UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

"PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DEL PEPTIDO ANTIMICROBIANO GICINA A"

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica, área de especialización Toxicología y Diagnóstico Molecular y
Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

ALONSO ANDRÉS FERRER SILVA

Director de Tesis

Dr. Gino Corsini Acuña

SANTIAGO- CHILE
2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

ALONSO ANDRÉS FERRER SILVA

Ha sido aprobado por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____del 2011.

Director de Tesis:

Dr. Gino Corsini Acuña _____

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez (Presidente) _____

Dra. Inés Contreras _____

Dra. María Inés Becker _____

“Dedicada a los ángeles que nos cuidan en el cielo”

“Nothing in the world can take the place of Persistence.
Talent will not; nothing is more common than unsuccessful men with talent.
Genius will not; unrewarded genius is almost a proverb.
Education will not; the world is full of educated derelicts.
Persistence and determination alone are omnipotent.
The slogan 'Press On' has solved and always will solve the problems of the human race”.

Calvin Coolidge

30th president of US (1872 - 1933)

Agradecimientos

Primero que todo quiero agradecer a Dios, por guiarme por el hermoso camino de la búsqueda de la verdad.

En estos momentos son tantas las personas a las que les debo mi formación tanto profesional como personal. Quiero agradecer a mi familia que ha sido un pilar fundamental en mi vida, consejeros en casi todas mis decisiones y un apoyo en todo momento. Gracias a mi madre Rosa y mis hermanos Nicolás y Camila por ser como son. Agradecer a mi padre por su apoyo. También a mis compañeros y amigos de carrera que han sido y aun continúan siendo incondicionales, en especial a Matías, Claudia, Valentina, Juanito, Cataldo, Freddy, Fanta y Checho entre tantos que me ofrecieron su amistad. Al grupo legendario de "Los de Atrás".

Quiero agradecer a todos los integrantes de la comunidad universitaria perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Allí conocí a muchas personas de gran calidad humana como la asistente social Ximena Escanilla quien me apoyo en tantos momentos tanto emocionales como económicos. Gracias a ella podía almorzar algunos días y no seguir de largo sin comer, además de ayudarme a poder financiar mis estudios. Tantos profesores que imprimieron su sello en mi alma: Dr. Santiago Zolezzi, Dra. Ana María Kettlun, Dra. Else Lemp, Dra. María Antonieta Valenzuela, Dra. Daniela Seelenfreund, Dr. Mario Chiong entre tantos otros que se me quedan en el tintero. Muchas gracias por su entrega humana y profesional.

En especial quiero agradecer a la Dra. Inés Contreras, Dr. Sergio Álvarez y Dr. Marcelo Kogan por su interés y apoyo en mi ingreso y realización del Magíster en Bioquímica.

A todos los integrantes del laboratorio de Inmunobioquímica de la Facultad. En especial al Dr. Dante Miranda que me acogió en su laboratorio de una manera muy grata y me entregó todo su conocimiento tanto profesional como humano durante una parte de esta tesis. A Jorge, Paola, Claudia y Estefanía que tuvieron que aguantar que les usara la campana y les hiciera mis consultas, siempre dándome la mejor de las respuestas.

No puedo no mencionar a las personas que conocí en el laboratorio que me acogió para la realización de mi tesis en la Universidad Diego Portales: Arlyn, Lissette, Pablo, Luz María, Paola, Franco, Stephanie, Laura, Sebastián, Samanta, Paty Palma, Katia, Rosa, Dago, Dr. Eduardo Karahanian, Juan Carlos, Andreíta y tantas personas que tuve la oportunidad de conocer en este lugar como Myriam Navarro que fue una gran persona que siempre me brindó su apoyo en los momentos difíciles y felices.

En especial a tres amigos que pude conocer, amigos no porque nos digamos así, sino que porque yo los considero así. En primer lugar a José Miguel Saavedra que es mi hermano mayor en la ciencia y porque no decirlo en la vida. Aún siendo muy distintos siempre me ofreció una mano, un apoyo, un consejo más allá de lo que la ciencia permite, y también aceptó mi amistad.

El Dr. Mario Tello ha sido uno de mis formadores durante esta tesis, forjando junto con el Dr. Corsini mi criterio y carácter científico. Además de compartir tantos momentos buenos y malos. Gracias Dr. Tello y espero esta amistad perdure mucho en el tiempo.

Y quiero agradecer a una de las personas más importantes en mi formación humana-profesional que en sus propias palabras lo definen como mi “papá” de la ciencia. El Dr. Gino Corsini ha sido mi formador directo, enseñándome criterios y formas de ver la ciencia, siendo mi guía directo en la academia y en muchos aspectos de la vida. El Dr. Corsini me tendió la mano en uno de los momentos más difíciles de la vida, y confió en

mí y me apoyo, permitiendo que ahora me encuentre en la situación actual y de la cual estoy muy orgulloso. Gracias “papá” científico y espero algún día poder darle nietos en esta área y hacerlo de tan buena forma como usted lo hizo conmigo. Gracias a usted y a toda su familia.

Para finalizar mis palabras van dirigidas a mi pareja Camila Gacitúa que me ha sido enviada desde del cielo y ha sido uno de mis pilares en el cual me puedo apoyar y la estrella que me motiva a seguir, a seguir creyendo, a seguir creyendo en la vida, a seguir creyendo en la ciencia... Te Amo.

Gracias para todos los que mencione y que no he mencionado, ustedes saben bien lo que han hecho por mí, y Dios también, los quiero mucho.

Índice

Pag

Índice vii
Índice de figuras ix
Índice de tablas x
Abreviaturas xi
Resumen xii
Abstract xiv

Contenido

1. Introducción 1
1.1 LOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS 1
1.2 BACTERIOCINAS 1
1.2.1 Bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* 3
1.2.2 Potenciales aplicaciones de las bacteriocinas 5
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 5
2. Hipótesis 10
3. Objetivos 10
3.1 OBJETIVO GENERAL 10
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 10
4. Materiales y Métodos 11
4.1 MATERIALES 11
4.1.1 Reactivos 11
4.1.2 Medios de cultivo 12
4.2 MÉTODOS 13
4.2.1 Cultivo bacteriano 13
4.2.2 Preparación de césped bacteriano 13
4.2.3 Ensayo de detección de actividad antimicrobiana en placa 13
4.2.4 Determinación de la actividad de gicina A 13
4.2.5 Purificación de gicina A mediante columnas Sep-Pack C_{18} 14
4.2.6 Purificación de gicina A mediante HPLC 14
4.2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15
4.2.8 Análisis de gicina A mediante espectrometría de masa 16
4.2.9 Ensayo de estabilidad de gicina A a temperatura 16
4.2.10 Ensayo de estabilidad de gicina A a pH 16

4.2.11 Ensayo de estabilidad de gicina A a solventes 16
4.2.12 Efecto de gicina A sobre la cinética de crecimiento de la bacteria blanco 17
4.2.13 Ensayo de viabilidad celular bacteriana mediante fluorescencia 17
4.2.14 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) 18
4.2.15 Viabilidad celular mediante azul de tripán 18
4.2.16 Análisis estadístico 19

5. Resultados 20

5.1 PURIFICACIÓN DE GICINA A 20
5.1.1 Purificación mediante cromatografía en columna hidrofóbica C_{18} 20
5.1.2 Purificación de gicina A mediante HPLC 22
5.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE GICINA A 24
5.2.1 Masa molecular de gicina A 24
5.2.2 Efecto de condiciones extremas sobre la actividad de gicina A 24
5.2.3 Efecto de temperatura sobre la estabilidad de gicina A 25
5.2.4 Efecto de Solventes sobre la estabilidad de gicina A 26
5.2.5 Efecto de pH sobre la estabilidad de gicina A 27
5.3 DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE CEPAS BACTERIANAS SENSIBLES Y MODO DE ACCIÓN DE GICINA A 28
5.3.1 Efecto de gicina A sobre la cinética de crecimiento de la bacteria blanco 29
5.4 DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE GICINA A SOBRE CÉLULAS EUCARIONTES 33

6. Discusión 35

6.1 PURIFICACIÓN DE GICINA A 35
6.2 DETERMINACIÓN MASA MOLECULAR DE GICINA A 37
6.3 ESTABILIDAD DE GICINA A A TEMPERATURA, pH Y SOLVENTES 38
6.4 ESPECTRO DE ACCIÓN DE GICINA A 39
6.5 MODO DE ACCIÓN DE GICINA A 40
6.6 CITOTOXICIDAD DE GICINA A SOBRE CÉLULAS EUCARIONTES 41

7. Conclusiones 44

8. Bibliografía 44

Índice de figuras

Figura 1	Actividad de sobrenadantes concentrados por evaporación a través de membranas de diálisis	6
Figura 2	Purificación de gicina A mediante cromatografía en columna hidrofóbica Sep-Pack C_{18}	21
Figura 3	Electroforesis SDS-PAGE y ensayo de actividad de gicina purificada mediante columnas Sep-Pack C_{18}	22
Figura 4	Purificación de la gicina A mediante cromatografía HPLC	23
Figura 5	Espectrometría de masa de gicina A	24
Figura 6	Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de gicina A	27
Figura 7	Cinética de acción de gicina A purificada	30
Figura 8	Efecto de la gicina A sobre la membrana de células de *Staphylococcus aureus*	32
Figura 9	Efecto de gicina A sobre la viabilidad celular en líneas de células eucariontes	34

Índice de tablas

Tabla I	Modo de acción microcinas clase II	8
Tabla II	Modo de acción de bacteriocinas Clase II	9
Tabla III	Purificación de gicina Amediante cartuchos Sep-Pack C_{18}	21
Tabla IV	Estabilidad de gicina A a temperatura	25
Tabla V	Estabilidad de la gicina A frente a solventes	26
Tabla VI	Efecto de gicina A sobre césped de bacterias Gram positivo	28
Tabla VII	Efecto de gicina A sobre césped de bacterias Gram negativo	29
Tabla VIII	Masa molecular y composición molecular de microcinas de clase I y clase II	36

Abreviaturas

ATCC: American type culture collection

CIM: Concentración mínima inhibitoria

DMEM: Medio basal de Eagle modificado

D.O.: Densidad óptica

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

LB: Luria Bertani

MALDI: Desorción/ionización láser asistida por matriz

PBS: Tampón fosfato salino

PI: Yoduro de propidio

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

SFB: Suero fetal bovino

TOF: Contador de tiempo de vuelo

U.A.: Unidades arbitrarias

U.F.C.: Unidades formadoras de colonias

Resumen

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por microorganismos, principalmente del dominio bacteria. Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo o Gram negativo, presentan una actividad tóxica sobre especies bacterianas estrechamente relacionadas con la bacteria productora. Para ejercer su acción antimicrobiana las bacteriocinas utilizan receptores específicos localizados exclusivamente en la bacteria blanco, por lo tanto raramente se observa actividad citotóxica sobre células eucariontes. No obstante, algunas bacteriocinas inhiben específicamente el crecimiento de líneas celulares neoplásicas.

Debido a estas propiedades, las bacteriocinas tienen una potencial aplicación biotecnológica por su posible uso como alternativa a los tratamientos con antibióticos tradicionales, o como nuevos antibióticos contra patógenos multirresistentes, como preservantes o desinfectantes en la industria alimenticia, y en el área biomédica como antineoplásicos para combatir algunos tipos de cáncer.

En nuestro laboratorio encontramos un nuevo compuesto antimicrobiano del tipo bacteriocina producido por la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* O400, al que hemos denominado gicina A. Este compuesto es capaz de inhibir, selectivamente, el crecimiento de bacterias Gram positivo. Debido a que no existen informes en la literatura de bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativo que presenten actividad antimicrobiana solamente sobre bacterias Gram positivo, el estudio del mecanismo de acción y las propiedades bioquímicas de gicina A constituye un valioso aporte en la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas.

El objetivo general de esta tesis fue "Purificar, caracterizar bioquímicamente, y evaluar tanto el mecanismo de acción antibacteriano de gicina A, como su toxicidad *in*

vitro sobre líneas celulares eucariontes". Para lograr este objetivo se realizó la purificación de gicina A mediante cromatografías en columnas hidrofóbicas y HPLC. Mediante electroforesis de proteínas y espectrometría de masas se determinó que esta proteína tiene una masa molecular de 7925 Da.

La evaluación de sus propiedades bioquímicas demostró que la actividad de gicina A es estable a un amplio rango de temperaturas, conserva su actividad al ser solubilizada en una amplia gama de solventes y presenta una mayor actividad al ser solubilizada a un pH neutro. Por otra parte empleado gicina A purificada se confirmó que esta posee una actividad antibacteriana selectiva por bacterias Gram positivo.

Estudios de alteración de la cinética de crecimiento de la bacteria blanco y ensayos de microscopía de fluorescencia indicaron que gicina A posee un efecto bactericida sobre bacterias Gram positivo y que este efecto es producido por una permeabilización en la membrana celular.

La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de gicina A sobre células eucariontes mostró que esta bacteriocina ejerce una leve toxicidad en las líneas de origen tumoral, sin embargo no se observó efecto citotóxico sobre las líneas celulares no tumorales.

Abstract

Bacteriocins are antimicrobial peptides ribosomally synthesized produced by microorganisms, mainly from Bacteria domain. Bacteriocins produced by Gram positive or Gram negative bacteria, present a toxic activity on bacterial species closely related to the bacteriocin producing bacteria. To exert its antimicrobial action, bacteriocins use specific receptors exclusively located in the target bacteria, therefore rarely cytotoxic activity on eukaryotic cells can be observed. However, some bacteriocins specifically inhibit growth of neoplastic cell lines.

Because of these properties, bacteriocins have a potential for biotechnological application for its possible use as an alternative to the traditional antibiotic treatments, or as new antibiotics against multi-resistant pathogens, also as preservatives or disinfectants in food industry, and in biomedical field as antineoplastics. In our laboratory we have found a new antibacterial compound with bacteriocin properties produced by the *Pseudomonas aeruginosa* O400 strain, which we called gicin A. This compound is able to selectively inhibit the growth of Gram positive bacteria.

Because there are no reports in the literature of bacteriocins produced by Gram negative bacteria that have antimicrobial activity only on Gram-positive bacteria, the study of the mechanism of action and biochemical properties of gicin A is a very valuable contribution to the search of new antimicrobial substances.

The overall aim of this thesis was to “Purify, characterize biochemically, and assess both the antibacterial action mechanism of gicin A, and its *in vitro* toxicity on eukaryotic cell lines”. To achieve this objective the purification of gicin A was performed by a hydrophobic column chromatography and HPLC.

Protein electrophoresis and mass spectrometry determined that this protein has a molecular mass of 7925 Da. The evaluation of its biochemical properties showed that the activity of gicin A is stable at a wide temperature range, it retains its activity when is solubilized in a wide range of solvents and has a higher activity when is solubilized at a neutral pH. Moreover, employing purified gicin A was confirmed that it has a selective antibacterial activity against Gram positive bacteria.

Alteration studies of the growth kinetics of the target bacteria and fluorescence microscopy indicated that gicin A has a bactericidal effect on Gram positive bacteria and that this effect is produced by cell membrane permeabilization.

The evaluation of cytotoxicity *in vitro* of gicin A on eukaryotic cells shows that this bacteriocin has a mild toxicity on tumoral origin cell lines, however we noticed no cytotoxic effect on non tumoral origin cell lines.

1. Introducción

1.1 Los péptidos antimicrobianos

El fenómeno de antagonismo microbiano mediado por péptidos ha tomado mucha importancia debido a que este tipo de sustancias presentan una rápida actividad tóxica sobre un amplio espectro de bacterias, las que además tienen baja propensión a desarrollar resistencia a este tipo de compuestos (**Maqueda y cols., 2008**). Una gran variedad de organismos producen péptidos antimicrobianos como mecanismo de defensa (**Jenssen y cols., 2006**). Ellos están ampliamente distribuidos en la naturaleza siendo producidos por mamíferos, aves, anfibios, insectos, plantas y microorganismos. Por ejemplo en mamíferos estos péptidos son expresados en fagocitos y células epiteliales de las mucosas. En insectos los péptidos antimicrobianos son liberados hacia la hemolinfa en respuesta a alguna infección bacteriana. Del mismo modo la piel de algunas ranas contiene glándulas que producen este tipo de polipéptidos y les permite vivir en aguas que poseen una gran cantidad de microorganismos. En el caso de las bacterias, los péptidos antimicrobianos producidos por ellas son denominados bacteriocinas **(Nissen-Meyer y Nes, 1997).**

1.2 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son compuestos antibacterianos, de naturaleza protéica, las cuales son sintetizadas por una determinada cepa bacteriana y que pueden actuar sobre cepas de la misma especie u otras relacionadas **(Nomura, 1967)**. Estos compuestos difieren de los antibióticos tradicionales ya que actúan sobre un estrecho espectro de bacterias que están relacionadas con la cepa productora **(Riley y Wertz, 2002).**

Las bacteriocinas fueron detectadas por primera vez por André Gratia en 1925, quien observó la inhibición del crecimiento de algunas cepas de *E. coli* por la acción de un compuesto antibacteriano liberado al medio por la cepa *E. coli* V, a este compuesto lo denominó Colicina V

(Oscáriz y Pisabarro, 2001; Gratia, 1925). Sin embargo el primero en acuñar el término bacteriocina fue Jacob en el año 1952 **(Nomura, 1967; Jacob y cols., 1952).**

En general podemos clasificar las bacteriocinas en dos grandes grupos: las producidas por bacterias Gram positivo y las producidas por Gram negativo **(Gillor y cols., 2008).**

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo han sido clasificadas preferentemente por su estructura primaria y sus características bioquímicas. La clase I está compuesta por péptidos pequeños (menores a 5 kDa) que contienen los aminoácidos poco frecuentes lantionina, β-metil lantionina, y residuos deshidratados; ejemplos de bacteriocinas de esta clase son: nisina y lactocina S. La clase II corresponde a péptidos (menores a 10 kDa) termoestables que no contienen lantionina y cuyo mecanismo de acción se debe principalmente a la permeabilización de la membrana de la bacteria blanco. En este grupo tenemos como ejemplo a pediocina PA-1 y lactococcina A. La clase III se compone de proteínas termolábiles (mayores a 30 kDa) y cuyo mecanismo de acción no se conoce bien. Además se ha propuesto la existencia de una cuarta clasificación, la clase IV, en la cual se agrupan las bacteriocinas complejas compuestas por un motivo proteíco más un motivo químico (carbohidratos, lípidos). Dentro de este grupo estarían la plantaricina S, pediocina SJ-1, entre otras **(Héchard y Sahl, 2002; Klaenhammer, 1993)**

En el caso de las bacteriocinas de bacterias Gram negativo la clasificación más usada se basa en su masa molecular, denominándose colicinas a las bacteriocinas con una masa superior a 10 kDa y microcinas a las que poseen una masa inferior a 10 kDa. Las colicinas se caracterizan por su estrecho espectro de acción y por tener una actividad mediada por interacciones con receptores específicos de membrana. Además, su síntesis está regulada por un mecanismo dependiente del sistema SOS. En cambio, las microcinas son sintetizadas principalmente durante la fase estacionaria y no son reguladas por el sistema SOS **(Oscáriz y Pisabarro, 2001)**. Las microcinas, al igual que algunas bacteriocinas de baja masa molecular producidas por bacterias Gram positivo, son: termoestables, resistentes al tratamiento con proteasas, presentan alta hidrofobicidad y resisten condiciones extremas de pH **(Gillor y cols., 2004; Baquero y Moreno, 1984).** En el año 2002 **Pons y cols**., propusieron clasificar las microcinas en dos

grupos, dependiendo de su masa y estado de modificación postraduccional. La clase I comprende a las microcinas con masas moleculares inferiores a 5 kDa, generalmente modificadas post-traduccionalmente y con blancos moleculares intracelulares. Las microcinas de clase II tienen una masa molecular entre 7 y 10 kDa, no presentan modificaciones post-traduccionales, y ejercen su acción antimicrobiana a través de la disrupción del potencial de membrana. Las microcinas de clase II comparten muchas características con las bacteriocinas clase II producidas por bacterias Gram positivo **(Gillor y cols., 2004; Baquero y Moreno, 1984)**.

En el año 2007 **Dusquense y cols.** proponen ampliar esta clasificación considerando que la microcina E492, puede ser exportada y activa en su forma modificada o no modificada. En esta clasificación, las microcinas clase I son todas aquellas que presentan un masa inferior a 5 kDa, con una vasta modificación postraduccional (MccB17, MccC7/C51, MccJ25). En la clase II se incluye a todas las microcinas entre 5 y 10 kDa. Sin embargo la clase II se subdivide en dos grupos, clase IIa para aquellas microcinas sin modificación postraduccional (MccL, MccV y MccN (ex 24), y clase IIb para aquellas que pueden presentar modificación postraduccional (MccE492, MccM y presumiblemente MccH47 y MccI47) **(Duquesne y cols., 2007)**.

1.2.1 Bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas* está compuesto por bacilos Gram negativo que habitan comúnmente en suelos, aguas frescas y ambientes marinos. *Pseudomonas aeruginosa* es el representante de este género que recibe mayor atención ya que es un patógeno oportunista, que puede causar enfermedades en humanos. Además, existe un interés creciente por esta bacteria debido a la secuenciación completa de su genoma el año 2000 **(Michel-Briand y Baysse, 2002)**.

En *Pseudomonas aeruginosa* las proteínas con actividad antimicrobiana que más se han estudiado son las pyocinas **(Sano y Kageyama, 1984; Higerd y cols., 1967)**. Se han descrito tres tipos de pyocinas (tipo R, F y S), las que son proteínas de alta masa molecular y poseen

actividad antimicrobiana sobre otras cepas de *Pseudomonas.* Los genes que codifican para estas proteínas se localizan en el cromosoma bacteriano y su expresión es inducida por agentes que dañan el DNA activando la respuesta SOS **(Michel-Briand y Baysse, 2002; Parret y De Mot, 2002)**. Las pyocinas del tipo R son proteínas no flexibles similares al tallo contráctil de un bacteriófago, formando un complejo multiproteíco. Este tipo de pyocinas produce la despolarización de la membrana citoplasmática, debido a la formación de un poro o canal **(Michel-Briand y Baysse, 2002)**. Las pyocinas del tipo F, si bien son similares al tallo de un bacteriófago y están formadas por varias proteínas, son estructuras flexibles con una forma similar a una varilla. No es conocido el mecanismo de acción de estas pyocinas, sin embargo, por su estructura es probable que sea similar al de las pyocinas del tipo R. Por otra parte, las pyocinas del tipo S son similares a las colicinas. Este tipo de pyocina está formado por dos proteínas (una grande y otra pequeña) que se mantienen asociadas incluso durante su proceso de purificación. La proteína de mayor tamaño lleva la actividad antimicrobiana (actividad DNasa para pyocinas S1, S2, S3, AP41; actividad tRNasa para pyocina S4; actividad formadora de poro para pyocina S5), en cambio el componente pequeño posee la función de inmunidad que permite no matar a la cepa productora **(Michel-Briand y Baysse, 2002)**.

Otro tipo de proteína antimicrobiana, secretada por representantes del género *Pseudomonas,* es la bacteriocina LlpA producida por *Pseudomonas* sp. BW11M1. Esta es una proteína de 276 residuos con una masa molecular de 30 kDa que se encuentra codificada en el cromosoma, con actividad sobre *Pseudomonas putida* y posee similitud con una familia de lectinas presentes en plantas **(Parret y cols., 2003)**. Otro ejemplo de péptido antimicrobiano producido por *Pseudomonas* es la bacteriocina PsVp10 **(Hubert y cols., 1998)**. Este péptido, de 2,6 kDa, posee actividad sobre bacterias Gram positivo como *Enterococcus faecalis, Salmonella Typhimurium, Shigella flexneri* **(Padilla y cols., 2002)** y Gram positivo tales como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* **(Padilla y cols., 2006)**.

1.2.2 Potenciales aplicaciones de las bacteriocinas

Las aplicaciones de las bacteriocinas han sido revisadas por algunos autores **(Gillor y cols., 2008; Riley y Wertz, 2002; Gálvez y cols. 2007)**, dentro de ellas las más importantes son como alternativa para las terapias antibióticas tradicionales, las cuales son cada vez menos efectivas por la aparición de cepas patógenas multi-resistentes **(Riley y Wertz, 2002)**. Asimismo, el uso de las bacteriocinas en la industria alimenticia es un importante campo de aplicación, en donde pueden ser empleadas como probióticos, biopreservantes, entre otros **(Gillor y cols., 2008)**. Todas estas aplicaciones pueden ser útiles tanto para el hombre como para aplicaciones en animales **(Gillor y cols., 2004)**.

Debido a la especificidad de la interacción de estos compuestos con receptores de la bacteria, la mayoría de estas proteínas no presenta toxicidad frente a líneas celulares eucarióticas **(Lagos y cols., 2009)**. No obstante, muchas bacteriocinas presentan propiedades inhibitorias sobre líneas celulares neoplásicas. Tal es el caso de algunas pyocinas, colicinas, pediocinas y microcinas entre otras **(Cornut y cols., 2008)**. Por lo tanto previo a la utilización de las bacteriocinas en el área industrial o el área biomédica, se necesita evaluar su toxicidad sobre animales y/o humanos.

1.3 Planteamiento del problema

En nuestro laboratorio hemos identificado una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que secreta un compuesto difusible, termoestable, con actividad antibacteriana. Mediante ensayos sobre un césped bacteriano hemos encontrado que al inocular tanto colonias de la cepa productora como sobrenadantes, concentrados por evaporación, de cultivos de la misma cepa se inhibe específicamente el crecimiento de bacterias Gram Positivo como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*, pero no tiene efecto sobre bacterias como: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Shigella sonnei* u

otras cepas de *P. aeruginosa.* Este compuesto aún no identificado presente en los sobrenadantes del cultivo de la cepa *P. aeruginosa* O400 lo hemos denominado gicina A.

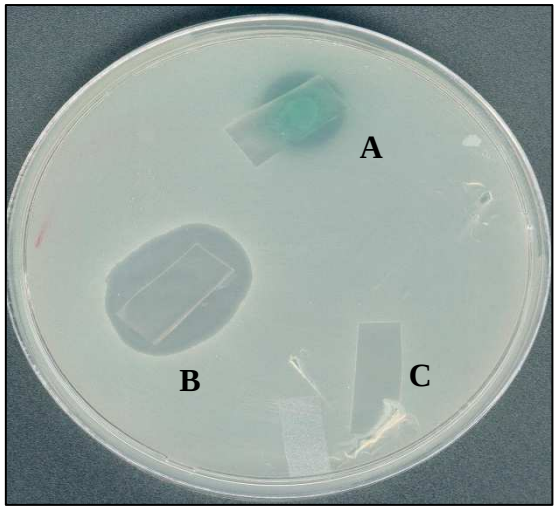

Figura 1. Actividad de sobrenadantes concentrados por evaporación a través de membranas de diálisis.

La actividad de sobrenadantes concentrados por evaporación difunde a través de membranas de dialisis de 12 kDa. Sobre una membrana de diálisis de 12 KDa se colocó; **(A)** un inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* O400 **(B)** 10 μL de sobrenadante concentrado por evaporación y **(C)** 10 μL de medio de cultivo estéril concentrado por evaporación.

Experimentos utilizando membranas de diálisis, que poseen un tamaño de exclusión de 12 kDa, han indicado que gicina A es una molécula pequeña, pues la actividad antibiótica difunde a través de la membrana de diálisis **(Figura 1).** En base a estos resultados proponemos que gicina A es una nueva bacteriocina de masa molecular menor de 12 kDa, situación que permitiría clasificar a la gicina A como una nueva microcina.

Las bacteriocinas de bajo tamaño molecular producidas por bacterias Gram positivo de clase II y las microcinas clase IIa y IIb poseen propiedades en común tales como la estabilidad a condiciones extremas (como temperatura y pH) y el modo en que ejercen su efecto antimicrobiano. En la **Tabla I** se muestra el modo de acción que presentan las microcinas de clase II, el cual en todos los casos es mediante la alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática de la bacteria blanco. Por otra parte, en las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo de clase II se observa que el modo de acción también es producto de cambios en la permeabilidad de la membrana plásmatica de la bacteria blanco que la llevan a la muerte **Tabla II** (**Héchard y Sahl, 2002; Gillor y cols., 2004**).

El compuesto antimicrobiano producido por la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* O400 es de masa molecular inferior a 12 kDa y es termoestable lo que hace suponer que es un nuevo tipo de microcina de clase II. Además al espectro de bacterias sobre el cual este compuesto ejerce su acción, gicina A tiene potenciales aplicaciones, en los campos de la biotecnología y biomedicina, como antibacteriano específico para bacterias Gram positivo resistente a condiciones extremas. En consecuencia, se hace necesario desarrollar protocolos que permitan la purificación de gicina A para la posterior caracterización de sus propiedades bioquímicas, microbiológicas, y el posible efecto citotóxico sobre células eucarióticas.

Tabla I. Modo de acción microcinas clase II

Actividad	**Microcina**
Formación de poro y disrupción del potencial de membrana.	E492 H47 N (ex 24)*
Disrupción del potencial de membrana.	V L

Extraída de Guillor y cols., 2004. * Corsini y cols. 2010.

Tabla II. Modo de acción de bacteriocinas clase II

Actividad	**Bacteriocina**
Formación de Poros, **Poros K^+**	Bavaricina MN Enterocina P
Formación de Poros	Mesentericina Y105 Pediocina PA-1 Lactacina F Lactococcina A Plantaricina A
Formación de Poros catiónicos.	Lactococcina G Plantaricina EF
Formación de Poros aniónicos.	Plantaricina JK
Inhibición en la formación del septum.	Lactococcina 972

Extraído de Héchard y Sahl., 2002

2. Hipótesis

La gicina A es una bacteriocina de baja masa molecular, altamente resistente a condiciones desnaturantes, con actividad específica sobre bacterias Gram positivo, que ejerce su efecto antimicrobiano mediante la permeabilización de la membrana de bacterias Gram positivo y que presenta baja toxicidad *in vitro* sobre células eucariontes.

3. Objetivos

Para el desarrollo de esta tesis se propusieron los siguientes objetivos:

3.1 Objetivo General

Purificar, caracterizar bioquímicamente, y evaluar tanto el mecanismo de acción antibacteriano de la gicina A, como su toxicidad *in vitr*o sobre líneas celulares eucariontes.

3.2 Objetivos Específicos

1. **Purificar la gicina A**
2. **Caracterizar bioquímicamente la gicina A.**
3. **Determinar el espectro de organismos sensibles a la gicina A e identificar el mecanismo por el cual ejercería su actividad antimicrobiana.**
4. **Determinar la citotoxicidad *in vitro* de la gicina A sobre células eucariontes.**

4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos

De Winkler Ltda, Santiago Chile se obtuvo: glicina, glicerol, acrilamida, bis-acrilamida, β-mercaptoetanol, citrato de sodio, TEMED, cloroformo, ampicilina, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, metanol, acetonitrilo, fosfato de sodio, glucosa, DMSO, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, antibióticos y Tris Base.

De TCL, Santiago, Chile se obtuvo: Solventes y reactivos grado técnico (ácido acético, etanol, metanol, acetona, ácido clorhídrico).

De Invitrogen Co., Carlsbad, CA, E.E.U.U. se obtuvo: El sistema comercial de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® BacLight.

HyClone, Thermo Scientific, Massachusetts, E.E.U.U. se obtuvo: Suero Fetal Bovino 10% (SFB) y Penicilina-estreptomicina 50 U/mL**.**

De Waters, Milford, MA E.E.U.U. se obtuvo: Cartuchos Sep-Pak C_{18}.

. **De Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.E.U.U. se obtuvo:** Glutamina.

4.1.2 Medios de cultivo

4.1.2.1 Medios de cultivo bacterianos

Caldo LB. Extracto de levadura 5 g/L, peptona de caseína 10 g/L, NaCl 10 g/L. (MOBIO Laboratories Inc., Solana Beach, CA, E.E.U.U.)

Caldo nutritivo. Extracto de res 3 g/L, peptona de caseína 5 g/L. (DIFCO Laboratorios, Detroit, MI, E.E.U.U.)

Agar Nutritivo. Extracto de res 3 g/L, peptona de caseína 5 g/L, 15 g/L agar. (DIFCO Laboratorios, Detroit, MI, E.E.U.U.)

4.1.2.2 Medios de cultivo líneas celulares

RPMI-1640 (Invitrogen, Grand Island, NY, E.E.U.U.)

DMEM (Invitrogen, Grand Island, NY, E.E.U.U.)

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo bacteriano

Las células bacterianas se cultivaron en placas que contenía 20 mL de agar nutritivo a 37 ºC o en tubos de caldo nutritivo o LB en agitación a 37ºC.

4.2.2 Preparación de césped bacteriano

Se mezclaron alícuotas de 100 µL de cultivo de la cepa indicadora crecida a una D.O. $_{600}$ de 0,4 en caldo nutritivo, con 3 mL de medio nutritivo con 0,7 % p/v de agar y se esparcieron sobre placas de agar nutritivo.

4.2.3 Ensayo de detección de actividad antimicrobiana en placa

La actividad antibacteriana de la gicina A se detectó sembrando una colonia o depositando 5 µL del sobrenadante de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* O400 sobre un césped de la cepa bacteriana a analizar. Las placas se incubaron a 37 °C durante 8 a 12 horas. La actividad de la gicina A se visualizó por la presencia de una zona de inhibición de crecimiento sobre el césped bateriano.

4.2.4 Determinación de la actividad de gicina A

Se empleó el método de dilución crítica descrito por **Mayr-Harting y cols. 1972.** Se realizó una dilución seriada en base 2 de gicina A purificada, sobre el solvente de interés, para medir la actividad antimicrobiana. Se agregó, posteriormente, 5 µL de cada una de estas diluciones sobre un césped sensible. Se definió como Unidad Arbitraria de actividad (UA) a la máxima dilución

realizada la cual generó un halo de inhibición de crecimiento de la bacteria sensible. Este ensayo se realizó en triplicado.

4.2.5 Purificación de gicina A mediante columnas Sep-Pack C_{18}

Sobre 500 mL de caldo nutritivo se agregó una a dos colonias de un cultivo de *P. aeruginosa* O400 la que se incubó a 37 °C sin agitación durante 18 horas. El cultivo se centrifugó a 14.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una columna Sep-Pack C_{18}. La columna se lavó con 5 mL de H_2O_d. Posteriormente, gicina A se eluyó con una gradiente escalonada de metanol-agua (10-100%). Se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana en placa a cada una de las fracciones colectadas sobre un césped de la cepa bacteriana sensible *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.2.6 Purificación de gicina A mediante HPLC

La purificación de gicina A mediante HPLC se realizó a partir de gicina prepurificada mediante columnas Sep-Pak C_{18}. Se tomó 1 mL de bacteriocina prepurificada mediante cartuchos Sep-Pak C_{18} y se concentró a sequedad mediante Speed-Vac. El concentrado obtenido se resuspendió en 50 µL de una solución de acetonitrilo 40 %. La gicina A concentrada se cargó en un HPLC Beckman System Gold y se separó mediante cromatografía isocrática en una columna Beckman ODS (5µ X 4,6 mm X 25 cm) usando acetonitrilo al 40 % con un flujo de 1 mL/minuto. La presencia de gicina A se detectó a 215 nm usando un detector Beckman System Gold 166. Para identificar qué pico del cromatograma correspondía a gicina A, se colectaron fracciones de 0,5 mL. La bacteriocina en las fracciones se detectó realizando ensayos de actividad antibacteriana en placa usando un césped de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como esta descrito en **material y métodos.**

4.2.7 Cuantificación de proteínas mediante Bradford

Se determinó la concentración de proteínas basándose en el método desarrollado por Bradford (**Bradford, 1976**) el cual detecta proteínas en el rango de 10 a 100 μg/mL. Se realizó una curva de calibración con albumina en el rango de 10 a 80 μg/mL. Posteriormente 500 μL de gicina A purificada se concentró por evaporación 100 veces y se solubilizaron en 1mL de reactivo de Bradford. La absorbancia se midió a 595 nm. El blanco fue 1 mL de reactivo de Bradford.

4.2.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los geles se prepararon según lo descrito por **Schägger y von Jagow (1987)**, método que permite separar proteínas de un rango de masa molecular de 1 a 100 kDa. El gel separador se preparó con: 20 % de acrilamida; Tris-HCl 1,0 M pH 8,5; SDS 0,1 % y glicerol al 10 %. El segundo gel separador se preparó con: 10 % de acrilamida; Tris-HCl 1,0 M pH 8,5; SDS 0,1 %. El gel concentrador se preparó con: 3 % de acrilamida; Tris-HCl 1,0 M pH 8,5; SDS 0,1 %. A cada una de estas soluciones se le agregó 0,033 % de persulfato de amonio y 2,2 mM de TEMED. Los geles se sometieron a un campo eléctrico de 50 y 100 V, empleando un amortiguador catódico (Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, Tricina 0,1 M y SDS 0,1 %) y un amortiguador anódico (Tris-HCl 0,2 M pH 8,9). La diferencia de potencial se aplicó con una fuente de poder CBS SCIENTIFIC modelo EPS-300 IIV.

Las muestras obtenidas mediante la columna Sep-Pack se concentraron por evaporación tomando 300 μL del eluído y llevando a 10 μL. Para los eluídos obtenidos mediate HPLC la muestra se concentró mediante Speed-Vac en la misma proporción. A los concentrados se agregó 10 μL de amortiguador de carga 4X (glicerol 40 %; Tris-HCl 50 mM pH 7,6; SDS 10 %; β-mercaptoetanol 20 %; azul de bromofenol 0,04 % p/v). La mezcla se calentó a 100ºC por 3 minutos y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE.

Se empleó el marcador de masa molecular Kaleidoscope Prestained Standard que posee fragmentos con las masas moleculares aparentes: 216; 132; 78; 45,7; 32,5; 18,4 y 7,6 kDa. Los geles fueron teñidos durante 2 horas en azul de coomasie G-250 al 0,1%. Posteriormente los

geles se destiñeron en metanol al 20%. La actividad antibacteriana de las proteínas presentes en el gel de poliacrilamida se realizó lavando con agua destilada durante 2 horas el gel sin teñir y posteriormente se incubó sobre una placa de agar blando sembrado con un césped de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 durante 12 horas.

4.2.9 Análisis de gicina A mediante espectrometría de masa

Para determinar la masa molecular de la bacteriocina en estudio gicina A purificada por HPLC, se sometió a un análisis mediante espectrometría de masa. Los espectros de masa se obtuvieron en un equipo Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Inc., MA-E.E.U.U. pertenecientes al CEPEDEQ de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile). Para la obtención de espectros se trabajó en modo ión positivo y detección lineal. El espectro final corresponde a espectros sumados de 10 barridos de 40 “shots” de láser aplicados en diferentes puntos tomados al azar.

4.2.10 Ensayo de estabilidad de gicina A a temperatura

Se incubaron 100 µL de la gicina A purificada mediante cartuchos Sep-Pak C_{18} durante 20 minutos a las siguientes temperaturas -80ºC, -20ºC, 4ºC, 50ºC, 80ºC y 100ºC. Posteriormente su actividad fue determinada por el método de dilución crítica **(material y métodos).** Este ensayo se realizó por triplicado.

4.2.11 Ensayo de estabilidad de gicina A a pH

Se tomaron 100 µL de la gicina A purificada mediante cartuchos Sep-Pak C_{18} de 6400 UA/mL de actividad y se evaporó el solvente a 80ºC hasta sequedad. Posteriormente se resuspendió la gicina A en 100 µL de tampón citrato de sodio 50 mM a los siguientes pH: 3, 4, 5, 7, 9.6. La actividad de las muestras incubadas fue determinada por el método de dilución crítica. Este ensayo se realizó por triplicado.

4.2.12 Ensayo de estabilidad de gicina A a solventes

Se tomaron 100 μL de gicina A purificada mediante cartuchos Sep-Pak C_{18} de 6400 UA/mL de actividad y se evaporó el metanol a 80ºC hasta sequedad. Luego se resuspendió la gicina A en 100 μL de los siguientes solventes: Cloroformo, Acetonitrilo, Etanol, Butanol, Isoprapanol, Metanol, Acetona, PBS (Tampón Fosfato Salino) y H_2Od. Su actividad se determinó mediante el método de dilución crítica. Este ensayo se realizó por triplicado.

4.2.13 Efecto de gicina A sobre la cinética de crecimiento de la bacteria blanco

El ensayo se realizó tomando sembrando una alícuota de un cultivo de 24 hrs de la cepa sensible *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 crecida en caldo nutritivo y se llevo a una $D.O._{600}$ de 0,2 en caldo nutritivo. Posteriormente al cultivo se añadió gicina A a una concentración final de 6400 UA/mL. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL cada una hora y se midió la turbidez del cultivo celular y se contaron las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) del cultivo. La turbidez se determinó en espectrofotómetro midiendo la $D.O._{600}$ de 1 mL del cultivo. Las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) se determinaron tomando una alícuota de 100 μL y realizando diluciones seriadas en base 10, posteriormente se sembraron de cada dilución 10 μL sobre una placa de agar nutritivo y se contaron las colonias obtenidas después de incubar a 37 ºC durante 16 horas.

4.2.14 Ensayo de viabilidad celular bacteriana mediante fluorescencia

El ensayo de viabilidad celular se realizó utilizando el sistema comercial de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® BacLight. Este sistema comercial contiene dos fluoróforos, que poseen la habilidad de unirse al DNA; SYTO 9® que ingresa a la bacteria por un receptor específico y yoduro de propidio que no ingresa a la bacteria, a menos que ésta pierda la integridad de su membrana interna. El ensayo se realizó según las recomendaciones del fabricante. Se cultivó una

cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en 30 mL de caldo nutritivo hasta una DO_{600} de 0,6. Posteriormente las bacterias se centrifugaron y se lavaron en una solución de NaCl al 0,85%, concentrándolas finalmente a 2 mL. Se trató 1 mL de esta suspensión con la gicina A durante 1 hora y 1 mL restante fue usado como control utilizando las mismas diluciones. Se preparó la tinción fluorescente mezclando los colorantes yoduro de propidio y SYTO 9 suministrado por el proveedor, en partes iguales y agregando 3 µL de esta mezcla por cada 1 mL de suspensión de bacterias. Esta mezcla se dejó incubar durante 15 minutos en oscuridad y finalmente se observó una alícuota de 5 µL de ésta en el microscopio de fluorescencia. La medición fluorescente se realizó excitando la muestra a una longitud de onda de 470 nm y midiendo la emisión a longitudes de onda de 530 nm para la fluorescencia verde del SYTO 9 y 640 nm para la fluorescencia roja del yoduro de propidio. La superposición de imágenes se realizó con el programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) desarrollado en National Institute of Health **(Collins, 2007)**.

4.2.15 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

En tubos de vidrio de 5 x 0,5 cm se realizaron diluciones seriadas de la gicina A en 1mL de caldo Luria. Posteriormente los tubos se inocularon con 100 µL de un cultivo bacteriano sensible crecido durante 24 horas y se incubarón durante 18 hrs. La concentración de la ultima dilución que presento una turbidez detectable se considero como la concentración mínima inhibitoria.

4.2.16 Determinación del efecto de gicina A sobre líneas celulares eucariontes.

Se empleó para el cultivo de las líneas celulares U937 y K562 el medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) y glutamina. Para las células HEK 293 se empleó el medio de cultivo DMEM suplementado con SFB y glutamina. El ensayo de viabilidad celular se realizó sobre una placa de 24 pocillos de la siguiente manera. Para las líneas celulares U937 y K562se sembraron 80.000 células por pocillo y en el caso de la línea celular HEK 293 se sembraron 100.000 células. Posteriormente a cada uno de los pocillos con células se añadieron

concentraciones crecientes de la gicina A hasta llegar a un volumen final de 1 mL/pocillo**.** Para realizar el conteo de células viables de las células HEK 293 se lavaron con 500 µL de PBS para luego ser despegadas de los pocillos incubándolas 5 min con 200 µL de tripsina. Luego se inactivó la tripsina añadiendo 500 µL de medio DMEM suplementado. Finalmente se tomaron alícuotas de 20 µL del cultivo y se mezclaron con 20 µL de azul de tripán. En el caso de las células U937 y K562 se tomaron directamente las alícuotas de 20 µL y se mezclaron con 20 µL de azul de tripán. En ambos casos las células viables se contaron en una cámara de Neubauer. El ensayo se realizó en triplicado.

4.2.17 Análisis estadístico

Los experimentos de medición de la sensibilidad de las mutantes se realizaron por quintuplicado. El análisis estadístico se realizó aplicando la Prueba-T al valor medio y a la desviación estándar de las medidas de sensibilidad, empleando el programa para análisis estadísticos ON-Line SISA **(**Simple Interactive Statistical Analysis), desarrollado por Daan Uitenbroek (www.quantitativeskills.com/sisa/)**.** El intervalo de confianza utilizado para validación de la prueba fue de un 95 % (con un $p < 0,05$).

5. Resultados

5.1 Purificación de gicina A

5.1.1 Purificación mediante cromatografía en columna hidrofóbica C_{18}

Basado en los protocolos de purificación descritos por **de Lorenzo (1984)**, se desarrolló un esquema de purificación de gicina A a partir de sobrenadantes de un cultivo de la cepa productora *P. aeruginosa* O400 crecida hasta fase exponencial tardía de crecimiento. Este sobrenadante se cargó sobre una columna hidrofóbica Sep-Pack C_{18} y posteriormente se eluyó la gicina A con concentraciones crecientes de metanol, según lo descrito en materiales y métodos. Se analizó la actividad de las fracciones obtenidas de la columna, determinando su capacidad de generar halos de inhibición de crecimiento sobre un césped de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sensible a la acción de gicina A. Además se determinó la concentración de proteínas en las fracciones mediante el método de Bradford **(Bradford, 1976).**

Los resultados muestran que gicina A presenta una hidrofobicidad elevada, puesto que eluye entre las fracciones que contienen un 70 % y un 90% de metanol. **(Figura 2A)** Por otra parte la actividad específica de gicina A se encontró en mayor cantidad en la fracción correspondiente a 80% metanol **Tabla III**.

Posteriormente se realizó una electroforesis en condiciones desnaturantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a la fracción con mayor actividad específica (80% metanol) (**Tabla III**) para comprobar la presencia de la proteína. Esta electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE indica que en el purificado existe un péptido de aproximadamente 7 kDa **(Figura 3A)** que posee actividad antimicrobiana al ser incubado sobre un césped de una cepa bacteriana sensible de *Staphylococcus aureus* (**Figura 3B**).

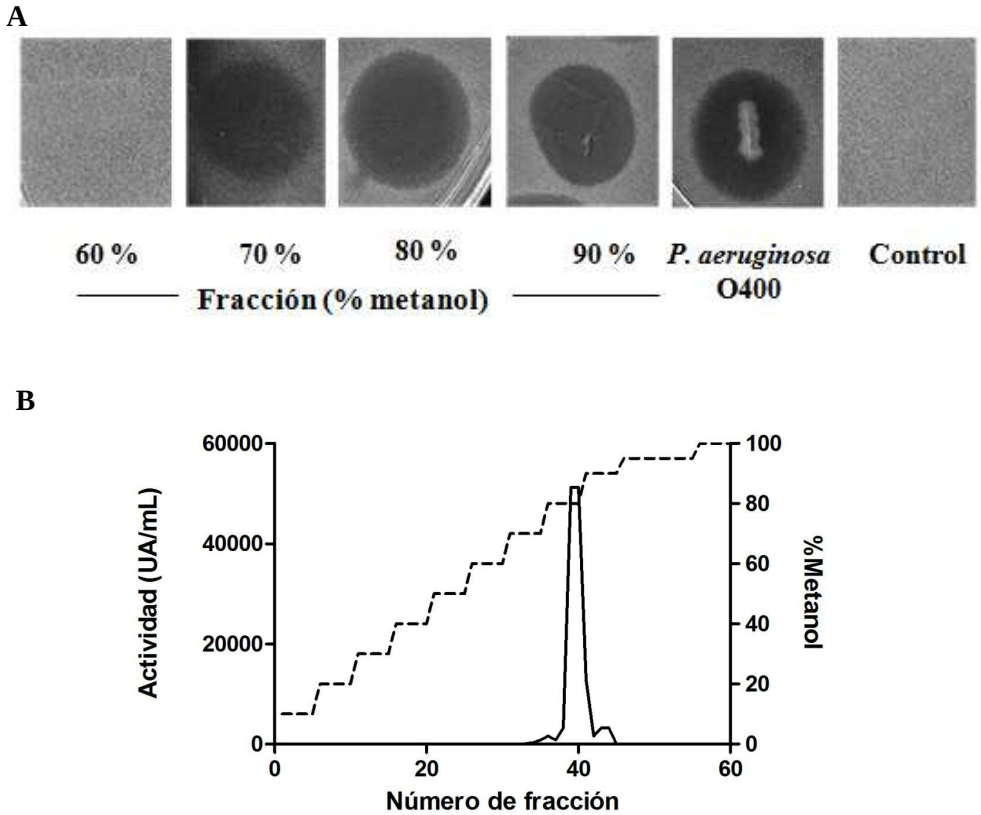

Figura 2 Purificación de gicina A mediante cromatografía en columna hidrofóbica Sep-Pack C_{18}. A. Halos de inhibición de 5 µL los eluidos sobre un césped de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **B**. Perfil de elución de actividad antimicrobiana de sobrenadante de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* O400 purificado mediante cromatografía en columnas Sep-Pack C_{18} .

Tabla III. Purificación de gicina A mediante cartuchos Sep-Pack C_{18}

Fracción (% metanol)	Concentración de proteína (µg/mL)	Actividad (UA/mL)	Actividad específica (UA/µg de proteína)
70	34, 5	12.800	371
80	27,9	102.499	3.670
90	28	25.600	914

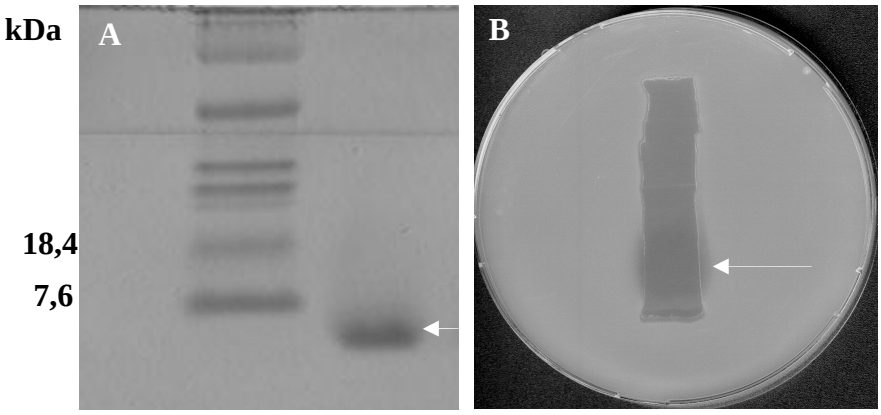

Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE y ensayo de actividad de gicina purficada mediante columnas Sep-Pack C_{18}.

(A). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 20% (PAGE) de gicina A, purificada mediante columna Sep-Pack C_{18} teñidos con azul de coomasie, la flecha muestra la gicina A purificada. **(B).** Ensayos de actividad de los geles lavados sobre un césped sensible de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La flecha indica la actividad antibacteriana de gicina A difundiendo a través del gel formando un halo de inhibición del crecimiento del césped bacteriano sensible.

5.1.2 Purificación de gicina A mediante HPLC

La purificación de gicina A mediante HPLC se realizó a partir de la fracción que contiene 80 % de metanol eluída de la columna Sep-Pak C_{18}. La gicina A se eluyó desde la columna con una fase móvil de acetonitrilo al 40 % y se recolectaron fracciones del eluído de la columna cada 0,5 minutos. El perfil de elución muestra que a una longitud de onda de 215 nm se observa un gran pico a partir del minuto 4 (**Figura 4**). Para determinar si el compuesto eluído desde la columna a partir del minuto 4 corresponde con la gicina A, se analizaron cada una de las fracciones eluídas para determinar su capacidad de formar halos de inhibición de crecimiento sobre un césped sensible a gicina A, observándose actividad en las fracciones que presentan tiempos de retención

de 4,5 y 5 min**.** Por último, a cada una de estas fracciones se le realizó una electroforesis SDS-PAGE según lo descrito en materiales y métodos, para confirmar la presencia de la proteína (**Figura 4B**).

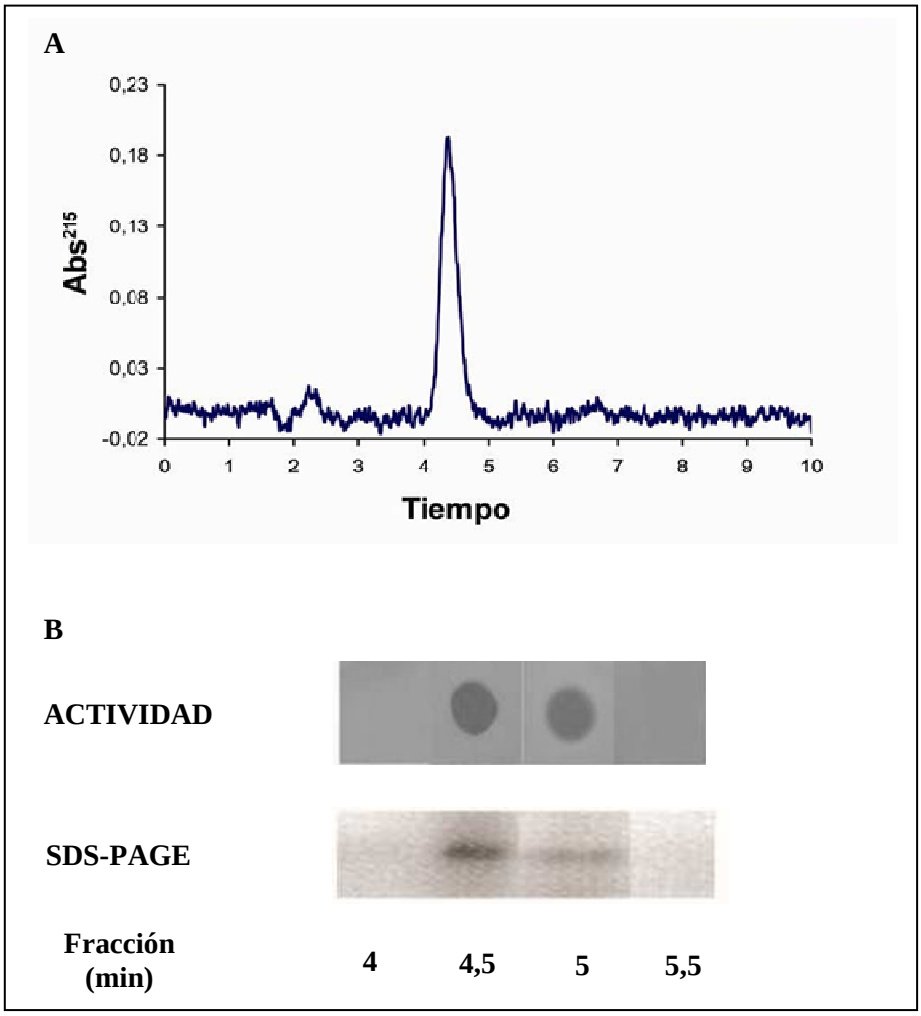

Figura 4. Purificación de la gicina A mediante cromatografía HPLC.

(A). Perfil de elución de la cromatografía HPLC de gicina A previamente purificada mediante columna Sep-Pack C_{18}. **(B)**. Detección de la gicina A mediante electroforesis SDS-PAGE y actividad mediante ensayos sobre un césped sensible de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de las fracciones recolectadas por cromatografía HPLC correspondientes a los minutos 4 a 5,5.

5.2 Caracterización bioquímica de gicina A

5.2.1 Masa molecular de gicina A

Para determinar la masa molecular de gicina A, la muestra purificada mediante HPLC se analizó mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Los resultados de la espectrometría de masa de la muestra analizada indican que gicina A es un compuesto de masa molecular de 7925 Da **(Figura 5)**.

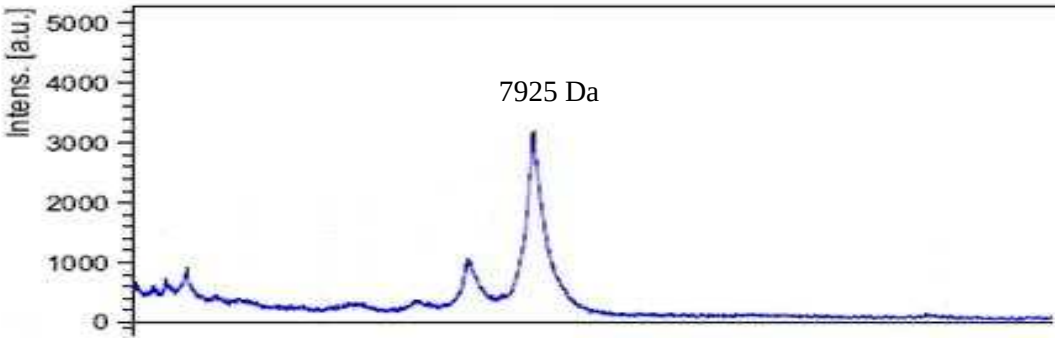

Figura 5. Espectrometría de masa de gicina A.
Mediante espectrómetro MALDI-TOF se obtuvo un espectro que equivale a espectros sumados correspondientes a 10 barridos de 40 shots de láser aplicados en diferentes puntos tomados al azar.

5.2.2 Efecto de condiciones extremas sobre la actividad de gicina A

Dado que la mayoría de las bacteriocinas de baja masa molecular son resistentes a condiciones extremas, se estudió el efecto que ejercen sobre la actividad antimicrobiana de la gicina A algunas condiciones tales como: condiciones extremas de pH y temperatura, y exposición a solventes orgánicos.

5.2.3 Efecto de temperatura sobre la estabilidad de gicina A

El efecto de la temperatura sobre la actividad de gicina A se determinó incubando durante 30 min 100 µL de bacteriocina con actividad de 6400 UA/mL en un amplio rango de temperaturas, entre -80ºC y 100º C. Los resultados obtenidos muestran que no se alteró la actividad de gicina A al ser incubada a las distintas temperaturas (**Tabla IV**).

Tabla IV. Estabilidad de gicina A a temperatura

Temperatura	Actividad	UA/mL
-80ºC	+	6400
-20ºC	+	6400
30ºC	+	6400
50ºC	+	6400
80ºC	+	6400
100ºC	+	6400

+ : Presencia de actividad antimicrobiana.

5.2.4 Efecto de Solventes sobre la estabilidad de gicina A

Para determinar si la actividad de gicina A es afectada por la exposición a distintos solventes con distintos grados de hidrofobicidad, se analizó la actividad antimicrobiana de gicina A resuspendida en diferentes solventes. Para esto 100 µL de gicina A purificada (6400 UA/mL) se evaporó a 80ºC hasta casi sequedad. Posteriormente se resuspendió esta bacteriocina en 100 µL de los siguientes solventes: cloroformo, isopropanol, butanol, etanol, dimetilsulfoxido, metanol, acetonitrilo, tampón fosfato salino (PBS) y H_2O destilada, y se incubó durante 30 min. La actividad de gicina A resuspendida en los distintos solventes se determinó mediante el método de dilución crítica. El resultado de este ensayo mostró que gicina A mantuvo su actividad en los distintos solventes ensayados (**Tabla V**).

Tabla V. Estabilidad de la gicina A frente a solventes

Solvente	Actividad	UA/mL
Metanol	+	6400
Isopropanol	+	6400
Butanol	+	6400
Etanol	+	6400
Acetona	+	6400
Cloroformo	+	6400
Acetonitrilo	+	6400
PBS	+	6400
H2Od	+	6400

+ : Presencia de actividad antimicrobiana. Como control se emplearon los solventes puros los cuales no presentaron actividad antimicrobiana.

5.2.5 Efecto de pH sobre la estabilidad de gicina A

Para determinar si la actividad de la gicina A es alterada en función del pH, la bacteriocina se resuspendió en soluciones amortiguadoras de citrato de sodio con distintos valores de pH y se analizó los cambios en la actividad antimicrobiana que presentó. Para esto 15 µL de gicina A en metanol (12800 UA/mL) se evaporó a 80ºC hasta sequedad. Posteriormente se resuspendió la bacteriocina en 15 µL de las soluciones amortiguadoras y se incubó durante 2 horas a 37ºC. La actividad de gicina A resuspendida en los distintos solventes se determinó mediante el método de dilución crítica realizando las diluciones en el mismo tampón que se incubó la bacteriocina.

Los resultados obtenidos muestran que gicina A presenta su mayor actividad a un valor de pH neutro, disminuyendo su actividad a pH ácido y básico (**Figura 6**).

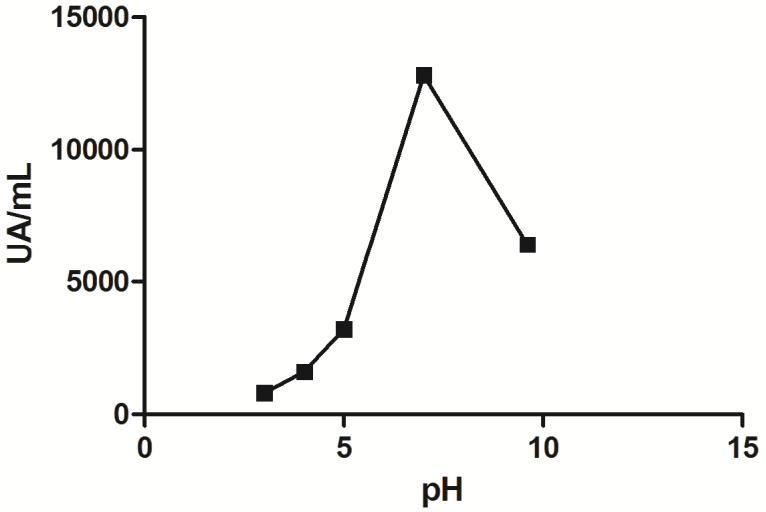

Figura 6. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de gicina A. Una cantidad de la bacteriocina correspondiente a 12800 UA/mL se incubarón durante 2 h en distintos tampones de citrato de sodio 50 mM de pH 3, 4, 5, 7 y 9,6. Se observa una disminución de la actividad a valores extremos de pH.

5.3 Determinación del espectro de cepas bacterianas sensibles y modo de acción de gicina A

Para determinar sobre qué tipo de bacterias actúa gicina A, se realizaron ensayos en placas sobre césped bacteriano a 10 cepas bacterianas Gram positivo y 10 cepas Gram negativo. Para ello 5 µL de gicina A purificada correspondientes a 1024 UA se agregaron sobre céspedes de las distintas cepas bacterianas en agar nutritivo al 0,7 % de agar y se observó la inhibición en el crecimiento bacteriano. Se consideraron cepas sensibles a la bacteriocina a aquellas que presentaron halos de inhibición del crecimiento mayores a 5 mm. El resultado de estos ensayos se resume en la **Tabla VI** para bacterias Gram positivo y en la **Tabla VII** para bacterias Gram negativo.

Tabla VI. Efecto de gicina A sobre césped de bacterias Gram positivo

Cepa Indicadora	**Sensibilidad**
Staphylococcus aureus ATCC 25923	+
Bacillus cereus	+
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	+
Streptococcus pyogenes	+
Listeria monocytogenes	+
Micrococcus sp.	+
Streptococcus agalactiae	+
Staphylococcus saprofiticus ISP 167/00	+
Enterococcus faecalis ATCC 29212	-
Enterococcus. faecium ISP 133/04	-

+ : Presencia de actividad antimicrobiana; - : Ausencia de actividad antimicrobiana.

Tabla VII. Efecto de gicina A sobre césped de bacterias Gram negativo

Cepa Indicadora	**Sensibilidad**
Escherichia coli ATCC 25922	-
Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2	-
Shigella flexneri	-
Pseudomonas aeruginosa 262	-
Morganella morganii	-
Vibrio parahemolyticus	-
Salmonella enterica serovar Enteritidis	-
Enterobacter aerogenes ATTCC 13048	-
Shigella sonnei	-
Citrobacter freundii ISP 1949/99	-

+ : Presencia de actividad antimicrobiana; - : Ausencia de actividad antimicrobiana.

5.3.1 Efecto de gicina A sobre la cinética de crecimiento de la bacteria blanco

El efecto de acción de gicina A se determinó mediante la alteración de la cinética de crecimiento la cepa sensible *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Un cultivo de $D.O._{600}$ = 0,2 se creció en presencia de una concentración final de 6400 UA/mL de la gicina A purificada y en metanol 70% en ausencia de la bacteriocina como control. El efecto sobre el crecimiento se determinó midiendo la O.D. a 600 nm y determinando las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). En la **Figura 7** se puede observar el efecto bactericida que ejercería la gicina A la bacteria sensible.

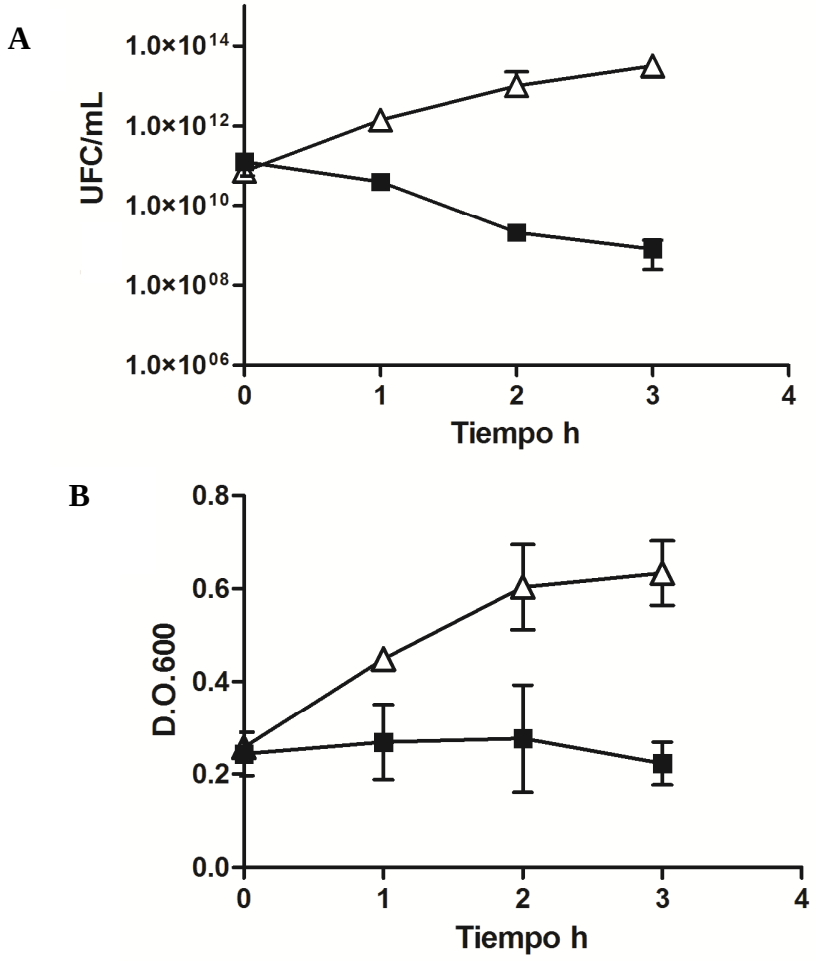

Figura 7. Cinética de acción de gicina A purificada.

Se añadió gicina A purificada a una suspensión de $D.O._{600}$ de 0, 2 de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en caldo nutritivo hasta una concentración final de 6700 UA/mL. **(A)** Viabilidad celular bacteriana de los cultivos en Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mL. **(B)** Densidad óptica a 600 nm ($D.O._{600}$) de los cultivos tratados con gicina A y control. ■: gicina A (6400 UA/mL) Δ: Control (sin gicina A)

Por otra parte, se evaluó el daño que la gicina A produce sobre la bacteria blanco mediante microscopía de fluorescencia utilizando los fluoróforos SYTO 9 y yoduro de Propidio (PI) incluidos en el sistema comercial para determinar viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight. Estos compuestos permiten determinar daño a nivel de la membrana plásmatica. El fluoróforo SYTO 9 entra a las bacterias vivas por receptores específicos y una vez dentro de la bacteria puede unirse al DNA. Este complejo es excitado a 470 nm y emite una florescencia verde a 530 nm. En cambio el colorante PI entra a las bacterias cuando existe daño en la membrana de la bacteria control. Al ser excitado a 470 nm el PI emite fluorescencia a 640 nm correspondiente a la emisión roja

En la **Figura 8** se puede observar el efecto de la gicina A sobre la membrana de células de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En los paneles A, B y C se observa el ensayo control de *Staphylococcus aureus* tratado con amortiguador durante 1 hora, donde el fluoróforo SYTO 9 entra a las bacterias vivas y una vez dentro de la bacteria se une al DNA. En contraste en el panel D, E y F se observa el cultivo de *Staphylococcus aureus* tratado con gicina A (3000 UA/mL) durante 1 hora, observándose la emisión roja generada por el PI unido al DNA el cual desplazó al fluoróforo SYTO9. En ambos casos la primera foto de izquierda a derecha (**Figura 8A y D**) representa la lectura en canal verde (células vivas), la segunda fotografía el canal en rojo (células muertas) (**Figura 8B y E**) y la tercera fotografía corresponde a la superposición de las dos fotografías anteriores (**Figura 8C y F**).

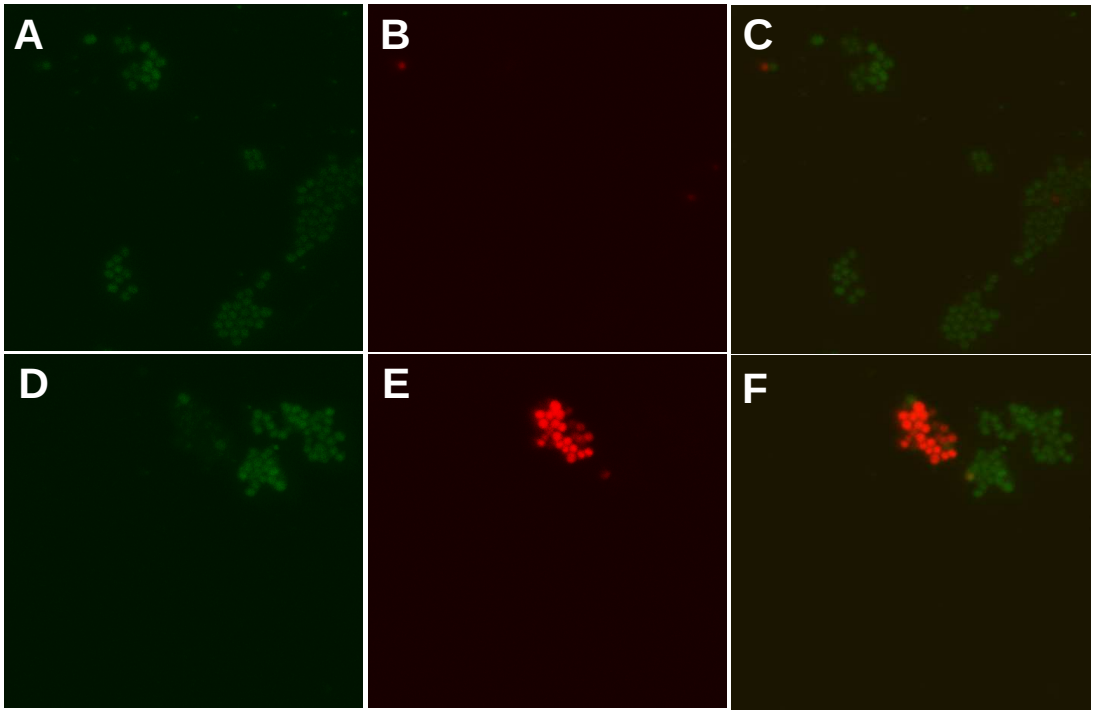

Figura 8. Efecto de la gicina A sobre la membrana de células de *Staphylococcus aureus*.

En **(A)**, **(B)** y **(C)** se observa el ensayo control sin bacteriocina. En **(D)**, **(E)** y **(F)** se observa el cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tratado con gicina A (3000 UA/mL) durante 1 hora. Tanto en **(A)** y **(D)** se representa la lectura en canal verde (células vivas). En **(B)** y **(E)** se observa la fotografía en el canal en rojo (células muertas). Por último **(C)** y **(F)** corresponden a la superposición de las dos fotografías anteriores.

5.4 Determinación de la citotoxicidad *in vitro* de gicina A sobre células eucariontes

Debido a los potenciales biotecnológicos en el área de alimentos y de biomedicina que presenta la gicina A se debe evaluar la toxicidad que esta bacteriocina presenta sobre células animales **(Hancock y Sahl 2006)**. En la literatura está bien descrito que las bacteriocinas son capaces de inhibir el crecimiento de células de la bacteria blanco siendo primeramente reconocidas por receptores específicos **(Lagos y cols. 2009)**. Para determinar la citotoxicidad que posee gicina A sobre células animales se realizaron ensayos de viabilidad celular *in vitro* sobre tres líneas celulares eucariontes. Las células eucariontes utilizadas corresponden a las líneas U937 (linfoma histocístico humano), K562 (leucemia mieloide) y HEK293 (embrionarias de riñon humano). Estas células se incubaron en concentraciones crecientes de gicina A durante 48 h. Luego se analizó el número de células muertas mediante tinción con azul de tripán y observación microscópica. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Por lo tanto, las células que presentan coloración azul son consideradas no viables. Posteriormente, se estimó el porcentaje de sobrevida de las células incubadas con gicina A respecto a un control de células que se incubaron con tampón a pH 7 en ausencia de la bacteriocina. De esta manera es posible observar el efecto sobre la proliferación de líneas celulares eucariontes que ejerce gicina A.

Los resultados indican que la gicina A presenta una toxicidad significativa sobre dos de las líneas celulares estudiadas **Figura 9**. Estas células corresponden a las células K562 y U937 que son de origen tumoral. Esta disminución de la sobrevida sólo fue significativa en la concentración de gicina A más alta en la que se incubaron las células y que corresponden a una concentración muy superior a la concentración mínima inhibitoria (CIM) de 2560 UA/mL, que gicina A presenta sobre la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

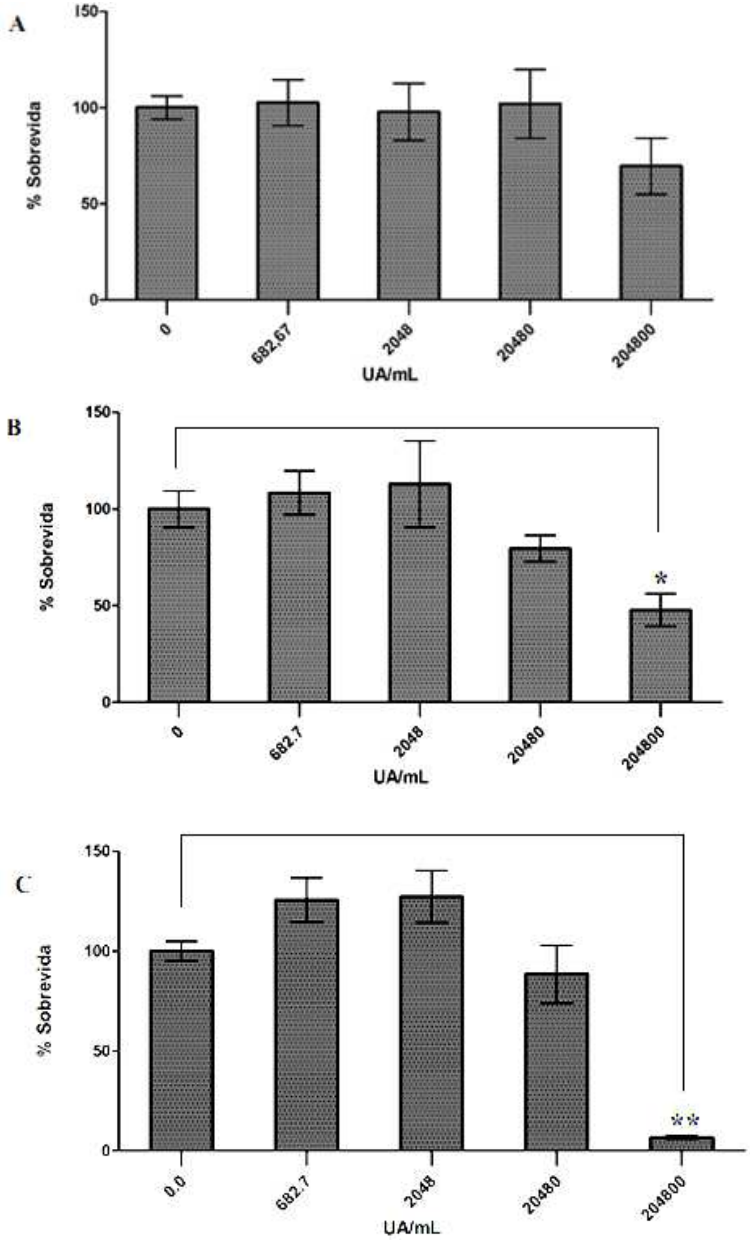

Figura 9. **Efecto de gicina A sobre líneas de células eucariontes**. Se midió el porcentaje de sobrevida de las líneas celulares HEK 293 **(A)**, K562 **(B)** y U962 **(C)**. Se observó una disminución en la sobrevida sólo en las líneas de origen tumoral. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6. Discusión

Esta tesis se centró en la caracterización de un nuevo compuesto tipo-bacteriocina producido por la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* O400 al cual denominamos gicina A. Para la realización de este trabajo se propusieron cuatro objetivos principales: la purificación de gicina A, su caracterización bioquímica, el modo de ejercer su efecto antibacteriano y la determinación de su toxicidad *in vitr*o sobre líneas celulares eucariontes.

6.1 Purificación de gicina A

Las bacteriocinas del tipo microcinas son conocidas por poseer alta hidrofobicidad y solubilidad en solventes orgánicos **(Kolter y Moreno, 1992)**. En el año 1984 **de Lorenzo** desarrolló un método para purificar la microcina E492 (una microcina de la clase II) mediante el uso de cromatografía con columnas hidrofóbicas **(de Lorenzo, 1984).** Basándose en este protocolo la purificación de gicina A primeramente se realizó empleando cromatografía en columnas hidrofóbicas Sep-pack C_{18}.

Las fracciones colectadas muestran que los eluidos correspondientes a 70, 80 y 90 % de metanol presentan actividad antimicrobiana sobre la cepa sensible de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 lo que indica que gicina A eluye en dichas fracciones. Además la cuantificación de proteínas y la determinación de la actividad antimicrobiana indicaron que la fracción de 80% posee una mayor actividad específica, mostrando que gicina A eluye mayormente a 80% metanol-agua.

Estos resultados indican que esta bacteriocina posee una alta hidrofobicidad, lo que hace suponer que gicina A esta constituida por una gran cantidad de aminoácidos de carácter hidrofóbico tales como glicina o alanina y aminoacidos sin carga tales como serina o cisteina. En las microcinas clase II descritas a la fecha, todas poseen un porcentaje importante de este tipo de aminoácidos, en la **Tabla VIII** se puede observar el porcentaje de composición de glicina y cisteína para las microcinas las cuales tienen todas sobre un 30% de estos aminoácidos en su

composición. Estos resultados muestran que gicina A presenta una alta hidrofobicidad, lo que se correlaciona con lo descrito en la literatura para las bacteriocinas de baja masa molecular del tipo microcinas de clase II **(Baquero y Moreno, 1984).**

Tabla VIII. Masa molecular y composición molecular de microcinas de clase I y clase II

Microcina	Clase	Numero de residuos	Masa Molecular (Da)	Contenido Glicina (%)	Contenido Serina (%)
MccB17	I	43	3093	60.5	13.9
MccC7/C51	I	7	1177	70	0
MccJ25	I	21	2107	28.6	64.8
MccV	IIa	88	8733	16.9	99.1
MccL	IIa	90	8884	15.6	66.6
MccN	IIa	73	7457	13.5	55.4
MccE492	IIb	84	8717	22.6	11.9
u-MccE492	IIb	84	7886	22.6	11.9
MccM	IIb	77	7283	19.5	23.4
MccH47	IIb	60	4865	26.6	15
MccI47	IIb	62	6276	10.8	16.2

Extraído de Duquesne y cols., 2007 y modificado según Corsini y cols., 2010.

El análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturantes, del eluído con mayor actividad antimicrobiana específica purificado mediante columnas hidrofóbicas Sep-pack C_{18}, revela la presencia de una proteína de masa aproximada de 7 kDa que posee actividad inhibiendo el crecimiento de la bacteria sensible. Debido a la masa molecular que presenta esta proteína, gicina A es una proteína con actividad antimicrobiana tipo bacteriocina del tipo microcina, ya que, es producida por una bacteria Gram negativo con masa inferior a 10 kDa y entraría en la subcategoría clase II que abarca a las microcinas con masa molecular entre 5 a 10 kDa..

Además la misma fracción analizada previamente mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se sometió a un segundo paso de purificación mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El perfil de elución obtenido del HPLC muestra que gicina A eluye a tiempos de retención de 4 a 5 minutos al observarse la presencia de la proteína al realizar electroforesis en geles de poliacrilamida y ensayar la actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de la cepa bacteriana sensible *Staphylococcus aureus* ATCC 2923. Estos resultados corroboran la presencia de gicina A en el eluído y la naturaleza hidrofóbica de esta misma.

6.2 Determinación masa molecular de gicina A

Datos preliminares que se presentaron en la introducción indicaron que la actividad antimicrobiana producida por la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* O400 era capaz de difundir a través de membranas de diálisis con tamaño de poro de 12 kDa **(Figura 1)** por lo que se esperaba que gicina A fuera una proteína pequeña. Por otra parte la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes de la bacterocina purificada mostró la presencia de una proteína de masa aproximada de 7 kDa. Al someter las fracciones purificadas mediante HPLC a espectrometría de masas MALDI-TOF se obtuvo un espectro de masas en el que se observó la presencia de una molécula de 7925 Da. Este resultado concuerda con lo observado en los experimentos previos donde gicina A difundía a través de la membrana de diálisis de tamaño de poro de 12 kDa, y donde presentaba una masa molecular aproximada de 7 kDa en geles de poliacrilamida.

Es bien sabido que *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* colonizan algunos nichos similares. Estas especies bacterianas son agentes infecciosos intrahospitalarios que afectan principalmente a pacientes inmunodeprimidos produciendo afecciones en el tracto respiratorio (**Mascellino y cols. 2001**). Existe una diversidad de interacciones entre ambas especies, encontrándose tanto sinergismo entre ellas para colonizar un nicho (**Hendricks y cols. 2001**), como también antagonismo microbiano entre ellas (**Burke y Patte, 1967**).

Como mecanismos antimicrobianos entre estas especies ha sido documentado la presencia de diversa actividad anti-staphyoloccocica de diversa naturaleza (enzimática, metabolitos secundarios, etc) producida por aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (**Mansito y cols. 1987**). En base a estos hallazgos se ha propuesto la producción de diversos tipos de compuestos con efectos antagonistas contra cepas de *Staphypolococcus aureus* por parte de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, incluyendo bacteriocinas y microcinas las que son empleadas como mecanismos de competencia debido a que ocupan el nicho ecológico (**Mashburn y cols.2005**; **Burke y Patte, 1967; Mansito y cols. 1987**). No obstante lo señalado anteriormente, un compuesto tipo bacteriocina de estas características de masa molecular y actividad antimicrobiana no ha sido reportado previamente en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

6.3 Estabilidad de gicina A a temperatura, pH y solventes

La mayoría de las bacteriocinas de baja masa molecular producidas tanto por bacterias Gram positivo como por bacterias Gram negativo son resistentes a condiciones extremas **(Héchard y Sahl, 2002; Gillor y cols., 2004).** Los resultados obtenidos confirman lo descrito en la literatura, ya que, la actividad antibacteriana de gicina A no se ve alterada en ninguna del amplio rango de temperaturas ensayadas. Esta estabilidad se observó de manera previa para altas temperaturas dado que en ensayos con la cepa productora de la bacteriocina eran concentrados por evaporación a 60 ºC, presentando una inhibición sobre el crecimiento bacteriano de un césped de la cepa indicadora de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Por otra parte, gicina A presentó estabilidad a temperaturas bajo 0 ºC y temperaturas cercanas a la ambiental **(Tabla IV).** Asimismo la actividad antimicrobiana de gicina A no es alterada al ser incubada en ninguno de los solventes estudiados **(Tabla V)** lo que es coincidente con las propiedades de las microcinas de clase II **(Baquero y cols. 1984)**.

No existe en la literatura explicaciones para este fenómeno de resistencia a condiciones extremas presente en este tipo de péptidos o polipéptidos, sin embargo, se puede proponer que estas proteínas tienen una gran capacidad de replegar su estructura terciaria, luego de haber sido sometidas a alguna de estas condiciones, recobrando de esta manera su actividad antimicrobiana

original. Otra opción para explicar este fenómeno es que los dominios aminoacídicos que le dan la actividad antimicrobiana no dependan fuertemente de la estructura terciaria de la proteína, de manera tal que, aún perdiendo su estructura terciaria por alguna condición, por ejemplo alta temperatura, estos dominios mantengan la estructura que produce la actividad antimicrobiana de la proteína. Sin duda este es un fenómeno interesante y que debe ser motivo de mayores estudios.

Continuando con el análisis de estabilidad de gicina A a condiciones extremas la incubación de la bacteriocina en amortiguadores con distintos valores de pH mostró una disminución en la actividad antimicrobiana de la bacteriocina a valores extremos de pH. Una explicación para este fenómeno podría ser considerar variables que puedan estar afectando en conjunto con el pH la estabilidad de la proteína, como por ejemplo el tiempo de incubación o la fuerza iónica presente en el tampón empleado para realizar estos ensayos. Estos factores pueden estar alterando la estructura de la proteína que le confiere a la bacteriocina la capacidad para volver a plegarse en su forma activa.

Por los resultados obtenidos gicina A puede ser clasificada como una bacteriocina hidrofóbica, termoestable cuya actividad es estable en diversos solventes orgánicos e inorgánicos y cuya actividad antimicrobiana se ve disminuida a valores extremos de pH.

6.4 Espectro de acción de gicina A

La actividad antimirobiana de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* O400 estudiada inicialmente abarcaba un estudio sólo sobre cuatro cepas bacterianas Gram positivo (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*) y cuatro bacterias Gram negativo analizadas *(Escherichia coli, Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Shigella sonnei, Pseudomonas aeruginosa).*

Para determinar si gicina A posee actividad antibacteriana sólo sobre bacterias Gram positivo se realizaron ensayos de actividad en placa ampliando el análisis a 10 cepas bacterianas Gram positivo y 10 cepas bacterianas Gram negativo. De este análisis se desprendió que gicina A no

presenta actividad antimicrobiana sobre ninguna de las 10 cepas de bacterias Gram negativo estudiadas, y solo tiene actividad antimicrobiana sobre cepas bacterianas Gram positivo. Esto es completamente novedoso, ya que no se ha descrito en la literatura una bacteriocina producida por una bacteria Gram negativo que presente actividad antimicrobiana sólo sobre bacterias Gram negativo. Todas las bacteriocinas por definición tienen actividad sobre cepas bacterianas de la misma especie o estrechamente relacionadas y además pueden poseer actividad sobre otras bacterias de especies diferentes a la cepa productora **(Joerger, 2002)**. Sin embargo gicina A no presenta actividad sobre otras cepas de *Pseudomonas aeruginosa* u otras bacterias relacionadas a ellas como algunas ɤ-proteobacterias tales como *Escherichia coli* o *Salmonella enterica* serovar Enteritidis miembros de la familia Enterobacteriaceae o a bacterias representantes del grupo Vibrionaceae como *Vibrio parahaemolyticus* entre otras especies bacterianas Gram negativo relacionadas a la cepa productora de esta bacteriocina.

6.5 Modo de acción de gicina A

Los resultados de alteración en la cinética de crecimiento producto de la gicina A muestran que el efecto de esta bacteriocina sobre la bacteria blanco es un efecto bactericida dado que produce un efecto letal en la bacteria disminuyendo la viabilidad celular (UFC/mL), pero no produce una lisis de las mismas, ya que la turbidez del cultivo ($D.O._{600}$), dado por los cuerpos celulares, no disminuyó durante el ensayo.

Este efecto antimicrobiano es característico de las bacteriocinas de clase II producidas por bacterias Gram positivo y en las microcinas de clase II producidas por bacterias Gram negativo, donde el mecanismo de acción de estos antimicrobianos es la alteración de la permeabilidad de la membrana celular de la bacteria blanco como se puede observar en la **Tablas I y II**.

Para corroborar si ocurre una permeabilización de la membrana celular de la bacteria blanco debido a la interacción de esta con gicina A, se realizó un ensayo de viabilidad celular utilizando el sistema comercial BACTO/LIVE® (Invitrogen). Este ensayo ratifica la hipótesis de que

gicina A tiene un efecto tóxico sobre la bacteria blanco generando un daño en la membrana plasmática y produciendo su permeabilización.

Los resultados muestran que esta bacteriocina tiene un efecto bactericida alterando la permeabilidad de la membrana celular de bacterias Gram positivo. Las bacteriocinas ejercen su efecto mediante receptores específicos que permiten la interacción de la bacteriocina con la bacteria blanco **(Lagos y cols., 2009)**. Las microcinas de clase II por lo general usan como receptores a proteínas involucradas en la captación de hierro o nutrientes tales como FepA, Cir, Fiu y Omp C, mediante estos receptores son capaces de traspasar la membrana celular externa hacia el periplasma y ejercer su efecto a nivel de la membrana celular interna de la bacteria **(Duquesne y cols. 2007)**. Sin embargo la actividad antimicrobiana producida por gicina A es selectiva sólo para bacterias Gram positivo. Esto hace suponer que debe existir un receptor específico que se expresa en este tipo de bacterias que permite la acción de esta bacteriocina. Un ejemplo conocido de blanco presente en bacterias Gram positivo utilizado por algunos antimicrobianos, incluido bacteriocinas, es el precursor de la síntesis de la pared celular el lípido II **(Breukink y, de Kruijff, 2006)**.

Una buena aproximación para el entendimiento del mecanismo molecular de acción de gicina A es el análisis de su secuencia aminoácidica para estudiar la existencia de homología con bacteriocinas cuyo mecanismo de acción ya se encuentre descrito o realizar genética reversa, a partir de la proteína purificada, para identificar el gen que codifica para gicina A. Actualmente en nuestro laboratorio se están abordando enfoques de genética molecular, a través de mutagénesis al azar por transposición, para identificar los determinantes genéticos involucrados en la producción de gicina A. Además, de manera paralela, se están elaborando genotecas.

6.6 Citotoxicidad de gicina A sobre células eucariontes

Antes de proponer una utilización de las bacteriocinas como agentes antimicrobianos con aplicaciones biotecnológicas para combatir infecciones en biomedicina, o como control de organismos en la industria alimenticia o sus posibles usos en probióticos, se hace necesario

evaluar la toxicidad que estas presentan sobre células eucariontes **(Hancock y Sahl 2006).** Hasta ahora se sabe que la acción de las bacteriocinas ocurre mediada por el reconocimiento de receptores específicos de la bacteria; por esto, la mayoría de estas proteínas no presentan toxicidad frente a líneas celulares eucariontes **(Lagos y cols., 2009)**.

Dado que hemos descubierto que gicina A posee un efecto tóxico en la bacteria blanco a través de la permeabilización de la membrana celular, evaluamos el efecto que esta ejercía sobre el crecimiento de líneas celulares eucariontes *in vitro*. Para la realización de este ensayo se utilizó dos líneas celulares de origen tumoral. Las células U937 correspondientes a un linfoma histocístico humano y las células K562 cuyo origen es una leucemia mieloide. Por otra parte se utilizó una línea celular cuyo origen eran células embrionarias de riñón humano la línea celular HEK 293.

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad de gicina A sobre las células eucariontes mostraron una disminución en el porcentaje de sobrevida de las líneas celulares de origen tumoral a valores altos de concentración de gicina A (204800 UA/mL). Esta disminución es más exacerbada en las células U937.

No obstante lo anterior, la citotoxicidad que gicina A presentó sobre las líneas celulares de origen tumoral se presenta a concentraciones de gicina A mayores a su CIM (2560 UA/mL), siendo unas 100 veces mayor que esta.

Las microcinas de clase II dada su alta hidrofobicidad tienen la propensión a formar agregados en soluciones acuosas **(Corsini y cols., 2010).** En el caso de gicina A para estos experimentos se concentró mediante evaporación a altas concentraciones solubilizando en un tampón acuoso de fosfato salino a pH 7 lo que es un medio idóneo para la formación de agregados de este tipo de bacteriocinas. Los agregados formados por algunos tipos de estas microcinas como la microcina E492 son de tipo amiloide e inducen apoptosis en algunas líneas celulares de origen tumoral **(Hetz y cols., 2002).** La formación de agregados en altas concentraciones de gicina A podría dar cuenta de la citotoxicidad que presenta sobre las líneas tumorales a tales concentraciones.

Debido a que gicina A no presentó citotoxicidad significativa sobre las células embrionarias de riñón humano y presentaron una disminución en la sobrevida a concentraciones altas de gicina A se puede concluir que esta bacteriocina no es citotóxica en células eucariontes de origen no tumoral y es levemente citotóxica en líneas celulares tumorales.

El fenómeno de citotoxicidad selectiva para células de origen tumoral, ha sido descrito para otros tipos de bacteriocinas como es el caso de algunas pyocinas, colicinas, pediocinas, microcinas entre otras **(Cornut y cols., 2008)**, lo que ha generado la oportunidad de aplicar estas proteínas como agentes antineoplásicos. Proseguir con estudios en el mecanismo mediante el cual gicina A genera esta citotoxicidad serán de utilidad para una posible aplicación en el campo de la biomedicina.

7. Conclusiones

1. **La gicina A es un polipéptido de 7925 Da con características clásicas de bacteriocinas y microcinas de clase II (hidrofóbico, termoestable, resistente a solventes orgánicos).**

2. **La actividad de gicina A disminuye a valores extremos de pH.**

3. **La gicina A ejerce su acción antibacteriana permeabilizando la membrana de la bacteria blanco.**

4. **La gicina A puede ser clasificada como un nuevo tipo de microcina que actúa sólo sobre bacterias Gram positivo.**

5. **La gicina A presenta citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares de origen tumoral solo a altas concentraciones.**

8. Bibliografía

1. Baquero F, Moreno F. (1984). The microcins. FEMS Microbiology Letters; **23**: 117-124.

2. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.; **72**: 248-254.

3. Burke ME, Pattee PA (1967). Purification and characterization of a staphylolytic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol.; **93**: 860-865.

4. Breukink E, de Kruijff B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. Nat. Rev. Drug Discov.; **5**: 321-332.

5. Collins, TJ. (2007). ImageJ for microscopy. BioTechniques*;* **43:** 25–30.

6. Cornut G, Fortin C, Soulières D. (2008). Antineoplastic properties of bacteriocins: revisiting potential active agents. Am. J. Clin. Oncol.; **31**: 399-404.

7. Corsini G, Karahanian E, Tello M, Fernandez K, Rivero D, Saavedra JM, Ferrer A. (2010). Purification and characterization of the antimicrobial peptide microcin N. FEMS Microbiol. Lett.; **312**: 119-125.

8. de Lorenzo. (1984). Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae.* Arch. Microbiol.; **139**: 72-75.

9. Duquesne S, Petit V, Peduzzi J, Rebuffat S. (2007). Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterialpeptides from enterobacteria. J. Mol. Microbiol Biotechnol.;**13**: 200-209.

10. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Ben Omar N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int. J. Food Microbiol.; **120**: 51-70.

11. Gillor O, Kirkup BC, Riley MA. (2004). Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. Adv. Appl. Microbiol.; **54**: 129-146.

12. Gillor O, Etzion A, Riley MA. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. Appl. Microbiol. Biotechnol.; **81**: 591-606.

13. Gratia A. (1925). Sur un rémarquable example d' antagonisme entre deux souches de colibacille. C. R. Séances Soc. Biol. Fil.; **93**: 1040-1041.

14. Hancock RE, Sahl HG. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat. Biotechnol.; **24**: 1551-1557.

15. Héchard Y, Sahl HG. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. Biochimie; **84**: 545-557.

16. Hendricks KJ, Burd TA, Anglen JO, Simpson AW, Christensen GD, Gainor BJ. (2001). Synergy between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of complex orthopaedic wounds. J. Bone Joint Surg. Am.; **83-A**: 855-861.

17. Hetz C, Bono M , Barros L, Lagos R. (2002). Microcin E492, a channel-forming bacteriocina from *Klebsiella pneumoniae*, Induces apoptosis in some human cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.; **99**: 2696–2701.

18. Higerd TB, Baechler CA, Berk RS. (1967). In vitro and in vivo characterization of pyocin. J. Bacteriol.; **93**: 1976-1986.

19. Jacob, F., Siminovitch, L. and Wollman, E., (1952). Sur la biosynthese d'une colicine et sur son mode d'action. Ann. Inst. Pasteur; **83**: 295-315.

20. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE (2006). Peptide antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev.; **19**: 491-511.

21. Joerger RD. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poult. Sci.; **82** : 640-647.

22. Klaenhammer TR. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev.; **12**: 39-85.

23. Lagos R, Tello M, Mercado G, García V, Monasterio O. (2009). Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. Curr. Pharm. Biotechnol.; **10**: 74-85.

24. Mansito TB, Falcón MA, Moreno J, Carnicero A, Gutierrez-Navarro AM. (1987). Effects of staphylolytic enzymes from *Pseudomonas aeruginosa* on the growth and ultrastructure of *Staphylococcus aureus*. Microbios.; **49**: 55-64.

25. Mascellino MT, Delogu G, Pelaia MR, Ponzo R, Parrinello R, Giardina A. (2001). Reduced bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* of blood neutrophils from patients with early adult respiratory distress syndrome. J. Med. Microbiol.: **50**: 49-54.

26. Mashburn LM, Jett AM, Akins DR, Whiteley M. (2005). *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. J. Bacteriol.; **187**: 554-566.

27. Maqueda M, Sánchez-Hidalgo M, Fernández M, Montalbán-López M, Valdivia E, Martínez-Bueno M. (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Rev.; **32**: 2-22.

28. Michel-Briand Y, Baysse C. (2002). The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie; **84**: 499-510.

29. Nissen-Meyer J, Nes IF. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. Arch. Microbiol. **167**: 67-77.

30. Nomura M. (1967). Colicins and related bacteriocins. Annu. Rev. Microbiol. **21**: 257-284.

31. Oscáriz JC, Pisabarro AG. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Int. Microbiol.; **4**: 13-19.

32. Padilla C, Lobos O, Brevis P, Abaca P, Hubert E. (2002). Effects of the bacteriocin PsVP-10 produced by *Pseudomonas sp*. on sensitive bacterial strains. Rev. Latinoam. Microbiol.; **44**: 19-23.

33. Padilla C, Lobos O, Hubert E, Poblete F, Navarro A, Nuñez L. (2006). In vitro antibacterial activity of the peptide PsVP-10 against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* with and without glycocalyx. Int. J. Antimicrob. Agents.; **27**: 212-216.

34. Parret AH, De Mot R. (2002). Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other gamma-proteobacteria. Trends. Microbiol.; **10**: 107-112.

35. Parret AH, Schoofs G, Proost P, De Mot R. (2003). Plant lectin-like bacteriocin from a rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* isolate. J. Bacteriol.;**185**: 897-908.

36. Pons AM, Lanneluc I, Cottenceau G, Sable S. (2002). New developments in non-post translationally modified microcins. Biochimie; **84**: 531-537.

37. Riley MA, Wertz JE. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. Biochimie; **84**: 357-364.

38. Sano Y, Kageyama M. (1984). Genetic determinant of pyocin AP41 as an insert in the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. J. Bacteriol.;**158**: 562-570.

39. Schägger, H., von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem; **166**: 368-379.