



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Bioquímica

Profesor Patrocinante

Dra. Margarita Concha G.

Instituto de Bioquímica

Facultad de Ciencias

ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS
APOLIPOPROTEINAS A-I Y A-II EN LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE HDL DEL PEZ *Cyprinus carpio*

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y al Título
profesional de ***Bioquímico***

KARINA PAOLA CASTRO PARADA

VALDIVIA – CHILE

2005

*“Dedicada con cariño a todos los que confiaron en mi,
especialmente a mamá y a mi familia...
Gracias...”*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a la Dra. Margarita Concha G. y al Dr. Rodolfo Amthauer, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, guiarme y apoyarme en esta etapa de mi formación profesional.

Quiero hacer partícipes en mis agradecimientos a los profesores informantes: Dr. Jaime Figueroa y Dr. Hugo Folch, por aceptar formar parte de la comisión evaluadora y aportar en la corrección de esta tesis.

Al Dr. Jaime Figueroa le agradezco particularmente su buena disposición y sus gratas conversaciones.

Me gustaría agradecer especialmente a la Dra. Margarita Concha, quien no solo ha sido una excelente guía profesional; su apoyo, comprensión y consejos me han ayudado más de lo que se imagina y me han permitido mejorar como persona.

A la profesora Julieta Villanueva le agradezco por sus conocimientos y gran calidez humana. También quiero agradecer a mis compañeros y amigos Rodrigo L, Nadya B, Adriana B, Valeria L, por su excelente disposición y agradable compañía. Especialmente le agradezco a Romi por su amistad desinteresada e incondicional.

A toda mi familia, quienes, más allá de la distancia, siempre han estado a mi lado apoyándome. Sin su amor y comprensión no podría haber llegado hasta éste punto.

Agradezco en general a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, me han ayudado.

Esta tesis fue financiada por el proyecto DID-UACH S-200211

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
INDICE DE CONTENIDOS	i
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1 Materiales	14
3.1.1 Reactivos	14
3.1.2 Equipos	15
3.2 Métodos	16
3.2.1 Animales de experimentación	16
3.2.2 Purificación de proteínas	16
3.2.2.1 Obtención de plasma de carpa	16
3.2.2.2 Purificación de HDL mediante cromatografía de afinidad	17
3.2.2.3 Purificación de apoA-I mediante cromatografía de filtración en gel	18

3.2.3	Determinación de concentración de proteínas	19
3.2.3.1	Determinación de concentración de proteínas por el método de ácido bicinconinico	19
3.2.3.2	Determinación de concentración de proteínas por el método de Bradford modificado	19
3.2.4	Cinética de digestión con quimotripsina de apoA-I asociada a HDL	20
3.2.5	Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalantes (PAGE-SDS) y electrotransferencia	21
3.2.5.1	PAGE-SDS	21
3.2.5.2	PAGE-SDS Tris-Tricina-SDS	22
3.2.5.3	Electrotransferencia	23
3.2.6	Preparación de Ac anti-péptido carboxilo terminal de apoA-I de carpa hecho en conejo	24
3.2.6.1	Obtención de suero pre-inmune	24
3.2.6.2	Inmunización de conejos	24
3.2.6.3	Evaluación del suero anti-péptido C-terminal apoA-I de carpa hecho en conejo mediante <i>dot blot</i>	25
3.2.6.4	Evaluación de la especificidad del suero anti-péptido para apoA-I de carpa por análisis de <i>Western Blot</i>	26
3.2.7	Ensayos de actividad Antimicrobiana	27
3.2.7.1	Ensayo de Actividad Bacteriostática y	27

Bactericida en Microplaca	
3.2.7.2 Ensayo de difusión radial en agar Mueller-Hinton	29
3.2.8 Ensayo de actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Purificación de HDL y las apolipoproteínas A-I y A-II	31
4.2 Evaluación de la susceptibilidad y estabilidad de la HDL plasmática de carpa frente a condiciones específicas	34
4.3 Análisis estructural de un péptido sintético análogo al C-terminal de apoA-I	38
4.4 Preparación del antisuero anti-péptido C-terminal de apoA-I de carpa	41
4.5 Evaluación de la proteólisis limitada de apoA-I asociada a HDL con quimotripsina	41
4.6 Análisis de la actividad bacteriostática del péptido sintético y las apoA-I y A-II de la HDL	46
4.7 Análisis de la actividad bactericida de la HDL y la apolipoproteína A-I	49
4.8 Evaluación del sinergismo entre el péptido sintético de apoA-I y la proteína antimicrobiana lisozima	51

4.9	Evaluación del efecto hemolítico del péptido sintético de apoA-I	53
5.	DISCUSIÓN	56
6.	BIBLIOGRAFÍA	68

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	
Análisis electroforético de HDL purificada desde plasma de carpa	32
Figura 2	
Purificación de las apolipoproteínas de HDL de carpa	33
Figura 3	
Degradación de apoA-I plasmática de carpa	35
Figura 4	
Estabilidad de HDL deslipidada y no deslipidada	36
Figura 5	
Evaluación de la estabilidad de HDL de carpa sin deslipidar durante incubación con <i>E. coli</i> .	37
Figura 6	
Análisis de Western blot de la incubación de HDL con bacterias Gram negativas	39
Figura 7	
Predicción de α -helicidad del péptido C-terminal de apoA-I y modelo tridimensional de apoA-I de carpa	40
Figura 8	
Especificidad del suero anti-péptido C-terminal con respecto a apoA-I asociada a HDL	42

Figura 9	43
Título del suero anti-péptido C-terminal de apoA-I de carpa	
Figura 10	
Cinética de proteólisis limitada de apoA-I asociada a HDL	45
Figura 11	
Efecto inhibitor del crecimiento bacteriano de las apolipoproteínas A-I y A-II	48
Figura 12	
Actividad bactericida de HDL plasmática de carpa	50
Figura 13	
Actividad bactericida de apoA-I plasmática de carpa	52
Figura 14	
Sinergismo del péptido de apoA-I con lisozima	54
Figura 15	
Efecto hemolítico del péptido sintético de apoA-I	55

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1:	
Actividades bacteriostática y bactericida de apoA-I y apoA-II de carpa.	47

LISTAS DE ABREVIATURAS

A	: absorbancia
ANSA	: ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico
apoA-I	: apolipoproteína A-I
apoA-II	: apolipoproteína A-II
BCIP	: 5- bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BSA	: albúmina sérica de bovino
ufc	: unidades formadoras de colonias
C-terminal	: carboxilo terminal
EDTA	: ácido etiléndiamino tetracético
KLH	: keyhole lymphet hemocyanin
LB	: caldo de cultivo Luria-Bertani
LBA	: medio de cultivo sólido Luria-Bertani
M-H	: medio de cultivo Müller-Hinton
NBT	: nitroazul de tetrazolio
PMSF	: fluoruro de sulfonilfenilmetano
PSA	: persulfato de amonio
QT	: quimotripsina
r.p.m.	: revoluciones por minuto
SDS	: dodecil sulfato de sodio
Temed	: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris	: Tris (hidroximetil) aminometano

UV

: ultravioleta

1. Resumen.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la lipoproteína de alta densidad (HDL) es la proteína más abundante en el plasma de la carpa (*Cyprinus carpio*), y presenta una potente actividad antimicrobiana *in vitro*. Para evaluar la contribución de sus apolipoproteínas mayoritarias (apoA-I y apoA-II) en esta función defensiva, se las purificó desde el plasma de carpa a través de dos etapas cromatográficas que involucran, cromatografía de afinidad y filtración en gel. Ambas apolipoproteínas mostraron actividad bactericida y/o bacteriostática en el rango micromolar, en un ensayo de dilución en microplaca, contra diversas bacterias susceptibles, incluyendo patógenos de peces.

Se sabe que varios péptidos antimicrobianos son producidos por proteólisis parcial de proteínas precursoras inactivas. En este contexto, el péptido sintético derivado de la región C-terminal de apoA-I de carpa, también demostró actividad antimicrobiana ($EC_{50} = 3-6 \mu M$) contra *Planococcus citreus*, sin un efecto hemolítico detectable. Adicionalmente, mediante ensayos de difusión radial, éste péptido fue capaz de potenciar la actividad antimicrobiana de la lisozima, a concentraciones sub-inhedoras para ambos efectores.

Finalmente, *in vitro* se generó un fragmento truncado mayoritario a partir de apoA-I asociada a HDL sometida a proteólisis limitada con quimotripsina, lo que sugiere que péptidos con actividad bactericida pueden ser liberados desde apoA-I *in vivo*.

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que estas proteínas podrían actuar como efectores importantes de la inmunidad innata de peces teleósteos, tanto a nivel sistémico como en mucosas.

1. Summary

Previous studies in our laboratory showed that high density lipoprotein (HDL) is the most abundant protein in the carp (*Cyprinus carpio*) plasma and displays antimicrobial activity *in vitro*. To evaluate the contribution of its major apolipoproteins (apoA-I y apoA-II) in this defensive role, they were isolated from the carp plasma by two chromatographic steps, involving affinity and gel filtration chromatography.

Both apolipoproteins showed bactericidal and/or bacteriostatic activity in the micromolar range in a microplate dilution assay, against several susceptible bacteria, including fish pathogens.

It is known that several antimicrobial peptides are produced by partial proteolysis from inactive precursor proteins. In this context, the synthetic peptide derived from the C-terminal region of carp apoA-I also demonstrated antimicrobial activity ($EC_{50} = 3-6 \mu\text{M}$) against *Planococcus citreus*, without detectable haemolytic effect. Additionally, this peptide was able to enhance the antimicrobial activity of lysozyme at sub-inhibitory concentrations of both effectors, in radial diffusion assays.

Finally, *in vitro* a major truncated fragment was generated from HDL-associated apoA-I after limited proteolysis with chymotrypsin, which suggests that apoA-I peptides could be liberated *in vivo*.

These results strongly suggest that these proteins could act as important effectors of innate immunity in teleost fishes, both at systemic and mucosal level.

2. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune de los vertebrados cuenta con dos tipos de respuesta frente a las distintas agresiones del medio: la respuesta inmune específica o adaptativa y la respuesta inmune innata o inespecífica. El primer tipo de respuesta reacciona solo frente a las estructuras antigénicas que la estimularon y además posee “memoria”, lo que permite que la segunda respuesta frente a un mismo antígeno sea mayor y más rápida que la primera (se dice que el individuo está inmunizado contra ese antígeno). Al contrario, la respuesta inmune innata es inespecífica y no posee memoria, es un mecanismo de defensa más primitivo pero que también juega un papel fundamental en la protección del ser vivo, impidiendo su colonización por otros organismos invasores, y constituye la primera línea de defensa contra el patógeno. Además, se ha demostrado recientemente que el sistema inmune innato también juega un papel regulatorio de la respuesta inmune adquirida (Janeway y Medzhitov, 2002, Pasare y Medzhitov, 2004).

En los vertebrados superiores el sistema inmune específico está mucho más desarrollado que en los vertebrados inferiores y es por eso que a medida que se descende en la escala zoológica la inmunidad innata adquiere mayor relevancia. Para los peces teleósteos, como la carpa (*Cyprinus carpio*), el sistema inmune innato es esencial; por ello el estudio de sus componentes es fundamental si se quiere desarrollar nuevas estrategias con el fin de estimular esta respuesta temprana y de esta manera poder obtener mejores resultados en la prevención de las infecciones.

Los péptidos y proteínas antimicrobianas son importantes efectores del sistema inmune innato y cumplen un rol fundamental en todos los escenarios donde

se han descrito hasta el momento (Lehrer y Ganz, 1999; Silva, 2004). Estos efectores constituyen un grupo de moléculas muy heterogéneo, presentes en fluidos, fagocitos y mucosas (Zaslhoff, 2002).

Solo recientemente se ha demostrado la importancia de estas moléculas en la defensa primaria de los peces. En este contexto, varios estudios describen la presencia de diferentes proteínas antimicrobianas en la piel de la carpa y de otros peces teleósteos (Robinette y col., 1998; Smith y col., 2000; Ebran y col., 2000; Fernández y col., 2002; 2004; Concha y col., 2003). Cabe destacar que varias de estas moléculas antimicrobianas corresponderían a proteínas o a péptidos liberados desde proteínas sin una aparente función inmune, tales como las histonas H1 y H2A (Fernandes y col., 2002, 2004; Cho y col., 2002; Richards y col., 2001).

En los peces, la piel cumple una importante función defensiva frente a las agresiones físicas, químicas y biológicas del medio acuático. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde las principales rutas de entrada e invasión bacteriana son el aparato digestivo y respiratorio, en los peces los agentes invasores ingresan fundamentalmente a través de la piel y las branquias. En la mayoría de los teleósteos las células epiteliales no se queratinizan, lo que en principio dejaría a este tejido más expuesto a las agresiones del medio (Yasutake y Wales, 1983); sin embargo, la presencia de barreras primarias como el mucus, así como otros mecanismos de inmunidad innata, actúan eficientemente en la defensa frente a patógenos. En este sentido, el mucus cutáneo que recubre la epidermis ejerce una función trascendente en la mencionada defensa primaria de los peces, tanto gracias a sus propiedades físicas como químicas (Fouz y col., 1990; Buchmann, 1998; Fast y col., 2002; Smith y col., 2000; Ebran y col., 2000). Entre los componentes químicos activos que contiene el mucus se encuentran principalmente proteínas y

carbohidratos secretados principalmente por las células mucosas y epiteliales. Entre las proteínas que intervienen en su rol defensivo se destacan las inmunoglobulinas M, aglutininas naturales, C3 (factor 3 del complemento), peroxidasa, interleuquina 1, lisozima y una serie de proteasas (Hatten y col., 2001; Buchmann y Bresciani, 1998; Brokken y col., 1998).

Por otro lado, a nivel sanguíneo se encuentran proteínas de fase aguda (por ej., proteína C reactiva y transferrina) y lisozima; siendo esta última la principal proteína antimicrobiana en la sangre de estos organismos (Fast y col., 2002; Smith y col., 2000). Para las proteínas de fase aguda, distintos estudios sugieren que en estos organismos, en contraste a lo que ocurre en los mamíferos, estas proteínas son constituyentes normales del suero y su concentración puede estar aumentada después de una infección bacteriana, en respuesta al estrés, manipulación, exposición antigénica, etc (Olabuenaga, 2000).

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron la presencia de la lipoproteína de alta densidad (HDL) tanto en el mucus como en la piel de la carpa, además se demostró que la HDL aislada de plasma de carpa posee actividad bactericida frente a una cepa de *E. coli* no patogénica (Concha y col., 2003). El hecho de que HDL corresponde a la fracción proteica más abundante y anódica del plasma de *Cyprinus carpio* y otros peces teleósteos (Amthauer y col. 1989; Metcalf y col., 1999), cuando dichos organismos se destacan por su notable economía metabólica, sugiere que ésta podría estar realizando otras importantes funciones en estos vertebrados.

Los principales componentes proteicos de la HDL son las apolipoproteínas A-I (apoA-I) y A-II (apoA-II), de aproximadamente 27,5 y 12,5 kDa, respectivamente. La síntesis de apoA-I en la mayoría de los vertebrados ocurre principalmente en el

hígado e intestino delgado: ambos tejidos cumplen una importante función en la movilización de lípidos. La apolipoproteína es sintetizada como una preproteína, luego de perder su péptido señal en el retículo endoplásmico rugoso, la proproteína es llevada al aparato de Golgi donde se forman las partículas de HDL nacientes y una vez que éstas son secretadas, la apoA-I continúa siendo procesada en el plasma por acción de alguna proteasa específica para dar origen a la proteína madura (Scanu, 1987; Dixon y Ginsberg, 1992).

En lo que respecta a la estructura de la HDL, el modelo propuesto por Segrest y col. (1999) es uno de los más aceptados para las partículas de HDL nacientes o partículas discoidales, éste postula que cada partícula estaría constituida por dos monómeros de apoA-I orientados antiparalelamente, que rodearían como un cinturón doble a una pequeña bicapa monolaminar de aproximadamente 160 moléculas de fosfolípidos. En la circulación esta partícula naciente sufre diferentes modificaciones que la transforman en una partícula esférica y que corresponde a la forma predominante en el plasma de los mamíferos (Settasatian y col., 2001). Se sabe que en esta maduración participan tanto otras proteínas que se encuentran en el plasma como los tejidos periféricos (Clay y col., 2000).

Por otro lado, también se ha descrito en algunas especies sitios secundarios de síntesis de esta proteína en tejidos, tales como riñón, músculo, cerebro y piel (Byrnes y col., 1987; Lenich y col., 1988, Tarugi y col., 1991). Si bien la síntesis de apoA-I ha sido ampliamente estudiada en mamíferos, no ocurre lo mismo con especies vertebradas inferiores. Esto es particularmente cierto en lo que se refiere a expresión y secreción de apoA-I en tejidos periféricos. En *Cyprinus carpio* se analizó la síntesis de apoA-I en intestino delgado e hígado, sin embargo solo se observó abundante síntesis en hepatocitos (Amthauer, 1990), mientras que el intestino

delgado no presentó el transcrito (Concha y col., 2005). Además, Concha y col. (2003) demostraron la expresión y localización de apoA-I en la piel de este pez.

En mamíferos, además de la reconocida función de HDL (particularmente apoA-I) como activador de la enzima lecitin colesterol acil transferasa (LCAT) y de su efecto anti-aterogénico asociado a su participación en el transporte reverso de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado (Frank y Marcel, 2000), se le han descrito otras funciones menos estudiadas, entre las que se destacan aquellas relacionadas con un posible rol defensivo, como por ejemplo su actividad antioxidante en el plasma (Mashima y col., 1998), su capacidad de unir y neutralizar al lipopolisacárido bacteriano (Massamiri y col., 1997), su actividad antimicrobiana y antiviral en el plasma (Tada y col., 1993; Hu y col., 1994). Ninguna de estas funciones ha sido estudiada en vertebrados inferiores, particularmente en peces teleósteos.

En el caso particular de nuestro modelo experimental, la carpa, la función de la HDL y/o sus apolipoproteínas en la piel parece no ser exclusivamente el transporte reverso de colesterol ya que en primer lugar estas proteínas son sintetizadas en las células basales de la epidermis de la carpa (Concha y col., 2003) y luego, aparentemente, serían secretadas mayoritariamente al mucus que la recubre y no a los vasos sanguíneos. Por ello, la presencia de HDL y sus principales apolipoproteínas en este tejido periférico sugiere que podrían estar formando parte de la batería de proteínas y otras moléculas que constituyen la compleja película mucosa que protege al epitelio del ataque de microorganismos patógenos y oportunistas. Asimismo, como ya se mencionó, el trabajo de Concha y col. (2003) demostró además que la HDL aislada del plasma de carpa posee actividad bactericida frente a una cepa de *E. coli* no patogénica, lo que sugiere que alguna de

sus apolipoproteínas componentes podrían ser responsables de esta actividad, constituyéndose en efectores importantes de la inmunidad innata en la carpa a nivel sistémico (sangre y mucosas).

Se sabe que tanto el epitelio de vertebrados superiores como inferiores están normalmente cubiertos por microorganismos, sin embargo, éstos generalmente no logran colonizar dichos epitelios debido a que además de las barreras físicas presentes, existe una producción constitutiva o inducida de péptidos y proteínas antimicrobianas por parte de las células epiteliales (Schroeder, 1999). Los péptidos antimicrobianos han sido aislados de muchos organismos, incluyendo animales, plantas e insectos (Vizioli y Salzet, 2002; Silva, 2004) Estos varían considerablemente en tamaño, secuencia aminoacídica y estructura secundaria (Lehrer y Ganz, 1999; Zasloff, 2002). Entre los diferentes grupos de péptidos antimicrobianos caracterizados hasta la fecha, uno de los más estudiados corresponde al de los péptidos catiónicos, lineales y con estructura α -helicoidal anfipática (Tossi y col., 2000; Zasloff, 2002). Se ha descrito que estos péptidos interactúan con membranas y, posiblemente, éstas constituyan el blanco para ejercer su acción bactericida y fungicida. Si bien se desconoce el mecanismo exacto por el cual ejercen su acción, se sabe que la permeabilización de membranas, producida por la interacción péptido-lípido, es importante en dicha actividad antibacteriana y puede ocurrir por dos mecanismos posibles: a) formación de poros de transmembrana; y b) destrucción o solubilización de membranas (Oren y Shai, 1998). La característica estructural de hélices anfipáticas, en las cuales residuos hidrofóbicos e hidrofílicos se localizan en caras opuestas de la hélice, es un motivo estructural presente en muchos péptidos y proteínas que se unen a membranas. Coincidentemente, a pesar que las apoA-I de las especies estudiadas hasta el

momento presentan una secuencia aminoacídica muy variable, poseen características estructurales conservadas entre las que se destacan repeticiones de 22 y 11 residuos aminoacídicos que formarían α -hélices anfipáticas, cruciales para la interacción de esta proteína con membranas celulares (Brouillette y col., 2001). En el caso particular de la apoA-I de carpa, el modelo tridimensional de la secuencia parcial de la apolipoproteína, generado mediante SWISS-MODEL, reveló que adoptaría una estructura esencialmente α -helicoidal, en cuyo extremo carboxilo terminal habría regiones que presentan carga neta positiva. Por lo tanto, cabía plantearse la posibilidad de que en caso de liberarse un péptido desde el extremo carboxilo terminal de esta proteína, éste sería un buen candidato como péptido antimicrobiano.

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos existentes, la función defensiva de HDL podría ser dependiente de alguna de sus apolipoproteínas mayoritarias, o estar dada por la acción combinada de varias proteínas. Tampoco se puede descartar la participación de algún lípido transportado por HDL en la actividad antimicrobiana que ésta manifiesta o bien que ésta sea mediada por algún(os) péptido(s) liberado(s) desde apoA-I o apoA-II por proteólisis limitada durante la respuesta inflamatoria. Con respecto a esto último, estudios realizados indican que proteasas liberadas por mastocitos humanos (ej. quimasa y tripsina) atacan a la apoA-I asociada a partículas de HDL₃ generando una apoA-I truncada en el extremo carboxilo terminal (Lee y col., 2002, 2003; Lindstedt y col., 1999). Además, se ha establecido que la proteólisis parcial de HDL por tripsina anula prácticamente la capacidad de apoA-I de remover colesterol de las células (Méndez y Oram, 1997). Este hallazgo también es consistente con el crítico papel que desempeña el dominio carboxilo terminal de apoA-I en la unión de membranas y la remoción de colesterol

(Favari y col., 2002). En cuanto a la apoA-II, se ha descrito que posee actividad bactericida en el plasma bovino y que un péptido sintético correspondiente a su extremo carboxilo terminal también es activo (Motizuki y col., 1999, 2002).

Otro dato a tener en cuenta en el difícil análisis del mecanismo por el cual HDL ejercería su actividad antimicrobiana, es que la HDL está involucrada en el transporte de la única catelicidina humana descrita (hCAP-18), la cual es precursora del péptido antimicrobiano LL-37 (Sorensen y col., 1999). Por lo tanto, cabe la posibilidad que la lipoproteína lleve a cabo su función defensiva a través de alguna otra proteína antimicrobiana transportada por ella. Adicionalmente, las apolipoproteínas también parecen contribuir a la defensa primaria a través de la modulación de células defensivas en mamíferos (Furlaneto y col., 2002).

El hecho que HDL y sus apolipoproteínas puedan participar en la defensa innata de los peces no se contradice con su conocida función en el transporte reverso de colesterol ya que se ha descrito que una parte importante de proteínas, sin aparente actividad inmunológica, luego de ser procesadas por proteasas específicas, liberan uno o más péptidos con potente actividad antimicrobiana. Tal es el caso de lactoferrina bovina de 80 kDa, que luego de su digestión con pepsina, libera un péptido antimicrobiano de 25 residuos denominado lactoferrina B, éste adoptaría una estructura anfipática y es capaz de despolarizar la membrana de *E. coli* (Ulvatane y col., 2001). Otros ejemplos lo constituyen péptidos antimicrobianos derivados de la histonas H2A (Park y col., 2000; Cho y col., 2002)) y el péptido LL-37, cuya proteína precursora es hCAP-18, la cual es secretada por neutrófilos a la sangre y se ha demostrado que aumenta considerablemente en los queratinocitos durante enfermedades inflamatorias de la piel (Sorensen y col., 1999; Frohm y col., 1997).

Un aspecto relevante de los péptidos antimicrobianos es que, además de su acción directa, algunos de ellos muestran actividad sinérgica con otros componentes del sistema inmune innato, como por ejemplo la lisozima. Esta enzima, también conocida como muramidasa, causa la lisis de bacterias Gram positivas a través de la hidrólisis de la capa de mucopolisacáridos de la pared celular de dichas bacterias (Ibrahim y col., 2002, Olabuenaga, 2000). Se encuentra presente en suero, mucus, neutrófilos, monocitos y macrófagos, tanto en peces de agua dulce como salada (Fast y col., 2002). Parece ser la principal molécula antimicrobiana presente en la sangre de los peces (Smith y col., 2000), sin embargo resulta poco probable que sea capaz de ejercer una protección sistémica por si sola debido a que es bastante ineficaz sobre las bacterias Gram negativas (el tipo más común en ambientes acuáticos). Existen antecedentes que indican sinergismo entre la acción antimicrobiana de la lisozima y la de pequeños péptidos catiónicos (Patrzykat y col., 2001). Sin embargo, no solo se podría pensar en la posibilidad de que HDL, apoA-I y/o algún(os) péptido(s) puedan potenciar la actividad de lisozima, sino que también cabe la posibilidad que la brecha en la actividad antimicrobiana de la lisozima sobre los Gram negativos, sea cubierta por la acción de estas moléculas no específicas capaces de proteger al organismo en un amplio espectro de microorganismos.

Finalmente, cabe destacar que la industria de peces salmónidos en Chile genera un ingreso de mil millones de dólares anualmente (Vidal, 2002) y en un creciente mercado competitivo uno de los desafíos más importantes para la sustentabilidad de esta industria lo constituye el control de las infecciones transmisibles, que en caso de no ser efectivamente controladas pueden tener efectos devastadores. El uso de vacunas y antibióticos ha ayudado a controlar enfermedades infecciosas, sin embargo un uso excesivo de ellos a menudo favorece

la resistencia de los patógenos. En este sentido, Chile se estima que ya supera en 75 veces el uso de antibióticos a Noruega, que es el primer productor de salmón. La creciente multi-resistencia de las bacterias, en todos los escenarios afectados, ha llevado a la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos con nuevos mecanismos de acción. El hecho de que los péptidos antimicrobianos se encuentren en la mayoría de los organismos y formen parte clave de la inmunidad innata de éstos, además de demostrar una potente actividad frente a un amplio espectro de microorganismos, los ha transformado en los mejores candidatos para el potencial uso terapéutico.

En base a todos los antecedentes antes mencionados se planteó la siguiente hipótesis:

“La actividad bactericida de la HDL del pez *Cyprinus carpio* es dependiente de las apolipoproteínas A-I y/o A-II o bien podría radicar en algún péptido liberado a partir de éstas por la acción de diversas proteasas”. El (los) péptido(s) generado(s) tendrían estructura α -helicoidal anfipática y carácter catiónico, ambas características estructurales presentes en otros péptidos antimicrobianos.

En este contexto, la presente tesis se focalizó en los siguientes objetivos generales:

- Evaluar la participación de las apolipoproteínas (apoA-I y A-II) en la actividad bactericida de HDL de carpa.
- Analizar si la posible actividad bactericida de apoA-I radica en su extremo carboxilo terminal
- Analizar la sensibilidad de HDL y sus principales apolipoproteínas frente a alguna(s) proteasa(s) específica(s).

Según esto se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Purificar HDL plasmática y sus apolipoproteínas por cromatografía de afinidad y filtración en gel, respectivamente.
2. Evaluar la actividad bactericida de HDL, apoA-I y apoA-II purificadas.
3. Evaluar la sensibilidad de HDL y sus apolipoproteínas frente a una o más proteasas.
4. Determinar por análisis de *Western blot* si el (los) péptido(s) de menor tamaño liberado(s), corresponden a la región carboxilo terminal de apoA-I.
5. Analizar la estructura secundaria de la región carboxilo-terminal de apoA-I y diseñar un posible péptido antimicrobiano.
6. Preparar y evaluar un antisuero contra dicho péptido.
7. Evaluar la actividad bactericida del péptido sintético
8. Asociado con el objetivo anterior, evaluar el espectro antimicrobiano del péptido sintético.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos Químicos

Sigma Chemical Co.: BSA Fracción V liofilizada, heparina, azul de bromofenol, ácido aminocaproico, Sephacryl S-200, ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico, Benzocaina..

Merck, Darmstadt, Alemania: hidróxido de sodio, ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), urea, fluoruro de sulfonilfenilmetano (PMSF), benzamidina, metanol, etanol absoluto, éter dietílico, glicerol, β -mercaptoetanol, dodecilsulfato de sodio (SDS), fosfato monoácido de sodio, fosfato diácido de potasio, N,N'-Metilenbisacrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), xilol, etanol absoluto, ácido acético, glicerol 87%, azida de sodio, peptona de caseína, extracto de levadura granulada, agar-agar granulada libre de inhibidores, medio Caso, agar Mc Conkey y agar GSP (glutamato almidon rojo-fenol).

Invitrogen-Gibco BRL, Inc: Tris[hidroximetil]aminometano (Trizma-base); anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado a fosfatasa alcalina, nitroazul de tetrazolium (NBT), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), estándar de peso molecular para electroforesis en geles de poliacrilamida (Protein ladder Benchmark).

PIERCE: kit para determinación de proteínas por el método del ácido bicinconínico.

J. T. Baker: Acrilamida, ácido clorhídrico, glicina.

Calbiochem: quimotripsina de páncreas bovino

Bio-Rad Labs: resina Affi-Gel[®] Blue-Gel, persulfato de amonio, azul de Coomassie R-250, tricina, Azul de Coomassie G-250, acrilamida, Tween 20.

Difco: medio de crecimiento Mueller-Hinton.

Equilab: etanol, metanol, isopropanol, ácido acético (todos de grado técnico).

Global Peptide Services LLC, Colorado, USA: síntesis de péptido carboxilo terminal de apoA-I de carpa [AQEFRQSVKSGELRKKMNELGRRR]. El péptido fue sintetizado utilizando química del tipo N-(9-fluorenil)metoxicarbonilo) y luego fue purificado a >70% por HPLC.

3.1.2 Equipos

Agitador magnético Nuova Stirrer Thermolyne; agitador termorregulado Orbit Environ-Shaker de Lab-Line Instruments, Inc.; agitador Gerhardt Bonn RO-10; agitador Polymax 1040 Heidolph; autoclave Orthman; balanza ESCALTEC SPO 61; balanza analítica ESCALTEC SBA 33; baño termorregulado C20 de MGW Lauda; centrífuga clínica; centrífuga refrigerada RC-5 Superspeed Du Pont Instruments Sorvall; rotor GSA; microcentrífuga Boeco M-24; espectrofotómetro UV-150-02 Shimadzu; fuente de poder BRL Modelo 500 de Life Technologies, Inc.; bomba de vacío Air Cadet, Cole-Palmer Instrument Co.; sistema de filtración de Advantec MFS, Inc.; equipo Bio-dot de Bio-Rad; Lector de microplacas Multiskan EX original Labsystems; microplacas estériles de 96 pocillos Falcon; microondas Somela; estufa Memmert BE- 300 D-91126 FRG Germany; micropipetas Gilson P-1000, P-200, P-20, P-10 ; micropipetas Eppendorf P-100, P-10; micropipeta Nichipet Ex P-5000; transiluminador TFX-20 M de Vilber Lourmat; pHímetro Inolab 8F93 de Laboratory Equipment; Cromatógrafo de baja presión BioLogic LP; Colector de fracciones modelo 2128 de Bio-Rad; ultra turrax Janke & Kunkel Ika-Werk; trampa de

condensación refrigerada modelo RT-100A y sistema centrífuga-concentrador Speed-vac, Savant Instr.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Animales de experimentación

Los especímenes de *Cyprinus carpio* utilizados en los procedimientos experimentales fueron capturados en el río Cayumapu (provincia de Valdivia) y mantenidos en cautiverio en una jaula sumergida a orillas del río Cau-Cau. Los peces utilizados pesaban entre 1,5 y 2,0 kg.

Para la preparación del antisuero anti péptido carboxilo-terminal de apoA-I de carpa, se utilizaron conejos adultos corrientes, los cuales fueron mantenidos en el vivero del Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina durante todo el período de inmunización y posterior a la obtención del suero.

3.2.2 Purificación de proteínas

3.2.2.1 Obtención de plasma de carpa

Las muestras de sangre se extrajeron con jeringa heparinizada por punción cardiaca desde carpas anestesiadas en baño de agua conteniendo benzocaina 50 mg/l. Posteriormente, se eliminaron las células sanguíneas mediante centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C en rotor SS-34 en centrífuga Sorvall RC-5. Al plasma obtenido se le adicionaron los inhibidores de proteasas PMSF y benzamidina, a una concentración final de 1 y 2 mM, respectivamente. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su utilización.

3.2.2.2 Purificación de HDL mediante cromatografía de afinidad

La purificación de HDL desde el plasma de carpa se realizó de acuerdo a lo descrito por Amthauer y col. (1988; 1989); para ello, se utilizó una columna de Affi-Gel Blue-agarosa (1,5 cm x 19 cm, $V_c = 33,6$ ml). La columna se equilibró con tampón citrato de sodio 50 mM pH 6,5; NaCl 50 mM y EDTA 2,5 mM, luego se aplicaron 6 ml de plasma y se lavó con tampón citrato de sodio 50 mM pH 6,5; NaCl 350 mM y EDTA 2,5 mM, con el fin de eliminar proteínas contaminantes. Se colectaron fracciones de 3 ml cada una, y se continuó el lavado hasta que la absorbancia a 280 nm de estas muestras alcanzó un valor menor a 0,03. Posteriormente, la lipoproteína retenida fue eluída utilizando tampón de elución, el cual contiene citrato de sodio 50 mM pH 6,5; NaCl 50 mM; EDTA 2,5 mM y fluoróforo ANSA 0,06 % (p/v), a un flujo de 0,5 ml/min. Las fracciones obtenidas que mostraron mayor fluorescencia bajo luz ultravioleta se reunieron en una sola y se dializaron contra tampón citrato de sodio 1 mM, pH 6,5; EDTA 0,1 mM, durante aproximadamente 16 h, realizándose 4 cambios de tampón de diálisis con intervalos de tiempo de aproximadamente 4h. A la HDL obtenida se le adicionaron los inhibidores de proteasas PMSF (1 mM) y benzamidina (2 mM). Finalmente, se llevó a una concentración final de proteínas de alrededor de 6 a 8 mg/ml, utilizando un concentrador por medio de vacío (*Speed- vac*).

Finalizada la cromatografía, se regeneró la resina haciendo pasar, en forma sucesiva, soluciones de: NaOH 20 mM, agua destilada, urea 6 M en NaCl 2 M, agua destilada y finalmente tampón de equilibrio en caso de ser utilizada inmediatamente o azida de sodio 0,02% (p/v) para su conservación en frío, hasta su nuevo uso.

3.2.2.3 Purificación de apoA-I mediante cromatografía de filtración en gel

Previo a la purificación de apoA-I y apoA-II de la HDL aislada del plasma de carpa, se realizó una extracción de los lípidos con una mezcla de etanol-éter (3:2 v/v) a -20°C durante toda la noche. Luego se centrifugó a 6.000 x g en rotor GSA en centrífuga Sorvall RC-5 durante 20 minutos a 4°C. Las lipoproteínas deslipidadas fueron resuspendidas en un pequeño volumen de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,6; EDTA 1 mM. Posteriormente, se realizó una segunda deslipidación en las condiciones antes descritas, durante 2 h. Se centrifugó y el sobrenadante se resuspendió en 1 ml de solución tampón conteniendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,6; EDTA 1 mM y Urea 8 M.

Las muestras fueron fraccionadas en una columna de Sephacryl S-200 (1,5 cm. x 96 cm, Vc: 169,6 ml), la cual se acopló a un cromatógrafo de baja presión BioLogic LP (BioRad). Este instrumento permite monitorear la absorbancia a 280 nm y las fracciones eluidas son colectadas automáticamente por un colector 1228. La columna fue previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,6; EDTA 1 mM, Urea 8 M, y para la elución se utilizó el mismo tampón, colectándose fracciones de 1 ml a un flujo de 0,25 ml/min. Las fracciones correspondientes a apoA-I se reunieron en una sola y ésta se dializó contra tampón Tris-HCl 5 mM, pH 8,6; EDTA 0,1 mM para eliminar la urea. Este mismo procedimiento se realizó con apoA-II. La purificación lograda a través del proceso antes descrito se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

3.2.3 Determinación de concentración de proteínas

3.2.3.1 Determinación de concentración de proteínas por el método del ácido bicinconínico

La concentración de proteínas en las distintas muestras se determinó por el método del ácido bicinconínico, utilizando un KIT (PIERCE) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó una curva de calibración, con un rango de concentración de albúmina desde 0 a 1 mg/ml. El volumen de muestra fue de 50 μ l, al cual se le agregó 1 ml de reactivo (sulfato cúprico y ácido bicinconínico) y se incubó por 5 minutos a 50°C. Finalmente se determinó la absorbancia a 562 nm.

Este método se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ , dependiente de la concentración de proteínas en medio alcalino. El Cu^+ forma un complejo altamente específico con el ácido bicinconínico, que tiene una absorbancia máxima a 562 nm. La cantidad de complejo formado es directamente proporcional a la concentración de proteínas utilizada (Smith y col., 1985).

3.2.3.2 Determinación de concentración de proteínas por el método de Bradford modificado

La base de éste método es la misma que para el método de Bradford, se utiliza la propiedad del colorante azul de Coomassie G-250 de unirse a las proteínas. El colorante libre presenta un máximo de absorbancia a 465 nm mientras que cuando se encuentra unido a proteínas éste presenta un λ_{max} a 595 nm. Con el fin de obtener la razón 595/465 nm, que permite linealizar la curva entre concentraciones de 0,5 y 50 μ g de proteína por tubo, se realizan las lecturas a esas 2 longitudes de onda (Sedmak y Grossberg, 1977)

Para este método se utiliza una solución de azul de Coomassie G250 al 0,06% (p/v) en HCl 0,6 N. Dicha solución se filtró y se diluyó con HCl hasta obtener una absorbancia de 1,3 -1,5 a 465 nm, que corresponde al máximo de absorbancia para la forma leuco del colorante.

Se realizó una curva de calibración, con un rango de concentraciones de BSA desde 0 a 1 mg/ml. El volumen de muestra utilizado fue de 50 μ l, el cual se diluyó a 0,5 ml con una solución de NaCl 0,15 M y posteriormente se le agregó 0,5 ml del colorante. Finalmente se determinó absorbancia a 595 nm y 465 nm y se calculó la razón A_{595}/A_{465} de las lecturas obtenidas, restándole la razón A_{595}/A_{465} obtenida para el blanco de reactivo.

3.2.4 Cinética de digestión con quimotripsina de apoA-I asociada a HDL

Para la proteólisis limitada de apoA-I asociada a HDL, 290 μ g de HDL disuelta en bicarbonato de amonio 150 mM fueron incubados a 37°C con quimotripsina pancreática bovina a una razón molar proteasa/lipoproteína de 1:100. Cabe destacar que el tiempo cero se tomó antes de agregar la QT y posterior a la adición de la proteasa, durante 3,5 h., se extrajeron alícuotas de 45 μ l cada 30 minutos. La reacción se detuvo calentando las alícuotas a 95°C por 5 min en tampón de muestra (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; glicerol 10 % (v/v); SDS 2 % (p/v); 5 % (v/v) β -mercaptoetanol; y azul de bromofenol). Los productos de digestión obtenidos se sometieron a electroforesis en gel Tris-Tricina (descrito en sección 3.2.5.2) y posteriormente a análisis por *Western Blot* (sección 3.2.6.4)

3.2.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y electrotransferencia

3.2.5.1 PAGE-SDS

Las proteínas fueron separadas de acuerdo a su masa relativa por PAGE-SDS (Laemmli y col., 1970). Se preparó un gel separador 12,5 % (p/v) de poliacrilamida de aproximadamente 7 cm de alto con la siguiente composición: 12,5 % (p/v) de poliacrilamida, tampón Tris-HCl 0,375 M pH 8,8; SDS 0,1 % (p/v); persulfato de amonio 0,03 % (p/v) y TEMED 0,1 % (v/v). Sobre éste se agregó un gel espaciador de alrededor de 2 cm de alto con la siguiente composición: 4 % (p/v) poliacrilamida, tampón Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v), persulfato de amonio y TEMED en iguales concentraciones al gel separador. Ambas partes se prepararon a partir de un "stock" de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 % (p/v).

Las proteínas fueron diluidas en tampón de muestra 5X constituido por: Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 1 % (p/v), glicerol 10 % (v/v); 2-mercaptoetanol 5 % (v/v) y azul de bromofenol 0,05 % (p/v) (marcador del frente iónico). Posteriormente, las muestras se hicieron migrar con una corriente de 25 mA hasta que el frente iónico alcanzó el final del gel (aproximadamente 3 horas). El tampón de electrodos contenía Tris-HCl 25 mM, glicina 0,19 M y SDS 0,1 % (p/v). Finalizada la electroforesis, el gel se fijó durante 1 hora en una solución de isopropanol 25 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v), y posteriormente se tiñó con una solución de azul de Coomassie R-250 0,3 % (p/v), metanol 30 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v) durante 1 h. Para desteñir el gel, se utilizó una solución de metanol 30 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v) hasta la aparición de las bandas de proteínas.

3.2.5.2 PAGE Tris-tricina-SDS.

Este tipo de electroforesis utiliza un sistema de tampón Tris-tricina, el cual permite una mayor resolución de las bandas de proteínas de bajo peso molecular (Schägger y Von Jagow, 1987). En este gel las proteínas son fraccionadas por peso molecular y consta de tres partes. La primera, de aproximadamente 6,5 cm de alto, tenía la siguiente composición: 17% (p/v) de poliacrilamida a partir de un "stock" de acrilamida/bisacrilamida 48:3 % (p/v), tampón Tris-HCl 1M pH 8,9, SDS 0,1% (p/v), glicerol 9,3% (v/v), persulfato de amonio 0,03 % (p/v) y TEMED 0,03 % (v/v). La segunda parte del gel midió aproximadamente 2 cm de alto con la siguiente composición: 10 % (p/v) de poliacrilamida a partir de un "stock" de acrilamida/bisacrilamida 48:1,5 % (p/v), tampón Tris-HCl 1 M pH 8,9, SDS 0,1 % (p/v), persulfato de amonio 0,05 % (p/v) y TEMED 0,03 % (v/v). La tercera parte, que corresponde al gel espaciador, midió aproximadamente 2 cm de alto, y tenía la siguiente composición: 5% (p/v) de poliacrilamida a partir de un "stock" de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 % (p/v), tampón Tris-HCl 0,128 M pH 6,8, EDTA 2 mM, persulfato de amonio 0,1 % (p/v) y TEMED 0.05 % (v/v). Las muestras de proteínas fueron solubilizadas en tampón de muestra (SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, 2- mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol 5% (p/v) (marcador de frente iónico), y calentadas a 99°C por 5 min. Para separar las muestras, se aplicó una corriente de 22 mA por 14 h. El tampón de ánodo contenía Tris-HCl 0,2 M pH 8,9 y el tampón de cátodo contenía Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS 0,1 % (p/v).

Finalizada la electroforesis, el gel se fijó en una solución de isopropanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v) durante al menos 4 h y posteriormente se tiñó en una solución de azul de Coomassie R-250 0,3 % (p/v), metanol 30% (v/v) y ácido acético

10% (v/v) por 1 h. Para desteñir se utilizó una solución de metanol 30 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v) hasta la aparición de las bandas de proteínas.

3.2.5.3 Electrotransferencia

Concluida la electroforesis, las proteínas separadas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema semiseco (LABCONCO Semy Dry Blotter) de acuerdo al procedimiento descrito por Bolte y col. (1997, 1998). En primera instancia, el gel separador se equilibró en tampón de electrotransferencia (Tris-HCl 25 mM pH 9,4; glicina 192 mM; metanol 20 % (v/v)) durante 30 min. Mientras transcurría este tiempo, se colocaron 2 papeles filtro Whatman 3MM prehumedecidos en solución tampón ánodo 1 (Tris-HCl 0,3 M pH 10,4 y metanol 20% (v/v)), sobre el polo positivo de la cámara (ánodo). A continuación se depositó una hoja de papel filtro humedecida en tampón ánodo 2 (Tris-HCl 25 mM pH 10,4 y metanol 20 % (v/v)); sobre ésta se ubicó la membrana de nitrocelulosa previamente equilibrada por 10 minutos en H₂O desionizada. El gel se colocó sobre la membrana, hacia el polo negativo (cátodo) y se agregaron 3 hojas de papel filtro humedecidas en tampón Tris-HCl 25 mM pH 9,4; ácido aminocaproico 40 mM y metanol 20 % (v/v) (tampón cátodo).

La transferencia se llevó a cabo durante 45 min, aplicando una corriente constante de 2,5 mA/cm². Finalizada la transferencia, se dejó secar la membrana a temperatura ambiente sobre un papel filtro; el gel se fijó y tiñó en forma habitual para comprobar que la transferencia de proteínas desde el gel fue completa.

3.2.6 Preparación de anticuerpo anti-péptido carboxilo terminal de apoA-I de carpa hecho en conejo

3.2.6.1 Obtención de suero pre-inmune

Previo a la inmunización de los conejos, desde la vena marginal de la oreja, se extrajeron 10 ml de sangre a cada animal. La sangre se incubó durante 1 hora a 37°C para retracción del coágulo y luego se centrifugó a 2500 rpm por 10 min. Se separó el suero y en seguida se lo incubó a 56°C por 30 min para inactivar el complemento. Finalmente, se centrifugó a 7000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente y al sobrenadante se le adicionó EDTA 1mM y PMSF 0,2 mM como inhibidores de proteasas. Las alícuotas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. Los sueros preinmunes de los conejos fueron evaluados por Western blot para evaluar la presencia de anticuerpos que reaccionen contra proteínas plasmáticas de carpa. Se seleccionó para su posterior inmunización aquellos que no presentaron reacción con antígenos de carpa.

3.2.6.2 Inmunización de conejos.

El suero contra el péptido sintético (AQEFRQSVKSGELRKKMNELGRRR), correspondiente a la región carboxilo terminal de apoA-I de carpa, se preparó acoplándolo a hemocianina (KLH), proteína inmuno-estimulante que se utiliza como proteína "carrier" para la producción de anticuerpos contra moléculas pequeñas (haptenos). El procedimiento usado fue el siguiente: 4 mg del péptido se disolvieron en 1 ml de PBS 1X (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,4) pH 7,1 estéril, posteriormente se adicionó 1 ml de hemocianina 8 mg/ml y se mezcló suavemente. Luego, se fue adicionando, cuidadosamente (gota a gota), 520 µl de glutaraldehído 102 mM en alícuotas de 20 µl y se dejó en agitación suave durante

1 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 1 ml de glicina 10 mM y se llevó a un volumen final de 12 ml con PBS 1X. Las alícuotas obtenidas se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Para la primera inoculación se homogenizaron 2 ml del péptido sintético conjugado a KLH (antígeno) con 2 ml de coadyuvante de Freund completo en un Politrón (Ultraturrax Janke y Kunkel) hasta que se obtuvo una pasta cremosa. Esta mezcla se inyectó por vía subcutánea en diferentes partes del lomo del animal. Transcurridos 12 días se realizó la segunda inoculación. El homogeneizado del antígeno esta vez se realizó con 2 ml de coadyuvante de Freund incompleto. La tercera inoculación se realizó a los 24 días posteriores a la primera aplicación y en las mismas condiciones que la segunda. Finalmente, transcurridos 10 días, el conejo se sangró por la vena marginal de la oreja para evaluar el título del antisuero. Luego de comprobar que el título era adecuado (al menos 1/1.000), se obtuvo el antisuero sangrando el conejo de la misma manera. La sangre recogida sin anticoagulante se procesó de la misma forma antes descrita para la obtención del suero pre-inmune (sección 3.2.6.1). El antisuero se repartió en alícuotas de 25 µl y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

3.2.6.3 Evaluación del suero anti-péptido carboxilo terminal apoA-I de carpa hecho en conejo mediante *dot blot*

Para este ensayo, 1 µl del péptido sintético AQEFRQSVKSGELRKKMNELGRRR (5 mg/ml) se inmovilizó en membranas de nitrocelulosa (1 cm²) utilizando un equipo *Bio-dot* (Bio-Rad) conectado a un sistema de vacío. Posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana utilizando solución Blotto (leche descremada 5% (p/v), Tween 20 0,05% (v/v) y PBS

1X) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. La membrana se lavó 3 veces con PBS 1X por espacio de 3 minutos cada vez.

Las membranas se incubaron con las distintas diluciones del suero anti-péptido en Blotto (desde 1/500 hasta 1/2.500) y con el suero preinmune, que fue utilizado como control, durante 4 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se realizaron 3 lavados cortos con PBS 1X, de 5 minutos cada uno; posteriormente todos los trozos de membrana se incubaron durante 1,5 h con una dilución 1/2.500 de anti-IgG de conejo preparado en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina (Gibco-BRL). Finalmente las membranas se lavaron 3 veces más con PBS 1X, durante 3 minutos cada lavado y se equilibraron por 10 min en tampón fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1M y MgCl₂ 5 mM). La presencia de marcas inmunoreactivas se reveló agregando tampón de la enzima con los sustratos NBT (0,33 mg/ml) y BCIP (0,17 mg/ml), en oscuridad. La reacción se detuvo con EDTA 5 mM y luego las membranas se secaron a temperatura ambiente.

3.2.6.4 Evaluación de la especificidad del suero anti-péptido para apoA-I de carpa por análisis de *Western Blot*

Con el objetivo de evaluar la especificidad del suero anti-péptido C-terminal, los productos de la digestión con quimotripsina de la apoA-I de carpa asociada a HDL, fueron separados en PAGE Tris-tricina-SDS, cargándose aproximadamente 10 µg de proteína en cada carril. Finalizada la electroforesis se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo al procedimiento descrito en el punto **3.2.5.3**.

Posteriormente, la membrana se bloqueó con solución Blotto durante 2 h en agitación constante, luego, según sea el caso, se incubó con el anticuerpo anti-péptido diluido 1/1.500, suero anti-apoA-I de carpa diluido 1/25.000 o suero anti-

apoA-II de carpa diluido 1/1.000 (diluciones preparadas en Blotto), durante al menos 2 h. La membrana se lavó 3 veces con abundante PBS 1X por espacio de 5 min cada vez y se incubó, por 1 h más, con una dilución 1/2.500 del anticuerpo anti-IgG de conejo preparado en cabra y conjugado a fosfatasa alcalina. Luego de lavar 3 veces con PBS 1X, se equilibró durante 10 min con tampón fosfatasa (Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 5 mM). Finalmente se agregó el tampón de la enzima que contenía los sustratos NBT (0,33 mg/ml) y BCIP (0,17 mg/ml) y se reveló la actividad de la fosfatasa en oscuridad y a temperatura ambiente. La reacción se extendió hasta la aparición de bandas de proteínas inmunoreactivas y se detuvo con agua desionizada y EDTA 5 mM. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente en papel absorbente.

3.2.7 Ensayos de Actividad Antimicrobiana

3.2.7.1 Ensayo de Actividad Bacteriostática y Bactericida en Microplaca

La actividad antimicrobiana de las proteínas purificadas se analizó por una modificación del método de inhibición del crecimiento bacteriano en microplacas utilizando diluciones seriadas (Tada y col., 1993; Friedrich y col., 1999; Concha y col., 2003).

Las suspensiones bacterianas se efectuaron, creciendo bacterias, almacenadas a -70°C, en medio sólido agar M-H, GSP, Mc Conkey y LBA, aptos para el crecimiento de *Planococcus citreus* (NCIMB 1493), *Pseudomonas sp.*, *Yersinia ruckeri* y *Escherichia coli DH-5α*, respectivamente; durante toda la noche, a 37 °C para *E. coli* y a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) para el resto de las bacterias. De estos cultivos se tomó una colonia aislada de la cepa y se creció en medio líquido M-H, LB y Caso (dependiendo si se trataba de *P. citreus*, *E. coli*,

Pseudomonas sp. o *Y. ruckeri*, respectivamente) durante toda la noche, a las temperaturas adecuadas para el crecimiento de cada cepa bacteriana en particular. Posteriormente, una alícuota de estos cultivos se diluyó 1:100 con medio fresco y se dejó incubando hasta fase exponencial. Luego se centrifugaron las bacterias a 3.000 r.p.m, y se lavaron con una solución estéril de NaCl 0,85% (p/v) para finalmente ser resuspendidas en medio de modo de obtener una concentración final de 1×10^7 ufc/ml.

En una microplaca estéril de 96 pocillos, pre-tratada durante 1 h con BSA 1 mg/ml, se mezclaron 100 μ l de la suspensión bacteriana (diluida 1:500) con diluciones seriadas, con factor 2, de la proteína o péptido a evaluar en BSA 0,2% (p/v) estéril. El control positivo contenía solamente suspensión bacteriana y solución BSA sin la proteína. La microplaca se incubó a temperatura ambiente hasta que la atenuancia del control positivo, a 570 nm, alcanzó aproximadamente 0,2. Como blanco se utilizó la solución diluyente. El EC_{50} se definió como la concentración más baja de péptido/proteína capaz de reducir la atenuancia del cultivo bacteriano en un 50% con respecto al control positivo.

La concentración mínima bactericida (MBC) para *Y. ruckeri* y *Pseudomonas sp.* se obtuvo plaqueando el contenido de cada pocillo que no mostró crecimiento visible. Mientras que para obtener la MBC de apoA-I con *E. coli*, se procedió a preparar una microplaca de 24 pocillos que contenía varias diluciones, en medio LB, de la proteína a evaluar (apoA-I). Posteriormente, se agregó a cada pocillo 10 μ l de la suspensión bacteriana diluida 1:500, exceptuando al control negativo (sin proteína), y se procedió a la incubación durante 6 h a 37°C y 100 rpm. Luego, para el recuento de colonias se diluyó una alícuota de cada pocillo 1:25 en PBS 1X y se

sembraron 50 μ l de estas diluciones por duplicado en placas de agar LB, las cuales se crecieron a 37°C durante aproximadamente 18 h.

La MBC se consideró como la concentración más baja capaz de prevenir cualquier aparición de colonias luego de un periodo de incubación de 24 h a la temperatura apropiada.

3.2.7.2 Ensayo de difusión radial en agar Mueller-Hinton

El sinergismo entre Lisozima y el péptido sintético de apoA-I de carpa, se analizó mediante el método descrito por Smith y col (2000), utilizando como microorganismo susceptible la bacteria gram-positiva, *P. citreus*.

Para preparar el cultivo de *P. citreus* en fase exponencial, se tomó una colonia aislada de la cepa y se creció en medio de cultivo Mueller-Hinton, durante aproximadamente 20 h a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 2.000 x g durante 10 min y el sedimento bacteriano se lavó con medio M-H y se resuspendió en 5 ml del mismo medio, ajustando la atenuancia a 570 nm a 0,4

Luego, el agar base se preparó fundiendo 30 ml de agar Mueller-Hinton, y una vez que éste alcanzó la temperatura cercana a 37°C (sin solidificarse) se adicionaron 200 μ l de la suspensión bacteriana, se homogenizó rápidamente y se vertió en placa Petri estéril de 10 x 10 cm. Luego de 45 min de solidificación en la placa (a 4°C), se formaron los pocillos necesarios succionando el agar con una pipeta Pasteur de plástico estéril de 1 ml y utilizando una plantilla. En cada pocillo se depositaron 3-4 μ l de las proteínas/péptidos a evaluar. La placa se almacenó durante aproximadamente 3 h a 4°C, hasta que las muestras difundieron en el agar. El *top* agar se preparó de la misma forma que el agar base, en el momento que alcanzó la temperatura adecuada se lo depositó sobre el agar base y la placa se

incubó a temperatura ambiente hasta la aparición de claras zonas de inhibición (halos). Para cuantificar la actividad antimicrobiana se midió el diámetro del halo, restándole el diámetro del pocillo y luego se calculó el área en cm^2 .

3.2.8 Ensayo de actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos

La sangre humana, extraída utilizando como anticoagulante heparina, se centrifugó a $1.000 \times g$ para eliminar el plasma. Los eritrocitos se lavaron cuatro veces con PBS 1 x estéril y posteriormente, fueron diluidos con el mismo tampón preparando una suspensión al 2% (v/v).

Se prepararon diluciones seriadas con factor de 2 del péptido sintético de apoA-I, melitina (conocido péptido antimicrobiano) y Tritón X-100. De cada dilución se extrajeron $50 \mu\text{l}$ y se mezclaron, en una microplaca estéril de 96 pocillos, con alícuotas de $100 \mu\text{l}$ de la suspensión sanguínea al 2%. Finalmente, la microplaca se incubó durante 3 h a temperatura ambiente con agitación constante. Como controles negativos se utilizaron PBS y agua destilada. Al cabo de este tiempo se determinó en que pocillos ocurrió hemólisis, esto se visualiza claramente por la ausencia de sedimentación de glóbulos rojos y un intenso color rojo en el sobrenadante.

4. RESULTADOS

4.1 Purificación de HDL y las apolipoproteínas A-I y A-II

Para la purificación de las apolipoproteínas de la HDL desde el plasma de carpa se realizaron secuencialmente dos etapas cromatográficas tal como se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 1 se muestra el análisis electroforético en geles PAGE-SDS de la primera etapa de purificación, en el primer carril se observa la separación de las proteínas totales del plasma de carpa, donde claramente se puede apreciar que las apolipoproteínas A-I y A-II corresponden a fracciones abundantes; el carril 2 contiene la HDL eluida de la columna de afinidad con ANSA apreciándose el alto grado de pureza logrado.

Para la purificación de las dos apolipoproteínas mediante cromatografía de filtración en gel, fue necesario someter a la HDL a dos deslipidaciones sucesivas, lográndose optimizar el resultado sometiendo a la HDL a una primera deslipidación más extensa que la segunda. En la Figura 2 se observa el perfil de elución obtenido de la columna Sephacryl S-200, donde se aprecian 3 picos principales, que de acuerdo a análisis previos corresponden a: 1) agregados de ambas apolipoproteínas, 2) apoA-I, y 3) apoA-II. El inserto de la Figura muestra el análisis de la purificación por PAGE-SDS al 12,5%, donde el carril 2 contiene el pico 2 correspondiente a apoA-I purificada (27,5 kDa) y el carril 3, al pico 3 que contiene apoA-II (12,5 kDa). La ausencia de otras bandas en el gel muestra el importante grado de pureza obtenido.

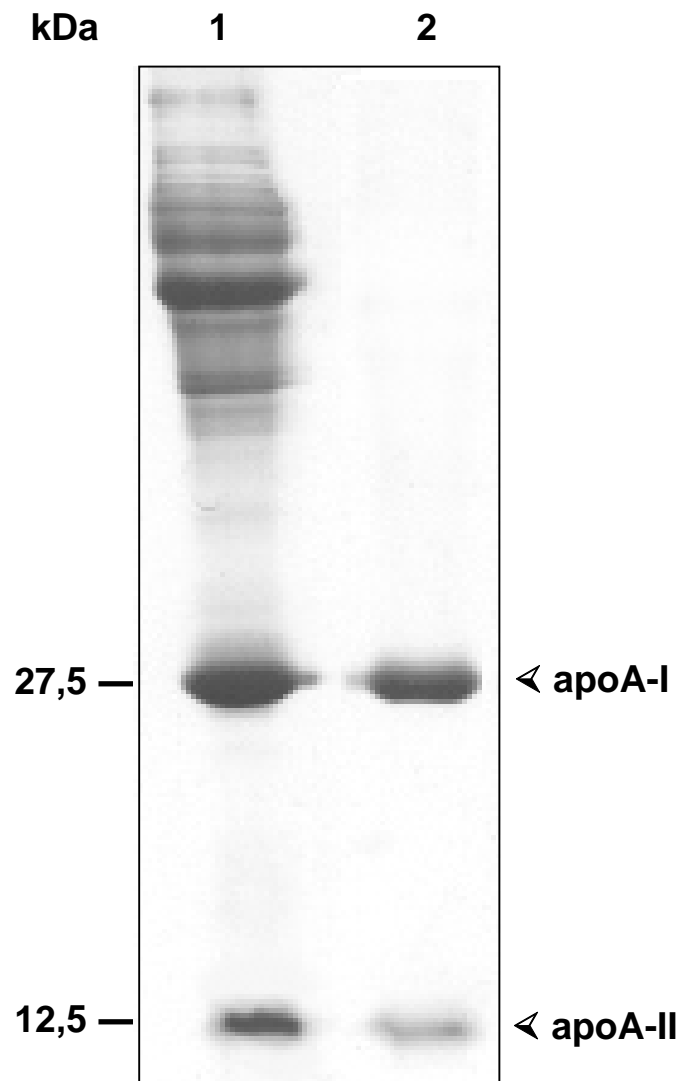


Figura 1: Análisis electroforético de HDL purificada desde plasma de carpa.

HDL se purificó a partir de plasma de carpa mediante cromatografía de afinidad en Affi-Gel[®] Blue-Gel, como se describió en Materiales y Métodos. Las proteínas fueron separadas por PAGE-SDS al 12,5% y teñidas con azul de Coomassie. **Carril 1**, perfil de separación de las proteínas del plasma de carpa (10 µg); **carril 2**, HDL purificada (2 µg).

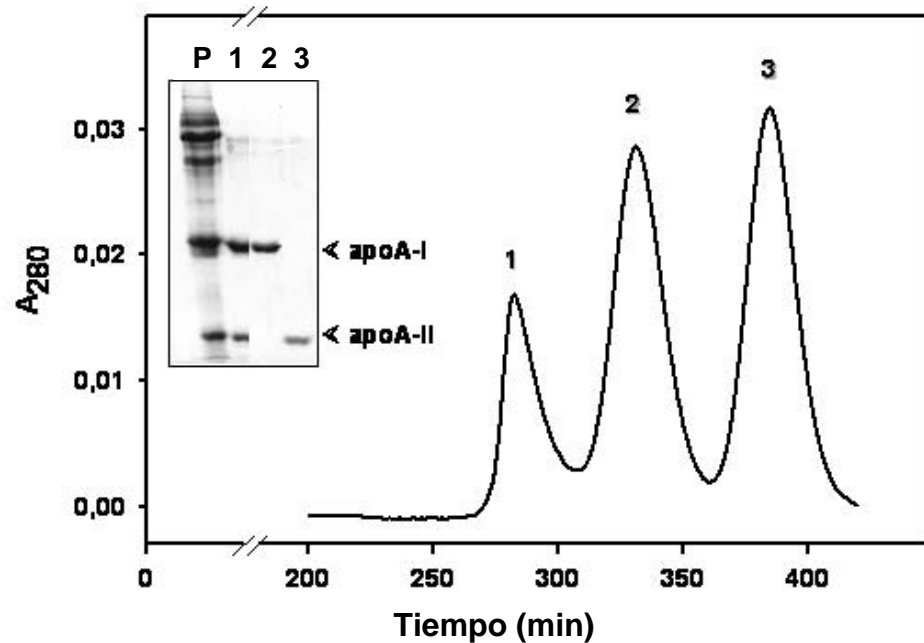


Figura 2: Purificación de las apolipoproteínas de HDL de carpa. Se purificaron apoA-I y A-II de carpa a partir de HDL deslipidada, para ello se utilizó filtración en gel en condiciones desnaturalantes en una columna de Sephacryl S-200 (Volumen columna = 169,6 ml) y se eluyó como se describe en Materiales y Métodos. **Inserto**, electroforesis en PAGE–SDS al 12,5% de las apolipoproteínas purificadas. **Carril P**, plasma de carpa (10 μ g de proteínas); **carril 1**, HDL cargada a la columna (2 μ g); **carriles 2 y 3**, corresponden a 5 μ g de proteínas de los picos 2 y 3 del perfil de elución (apoA-I y A-II), respectivamente.

4.2 Evaluación de la susceptibilidad y estabilidad de la HDL plasmática de carpa frente a condiciones específicas.

En distintas preparaciones de HDL purificadas a partir de plasmas sin previo tratamiento con inhibidores de proteasas, se pudo observar que algunas de las apoA-I presentaban algún grado de proteólisis limitada generando un fragmento truncado más abundante y una serie de péptidos minoritarios (Figura 3). Inicialmente, para determinar si la HDL deslipidada era más susceptible a la degradación que la no deslipidada, se tomaron alícuotas de distintas muestras de HDL sometidas a una sola deslipidación con solventes orgánicos (ver sección 3.2.2.3 de Materiales y Métodos), y junto con muestras de HDL sin deslipidar, se incubaron a 37°C durante 14 y 24 h. La Figura 4 muestra el análisis electroforético en PAGE-SDS 12,5 % de estos tratamientos, donde es evidente el grado de degradación que muestra la apoA-I de la HDL deslipidada (carriles 5 y 6) en comparación con aquella asociada a la HDL sin deslipidar, la cual se mantuvo estable durante al menos las 14 y 24 h que duró la incubación a 37°C (carriles 2 y 3). Por otra parte, como se aprecia en el carril 4, la HDL no se degradó durante el proceso de deslipidación sino que durante la incubación.

Una vez establecida la estabilidad de la HDL sin deslipidar se procedió a analizar la susceptibilidad de la apoA-I asociada a la partícula frente a otros factores que pudiesen afectar su integridad. Así para determinar si ocurre proteólisis de apoA-I por acción de alguna proteasa bacteriana durante el ensayo de actividad antimicrobiana, se realizó una cinética de incubación de HDL purificada con bacterias *E. coli* DH5 α . Las distintas muestras fueron analizadas por PAGE-SDS y el resultado se muestra en la Figura 5. Luego de 28 h de incubación no se detectó la generación de algún péptido producido por la exposición a esta cepa bacteriana.

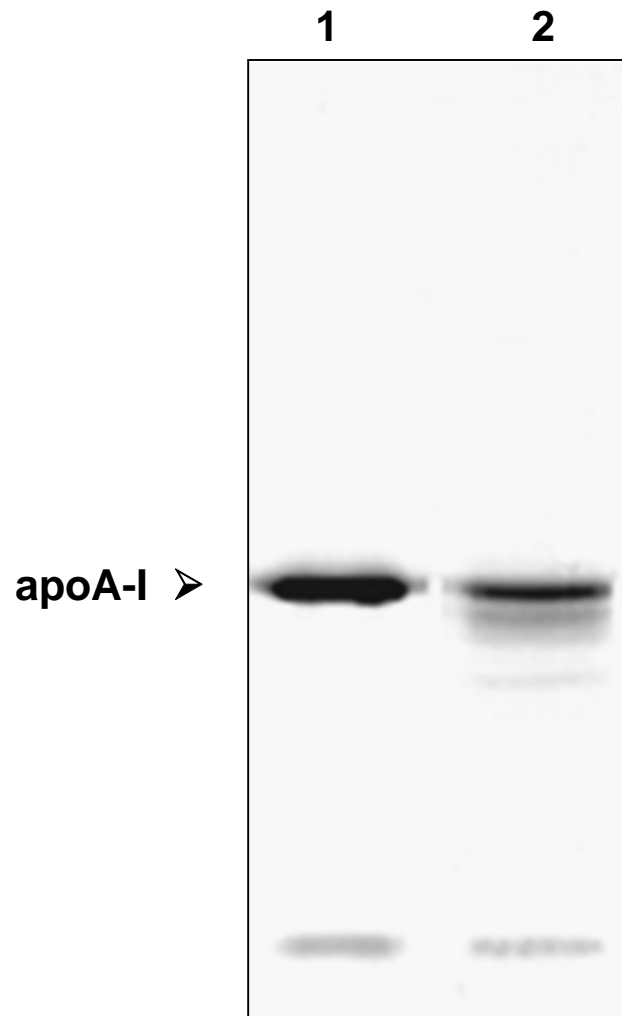


Figura 3: Degradación de apoA-I plasmática de carpa. Muestras de HDL purificadas a través de cromatografía de afinidad en Cibacron blue-agarosa, se sometieron a análisis electroforético en PAGE-SDS 12,5%. **Carril 1: HDL condición A**, apoA-I sin degradación evidente (control). **Carril 2: HDL condición B**, apoA-I presenta proteólisis limitada, generándose una serie de productos de menor tamaño en tanto que apoA-II, aparentemente, no presenta signos de degradación

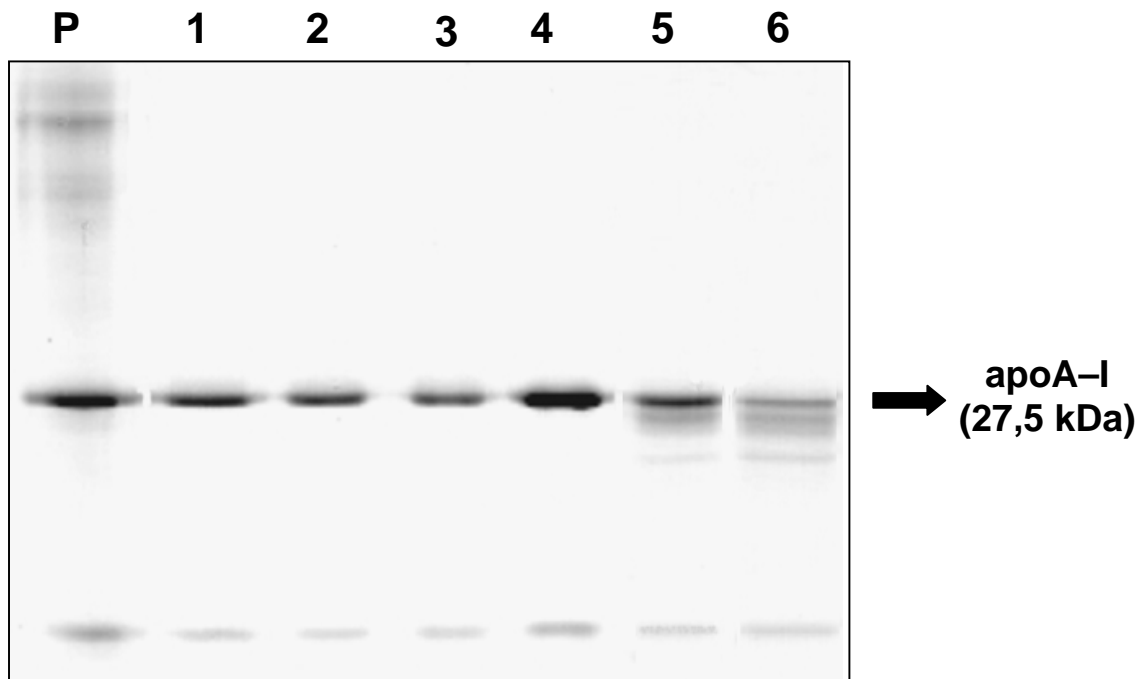


Figura 4: Estabilidad de HDL deslipidada y no deslipidada. Muestras de HDL purificadas desde el plasma de carpa, sin inhibidores de proteasas, fueron sometidas a un proceso de deslipidación como se describe en Materiales y Métodos. Alícuotas de HDL deslipidadas y sin deslipidar se incubaron 14 y 24 h a 37°C y posteriormente se analizaron a través de electroforesis en PAGE-SDS al 12,5%. **Carril P**, corresponde a plasma de carpa; **carril 1**, HDL sin deslipidar, control; **carriles 2 y 3**, corresponden a 2 μg de HDL sin deslipidar incubada por 14 y 24 h, respectivamente; **carril 4**, HDL deslipidada sin incubar; **carriles 5 y 6**, 2 μg de HDL deslipidada incubada a 37°C por 14 y 24 h, respectivamente.

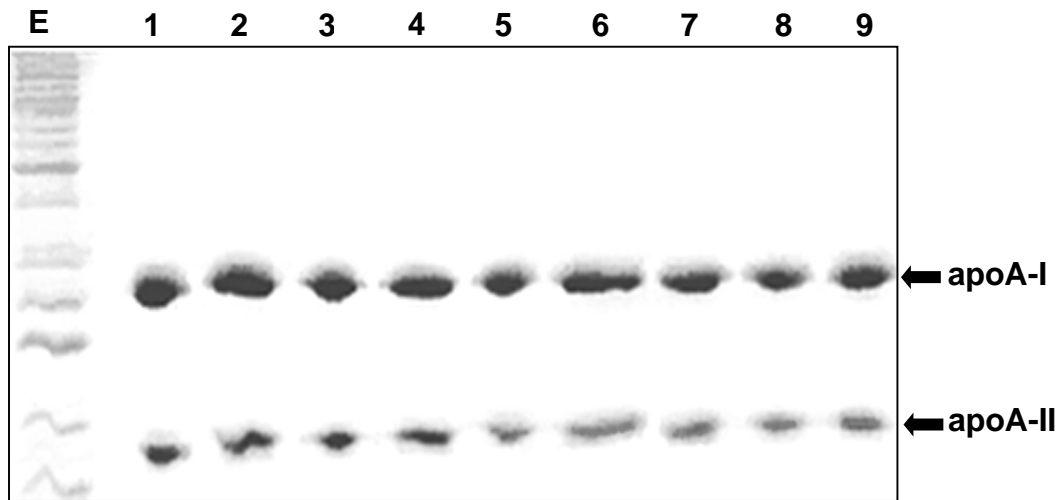


Figura 5: Evaluación de la estabilidad de HDL de carpa sin deslipidar durante incubación con *E. coli*. HDL sin deslipidar fue incubada con bacterias *E. coli* en una proporción (v/v) de HDL/bacterias de 10:1 y 1:1. Las muestras se analizaron en PAGE-SDS al 12,5 %. **Carril E**, estándar de peso molecular *Benchmark protein ladder*. **Carril 1**, HDL sin incubar; **carriles 2 y 3**, HDL incubada sola a 37°C por 6 y 28 h, respectivamente. **Carriles 4 y 5**, HDL/bacterias en una proporción 10:1, incubadas por 6 y 28 h a 37°C, respectivamente; **carril 6**, tiempo cero de la incubación HDL/bacterias 1:1; **carriles 7, 8 y 9**, HDL/bacterias en proporción 1:1 luego de 3, 6 y 28 h a 37°C, respectivamente.

Con el fin de confirmar la ausencia de productos de proteólisis se realizó un análisis por *Western blot* utilizando un anticuerpo específico para apoA-I de carpa y como se puede observar en la Figura 6, la apo A-I no presentó productos proteolíticos evidentes en ninguno de los tiempos de incubación analizados. Igualmente se evaluó si posibles cambios en el pH del medio o en la temperatura podrían influir en la generación de péptidos a partir de apo A-I. No obstante, el resultado obtenido fue el mismo que el observado frente a las bacterias, es decir, no se observaron bandas que pudiesen corresponder a apoA-I truncada por la acción de alguna proteasa plasmática contaminante bajo esas condiciones (datos no mostrados).

4.3 Análisis estructural de un péptido sintético análogo al carboxilo terminal de apoA-I.

Se ha descrito que ciertas proteasas, como quimasa (Lee y col, 2000) y algunas metaloproteasas de matriz (Lindstedt y col, 1999), son capaces de truncar *in vitro* el extremo carboxilo terminal de la apoA-I asociada a HDL. En base a estos datos y a observaciones de que la apoA-I aislada del plasma de carpa también sufre proteólisis parcial (Figura 3), se analizó la secuencia aminoacídica de apoA-I de carpa y se sintetizó un péptido análogo a la región carboxilo terminal de la apolipoproteína. Utilizando un paquete de programas bioinformáticos ANTHEPROT V.5. (www.antheprot-pbil.ibcp.fr) se realizó una predicción de la posible estructura secundaria que adoptaría dicho péptido sintético AQEFRQSVKSGELRKKMNELGRRR. En la Figura 7 es posible observar el resultado de la predicción realizada: el péptido adoptaría una estructura α -helicoidal con una carga neta de +5. Estas características estructurales coinciden con las de

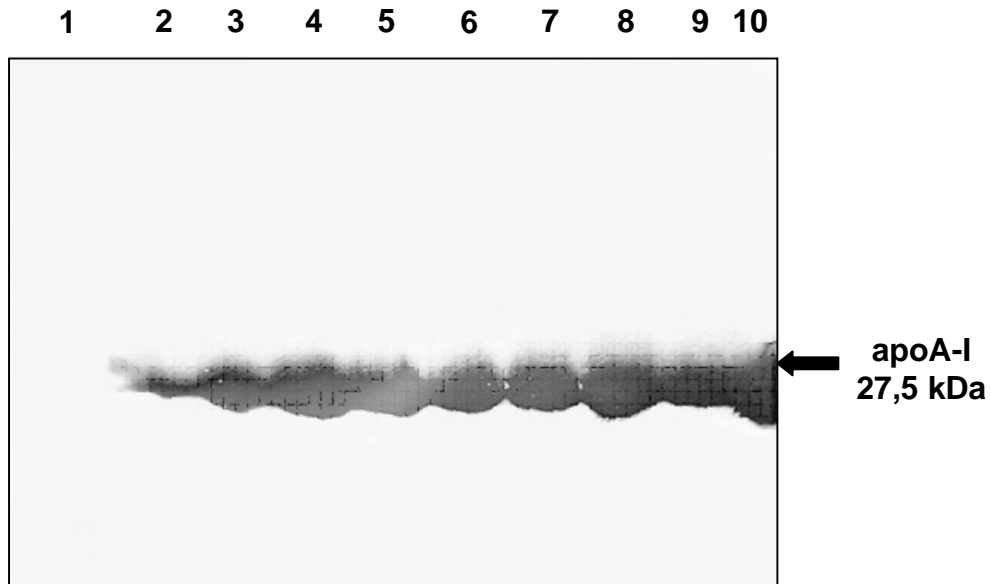


Figura 6: Análisis de Western blot de la incubación de HDL con bacterias Gram negativas. HDL incubada con bacterias *E. coli* (cepa DH5 α) a 37°C se sometió a PAGE-SDS 12,5% y posteriormente se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa. **Carril 1**, estándar de peso molecular *Benchmark protein ladder*, **carril 2**, tiempo cero de HDL sin bacterias; **carriles 3 y 4**, incubación de HDL sin bacterias por 6 y 28 h, respectivamente; **carriles 5 y 6**, incubación de HDL/bacterias en una proporción 10:1 por 6 y 28h, respectivamente; **carriles 7, 8, 9 y 10**, incubación HDL/bacterias 1:1 durante 0, 3, 6 y 28, respectivamente.

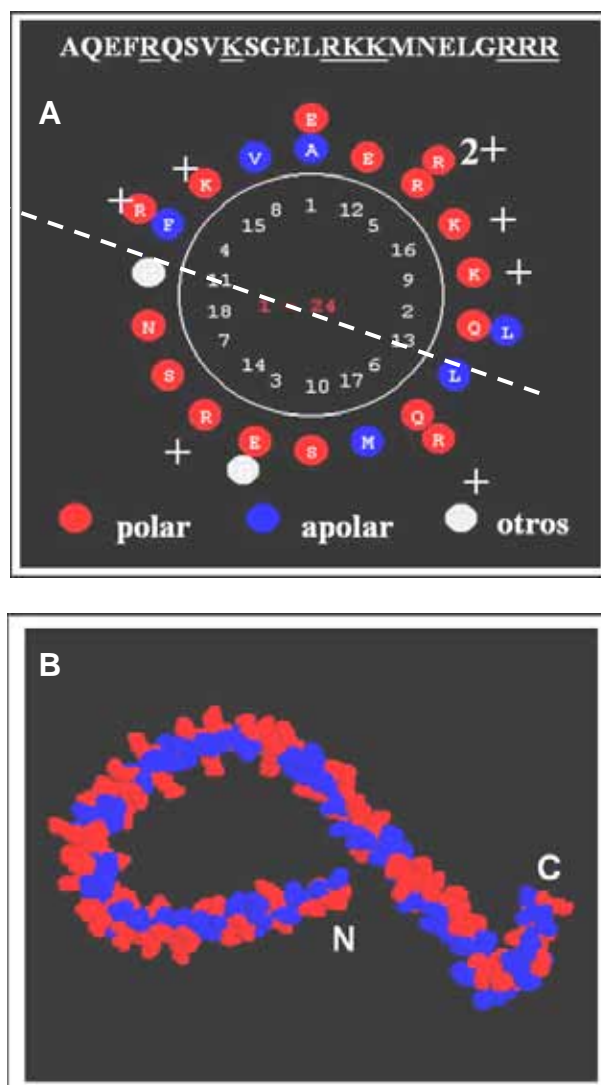


Figura 7: Predicción de α -helicidad del péptido C-terminal de apoA-I y modelo tridimensional de apoA-I de carpa. (A) Proyección en “helical wheel” del péptido sintético realizada con el programa ANTHEPROT V.5. La línea discontinua separa las dos caras de la hélice destacando la localización preferencial de residuos básicos en la cara superior. En el margen superior se indica la secuencia aminoacídica del péptido en código de una letra. Los residuos básicos aparecen subrayados. **(B)** Modelo tridimensional de la secuencia parcial de apoA-I de carpa generado mediante SWISS-MODEL. (N) residuo N-terminal de secuencia parcial apoA-I de carpa (N° acceso GenBank AJ308993) y (C), residuo C-terminal.

un importante grupo de péptidos antimicrobianos, los cuales también presentan estructura α -helicoidal anfipática y carácter catiónico.

4.4 Preparación de antisuero anti-péptido carboxilo terminal de apoA-I de carpa.

Con el objetivo de obtener un anticuerpo específico para el péptido sintético (AQEFRQSVKSGELRKKMNELGRRR), el cual sería análogo a un péptido de la región carboxilo terminal de la apoA-I de carpa, se realizó la conjugación del péptido con la proteína carrier KLH como se describe en Materiales y métodos y se siguió el protocolo de inmunizaciones descrito por Amthauer (1990).

En primera instancia se evaluó la especificidad del antisuero a través de su capacidad para reconocer específicamente la apoA-I de carpa mediante *Western blot*. En la Figura 8 se puede observar la presencia de una intensa banda inmunoreactiva de aproximadamente 27,5 kDa correspondiente a apoA-I, con una dilución del anti-suero de 1/500; además se muestra que el suero pre-inmune no presentaba bandas inmunoreactivas que posteriormente pudiesen haber generado interferencias.

La Figura 9 muestra la evaluación del título del antisuero producido mediante *dot Blot* y como se aprecia, hay una señal inmunorreactiva detectable contra el péptido hasta una dilución de 1/1000.

4.5 Evaluación de la proteólisis limitada de apoA-I asociada a HDL con quimotripsina.

Con el fin de analizar la posibilidad de que uno o más péptidos pudieran ser liberados desde la apoA-I de carpa *in vitro*, se sometió a la apolipoproteína asociada

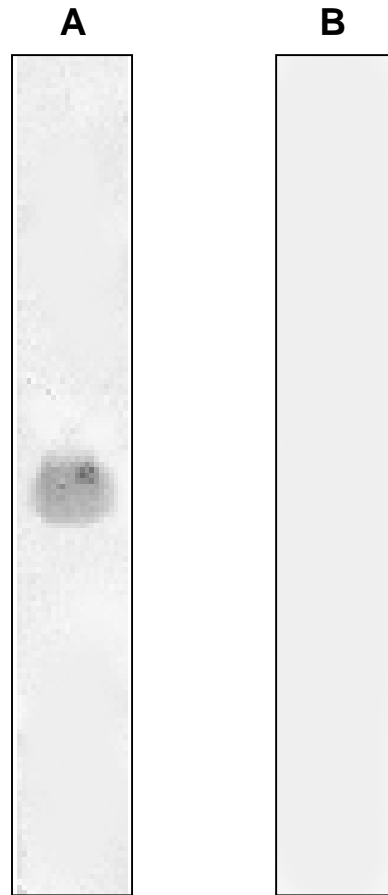


Figura 8: Especificidad del suero anti-péptido C-terminal con respecto a apoA-I asociada a HDL. HDL fue sometida a PAGE-SDS 12,5% y posteriormente se transfirió a membrana de nitrocelulosa, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. **A)** banda inmunoreactiva de apoA-I, utilizando una dilución del suero anti-péptido 1/500. **B)** corresponde a inmunodetección control de apo A-I con suero pre-inmune diluido 1/500.

DOT-BLOT

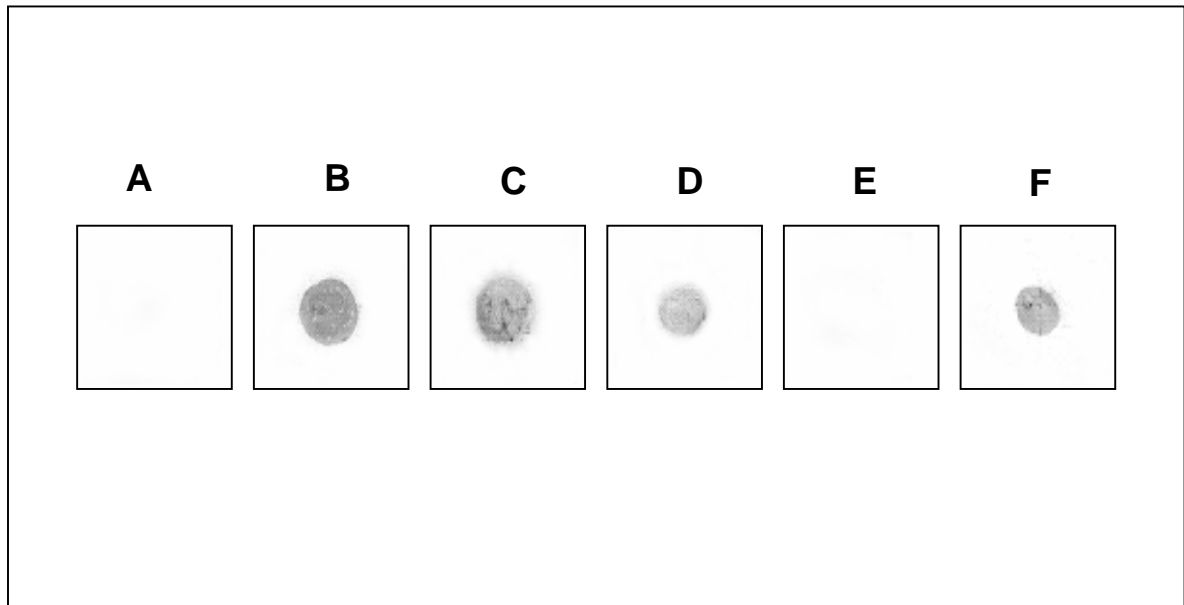


Figura 9: Título del suero anti-péptido C-terminal de apoA-I de carpa. Se analizó el título del anticuerpo anti-péptido C-terminal de apoA-I por *dot blot*, como se describió en Materiales y Métodos. Aproximadamente 5 μ g del péptido fueron inmovilizados en las membranas de nitrocelulosa. **A**, control negativo utilizando suero pre-inmune diluido 1/500. **B, C, D y E**, inmunodetección del péptido con suero anti-péptido C-terminal de apoA-I diluido 1/500, 1/750, 1/1.000 y 1/2.500, respectivamente. **F**, corresponde a inmunodetección de apo A-I asociada a HDL (1,5 μ g) utilizando el anticuerpo anti-péptido diluido 1/500 (control positivo).

a HDL a proteólisis limitada con quimotripsina y los productos de digestión obtenidos se analizaron a través de PAGE Tris-tricina y posteriormente fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa como se especifica en Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la Figura 10A, a tiempos tempranos de incubación se producen 2 productos mayoritarios de proteólisis: un producto intermedio (banda b) que va desapareciendo a medida que transcurre la incubación, y un segundo producto mayoritario que se mantiene estable en el tiempo (banda c), además de la banda (a) correspondiente a apoA-I intacta. Esto indicaría que existe una fracción de apoA-I asociada a HDL que sería bastante resistente a proteólisis en tanto que otra fracción sería más susceptible pero sólo algún(os) dominio(s) de la proteína. Esto queda claro puesto que la reducción más importante de la banda (a) detectada tanto por tinción con azul de Coomassie como por inmunodetección, ocurrió durante los 30 min de incubación, manteniéndose sin mayor modificación hasta al menos 210 min. El posterior análisis por *Western blot*, utilizando el anticuerpo específico para apoA-I intacta (Figura 10B) detectó claramente las 3 bandas. Sin embargo, la inmunodetección con el antisuero específico antipeptido reveló que la apoA-I truncada más estable (banda c) no fue detectada, por lo tanto ya no contendría el epitope reconocido por el antisuero antipeptido C-terminal o dicho de otra manera correspondería a apoA-I truncada en el carboxilo terminal (Figura 10C). Además se analizó durante esta cinética de digestión el comportamiento de apoA-II como segundo componente proteico mayoritario de HDL. Como se apreciar en la Figura 10, paneles D y E, la integridad de apoA-II no se vio

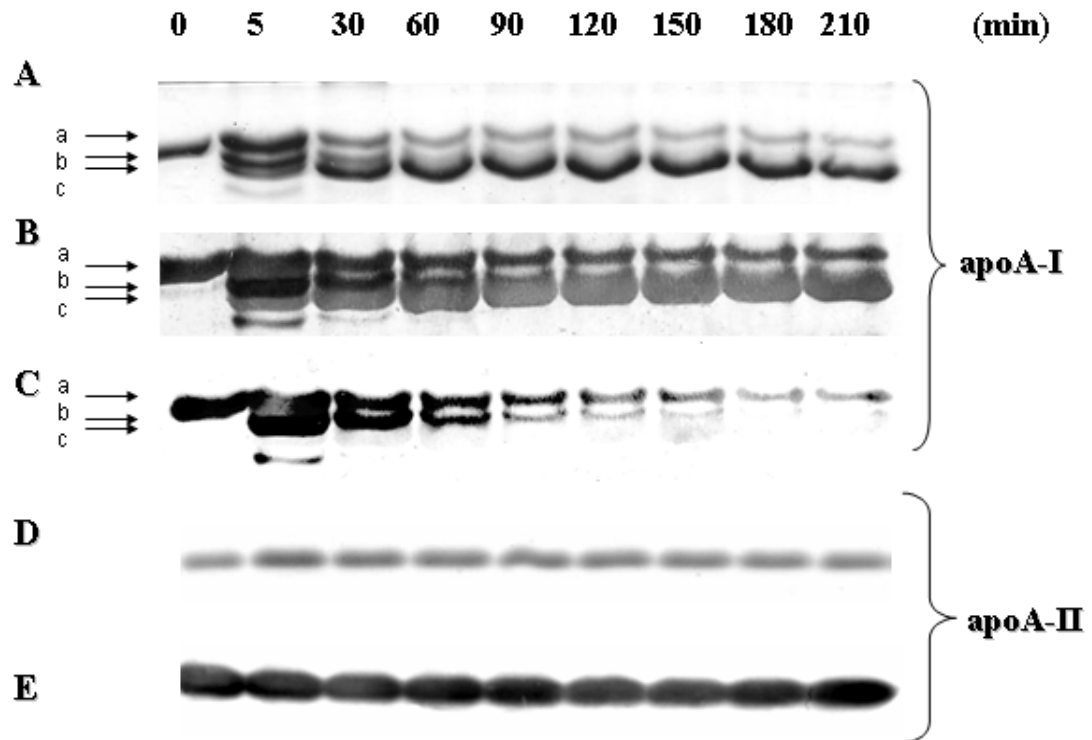


Figura 10: Cinética de proteólisis limitada de apoA-I asociada a HDL. La proteólisis limitada se realizó incubando HDL con quimotripsina durante 210 min, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. **(A)** productos de digestión separados por PAGE Tris-Tricina visualizados por tinción con azul de Coomassie. **(B)** y **(C)** Western blot correspondiente a gel en A, inmunodetectado con antisuero anti apoA-I y anti-péptido, respectivamente. Las flechas indican las diferentes bandas de apoA-I (a) intacta; (b) fragmento intermedio y (c) apoA-I truncada estable. El tiempo de incubación se indica en la parte superior. **(D)** PAGE SDS-Tricina y tinción con azul de Coomassie de apoA-II asociada a HDL incubada en las mismas condiciones que en A. **(E)** Análisis de Western blot del gel en D utilizando un antisuero específico para apoA-II de carpa.

afectada durante todo el período de incubación, indicando que probablemente ésta se encuentra menos accesible que la apoA-I en la partícula de HDL.

4.6 Análisis de la actividad bacteriostática del péptido sintético y las apolipoproteínas A-I y A-II de la HDL.

Puesto que nuestro grupo había demostrado recientemente que HDL posee no solo actividad bacteriostática sino que además bactericida contra una cepa de *E. coli* (Concha y col., 2003), la evaluación de la participación de las apolipoproteínas mayoritarias de HDL y del análogo sintético de un posible péptido antimicrobiano liberado desde el C-terminal de apoA-I en esta actividad antimicrobiana, se constituyó en uno de los objetivos centrales de esta tesis. Para este propósito se escogió el ensayo de dilución en microplaca y el ensayo de difusión radial utilizando como bacteria susceptible una bacteria Gram positiva (*Planococcus citreus*).

El EC_{50} , que corresponde a la concentración efectiva requerida para alcanzar un 50 % de inhibición en el crecimiento bacteriano, fue calculado para cada una de las proteínas y péptido evaluados, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 1 y Figura 11. Se observó que tanto la HDL como sus apolipoproteínas ejercen una actividad bacteriostática sobre *P. citreus* a concentraciones micromolares. En la Figura 11, se puede apreciar que ciertamente ambas apolipoproteínas muestran un claro efecto inhibitor del crecimiento bacteriano, siendo más evidente la acción producida por la apo A-I (triángulos llenos). Adicionalmente se evaluó el efecto antimicrobiano de apoA-I y apoA-II de carpa sobre algunos patógenos de peces tales como *Yersinia ruckeri* y *Pseudomonas sp.* En todos los casos se encontró un valor de EC_{50} en el rango micromolar, siendo como era esperable *P. citreus* la bacteria más susceptible (Tabla 1). De estos resultados se puede deducir que las

Bacteria	tinción Gram	ApoA-I		ApoA-II
		EC ₅₀ (μ M)	CMB (μ M)	EC ₅₀ (μ M)
<i>Planococcus citreus</i>	+	0,3 \pm 0,06	0,4 \pm 0,2	1,8 \pm < 0,001
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	2,6 \pm 0,01	n.d.	3,5 \pm 0,04
<i>Yersinia ruckeri</i>	-	2,6 \pm < 0,001	4,0 \pm 0,5	3,7 \pm 0,15
<i>Escherichia coli</i>	-	5,2 \pm 0,85	8,5 \pm 0,5	7,1 \pm < 0,001

n.d. = no determinada

CMB = concentración mínima bactericida

Tabla 1: Actividades bacteriostática y bactericida de apoA-I y apoA-II de carpa.

Cada valor de la tabla representa el promedio \pm EE (error estándar) de experimentos realizados en triplicado. Resultados similares se obtuvieron con diferentes preparaciones de apolipoproteínas.

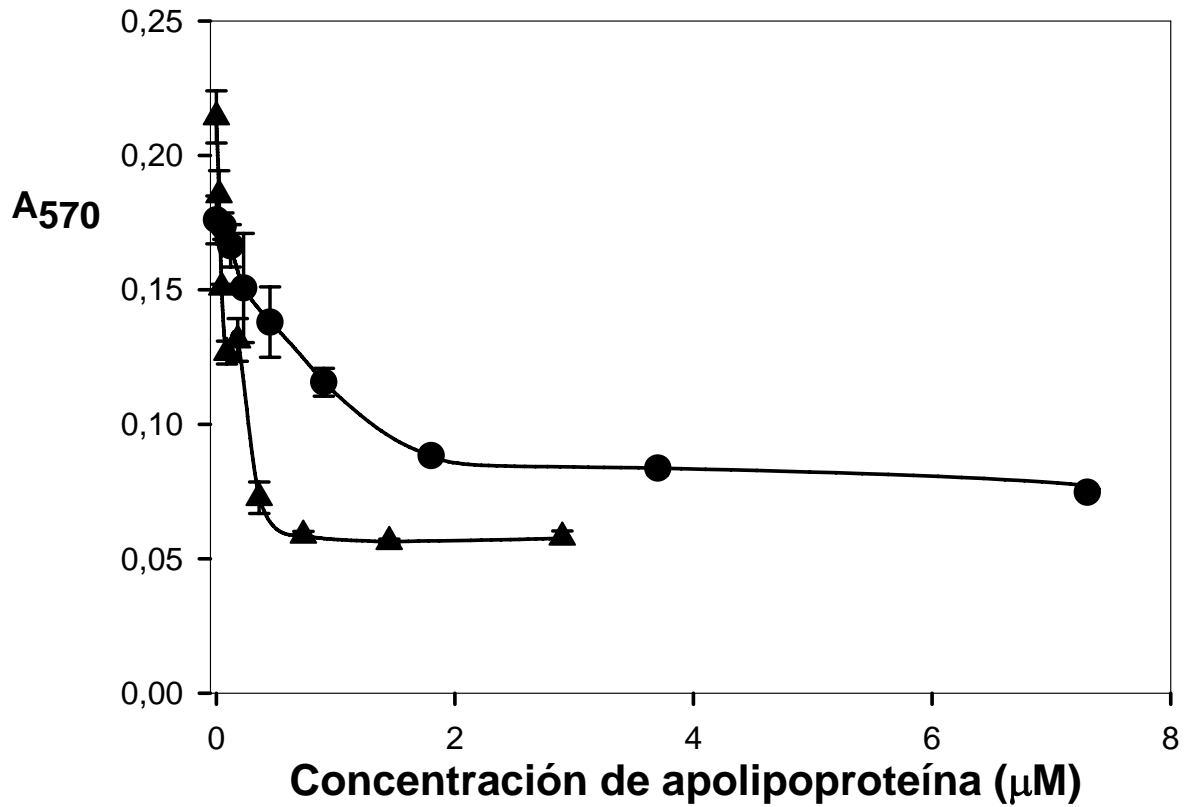


Figura 11: Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de las apolipoproteínas A-I y A-II. El ensayo de dilución en microplaca, utilizando como bacteria susceptible *P. citreus* (Gram+), se realizó siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. La incubación de la microplaca se realizó durante aproximadamente 20 h, hasta que la atenuancia a 570 nm del control positivo alcanzó 0,2. (▲-▲) = apoA-I, (●-●) = apoA-II. Los valores graficados representan el promedio \pm error estándar de tres determinaciones.

apolipoproteínas serían importantes contribuyentes de la actividad antimicrobiana demostrada para la HDL en el plasma de la carpa.

Habiendo confirmado que al menos *in vitro* se libera un péptido de la región C-terminal desde la apoA-I asociada a HDL que sería análogo al péptido sintético utilizado y con características estructurales comunes a un importante grupo de péptidos antimicrobianos, se procedió a analizar su potencial actividad bacteriostática. Ciertamente, el péptido sintético también demostró un efecto inhibidor del crecimiento sobre *P. citreus* lo que se refleja claramente en su EC₅₀, de aproximadamente 6 µM, lo que corresponde al mismo orden de magnitud del EC₅₀ determinado para apo A-I y apoA-II intactas.

4.7 Análisis de la actividad bactericida de la HDL y la apolipoproteína A-I.

Si bien se demostró que tanto la HDL como las apoA-I y apoA-II ejercen un efecto bacteriostático sobre bacterias Gram positivas y negativas, era importante determinar si también producían efecto bactericida sobre bacterias Gram negativas, ya que en el medio acuático predominan las infecciones producidas por este tipo de bacterias. Utilizando como bacterias a ensayar una cepa de *E. coli* no patógena (DH-5α) y un patógeno de peces, *Yersinia ruckeri*, se analizó la actividad bactericida a través de una modificación del método de inhibición del crecimiento bacteriano en microplaca aplicando diluciones seriadas de la proteína seguido por recuento de colonias viables en placa, descrito en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos para HDL se representan en el gráfico de la Figura 12, la concentración mínima bactericida (MBC) de HDL frente a *E. coli* varió en un rango de 0,3 a 0,4 mg/ml dependiendo de la muestra utilizada. Dicha actividad podría, al igual que la bacteriostática, ser dada por la acción combinada de sus

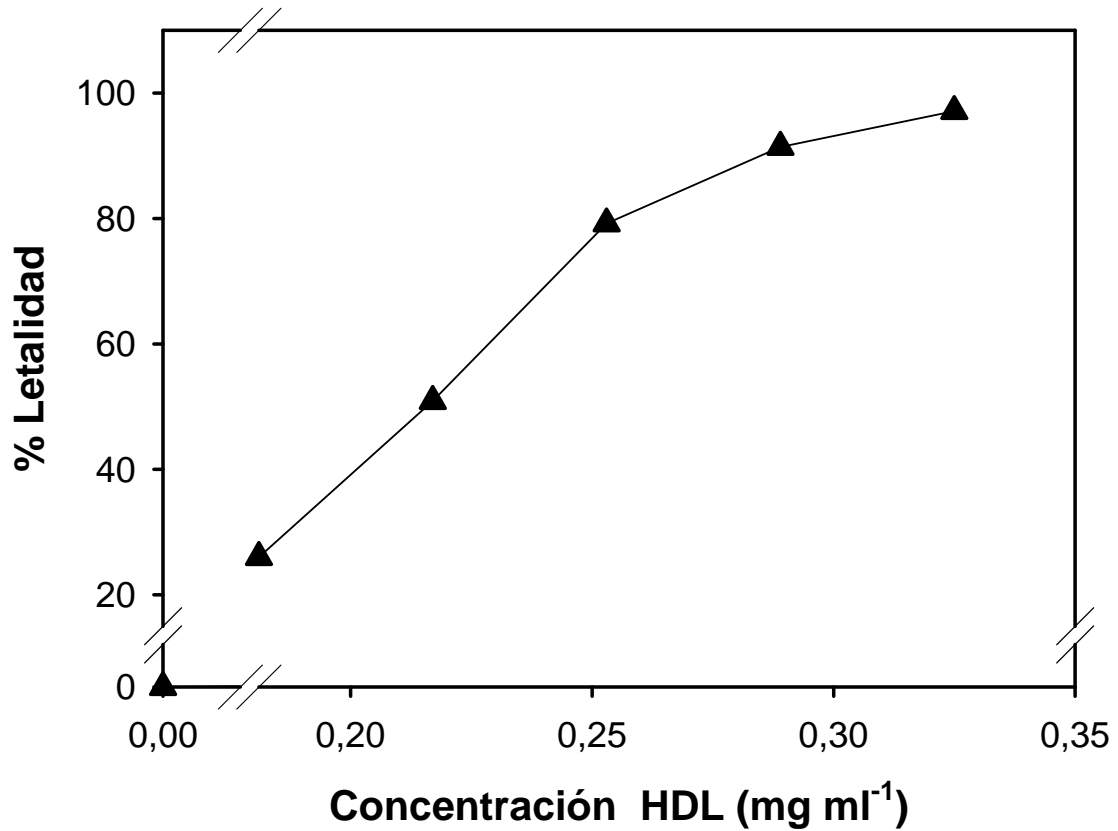


Figura 12: Actividad bactericida de HDL plasmática de carpa. Distintas diluciones de HDL plasmática se incubaron por 6 h con un cultivo exponencial de *E. coli* diluido 1/500. Posteriormente, alícuotas de cada una de las diluciones se sembraron en placas de LBA y se incubaron a 37°C por 18 h, como se describe en Materiales y Métodos. El 0% de letalidad corresponde al crecimiento bacteriano en ausencia de HDL (≥ 500 ufc), mientras que el 100% de letalidad corresponde a la MBC, ya que a esa concentración de proteína no se observa crecimiento bacteriano.

apolipoproteínas, o bien, también podrían contribuir uno o más péptidos liberados desde una de ellas.

Con el propósito de evaluar si la apoA-I posee efecto bactericida por si misma, se la purificó desde el plasma de carpa y posteriormente se la sometió al ensayo de actividad bactericida utilizando *E. coli* y *Y. ruckeri*, los resultados se muestran en la Figura 13 y Tabla 1. La curva de letalidad obtenida nos permite apreciar que la apolipoproteína produce un 100 % de letalidad en *E. coli* a una concentración aproximada de 0,24 mg/ml (8,5 μ M), lo que sugiere que efectivamente esta apolipoproteína podría ser uno de los componentes importantes que contribuyen al efecto antimicrobiano observado para HDL plasmática de carpa. Adicionalmente, se encontró que un patógeno Gram negativo como *Y. ruckeri* es más susceptible a apoA-I (CMB = 4 μ M) que *E.coli* no patogénico y que la cepa Gram positiva es la más susceptible de todas (CMB= 0,4 μ M)

4.8 Evaluación del sinergismo entre el péptido sintético de apoA-I y la proteína antimicrobiana lisozima.

Tanto en el mucus como en la sangre de los peces teleósteos se ha descrito la presencia de una importante batería de proteínas con función defensiva. Dentro de este grupo una de las proteínas antimicrobianas más abundantes es la lisozima y se ha descrito que algunas proteínas y péptidos catiónicos antimicrobianos logran potenciar la actividad de ésta proteína (Patrzykat y col. 2001).

Con el fin de analizar si el péptido sintético de apoA-I es capaz de potenciar la actividad de la lisozima se realizaron ensayos de sinergismo. Alícuotas de diferentes combinaciones de concentraciones sub-inhedorias de péptido y lisozima fueron probadas en ensayo de difusión radial utilizando *P. citreus* como bacteria

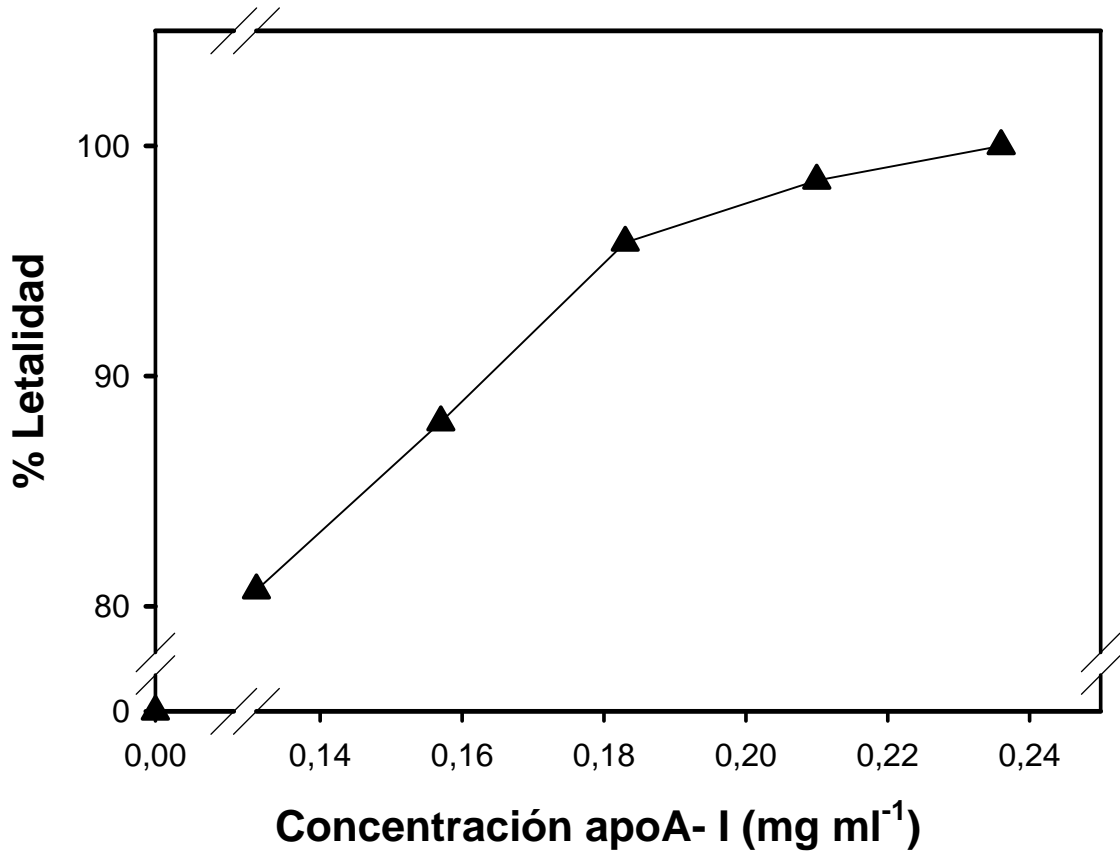


Figura 13: Actividad bactericida de apoA-I plasmática de carpa. Distintas diluciones de apoA-I purificada desde HDL plasmática se incubaron por 6 h con un cultivo exponencial de *E. coli* diluido 1/500. Posteriormente, alícuotas de cada una de las diluciones se sembraron en placas de LBA y se incubaron a 37°C por 18 h, como se describe en Materiales y Métodos. El 0% de letalidad corresponde al crecimiento bacteriano en ausencia de HDL (≥ 500 ufc), mientras que el 100% de letalidad corresponde a la MBC, ya que a esa concentración de proteína no se observa crecimiento bacteriano.

susceptible, tal como describe en Materiales y Métodos. Luego de 20-24 h de incubación a 20°C se midió el diámetro del halo de inhibición producido, se calculó el área del halo de inhibición y los resultados obtenidos se muestran en el gráfico de la Figura 14A. Se observó que el péptido sintético potenció la actividad de la lisozima a concentraciones en las que ninguno de los dos por sí solos tuvo un efecto antimicrobiano evidente. El máximo de efecto inhibitorio observado se obtuvo con la combinación de 0,6 µg/ml de lisozima y 0,8 mM de péptido. En la Figura 14B se aprecia el incremento significativo del halo de inhibición obtenido al incrementar la concentración del péptido desde 0 a 0,8 mM a una concentración fija de lisozima. Cabe destacar que el péptido a una concentración de 1 mM no produce halo de inhibición.

4.9 Evaluación del efecto hemolítico del péptido sintético de apoA-I

Una característica importante que debe poseer un compuesto antimicrobiano con posible uso terapéutico es la de no producir cito-toxicidad a células del hospedero, como eritrocitos. Con el objetivo de analizar el efecto hemolítico *in vitro* del péptido sintético de apoA-I, eritrocitos humanos fueron expuestos a diluciones seriadas, con factor de 2, del péptido sintético, Tritón X-100 y melitina, este último corresponde a un conocido péptido antimicrobiano con características estructurales similares al péptido sintético. Como se puede observar en la Figura 15, el péptido sintético no causó hemólisis a concentraciones tan altas como 1mM, mientras que la melitina sí tuvo un claro efecto hemolítico, incluso a una concentración tan baja como 3 µM.

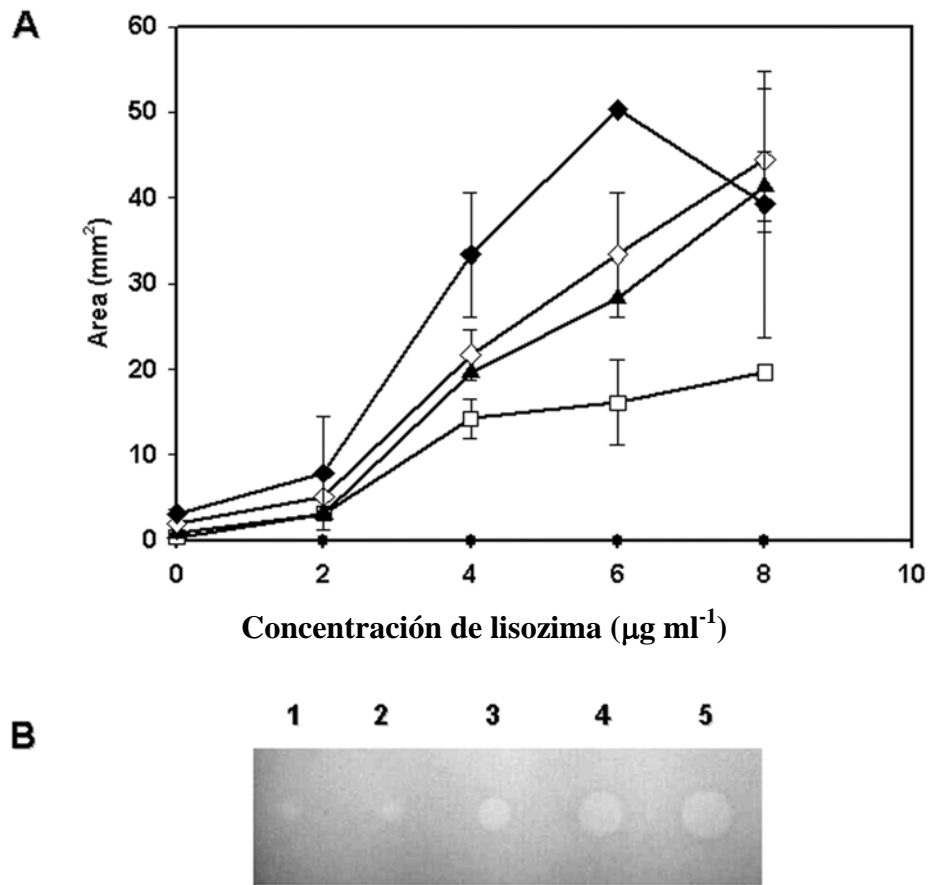


Figura 14. Sinergismo del péptido de apoA-I con lisozima. (A) El crecimiento bacteriano (*P. citreus*) en presencia de diferentes combinaciones de péptido y lisozima, cada una de ellas a concentraciones sub-inhedoras, se analizó mediante el ensayo de difusión radial. Concentraciones variables de lisozima sin péptido (●); con 0,2 mM (□); 0,4 mM (▲); 0,6 mM (◇) o 0,8 mM (◆) del péptido sintético. Los experimentos se realizaron en triplicado y se representan los promedios \pm el error estándar. **(B)** Se muestra el incremento en el halo inhibitorio del crecimiento observado al utilizar concentraciones crecientes del péptido en combinación con lisozima 6 $\mu\text{g/ml}$. Los pocillos 1-5 corresponden al rango entre 0 - 0,8 mM del péptido, respectivamente.

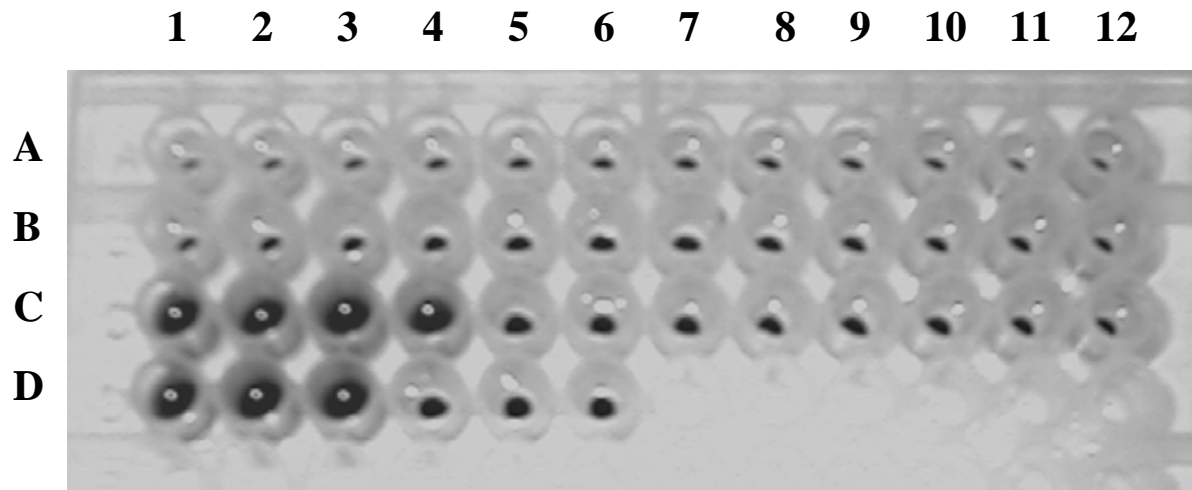


Figura 15: Efecto hemolítico del péptido sintético de apoA-I. Una suspensión al 2% de eritrocitos humanos fue incubada con diluciones en factor de 2 del péptido sintético de apoA-I entre el rango 1mM – 4,9 μ M (**A1-A12**), respectivamente; PBS (**B1-B12**); péptido antimicrobiano melitina en el rango 23 - 0,01 μ M (**C1-C12**), respectivamente; Triton X-100 0,2 %, 0,1 y 0,05% (**D1-D3**), respectivamente; agua destilada (**D4-D6**).

5. DISCUSIÓN

Al igual que en los vertebrados superiores, el sistema defensivo de los peces puede ser dividido en dos tipos: el sistema de defensa innato y el sistema inmune adquirido o específico. Sin embargo, estos organismos inferiores dependen principalmente del sistema inmune innato (Magor y Magor, 2001; Olabuenaga, 2000), ya que el sistema inmune adquirido no está bien desarrollado. Entre los efectores importantes del sistema inmune innato se han descrito diversas proteínas y péptidos antimicrobianos y el hecho de que se encuentran en la mayoría de los organismos, deja abierta la posibilidad de descubrir nuevos componentes contribuyentes a este sistema inmune (Silva, 2004; Vizioli y Salzet, 2002).

En este contexto, existen nuevos antecedentes que relacionan a la HDL y su componente principal, apoA-I, con funciones protectoras y por lo tanto sugieren una posible participación en inmunidad innata (Tada y col., 1993, Panzenböck y col., 2000; Mashima y col., 1998, Wu y col., 2004; Ma y col., 2004).

En lo que respecta a la expresión y secreción de la apolipoproteína A-I, en vertebrados inferiores, al contrario de lo que ocurre en mamíferos, no ha sido muy analizada (Tarugi y col., 1991). Sólo recientemente se ha abordado y demostrado la presencia del transcrito en un tejido periférico, como la piel de la carpa, en donde aparentemente asociada a partículas nacientes de HDL, sería mayoritariamente secretada hacia el mucus que recubre el epitelio y no hacia la sangre (Concha y col., 2003). Entonces, en base a esto, cabe preguntarse, ¿qué papel podría desempeñar HDL en tejidos periféricos como éste, el cual cumple un rol fundamental en la defensa innata del pez y en donde al parecer sería más relevante que la proteína participe en una función protectora más que en la movilización de lípidos? En este sentido, el estudio de Concha y col. (2003), abordando una posible función defensiva

de HDL, demostró que la lipoproteína purificada desde el plasma de carpa posee actividad bactericida frente a una cepa de *E. coli* no patogénica.

Los resultados obtenidos en esta tesis se suman a estos hallazgos, ya que se demostró que los principales componentes proteicos de HDL, apoA-I y apoA-II, contribuyen a la actividad antimicrobiana *in vitro* demostrada previamente para la HDL plasmática de carpa. Ambas apolipoproteínas exhibieron un claro efecto inhibitor del crecimiento a concentraciones micromolares (**Tabla 1**), tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, incluyendo *Yersinia ruckeri* que corresponde al agente causal de la yersiniosis o “enfermedad de la boca roja entérica” (Berc y col. 1999) y *Pseudomonas sp.*, patógeno oportunista que puede producir cuadros de septicemia (Nishimori y col., 2000; López-Romalde y col., 2003). Estos resultados reafirman la posibilidad de que efectivamente las apolipoproteínas formarían parte del sistema inmune innato del pez, actuando como efectores del mismo. Cabe destacar que en la carpa, la concentración plasmática de apolipoproteínas asociadas a HDL es de 10 mg/ml equivalente a 60 μ M (Krauskopf y col., 1988). Si bien la abundancia relativa de HDL plasmática varía entre diferentes peces teleósteos, es generalmente aceptado que esta lipoproteína es más abundante en plasma de peces que en vertebrados superiores (Babin y col., 1989). Ciertamente, esto nos permite especular que los valores de EC₅₀ y MBC obtenidos en el análisis de la actividad antimicrobiana *in vitro*, tanto para HDL como para sus principales apolipoproteínas, bien podrían ser relevantes fisiológicamente ya que niveles semejantes o mayores se encontrarían habitualmente en el plasma de carpa (Concha y col., 2003). Esto resulta aún más notable si se tiene en consideración que, sea cual sea la vía de ingreso de los patógenos, la diseminación ocurre principalmente a través de la circulación sanguínea de los peces infectados.

La actividad antimicrobiana de apoA-I y apoA-II podría ejercerse a través de las proteínas intactas o por un mecanismo que involucre la generación de péptidos antibacterianos. En este contexto, la generación de péptidos puede ser dependiente de la acción de proteasas bacterianas o proteasas liberadas en respuesta a inflamación, infección o situaciones de estrés (Aranishi, 1998; Cho y col., 2002). Este hecho no resultaría raro, ya que se ha descrito que diversas proteínas no inmunes actúan como precursores inactivos que, luego de sufrir proteólisis limitada, generan diferentes péptidos antimicrobianos, tal es el caso de la catelicidina humana hCAP-18, hemoglobina y lactoferrina bovina, péptidos antimicrobianos derivados de las histonas H1 y H2A, etc (Fogata y col., 1999; Pellegrini y col., 2001; Ulvatane y col., 2001; Sorensen y col., 2001; Park y col., 1998 (b); Park y col., 2000; Cho y col., 2002, Birkemo y col., 2003; Fernandes y col., 2003, 2004). Otro ejemplo importante lo constituye la proteína α -lactalbúmina que no posee actividad antibacteriana en si misma, sin embargo, luego de digestión con endopeptidasas libera tres polipéptidos con propiedades antimicrobianas (Pellegrini y col., 1999).

Ciertamente, en lo que respecta a la apoA-I, se sabe que en mamíferos ésta puede ser truncada *in vitro*, principalmente por su extremo carboxilo terminal, por algunas proteasas que podrían tener relevancia funcional *in vivo*. Uno de estos casos lo constituyen las metaloproteasas de matriz MMP-3, MMP-7 y MMP-12, que son capaces de cortar el extremo C-terminal de apoA-I (Lindstedt y col., 1999) y que además, pueden ser activadas por proteasas bacterianas (Okamoto y col. 1997). Nuestros estudios de proteólisis limitada se realizaron utilizando quimotripsina ya que posee la misma especificidad que quimasa, la cual corresponde a una proteasa neutra secretada por mastocitos y que ha demostrado ser capaz de generar apoA-I humana truncada en el extremo amino o carboxilo terminal (Lee y col., 2003). Los

resultados obtenidos indicarían que también quimotripsina genera un fragmento estable de apoA-I aparentemente truncado en los extremos carboxilo y/o amino terminal (**Figura 10**). El hecho de que no se haya logrado detectar el péptido liberado desde la región C-terminal de apoA-I a través del *Western blot*, utilizando el suero antipéptido, puede deberse a que bajo estas condiciones de digestión *in vitro*, el péptido sea muy lábil y por lo tanto resulte muy difícil su detección. Adicionalmente, se observó que la apoA-I asociada a la partícula de HDL y aislada del plasma sin previo tratamiento con inhibidores de proteasas, puede dar origen a productos de menor tamaño por proteólisis limitada (**Figura 3**). Cuando se analizó la posible generación de péptidos derivados de apoA-I luego de incubar HDL con bacterias susceptibles tales como una *E. coli* no patogénica, no se observó degradación visible de apoA-I, sugiriendo que en este ensayo la actividad antimicrobiana fue ejercida por la apolipoproteína intacta. Sin embargo, cabe la posibilidad que en las condiciones de cultivo utilizadas, esta bacteria u otras que si son patógenas, no expresen factores de virulencia que expresarían *in vivo*, ya que se ha descrito atenuación de la virulencia en patógenos que han sido cultivados en forma prolongada fuera del hospedero (Michel y García, 2003; Lemes-Marques y Yano, 2004).

Respecto de apoA-II, se ha descrito que regularía la estabilidad de la partícula de HDL (Boucher y col., 2004). Además, existen antecedentes de que apoA-II bovina y un péptido sintético derivado de ella, poseen actividad antimicrobiana (Motizuki y col., 1999). Los resultados presentados en esta tesis nos indican que apoA-II asociada a HDL sometida a tratamiento con quimotripsina no sufre proteólisis detectable. Esto coincide con lo descrito por Lee y col. (2003), donde la apoA-II humana también presentó resistencia a la digestión con quimasa. Además, cabe

destacar que el mismo resultado se observó en los ensayos donde fue evaluada la posible acción de proteasas bacterianas y la estabilidad de la partícula de HDL post deslipidación (**Figuras 4 y 5**, respectivamente). En conjunto, estos resultados sugieren que en las partículas de HDL de carpa, esta apolipoproteína estaría menos expuesta a un posible ataque por proteasas o mantendría una mayor estabilidad, siendo menos propensa a degradación. Ello permite especular que apoA-II es capaz de ejercer actividad antimicrobiana aún en su forma intacta. Sin embargo, no se puede descartar que *in vivo* esta actividad sea ejercida además a través de un mecanismo mediado por uno o más péptidos derivados de ésta y que bajo las condiciones aquí utilizadas no se haya observado.

Cabe destacar que se ha descrito que apoA-I de diversas especies difiere en su estructura primaria, no obstante conservaría su estructura secundaria y terciaria, la que se caracteriza por poseer un alto contenido α -helicoidal anfipático (Frank y Marcel, 2000; Bolanos-García y Nunez., 2003). Éstas características estructurales contribuyen a la maduración *in vivo* de HDL, ya sea por su participación en la unión a lípidos o en la activación de LCAT (McManus y col., 2000; Saito y col., 2004).

El modelo tridimensional de la secuencia parcial de la apoA-I de carpa, generado mediante SWISS-MODEL, reveló que efectivamente adoptaría una estructura en forma de herradura esencialmente α -helicoidal y en su extremo carboxilo terminal habría regiones que presentan carga neta positiva (**Figura 7**). En humanos, este extremo sería importante en la unión a membranas e interacción con los receptores que median el flujo de los lípidos celulares (Ji y Jonas, 1995; Huang y col., 2000; Favari y col., 2002).

Tomando en cuenta estos datos y los antecedentes antes descritos sobre la proteólisis de la región carboxilo terminal de apoA-I, se sintetizó un péptido análogo

a dicha región. A través del programa ANTHEPROT V.5 se realizó una predicción de la posible estructura secundaria que adoptaría el péptido. Ésta reveló una posible disposición α -helicoidal, con una carga neta de +5. (**Figura 7 A**). Considerando que el péptido sintético derivado del extremo C-terminal de apoA-I demostró actividad antimicrobiana a concentraciones micromolares, no es menor el hecho que la predicción de su estructura secundaria sea semejante a la que poseen un grupo importante de péptidos antimicrobianos.

Se han descrito 5 diferentes grupos de péptidos antimicrobianos (Zasloff, 2002, Escovar, 2004; Brogden, 2005), donde uno de los más estudiados es el de los péptidos catiónicos α -helicoidales anfipáticos (Tossi y col., 2000; Silva, 2004), en los cuales se ha analizado que un balance apropiado entre estas 3 características (hidrofobicidad, cationicidad y estructura α -helicoidal) es determinante en la potencia de su actividad antimicrobiana (Giangaspero y col., 2001; Motizuki y col., 2002; Powers y Hancock, 2003). En este sentido, se ha descrito que la diferente composición lipídica entre las membranas bacterianas también influye en la acción de los péptidos antimicrobianos (Lee y col., 2004; Brogden, 2005).

Si bien se desconoce el mecanismo exacto por el cual los péptidos antimicrobianos ejercen su acción, se sabe que los péptidos lineales α -helicoidales incrementan la permeabilidad de la membrana por interacción electrostática de sus cargas positivas con los grupos aniónicos de cabezas de fosfolípidos de la superficie celular bacteriana, y desestabilización de la membrana por desplazamiento de lípidos. Dicha permeabilización de membranas puede ocurrir por 2 mecanismos posibles: a) la formación de poros de transmembrana; y b) destrucción o solubilización de membranas (Oren y Shai, 1998; Ludtke y col., 1996; Zasloff, 2002; Vizioli y Salzet, 2002; Chen y col., 2003; Yang y col., 2000; Brogden, 2005).

Aunque la formación de poros de transmembrana y una extensa ruptura en la membrana eventualmente llevan a la lisis de las bacterias, existe una creciente especulación sobre que estos efectos no serían los únicos mecanismos involucrados en la destrucción de microorganismos (Wu y col., 1999). La creciente evidencia indica que los péptidos antimicrobianos tendrían además otros blancos intracelulares, tal es el caso de buforina II, pleuridina, e indolicidina, que se unen al ADN e inhiben su síntesis y también la de proteínas (Park y col., 1998 (a); Patrzykat y col., 2002; Subbalakshmi y Sitaram, 1998; Brogden, 2005).

El primer paso entre el péptido catiónico y la membrana celular aniónica involucra interacciones electrostáticas, las cuales son inhibidas por altas concentraciones de NaCl en la solución (Bals, 2000) y, por lo tanto, la actividad antimicrobiana de estas moléculas se ve disminuida. Tal es el caso de magaininas, cecropinas y oncorincina III (Friedrich y col., 1999; Fernández y col., 2003). Esto también se observó con el péptido sintético derivado del extremo C-terminal de apoA-I de carpa utilizado en esta tesis, el cual mostró actividad a muy baja concentración salina pero fue inactivo a 150 mM NaCl. Este antecedente sugiere que *in vivo* un péptido con estas características, podría ejercer una función antimicrobiana en forma más activa en el mucus de peces de agua dulce, que en su sangre, ya que en sangre la concentración de NaCl sería semejante a la concentración que inhibió la actividad antimicrobiana del péptido sintético.

Una de las características que debe tener un buen agente antimicrobiano es no ser citotóxico para el hospedero. El péptido derivado del C-terminal de apoA-I de carpa, al igual que oncorincina III (Fernández y col., 2003), no mostró actividad hemolítica incluso a concentraciones tan altas como 1 mM. En comparación, otro péptido antimicrobiano α -helicoidal, la melitina, proveniente del veneno de abejas, sí

posee actividad hemolítica a concentraciones tan bajas como 3 μM . Por ello, esta característica le otorga al péptido de apoA-I de carpa mayor relevancia en un potencial uso terapéutico.

En este contexto, el aumento de resistencia que manifiestan muchos patógenos humanos y también de peces frente a antibióticos convencionales y la necesidad de generar nuevos antibióticos para los cuales los patógenos aún no han desarrollado mecanismos de resistencia, ha provocado un gran interés en el desarrollo de péptidos antimicrobianos como agentes terapéuticos en humanos. Incluso algunos péptidos antimicrobianos de origen animal ya se encuentran en desarrollo farmacéutico (Zasloff, 2002; Vizioli y Salzet 2002). El amplio espectro de actividad antimicrobiana que poseen, también ha sugerido su participación en el tratamiento de enfermedades virales (Andersen y col., 2001; Chang y col., 2003) o en infecciones causadas por parásitos (Vizioli y Salzet, 2002).

A pesar de que los péptidos antimicrobianos en general constituyen potenciales agentes terapéuticos, ya existen algunos antecedentes que revelan la existencia de estrategias de resistencia frente a éstos, desarrolladas por algunas bacterias. Algunas van dirigidas a interferir con los mecanismos de unión del péptido antimicrobiano a la membrana, inserción del péptido y permeabilización de la membrana. Precisamente, las bacterias Gram-negativas son capaces de disminuir su susceptibilidad a los péptidos antimicrobianos, a través de la interrupción en la unión del péptido a la membrana externa, ya sea reduciendo la carga neta negativa de la superficie, o por medio de la cápsula del polisacárido (Campos y col., 2004; Brogden, 2005). Otro mecanismo de resistencia lo constituyen las proteasas bacterianas, como la ZapA, que son capaces de degradar los péptidos antimicrobianos, especialmente catiónicos (Belas y col., 2004).

Es lógico pensar que en *in vivo* los péptidos antimicrobianos no sólo actúan en forma directa sobre los microorganismos, sino que también pueden interactuar con otras moléculas involucradas en la defensa del hospedero. Es así como se ha descrito que péptidos antimicrobianos son capaces de aumentar la potencia de otras moléculas antibióticas existentes *in vivo*, probablemente facilitando el acceso de éstas hacia el interior de la célula bacteriana (Zasloff, 2002). Esto se ha observado para lisozima y péptidos catiónicos (Yan y Hancock, 2001; Patzkat y col., 2001; Ibrahim y col., 2002) y también fue observado en esta tesis a través del sinergismo obtenido entre lisozima y el péptido sintético de apo-A-I. La combinación de lisozima y del péptido, ambos en concentraciones sub-inhedorias fue capaz de producir una importante inhibición del crecimiento de la bacteria Gram-positiva *P. citreus*. Desde el punto de vista fisiológico, esta potenciación podría revestir gran importancia tomando en cuenta la abundancia de lisozima en mucus y plasma de peces, y a que en carpa, apoA-I asociada a HDL también está presente en estos fluidos (Krauskopf y col., 1988, Concha y col., 2003). Aún se desconoce si un efecto sinérgico o aditivo semejante al observado con el péptido pudiese producirse entre las apolipoproteínas intactas y lisozima.

Por otro lado, en lo que respecta a la interacción directa con microorganismos, se sabe que HDL, a través de apoA-I, se une y neutraliza al lipopolisacárido (LPS), componente integral de la membrana externa de bacterias Gram-negativas (Brandenburg y col., 2002). Ello provoca una drástica reducción en la actividad inmuno-estimuladora del LPS, afectando principalmente la producción de citoquinas (Ma y col., 2004). Esta actividad anti-inflamatoria ya ha sido descrita antes para otros péptidos antimicrobianos, como el LL-37 (Bals y col., 2000; Scott y col., 2000), que coincidentemente deriva del carboxilo terminal de la catelicidina humana

hCAP-18; la cual corresponde a la principal proteína de los gránulos específicos de neutrófilos humanos (Sorensen y col., 1999).

El hecho que HDL, apoA-I y sus péptidos miméticos en varias especies participen en actividades anti-inflamatorias, reguladoras del complemento, antivirales y antibacterianas (Tada y col., 1993; Mashima y col., 1998; Motizuki y col., 2002; Burger y Dayer, 2002; Jenne y col., 1991; Magnadóttir y Lange, 2004; Concha y col., 2003, 2004; Wu y col., 2004), confirma la multifuncionalidad de estas proteínas. No obstante, a pesar de que estas funciones defensivas no han sido analizadas en profundidad en peces, nuestros resultados de actividad antimicrobiana *in vitro* nos permiten especular que pese a su escasa conservación a nivel de secuencia primaria, la apoA-I ha conservado su estructura y multifuncionalidad a lo largo de la evolución.

En lo que respecta a la inducción de la expresión de péptidos antimicrobianos, se ha descrito la participación en este proceso de una de las familias más importantes de receptores para el reconocimiento de patrones (PRR): los receptores tipo Toll (TLR) (Medzhitov y Janeway, 1997; Akira y col., 2001). Estos reconocen varios patrones moleculares propios de los patógenos (PAMPs) (Medzhitov y Janeway, 2000), entre éstos se destacan componentes de la pared celular bacteriana como el LPS, lipopéptidos, peptidoglicanos (PGN) y ácido lipoteicoico (LTA), además de otros tales como ARN viral, CpG de ADN bacteriano, lipoproteínas de hongos, etc (Underhill y Ozinsky, 2002; Medzhitov y Janeway, 2000). Por otra parte, cabe destacar que en este último tiempo se ha sugerido una posible activación de TLR por ligandos endógenos (Pasare y Medzhitov, 2004), tales como Hsp60, miembro de la familia de proteínas de “shock” térmico (Ohashi y col., 2000). La presencia de estos receptores se ha descrito en peces como la trucha arcoiris y

pez cebra (Jault y col., 2004; Stafford y col., 2003; Tsujita y col., 2004). Las similitudes funcionales y estructurales de las rutas de señalización de los TLRs, entre las diversas especies, sugiere que este mecanismo tiene una importancia vital en la defensa del hospedero, ya que ha tenido que ser conservado a través de la evolución hasta los organismos más avanzados (Hoffmann y col., 1999).

El reconocimiento de los PAMPs por los TLRs constituye un puente entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Esto debido a que una vez que los TLRs reconocen los PAMPs inician una vía de señalización que lleva a la inducción de una respuesta de defensa y expresión de moléculas co-estimuladoras necesarias para procesos inmunes como la inflamación o para la estimulación de linfocitos en el establecimiento de una respuesta adaptativa, y además se activan genes que codifican péptidos antimicrobianos (Akira y col., 2001; Pasare y Medzhitov, 2004).

En el análisis de las apolipoproteínas como posibles efectores de la inmunidad innata, no debemos olvidar que *in vivo*, el objetivo es eliminar el agente invasor y, por lo tanto, se pueden producir múltiples interacciones con otros componentes. Desde ya, por los antecedentes descritos, resulta complejo analizar el mecanismo por el cual HDL y/o apolipoproteínas ejercerían su actividad antimicrobiana ya que ésta puede ser producto de la acción combinada de diferentes elementos: actividad antimicrobiana *per se* (Concha y col., 2003), liberación de péptidos antimicrobianos (Motizuki y col., 1999, 2002), o bien, mediada por el transporte de alguna otra molécula antimicrobiana semejante a hCAP-18 (Sorensen y col., 1999).

En base a nuestros resultados y sumado a lo descrito en carpa (Concha y col., 2003) y otros peces teleósteos (Cho y col., 2002), postulamos que además de la contribución constitutiva de HDL y sus apolipoproteínas en inmunidad innata de

peces teleósteos, un mecanismo adicional podría involucrar la liberación de uno o más péptidos antimicrobianos por proteólisis limitada de apoA-I asociada a HDL, posiblemente por la acción de una o más proteasas, las que pueden tener un origen bacteriano o ser producidas por células defensivas del hospedero bajo condiciones adversas como por ejemplo injurias e inflamación (por ej., elastasa o quimasa). Esta situación sería ventajosa puesto que permitiría que apoA-I pudiese cumplir normalmente otras funciones (como movilización de lípidos) y sólo bajo respuestas inflamatorias o agresiones específicas ser capaz de potenciar su actividad antimicrobiana a través de la liberación de péptido(s) activo(s). Un mecanismo semejante al propuesto, ha sido descrito para otra proteína no-inmune, la histona H2A en piel de pez gato, donde una compleja cascada de proteasas inducidas por injurias está involucrada en la regulación de la producción del péptido antimicrobiano parasina I (Cho y col., 2002).

Este trabajo constituye una contribución al conocimiento sobre proteínas multifuncionales, tales como HDL y sus apolipoproteínas mayoritarias, las cuales además de sus conocidas funciones metabólicas juegan un importante rol en la defensa primaria del hospedero frente a diversas agresiones provenientes del medio ambiente (como patógenos y agentes oxidantes). El entender las diversas funciones de HDL y sus apolipoproteínas, así como los mecanismos que regulan su expresión en diferentes tejidos en condiciones normales y patológicas permitirá, entre otras cosas, desarrollar técnicas o terapias que apunten a estimular los diversos mecanismos de la inmunidad innata en peces; lo que resultaría de gran importancia en el manejo de la piscicultura y el control de enfermedades infecciosas en los peces.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Akira, S., Takeda, K. y Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.*, **2**(8), 675-680.
- Amthauer, R., Concha, M., Villanueva, J. y Krauskopf, M (1988) Interaction of Cibacron blue and anilinonaphtalenesulphonate with lipoproteins provides a new means for simple isolation of these plasma protein. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **154**, 752-757.
- Amthauer, R., Villanueva, J., Concha, M., y Krauskopf, M (1989) Characterization of the major plasma apolipoproteins of the high density lipoprotein in the carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B**, 787-793.
- Amthauer, R. (1990) Estudios sobre la lipoproteína de alta densidad del pez *Cyprinus carpio*. Síntesis de la apolipoproteína A-I durante aclimatización. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Andersen, J. H., Osbakk, S. A., Vorland, L. H., Traavik, T. y Gutteberg, T. J. (2001) Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral. Research.*, **51**, 141-149.
- Aranishi, F., Mano, N., Nakane, M. y Hirose, H. (1998) Epidermal response of the Japanese eel to environmental stress. *Fish Physiol. Biochem.*, **19**, 197-203.
- Babin, P. J. y Vernier, J. M. (1989) Plasma lipoproteins in fish. *J. Lipids Res.*, **30**, 467-489.
- Bals, R. (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Resp. Res.*, **1**, 141-150

- Belas, R., Manos, J. y Suvanasuthi, R. (2004) *Proteus mirabilis* zapa metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect. & Immun.*, **72**(9), 5159-5167.
- Berc A., Petrincic Z., Matasin Z., Kozaric Z. (1999) *Yersinia ruckeri* septicaemia in experimentally infected carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Acta Vet. Hung.*, **47**(2), 161-72
- Birkemo G. A., Luders T., Andersen O., Nes I. F., Nissen-Meyer J. (2003) Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Biochim Biophys Acta*, **1646**(1-2), 207-215.
- Bolanos-García, V. M. y Nunez, R. (2003) On the structure and function of apolipoproteins more than a family of lipid-binding proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **83**, 47-68.
- Bolte, G., Knauss, M., Metzdorf, I. y Stern, M. (1997) Dot blot chemiluminescence assay for studying food protein binding to small intestinal brush border membranes *in vitro*. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, **34**(3), 189-203.
- Bolte, G., Knauss, M., Metzdorf, I. y Stern, M. (1998) Postnatal maturation of rat small intestinal brush border membranes correlates with increase in food protein binding capacity. *Dig. Dis. Sci.*, **43**(1), 148-155.
- Boucher J, Ramsamy T.A., Braschi S., Sahoo D., Neville T.A., Sparks D.L. (2004) Apolipoprotein A-II regulates HDL stability and affects hepatic lipase association and activity. *J. Lipid. Res.*, **45**(5), 849-58
- Brandenburg, K., Jurgens, G., Andra, J., Lindner, B., Koch, M. H., Blume, A. y Garibel, P. (2002) Biophysical characterization of the interaction of high-

density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur J. Biochem.*, **269**(23), 5972-5981.

Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.*, **3**(3):238-250.

Brokken, L. J. S., Verbost, P.M., Atsma, W. y Wendelaar Bonga, S. E. (1998) Isolation partial characterization and localization of integumental peroxidase, a stress-related enzyme in the skin of a teleostean fish (*Cyprinus carpio*). *Fish. Physiol. Biochem.*, **18**, 331-342.

Brouillette, C. G., Anantharamaiah, G. M., Engler, J. A. y Borhani, D. W. (2001) Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review. *Biochim. Biophys. Acta*, **1531**, 4-46.

Buchmann, K. (1998) Some histochemical characteristics of the mucous microenvironment in four salmonids with different susceptibilities to gyrodactylid infections. *J. Helmentol.* 72: 101-107.

Buchmann, K. y Bresciani, J. (1998) Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasitol. Res.* 84: 17-24.

Burger, D. y Dayer, J. M. (2002) High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun. Rev.*, **1**, 111-117.

Byrnes, L., Luo, Ch. y Li, W. (1987) Chicken apolipoprotein A-I: cDNA sequence, tissue expression and evolution. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **148**, 485-492.

- Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompарт, C. M., Alberti, S. y Bengoechea JA. (2004) Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun.*, **72**(12), 7107-7114.
- Chang, T. L., Francois, F., Mosoian, A. y Klotman, M. E. (2003) CAF-mediated human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transcriptional inhibition is distinct from alpha-defensin-1 HIV inhibition. *J. Virol.*, **77**(12), 6777-6784.
- Chen, F. Y., Lee M. T. y Huang H. W. (2003) Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys. J.*, **84**, 3751–3758.
- Cho, J. H., Park, I. Y., Kim, M. S. y Kim, S. C. (2002) Matrix metalloproteinase 2 is involved in the regulation of the antimicrobial peptide parasin I production in catfish skin mucosa. *FEBS Lett.*, **531**, 459-463.
- Clay, M. A., Pyle, D. H., Rye, K. y Barter, P. J. (2000) Formation of spherical, reconstituted high density lipoproteins containing both apolipoproteins A-I and A-II is mediated by lecithin: cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16978-16985.
- Concha, M. I., Molina, S., Oyarzún, C., Villanueva, J. y Amthauer, R. (2003). Local expression of apolipoprotein A-I gene and a possible role for HDL in the carp skin. *Fish & Shellfish Immunol.*, **14**, 259-273.
- Concha, M. I., Smith, V. J., Castro, K., Bastias, A., Romero, A. y Amthauer, R. J. (2004) Apolipoproteins A-I and A-II are potentially important effectors of innate immunity in the teleost fish *Cyprinus carpio*. *Eur. J. Biochem.*, **271**(14), 2984-2990.

- Concha, M. I., López, R., Villanueva, J., Báez, N. y Amthauer, R. (2005) Undetectable apolipoprotein A-I gene expression suggests an unusual mechanism of dietary lipid mobilisation in the intestine of *Cyprinus carpio*. *J. Exp. Biol.* (en prensa).
- Dixon, J. L. y Ginsberg, H. N. (1992) Hepatic synthesis of lipoproteins and apolipoproteins. *Semin. Liver Dis.*, **12**, 364-372.
- Ebran, N., Julien, S., Orange, N., Auperin, B. y Molle, G. (2000) Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore-forming properties and their antibacterial activities. *Biochim. Biophys. Acta*, **1467**, 271-280.
- Escovar, X. y Chalela, J. G. (2004) Cutaneous antimicrobial peptides. *Dermatol. Peru*, **14**, 40-43.
- Fast, M. D., Sims, D. E., Burka, J. F., Mustafa, A. y Ross, N. W. (2002) Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, **132(A)**, 645-657.
- Favari, E., Bernini, F., Tarugi, P., Franceschini, G., y Calabresi, L. (2002) The C-terminal domain of apolipoprotein A-I is involved in ABCA1-driven phospholipid and cholesterol efflux. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **299**, 801-805.
- Fernandes, JM., Kemp, GD., Molle, G. & Smith VJ. (2002) Antimicrobial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem. J.* **368**, 611-620.

- Fernandes, J. M., Saint, N., Kemp, G. D. y Smith V. J. (2003) Oncorhyncin III: a potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem. J.*, **373**(2), 621-628.
- Fernandes, J. M., Molle, G., Kemp, G. D. y Smith, V. J. (2004). Isolation and characterisation of oncorhyncin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.*, **28**(2), 127-138.
- Frank, P. G. y Marcel, Y. L. (2000) Apolipoprotein A-I: structure-functions relationships. *J. Lipid Res.*, **41**,853-872.
- Friedrich, C., Scott, M. G., Karunaratne, N., Yan, H. y Hancock, R. E. W. (1999) Salt resistant α -helicoidal cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1542-1548.
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle-Bäckdahl, M., Liden, S., Wigzell, H. y Gudmundsson, G. H. (1997) The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15258-15263.
- Fogaca, A.C., da Silva, P.I. Jr, Miranda, M.T., Bianchi, A.G., Miranda, A., Ribolla, P.E. y Daffre, S. (1999) Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* **274**: 25330-25334.
- Fouz, B., Devesa, S., Gravningen, K., Barja, J. L. y Toranzo, A. E. (1990) Antibacterial action of the mucus of the turbot. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 10: 56-59.

- Furnaletto, C. J., Ribeiro, F. O., Hatanaka, E., Souza, G. M., Cassatella, M. A. y Campa, A. (2002) Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions. *Lipids*, **37**, 925-928.
- Giangaspero, A., Sandri, L. y Tossi, A. (2001) Amphipathic α helical antimicrobial peptides. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5589-5600
- Hatten, F., Fredricksen, A., Hordvik, I. Y., y Endresen, C. (2001) Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus. *Fish & Shellfish Immunol.*, **11**, 257-260.
- Hoffmann, J. A., Kafatos F.C., Janeway C.A. y Ezekowitz R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, **284**, 1313-1318.
- Hu, G., Chen, B., y Yan, X. (1994) The physiological function of plasma apoA-I, the antiviral effects of apoA-I and its fragments. *Chung Kuo I Hsueh Pao*, **16**, 98-103.
- Huang, W., Sasaki, J., Matsunaga, A., Han, H., Li, W., Koga, T., Kugi, M., Ando, S., y Arakawa, K. (2000) A single amino acid deletion in the carboxy terminal of apolipoprotein A-I impairs lipid binding and cellular interaction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 210-216
- Ibrahim, H. R., Aoki T. y Pellegrini A. (2002) Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme y aprotinin as model molecules. *Current Pharmaceutical Design*, **8**, 671-693.

- Janeway C. A. y Medzhitov R. (2002) Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 197-216
- Jault, C., Pichon. L. y Chluba. J. (2004) Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*. *Mol. Immunol.*, **40**, 759-771.
- Jenne, D.E., Lowin, B., Peitsch, M.C., Bottcher, A., Schmitz, G. y Tschopp, J. (1991) Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma. *J. Biol. Chem.*, **17**, 11030-11036.
- Ji, Y. y Jonas,A. (1995). Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein A-I in solution and in reconstituted high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, **19**, 11290-11297
- Krauskopf, M., Amthauer, R., Araya, A., Concha, M., Leon, G., Rios, L., Vera, M. I. y Villanueva, J. (1988) Temperature acclimatization of the carp. Cellular and molecular aspects of the compensatory response. *Arch. Biol. Med. Exp. (Santiago)*, **21**(1), 151-157.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, M., Sommerhoff, CP., von Eckardstein, A., Zetl, F., Fritz, H. y Kovanen, PT. (2002) Mast cell tryptase degrades HDL and blocks its function as an acceptor of cellular cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 2086-91.
- Lee, M., Kovanen, P. T., Tedeschi, G., Oungre, E., Franceschini, G. y Calabresi, L. (2003) Apolipoprotein composition and partial size affect HDL degradation by chymase: effect on cellular cholesterol efflux. *J. Lipid. Res.*, **44**(3), 539-546.
- Lee, M., Chen, F.Y. y Huang, H.W. (2004) Energetics of Pore Formation Induced by Membrane Active Peptides. *Biochemistry*, **43**, 3590-3599

- Lemes-Marques, E. G. y Yano, T. (2004) Influence of environmental conditions on the expression of virulence factors by *Listeria monocytogenes* and their use in species identification. *FEMS Microbiol. Lett.*, **239**, 63-70.
- Lenich, C., Brecher, P., Makrides, S., Chobanian, A. y Zannis, V. I. (1988) Apolipoprotein gene expression in the rabbit: abundance, size, and distribution of apolipoprotein mRNA species in different tissues. *J. Lipid. Res.*, **29**, 755-764.
- Lehrer, R.I. y Ganz, T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence *Curr. Opin. Immunol.* 11: 23-27.
- Lindstedt, L., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Welgus, H. y Kovanen, PT. (1999) Matrix metalloproteinases-3, -7, and -12, but not -9, reduce high density lipoprotein-induced cholesterol efflux from human macrophage foam cells by truncation of the carboxyl terminus of apolipoprotein A-I. Parallel losses of pre-beta particles and the high affinity component of efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 2086-2091.
- López-Romalde, S., Magarinos, B., Ravelo, C., Toranzo, A. E. Y Romalde, J. L. (2003) Existence of two O-serotypes in the fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica*. **94**(4), 325-333.
- Ludtke, S., He, K., Heller, W., Harroun, T., Yang, L. y Huang, H. (1996). Membrane Pores Induced by Magainin. *Biochemistry*, **35**, 13723-13728
- Ma, J., Liao, X., Lou, B. y Wu, M. (2004) Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **36** (6), 419-424.
- Magor, BG. & Magor KE. (2001) Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Devel. Comp. Immunol.* **25**, 651-682.

- Magnadóttir, B. y Lange, S. (2004) Is Apolipoprotein A-I a regulating protein for the complement system of cod (*Gadus morhua* L.)? *Fish & Shellfish Immunol.*, **16**, 265-269.
- Massamiri, T., Tobias, P.S. y Curtiss, L.K. (1997) Structural determinants for the interaction of lipopolysaccharide binding protein with purified high density lipoproteins: role of apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res.* 38: 516-525.
- Mashima, R., Yamamoto, Y. y Yoshimura, S. (1998) Reduction of phosphatidylcholine hydroperoxide by apolipoprotein A-I: purification of the hydroperoxide-reducing proteins from human blood plasma. *J. Lipid. Res.*, **39**, 1133-1140.
- McManus, D. C., Scott, B. R., Frank, P. G., Franklin, V., Schultz, J. R. y Marcel, Y. L. (2000) Distinct central amphipathic alpha-helices in apolipoprotein A-I contribute to the in vivo maturation of high density lipoprotein by either activating lecithin-cholesterol acyltransferase or binding lipids. *J. Biol. Chem.*, **275**, 5043-5051.
- Medzhitov, R. y Janeway, C. A. Jr. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.*, **91**(3):295-298.
- Medzhitov, R. y Janeway, F. (2000) Innate Immunity. *N. England J. Med.*, **343**(5), 338-344.
- Méndez, A. J. y Oram, J. F. (1997) Limited proteolysis of high density lipoprotein abolishes its interaction with cell-surface binding sites that promote cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta.* **1346**, 285-299.
- Metcalf, V. J., Brennan, S. O., y George, P. M. (1999) The Antarctic toothfish (*Dissostichus mawsoni*) lacks plasma albumin and utilizes high density

lipoprotein as its major palmitate binding protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, **124 B**, 147-155.

Michel, C. y García, C. (2003) Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Vet. Res.*, **34**, 127-132.

Motizuki, M., Itoh, T., Satoh, T., Yokota, S., Yamada, M., Shimamura, S., Samejima, T. y Tsurugi, K. (1999) Lipid-binding and antimicrobial properties of synthetic peptides of bovine apolipoprotein A-II. *Biochem. J.*, **342**, 215-221.

Motizuki, M., Satoh, T., Takei, T, Itoh, T., Yokota, S., Kojima, S., Miura, K., Samejima, T y Tsurugi, K. (2002). Structure-activity analysis of an antimicrobial peptide derived from bovine apolipoprotein A-II. *J. Biochem.*, **132**, 115-119.

Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K. y Wakabayashi, H. (2000) *Pseudomonas plecossicida sp. nov.*, the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**(1), 83-89.

Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. y Kolb, H. (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor- 4 complex, *J. Immunol.*, **164** 558–561.

Okamoto, T., Akaike, T., Suga, M., Tanase, S., Horie, H., Miyajima, S., Andos, M., Ichinose, Y. y Maeda, H. (1997) Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J. Biol. Chem.*, **272** (9), 6059-6066

Olabuenaga, S. (2000) Fish immune system. *Gayana (Concept.)*, **64**(2), 1-19.

- Oren, Z. y Shai, Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers.*, **47**, 451-463.
- Pasare, C. y Medzhitov, R. (2004) Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*, **6**, 1382–1387
- Panzenböck, U., Kritharides, L., Raftery, M., Rye, K. y Stocker, R. (2000) Oxidation of methionine residues to methionine sulfoxides does not decrease potential antiatherogenic properties of apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* **275**: 19536-19544.
- Park, C. B., Kim, H. S. y Kim, S. C. (1998) **(a)**. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 253–257
- Park, I. Y., Park, C. B., Kim, M. S. y Kim, S. C. (1998) **(b)**. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett.*, **437**(3), 258-262.
- Park, C.B., Yi, K., Matsuzaki, K. y Kim, M. S. (2000) Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8245-8250.
- Patrzykat, A., Zhang, L., Mendoza, V., Iwama, G. I. y Hancock, R. E. (2001) Synergy of histone-derived peptides of coho salmon with lysozyme and flounder pleurocidin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 1337-1342.
- Patrzykat, A., Friedrich, C. L., Zhang, L., Mendoza, V. y Hancock, R. E. (2002) Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit

macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 605–614 .

Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P. y von Fellenberg, R. (1999) Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**(3), 439-448.

Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U. y Hunziker, P. (2001) Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1526**(2), 131-140.

Powers, J.P. y Hancock, R. (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, **24**, 1681-1691

Richards, R. C., O'Neil, D. B., Thibault, P. y Ewart K. V. (2001) Histone H1: an antimicrobial protein of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **284**, 549-555.

Robinette, D., Wada, S., Arroll, T., Levy, M.G., Miller, W.L. y Noga, E.J. (1998). Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. *Cell Mol Life Sci.* **54**: 467-475.

Saito, H., Dhanasekaran, P., Nguyen, D., Deridder, E., Holvoet, P., Lund-Katz, S. y Phillips, M. C. (2004) Alpha-helix formation is required for high affinity binding of human apolipoprotein A-I to lipids. *J. Biol. Chem.*, **279**(20), 20974-20981.

Scanu, A. M. (1987) Proteolytic enzymes in the biogenesis and metabolism of plasma HDL. *Atherosclerosis Rev.*, **16**, 9-18.

Schägger, H. y 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**, 368-397.

- Schroeder, J.M. (1999) Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 57: 121-134
- Scott, M.G., Vreugdenhil, A., Buurman, W., Hancock, R. y Gold, M. (2000) Cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *The Journal of Immunology*, **164**, 549-553
- Sedmak, J. J. y Grossberg, S. E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.*, **79**(1-2), 544-552.
- Segrest, J. P., Jones, M. K., Klon, A. E., Sheldahl, C. J., Hellinger, M., De Loof, H. y Harvey, S. C. (1999) A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal High Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 31755-31758.
- Settasatian, N., Duong, M., Curtiss, L. K., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., Huuskonen, J. y Rye, K. A. (2001) The mechanism of the remodeling of high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 26898-26905.
- Silva L. P., (2004) Antimicrobial Peptides from Animals: Focus on Drug Discovery. *Letters in Drug Design & Discovery*. **1**, 230-236.
- Smith, PK., Krohn, RI., Hermanson, GT., Mallia, AK., Gartner, FH., Provenzano, MD., Fujimoto, EK., Goeke, NM., Olson, BJ. & Klenk DC. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Smith V. J., Fernandes J. M., Jones S. J., Kemp G. D. y Tatner M. F. (2000) Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunol.*, **10** (3), 243-260.

- Sorensen, O., Bratt, T., Johnsen, A., Madsen, M. y Borregaard, N. (1999) The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. *J. Biol. Biochem.*, **274**, 22445-22451.
- Sorensen, O., Follin P., Johnsen, A., Calafat, J., Tjabringa, S., Hiemstra, P. S. y Borregaard, N. (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, **97**(12), 3951-3959
- Subbalakshmi, C. y Sitaram, N. (1998) Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **160**, 91–96.
- Tada, N., Sakamoto, T., Kamgami, A., Mochizuki, K. y Kurosaka, K. (1993) Antimicrobial activity of lipoprotein particles containing apolipoprotein A-I. *Mol. Cell. Biochem.*, **119**, 171-178.
- Tarugi, P., Albertazzi, L., Nicolini, S., Ottaviani, E. y Calandra, S. (1991) Synthesis and secretion of apolipoprotein A-I by chick skin. *J. Biol. Chem.*, **266**, 7714-7720.
- Tossi, A., Sandri, L. y Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers.*, **55**(1), 4-30.
- Tsujita, T., Tsukada, H., Nakao, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M. y Seya, T. (2004) Sensing bacterial flagellin by membrane and soluble orthologs of Toll-like receptor 5 in rainbow trout (*Onchorhynchus mikiss*). *J. Biol. Chem.*, **279**(47), 48588-48597.
- Ulvatne, H., Haukland, H.H., Olsvik, O y Vorland, L.H. (2001) Lactoferricin B causes depolarization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* ATCC 25922 and fusion of negatively charged liposomes. *FEBS Lett.* 492: 62-65.

- Underhill, D.M. y Ozinsky, A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology*, **14**, 103-110
- Vidal, L. (2002) *Aquanoticias* **72**: 80-81
- Vizioli, J. y Salzet, M. (2002) Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23** (11), 494-496.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R. y Hancock, R. E. W. (1999) Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrana of *Escherichia coli*. *Biochem.* **38**, 7235-7242.
- Wu, A., Hinds, C. J. y Thiemermann, C. (2004) High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock.*, **21**(3), 210-221.
- Yan, H. y Hancock, R. (2001) Synergistic Interactions between Mammalian Antimicrobial Defense Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**(5), 1558-1560
- Yang, L., Weiss, T. M., Lehrer, R. I. y Huang, H. W. (2000) Crystallization of antimicrobial pores in membranes: Magainin and Protegrin. *Biophys. J.*, **79**, 2002-2009.
- Yasutake, W. T. y Wales J. H. (1983) Microscopy anatomy of salmonids: An Atlas. United States Department of the Interior. Fish and Wildlife Service. Resource Publication 150 Washington, D. C.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *N. Engl. J. Med.*, **347**, 1199-1200.