióticos Antraciclínicos (ATC) Doxorubicina y 4'epi Doxorubicina sobre plásmido y/o cromosoma bacteriano *in vivo*

ANELVI PATIÑO UZCÁTEGUI, MELISA COLMENARES, DÍAZ L. E.,
GRASSI H. C., ANDRADES EDJ.

Sección de Biotecnología. Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia
y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

RESUMEN

Los antibióticos antraciclínicos (ATC) se utilizan en la terapéutica como antineoplásicos ya que actúan intercalándose entre las bases apareadas del ADN, modificando su estructura y conformación y afectando a las polimerasas y topoisomerasas. En el presente trabajo se intenta demostrar que la resistencia a antibióticos, cuando ésta se encuentra modificada por un plásmido, puede ser alterada por la presencia de ATC. La cepa bacteriana **DH5 α /pUC19** se cultivó en medio tripticasa soya y luego se colocó en ausencia y presencia de ampicilina (como presión selectiva) y de una ATC (Doxorubicina o 4'epi Doxorubicina). El efecto se puso en evidencia por cuantificación del crecimiento y por evaluación del color en placas con X-gal. Los resultados sugieren que la Doxorubicina tiene un efecto negativo sobre la replicación del plásmido pero afecta positivamente la expresión del mismo. Mientras que 4'epi Doxorubicina afecta negativamente ambos procesos. Se propone la 4'epi Doxorubicina como antibiótico para curar plásmidos y así eliminar las resistencias codificadas en plásmidos, haciéndose la bacteria sensible al antibiótico.

ABSTRACT

Anthacycline antibiotics (ATC) are used in antineoplastic therapeutics because they are able to intercalate between base pairs in DNA, modifying DNA's structure and conformation and affecting polymerases and topoisomerases. In the present paper we try to show that antibiotic resistance, if it is plasmid coded, it can be altered by the presence of ATC. The bacterial strain **DH5 α /pUC19** was cultured in trypticase soy broth and was assayed in the presence and absence of ampicillin (as selective pressure) and of ATC (Doxorubicin or 4'epi Doxorubicin). The effect

was demonstrated by quantifying growth and by evaluating the color in X-gal. The results suggest that Doxorubicin has a negative effect on plasmid replication and a positive effect on plasmid expression, while 4'epi Doxorubicin has a negative effect on both processes. We propose that 4'epi Doxorubicin can be used to cure plasmid and thus eliminate plasmid coded resistances, thus rendering the bacteria sensitive to the antibiotic.

PALABRAS CLAVE

Antraciclinas, Bacterias, Plásmidos.

AGRADECIMIENTOS

CDCHT por el financiamiento en los proyectos de investigación bajo los números FA-184-96 y FA-269-01-03F.

INTRODUCCIÓN

El ADN es afectado por una gran variedad de fármacos. Estos pueden actuar en el ADN a varios niveles (citado por Díaz, 1996). La interacción directa es la base del mecanismo de acción de la mayor parte de los fármacos antineoplásicos. Entre ellos están los Antibióticos Antraciclínicos (ATC) (Silverman, 1992). Los ATC son metabolitos encontrados en Actinomicetos del género *Streptomyces*. Actúan intercalándose entre las bases apareadas del ADN, modificando su estructura y conformación (efecto tóxico) o apilándose a los lados de la molécula de ADN (efecto no tóxico); han sido utilizados en la terapéutica como antineoplásicos (Silverman, 1992). La interacción molecular entre las ATC Doxorubicina y Daunorubicina y su receptor celular en la molécula de ADN, ha sido elucidada por análisis de difracción de

rayos X de alta resolución. Estos estudios estructurales han permitido entender las posibles funciones biológicas asociadas con diferentes regiones de la molécula de ATC. Algunas de ellas son esenciales para su unión al ADN, mientras que otras proporcionan la especificidad necesaria de unión o interferencia con enzimas celulares tales como *polimerasas* y *topoisomerasas*. Las moléculas de la droga adoptan una conformación que les permite ubicar los sitios funcionales en la doble hélice del ADN para obtener una óptima afinidad y especificidad (Wang y col. 1995). Los ATC, Doxorubicina y Daunorubicina, son aplicadas ampliamente en casos clínicos de quimioterapia de cáncer (Wang y col. 1995.). Estudios preliminares indican que las ATC: Doxorubicina, 4'epi Doxorubicina y Daunorubicina muestran un efecto diferencial sobre el plásmido y/o cromosoma bacteriano (Díaz, 1999). El presente estudio se dirigió al diseño de un método que, a través del uso de una ATC, permita determinar la modificación de la resistencia a antibióticos, cuando ésta es mediada por un plásmido bacteriano.

Para cumplir con estos propósitos se evaluó el efecto de la ampicilina sobre el crecimiento de la cepa *E. coli DH5α/pUC19*, se determinó el efecto diferencial de los ATC Doxorubicina, 4'epi Doxorubicina a concentraciones seriadas, sobre las cepa *E. coli DH5α/pUC19*. Seguidamente se utilizó la técnica X Gal como monitor de la expresión y replicación del plásmido pUC19. Finalmente, a partir de los datos obtenidos se planteó un método que permite medir el efecto diferencial de estos antibióticos antraciclínicos sobre plásmido y cromosoma bacteriano *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas.

NOMBRE DE LA CEPA	FUENTE
<i>E. coli</i> DH5α/pUC19	<i>E. coli</i> DH5α/pUC19: Sección de biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia (IIFP).

Tabla 2. Antibióticos Antraciclínicos utilizados.

NOMBRE DEL ANTIBIÓTICO	FUENTE
Doxorubicina	Banco de Medicamentos Antineoplásicos (BAMEAN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (I.A.H.U.L.A.).
4'epi Doxorubicina	Banco de Medicamentos Antineoplásicos (BAMEAN) del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. (I.A.H.U.L.A.).

ENSAYO DE LOS ANTIBIÓTICOS ANTRACICLÍNICOS

Se realizó un cultivo de cada una de las cepas en caldo Trypticase Soya, hasta llevarlo a 0,5 de Densidad Óptica a 600nm. Se hicieron diluciones consecutivas 1:10, y a partir de la dilución 10⁻⁴ (dilución a partir de la cual se obtuvieron colonias contables) se sembraron en forma de gota, 3μL de la misma en placas con Agar Trypticase Soya en presencia y ausencia de Ampicilina (presión selectiva). Sobre cada gota de suspensión bacteriana, se colocaron 5μL de una dilución del Antibiótico Antraciclínico (preparada a partir de una solución madre de 2mg/mL).

Así, Doxorubicina, se evaluó a 0,02mg/mL y 0,002 mg/mL, y 4'epi Doxorubicina a 2mg/ml, 0,2mg/ml y 0,002 mg/mL. La cepa en estudio fue *E. coli* DH5α/pUC19. La Ampicilina se usó como indicador del crecimiento en presencia del plásmido pUC19.

En todos los casos se realizaron controles en presencia y ausencia de ampicilina y del Antibiótico Antraciclínico correspondiente.

EXPRESIÓN DEL PLÁSMIDO pUC19.

Sobre una placa de Agar Luria Broth en presencia y ausencia de Ampicilina, se colocó 2μL de solución X-gal (2mg en 100uL de Dimetilformamida) y 400μL de solución de Isopropil tío beta galactósido (IPTG) (4mg en 2 mL de agua), previamente esterilizado por filtración. Seguidamente se realizó un cultivo de la cepa *E. coli* DH5α/pUC19 en caldo Luria Broth, y a partir de la dilución 10⁻⁴ se sembraron 3μL en las placas anteriormente preparadas (tomado de Sambrook, 1989.). Los Antibióticos Antraciclínicos fueron ensayados siguiendo la metodología anteriormente descrita.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONSIDERACIONES PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS:

► Un crecimiento menor en placa con antraciclina, independiente de la presión selectiva (Ampicilina), con respecto al control sin antraciclina, indica **efecto sobre el cromosoma** que se traduce como un **efecto antibacteriano**.

► Un crecimiento diferencial observado entre placas con antraciclina y en presencia o ausencia de presión selectiva (Ampicilina), indica un **mayor efecto sobre el plásmido**.

► Un mayor crecimiento con antraciclina y en presencia de presión selectiva (Ampicilina), indica un efecto **positivo** sobre la **replicación del plásmido**.

► Un menor crecimiento con antraciclina y en presencia de presión selectiva (Ampicilina), indica un efecto **negativo** sobre la **replicación del plásmido**.

EFFECTO DE DOXORUBICINA, A CONCENTRACIONES SERIADAS, SOBRE LA CEPA *E.coli DH5α/pUC19*

Tabla Nº 3

D. ATC	V	ATS — AMP UFC/ml 1x10 ⁴		V	ATS — AMP UFC/ml 1x10 ⁴	
		UFC/3μL VO	UFC/ml VO		UFC/3μL VO	UFC/ml VO
SD	2 ⁺	23	7667	+	6	2000
-1	2 ⁺	32	10667	+	10	3333
-2	2 ⁺	35	11667	+	10	3333
-3	4 ⁺	80	26667	+	10	3333
-4	3 ⁺	50	16667	+	7	2333
-5	2 ⁺	31	10333	+	20	6667

+o -: Grado de crecimiento
v: viabilidad
ATS: Agar tripticosa soya
D.ATC: Diluciones de la antraciclina
Amp: Ampicilina
VO: Valor observado

SD: Sin Diluir (2mg/mL)
-1:0,2mg/mL
-2:0,02mg/mL
-3:0,002mg/mL
-4:0,0002mg/mL
-5:0,00002mg/mL

La tabla Nº 3 muestra el efecto de la Doxorubicina, a concentraciones seriadas, sobre la cepa *DH5α/pUC19*, evidenciándose que el mecanismo de acción de estos antibióticos antraciclínicos es dependiente de la concentración del mismo, ya que se observa como a ciertas concentraciones aparentemente se intercala entre las bases apareadas del ADN (efecto tóxico), principal mecanismo de acción de este tipo de antibióticos, y en otras aparentemente se apila (efecto no tóxico). Así cuando el antibiótico es utilizado a concentraciones de 2mg/mL (SD) y 0,0002mg/mL (D4), este tiende a intercalarse, observándose menor crecimiento en presencia de ampicilina, mientras que a las concentraciones 0,2mg/mL (D1), 0,02mg/mL (D2) y 0,002mg/mL (D3), este tiende a apilarse, observándose mayor crecimiento de la cepa, en presencia de ampicilina, la cual se mantiene constante en las diluciones consecutivas.

En este ensayo se observó que Doxorubicina mostró un efecto negativo sobre el plásmido desde la concentración de 2mg/mL (SD), hasta la concentración 0,0002mg/mL (D4), evidenciado por un menor crecimiento de la cepa en placa más ampicilina, en comparación con la placa menos ampicilina acentuándose éste en la dilución 0,002mg/mL (D3).

Así mismo, en la concentración 0,00002mg/mL (D5), este antibiótico antraciclínico mostró un efecto positivo sobre el plásmido, demostrado por un mayor crecimiento de la cepa, en comparación con el

observado en otras diluciones del antibiótico antraciclínico, en presencia de ampicilina.

EFFECTO DE 4'EPI DOXORUBICINA, A CONCENTRACIONES SERIADAS, SOBRE LA CEPA *E. coli DH5α/pUC19*

Tabla Nº 4

D. ATC	V	ATS — AMP UFC/ml 1x10 ⁴		V	ATS — AMP UFC/ml 1x10 ⁴	
		UFC/3μL VO	UFC/ml VO		UFC/3μL VO	UFC/ml VO
SD	2 ⁺	29	9667	+	8	2667
-1	2 ⁺	39	13000	+	7	2333
-2	2 ⁺	35	11667	+	11	3667
-3	2 ⁺	36	12000	+	8	2667
-4	2 ⁺	40	13333	+	13	4333
-5	2 ⁺	30	10000	+	11	3667

+o -: Grado de crecimiento
v: viabilidad
ATS: Agar tripticosa soya
D.ATC: Diluciones de la antraciclina
Amp: Ampicilina
VO: Valor observado

SD: Sin Diluir (2mg/mL)
-1:0,2mg/mL
-2:0,02mg/mL
-3:0,002mg/mL
-4:0,0002mg/mL
-5:0,00002mg/mL

La tabla Nº 4 muestra el efecto de 4'epi Doxorubicina, a concentraciones seriadas, sobre la cepa *E. coli DH5α/pUC19*, observándose de nuevo que el mecanismo de acción de las antraciclinas es dependiente de una relación óptima ADN-ATC. En este ensayo se observó una disminución del crecimiento de la cepa en presencia de ampicilina, que se acentúa en las concentraciones 0,2mg/mL (D1) 0,002mg/mL (D3), consiguiéndose así en estas diluciones un efecto negativo sobre el plásmido pUC19.

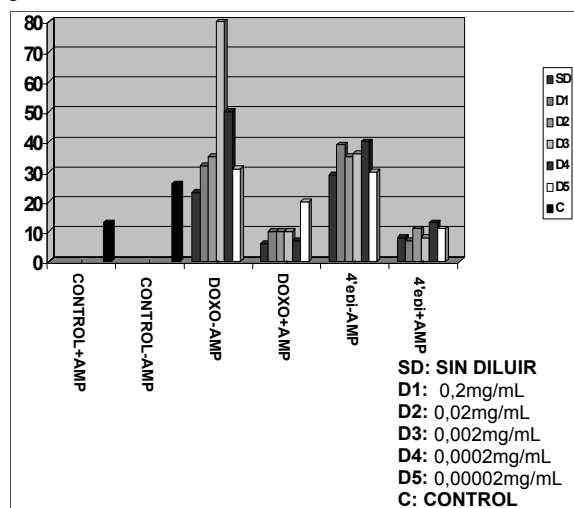
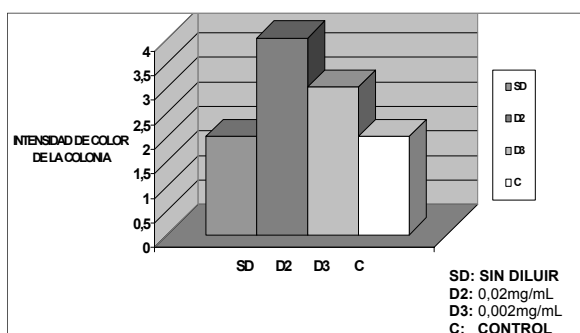


Gráfico Nº 1

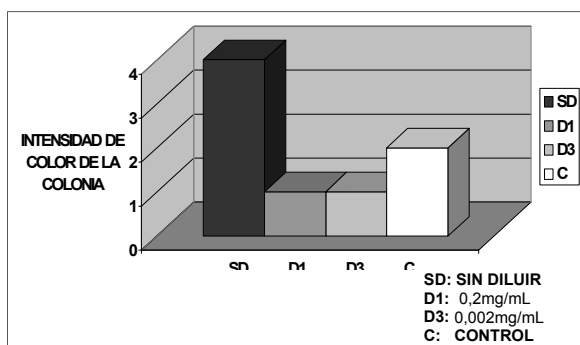
Efecto de Doxorubicina y 4'epi Doxorubicina a concentraciones seriadas sobre la cepa *E. coli DH5α/pUC19*. Efecto plasmídico



*** La evaluación de la intensidad de color de la colonia es ponderada, es decir, cuantitativa. Los valores numéricos observados en los gráficos indican el número de cruces (+) asignadas para cada dilución del antibiótico antraciclínico.

Gráfico N° 2

Efecto de 4'epi Doxorubicina sobre la cepa *E. coli* DH5α/pUC19 evidenciado por la Técnica X Gal.



*** La evaluación de la intensidad de color de la colonia es ponderada, es decir, cuantitativa. Los valores numéricos observados en los gráficos indican el número de cruces (+) asignadas para cada dilución del antibiótico antraciclínico.

Gráfico N° 3

Efecto de 4'epi Doxorubicina sobre la cepa *E. coli* DH5α/pUC19 evidenciado por la Técnica X Gal.

EFEECTO DIFERENCIAL DE LOS ATC SOBRE LA CEPA *E. coli* DH5α/pUC19

• *E. coli* DH5α/pUC19

En el gráfico N°1 Doxorubicina mostró un efecto negativo sobre el plásmido pUC19 desde la concentración de 2mg/mL (SD) hasta la concentración de 0,0002mg/mL (D4), evidenciado por un menor crecimiento de la cepa en presencia de presión selectiva (Ampicilina), en comparación con el crecimiento de la cepa en ausencia de presión selectiva, acentuándose este efecto en la concentración 0,002mg/mL (D3). Igualmente 4'-épi- Doxorubicina mostró un efecto negativo sobre el plásmido en estudio, que se acentúa en las concentraciones 0,2mg/mL (D1) y 0,002mg/mL (D3). Es de hacer notar que el efecto de ambos

antibióticos antraciclínicos (ATC) sobre el crecimiento no sigue una relación proporcional. Esto ya había sido observado (Díaz, 1999) y se atribuyó al hecho de que los ATC pueden reaccionar con el ADN intercalándose o apilándose, dependiendo de la relación ATC/ADN y afectando el crecimiento de manera diferente.

X gal COMO MONITOR DE LA EXPRESIÓN Y REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO pUC19.

La mayoría de los vectores de la serie pUC poseen un segmento corto de ADN de *E. coli*. que contiene la secuencia reguladora y la información que codifica para los primeros 146 aminoácidos del gen β-galactosidasa (*lacZ*), en esta región codificadora está un sitio de policloneo que provoca una interpolación de un pequeño número de aminoácidos en el fragmento amino terminal de el gen β-galactosidasa.

En el vector pUC19 se expresa este fragmento amino terminal y muestra una α-complementación en células hospedadoras apropiadas. El genotipo de la cepa DH5α (Tabla N°3) tiene una región denominada φ80 *lacZDM15* que permite la α-complementación con el extremo amino terminal del gen β-galactosidasa en el vector pUC. La figura N°1 muestra el genotipo y mapa físico del vector pUC19, en él se destacan la zona de policloneo y el gen *lacZ*, regiones importantes de este vector.

En una α-complementación se eliminan mutantes del segmento operador-proximal del gen *lacZ* y son complementados por un mutante β-galactosidasa negativo que tiene una región operador-proximal intacta.

El resultado de una α-complementación se reconoce por el desarrollo de una coloración azul en las colonias en presencia de un sustrato cromogénico, 5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactosido (X-gal).

La inserción de un fragmento de ADN en el sitio de policloneo modifica el fragmento amino terminal, por lo tanto, no se producirá la α-complementación. Como resultado de esta ausencia se observan colonias de color blanco, (citado en Sambrook, 1989).

En el gráfico N° 2 se observa que **Doxorubicina** a concentración de 0,02 mg/mL (D2) y 0,002 mg/mL (D3) muestra un aumento en la intensidad del color azul indicando un efecto positivo sobre la expresión del plásmido pUC19 (α-complementación marcada).

En el gráfico N° 3 se observa que **4'epi Doxorubicina** presentó una tendencia a disminuir el color azul (Disminución α-complementación), indicando un efecto negativo sobre la expresión del plásmido pUC19 a las concentraciones 0,2 mg/mL (D1) y 0,002 mg/mL (D3).

GENOTIPO DE LA CEPA *E. coli* DH5 α
TABLA N°3

CEPA	GENOTIPO
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>SupE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>

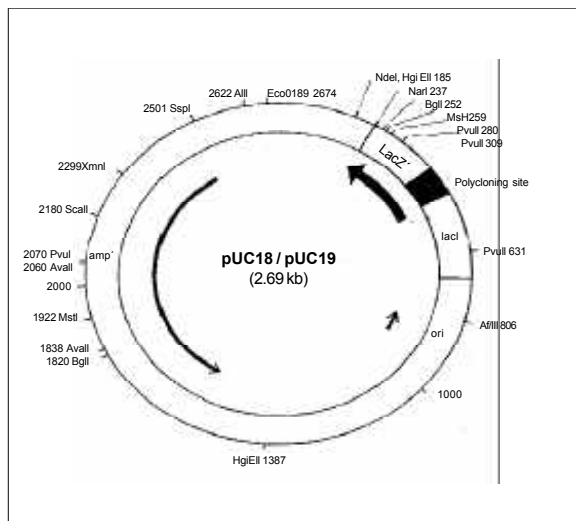


Figura N° 1
Mapa físico y genotipo del vector pUC19

CONCLUSIÓN

El efecto de los Antibióticos Antraciclínicos sobre el ADN y por lo tanto sobre el plásmido bacteriano es dependiente de una relación óptima de ADN – Antraciclina.

En este trabajo se puso en evidencia que ambos antibióticos ATC tienen un efecto negativo sobre la replicación del plásmido, la expresión del mismo es afectada positivamente en presencia de Doxorubicina (α -complementación marcada) y negativamente en presencia de 4'epi Doxorubicina (disminución α -complementación). Todo esto indica que 4'epi Doxorubicina afecta negativamente tanto la replicación como la expresión del plásmido. Esta característica puede ser aprovechada en el tratamiento de

enfermedades terminales producidas por infecciones bacterianas que presentan plásmidos de resistencia múltiple. En estos casos 4'epi Doxorubicina se utilizaría de forma sinérgica con otro antibiótico antibacteriano. Así, el antibiótico antraciclínico afectaría el plásmido bacteriano y el antibiótico antibacteriano produciría el efecto bactericida. Es importante señalar que la concentración de 4'epi Doxorubicina de 0,002mg/mL es ideal para este tipo de terapia, ya que afecta significativamente el plásmido bacteriano y en menor grado la célula del cuerpo humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Díaz, L. E. (1996). **Estudio del efecto de las Antraciclinas antibióticos intercaladores del ADN e inhibidores de la topoisomerasa II sobre enterobacterias.** Tesis de Postgrado, Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia. Instituto de Investigaciones. Laboratorio de Biotecnología. Mérida-Venezuela. p. 9 – 27.

Díaz, L. E. (1999). **Estudio del efecto de las Antraciclinas antibióticos intercaladores del ADN e inhibidores de la topoisomerasa II sobre enterobacterias.** Tesis de Postgrado, Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia. Instituto de Investigaciones. Laboratorio de Biotecnología. Mérida-Venezuela. P.9-27,176-178.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989) **Molecular cloning.** New York. Cold Spring harbor laboratory press. V1. p.1.13,1.85,1.86.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989) **Molecular cloning.** New York. Cold Spring harbor laboratory press. V3. p. A.10.

Silverman, R. (1992) **The organic chemistry of drug design and drug action.** San Diego. California. Academic Press, Inc. p.236-239.

Wang, J. Y.-T.; Chon, M. y Wang, A. H.-J. (1995) **Adduct of DNA anthracycline antibiotics. Structure, interaction and activities.** In Priebe Waldemar (ed.), Anthracycline antibiotics, ACS Symposium series T74, American Chemical Society, Washinton, D.C. p.168-169.