

TRABAJOS ORIGINALES

La neomicina y bacitracina disminuyen la permeabilidad intestinal en ratones e incrementan la expresión de algunas proteínas de unión estrecha

Rebeca Nevado¹, Raquel Forcén¹, Elena Layunta¹, María Divina Murillo^{1,2} y Laura Grasa^{1,2,3}

¹Departamento de Farmacología y Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. ²Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS).

³Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2) (Universidad de Zaragoza-CITA). Zaragoza

RESUMEN

Antecedentes: las proteínas de unión estrecha (UE) regulan la permeabilidad paracelular. La permeabilidad intestinal puede estar modulada por la microbiota comensal. Las manipulaciones de la microbiota intestinal con antibióticos como la bacitracina y neomicina han resultado ser útiles para el tratamiento de la diarrea inducida por *Clostridium difficile* o los fármacos quimioterápicos.

Objetivos: evaluar los efectos de la depleción de la microbiota mediante la administración oral de bacitracina y neomicina sobre la permeabilidad intestinal y la expresión de las proteínas de UE en ratón.

Métodos: los ratones recibieron por vía oral la combinación de neomicina y bacitracina durante 7 días. La permeabilidad intestinal se cuantificó con el método del dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC-dextrano). La expresión de las proteínas de UE en el intestino se determinó mediante PCR a tiempo real.

Resultados: los niveles de FITC-dextrano en suero se redujeron a la mitad en los ratones tratados con antibióticos, indicando una reducción de la permeabilidad intestinal. Los antibióticos incrementaron la expresión de zónula occludens 1 (ZO-1), molécula de adhesión de unión A (JAM-A) y ocludina en íleon y de ZO-1, claudina-3 y claudina-4 en colon.

Conclusiones: la combinación de neomicina y bacitracina reduce la permeabilidad intestinal e incrementa la expresión de ZO-1, JAM-A y ocludina en íleon y ZO-1, claudina-3 y claudina-4 en colon.

Palabras clave: Antibióticos. Microbiota. Proteínas de unión estrecha. Permeabilidad intestinal.

INTRODUCCIÓN

El epitelio intestinal constituye una barrera permeable y selectiva, gracias a la presencia de estructuras intercelulares de unión estrecha (UE), que regulan la permeabilidad paracelular. Las proteínas de UE son proteínas transmembrana y proteínas adaptadoras intracelulares. Se han identificado cuatro proteínas transmembrana: ocludina, claudi-

nas (24 miembros), molécula de adhesión de unión (JAM) y tricelulina. Estas proteínas transmembrana interactúan con las proteínas adaptadoras citosólicas, como la *zonula occludens* (ZO) (1).

Las células epiteliales del intestino están en continua interacción con una extensa microbiota intestinal, la cual puede modular la permeabilidad intestinal directamente, mediante la liberación de toxinas, componentes celulares o metabolitos, o indirectamente, a través de sus efectos sobre las células inmunológicas del hospedador (2).

La ingesta de antibióticos para el tratamiento de diversas patologías de origen bacteriano produce obviamente una alteración de la microbiota intestinal. Esta alteración de la microbiota intestinal puede tener efectos beneficiosos y contribuir al restablecimiento de la homeostasis intestinal. Así, la bacitracina oral se ha utilizado para el tratamiento de las diarreas asociadas a *Clostridium difficile* y colitis (3,4). La neomicina oral está indicada para la supresión de la flora bacteriana en pacientes que van a someterse a una cirugía colorrectal (5,6) o padecen una encefalopatía hepática (7). Además, la combinación de neomicina y bacitracina previene la diarrea inducida por las drogas quimioterápicos utilizadas contra el cáncer colorrectal (8). Sin embargo, el uso prolongado de antibióticos también se ha descrito como un factor que, al alterar la microbiota intestinal, puede contribuir al desarrollo y/o mantenimiento de patologías intestinales crónicas como la enfermedad inflamatoria intestinal o el síndrome de intestino irritable, patologías en las que la permeabilidad intestinal se encuentra alterada (9).

El objetivo del presente estudio es evaluar los efectos de la depleción de la microbiota intestinal producida por la administración oral de neomicina y bacitracina sobre la permeabilidad intestinal de ratones y la expresión de las proteínas de UE.

Recibido: 27-05-2015

Aceptado: 25-07-2015

Correspondencia: Laura Grasa. Departamento de Farmacología y Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza
e-mail: lgralo@unizar.es

Nevado R, Forcén R, Layunta E, Murillo MD, Grasa L. La neomicina y bacitracina disminuyen la permeabilidad intestinal en ratones e incrementan la expresión de algunas proteínas de unión estrecha. Rev Esp Enferm Dig 2015;107:672-676.

METODOLOGÍA

Animales y tratamiento con antibióticos

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PI36/12).

Ratones hembras C57BL/10 (5 a 7 semanas de edad) recibieron por sonda oral (0,2 mL) una combinación de antibióticos no absorbibles (neomicina 20 mg y bacitracina 20 mg por ratón, AppliChem, Barcelona, España) durante 7 días. La bacitracina y la neomicina se disolvieron en agua destilada estéril y el pH de la disolución se ajustó a 4,0 para evitar la inactivación de la bacitracina. Para evitar la contaminación por hongos, se añadió el antifúngico pimaricina (5 µg por ratón) a la solución de antibióticos. Los ratones control recibieron agua destilada estéril (0,2 mL). Previamente, nuestro grupo ha demostrado que la administración oral de estos antibióticos produce en ratones una gran depleción de su microbiota intestinal (10).

Se utilizaron 2 grupos de 8 ratones (control y tratados) para evaluar la permeabilidad intestinal *in vivo* y 2 grupos de 8 ratones (control y tratados) para estudiar la expresión de las UE.

Permeabilidad intestinal *in vivo*

Tras un ayuno de 14 horas, se suministró a cada ratón por sonda oral 60 mg de dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC-dextrano, FD4, 3.000-5.000 kD, Sigma-Aldrich, Madrid, España) por cada 100 g de peso corporal, en un volumen de 0,2 mL. Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca a las 4 h de la administración del FITC-dextrano, ya que se ha descrito que los niveles de dextrano en suero son máximos en este punto (11). La sangre se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente para extraer el suero. Se midió la intensidad de la fluorescencia de cada muestra de suero (DTX 880 Multimode Detector,

Beckman Coulter, CA, Estados Unidos) y las concentraciones de FITC-dextrano se determinaron a partir de curvas estándar generadas a partir de diluciones seriadas de FITC-dextrano. Los resultados se expresaron como ng FITC-dextrano mL⁻¹ suero por 100 g de peso corporal (pc).

Estudio de la expresión del ARNm de las UE

La expresión de ARNm de ZO-1, JAM-A, ocludina, y claudinas-3, -4 y -7 se determinó mediante PCR a tiempo real. Se tomaron muestras de íleon (6 cm últimos de intestino delgado) y de colon proximal de ratones control y tratados con antibióticos y se mantuvieron en solución RNAlater (Ambion, Life Technologies, Madrid, Spain) a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta la extracción del ARN mediante el RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó por transcripción reversa utilizando el AffinityScript Multiple Temperature cDNA synthesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos) y se utilizó para determinar los niveles de expresión de ARNm de las UEs. Las amplificaciones se realizaron con el sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Life Technologies, Carlsband, CA, Estados Unidos). La mezcla de la reacción (10 µL) contenía 4,5 µL de FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, Mannheim, Alemania), 0,5 µL de cada cebador 30 µM (Tabla I), 2,5 µL de agua destilada estéril y 2 µL de ADNc (100 ng µL⁻¹). Cada muestra se evaluó por triplicado y se calculó la media de los Ct obtenidos. La expresión relativa de ARNm de las UE de cada condición experimental (control o tratados) se expresó como $\Delta Ct = Ct_{UE} - Ct_{calibrador}$. La expresión del gen GAPDH se utilizó como calibrador tras verificar su estabilidad bajo nuestras condiciones experimentales. Luego, la expresión relativa de ARNm de las UE se calculó como $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tratados} - \Delta Ct_{control}$. Finalmente, los niveles de expresión relativa de los genes se convirtieron y se expresaron como cambio relativo al control ($= 2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Tabla I. Cebadores utilizados para la cuantificación de las UE mediante PCR a tiempo real

Gen	Referencia	Número de acceso en GenBank	Cebadores sentido y antisentido
ZO-1	(22)	NM_001163574.1	ACTCCCCTCCCCAAAAC CCACAGCTGAAGGACTCACA
Ocludina	(22)	NM_008756.2	ACTGGGTCAGGGAATATCCA TCAGCAGCAGCCATGTACTC
JAM-A	(22)	NM_172647.2	CTGATCTTTGACCCCGTGAC ACCAGACGCCAAAATCAAG
Claudina-3	(17)	NM_009902.4	AAGCCGAATGGACAAAGAA CTGGCAAGTAGCTGCAGTG
Claudina-4	(17)	NM_009903.2	CGTACTCTTGCCATTACG ACTCAGCACACCATGACTTG
Claudina-7	(17)	NM_016887.6	AGGGTCTGCTCTGGTCTT GTACGCAGCTTTGCTTCA
Beta-actina	Primerbank	NM_007393.3	GGCTGTATCCCCTCCATCG CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

Análisis de datos y estadística

Los resultados se expresaron como la media \pm E.E.M. con n indicando el número de animales utilizados. Los datos se compararon con el test de Mann-Whitney U y diferencias con valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Efecto de la neomicina y bacitracina sobre la permeabilidad intestinal

Como se observa en la figura 1, los ratones tratados con agua mostraron unos niveles de FITC-dextrano en suero de $2009 \pm 473,5$ ng mL⁻¹ de suero por 100 g de peso corporal. Los ratones tratados con antibióticos mostraron unos niveles de FITC-dextrano reducidos a la mitad aproximadamente ($973,4 \pm 172,8$ ng mL⁻¹ de suero por 100 g de peso corporal) respecto a los controles.

Efecto de la neomicina y bacitracina sobre la expresión de ARNm de las UE

La figura 2 muestra los niveles de expresión de ARNm de ZO-1, JAM-A, ocludina y claudinas 3, 4 y 7 en íleon (Fig. 2A) y colon (Fig. 2B) de los ratones tratados con los antibióticos respecto a los controles. El tratamiento con antibióticos incrementó significativamente la expresión de ZO-1, JAM-A y ocludina en íleon y de ZO-1, claudina-3 y claudina-4 en colon.

DISCUSIÓN

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que la administración oral de neomicina y bacitracina en ratones produce una gran depleción de su microbiota intestinal, una ligera inflamación intestinal, así como una reducción de las deposiciones fecales, un enlentecimiento del tránsito intestinal y una reducción de la contractilidad en el íleon y colon *in vitro* (10). En el presente trabajo evaluamos en estos mismos ratones tratados con antibióticos la permeabilidad del intestino delgado y colon al FITC-dextrano tras 4 horas de su administración. Otros autores han demostrado que el dextrano marcado con FITC puede llegar al colon a las 3 h (12) y alcanzar concentraciones máximas en el suero a las 4 h de su administración por vía oral (11). Nuestros resultados revelan que los ratones tratados con neomicina y bacitracina muestran en estas condiciones una permeabilidad intestinal reducida al FITC-dextrano. Sin embargo, otros autores han demostrado que la bacitracina incrementa la absorción paracelular del FITC-dextrano (4.000 kD) en células epiteliales de carcinoma de colon humano (Caco-2) (13). Por otra

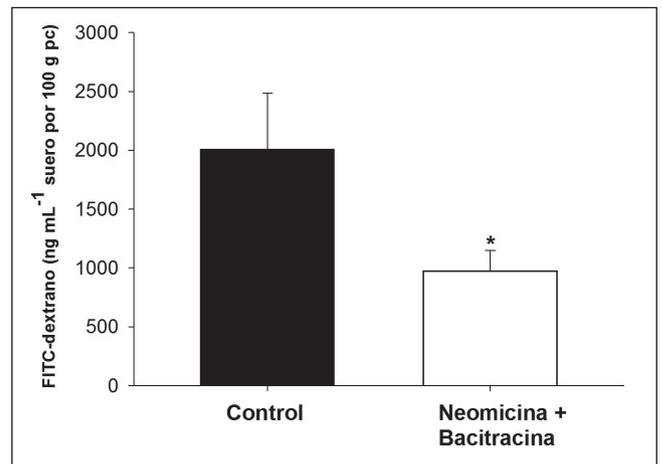


Fig. 1. Niveles de FITC-dextrano en suero de ratones control y tratados con neomicina + bacitracina, como medida de la permeabilidad intestinal. Los resultados se expresan en valores medios (ng mL⁻¹ de suero por 100 g de peso corporal, pc), y las barras verticales indican el E.E.M. de ocho ratones por grupo. * $p < 0,05$ respecto al control.

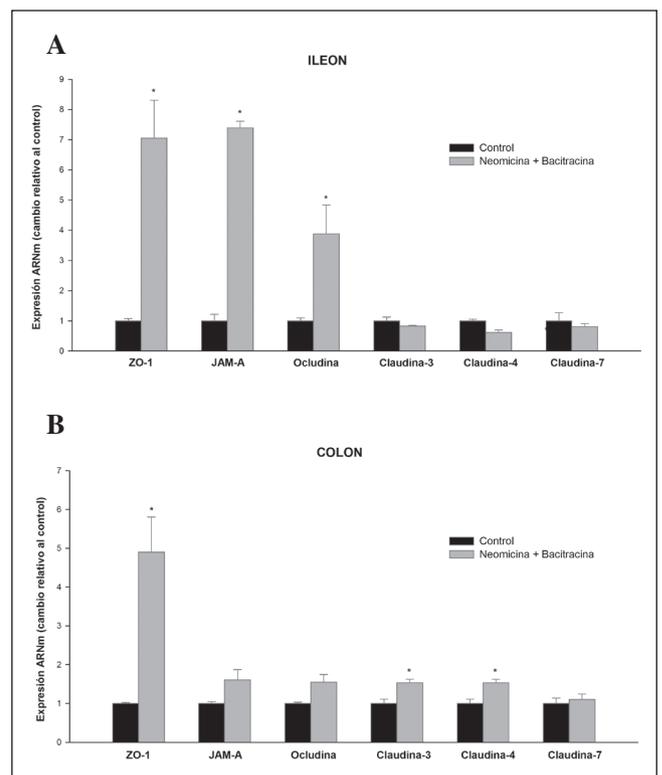


Fig. 2. Niveles de expresión del ARNm de las UE en A íleon y B colon de ratones control y tratados con neomicina + bacitracina. Los resultados se expresan en valores medios (cambio relativo al control), y las barras verticales indican el E.E.M. de ocho ratones por grupo. * $p < 0,05$ respecto al control.

parte, la neomicina incrementa la absorción de azúcares, a la vez que tiene efectos directos sobre la morfología del epitelio intestinal en rata. Sin embargo, la neomicina no

produce estos efectos en hámster, indicando que existen diferencias específicas entre las especies en cuanto a la susceptibilidad del epitelio a la neomicina (14). El hecho de que el tránsito intestinal esté enlentecido en los ratones tratados con neomicina y bacitracina podría explicar una menor llegada de FITC-dextrano a las células epiteliales intestinales del íleon y colon, y por lo tanto, un menor paso paracelular de este.

Por otra parte, existen varios ejemplos en los que el tratamiento con antibióticos ha resultado ser eficaz en el restablecimiento de la permeabilidad intestinal normal. Así, la ciprofloxacina y el metronidazol mejoran la función de barrera de la mucosa dañada en ratones con fibrosis quística (15). La rifaximina oral previene el daño de la función de barrera intestinal producido por estrés de evitación al agua en ratas (16).

Entre los mecanismos que pueden modificar la permeabilidad intestinal se encuentran las alteraciones en la expresión, localización y función de las proteínas de unión estrecha (2). En nuestro estudio, evaluamos el efecto directo de la combinación de neomicina y bacitracina sobre la expresión génica de algunas de las proteínas que forman parte de las UE. Todos los segmentos de intestino delgado e intestino grueso de ratón muestran altos niveles de expresión de ZO-1, JAM-A, ocludina y claudinas -3, -4 y -7 (17). En nuestro estudio, la depleción de la microbiota mediante la administración de los antibióticos neomicina y bacitracina indujo un incremento en la expresión génica de ZO-1, JAM-A y ocludina en íleon y de ZO-1, claudina-3 y claudina-4 en colon. Estos resultados indican que la microbiota intestinal podría modular la transcripción de estas proteínas y, a su vez, regular la permeabilidad intestinal. Sin embargo, hay que tener en cuenta que cambios en la expresión génica no siempre implican un cambio en los niveles de proteína funcional y, por lo tanto, un cambio en la funcionalidad de las uniones estrechas.

Nuestro estudio demuestra que la microbiota podría regular la expresión génica de las proteínas de unión estrecha de diferente manera en íleon y colon. Así, el incremento de expresión de las proteínas ZO-1, JAM-A y ocludina podría contribuir a la permeabilidad reducida al FITC-dextrano observada en el íleon. Se ha descrito que las proteínas ZO podrían tener un papel importante en la regulación del ensamblaje de las uniones estrechas (1). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que JAM-A participa en la regulación y mantenimiento de la barrera formada por las uniones estrechas (1). Ratones con carencia del gen JAM-A muestran una mayor permeabilidad al dextrano en el colon comparado con los ratones normales (18). Estudios en células Caco-2 e intestino de ratón han demostrado que la disminución en la expresión de ocludina induce un incremento en la permeabilidad paracelular a las macromoléculas (19).

Por el contrario, el incremento de expresión de las proteínas ZO-1, claudina-3 y claudina-4 podría contribuir a la permeabilidad reducida al FITC-dextrano observada en el

colon. Así, la claudina-3 y la claudina-4 están implicadas en la formación de barrera y disminuyen la permeabilidad paracelular (1). Sin embargo, la claudina-7, cuyo nivel de expresión génica no se altera ni en íleon ni en colon, está implicada en la formación de poros e incrementa la permeabilidad paracelular (1), lo que apoya nuestros resultados.

Por último, se ha demostrado que otros antibióticos pueden modificar la expresión de estas proteínas de UE. La oligomicina evita la redistribución de la ZO-1 y ocludina observadas en la disfunción de la barrera intestinal inducida por IFN- γ y TNF- α (20). La minociclina ejerce un efecto antiinflamatorio y atenúa la reactivación de la colitis incrementando la expresión de ZO-1 (21).

En conclusión, la depleción de la microbiota con neomicina y bacitracina reduce la permeabilidad intestinal e incrementa la expresión de ZO-1, JAM-A y ocludina en íleon y ZO-1, claudina-3 y claudina-4 en colon.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el Gobierno de Aragón (B61/2014) y la Universidad de Zaragoza (JIUZ-2013-BIO-08), España.

BIBLIOGRAFÍA

1. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:631-59. DOI: 10.1007/s00018-012-1070-x
2. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:503-12. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x
3. Bricker E, Garg R, Nelson R, et al. Antibiotic treatment for Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2005 CD004610.
4. Nelson R. Antibiotic treatment for Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;CD004610.
5. Cannon JA, Altom LK, Deierhoi RJ, et al. Preoperative oral antibiotics reduce surgical site infection following elective colorectal resections. *Dis Colon Rectum* 2012;55:1160-6. DOI: 10.1097/DCR.0b013e3182684fac
6. DiPiro JT, Patrias JM, Townsend RJ, et al. Oral neomycin sulfate and erythromycin base before colon surgery: A comparison of serum and tissue concentrations. *Pharmacotherapy* 1985;5:91-4.
7. Eltawil KM, Laryea M, Peltekian K, et al. Rifaximin vs. conventional oral therapy for hepatic encephalopathy: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2012;18:767-77. DOI: 10.3748/wjg.v18.i8.767
8. Alimonti A, Satta F, Pavese I, et al. Prevention of irinotecan plus 5-fluorouracil/leucovorin-induced diarrhoea by oral administration of neomycin plus bacitracin in first-line treatment of advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 2003;14:805-6. DOI: 10.1093/annonc/mdg193
9. Spiller R, Lam C. The shifting interface between IBS and IBD. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:586-92. DOI: 10.1016/j.coph.2011.09.009
10. Grasa L, Abecia L, Forcen R, et al. Antibiotic-induced depletion of murine microbiota induces mild inflammation and changes in toll-like receptor patterns and intestinal motility. *Microb Ecol* 2015;70:835-48. DOI: 10.1007/s00248-015-0613-8
11. Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, et al. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am J Pathol* 2012;180:626-35. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.10.025

12. Ren T, Grants I, Alhaj M, et al. Impact of disrupting adenosine A(3) receptors (A(3)(-)/(-) AR) on colonic motility or progression of colitis in the mouse. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1698-713. DOI: 10.1002/ibd.21553
13. Fujita T, Kawahara I, Quan Y, et al. Permeability characteristics of tetragastrins across intestinal membranes using the Caco-2 monolayer system: Comparison between acylation and application of protease inhibitors. *Pharm Res* 1998;15:1387-92. DOI: 10.1023/A:1011997404306
14. Rull S, Ponz F. [Effects of neomicine on the transport of sugars by rat and hamster small intestine (author's transl)]. *Rev Esp Fisiol* 1974;30:183-90.
15. De Lisle RC, Mueller R, Boyd M. Impaired mucosal barrier function in the small intestine of the cystic fibrosis mouse. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53:371-9. DOI: 10.1097/MPG.0b013e318219c397
16. Xu D, Gao J, Gilliland M, 3rd, et al. Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology* 2014;146:484-96 e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.026
17. Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, et al. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns* 2006;6:581-8. DOI: 10.1016/j.modgep.2005.12.001
18. Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, et al. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 2007;204:3067-76. DOI: 10.1084/jem.20071416
19. Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G1054-64. DOI: 10.1152/ajpgi.00055.2011
20. Liu H, Wang P, Cao M, et al. Protective role of oligomycin against intestinal epithelial barrier dysfunction caused by IFN-gamma and TNF-alpha. *Cell Physiol Biochem* 2012;29:799-808. DOI: 10.1159/000188076
21. Garrido-Mesa N, Utrilla P, Comalada M, et al. The association of minocycline and the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 results in an additive beneficial effect in a DSS model of reactivated colitis in mice. *Biochem Pharmacol* 2011;82:1891-900. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.09.004
22. Hwang I, An BS, Yang H, et al. Tissue-specific expression of occludin, zone occludens-1, and junction adhesion molecule A in the duodenum, ileum, colon, kidney, liver, lung, brain, and skeletal muscle of C57BL mice. *J Physiol Pharmacol* 2013;64:11-8.