

DISCUSIÓN

En la segunda parte de este trabajo se sintetizó un análogo de la bacteriocina Plantaricina 149, identificado como: PIn149a; se evaluó su actividad antimicrobiana y se realizaron estudios conformacionales por Dicroísmo circular y Fluorescencia en diferentes medios solventes.

PIn149a se obtuvo mediante síntesis en fase sólida con un rendimiento del 34 %, siendo el pico mayoritario, que eluye al 40 % de ACN, el que corresponde a la bacteriocina sintética de acción antibacteriana (Figura 1-2). Los otros picos no presentaron actividad antimicrobiana.

El péptido fue purificado mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) semipreparativa. Los controles de pureza mediante HPLC analítico demostraron una pureza mayor al 95 % (Figura 2-2), que fue corroborada por Espectrometría de masa (Figura 3-2) y posterior secuenciamiento mediante el método de Edman.

De acuerdo a lo reportado por los autores que aislaron la bacteriocina natural (Kato y col., 1994), Plantaricina 149 no presentó actividad inhibitoria hacia las cepas patógenas o causantes de ETAs como *Listeria monocytogenes* VTU 206 y *Staphylococcus aureus* ATCC 4012 y ATCC 14498, pero sí frente a cepas cercanas taxonómicamente a la cepa productora.

En la Tabla 1-2 se observa el espectro inhibitorio del análogo sintetizado en este trabajo (PIn149a), el cual resultó ser activo frente a 4 cepas del género *Listeria* y una cepa de *Staphylococcus aureus* coagulasa-positiva, pertenecientes a la colección del Dpto. de Tecnología de la Univ. Nac. De Luján y a la colección propia.

La CIM de PIn149a fue de 264 μ M frente a *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3, y mayor a 528 μ M frente a *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21. En la literatura se ha reportado, por ejemplo para Plantaricina A-22, CIM de 0.3 μ M frente a *Lactobacillus plantarum* 965 y del orden de 10 μ M o mayor frente a *Pediococcus pentosaceus* NCDO990 y *Carnobacterium piscicola* U149 (Hauge y col., 1998). Es de destacar que no se han encontrado informes referidos a determinaciones de CIM de Plantaricina

A-22 frente a patógenos alimentarios tales como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

La actividad antimicrobiana de PIn149a frente a *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 a pH 5.5 fue mucho menor que la reportada para el péptido aislado a partir de la cepa productora.

Los resultados obtenidos indican que el análogo sintético de Plantaricina 149 (PIn149a) presenta un espectro antimicrobiano diferente a la bacteriocina nativa. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las cepas utilizadas en este trabajo son distintas a las utilizadas por Kato y col. (1994), y que los compuestos difieren en la funcionalización del extremo C-terminal, y consecuentemente en su carga neta.

Si se tiene en cuenta que la interacción inicial de estos compuestos catiónicos con las membranas de las bacterias sensibles es de naturaleza electrostática, esto implica que la carga es un factor que incide sobre la actividad, como ha sido reportado en la literatura (Sitaram y col., 1999; Dathe y col., 2001); PIn149a presenta un 36 % de residuos aminoacídicos hidrofóbicos y 6 residuos de Lisina (K), y está funcionalizada como amida en su extremo C-terminal, con una carga neta de +7; en cambio el péptido nativo (Plantaricina 149) tiene carga neta +6, dado que su extremo C-terminal se encuentra funcionalizado como ácido carboxílico.

De acuerdo a lo reportado para el péptido natural, el mismo demostró tener una acción bactericida frente a la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (Kato y col., 1994); en cambio, PIn149a presentó acción bactericida frente a *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3 y *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21, como se pudo demostrar a través de los ensayos sobre evolución de la viabilidad de las dos cepas bacterianas, en presencia del péptido, a una concentración 82.4 μM y pH 7.4. En estos ensayos se determinó que cuando se agregaba la solución de PIn149a a un cultivo en fase logarítmica de *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3 o *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21, el número de células viables por mL disminuía desde 1.10^7 a valores menores a 10^2 UFC/mL, luego de 6 h de incubación. El descenso de las poblaciones microbianas continuó hasta que, a partir de las 12 h de cultivo y hasta las 24 h (tiempo

máximo ensayado), ya no se detectaron células viables por cultivo y conteo en placas de las muestras obtenidas en los diferentes tiempos ensayados.

En el cultivo control, el número de células viables por mL de las mismas cepas indicadoras se incrementó progresivamente desde 10^7 hasta aproximadamente $3.6 \cdot 10^8$ UFC/mL, luego de un período de incubación de 24 horas (Figura 4-2).

En cuanto a la actividad hemolítica, se detectó actividad lítica del orden del 15-16 %, no observándose variación de la capacidad hemolítica con la concentración de péptido (desde 50 a 500 $\mu\text{g/mL}$). Esto puso en evidencia una importante selectividad del análogo hacia la membrana bacteriana.

Existen reportes en la literatura sobre estudios conformacionales de plantaricinas; por ejemplo, Plantaricinas E/F y J/K (PInE/F y PInJ/K) y Plantaricina A-22 (PInA-22) se encuentran no estructuradas en medio acuoso, y en presencia de TFE y micelas de docecilsfosfolina o liposomas cargados negativamente estas bacteriocinas adoptan una estructura predominantemente helicoidal, pero se estructuran muy poco en presencia de liposomas zwitteriónicos (Hauge, y col., 1998 y 1999). Lo mismo ocurre con la variante de 26 aminoácidos de Plantaricina A (PInA-26), que ha sido estudiada en su estructura tridimensional mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la región comprendida entre los residuos T₁₂ y K₂₃ adopta una estructura de α -hélice anfipática en presencia de micelas de dodecilsfosfolina (Kristiansen y col., 2005).

PInA-22 (YSLQMGATAIKQVKKLFKKWGW) y PInA-26 (KSSAYSLQMGATAIKQVKKLFKKGG-amida) son bacteriocinas con las cuales PIn149a (YSLQMGATAIKQVKKLFKKGG-amida) presenta una elevada homología de secuencia. Los momentos hidrofóbicos (μH) de PInA-22 y PIn149a calculados mediante la ecuación de Eisenberg son muy similares, 0.60 y 0.55 respectivamente. También hay una muy pequeña diferencia en la hidrofobicidad entre ambas plantaricinas, 0.05 y -0.07 para PInA-22 y PIn149, respectivamente.

Teniendo en cuenta la información citada en los párrafos anteriores se realizaron sobre PIn149a análisis predictivos de estructura secundaria y estudios conformacionales mediante DC y Fluorescencia inducidos por diferentes solventes y

micelas de AOT. Mediante Antheptrot 4.0 (Método Garnier) y PSIPRED los resultados de las predicciones de estructura sobre Pln149a se aproximaron a los valores encontrados para PlnA-26, ya que asignaron una región de alto contenido en α -hélice a la comprendida entre los residuos Q₄ - K₁₉ y M₅ - K₁₉ respectivamente. Utilizando el software SP³ 1.0 (Zhou y col., 2005) se obtuvo un modelo molecular de Pln149a donde se observa que la región más anfipática (μ H = 0.78) corresponde a la comprendida entre los residuos: T₈ - K₁₉, con los residuos polares T₈, K₁₁, K₁₄, K₁₅, K₁₈ y K₁₉ de un mismo lado de la hélice, y los residuos no polares A₉, I₁₀, V₁₃, L₁₆, F₁₇ del otro lado (Figuras 1-d2 y 2-d2).

Figura 1-d2: Representación de la región helicoidal más anfipática de Pln149a.

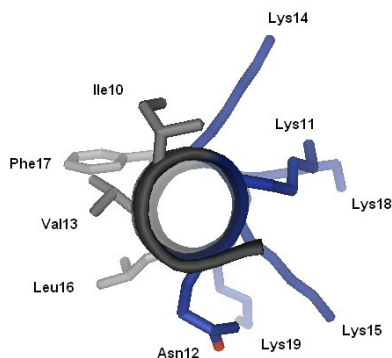
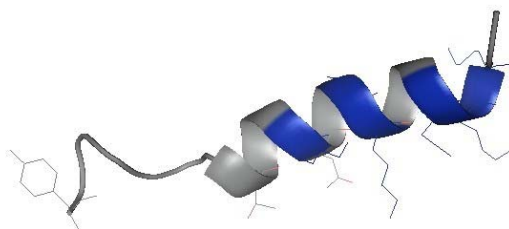


Figura 2-d2: Modelo molecular de Pln149a obtenido mediante el programa SP³ 1.0 (Zhou y col., 2005).



La visualización de las estructuras se realizaron mediante el programa Pymol V 0.95 (Delano, 2002).

Mediante DC PIn149a presentó en medio acuoso una estructura no ordenada, como es de esperar para un péptido pequeño en dicha solución (Figura 5-2a). La deconvolución del espectro de DC confirmó lo expuesto, con resultados de 86.4 % de estructura no ordenada, lo cual es consistente con el mínimo pronunciado a 198 nm observado en el espectro. Para la deconvolución de los espectros de péptidos con alto contenido en estructura no ordenada, es necesario utilizar una base de datos de referencia integrado por 48 proteínas, la cual incluye espectros de proteínas desnaturalizadas (Sreerama y col., 2000).

En buffer fosfato de sodio pH 7.4, el espectro de DC de PIn149a mostró un mínimo alrededor de 198 nm (Figura 5-2b), indicativo de una estructura fundamentalmente no ordenada, al igual de lo observado en medio acuoso. La deconvolución de este espectro indicó un 68 % de estructura no ordenada, y 32 % de lámina- β , demostrando que en buffer pH 7.4 el péptido está más ordenado que en agua. En buffer fosfato de sodio pH 5.5 se determinó un 80 % de estructura no ordenada, 18 % de lámina- β y 2 % de α -hélice. Los resultados evidencian que el péptido se presenta bajo diferentes arreglos estructurales a diferentes pH.

El espectro de DC de PIn149a se modificó con el agregado de TFE, solvente que tiene la capacidad de inducir la formación de estructuras tipo α -hélice, así como en presencia de micelas inversas de AOT. En TFE, se observaron dos mínimos cercanos a 206 y 223 nm, y un máximo a 190 nm, los cuales estarían básicamente asociados a contribuciones de estructuras tipo α -hélice (Figura 5-2 a) (Sönnichsen y col., 1992). La deconvolución de los espectros mediante los programas SELCON3, CONTILL, demostró un aumento en el contenido en α -hélice al aumentar el porcentaje de TFE del medio, pasando de 47.3 % de α -hélice al 20 % de TFE, al 99 % en presencia de 80 % de TFE.

En presencia de micelas inversas de AOT ($W_o=16$) la estructura conformacional de PIn149a también se estabilizó; el espectro de DC, similar tanto a pH 7.4 como a pH 5.5, muestra dos mínimos a 206 y 222 nm, y un máximo a 194 nm, asociados a transiciones tipo α -hélice (Woody y col., 1996). Mediante la deconvolución se observó

un incremento en el contenido de α -hélice a 74 %, y una disminución de lámina beta y no ordenada al 26% en el caso de micelas en buffer fosfato pH 7.4; en forma similar, se determinó un 78 % de α -hélice y 22 % de estructura no ordenada en micelas en buffer fosfato pH 5.5 (Tabla 2-2). Los resultados de los experimentos de DC realizados sobre PIn149a en micelas inversas de AOT sugieren que la estructura helicoidal se estabiliza mediante interacciones electrostáticas entre los residuos cargados de lisina (carga neta del péptido +7) y el surfactante aniónico.

Los resultados de los experimentos de Fluorescencia en buffer fosfato pH 7.4 fueron coherentes con los datos obtenidos mediante DC en el mismo medio, ya que el $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión a 310 nm observado para PIn149a en buffer pH 7.4 es característico de la exposición total del residuo de tirosina al medio ambiente acuoso, polar (Lakowicz, J.R., 1999) (Figura 6-2). Por otra parte, hubo escasa diferencia en los valores de las constantes de Stern-Volmer calculadas mediante las experiencias de apagamiento con ión yoduro sobre PIn149a y tirosina libre, ambos en medio acuoso (Figura 7-2), sugiriendo que el residuo de tirosina del extremo N-terminal de PIn149a se encuentra totalmente expuesto a la acción del apagador en dicho medio.

En presencia de micelas de AOT no se observaron cambios en el $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión con respecto al medio acuoso ($\lambda_{\text{máx}}$: 310 nm). La supresión de la fluorescencia observada en micelas de AOT puede estar relacionada con la formación de una estructura tipo α -hélice en dicho medio, o bien ser consecuencia de la interacción con las cabezas aniónicas del AOT (Figura 6-2). La constante de Stern-Volmer para PIn149a frente a las micelas presenta una disminución moderada si se la compara con la constante obtenida para el péptido en solución buffer (Figura 8-2). Estos resultados sugieren que el residuo de tirosina del extremo N-terminal de PIn149a se sitúa cercano a las cabezas polares de las moléculas de AOT (Jelokhani y col., 2002; Poveda y col., 2003).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con Pln149a en su conjunto, y en particular los obtenidos de experimentos de DC y Fluorescencia en micelas inversas de AOT sugieren que el péptido inicialmente interactuaría en forma electrostática con la membrana de la bacteria a través de los múltiples residuos de lisina, adoptando una estructura helicoidal anfipática, ubicándose en forma paralela a la membrana. No se deduce de estos estudios que el péptido pueda insertarse en el núcleo hidrofóbico de la membrana. No obstante, a fin de profundizar en este aspecto, sería necesario realizar estudios estructurales empleando otros sistemas biomiméticos y preparando nuevos análogos de sustitución sobre posiciones estratégicas de la secuencia, a fin de investigar sus efectos. Los resultados son compatibles con un mecanismo de acción tipo “carpetas”, propuesto para péptidos helicoidales anfipáticos, lineales, altamente catiónicos y con acción selectiva hacia las membranas bacterianas. Éste mecanismo propone que el péptido interactúa con las cabezas de los lípidos de membrana mediante interacciones electrostáticas ubicándose en forma paralela a ella, hasta que alcanza una concentración a partir de la cual produce la permeabilización de la membrana (Shai y col., 2002; Giangaspero y col., 2001).

El bajo peso molecular de Pln149a, y fundamentalmente su actividad a pH 5.5 hacia bacterias patógenas causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA_s), la hacen atractiva tecnológicamente para ser utilizada como preservador alimentario. Por otra parte, la actividad antimicrobiana detectada a pH 7.4 hacia bacterias Gram-positivas despierta nuestro interés en evaluar su potencial utilidad a nivel terapéutico. Estos péptidos purificados a homogeneidad podrían evaluarse como alternativa en el tratamiento de infecciones bacterianas producidas por *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, etc., microorganismos resistentes a la mayor parte de los antibióticos conocidos y causantes de algunas patologías del hombre y los animales (acné y eczemas infecciosos). Será necesario realizar nuevas pruebas con un mayor número de cepas diferentes de las especies bacterianas frente a las cuales Pln149a

mostró en este trabajo actividad inhibitoria, con el objeto de dejar establecida su importancia para un futuro desarrollo como antibiótico.