

PLAN DE TRABAJO TESIS DOCTORAL: SANTIAGO CLAVER

“ESTUDIO DE BIOMOLÉCULAS DE ORIGEN VEGETAL CON POTENCIAL CAPACIDAD INHIBITORIA ANTIMICROBIANA GENERAL Y SOBRE MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANOS INDUCIBLES”

Objetivo:

El presente plan de tesis pretende investigar y aprovechar la diversidad ofrecida por la biomasa vegetal nativa para la obtención de compuestos bioactivos de alto valor biotecnológico, ya sea mediante su obtención directa, o como moléculas recombinantes, que tengan potencial acción como agentes antimicrobianos y antifúngicos, para su utilización en la industria farmacéutica, alimentaria y la biomedicina.

Antecedentes:

Los productos naturales constituyen una de las mayores fuentes para el desarrollo de medicamentos o aditivos alimentarios, debido a su diversidad química y a que se les supone una toxicidad inicial limitada al encontrarse en seres vivos.

La búsqueda de este tipo de moléculas promueve el estudio de nuevos productos naturales para el reemplazo a futuro de los compuestos obtenidos artificialmente. Se sabe que el grado de homología, en cuanto a las características estructurales más relevantes, de los compuestos sintéticos con respecto a los naturales estudiados es del 60% y se estima solamente haber abarcado el 10% de la biodiversidad mundial. A estas estadísticas debemos agregar que la búsqueda en fuentes naturales –por sí misma- contribuye significativamente al conocimiento bioquímico y biológico de las especies estudiadas.

Una de las contribuciones de el estudio de nuevos compuestos naturales como agentes antimicrobianos es su potencial y necesario uso para el reemplazo de medicamentos que además de ser sintéticos, no pueden ser usados debido a la resistencia adquirida en los últimos tiempos por las distintas cepas bacterianas. Ya desde el descubrimiento en 1940 de las penicilinas, hasta nuestros días, grande ha sido el camino recorrido en materia de resistencia bacteriana, fenómeno que hoy en día, provoca una de las mayores preocupaciones del médico moderno.^{1,2}

Después de este descubrimiento, basado en estudio de cultivos de *E. coli*, vino la confirmación de Kirby y colaboradores en 1944 de que la resistencia de ciertas cepas de *Staphylococcus aureus* ante las penicilinas, era provocada por la misma causa. De igual forma fueron sumándose posteriormente, a través de todos estos años, nuevos informes de resistencia de gérmenes, tantos gram positivos como gram negativos, ante los antimicrobianos betalactámicos provocado por la producción de dichas enzimas, que posteriormente fueron llamadas betalactamasas, ya que no solo hidrolizan las penicilinas sino también las cefalosporinas, así como los monobactámicos y más recientemente los carbapenémicos^{3,4}.

Los primeros mecanismos de resistencia bacteriana inducible se reportaron en Alemania en 1983 con una betalactamasa de espectro extendido (BLEE) que fue aislada de una cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Años después, en Francia, fueron aisladas cepas del mismo germen produciendo otra tipo de betalactamasas, las TEM-3, producto de mutaciones de la TEM-1, también pertenecientes al grupo 2b de la clasificación de Bush y col. A partir de aquí este fenómeno se fue extendiendo y hoy se han descrito más de 100 BLEE derivadas de la TEM-1 y TEM-2 y más de 50 BLEE derivadas de la SHV-1, pertenecientes al grupo 2b de Bush y col.

^{5,6,7,8,9,10,11}

Cabe destacar que las enterobacterias han llevado la delantera en este tipo de resistencia, destacándose llamativamente cepas de *K pneumoniae* y *E. coli*, reportándose una incidencia en América Latina del 45% y 8% de las cepas aisladas respectivamente. También han sido encontradas en cepas de *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y otras.

Dentro de los factores predisponentes implicados en la aparición de este tipo de cepas productoras de BLEE se encuentra, encabezando el grupo, el uso indiscriminado de las cefalosporinas de tercera generación, seguido de las largas estadías hospitalarias, ventilación mecánica, catéteres endovenosos y urinarios, hemodiálisis y nutrición parenteral

Este tipo de BLEE presenta como característica principal la capacidad de hidrolizar las oximiinocefalosporinas (Ceftriaxona, Cefotaxime, Ceftazidima) y el Aztreonam, quedando sensible frente a las cefamicinas (Cefoxitin, Cefotetam) y los carbapenémicos (Imipenem, Meropenem, Ertapenem) ^{11,12,13}. Muchas cepas productoras de BLEE tienen la característica de ser multirresistentes, ya que son portadoras de otros genes que provocan resistencia a las quinolonas, aminoglucósidos ecotrimoxazol, etc.

Hoy en día, en distintos Hospitales del Partido de La Plata ya han surgido cepas con capacidad productora de BLEE, Meticilino resistencia y cepas con KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapemensa*). Estas cepas con capacidad de soportar niveles terapéuticos de los antibióticos en uso, generan un nuevo desafío para el tratamiento de infecciones bacterianas y fuerzan permanentemente a los profesionales de la salud a desarrollar nuevas conductas a la hora de aplicar un tratamiento y buscar distintas moléculas con capacidad bactericida o bacterioestática.

Biomoléculas de origen vegetal de potencial acción en la industria alimentaria y en biomedicina

Como hemos nombrado precedentemente, son muchas las razones por las cuales la tecnología moderna debe continuar avanzando en la búsqueda de productos naturales con propiedades biológicas y aprovecharse de la gran biodiversidad que ofrece la biomasa vegetal nativa. Por este motivo se propone ampliar dicho estudio e investigar nuevas biomoléculas de origen natural que tengan potencial aplicación en los distintos campos citados.

Entre estas moléculas podemos citar a los compuestos proteicos y peptídicos naturales; y dentro de estos nos focalizaremos en las proteasas, los inhibidores de proteasas (IPs) y los péptidos bioactivos obtenidos a partir de proteínas alimentarias. Tanto las proteínas funcionales (proteasas e IPs) como los péptidos bioactivos están cobrando gran importancia ya que, además de su papel nutricional por ser fuente de aminoácidos, son capaces de ejercer diferentes efectos biológicos específicos sobre el sistema inmune, el sistema cardiovascular o el tracto gastrointestinal. Además, se ha descrito que estos péptidos y proteínas pueden tener efectos anticancerígenos, antibacterianos o antivirales. Muchos compuestos antimicrobianos naturales son revisados actualmente por sus posibles aplicaciones en los alimentos como biopreservadores o para aumentar su vida útil. Generalmente, los alimentos reciben tratamientos térmicos para destruir microorganismos nocivos, acción que puede alterar sus propiedades organolépticas y su valor nutricional. Mediante el empleo de técnicas de bioconservación se ha logrado extender la vida útil del alimento y aumentar su bioseguridad, por ejemplo mediante el uso de la microflora natural o controlada, y/o sus productos antibacterianos.

Construcción de la hipótesis y justificación general de la metodología de trabajo

La producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) es una estrategia extendida usada para la defensa por muchos organismos. Los AMPs son componentes cardinales de inmunidad innata, constituyendo un mecanismo de defensa antiguo encontrado en organismos diversos, incluso microorganismos, artrópodos, plantas y animales¹⁴.

Las actividades biológicas presentadas por los AMPs los hacen atractivos para la biotecnología. Entre estas características están las actividades antimicrobianas, insecticidas e incluso antiparasitarias. Estas cualidades hacen a los péptidos buenos candidatos para el uso en ingeniería de proteínas y la producción transgénica de plantas agrónomicamente importantes que pueden combatir contra los patógenos y plagas. Además, la actividad antifúngica proporciona otra ventaja, ya que un péptido es activo contra varios fitopatógenos en concentraciones que van de 1 a 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Adicionalmente, pueden trabajar junto con otros compuestos antimicrobianos, confiriendo o reforzando la resistencia. Finalmente, pueden conferir adaptación al estrés abiótico además de la actividad antimicrobiana¹⁴.

Durante la última década se ha vuelto a visitar la vieja idea del uso potencial de AMPs como nuevas sustancias terapéuticas. Los AMPs presentan algunas actividades que han llamado la atención de los investigadores. Éstas incluyen (1) amplios espectros antimicrobianos, incluyendo virus, bacterias (Gram + y -), hongos, protozoarios y hasta células tumorales; (2) actividad a dosis bajas y muerte rápida de los microorganismos; (3) sinergismo con otros AMPs y también con terapéuticos clínicos; (4) capacidad de inactivar endotoxinas y así prevenir el shock séptico; (5) el desarrollo de resistencia es improbable puesto que principalmente su blanco es la membrana plasmática; (6) su toxicidad a las células de los mamíferos es generalmente baja; (7) algunos AMPs presentan capacidad de modular la respuesta inmune innata en los mamíferos, abriendo nuevas oportunidades terapéuticas¹⁴.

Como habíamos nombrado anteriormente, un ejemplo de potenciales AMPs son los inhibidores peptídicos de proteasas (IPPs). Los mismos tienen importantes aplicaciones en la biomedicina, la biotecnología y el diagnóstico. En el caso de los inhibidores peptídicos de origen vegetal, son sumamente escasos los estudios referidos a material botánico de la flora Argentina. Dada la gran biodiversidad vegetal existente en nuestro país resulta de sumo interés la implementación de una búsqueda de nuevas moléculas naturales capaces de modificar o modular el crecimiento bacteriano, y/o sus mecanismos de resistencia inducible (BLEE, KPC, entre otras), lo que permitiría un tratamiento efectivo con antibióticos clásicos sobre infecciones con cepas productoras de dichas enzimas.

Debemos resaltar que la evaluación del potencial estudio y aplicación de éstas biomoléculas debiera efectuarse antes de que haya un deterioro irreversible del medio ambiente en donde se encuentran y puedan llegar a extinguirse.

Objetivos específicos:

Con todo esto; y aprovechando también mi experiencia en el estudio bioquímico y estructural de las proteínas, sus aplicaciones biotecnológicas y la infraestructura disponible en el LIPROVE, en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital San Juan de Dios y en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Habana, Cuba. Se propone a partir de diferentes extractos vegetales detectar, purificar, caracterizar bioquímicamente, clonar y aplicar técnicas antimicrobianas sobre nuevas biomoléculas que demuestren posibilidades de potenciales aplicaciones a nivel farmacéutico y biomédico.

Metodología

Material vegetal:

Se utilizarán como material vegetal todos aquellos disponibles y estudiados por el Dr. Walter David Obregón y el Dr. Juan Abreu Payrol. Entre ellos podemos destacar frutos de la Familia: Bromeliaceae, (*Bromelia pinguin*), Rubiaceae (*Morinda citrifolia*), Asclepiadaceae (*Araujia hortorum*, *Araujia angustifolia*), Caricaceae (*Carica papaya*), entre otros. A partir de los cuales se obtuvieron, aislaron y estudiaron una gran diversidad de proteasas.

También se emplearán inhibidores de proteasas obtenidos a partir de la familia Solanaceae (*Solanum tuberosum*), sumamente rica en este tipo de moléculas; Oxaliaceae (*Oxalis tuberosa*); Basellaceae denominadas (*Ullucus tuberosus*), entre otras especies estudiadas.

Adicionalmente se estudiarán los efectos antimicrobianos de los péptidos generados por hidrólisis de proteínas alimentarias a partir de las proteasas citadas anteriormente.

Preparación de extractos y clarificación

Los diferentes órganos vegetales, fundamentalmente semillas, frutos y tubérculos, serán homogeneizados en un medio buffer, centrifugados y liofilizados. Los extractos crudos serán tratados mediante calentamiento, ácido tricloroacético (TCA) y/o filtrados por membranas de 10 kDa para eliminar interferencias de compuestos mayores. Las preparaciones crudas se someterán a una purificación inicial por precipitación acetónica, etanólica, salina fraccionada y/o ultracentrifugación, luego serán liofilizadas, previa confirmación que el proceso no afecta la actividad inhibitoria de las mismas; en caso contrario serán conservadas a -20°C con glicerol 10%.

Purificación de AMPs

El análisis por isoelectroenfoque (IEF), espectrometría de masas MALDI-TOF MS y electroforesis SDS-PAGE en condiciones nativas y desnaturizantes de las preparaciones que muestren actividad biológica permitirá definir la estrategia de purificación a adoptar. Las preparaciones serán purificadas mediante FPLC (cromatografía de intercambio iónico, exclusión molecular y/ cromatografía de afinidad). Una vez separadas las fracciones con actividad biológica serán sometidas a RP-HPLC. En cada etapa se establecerán el grado de purificación alcanzado y el porcentaje de recuperación de la actividad original.

Caracterización de los péptidos aislados

El grado de homogeneidad y la composición polipeptídica será evaluada por SDS-tricina PAGE, en condiciones nativas y desnaturizantes, isoelectroenfoque y electroforesis bidimensional. El peso molecular relativo se determinará por espectrometría de masas (MALDI TOF). El número de cisteínas también se determinará MALDI TOF MS de acuerdo a los valores de la masa antes y después de bloquear los residuos de cisteína por tratamiento con iodoacetamida. Se obtendrá la huella peptídica o peptide mass fingerprint (PMF) por digestión triptica y análisis de los péptidos obtenidos utilizando MALDI TOF/ MS.

Secuenciación parcial

La muestra será sometida a reducción y carbamidometilación de los residuos de cisteína y posterior digestión enzimática con la endoproteinasa LysC, Asp-N u otras endopeptidasas comerciales con especificidad de corte. Los productos de digestión serán analizados por MALDI-TOF MS y separados por HPLC en una columna de fase reversa y secuenciados por el método de Edman. Por otra parte se determinará la secuencia del extremo N-terminal también por el método de Edman de los péptidos purificados sin digerir. Las secuencias obtenidas serán analizadas empleando los algoritmos BLAST para establecer el grado de homología con otros péptidos bioactivos.

Clonado y expresión heteróloga:

Los AMPs que se hayan caracterizado bioquímicamente serán clonados y luego producidos como inhibidores recombinantes. Con este objeto se extraerá el RNA total del material vegetal seleccionado (hojas, látex, frutos), se hará la retrotranscripción por el método de 3'RACE-PCR¹⁵. Los productos específicos de la reacción se aislarán mediante PCR empleando primers específicos. Para confirmar que los productos de PCR corresponden a la secuencia del gen buscado, se realizará una reacción de Nested PCR. El DNA será entonces purificado por electroforesis en geles de agarosa al 2%, ligados al vector pGEM-T Easy y transformados en células de *E. coli* XL1-Blue¹⁶. Los clones positivos serán seleccionados y glicerizados para su conservación. El DNA plasmídico será aislado, analizado por digestión con enzimas de restricción y posteriormente secuenciado. Con las secuencias obtenidas para las distintas proteínas se realizará una búsqueda en las bases de datos utilizando el algoritmo PSI-BLAST para identificar las secuencias de los inhibidores. Para los AMPs de interés se determinará la secuencia de la región 5' de dicho gen mediante la técnica de 5'RACE-PCR empleando el kit comercial BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences Clontech); Se diseñarán primers específicos de expresión para aislar por PCR los genes completos de los AMPs de interés. El mismo será purificado y clonado en *E. coli*. Confirmada la presencia del gen seleccionado en el DNA plasmídico, estos productos serán clonados en *E. coli* TOP10F' a fin de obtener el material necesario para hacer la transformación en *Pichia pastoris*; previa ligación de dicho gen al vector de expresión extracelular, pPICZ_. Se seleccionarán los clones que tengan el gen y se analizarán los niveles de expresión en los sobrenadantes de los cultivos mediante la evaluación por SDS-PAGE y determinación de la actividad biológica específica. Para el escalado de la producción de los productos recombinantes se seleccionarán aquellos clones que hayan presentado los mayores niveles de expresión.

Determinación de la actividad antimicrobiana¹⁷

Se evaluará la actividad antimicrobiana de las peptidasas, los péptidos naturales (inhibidores de peptidasas) y los generados por hidrólisis enzimática (péptidos bioactivos). Como primera determinación, se realizará el ensayo de difusión en agar para determinar la capacidad inhibitoria en el crecimiento de microorganismos indicadores (*Escherichia coli* ATCC 11229 y *Bacillus cereus* ATCC 10876). Cada uno de ellos será cultivado en caldo nutritivo a 37°C durante 18-24 h. El inóculo se preparará en solución fisiológica, ajustando la turbidez al 0,5 de la escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Los inóculos se sembrarán con hisopo sobre placas de agar nutritivo, en las cuales se realizaron pocillos de 5 mm de diámetro en los que se colocarán 45 µl de soluciones 1 mg/ml, 200 µg/ml, 20 µg/ml y 5 µg/ml de los productos a ensayar. Las placas serán incubadas a 37 °C durante 24 horas y a continuación se registrarán los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (en milímetros). Los ensayos de poder

antimicrobiano se realizarán mediante el método de microdilución a partir de una solución de cada producto en microplacas de cultivo frente a cultivos de microorganismos Gram positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, Gram negativos (*Escherichia coli* ATCC 35218 7 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27855), entre otros, en una concentración de 10^8 UFC/mL. En todos los casos, se incluirán controles de esterilidad del compuesto a ensayar y del caldo nutritivo, así como también de la viabilidad de los microorganismos. Las microplacas serán incubadas 48 h bajo las condiciones apropiadas de crecimiento de cada microorganismo. Luego, se medirá la absorbancia a 600 nm (A600) de cada pocillo de la microplaca, calculando el porcentaje de la inhibición del crecimiento de cada microorganismo según:

$$\% \text{ de inhibición del crecimiento} = [1 - (Ac/A0)] \times 100$$

donde Ac representa la absorbancia en el pocillo con la concentración de producto c, y A0 la absorbancia del pocillo de control de crecimiento del microorganismo. La concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada cepa será la menor concentración de producto que inhibe completamente el crecimiento medible (A600=0).

Se realizarán ensayos de inhibición microbiana de bacterias patógenas del hombre y de bacterias contaminantes de los alimentos (géneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Salmonella*, coliformes, etc.) y de hongos y bacterias patógenos de plantas (géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, etc.). Para la determinación de la actividad antimicrobiana se empleará el método de difusión en agar con algunas modificaciones (Carrasco y col., 2002). La concentración inhibitoria mínima (CIM) será evaluada y determinada en aquellas muestras de AMPs que muestren eficacia frente a los microorganismos ensayados. Como controles positivos se emplearán distintos antibióticos, como sulfato de gentamicina (1.0 µg/ml), clindamicina (0.3 µg/ml) y nistatina (1.0 µg/ml).

Para el estudio de la modulación que puedan realizar estas biomoléculas sobre los mecanismos de resistencia inducible se probarán los antibióticos para la detección de dichos mecanismos en medios Muller Hilton adicionados con los distintos AMPs.

Las cepas de microorganismos patógenos serán ATCC (American Type Culture Collection) y serán provistas por el Servicio de Microbiología del Hospital San Juan de Dios. Además se probarán las distintas cepas aisladas en este servicio obtenidas de muestras clínicas reales con presencia de mecanismos inducibles. Cabe aclarar que el mencionado servicio es uno de los 89 laboratorios integrantes de la RED WHONET, organismo creado para la vigilancia de la resistencia a los antibióticos en la Argentina.

1. Abraham, EP, Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940; 146: 837.
2. Morejón M. HISTORIA DE LA ANTIBIOTICOTERAPIA. Monografía- Medicina Interna; www.cursosparamedicos.com
3. Kirby, WMM Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 1944; 99: 452-453.
4. Abarca G, Herrera ML. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev Med Hosp. Nac Niños*. 2001;36(1-2): 77-104 .
5. Sanchez B. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). *Rev Electrónica de Medicina Intensiva* 2004; 6 (4) 8.
6. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 June; 39(6): 1211–1233. PMID: PMC162717
7. B-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1233.
8. Jacques F. Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (Sup 1): S 17- S 18
9. Mulgrave L.: Extended Spectrum -Lactamase Detection in the Clinical Laboratory: A Mini-Review. *Australian Society for Antimicrobials* 1999; 200: 35
10. Damaso D. Mecanismos de resistencia a los antibióticos. , Ed MARKETING PHARM, S.A. Madrid, 1990,pg; 47-69.
11. Pujol M, Peña C. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21(2):69-7112 Sanchez B. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). *Rev Electrónica de Medicina Intensiva* 2004; 6 (4) 8.
- 13 Gobernado M. Betalactamasas de espectro extendido en aumento. *Rev Esp Quimioterap* 2005;18(2):115-117
14. Review. Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. Andre´ de Oliveira Carvalho, Valdirene Moreira Gomes. *Peptides* 30, 2009. 1007–1020.

- 15 Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R. (1988). "Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8998-9002
- 16 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 17 Gudiña, E.J.; Rocha, V.; Teixeira, J.A.; Rodrigues, L.R. (2010). "Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20". *Lett. Appl. Microbiology*, 50:419-424