

Efecto diferencial de la 4'-epi-doxorubicina sobre plásmido y cromosoma en aislados de enterobacterias con resistencia a antibióticos β -lactámicos

LAPENNA M., ELISA A.; SÁNCHEZ G., RACELY E.; DÍAZ, L. E.; GRASSI, H. C.; MEDINA-RAMÍREZ, GERARDO; ANDRADES, EDJ.

Instituto de Investigaciones. Sección de Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Escuela de Farmacia. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela.

RESUMEN

La resistencia bacteriana a los antibióticos puede residir en el cromosoma y/o plásmidos; sin embargo, una bacteria puede modificar la resistencia por el uso de agentes tales como los intercaladores del ADN, entre los cuales están los antibióticos antraciclínicos. En este trabajo se evaluó el efecto de la 4'-epi-doxorubicina (4EPI) sobre los plásmidos de Enterobacterias nosocomiales con resistencia a la ampicilina (Amp). Tanto la Amp como la 4EPI mostraron un efecto variado sobre las cepas en estudio. Los resultados muestran que la metodología debe ser adaptada a cada microorganismo en estudio y el resultado más relevante fue el efecto negativo sobre el plásmido a las concentraciones 2 mg/mL y 0,00002 mg/ml de 4EPI para *Klebsiella pneumoniae* PIN147.

ABSTRACT

The antibiotic bacterial resistens is conferred for cromosoma and plasmids. However this characteristic could be lost for the treatment with a DNA intercalator, for example the antraciclins. In these paper the effect of the 4'-epi-doxorubicin over the plasmid founded in nosocomial enterobacteries has been evaluated. Ampicilin and 4'-epi-doxorubicin showed varied effects, for example in *K. pneumoniae* PIN147, 4'-epi-doxorubicin in two differents concentrations (2 mg/ml and 0,00002 mg/ml) exhibit a negative effect over the plasmid. The variety effect observed indicated that these methodology must be adapted to a each microorganism.

PALABRAS CLAVE

Resistencia bacteriana, plásmidos, curación, intercalación, Antraciclinas.

AGRADECIMIENTO

Se agradece al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes por el financiamiento recibido en el proyecto FA-299-02-03-F y a la Dra. Maria del Carmen Araque por haber cedido las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

INTRODUCCION

La resistencia bacteriana a los antibióticos puede residir tanto en el cromosoma como en unos elementos extracromosómicos denominados plásmidos (Koneman *et al.* 2001), los cuales pueden curarse. El "CURADO DE PLÁSMIDO" es un proceso mediante el cual un agente físico o químico hace que una bacteria modifique la resistencia a un antibiótico debido a la pérdida de información que codifica dicha resistencia (Achtman *et al.* 1977), (Willets *et al.* 1980). El concepto de intercalación fue introducido por Lerman en 1.964, quien postuló el modelo de intercalación mediante complejos ADN-Acrídina. Los antibióticos antraciclínicos, se caracterizan por presentar un grupo cromóforo tetrahydroantracenoquinonico, constituido por tres anillos hexagonales planos; así encontramos que el mecanismo de acción de estos antibióticos, se ha descrito como la intercalación en el ADN (Pigram *et al.* 1972). En 1.963, estudios realizados independientemente, por grupos de investigadores en Italia (Grein *et al.* 1963) y en Francia (Dubos *et al.* 1963), reportaron un antibiótico antraciclínico que mostró tener actividad antineoplásica contra tumores de animales al que denominaron daunorubicina (Di Marco *et al.* 1969). Se han preparado y estudiado cientos de derivados antraciclínicos, en busca de un derivado más efectivo y menos tóxico, unos de ellos es la 4EPI (Arlin *et al.* 1990), (Berman *et al.* 1991),

(Goodman *et al.* 1996). En ensayos anteriores este antibiótico, mostró un efecto negativo sobre la función del plásmido pUC19 presente en la cepa *Escherichia coli* DH5a (Díaz, 1999), (Colmenares *et al.* 2000) que junto a su alta efectividad y bajos efectos tóxicos se convirtió en el antibiótico de elección para estudiar su efecto en el Curado de plásmidos, presentes en bacterias patógenas nosocomiales que portan resistencia a antibióticos β -lactámicos (Amp).

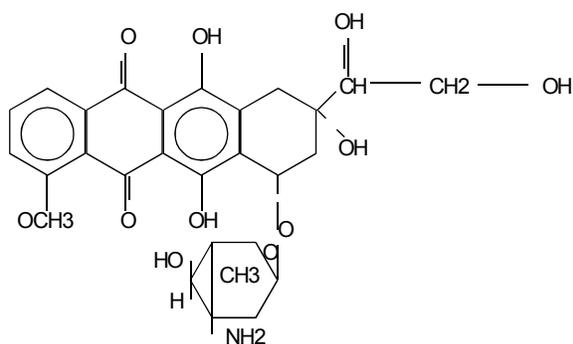


Figura 1
Estructura química de la 4'-epi-doxorubicina

OBJETIVO

Evaluar el efecto diferencial del antibiótico antraciclínico 4EPI sobre plásmido y cromosoma en las siguientes cepas: *K. pneumoniae* PIN147, *K. pneumoniae* PIN240, *K. pneumoniae* pAM/103 y *Proteus mirabilis* pAM/83, proveniente de aislados nosocomiales.

MATERIALES

I.- Material Biológico:

— *K. pneumoniae* pAM/103:

Fenotipo: lactosa⁺, ampicilina^r, cefalotina^r y carbenicilina^r.

— *K. pneumoniae* PIN147:

Fenotipo: ampicilina sulbactam^s, gentamicina^s, akamicina^s, imipenem^s, cefoxitina^s, cefotaxima^r y azitromicina^r.

— *K. pneumoniae* PIN240:

Fenotipo: ampicilina sulbactam^r, gentamicina^s, akamicina^s, imipenem^s, cefoxitina^s, cefotaxima^r y azitromicina^r.

— *P. mirabilis* pAM/83:

Fenotipo: lactosa⁻, ampicilina^r, cefalotina^r y carbenicilina^r.

II.- Antibióticos:

— Presión selectiva:

Ampicilina: AMP

Concentración de trabajo: 100 μ g/ml.

— Antibiótico de ensayo:

4'-epi-doxorubicina

Solución Patrón: 2mg/ml.

METODOLOGÍA

I.- Evaluación del efecto de la Amp sobre el crecimiento de las cepas bacterianas: *K. pneumoniae* pAM103, *K. pneumoniae* PIN147, *K. pneumoniae* PIN240 y *P. mirabilis* pAM83: Se preparó un preinóculo de cada microorganismo en 1ml Caldo Tripticasa Soya con Amp (100 μ g/ml) y se incubaron por 24 horas a 37°C. Se inocularon 3ml de Caldo Tripticasa Soya teniendo Amp, con 300 μ l de preinóculo y se incubaron a 37°C con agitación, haciendo lecturas espectrofotométricas a una longitud de onda de 600nm cada treinta minutos hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO) de 0,5. A partir de este cultivo se realizaron diluciones sucesivas 1:10 en NaCl 0.8% para cada microorganismo, en un rango de 10⁻¹ a 10⁻⁷. Partiendo de la dilución óptima de trabajo (aquella en la que se obtienen colonias contables de cada cepa) se sembraron 3 μ l, seis veces cada una, con asa calibrada en dos placas de Agar Tripticasa Soya (1 placa +AMP y 1 placa -AMP), posteriormente fueron incubados a 37°C por 24 horas. Al término de este tiempo se realizó el conteo de las UFC en cada placa (Colmenares *et al.* 2000).

II.- Determinación del efecto diferencial de la 4EPI, a concentraciones seriadas, sobre el plásmido de las cepas: *K. pneumoniae* pAM103, *K. pneumoniae* PIN147, *K. pneumoniae* PIN240 y *Proteus mirabilis* pAM83: Se utilizó la Amp como presión selectiva tomando en cuenta las mismas consideraciones del ensayo anterior. El efecto de la 4EPI sobre el plásmido, fue medido, siguiendo la metodología antes descrita con las siguientes modificaciones: a partir de una concentración madre de 2mg/ml del antibiótico 4EPI se realizaron 5 diluciones seriadas 1:10 en agua destilada, que corresponden a las siguientes concentraciones: 0,2 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,002 mg/ml, 0,0002 mg/ml y 0,00002 mg/ml, de las cuales se colocaron 5 μ l, sobre cada gota de suspensión bacteriana previamente sembrada. Las placas se incubaron en estufa a 37°C por 24 horas (Colmenares *et al.* 2000).

CRITERIOS PARA EL ANÁLISIS

I.- EFECTO DE LA AMP SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO

a. Un crecimiento igual de UFC en placas con y sin Amp implica que la concentración de Amp es menor que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Amp (128 μ g/ml) referida para la β -lactamasa de origen cromosomal (Araque *et al.* 1997); en consecuencia es suficiente con la expresión de esta enzima para que se manifieste la resistencia bacteriana. En este caso no podemos medir el efecto sobre plásmido y cromosoma.

b. Un crecimiento menor de UFC en placas con Amp con respecto a placas sin Amp implica que la concentración de Amp es mayor que la CMI de Amp referida para la β -lactamasa de origen cromosomal (Araque *et al.* 1997); en consecuencia la resistencia se manifiesta a expensas de la expresión de la β -lactamasa de origen plasmídico. En este caso podemos medir el efecto sobre plásmido y cromosoma.

II.- EFECTO DIFERENCIAL DE LA 4'-EPI-DOXORUBICINA SOBRE PLÁSMIDO Y CROMOSOMA

Tomando en consideración que la concentración de Amp es mayor de 128 μ g/ml, suficiente para inducir la expresión del plásmido, manifestándose la resistencia a la ampicilina, establecimos lo siguiente:

a. Un crecimiento igual de UFC en placas con y sin Amp (presión selectiva), más 4EPI; implica un mayor efecto (intercalación) sobre el cromosoma, sin poderse apreciar la expresión del plásmido.

b. Un crecimiento diferente de UFC en placas con y sin Amp (presión selectiva), más 4EPI; implica un mayor efecto (intercalación) sobre plásmido, observándose interferencia en la expresión del mismo (Colmenares *et al.* 2000).

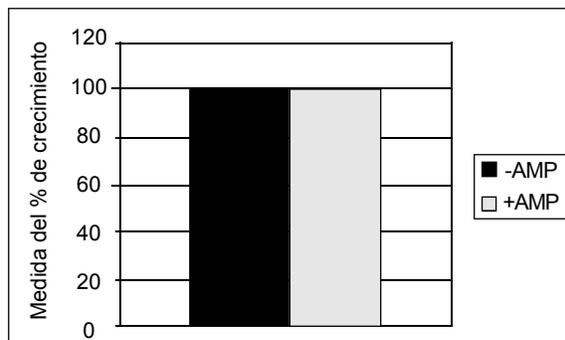
b.1. Un crecimiento de UFC mayor en placas con ampicilina más 4EPI que en placas sin ampicilina más 4EPI; implica un efecto positivo sobre el plásmido, es decir, que la suma de los dos antibióticos potencian la expresión del plásmido.

b.2. Un crecimiento de UFC menor en placas con ampicilina más 4EPI que en placas sin ampicilina más 4EPI; implica un efecto negativo sobre el plásmido, es decir, que la β -lactamasa no protege a la bacteria contra la ampicilina.

b.3. Llamamos efecto sinérgico a la adición de los efectos del antibiótico de ensayo (4EPI) y del antibiótico que representa la presión selectiva

(ampicilina) sobre el crecimiento de la cepa, en positivo (mayor crecimiento que el control sin ampicilina) o en negativo (menor crecimiento que el control sin ampicilina).

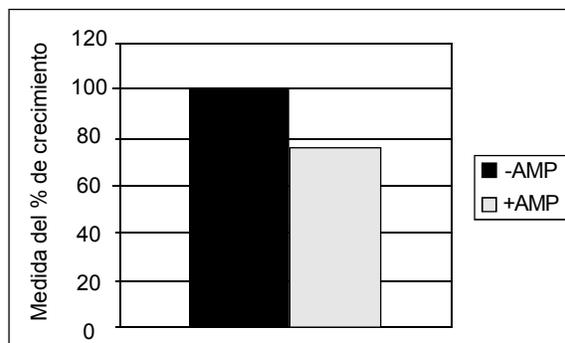
RESULTADOS



— AMP: sin ampicilina; +AMP: con ampicilina

Gráfico 1. Efecto de la AMP sobre la cepa *K. pneumoniae* pAM103 y *K. pneumoniae* PIN240 (Valor Observado)

Se observa un crecimiento igual de la cepa *K. pneumoniae* pAM103 y PIN240 en presencia y ausencia de Amp. Según los criterios para el análisis, no se puede medir el efecto sobre el plásmido y/o cromosoma, en estas cepas.



— AMP: sin ampicilina; +AMP: con ampicilina

Gráfico 2. Efecto de la AMP sobre la cepa *K. pneumoniae* PIN147

Se observa un crecimiento menor de la cepa *K. pneumoniae* PIN147 en presencia de Amp con respecto al crecimiento de la cepa en ausencia de la misma. En consecuencia, la Amp en este ensayo mostró un efecto inhibitorio del crecimiento de la cepa de 24%. De acuerdo a los criterios establecidos para el análisis, se puede medir el efecto diferencial sobre el plásmido y cromosoma.

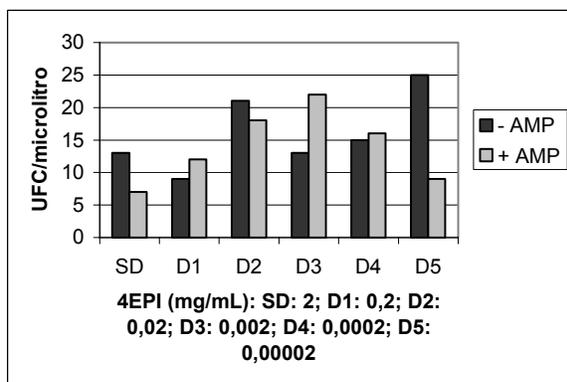


Gráfico 3. Efecto de la 4EPI a concentraciones seriadas sobre el plásmido de la cepa *K. pneumoniae* PIN147

Con base en los criterios para el análisis, se encontró que a las concentraciones 2 mg/ml (SD) y 0,00002 mg/ml (D5), la 4EPI ejerció un efecto plasmídico sobre la cepa, por el crecimiento diferencial observado entre las placas con y sin Amp.

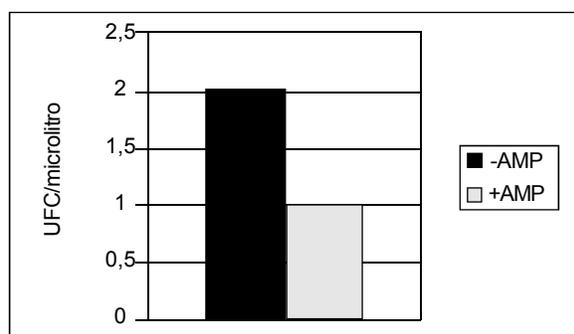


Gráfico 4. Efecto de la AMP sobre la cepa *P. mirabilis* pAM83

La Amp mostró un efecto inhibitorio del crecimiento de la cepa de 50%. De acuerdo a los criterios establecidos para el análisis, se puede medir el efecto diferencial sobre el plásmido y cromosoma.

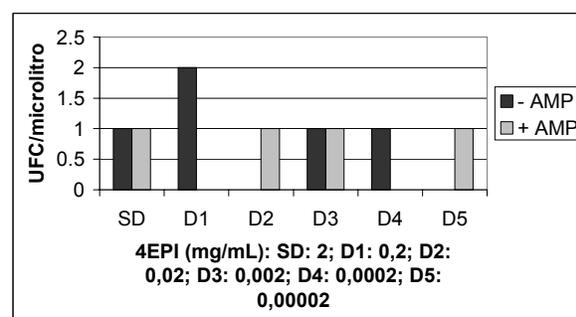


Gráfico 5. Efecto de la 4EPI a concentraciones seriadas sobre el plásmido la cepa *P. mirabilis* pAM83

Se observó un crecimiento diferencial entre placas con y sin AMP, en presencia de 4EPI; sin embargo, no se obtuvieron valores estadísticamente significativos que demuestren efecto alguno sobre el plásmido de esta cepa.

**Tabla 1
EFECTO DIFERENCIAL DE LA 4EPI SOBRE PLÁSMIDO Y CROMOSOMA DE LAS CEPAS *K. pneumoniae* pAM103, *K. pneumoniae* PIN147, *K. pneumoniae* PIN240 y *P. mirabilis* pAM83**

C.	CEPAS BACTERIANAS											
	<i>K. pneumoniae</i> pAM103			<i>K. pneumoniae</i> PIN147			<i>K. pneumoniae</i> PIN240			<i>K. pneumoniae</i> PIN147		
	EFFECTO CROMOSOMA	EFFECTO PLÁSMIDO	EFFECTO CROMOSOMA	EFFECTO PLÁSMIDO	EFFECTO CROMOSOMA	EFFECTO PLÁSMIDO	EFFECTO CROMOSOMA	EFFECTO PLÁSMIDO	EFFECTO CROMOSOMA	EFFECTO PLÁSMIDO		
EPI	-AMP	+AMP	+AMP	-AMP	+AMP	+AMP	-AMP	+AMP	+AMP	-AMP	+AMP	+AMP
SD	-	+	ND	-	-	-	+	-	ND	-	NE	NE
D1	+	NE	ND	-	-	+	-	NE	ND	-	+	-
D2	NE	+	ND	+	NE	NE	-	-	ND	-	-	+
D3	+	-	ND	-	+	+	-	-	ND	-	NE	NE
D4	-	-	ND	NE	NE	NE	+	-	ND	-	-	-
D5	-	+	ND	+	-	-	NE	-	ND	-	-	+

-AMP: sin ampicilina, +AMP: con ampicilina, C: EPI: concentración de 4EPI, SD: 2mg/mL, D1: 0,2mg/mL, D2: 0,02mg/mL, D3: 0,002mg/mL, D4: 0,0002mg/mL, D5: 0,00002mg/mL, ND: no determinado NE: no se observó efecto; +: mayor crecimiento; -: menor crecimiento (Ver criterios para el análisis).

De los microorganismos estudiados, la cepa que arrojó mejores resultados fue la *K. pneumoniae* PIN147, en la cual se logró observar un efecto (intercalación) negativo sobre el plásmido a la menor concentración de 4EPI (0,00002 mg/ml). Mientras que en las cepas *K. pneumoniae* pAM103, PIN240 y *P. mirabilis* pAM83 no se pudo determinar el efecto diferencial sobre plásmido y/o cromosoma, a pesar de que la Amp, mostró un efecto inhibitorio del crecimiento sobre la cepa *P. mirabilis* pAM83.

CONCLUSIONES

1.- El método utilizado para el análisis debe ser adaptado a cada microorganismo en estudio; verificando principalmente el medio de cultivo y las condiciones óptimas de: dilución bacteriana y concentración de antibiótico utilizado como presión selectiva para lograr la expresión del plásmido.

2.- *K. pneumoniae* PIN147:

La Amp mostró un efecto inhibitorio del 24% sobre el crecimiento de esta cepa. Mientras que la 4EPI a la concentración de 2 y 0,00002 mg/ml mostró un efecto (intercalación) negativo sobre el plásmido de esta cepa, siendo esta última la concentración ideal para modificar la resistencia mediada por el plásmido.

3.- *K. pneumoniae* pAM103 y PIN240:

La Amp no ejerció ningún efecto sobre el crecimiento de ambas cepas. No se pudo medir el efecto diferencial sobre el plásmido y/o cromosoma, ya que la concentración de Amp no fue suficiente para inducir la expresión del plásmido.

4.- *P. mirabilis* pAM83:

El método no fue apropiado para evaluar el efecto de la 4EPI sobre la cepa *P. mirabilis* pAM83; ya que, no se obtuvieron valores estadísticamente significativos que demuestren efecto alguno sobre el plásmido de esta cepa.

5.- El efecto plasmídico es independiente del efecto cromosoma y viceversa, lo cual indica que el antibiótico (4EPI) puede intercalarse en plásmido y/o cromosoma; siendo este último dependiente de la concentración de 4EPI.

BIBLIOGRAFIA

Achtman, M., G. and R. Skurray. 1977. **A redefinition of the mating phenomenon in bacteria.** In J. L. Reissig (Ed.): Microbial Interactions, Receptors, and Recognition, Ser. B. V3. Chapman and Hall. London. 233-279

Araque M., Nieves B., Ruiz O., Dagert M. 1997. **Caracterización de plásmidos que median la resistencia a múltiples antibióticos en bacterias gramnegativas de origen nosocomial.** Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Venez. Vol. 15: 299-305.

Arlin, Z., Case, D.C. Jr., Moore, J., Wiernik, P.H., Feldman, E., Saletan, S., Desai, P., Sia, L., and Cartwright, K. 1990. **Randomized multicenter trial of cytosine arabinoside with mitoxantrone or daunorubicin in previously untreated adult patients with acute nonlymphocyte leukemia (ANLL).** Leukemia. EEUU. Vol. 4: 177-183.

Berman, E., Séller, G., Santorsa, J., McKenzie, S., Gee, T., Kempin, S., Gulati, S., Andreeff, M., Koltz, J., Gabrilove, J., Reich, L., Mayer, K., Keefe, D., Trinor, K., Schluger, A., Penenberg, D., Raymond, V., O'Reilly, R., Jhanwar, S., Young, C., and Clarkson, B. 1991. **Result of a randomized trial comparing idarubicin and**

cytosine with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. Blood. EEUU. Vol. 77: 1666-1674.

Colmenares M, Patiño A. 2000. **Estandarización del Método para medir el Efecto Diferencial de los Antibióticos Antraciclínicos, Doxorubicina, Daunorubicina y 4'-epi Doxorubicina sobre Plásmido y Cromosoma Bacteriano *in vivo*.** Tesis de grado para optar al título en Licenciado en Bioanálisis. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela. P1-74.

Díaz, L. 1999. **Estudio del Efecto de las Antraciclinas. Antibióticos Intercaladores del ADN e Inhibidores de la Topoisomerasa II Sobre Enterobacterias.** Trabajo de grado para optar al título de Magíster Scientiae. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela. P1-190.

Di Marco, A., Gaetani, M., Scarpitano, B. 1969. **Adriamycin a new antibiotic with antitumor activity.** Cancer Chemotherapy Report. London. (Part I). Vol. 533:33-37.

Dubost, M, Ganter, P., Maral, R., Ninet, I. 1963. **Un nouvel antibiotique á propriétés Cytostatiques: Rubidomycine.** C.R. Academie de Sciences. Paris. (257): 1813-1815.

Goodman Gilman. 1996. **Las bases farmacológicas de la terapéutica.** 9ª Edición. Vol II. McGraw-Hill Interamericana, pp 1145.

Grein, A., Spalla, C., Di Marco, A and Canevazzi, G. 1963. **Descrizione e Classificazione di un attinomicete (*Streptomyces peucetius sp nova*) produttore di una sostanza ad attività antitumorale: La caunomicina.** G. Microbiol. Italia. Vol. 11: 109-118.

Koneman, Elmer; Allen, Stephen; Schreckenberger, Paul; Win, Washington. 2001. **Diagnóstico Microbiológico.** 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana, pp 765.

Pigram WJ. Fuller W. Hamilton LD. 1972. **Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA.** Nature New Biology. EEUU. Vol. 235: 17-19

Willets, N., and R. Skurray. 1980. **The conjugation system of F-like plasmids.** Ann. Rev. Genet. London. Vol. 14: 41-76.