

Rolliniastatina-2, molécula aislada de *Annona macrophyllata* Donn. Sm. (Annonaceae) inhibe protoplastos de bacterias

Lorena Mercedes Luna-Cazáres^{1*}

Alma Rosa González-Esquinca¹

¹Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Libramiento Norte-Poniente No. 1150. Colonia Lajas Maciel. C.P. 29039. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. E-mail: *lorena.luna@unicach.mx

RESUMEN

Se evaluó la toxicidad de la acetogenina rolliniastatina-2 (bullatacina) sobre protoplastos (bacterias sin pared celular) obtenidos de las cepas Grampositivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Los resultados obtenidos indican un mayor efecto sobre los protoplastos de *S. aureus* a los 10 y 30 minutos de exposición, la acetogenina también afectó a *B. subtilis* y *S. epidermidis* con la menor concentración solo a los 10 minutos de exposición. La toxicidad de la rolliniastatina-2 sobre las bacterias libres de pared puso en evidencia que las membranas citoplasmáticas son sensibles a su acción biológica.

Palabras clave: acetogenina de anonácea, Complejo I, bacterias Grampositivas, rolliniastatina-2, protoplastos

ABSTRACT

Acetogenin rolliniastatin-2 (bullatacin) toxicity on protoplasts (bacteria without cell wall) derived from Gram-positive *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* strains was evaluated. The results showed a greater effect on protoplasts of *S. aureus* at 10 and 30 minutes of exposure, the acetogenin also affected *B. subtilis* and *S. epidermidis* protoplasts with the lowest concentration only 10 minutes of exposure. Rolliniastatin-2 toxicity on wall free bacteria revealed that the cytoplasmic membranes are sensitive to their action biological.

Keywords: anonaceous acetogenin, Complex I, Grampositive bacteria, rolliniastatin-2, protoplasts

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos cosmopolitas, microscópicos y unicelulares, pueden ser móviles o inmóviles, aerobias o anaerobias. Las células individuales tienen diferentes morfología y capacidad de agruparse. Son procariotas con una “cubierta” constituida por pared celular, membrana citoplasmática y en ocasiones cápsula de secreción (Parés y Juárez, 1997). La pared bacteriana es permeable a la sal y a muchas sustancias de bajo peso molecular. La tinción diferencial de Gram las divide en Gramnegativas y Grampositivas, las primeras se tiñen con safranina y las segundas con cristal violeta. Esta coloración es un criterio de clasificación importante correlacionable con otras propiedades bacterianas.

Las bacterias Grampositivas tienen una capa gruesa del peptidoglucano unido a ácidos teicoicos que forman la pared. En muchas bacterias la red de mureína (peptidoglucano) está muy desarrollada, llegando a tener hasta 40

capas (Raisman, 2005). Esta envoltura externa restringe el acceso a la membrana citoplasmática, estructura estructural ya que en el caso de las bacterias aerobias, en ella se encuentran las enzimas de la cadena respiratoria, la que es bastante similar a la de las mitocondrias (Kita *et al.*, 1989; Parés y Juárez, 1997; Voet *et al.*, 2006), lo que no es sorprendente ya que una de las teorías evolutivas indica la factibilidad de que los ancestros de las bacterias aeróbicas dieron lugar a las mitocondrias.

Friedrich y Scheide (2000) señalan que existen homólogos del Complejo I no sólo en bacterias sino también en arqueobacterias, cloroplastos de plantas y la mayoría de eucariotas. La homología de secuencias, función y grupo prostético señalan un ancestro común. Hirst (2005) señala que todos los Complejos I tienen en común 14 subunidades, este núcleo de subunidades es considerado suficiente para la transducción de energía. Aunque de manera general, hasta hoy el de las bacterias es mucho más pequeño y simple, generalmente constituido

por 14 subunidades (Marreiros *et al.*, 2014), además de menos conocido que el de la mitocondria (de 44 o más subunidades) (Vartak *et al.*, 2014) (figura 1).

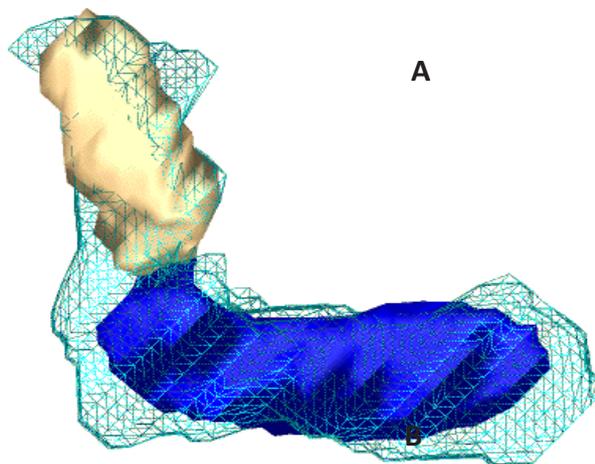


FIGURA 1

Reconstrucción electromicroscópica del Complejo I (NADH: Ubiquinona óxido-reductasa). A, Bacteriano; B, Mitocondrial (Hofhaus *et al.*, 1991)

Debido a que en la actualidad muchas de las bacterias que causan padecimientos infecciosos se han vuelto multirresistentes a los antibióticos o de sensibilidad reducida a los mismos, es importante evaluar nuevos compuestos obtenidos de plantas, entre ellos están las acetogeninas (ACG) de anónáceas, en este caso particular se trata de rolliniastatina-2.

Estas moléculas obtenidas de diversas estructuras botánicas de diferentes especies de la familia Annonaceae son metabolitos citotóxicos con efecto antimicrobiano, antihelmíntico, antivírico, entre otros, se han estudiado con relación a la actividad biológica en células cancerosas de distintos tipos, así como su efecto insecticida, antiparasitario y antialimentario. Además, esta es una de las más potentes sobre el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial de acuerdo a diferentes investigaciones realizadas sobre mitocondrias de insectos, de bovino, de pollo y ratón, también sobre partículas submitocondriales (PSM) de corazón de bovino (Londershausen *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1993; Tormo *et al.*, 1999; Miyoshi, 2005).

El efecto que esta ACG presenta sobre diversos modelos biológicos en concentraciones muy bajas, justifican el hecho de ser señalada como una de las más potentes inhibidoras del Complejo I, aún más potente que rotenona, el clásico inhibidor del Complejo I mitocondrial. Pero en pocos trabajos se ha determinado su acción sobre

bacterias y, todavía más escasas son las investigaciones sobre la actividad de las ACG en bacterias Grampositivas sin pared celular (protoplastos).

Valorar el efecto de las ACG sobre protoplastos es importante debido que tanto la membrana citoplasmática como los mesosomas, en donde se encuentra la enzima NADH: Ubiquinona óxido-reductasa (NADH deshidrogenasa, también llamada Complejo I), quedan expuestos a cualquier sustancia disuelta en el medio en que estos se encuentren y, por tanto, valorar el efecto sobre la enzima.

Las evidencias experimentales señalan la acción de las ACG sobre el transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial, con acción específica sobre la NADH: Ubiquinona óxido-reductasa de manera similar a como lo hacen los inhibidores clásicos como la rotenona y la piericidina A (Londershausen *et al.*, 1991; Degli Esposti *et al.*, 1994; Guadaño *et al.*, 2000; Tormo *et al.*, 2003; Chahbourne *et al.*, 2006). Por ello, el propósito de este trabajo fue el de evaluar la toxicidad de la rolliniastatina-2 aislada de semillas de *Annona macrophyllata* Donn. Sm. sobre los protoplastos de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

METODOLOGÍA

Recolección del material vegetal

Se obtuvieron semillas de frutos maduros de *A. macrophyllata* (papaua) provenientes de la Delegación de Copoya, municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Éstas se secaron a la sombra y temperatura ambiente en el laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH).

Obtención del compuesto puro

Se separó la testa del endospermo, este último se molió hasta obtener un polvo fino, este material se extrajo con hexano en un equipo soxhlet por ocho horas tres veces. El extracto se concentró por destilación al vacío en un rotaevaporador. El extracto formó un precipitado que se filtró y se fraccionó en una columna abierta que se eluyó con una mezcla de disolventes con gradientes de polaridad creciente, y se obtuvieron 65 fracciones. La fracción S4 presentó un precipitado que se filtró y recristalizó varias veces para su purificación y posterior elucidación estructural.

Obtención de protoplastos y evaluación biológica

Los protoplastos se obtuvieron de cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y

Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228) provenientes del Cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, se prepararon usando el método de Padilla *et al.* (2002) utilizando lisozima (Sigma®) y el ensayo de toxicidad de la ACG frente a los protoplastos de acuerdo a los métodos de Abriouel *et al.* (1998) y Codling *et al.* (2003). Se ensayaron concentraciones de 0.00160 nmol.mL⁻¹ (1 ng.mL⁻¹), 0.00643 nmol.mL⁻¹ (4 ng.mL⁻¹), 0.02572 nmol.mL⁻¹ (16 ng.mL⁻¹) y 0.10286 nmol.mL⁻¹ (64 ng.mL⁻¹) de la acetogenina frente a inóculos de las tres cepas bacterianas con absorbancia desde 0.35 hasta 625 nm durante 30 minutos de exposición, todas las pruebas se hicieron por duplicado.

El porcentaje de inhibición se determinó con relación al control (protoplastos) sin compuesto y corresponde al promedio de dos repeticiones. Todos los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto obtenido (15 mg) con punto de fusión de 69 a 71°C, fue identificado por el doctor Diego Cortés Martínez del Departamento de Farmacología, Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad de Valencia, España como rolliniastatina-2 (figura 2).

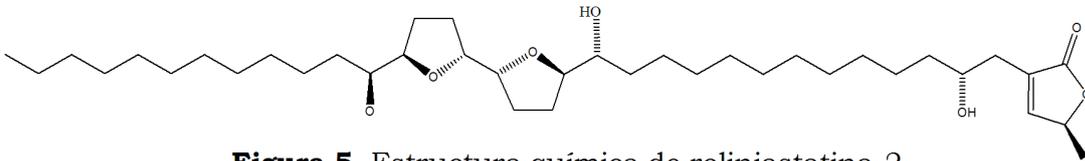


Figura 5. Estructura química de rolliniastatina-2

FIGURA 2

Estructura de rolliniastatina-2 o bullatacina

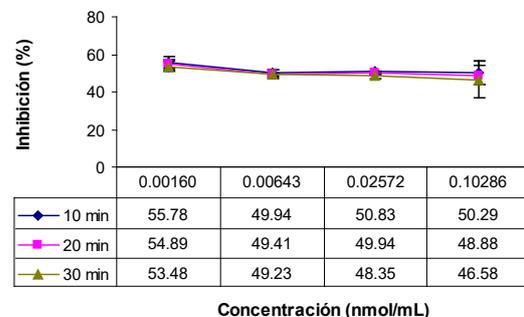
La eliminación de la pared celular de las cepas Grampositivas deja al protoplasma de las bacterias rodeado únicamente por la membrana celular (protoplasto), lo que convierte a la bacteria en un microorganismo extraordinariamente sensible (Raisman, 2005). La acción inhibitoria de rolliniastatina-2 se evaluó en tres tipos de protoplastos utilizando cuatro concentraciones diferentes durante 30 minutos de exposición, destacando que en ellos la mayor inhibición se produce en los primeros 10 minutos con la menor concentración (0.00160 nmol.mL⁻¹ = 1 ng.mL⁻¹), excepto en *S. aureus*.

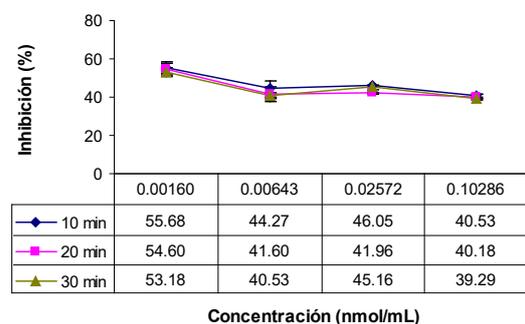
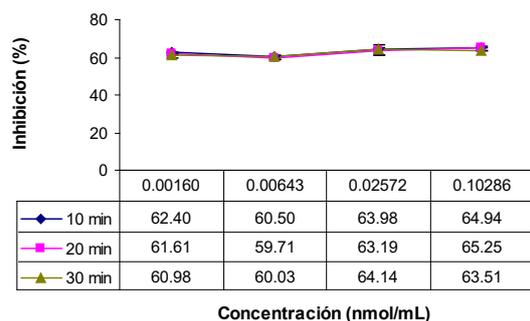
El efecto de la rolliniastatina-2 en *B. subtilis* en los primeros 10 minutos presenta un máximo inhibitorio del 55.78% con la menor concentración nmol.mL⁻¹ (pero disminuye ligeramente conforme se incrementa la concentración y el tiempo (gráfica 1A), mientras que el efecto es mayor sobre los protoplastos de *S. aureus* debido a que la inhibición aumenta del 62.40% en los primeros 10 minutos de exposición al 64.94% de acuerdo al aumento de la concentración, sin embargo no hay tiempo ni concentración dependencia (gráfica 1B); mientras que, también en *S. epidermidis* el efecto es mayor a los 10 minutos de exposición (0.00160 nmol.mL⁻¹ = 55.68%) para después tener un ligero decremento al aumentar la concentración y el tiempo (gráfica 1C).

El análisis estadístico de ANDEVA y de muestras pareadas al 95% de confiabilidad a los 10 minutos de ex-

posición no revela diferencias significativas en la actividad de la ACG. Es decir, en los protoplastos de *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. epidermidis* el efecto de la ACG fue independiente de la concentración y del tiempo de exposición.

Los resultados obtenidos con los protoplastos de *B. subtilis* y *S. epidermidis*, en los que el mayor valor de inhibición se obtuvo con la menor concentración, coincide con el reporte de Teuber (1969) cuando utilizó polimixina B sobre *Proteus mirabilis* resistente al antibiótico, al que le eliminó la pared celular, la mayor actividad la obtuvo con las dosis más bajas probadas.





GRAFICA 1

Efecto de la rolliniastatina-2 sobre protoplastos de bacterias Grampositivas. A, *B. subtilis*; B, *S. aureus*; C, *S. epidermidis*.

LITERATURA CITADA

- ABRIOUEL, H.E., A. VALDIVIA, A. GÁLVEZ & M. MAQUEDA, 1998.** Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 Spheroplast and Permeabilized Cells to the Bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4623-4626.
- CHAHBOUNE, N., I. BARRACHINA, I. ROYO, V. ROMERO, J. SÁEZ, J.R. TORMO, N. DE PEDRO, E. ESTORNELL, M.C. ZAFRA-POLO, F. PELÁEZ & D. CORTES, 2006.** Guanacetins, New Antitumoracetogenins, Mitochondrial Complex I and Tumor Cell Growth Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (4): 1089-1094.
- CODLING, C.E., J.Y. MAILLARD & A.D. RUSSELL, 2003.** Aspects of Antimicrobial Mechanisms of Action of a Polyquaternium and an Amidoamine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 1153-1158.
- DEGLI ESPOSTI, M., A. GHELLI, M. RATTI, M., D. CORTES & E. ESTORNELL, 1994.** Natural Substances (acetogenins) from the Family Annonaceae are Powerful Inhibitors of Mitochondrial NADH Dehydrogenase (Complex I). *Biochemical Journal* 301: 161-167.
- FRIEDRICH, T. & D. SCHEIDE, 2000.** The Respiratory Complex I of Bacteria, Archae and Eucarya and its Module Common with Membrane-Bound Multisubunit Hydrogenases. *FEBS Letters* 479: 1-5.

Los resultados obtenidos con los protoplastos bacterianos coinciden con lo que reportan Gumpert *et al.* (1982) al señalar que representan un sistema de ensayo adecuado y eficaz para detectar sustancias activas y para obtener más información acerca de su modo de acción. Ello debido a que la rolliniastatina-2 tuvo efecto inhibitorio sobre bacterias libres de pared a diferencia de lo reportado por Riley Saldaña (2007) con bacterias completas y la misma acetogenina.

CONCLUSIONES

La rolliniastatina-2, tiene efecto inhibitorio sobre las tres bacterias ensayadas.

El porcentaje de inhibición es variable de acuerdo a la especie bacteriana.

Despliega un potente efecto en concentraciones micromolares.

Los resultados sugieren que al igual que en otros sistemas biológicos, el sitio blanco de la rolliniastatina-2 es el Complejo I bacteriano.

Este es el primer reporte en el que se investiga la actividad de ACG sobre protoplastos aportando las primeras evidencias que la pared celular de las bacterias constituye una barrera que impide la interacción de la ACG con el sitio blanco en las bacterias.

- GUADAÑO, A., C. GUTIÉRREZ, E. DE LA PEÑA, D. CORTES & A. GONZÁLEZ-COLOMA, 2000.** Insecticidal and Mutagenic Evaluation of Two Annonaceous Acetogenins. *Journal of Natural Products* 63: 773-776.
- GUMPERT, J., K. DORNBERGER & T.H. SMITH, 1982. Antimicrobial Activities of Daunorubicin and Adriamycin Derivatives on Bacterial and Protoplast Type L-Form Cells of *Bacillus subtilis* 170, *Escherichia coli* B, and *Proteus mirabilis* VI. Structure-activity relationship. *Z Allg Mikrobiol* 22 (10): 687-692.
- HIRST, J., 2005.** Energy Transduction by Respiratory Complex I—an Evaluation of Current Knowledge. *Biochemical Society Transactions* 33 (3): 525-529.
- HOFHAUS, G., H. WEISS & K. LEONARD, 1991.** Electron Microscopic Analysis of the Peripheral and Membrane Parts of Mitochondrial NADH Dehydrogenase (complex I). *Journal of Molecular Biology* 221: 1027-1043.
- KITA, K., R.C.T. VIBAT, S. MEINHARDT, J.R. GUEST & R.B. GENNIS, 1989.** One-Step Purification from *Escherichia Coli* of Complex II (Succinate:ubiquinoneoxidoreductase) Associated with Succinate-Reducible Cytochrome b556. *Journal of Biological Chemistry* 264 (5): 2672-2677.
- LEWIS, M.A., J.T. ARNASON, B.J.R. PHILOGENE, J.K. RUPPRECHT & J.L. MCLAUGHLIN, 1993.** Inhibition of Respiration at Site I by Asimicin, an Insecticidal Acetogenin of the Paw Paw, *Asiminatoriloba* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 45: 15-23.
- LONDERSHAUSEN, M., W. LEICHT, F. LIEB, H. MOESCHLER & H. WEISS, 1991.** Molecular Mode of Action of Annoninas. *Journal of Pest Science* 33 (4): 427-433.
- MARREIROS, B.C., A.P. BATISTA & M.M. PEREIRA, 2014. Respiratory Complex I from *Escherichia coli* does not Transport Na⁺ in the Absence of its NuoL Subunit. *FEBS Letters* 588 (23): 4520-4525.
- MIYOSHI, H., 2005.** Inhibitors of Mitochondrial Respiratory Enzymes. *Journal of Pest Science* 30 (2): 120-121.
- PADILLA, C., O. LOBOS, P. BREVIS, P. ABACA & E. HUBERT, 2002.** Effects of the Bacteriocin PsVP-10 produced by *Pseudomonas* sp. on Sensitive Bacterial Strains. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 44 (1): 19-23.
- PARÉS-JUÁREZ, A.R., 1997.** *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté. España. Pp. 182, 183, 187.
- RAISMAN, J.S., 2005.** *La pared bacteriana*. Hipertextos del área de Biología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad del Nordeste. Corrientes, República Argentina. [en línea] <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro4.htm> (Consulta: 23-agosto-2016).
- RILEY-SALDAÑA, C.A., 2007.** *Actividad citotóxica y antibacteriana de Annona diversifolia Saff.* Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. 82 p.
- TEUBER, M., 1969.** Susceptibility to Spolimixin B of Penicillin G-Induced *Proteus mirabilis* L forms and Spheroplasts. *Journal of Bacteriology* 98 (2): 347-350.
- TORMO, J.R., M.C. GONZÁLEZ, D. CORTÉS & E. ESTORNELL, 1999.** Kinetic Characterization of Mitochondrial Complex I in Inhibitors Using Annonaceous Acetogenins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369 (1): 119-126.

TORMO, J. R., I. ROYO, T. GALLARDO, M.C. ZAFRA-POLO, P. HERNÁNDEZ, D. CORTES, D. & F. PELÁEZ, 2003. In Vitro Antitumor Structure-Activity Relationships of the Threo/Trans/Threo Mono-tetrahydrofuranic Acetogenins: Correlations with their Inhibition of Mitochondrial Complex I. *Oncology Research* 14 (3): 147-154.

VARTAK, R.S., M.K. SEMWAL & Y. BAI, 2014. An Update on Complex I Assembly: the Assembly of Players. *Journal Bioenergetics and Biomembrane* 46 (4): 323-328.

VOET, D., J.G. VOET & C.W. PRATT, 2006. *Fundamentos de bioquímica*. 2a edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pp. 551, 553.