

# La inhibición del promotor Egr-1 inducida por ciprofloxacino es revertida por EGF-1 en fibroblastos humanos

Francisco Martínez-Flores<sup>1,2</sup>; Reyna Barrera López<sup>1</sup>; Elizabeth Arce de la Vega<sup>1</sup>; Héctor E. Montes-Izunsá<sup>3</sup>; Lucinda Aguirre-Cruz<sup>4</sup>; Juan A. Madinaveitia Villanueva<sup>1</sup>; Omar F. Carrasco.<sup>2</sup>

ISSN IMPRESO 2954-4327. ISSN ELECTRÓNICO 2992-7277  
<https://dx.doi.org/10.58713/rf.v3i1.4> Ciudad de México

## Resumen:

**Introducción:** La proteína de respuesta temprana a crecimiento Egr-1, es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación y la proliferación celular, cuya expresión es regulada por su promotor en respuesta a factores externos y fármacos. Los procesos de cicatrización en pacientes quemados son dirigidos por fibroblastos que promueven la cicatrización y la diferenciación celular. **Objetivo:** Se presenta el efecto inhibitorio del ciprofloxacino sobre la proliferación celular y de EGF-1 sobre la actividad del promotor usando un sistema reportero transducido por el adenovirus AdΔEgr-1-Luc7 en fibroblastos primarios humanos. **Materiales y Métodos:** Se realizaron curvas de proliferación en presencia de ciprofloxacino para determinar la dosis de inhibición de la proliferación celular. Los ensayos reporteros se realizaron con fibroblastos transducidos con AdΔEgr-1-Luc7, los cuales fueron expuestos a diferentes concentraciones de ciprofloxacino y EGF-1, cuantificando la actividad del reportero mediante luminometría. **Resultados:** El ciprofloxacino inhibió la proliferación celular a dosis mayores de 50 µg/ml al día 4. Las dosis de 10 y 20 µg/ml tuvieron una curva de crecimiento similar al control. Cuando las células fueron expuestas a EGF-1, la inhibición de la actividad transcripcional de Egr-1 se revirtió y fue mayor a las 3 h post-exposición. **Conclusión:** La actividad del promotor Egr-1 en fibroblastos humanos es regulada negativamente por ciprofloxacino y positivamente por EGF-1.

## Palabras Clave:

Egr-1; ciprofloxacino, adenovirus, fibroblastos, EGF-1.

## Abstract:

**Introduction:** The early growth response protein Egr-1 is a transcription factor involved in cell differentiation and proliferation, whose expression is regulated by its promoter in response to external factors and drugs. The healing processes in burn patients are directed mainly by fibroblasts, which promote healing and cell differentiation. **Objective:** The effect of ciprofloxacin on cell proliferation and EGF1 on promoter activity is presented using a reporter system transduced by the adenovirus AdEgr-1-Luc7 in fibroblasts. **Materials and Methods:** Proliferation curves were performed in the presence of ciprofloxacin to determine the inhibition dose of cell proliferation. Reporter assays were performed with fibroblasts AdEgr-1-Luc7 + and exposed to ciprofloxacin and EGF-1, quantifying reporter activity. **Results:** Ciprofloxacin inhibited cell proliferation at doses greater than 50 µg/ml on day 4. Dose of 10 and 20 µg/ml shows a curve similar to the control. When the cells were exposed to EGF-1, the inhibition of transcriptional activity of Egr-1, was reversed after 3 hours post-exposure was greater. **Conclusion:** The activity of the Egr-1 promoter in human fibroblasts is negatively regulated by ciprofloxacin and positively by EGF-1.

## Keywords:

Egr-1; ciprofloxacin, adenovirus, fibroblasts, EGF-1.

<sup>1</sup> Programa de Bioterapéutica Molecular. Banco de Piel y Tejidos del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, Secretaría de Salud, México. <sup>2</sup> Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. <sup>3</sup> Hospital Angeles Roma; México. <sup>4</sup> Laboratorio de Inmunología; Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco. Secretaría de Salud, México.

## Introducción

La proteína de respuesta temprana a crecimiento Egr-1, también llamada ZNF268, NGFI-A; KROX-24, GNZIF, TIS8 y ZENK) es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación celular en diferentes tejidos embrionarios. En la vida postnatal regula la proliferación celular del tejido nervioso, pulmonar y articular. También se ha descrito su expresión en células tumorales de gliomas y leucemias, principalmente como supresor de tumores; sin embargo, su expresión se incrementa en procesos inflamatorios, angiogénesis y apoptosis.<sup>(1,2,3,4)</sup> Recientemente, su expresión ha sido descrita en los fibroblastos de la piel.<sup>(5)</sup>

En la edad adulta, la expresión del gen es baja y ubícuota en todos los tejidos; sin embargo, el incremento de su expresión es regulado esencialmente por los elementos responsivos de su promotor a diferentes inductores externos, entre los cuales se encuentran factores físico-químicos como temperatura, cambios osmóticos y osmolares, presión, hipoxia, luz ultravioleta (UV), la expresión de TGF- $\beta$  y también por fármacos como los derivados esteroideos, hormonas y el factor estimulador de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).<sup>(3,4,5)</sup> El promotor tiene una longitud de 700 pb, pero los mecanismos de autorregulación se encuentra en los primeros 600 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la caja TATA. El mecanismo específico para la regulación de la actividad transcripcional del promotor se realiza mediante secuencias de unión activadas por AMP cíclico (CRE); elementos de respuesta a suero (SRE) o a través de sitios de unión de la proteína Egr-1 (EBS) como un mecanismo de autorregulación negativa.<sup>(6,7)</sup> El efecto mitogénico de la proteína Egr-1 es mediada por sus motivos en dedos de zinc que reconoce secuencias consenso en el promotor de varios genes (CCGG/TGGGCCG) y que además, le confiere un mecanismo de autorregulación a través de un sitio de unión sobre su propio promotor EBS.<sup>(8)</sup>

Las fluoroquinolonas son antibióticos sintéticos de amplio espectro, derivados del ácido nalidíxico e introducidos en la práctica clínica desde 1962.

<sup>(9)</sup> El ciprofloxacino es el fármaco prototipo, cuyo

mecanismo de acción es compartido con los miembros de la familia mediante la inhibición de la topoisomerasa IV y la DNA girasa, las cuales son indispensables para la síntesis del ADN bacteriano.<sup>(9,10)</sup> En la actualidad, estos antibióticos son usados en todos los esquemas antimicrobianos para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, genitourinario y las infecciones de tejidos blandos, incluyendo a los pacientes grandes quemados con procesos sépticos.<sup>(11)</sup>

Se han reportado efectos adversos por el uso crónico de las fluoroquinolonas, entre los que destacan la ruptura de tendones, ruptura de aneurismas, además de la inhibición del crecimiento en las células del tejido conectivo como fibroblastos o células tendinosas.<sup>(12,13)</sup> En este artículo se reporta la inhibición inducida por ciprofloxacino sobre la capacidad proliferativa de los fibroblastos primarios humanos derivados de la piel (FPH), así como la inhibición de la actividad transcripcional del promotor del Egr-1 inducida por ciprofloxacino y la reversión de este efecto en presencia del factor de crecimiento epitelial 1 (EGF-1), usando un modelo reportero transducido por el adenovirus recombinante no replicativo Ad-Egr-1/Luc de localización episomal y de expresión transitoria.<sup>(14)</sup>

## II. Materiales y métodos

**II.A Cultivo de fibroblastos primarios humanos.** Los FPH fueron obtenidos del Banco de Tejidos del Instituto Nacional de Rehabilitación LGII, de acuerdo con el protocolo estandarizado (PR-DQ17-ISO-9001-2008). Los FPH fueron aislados a partir de aloinjertos de dermis obtenidos de donantes multiorgánicos y sometidos a disgregación enzimática. Las células obtenidas se cultivaron en medio D-MEM con 10 % suero fetal bovino, y 5 mM de ácido ascórbico en un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de O<sub>2</sub> y 100% de humedad a 37°C, hasta alcanzar una confluencia del 80% en cajas de cultivo cubiertas con colágena T-75 (GrainerBioOne, Corp; Alemania). Después del primer pase, las células se disgregaron y fueron cultivadas hasta el pase 5; al término se criopreservaron en nitrógeno líquido hasta la realización de los ensayos

de inducción con fármacos, de acuerdo a los protocolos estandarizados en nuestro laboratorio en cultivo de tejidos primarios.

### **II.B Producción a gran escala del adenovirus recombinante Ad-Egr1/Luc y AdCMV-GFP.**

Los virus Ad-Egr1/Luc y AdCMV-GFP fueron diseñados y clonados en el sistema AdEasy1 donado por el Dr. Vogelstein de la Universidad John Hopkins. <sup>(15)</sup> El genoma recombinante fue empaquetado en células HEK-293 (Invitrogen Corporation-AATC; USA) y purificado a gran escala para aplicaciones in vivo a partir de 250 millones de células HEK-293 de acuerdo con el protocolo estandarizado en nuestro laboratorio. Con el objeto de separar los viriones maduros de los inmaduros, así como de restos celulares, los lisados totales fueron mantenidos en hielo y purificados por ultra centrifugación, con gradientes de cloruro de cesio a 28 mil G, a 4°C y durante 12 h (WX-100 Thermo Corp, USA). Posteriormente, los viriones se aislaron por punción estéril y se dializaron (en presencia de magnesio y 5 mM de HEPES a 4°C) por 12 h, usando una membrana de 10,000 MWCO (Pierce Bioscience, USA). Los viriones recombinantes purificados se almacenaron en solución de preservación viral a -70°C. La eficiencia de la infectividad y la titulación de las partículas virales infectantes se determinó por ensayo de placa células HEK-293 a diluciones seriadas <sup>(10-6, 10-7, 10-8, 10-9, 10-10, 10-11)</sup> y por lectura de la densidad óptica del dializado a 260 nm.<sup>(16)</sup>

### **II.C Determinación de las concentraciones tóxicas de ciprofloxacino.**

Para determinar el rango de toxicidad se realizó un ensayo de exposición a ciprofloxacino a concentraciones de 10, 20, 40, 80 y 200 µg/ml. Para ello, se sembraron 5x10<sup>3</sup> células en una caja de 12 pozos. Después de que las células se adhirieran al fondo de la placa, el medio completo se reemplazó con medio fresco y las diferentes concentraciones de ciprofloxacino se fijaron en metanol frío (4°C) al día 1, 2, y 3. Cuando el ensayo concluyó, las células fueron teñidas con cristal violeta al 0.1% en PBS (pH 7.4) durante 10 min, y eluidas con ácido acético al 1%. Se cuantificaron 100 µl de cada eluido a 570 nm de absorbancia en un multilector DTX

800 de Beckman Coulter. Un segundo ensayo se realizó para estudiar los efectos de dosis en 10, 20, 30, 40 y 50 µg/ml de ciprofloxacino sobre la capacidad proliferativa de los FPH a 7 días. El tercer ensayo se realizó a dosis de 10 y 20 µg/ml de ciprofloxacino durante 10 días. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, las lecturas obtenidas fueron promediadas y graficadas. En el caso de los ensayos reportero con el Ad-Egr1-Luc y la cuantificación de actividad de luciferasa, solo se usaron 10 y 20 µg/ml de ciprofloxacino.

### **II.D Infección y determinación del múltiplo de infección (MOI) óptimo en fibroblastos humanos con el adenovirus Ad-CMV-GFP.**

Para determinar la cantidad óptima de adenovirus recombinante con transducción eficiente en los fibroblastos humanos, se usó un adenovirus que expresa la proteína verde fluorescente humanizada AdCMV-hGFP. Para ello, se sembraron 3x10<sup>5</sup> células en cajas de 6 pozos (Costar, Madison USA). 24 h después, las células fueron infectadas con 25, 50, 75, 100 y 200 MOIs con el adenovirus en medio reducido en suero. Al término de 2 h de exposición, el medio infectante fue reemplazado por medio fresco y las células transducidas se mantuvieron en cultivo por 24 h. Para documentar la eficiencia de la infección, se buscó la señal de la proteína verde fluorescente (GFP) usando un equipo Axioplan 2 (Carl Zeiss, Alemania). La GFP emitió una señal luminosa excitable a 488 nm, en las células infectadas por el adenovirus Ad-CMV-GFP.<sup>(15)</sup>

**II.E Modelo experimental para la inducción confármacos.** El sistema de evaluación y análisis de efecto de inducción farmacológica sobre el promotor está basado en un sistema reportero que es responsivo a la expresión del gen de la luciferasa, transducido por un adenovirus tipo 5 no replicativo de tercera generación (Ad-Egr1/luc). Este modelo reportero ha sido estudiado y reportado previamente en células de glioma y otros modelos celulares <sup>(17)</sup>.

Las células fueron sembradas e infectadas con el adenovirus Ad-Egr-1/Luc7 que contiene el cassette del promotor de Egr-1, para dirigir la expresión de la luciferasa.

(Figura 1A) La luciferasa es una enzima que hidroliza la luciferina en presencia de ATP y la emisión de luz que puede ser cuantificada en un detector de cuentas lumínicas/segundo (CL/S). Las CL/S son dependientes de la concentración de la proteína en un extracto celular total obtenido de las células expuestas. A su vez, el incremento o disminución de las CL/S es la resultante de la regulación negativa o positiva del promotor en presencia de los diferentes fármacos.

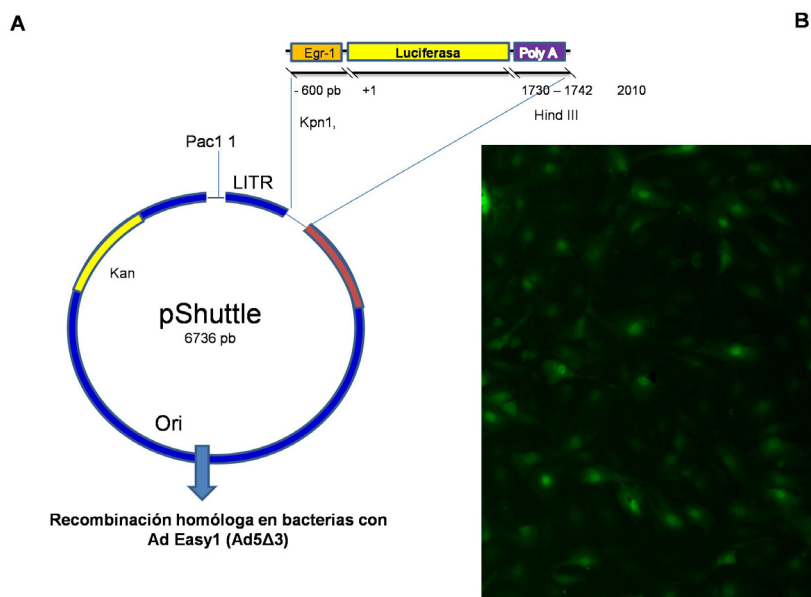


**Figura 1A.** Adenovirus AdEgr-1-Luc. A) El Diagrama representa los sitios de clonación del casete reportero EGR1-Luc en el Vector pShuttle del sistema AdEasy para su recombinación con el genoma recombinante del Adenovirus tipo 5.

**Figura 1B.** Fotografía de fluorescencia de FPH infectados con MOI 50 de AdCMV-GFP, para determinar el MOI óptimo de los ensayos reporteros.

**II.D Ensayo reportero de luciferasa inducido por fármacos.**  $3 \times 10^5$  FPH fueron sembrados en una caja de 6 pozos en condiciones de cultivo estándar hasta su adherencia, posteriormente fueron infectados con Ad-Egr1/luc en medio bajo en suero OptiMEM, (Gibco-invitrogen, Corp. USA) durante 1 h. Inmediatamente, se lavaron en D-PBS y se mantuvieron en recuperación a 12 h con medio completo. 24 h antes de los ensayos de inducción, el medio fue reemplazado con medio fresco con 1% de SFB, para llevar la actividad del promotor Egr-1 endógeno a niveles basales durante 24 h. Al término de este tiempo, el medio fue reemplazado por medio D-MEM (Gibco-invitrogen, Corp. USA) con las diferentes concentraciones de ciprofloxacino y EGF-1. Las células fueron expuestas a ciprofloxacino y al Factor de crecimiento epitelial (EGF-I) a

las siguientes concentraciones: 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  de ciprofloxacino; 10 y 20 ng de EGF-1; y para los ensayos de competencia 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  de ciprofloxacino con 10 ng/ml de EGF-1 y 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  de ciprofloxacino con 20 ng de EGF-1 durante 1 y 3 h. Al término de cada tiempo, las células fueron lisadas para la extracción de proteínas totales y sometidas a luminometría, para medir la actividad de la luciferasa.

**II.E Extracción de proteínas totales.** La extracción de proteínas totales de las células expuestas a diferentes fármacos se realizó de la siguiente manera: al término del tiempo de exposición, (1, 3 y 6 h) las células se lavaron con PBS a 37°C (Invitrogen Corp.) y se lisaron con 300  $\mu\text{l}$  de solución de lisis (Glo-Cell lysis Buffer, Promega Corp, USA) a temperatura ambiente por

5 minutos. El lisado fue colectado en un microtubo estéril, se agitó por 1 minuto e inmediatamente se centrifugó a 5 mil G a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C hasta su lectura en un cuantificador de luminometría.

## **II.F Cuantificación de actividad de luciferasa.**

Los ensayos de luminometría se realizaron con 50 µl del lisado celular, con una relación de volúmenes 1:1 de sustrato Glo-Luciferase (Glo-Luciferase system, Promega, USA). La mezcla se incubó durante 10 minutos a 23°C. Inmediatamente, la reacción fue cuantificada en un luminómetro (DTX-800 Beckman Coulter). La luciferasa presente en el extracto proteico hidroliza a la luciferina en presencia de ATP y genera una señal luminosa identificada por el lector y expresada en CL/S. Las cuales se ajustaron a la concentración de proteínas, para obtener los datos reales de actividad de la luciferasa controlada por el promotor Egr-1. El análisis de datos se realizó con el programa Multimode Analysis Software (Beckman Coulter, USA) y el análisis estadístico se realizó con herramientas de análisis métricos y paramétricos.

## **III. Resultados.**

### **III.A. Los FPH son transducibles eficientemente con un MOI de 50.**

Para determinar la eficiente transducción del sistema reportero usando un adenovirus no replicativo se sembraron 25,000 FPH, en condiciones estandarizadas de cultivo, hasta una confluencia del 100%. Posteriormente, las células infectadas con 25, 50, 75 y 100 MOIs de Ad-CMV-GFP, mostraron una eficiencia de transducción del 100% con MOIs mayores de 50. Una señal de fluorescencia fue detectada en las células con 25 MOIs, pero solo se infectaron el 75% de las células expuestas. El análisis comparativo determinó que los FPH fueron infectados en un 100% con un MOI de 50, sin la presencia de cambios morfológicos o efecto citotóxico, inducido por el adenovirus recombinante no replicativo. La [Figura 1B](#) muestra una fotografía de FPH transducidos con el Ad-CMV-GFP a las 72 h post infección con 50 MOIs.

### **III.B. La proliferación de FPH, es inhibida por la concentración creciente de ciprofloxacino.**

Para determinar los efectos tóxicos sobre la proliferación celular, se realizó un ensayo de exposición a dosis crecientes de ciprofloxacino (10, 20, 40, 80 y 200 µg/ml) durante 3 días. Las células fueron fijadas en cada punto, y teñidas con cristal violeta. Los resultados mostraron una inhibición de la proliferación celular, dependiente de la dosis, con lo que se observó que las dosis de 80 y 200 µg/ml, inhibieron el crecimiento celular desde el día 1 (Figura 2).

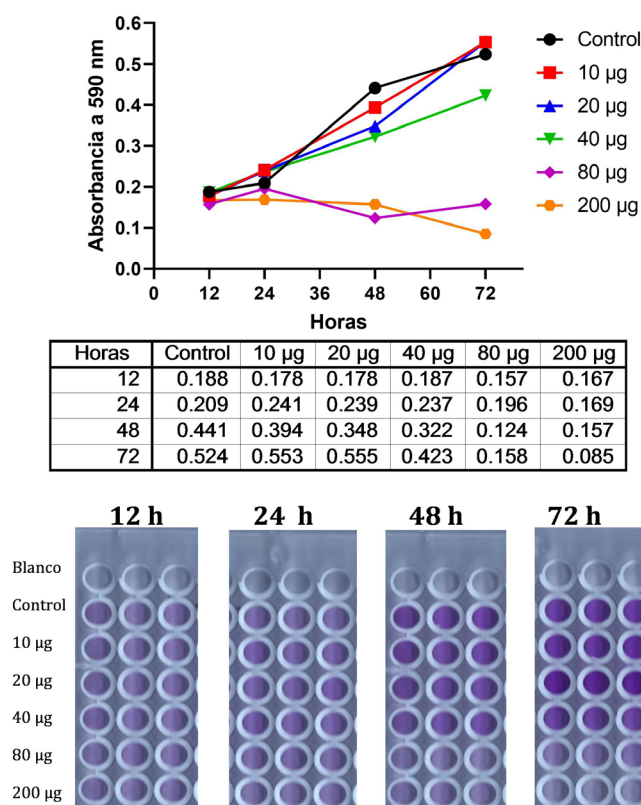


**Figura 2.** Curva de toxicidad de ciprofloxacino sobre la proliferación de fibroblastos primarios humanos. Las concentraciones de 80 y 200 µg/ml inhiben la proliferación celular desde las 24 h. Las concentraciones de 10, 20 µg/ml no mostraron diferencia en relación al grupo control sin ciprofloxacino, pero 40 µg/ml retrasan la proliferación celular.

En el segundo ensayo se determinaron los efectos a dosis menores a 50 µg/ml (10, 20, 30, 40, y 50 µg/ml de ciprofloxacino) durante 7 días. Los resultados mostraron un patrón de inhibición de proliferación celular para las dosis de 30, 40 y 50 µg/ml, las unidades de absorbancia fueron de (0.31; 0.26 y 0.26 UA, respectivamente) a partir del día 4, que se mantuvo durante los días 5, 6 y 7. (Figura 3).

En el tercer ensayo los FPH fueron expuestos a 10 y 20 µg/ml de ciprofloxacino durante 10 días. Las unidades de absorbancia fueron similares al grupo control sin ciprofloxacino hasta el día 4 (0.56, 0.72, 0.68 UA respectivamente). Sin embargo, el crecimiento después del día 6, 8 y 10 fue menor comparado con las células control sin ciprofloxacino (Figura 4).

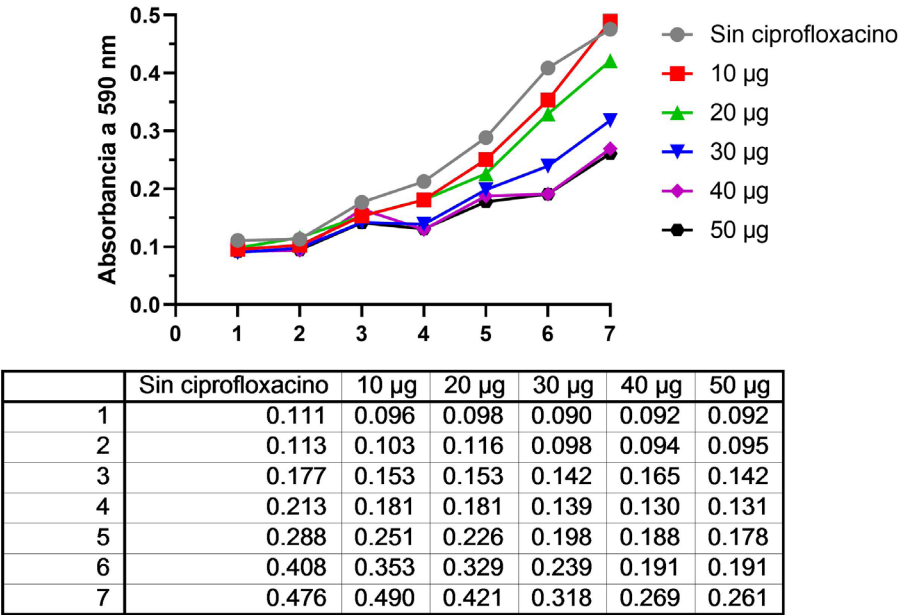


**Figura 3.** Efecto de las Concentraciones 10, 20, 30, 40, 50 µg de ciprofloxacino sobre la proliferación de fibroblastos primarios humanos. Se sembraron 5x10<sup>3</sup> FPH y se expusieron a concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 µg/ml de ciprofloxacino en medio D-MEM completo durante 7 días. Nótese como las dosis de 30, 40 y 50 µg/ml presentan un patrón inhibitorio durante después del día 5. Sin embargo, las dosis de 10, 20, µg/ml presentan una línea de tendencia de crecimiento similar al control desde el día 1 al día 7.

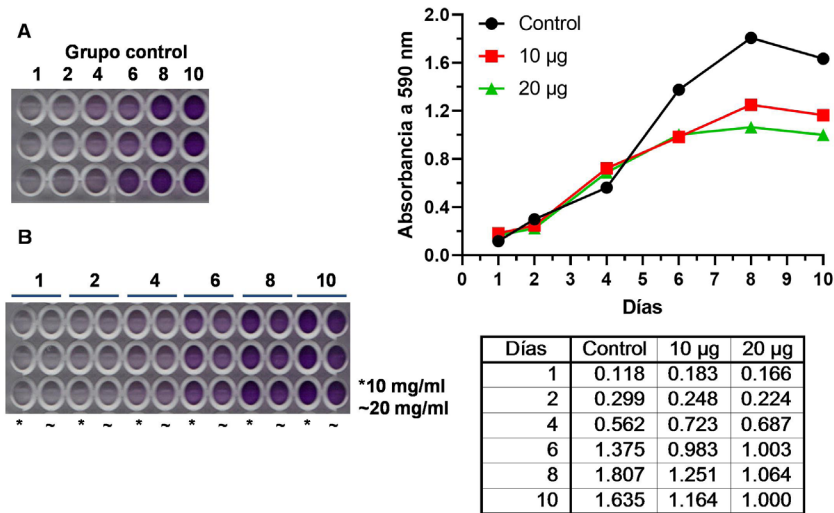


**Figura 4.** Efecto de las Concentraciones 10 y 20 µg de ciprofloxacino sobre la proliferación de fibroblastos primarios humanos. Se sembraron 5x10<sup>3</sup> FPH y se expusieron a concentraciones de 10 y 20 µg/ml de ciprofloxacino en medio D-MEM completo durante 10 días. Nótese como las dosis de 10 y 20 µg/ml presentan un patrón inhibitorio durante después del día 6. A pesar de ello, se observa una línea de tendencia de crecimiento.

### III.C. La Actividad transcripcional del promotor Egr-1 es inhibida por la exposición a ciprofloxacino.

Células FPH/Ad-Egr-1-Luc<sup>+</sup> se expusieron a ciprofloxacino a dos dosis equivalentes a las concentraciones terapéuticas (10 y 20 µg/ml). Las CL/S fueron obtenidas por luminometría de los extractos proteicos después de 1 y 3 h de exposición con ciprofloxacino. Se observó una disminución de la actividad del promotor Egr-1. Ensayos previos de los extractos proteicos (1 y 3 h) determinaron que el pico máximo de expresión se encontró a las 3 h y no se incrementó, por lo que los ensayos reporteros de luminometría se realizaron 3 h posteriores a la exposición con ciprofloxacino.

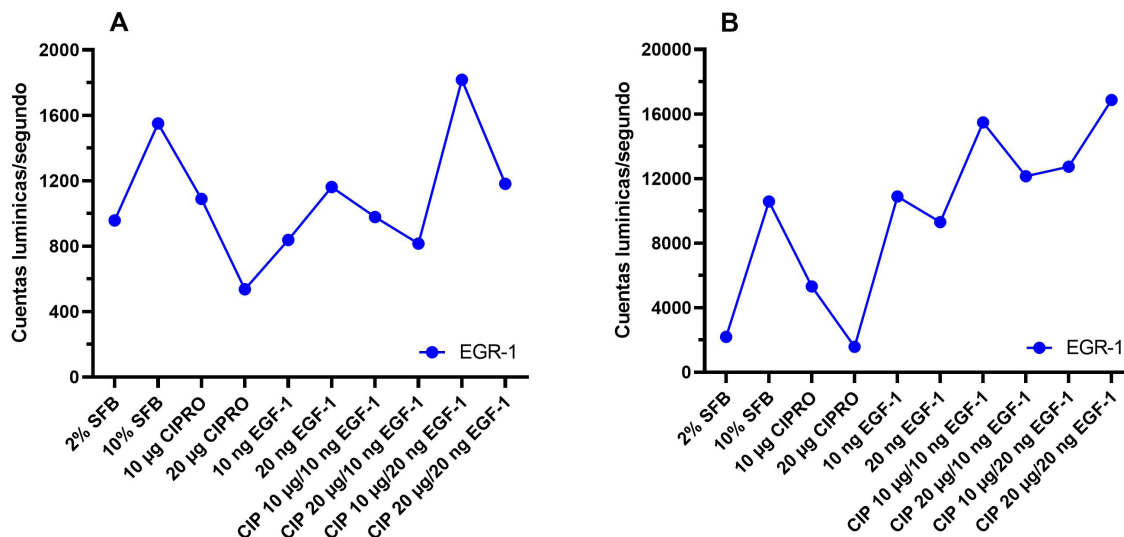


**Figura 5A.** Efecto de EGF y ciprofloxacino sobre el promotor Egr-1 en FPH/AdEgr-1/luc+.

A) Gráfica de la actividad del reportero a 1 h de exposición a diferentes concentraciones de ciprofloxacino y EGF-1 (concentraciones 1:1; 1:2 y 2:1).

**Figura 5B.** Gráfica de las mismas condiciones a 3 h post-exposición. La orden de expresión fue casi 9 veces más que la de la primera hora. Sin embargo, la potencia de la expresión es mayor en la dosis mayor de EGF-1.

La actividad basal del promotor Egr-1 fue de 957 CL/S a 1 h de exposición, el grupo control con 10% de SFB fue de 1,550 CL/S. Las CL/S del grupo expuesto a 10 y 20 µg/ml de ciprofloxacino fueron de 1,089 y de 537.33 respectivamente (Figura 5A). Después de 3 h de exposición, el grupo control tuvo una lectura de 10,587 CL/S y para 10 y 20 µg/ml de 5,316 CL/S y 1,587 CL/S, respectivamente. (Figura 5B)

### III.d. La inhibición por ciprofloxacino es revertida por la presencia de EGF en FPH.

Cuando las células FHP/Ad-Egr1/Luc fueron expuestas a 10 y 20 ng/ml de EGF-1 a 1 h, mostraron 838 CL/S y de 1,162 CL/S, respectivamente, comparadas con el grupo control de 1,089.2 CL/S. A las 3 hs con 10,897 y 9,307 CL/S, comparadas con la actividad basal 9,307 de CL/S para 20 ng/ml de EGF-1 (Figura 5B).

Para determinar si el incremento de la actividad del promotor Egr-1 inducida por EGF-1 puede tener algún efecto en presencia de ciprofloxacino, se realizaron ensayos de exposición simultánea. Los resultados fueron los siguientes: para el grupo de 10 µg de ciprofloxacino y 10 ng de EGF-1 a 1 h, fue de 978 CL/S y 3 h de 15,481 CL/S. Cuando se incrementó la concentración de ciprofloxacino a 20 µg/ml con 10 ng de EGF-1 a 1 h, se cuantificaron 816 CL/S y, a 3h, de 12,144 CL/S, observándose una disminución de la actividad transcripcional. Finalmente, el grupo de células FHP/Ad-Egr1/Luc expuestas a una concentración mayor de EGF-1 y ciprofloxacino (20 µg /ml y 20 ng respectivamente) mostraron un incremento de la actividad transcripcional. Después de 1h de exposición, las lecturas fueron de 1,182 CL/S y a las 3h de 16,871 CL/S. Es decir, se observó un incremento de 5 veces más que el control positivo.

#### IV. Discusión

Los fibroblastos son las células más importantes del tejido conectivo propiamente dicho, como tendones, fascias, la capa adventicia de las venas y arterias, así como en la dermis de la piel. El reemplazo de los fibroblastos es esencial para mantener el equilibrio celular y la síntesis de matriz extracelular. Los cambios en su metabolismo alteran el perfil de expresión génica o disminuyen su tasa de proliferación, lo cual puede ser consecuencia de senescencia, degeneración celular o por factores externos como trauma, ausencia de factores y nutrientes la exposición a fármacos, tales como los esteroides y las fluoroquinolonas.<sup>(16)</sup>

Se ha reportado que la tendinitis y la ruptura de tendones está asociada al uso crónico de las fluoroquinolonas, específicamente del ciprofloxacino.<sup>(17,18)</sup> Las fluoroquinolonas, por ser antibióticos de amplio espectro, son ampliamente prescritos para infecciones del tracto intestinal, genitourinario, respiratorio y las infecciones crónicas de tejidos blandos y músculo esqueléticos. En el caso de los pacientes grandes quemados, constituyen uno de los antibióticos de elección en los procesos de cirugía plástica reconstructiva, y se administran por períodos

prolongados. El mecanismo de acción de las fluoroquinolonas para inhibir la replicación celular en eucariontes no está bien dilucidado. Reportes previos han demostrado que el ciprofloxacino causa arresto del ciclo celular en la fase S en células de melanoma por inhibición de la topoisomerasa II y también apoptosis, mediada por el daño a la membrana mitocondrial; sin embargo, en tenocitos el arresto del ciclo celular ocurre en la fase G2/M<sup>(19, 20, 21)</sup> lo que podría explicar el efecto inhibitorio de los FPH expuestos a concentraciones crecientes de ciprofloxacino (figura 3 y 4). Las dosis ensayadas con 80 y 200 µg/ml de ciprofloxacino son congruentes con lo reportado por otros grupos. Este fenómeno es provocado principalmente por apoptosis inducida por la disminución de la proporción Bcl-2/Bax, lo que genera una translocación de Bax a la membrana mitocondrial con la consecuente activación de la caspasa 3.<sup>(22)</sup> No se ha descrito la posible participación de la proteína Egr-1 en la inhibición del crecimiento de los FPH fue definida por el sistema reportero utilizado en este modelo. Una de las ventajas de la estrategia utilizada fue el uso del gen de la luciferasa, una proteína de actividad enzimática que solo se expresa en las luciérnagas y no en células humanas, usando un adenovirus recombinante tipo 5 no replicativo. La expresión del transgen introducido por el adenovirus recombinante es de localización episomal, (no se integra al genoma del huésped) por lo que la expresión transitoria se puede observar hasta los 28 días incluso en modelos in vivo, lo que permite observar los cambios en la regulación transcripcional por días.<sup>(14)</sup> Sin embargo, los cambios en la actividad transcripcional del promotor, como todo proceso de regulación génica, se pueden observar a los minutos y horas tempranas en muchos reportes previos.

En el caso de los FHP transducidos con Ad-Egr-1-Luc y expuestos a ciprofloxacino, se observó una inhibición de la proliferación celular (Figura 4) que se manifiesta desde el día 4 hasta el día 10, pero también una inhibición de la actividad transcripcional del promotor a las dosis terapéuticas ensayadas. (10 y 20 µg/ml) en las primeras horas post-exposición. Las CL de la actividad del promotor en las células transducidas

y expuestas a los dos fármacos muestran una reversión del efecto inhibitorio del ciprofloxacino hasta 5 veces mayor comparado con el control basal y que se incrementa con la concentración mayor de EGF-1.

EGF-1 es un péptido de 51 aminoácidos que activa la cascada de señalización a través de su receptor membranal (EGFR) que culmina con la activación de la vía MAPK/ERK. En estudios previos se ha reportado que EGF-1 puede revertir la inhibición del crecimiento inducido por la dexametasona en este mismo modelo. <sup>(16)</sup> Este fenómeno puede ser resultado del mecanismo de acción de EGF-1 que activa las vías mitogénicas, entre las cuales, se encuentra la activación de Egr-1 que se ha descrito como un factor de crecimiento temprano que activa la vía de las MAP-Kinasas/ERK <sup>(23,24)</sup>

Considerando que EGF-1 se encuentra en la parte inicial de la cascada de activación de las vías mitogénicas, es posible que el incremento de la activación del promotor obedezca a una potenciación para activar la transcripción de genes miogénicos.

## Conclusiones:

El uso crónico de las fluoroquinolonas ha sido reportado como un factor de riesgo para la ruptura de tendones posiblemente como efecto inhibitorio de la proliferación de los FPH, puede contribuir a la disminución de la tasa de replicación celular en estos tejidos in vivo en presencia de ciprofloxacino a las concentraciones terapéuticas usados en estos ensayos y que es revertido por EGF-1 en los ensayos de competencia. Por lo anterior, concluimos que la actividad del promotor Egr-1 en FPH es regulada negativamente por ciprofloxacino y positivamente por EGF-1. Finalmente, se requieren estudios posteriores para determinar la participación de las vías de transducción de señales para regular vías de proliferación celular en este modelo, así como la interacción de las fluoroquinolonas con las vías de replicación del ADN y sus efectos en el ciclo celular.

## Referencias

1. Zhang Y, Yan N, Wang X, Chang Y, Wang Y. MiR-129-5p regulates cell proliferation and apoptosis via IGF-1R/Src/ERK/Egr-1 pathway in RA-fibroblast-like synoviocytes. *Biosci Rep*. 2019;20:39(12): BSR20192009.
2. Gibbs JD, Liebermann DA, Hoffman B. Egr-1 abrogates the E2F-1 block in terminal myeloid differentiation and suppresses leukemia. *Oncogene*. 2008 3;27(1):98-106.
3. Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, Chesterman CN, Khachigian LM. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med*. 2003 9(8):1026-32.
4. Sakamoto KM, Fraser JK, Lee HJ, Lehman E, Gasson JC. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 signaling pathways converge on the CREB-binding site in the human Egr-1 promoter. *Mol Cell Biol* 1994; 14:5975-5985.
5. Francisco Martínez-Flores, Araceli Barrera-L, Hugo-E Sandoval-Z, Catalina Machuca-R, Ricardo García-Cavazos; Juan A. Madinaveitia-V. David T Curiel, Alejandro Zentella-Dehesa. Activity of Egr-1 Promoter Induced by UV Light in Human Primary Dermal Fibroblasts transduced with Ad-egr-1luc is repressed by Betamethasone. *Gen Ther Mol Biol* 2013; 15: 92-106.
6. Sakamoto KM, Bardeleben C, Yates KE, Raines MA, Golde DW, Gasson JC. 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, EGR-1/TIS8. *Oncogene* 1991;6:867-871.
7. Aicher WK, Sakamoto KM, Hack A, Eibel H. Analysis of functional elements in the human Egr-1 gene promoter. *Rheumatol Int* 1999; 18:207-214.
8. Rolli M, Kotlyarov A, Sakamoto KM, Gaestel M, Neininger A. Stress-induced stimulation of early growth response gene-1 by p38/ stress-activated protein kinase 2 is mediated by a cAMP-responsive promoter element in a MAPKAP kinase 2-independent manner. *J Biol Chem* 1999; 274:19559-19564.
9. Campoli-Richards DM, Monk JP, Price A, Benfield P, Todd PA, Ward A. Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*. 1988;35(4):373-447.
10. LeBel M. Ciprofloxacin: chemistry, mechanism of action, resistance, antimicrobial spectrum, pharmacokinetics, clinical trials, and adverse reactions. *Pharmacotherapy*. 1988;8(1):3-33.
11. Nagoba BS, Gandhi RC, Hartalkar AR, Wadher BJ, Selkar SP. Simple, effective and affordable approach for the treatment of burns infections. *Burns*. 2010 ;36(8):1242-7.
12. Alves C, Mendes D, Marques FB. Fluoroquinolones and the risk of tendon injury: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2019;75(10):1431-1443.
13. Popowski E, Kohl B, Schneider T, Jankowski J, Schulze-Tanzil G. Uremic Toxins and Ciprofloxacin Affect Human Tenocytes In Vitro. *Int J Mol Sci*. 2020;14;21(12):4241.
14. Martínez-Flores F, Jiménez-Orozco FA, Villegas-Castrejón H. Molecular Biology of Adenoviral Vectors, *Cir Cir* 2006; 74:483-493.
15. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:2509-2514.
16. Martínez-Flores F, Sandoval H, de la Vega EA, García-Cavazos RJ, Jiménez-Orozco FA, Valdes-Flores M, Madinaveitia-Villanueva JA. Identification of drugs as regulators on the activity of Egr-1 promoter in human fibroblasts transduced with AdΔEgr-1-Luc7. *Cir Cir*. 2018;86(3):228-236.
17. Martínez-Flores F, Machuca-Rodríguez C, Sandoval-Zamora H, Aguirre-Cruz L, Valdez-Flores M, Villegas-Castrejón H. Fármacos esteroides y el GM-CSF modulan la actividad de Egr-1 en células de glioma. *Cir Cir*. 2013;81(1):3-13.
18. Pantalone A, Abate M, D'Ovidio C, Carnevale A, Salini V. Diagnostic failure of ciprofloxacin-induced spontaneous bilateral Achilles tendon rupture: case-report and medical-legal considerations. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(2):519-22.
19. Beberok A, Wrześniok D, Minecka A, Rok J, Delijewski M, Rzepka Z, Respondek M, Buszman E. Ciprofloxacin-mediated induction of S-phase cell cycle arrest and apoptosis in COLO829 melanoma cells. *Pharmacol Rep*.

- 2018;70(1):6-13.
20. Aranha O, Grignon R, Fernandes N, McDonnell TJ, Wood DP Jr, Sarkar FH. Suppression of human prostate cancer cell growth by ciprofloxacin is associated with cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Oncol.* 2003;22(4):787-94.
  21. Aranha O, Wood DP Jr, Sarkar FH. Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2-M cell cycle arrest, and apoptosis in a human transitional cell carcinoma of the bladder cell line. *Clin Cancer Res.* 2000 Mar;6(3):891-900.
  22. Tsai WC, Hu CC, Tang FT, Wong AM, Chen YC, Pang JH. Ciprofloxacin-mediated cell proliferation inhibition and G2/M cell cycle arrest in rat tendon cells. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1657-63.
  23. Kim J, Jung E, Ahn SS, Yeo H, Lee JY, Seo JK, Lee YH, Shin SY. WNT11 is a direct target of early growth response protein 1. *BMB Rep.* 2020;53(12):628-633.
  24. Shan J, Dudenhausen E, Kilberg MS. Induction of early growth response gene 1 (EGR1) by endoplasmic reticulum stress is mediated by the extracellular regulated kinase (ERK) arm of the MAPK pathways. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866(3):371-381.