



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

**Dr. Rodolfo Amthauer M.**

Instituto de Bioquímica

Facultad de Ciencias

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANO DE HDL  
Y/O ApoA-I**

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

**CARLOS EDUARDO ALVAREZ NAVARRO**

**VALDIVIA – CHILE**

**2007**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco al Dr. Rodolfo Amthauer por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por guiarme y modelarme en esta etapa de formación, para convertirme en buen profesional. Agradezco a la Dra. Margarita Concha por sus invaluable consejos y la permanente entrega de conocimientos. Quisiera agradecer a la profesora Julieta Villanueva, por transmitirme su experiencia en el trabajo de laboratorio. Al Dr. Jaime Figueroa por formar parte de mi comisión, pero fundamentalmente por su buena disposición y gratas conversaciones.

Especialmente agradezco a mis papas por ser un pilar fundamental en mi desarrollo como persona y por confiar en mí en los momentos importantes.

A mis compañeros y amigos: Clara, Magaly, Mauricio, Annette, Evelyn y Dany, ya que sin su apoyo (y retos) este largo camino hubiese sido mucho más difícil y solitario.

A mis compañeros de laboratorio (Franz, Alin, Jackie, Ella, Jorge) por todos los momentos vividos durante estos años e indudables aportes realizados durante esta tesis.

A Dennis y Pablo, por el apoyo incondicional que siempre me brindaron.

A Carolina, por permitirme formar parte de su vida y entregarme la fuerza que necesité durante los momentos difíciles.

A los que no he nombrado, pero saben que fueron importantes durante esta etapa de mi vida.

A los que creyeron en mí y confiaron en mis capacidades.

Esta tesis fue financiada por el proyecto DID-UACH S-2005-30.



3.2.5.3 <i>Western blot</i>	22
3.2.6 Cultivos bacterianos	23
3.2.7 Ensayos de unión de HDL y ApoA-I a bacterias	23
3.2.7.1 Inmunofluorescencia	23
3.2.7.2 Ensayos de competencia	24
3.2.8 Ensayos de integridad de membranas bacterianas	25
3.2.8.1 Ensayos de permeabilización	25
3.2.8.2 Análisis del daño de la membrana bacteriana por microscopía electrónica de barrido	26
3.2.9 Ensayos de unión de HDL a fracciones bacterianas	27
3.2.9.1 Preparación de fracciones bacterianas	27
3.2.9.1.1 Extracción de proteínas periféricas (tratamiento con bicarbonato)	27
3.2.9.1.2 Tratamiento de bacterias con Tripsina (desnudamiento)	28
3.2.9.1.3 Formación de protoplastos a partir de bacterias Gram negativas ( <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ )	28
3.2.9.2 Purificación de anticuerpo anti-ApoA-I	29
3.2.9.3 <i>Ligand blot</i> de HDL a fracciones bacterianas	30
3.2.9.4 Interacciones de proteínas con LPS-FITC	31
3.2.10 Análisis bioinformático del extremo C-terminal de ApoA-I	32

<b>4. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1 Análisis bioinformático del extremo C-terminal de ApoA-I de carpa	34
4.2 Purificación de HDL y apolipoproteínas A-I y A-II	39
4.3 Estudio de la unión de HDL y ApoA-I con bacterias	42
4.4 Estudios de permeabilización de membranas bacterianas incubadas con HDL y ApoA-I	44
4.5 Análisis del daño de la membrana bacteriana producido por HDL y ApoA-I	50
4.6 Identificar posibles sitios de unión para HDL y/o ApoA-I en membranas bacterianas	57
4.6.1 Ensayo de unión mediante <i>Ligand blot</i>	57
4.6.2 Interacción de proteínas plasmáticas con LPS-FITC, mediante cromatografía de filtración	63
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>70</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>85</b>

**INDICE DE FIGURAS**

	Página
<b>Figura 1</b>	35
Alineamiento de ApoA-I de distintas especies	
<b>Figura 2</b>	37
Representación en <i>Helical wheel</i> del extremo C-terminal de ApoA-I de pollo ( <i>G. gallus</i> ), humano ( <i>H. sapiens</i> ), pez cebra ( <i>D. rerio</i> ) y trucha arcoiris ( <i>O. mykiss</i> )	
<b>Figura 3</b>	38
Representación en <i>Helical wheel</i> del extremo C-terminal de ApoA-I de carpa y Melitina	
<b>Figura 4</b>	40
Modelo tridimensional del extremo C-terminal de ApoA-I de carpa y de Melitina	
<b>Figura 5</b>	41
Purificación de ApoA-I por cromatografía de filtración en columna Sephacryl S-200	
<b>Figura 6</b>	43
Inmunodetección de HDL y ApoA-I de carpa unida a <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	
<b>Figura 7</b>	45
Unión específica de HDL sobre bacterias Gram negativas y positivas	

<b>Figura 8</b>	47
Análisis de permeabilización de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ por HDL	
<b>Figura 9</b>	48
Análisis de permeabilización de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ por ApoA-I	
<b>Figura 10</b>	49
Análisis de permeabilización de <i>B. subtilis</i> por HDL	
<b>Figura 11</b>	51
Análisis de permeabilización de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ por HDL	
<b>Figura 12</b>	53
Análisis morfológico por microscopia electrónica de bacterias incubadas con HDL por 1 h	
<b>Figura 13</b>	54
Análisis morfológico por microscopia electrónica de bacterias incubadas con ApoA-I por 1 h	
<b>Figura 14</b>	55
Análisis morfológico por microscopia electrónica de bacterias incubadas con HDL por 6 h	
<b>Figura 15</b>	56
Análisis morfológico por microscopia electrónica de bacterias incubadas con ApoA-I por 6 h	
<b>Figura 16</b>	58
Tinción de Gram de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ luego de diversos tratamientos	

<b>Figura 17</b>	59
<i>Ligand blot</i> de fracciones bacterianas de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con HDL	
<b>Figura 18</b>	61
<i>Ligand blot</i> de fracciones bacterianas de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con HDL	
<b>Figura 19</b>	62
<i>Ligand blot</i> de fracciones bacterianas de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con HDL	
<b>Figura 20</b>	64
Análisis de LPS-FITC por cromatografía de filtración	
<b>Figura 21</b>	66
Interacción entre LPS de <i>E. coli</i> y fracciones proteicas del plasma de carpa	
<b>Figura 22</b>	67
Interacción entre LPS de <i>E. coli</i> y HDL de carpa	
<b>Figura 23</b>	68
Análisis en SDS-PAGE de los picos de elución obtenidos luego de cromatografía de HDL en columna Superdex 200 HR	

**LISTAS DE ABREVIATURAS**

ANS	Ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico
ApoA-I	Apolipoproteína A-I
ApoA-II	Apolipoproteína A-II
A-SAA	Proteína sérica amiloide A
BCIP	5- bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BSA	Albúmina sérica de bovino
C-terminal	Carboxilo terminal
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etiléndiamino tetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidad)
HMGCoA	Hidroximetil-glutaril-coenzima A
LB	Medio de cultivo líquido Luria-Bertani
LBP-BPI	<i>Lipopolysaccharide binding protein – Bactericidal permeability increasing protein</i>
LBA	Medio de cultivo sólido Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacarido
M-H	Medio de cultivo Müller-Hinton
NBT	Nitroazul de tetrazolio
DO	Densidad óptica

PBS	Tampón fosfato salino
PMSF	Fluoruro de sulfonilfenilmetano
PSA	Persulfato de amonio
RITC	Isotiocianato de rodamina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TBS	Tampón Tris salino
u.a	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta

## 1. RESUMEN

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que HDL de carpa (*Cyprinus carpio*) y sus apolipoproteínas mayoritarias (ApoA-I y A-II) presentan una potente actividad antimicrobiana, en el rango submicromolar a micromolar. Por otra parte ApoA-I muestra semejanza en su estructura secundaria con péptidos antimicrobianos  $\alpha$ -helicoidales anfipáticos, por lo que postulamos que el mecanismo de acción de HDL y sus apolipoproteínas sería similar al descrito para estos péptidos, lo cual involucraría interacción con la membrana bacteriana y posterior permeabilización de ésta.

Los resultados demuestran que tanto HDL como ApoA-I son capaces de unirse a la superficie bacteriana, y al menos la unión de HDL es específica, debido a que es completamente desplazada al realizar ensayos de competencia. Sin embargo, los ensayos de permeabilización con HDL o ApoA-I no demostraron un aumento en la permeabilidad bacteriana. Por otra parte, por microscopia de barrido no se observaron alteraciones morfológicas drásticas en bacterias tratadas con HDL o ApoA-I.

Mediante cromatografía de filtración se detectó unión de HDL a LPS-FITC, lo que sugiere que al menos en bacterias Gram negativas el LPS sería un posible sitio de unión.

En conjunto los resultados sugieren que el mecanismo de acción antimicrobiano de HDL y ApoA-I es diferente a lo clásicamente descrito para péptidos y proteínas que presentan motivos estructurales  $\alpha$ -helicoidales anfipáticos y catiónicos.

## 1.1 SUMMARY

Previous studies in our laboratory have shown that carp (*Cyprinus carpio*) HDL and its major apolipoproteins (ApoA-I and A-II) present a strong antimicrobial activity, in the submicromolar to micromolar range. In addition, ApoA-I shows a similar secondary structure to  $\alpha$ -helical, amphipathic antimicrobial peptides, therefore we hypothesized that the mechanism of action of HDL and its apolipoproteins involve an interaction with the bacterial membrane, producing permeabilization.

The results show that HDL and ApoA-I are capable to bind to the bacterial surface, and that at least HDL interaction is specific because it is completely displaced in competitive assays. However, permeabilization assays with HDL or ApoA-I did not show an increase in bacterial permeability. On the other hand, by scanning electron microscopy we did not observe important morphologic alterations in bacteria treated with HDL or ApoA-I.

By filtration chromatography we detected binding of HDL to LPS-FITC, suggesting that at least in Gram negative bacteria the LPS would constitute a possible binding site.

Taken together these results suggest that the antimicrobial mechanism of HDL and ApoA-I is different from the one classically described for peptides and proteins that present  $\alpha$ -helical, amphipathic and cationic structural motifs.

## 2. INTRODUCCIÓN

Durante la evolución, los organismos multicelulares han convivido con un sinnúmero de microbios. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, este equilibrio se rompe provocando que los microorganismos sean capaces de atacar a los organismos hospederos, desencadenando enfermedades. Por lo tanto, estos organismos han debido desarrollar diversos mecanismos de protección contra patógenos como bacterias, virus, hongos y parásitos. Estos mecanismos se encuentran agrupados en lo que se denomina sistema inmune.

En el momento de la infección por parte de los diversos patógenos, el sistema inmune es el encargado de eliminarlos o neutralizarlos, por lo que es muy importante el desarrollo inmunológico en las distintas especies. Esencialmente los vertebrados han desarrollado dos estrategias de defensa, la inmunidad innata y la inmunidad adquirida o específica (Medzhitov y Janeway, 2000; Verlhac y Kiron, 2004; Hume y Hertzog, 2006; Magnadottir, 2006).

El sistema inmune adquirido proporciona una respuesta específica contra antígenos extraños presentes en el organismo, mediada por la producción de anticuerpos y linfocitos activados, donde el tiempo y especificidad de la respuesta varía de acuerdo al estado evolutivo del sistema inmune (Du Pasquier, 2005; Pancer y Cooper, 2006). Por ejemplo en vertebrados superiores, donde se encuentra más desarrollado el sistema inmunológico, la producción de anticuerpos se inicia sintetizando primero IgM, como respuesta primaria, para luego tener una respuesta secundaria mucho más duradera y eficaz comandada por IgG. En cambio en los

vertebrados inferiores, en particular los peces, la respuesta está solo dada por la presencia de IgM (Watts y col., 2001; Magnadottir, 2006).

El sistema inmune innato proporciona una respuesta inespecífica. 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).

La mayoría de los compuestos que otorgan protección inespecífica, corresponden a péptidos o proteínas que poseen actividad anti-bacteriana, anti-viral o anti-fúngica y han sido aislados a partir de un gran número de organismos como son mamíferos, anfibios, insectos, peces, plantas e incluso bacterias (Zasloff, 2002; Yeaman y Yount, 2003; Brogden, 2005).

En el caso de los péptidos antimicrobianos la gran mayoría son sintetizados, por los organismos afectados, en lugares que corresponden a barreras primarias de entradas de patógenos como son: vías aéreas, tracto digestivo, piel, etc., de esta manera, se encuentran otorgando protección permanente (Ganz y col., 2002; Kawasaki y col., 2003; Koczulla y col., 2003; Satchell y col., 2003). Aún cuando muchos péptidos antimicrobianos están codificados en el genoma, son varios los que corresponden a fragmentos de proteínas que no presentan una aparente función inmune, tales como Lactoferrina, Proteína H6, Histonas H1, H2A, y H2B y (Hoek y col., 1997; Fernandes y col., 2002, 2003, 2004; Cho y col., 2002; Kawasaki y col., 2003).

En base a la información de la gran cantidad de péptidos antimicrobianos aislados, identificados y caracterizados de distintas especies, éstos se han agrupado en distintas clases considerando sus características estructurales y bioquímicas: i) péptidos en los cuales predomina la estructura de  $\alpha$ -hélice, ii) péptidos en los cuales predomina la estructura de hoja  $\beta$ -plegada, iii) péptidos ricos en cisteína, iv) péptidos con un alto contenido de un aminoácido.

Una de las clases más estudiadas es la que corresponde a péptidos catiónicos (a pH fisiológico), lineales y altamente  $\alpha$ -helicoidales. Se ha encontrado que estos péptidos catiónicos interactúan con vesículas y membranas artificiales, así como en membranas bacterianas, e incluso con membranas de eritrocitos u otros tipos celulares. (Hancock y Shaple, 1999; Zasloff, 2002; Yeaman y Yount, 2003; Bulet y col., 2004; Brogden, 2005; Glukhov y col., 2005). Debido a la alta heterogeneidad que presentan estas moléculas, tanto en su estructura primaria como secundaria, son capaces de ejercer sus efectos mediante mecanismos altamente complejos y variados.

La estructura blanco más importante en el mecanismo de acción antimicrobiano de estos péptidos, corresponde a la membrana de los agentes patógenos. Se debe tener en cuenta que la acción de los péptidos antimicrobianos debe ser selectiva para interactuar o destruir las membranas de estos patógenos y no la de las células del hospedero. Los diversos estudios que se han focalizado en la interacción que presentan los péptidos catiónicos con distintos tipos de membranas celulares, han llegado a un consenso que indican que la interacción es facilitada por la carga neta que presenten los distintos tipos de membranas, lo que permitiría una “selectividad” por parte del

péptido hacia las membranas con mayor carga negativa, como la de las bacterias (Zasloff, 2002; Yeaman y Yount, 2003; Glukhov y col., 2005).

Los análisis de composición lipídica han demostrado que las membranas bacterianas, son ricas en fosfolípidos como fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS) y cardiolipina (CL), los que presentan carga negativa, además ven aumentada su carga negativa por la presencia de lipopolisacárido (LPS), ácido lipoteicoico y ácido teicurónico en estos microorganismos (Hancock y Rozek, 2002; Jenssen y col., 2006). En cambio las membranas de los organismos hospederos son generalmente compuestas por fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomielina (SM) que son compuestos neutros (Yeaman y Yount, 2003). Por lo tanto estas diferencias en carga de las membranas son fundamentales para determinar una interacción específica del péptido con su membrana blanco (Glukhov y col., 2005)

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de acción antimicrobianos de éstos péptidos son muy variados, sin embargo, a rasgos generales, son tres las principales vías de acción:

- La primera vía es por alteración de la membrana celular, en las cuales se ha descrito que ciertos péptidos pueden producir la muerte celular en tan solo 2 a 3 minutos después de la exposición inicial (Lehrer y col., 1989; Tossi y col., 1997). Esta rápida muerte celular es atribuida a un depolarización rápida de la membrana, pérdida de iones y gradiente de metabolitos, además de otras funciones celulares como la respiración. Se ha demostrado que en bacterias Gram negativas los péptidos pueden interactuar de manera independiente sobre

la membrana interna y la membrana externa y que en bacterias Gram positivas resulta en un aumento del flujo de iones y agua, salida de  $K^+$ , aumento en la turgencia y alteración del equilibrio osmótico (Juretic y col., 1989; Otha y col., 1992; Matsuzaki y col., 1997a, 1997b).

- La segunda vía es por inhibición de la biosíntesis de polímeros extracelulares, donde es sabido que la biosíntesis del peptidoglicano está íntegramente relacionado con la integridad y función de la membrana. Esta vía de acción estaría dada por una inhibición directa o indirecta de los precursores de la síntesis del peptidoglicano, como en su translocación y/o entrecruzamiento de los mismos. (Brotz y col., 1998; Van Heusden y col., 2002; Breukink, 2003; Bauer y Dicks, 2005).
- La tercera vía es por inhibición de algunas funciones celulares, como son la síntesis proteica, la síntesis de DNA y/o RNA. Incluso se ha descrito la interacción de algunos péptidos con proteínas de shock térmico (DnaK, GroEL, GroES), cuya inhibición estaría asociada a muerte celular. Aunque la perturbación de la membrana es un paso importante para realizar su función, no es el paso que produce la muerte celular (Yeaman y Yount., 2003; Otvos y col., 2000, 2005; Brogden, 2005).

Proteínas que presentan actividad antimicrobiana, y que forman parte del sistema inmune innato, son las proteínas del complemento. Mayormente se ha estudiado la C3 y

su alta actividad que presenta en la vía alterna. Existe otro grupo que corresponde a enzimas líticas, que se ha encontrado que aumenta su presencia en estados de infección y que indudablemente ejercen su función sobre bacterias. Algunos ejemplos de estas enzimas son Lisozima, Quitinasa, y la vía lítica del complemento (Magnadottir, 2006). Por ejemplo Lisozima hidroliza el enlace  $\beta$ [1-4] glicosídico entre los ácidos N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina produciendo la ruptura del peptidoglicano. Se ha determinado previamente que esta enzima es más activa sobre bacterias Gram positivas, pero también es capaz de ejercer su efecto en las Gram negativas.

Por otra parte, proteínas que forman parte del grupo de las lectinas tienen alta especificidad de unión a carbohidratos tales como manosa, N-acetil glucosamina o fucosa, en presencia de iones de calcio. Una vez que se han unido a los motivos de carbohidratos, provocan la opsonización, fagocitosis y activación del sistema del complemento (Magnadottir, 2006).

Las pentraxinas son lectinas, dentro de las cuales se encuentra la Proteína C reactiva (PCR) y la Proteína sérica amiloide A (A-SAA). Estas proteínas son generalmente reconocidas como reactantes de fase aguda positivas, ya que un incremento en su concentración plasmática es producido por infección, trauma o injuria tisular. La acción de la PCR sobre bacterias se debe a su capacidad de unirse a los motivos de fosforilcolina presentes en las membranas bacterianas. A su vez la A-SAA muestra afinidad por fosforiletanolamina, y es conocida su propiedad de unión al LPS de bacterias Gram negativas (Watts y col., 2001; Gruys y col., 2005; Magnadottir, 2006)

Diversas investigaciones han demostrado que varios de los péptidos antimicrobianos que ofrecen protección a los diferentes organismos, no son sintetizados

por las células como tales, sino que provienen de proteínas que no poseen función inmune reconocida, como por ejemplo: Lactoferrina, Lactoalbúmina, Histonas, Hemoglobina y proteínas ribosomales (Mak y col., 2000; Nibbering y col., 2001; Pellegrini y col., 2001; Cho y col., 2002; Fernandes y col., 2002; Kawasaki y col., 2003). Sin embargo se ha encontrado que proteínas como Transferrina, Lactoferrina y Albúmina otorgan protección inespecífica ante infecciones (Shin y col., 1998; Borregaard, 2001; Van der Kraan y col., 2004, 2006; Brogden, 2005).

HDL es una lipoproteína de alta densidad, que junto a su apolipoproteína ApoA-I juegan un rol central en el metabolismo de los lípidos y en particular en el transporte reverso del colesterol (Rohrer y col., 2004; Wang y Briggs, 2004).

Así también otros estudios, han puesto de relevancia que el metabolismo de la HDL y sus apolipoproteínas ApoA-I y ApoA-II tiene otras funciones emergentes en directa relación con un papel defensivo. En efecto, a ApoA-I humana se le han atribuido funciones tales como antioxidantes en el plasma (Garner y col., 1998; Mashima y col., 1998; Panzenböck y col., 2000), capacidad inductora de la Elastasa (Thompson y col., 1998) e inhibidora de la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y de Interleukina-1 $\beta$  (Hyka y col., 2001), su capacidad de unir y neutralizar al lipopolisacárido bacteriano (Wurfel y col., 1994; Massamiri y col., 2001; Levels y col., 2003; Zweigner y col., 2006) y su actividad antimicrobiana y antiviral en el plasma (Tada y col., 1993; Hu y col., 1994). Adicionalmente, se ha demostrado que Catelicidina, una proteína antibacteriana de 18 kDa producida por los neutrófilos humanos, se encuentra mayoritariamente asociada a lipoproteínas del plasma (Sorensen y col., 1999) y que el péptido antimicrobiano citotóxico LL-37 liberado de esta proteína precursora es inhibido

por su unión a ApoA-I (Wang y col., 1998). Todo este cúmulo de antecedentes apunta a un importante rol defensivo de HDL y ApoA-I en el plasma humano. También se ha descrito que otra apolipoproteína constituyente de HDL (ApoA-II), parece ser la responsable de la actividad antimicrobiana en el plasma bovino (Motizuki y col., 1998)

En la mayoría de los vertebrados, se ha demostrado que la síntesis de la ApoA-I ocurre principalmente en el hígado e intestino delgado, ambos tejidos cumplen una función de gran importancia en la movilización de lípidos. Además se describen 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) En estudios en los cuales se han utilizado como modelo al pez *Cyprinus carpio* (carpa), se demostró que la lipoproteína de alta densidad HDL corresponde a la fracción proteica más abundante y anódica del plasma (Amthauer y col., 1989). También en este pez se ha observado síntesis de ApoA-I en hepatocitos aislados (Amthauer, 1990). Sin embargo estudios recientes han analizado la expresión de Apo-AI en tejidos periféricos de carpa, demostrándose tanto por análisis de *Northern Blot* como de RT-PCR la expresión del gen de esta proteína en la piel y por medios de estudios inmunohistoquímicos su presencia en células del estrato germinal de la piel, en células de la mucosa y en el mucus sobre la piel del pez (Concha y col., 2003). Estos resultados demuestran que ApoA-I se expresa en la piel y que se ensamblaría en una partícula lipoproteica con características de HDL naciente que es excretada al mucus y ejercería un efecto protector. A su vez, se han descrito propiedades antimicrobianas para ApoA-I en carpa y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Concha y col., 2003, 2004; Villarroel y col., 2007).

Los datos de secuencia aminoacídica de ApoA-I disponibles para varias especies, incluyendo carpa, revelan la presencia de repeticiones de 22 y 11 residuos aminoacídicos, los cuales se encuentran en una clara disposición  $\alpha$ -helicoidal anfipática. Se postula que este tipo de estructuras serían importantes para la unión y solubilización de lípidos (Luo y col., 1986; Frank y Marcel, 2000; López, 2006) Este tipo de motivos estructurales se encuentra presente en muchos péptidos y proteínas que poseen efectos antimicrobianos (Yeaman y Yount, 2003; Brodgen, 2005).

La unión de péptidos antimicrobianos a bicapas lipídicas se ha utilizado como modelo de estudio para posibles mecanismos de acción antimicrobianos que involucren permeabilización (Yeaman y Yount, 2003; Brodgen y col., 2005). En lo que respecta a ApoA-I, el extremo carboxilo terminal de ésta proteína se ve involucrado en producir una mayor eficiencia en la interacción de ésta proteína con bicapas lipídicas. (Pownall y col., 1979; Holvoet y col., 1996; Laccotripe y col., 1997). Específicamente para ApoA-I de carpa, López (2006) demostró que ésta proteína truncada en el extremo carboxilo terminal retiene parte de su capacidad de solubilizar vesículas de fosfolípidos, esto a pesar de que la actividad se ve disminuida en un 47%. Por otra parte ApoA-I de carpa es mas eficiente que ApoA-I humana para solubilizar vesículas de fosfolípidos (Concha y col., 2005). Estos hallazgos demuestran que ApoA-I de carpa presenta una fuerte interacción con lípidos, que es más eficiente que ApoA-I humana para solubilizar vesículas de fosfolípidos y que la falta del extremo C-terminal disminuye, pero no suprime, la afinidad que presenta ésta proteína por membranas lipídicas.

HDL es conocida por su rol en la movilización de lípidos y colesterol, sin embargo, también actúa como partícula transportadora de otras proteínas, como son:

Proteína sérica amilode A (A-SAA), *LPS binding protein* (LBP), (Wurfel y col., 1994; Cabana y col., 1999; Levels y col, 2003; Karlsson y col., 2005; Magnadottir, 2006; Zweigner y col., 2006). Ambas proteínas poseen la capacidad de unir LPS. En el caso de la carpa se ha demostrado la presencia de A-SAA y de LBP-BPI, donde LBP-BPI se presentan como una sola, y al menos en otras especies, han sido caracterizadas por su gran afinidad de unión a LPS (Kirschning y col., 1997; Kono y Sakai, 2003; Huttenhuis y col., 2006). A pesar de la presencia de ambas proteínas en carpa, no se ha demostrado si estas son transportadas por HDL. Por lo cual no se puede descartar que alguno de estos posibles componentes de HDL, ejerzan una función antimicrobiana sin desmedro de lo ya demostrado para ApoA-I y A-II (Concha y col., 2003, 2004).

De acuerdo con los antecedentes presentados se planteó la siguiente hipótesis: **“HDL y/o ApoA-I se uniría a membranas bacterianas alterando su estructura y aumentando su permeabilidad, produciendo de ésta manera su acción bactericida“**

Para poder obtener una respuesta a la interrogante planteada, nos propusimos los siguientes objetivos generales y específicos:

1. Caracterización de la interacción de HDL y ApoA-I con bacterias Gram negativas y Gram positivas.

- 1.1 Purificar HDL y ApoA-I de carpa.

- 1.2 Estudiar la unión de HDL y/o ApoA-I con bacterias.

- 1.3 Identificar posibles sitios de unión para HDL y/o ApoA-I con proteínas de membranas bacterianas.
2. Análisis del daño de la membrana bacteriana producido por HDL y/o ApoA-I.
    - 2.1 Análisis por microscopia electrónica de barrido de las membranas bacterianas incubadas con HDL y/o ApoA-I.
    - 2.2 Estudios de permeabilización de membranas bacterianas incubadas con HDL y/o ApoA-I.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 Reactivos

**Amersham Pharmacia Biotech:** Superdex 200 HR.

**BioRad Labs:** Affi-Gel<sup>®</sup>Blue-Gel, persulfato de amonio, Azul de Coomassie R-250, Azul de Coomassie G-250, Tween 20.

**Calbiochem:** Benzamidina.

**Dako Cytomation:** Medio de montaje para fluorescencia.

**Difco:** Medio Müeller Hinton.

**Equilab:** Etanol técnico, metanol técnico, isopropanol.

**Fluka-Chemica:** Cloruro de potasio

**Jackson Immuno Research:** Anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado con fosfatasa alcalina.

**J.T.Baker:** Acido clorhídrico, glicina, acrilamida.

**Merck, Darmstadt, Alemania:** Hidróxido de sodio, ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, cloruro de sodio, ácido acético, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), fluoruro de sulfonilfenilmetano (PMSF), metanol, etanol absoluto, fosfato monoácido de sodio, fosfato diácido de potasio, N,N'-metilenbisacrilamida, agar-agar granulado (libre de inhibidores), medio Caso, agar Mc Conkey y agar GSP (glutamato almidon rojo-fenol), dodecilsulfato de sodio (SDS), N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), glicerol 87%,  $\beta$ -mercaptoetanol, azida de sodio, glutaraldehido 25%.

**Millipore:** Microcon YM-10.

**Molecular Probes:** Anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado con Alexa Fluor 488, anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado con Alexa Fluor 594, Ioduro de propidio.

**Promega:** Nitroazul de tetrazolium (NBT), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP).

**Scharlau:** Urea.

**Sigma Chemical Co.:** BSA Fracción V liofilizada, heparina, azul de bromofenol, ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS), ácido amino caproico, poli-L-lisina., Melitina (M2272), Sephacryl S-200, LPS de *E. coli* O26:B6 (L8274), LPS-FITC (F3665).

**Sudelab:** Ácido acético técnico

**Winkler:** Estándar de peso molecular para geles de poliacrilamida, Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), carbonato de sodio.

### 3.1.2 Equipos

Agitador magnético Nuova Stirrer Thermolyne; autoclave Orthman; balanza SPO61 Scaltec; balanza analítica SBA33 Scaltec; espectrofotómetro UV-150-02 Shimadzu; fuente de poder BRL Modelo 500 Life Technologies, Inc.; fuente de poder EC250-90 E-C Apparatus Corporation; microcentrífuga M-24 Boeco, Germany; microondas Somela; micropipetas Gilson P-1000, P-200, P-100, P-20, P-10; micropipetas Eppendorf P-1000, P-100; micropipeta Nichipet Ex P-5000, P-2; microscopio óptico Zeiss Axioskop 2; cámara digital Nikon DXM 1200; transiluminador TFX-20 M Vilber Lourmat; pHmetro Orion 3 Star; Vortex mixer VM-300 de Arquimed; bomba de vacío Air Cadet Cole-Palmer Instrument Co.; sistema de filtración Advantec MFS, Inc; cromatógrafo de baja presión (FPLC) BioLogic LP (BioRad); colector de

fracciones modelo 2128 de BioRad; *Bio-dot* de BioRad; centrífuga refrigerada RC-5 Superspeed Du Pont Instruments Sorvall, rotor GSA; centrífuga Savant modelo SVC 100-H, trampa de condensación refrigerada modelo RT-100A, bomba de vacío Savant VP190, agitador Heidolph polimax 1040; estufa Memmert BE-300 D-91126 FRG Germany, Bio-Freezer Forma Scientific Inc. Model 8425 S/N 82612-291, cámara CCD modelo CA-1000/F Spectroline, biombo RB; Biolmager FX de BioRad, microscopio electrónico de barrido LEO 420 de Zeiss, IB-2 ion coater de Eiko engineering.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Animales de experimentación**

En todos los procedimientos experimentales se utilizaron carpas capturadas en el río Cayumapu (provincia de Valdivia). Los peces utilizados pesaban entre 1,5 y 2,0 Kg, los que se mantuvieron en cautiverio en una jaula sumergida a orillas del río Cau-Cau y se alimentaron *ad libitum*.

### **3.2.2 Purificación de proteínas**

#### **3.2.2.1 Obtención de muestras de plasma**

Los peces utilizados fueron anestesiados sumergiéndolos en baño de agua con benzocaina (BZ-20), a una concentración de 50 mg/L. Luego se procedió a extraer sangre por punción cardiaca utilizando una jeringa heparinizada de 10 mL. La sangre se centrifugó en centrífuga clínica a 2.000 r.p.m por 10 min. Al plasma así obtenido se le adicionó inhibidores de proteasas, PMSF 1 mM y Benzamidina 2 mM. Finalmente, se almacenó a -20°C debidamente rotulado hasta su utilización.

### 3.2.2.2 Purificación de HDL mediante cromatografía de afinidad

La purificación de HDL de carpa a partir de plasma se realizó de acuerdo a lo descrito por Amthauer y col. (1988; 1989). Para ello, se montó una columna de Affigel<sup>®</sup>Blue-Gel (1,5 cm x 24 cm, Vc = 42 mL), la cual se acopló a un cromatógrafo de baja presión BioLogic LP (BioRad). Este instrumento permitió monitorear automáticamente la absorbancia a 280 nm y las fracciones fueron colectadas usando un colector BioRad 2128.

La columna se equilibró con tampón citrato de sodio 50 mM, pH 6,5; NaCl 50 mM y EDTA 2,5 mM. Se aplicó 6 mL de plasma de carpa y se lavó la columna con tampón citrato de sodio 50 mM, pH 6,5; NaCl 350 mM y EDTA 2,5 mM, para eliminar proteínas contaminantes. La proteína retenida se eluyó con tampón de equilibrio conteniendo el fluoróforo ANS 0,06% (p/v) a un flujo de 1 mL por minuto, colectándose fracciones de 1 mL. Las fracciones obtenidas en la etapa de elución selectiva con ANS, que mostraron fluorescencia bajo luz ultravioleta, se reunieron en una sola. Esta fracción se dializó contra tampón citrato de sodio 1 mM, pH 6,5; EDTA 0,1 mM; durante aproximadamente 15 h, realizándose 3 cambios de tampón de diálisis con intervalos de tiempo de aproximadamente 5 h. A la HDL así obtenida se le adicionó los inhibidores de proteasas PMSF 1mM y benzamidina 2 mM. Finalmente, parte de la HDL obtenida fue concentrada aproximadamente a 1 mg/mL de proteínas y el resto utilizada para obtener ApoA-I, se concentró hasta alrededor de 5 mg/mL, utilizando un concentrador por medio de vacío (Speed vac).

### **3.2.2.3 Purificación de ApoA-I mediante cromatografía de filtración en gel**

A HDL purificada de plasma de carpa se le extrajo los lípidos con una mezcla de etanol-eter (3:2 v/v) a -20°C durante toda la noche. La proteína precipitada se recuperó por centrifugación a 6.000 x g durante 20 min a 4°C. Las lipoproteínas deslipidadas se resuspendieron en el mismo tampón de la columna pero sin urea y reextrajeron los lípidos por 4 h a -20°C, realizando el mismo procedimiento de deslipidación antes descrito. Finalmente, las lipoproteínas deslipidadas fueron resuspendidas en 1,5 mL de tampón Tris-HCl 10mM pH 8,7; EDTA 1 mM; Urea 8 M y fueron fraccionadas en una columna de Sephacryl S-200 (1,5 cm x 90 cm, Vc = 159 mL). La columna previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 10mM pH 8,7; EDTA 1 mM; Urea 8 M, se acopló a un cromatógrafo de baja presión BioLogic (BioRad), este instrumento permitió monitorear la absorbancia a 280 nm y las fracciones eluidas fueron colectadas automáticamente mediante un colector BioRad 2128. Para la etapa de elución se utilizó el mismo tampón antes mencionado, colectándose fracciones de 0,75 mL a un flujo de 0,25 mL/min. Las fracciones correspondientes de ApoA-I se reunieron en una sola y se dializaron contra tampón Tris-HCl 5mM, pH 8,7; EDTA 0,1 mM con el fin de eliminar la urea (3 cambios en 18 h). La purificación lograda a través del proceso antes descrito se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS.

### **3.2.3 Determinación de concentración de proteínas por el Método de Sedmak**

La base de este método es la misma que la del método de Bradford, con la excepción de que se realizan lecturas a dos longitudes de onda con el fin de obtener

una razón 595/465 nm que permite linearizar la curva entre concentraciones de 0,5 y 50 µg de proteína por tubo (Sedmak y Grossberg, 1977). Para este método se utiliza una solución Azul de Coomassie G-250 al 0,06% (p/v) en HCl 0,6 N. Dicha solución se filtró y se diluyó con HCl 0,6 N hasta obtener una absorbancia de 1,3-1,5 a 465 nm, que corresponde al máximo de absorbancia para la forma leuco (libre) del colorante. Se realizó una curva de calibración, con un rango de concentración de albúmina entre 0 a 1 mg/mL. El volumen de muestra utilizado fue de 25 µL, el cual se diluyó hasta 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  $A_{595}/A_{465}$  de las lecturas obtenidas, restándole la razón  $A_{595}/A_{465}$  del blanco de reactivo.

#### **3.2.4 Marcaje de HDL con RITC**

Se utilizó HDL a una concentración de 1 mg/mL, la cual fue previamente dializada, en cámara fría, contra PBS pH 8,0 realizando 3 de cambios de tampón en 24 h. A 1 mL de HDL a una concentración de 1mg/mL se le adicionó 2 µL de isotiocianato de rodamina (RITC) 50 mg/mL en dimetilformamida, se agitó vigorosamente en vortex y se incubó por 2 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). La reacción se detuvo utilizando 2 µL de glicina 1 M e incubando por 5 min a temperatura ambiente. El exceso de RITC libre se eliminó mediante diálisis contra tampón fosfato de potasio 50mM pH 8,0. Las alícuotas de HDL-RITC se almacenaron a -20°C protegidas de la luz hasta su utilización.

### **3.2.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia y *Western blot***

#### **3.2.5.1 SDS-PAGE**

Las proteínas aisladas fueron separadas por SDS-PAGE al 12,5% según lo descrito por Laemmli (1970). Se utilizó un gel separador 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). Una vez polimerizado, se preparó un gel espaciador sobre el gel anterior con la siguiente composición: 4% (p/v) de poliacrilamida, tampón Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1% (p/v); persulfato de amonio y TEMED en iguales concentraciones que en el gel separador.

Las proteínas, fueron solubilizadas en tampón de muestra constituido por: Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; SDS 1% (p/v); glicerol 10% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol 0,05% (p/v) (como marcador del frente iónico), para facilitar la denaturación, las muestras fueron calentadas a 95°C por 5 min. Posteriormente las muestras se hicieron migrar con una corriente constante de 25 mA hasta que el frente iónico alcanzó el final del gel. 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 con agitación orbital en una solución de isopropanol 25% (v/v) y ácido acético 10% (v/v), durante 1 hora 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 hora. Para desteñir el gel, este se hirvió en H<sub>2</sub>O durante 10 min en horno microondas a 100% de potencia o se destiño utilizando una solución de

desteñido compuesta por una mezcla de metanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v) hasta la aparición de las bandas.

### **3.2.5.2 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). El gel separador se equilibró en tampón de electrotransferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, 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 min en H<sub>2</sub>O destilada. 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). Tanto los papeles filtros como la membrana fueron cortados con las mismas dimensiones del gel.

La transferencia se llevó a cabo durante 45 min, aplicando una corriente constante de 2,5 mA/cm<sup>2</sup>. Finalizada la transferencia, se dejó secar la membrana a temperatura ambiente sobre papel absorbente; el gel se fijó y tñó como se describe en 3.2.5.1 para comprobar que la transferencia de proteínas desde el gel fue completa.

### 3.2.5.3 *Western Blot*

Para la inmunodetección, las membranas fueron bloqueadas con solución "Blotto" (leche descremada 5% (p/v), PBS, Tween 20 0,05% [v/v]) por 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Luego se incubó con suero anti-ApoA-I de carpa, preparado en conejo, diluido 1/50.000 en solución Blotto por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas, fueron lavadas 3 veces por 3 min cada vez, con Blotto. Luego se incubó por 1 h con el segundo anticuerpo, suero anti-IgG de conejo preparado en cabra y conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1/2.500) en la misma solución en que se diluyó el primero, la incubación se realizó a temperatura ambiente con agitación constante por 1 h. El exceso de segundo anticuerpo se eliminó realizando 3 lavados por 3 min con solución PBS y se equilibró la membrana con solución tampón para fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM) por 5 min. La actividad de fosfatasa alcalina se reveló a temperatura ambiente con los sustratos NBT (0,33 mg/mL) y BCIP (0,17 mg/mL) diluïdos en solución tampón para fosfatasa alcalina, el tiempo de revelado fue hasta la aparición de bandas de proteínas inmunoreactivas.

Finalmente la reacción se detuvo lavando las membranas en una solución de EDTA 5 mM por 5 min. Finalmente se lavaron las membranas con agua destilada, dejándose secar a temperatura ambiente en papel absorbente.

### 3.2.6. Cultivos bacterianos

Las bacterias almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  fueron primero cultivadas en medio sólido agar M-H, GSP, Mc Conkey y LBA, aptos para el crecimiento de *Planococcus citreus* (NCIMB 1493), *Pseudomonas sp.*, *Yersinia ruckeri*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . El cultivo se realizó durante toda la noche, a  $37^{\circ}\text{C}$  para *E. coli* DH5 $\alpha$  y *Bacillus subtilis*, y a temperatura ambiente (aproximadamente  $20^{\circ}\text{C}$ ) 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* DH5 $\alpha$ , *Bacillus subtilis*, *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 1:300 con medio fresco y se dejó incubando hasta fase exponencial. Luego se centrifugaron las bacterias a  $14.100 \times g$ , y se lavaron con PBS estéril para finalmente ser resuspendidas en las concentraciones adecuadas de trabajo.

### 3.2.7 Ensayos de unión de HDL y ApoA-I a bacterias

#### 3.2.7.1 Inmunofluorescencia

Se utilizó *E. coli* DH5 $\alpha$  en crecimiento exponencial ( $\text{DO}_{590} \sim 0,7-1,0$ ). Se tomó 1 mL de este cultivo y se centrifugó a  $14.100 \times g$  por 5 min, el sedimento fue lavado tres veces con PBS estéril y resuspendido en PBS a una densidad óptica de 1. Luego, 50  $\mu\text{L}$  de esta suspensión se incubó con HDL ( $1\mu\text{M}$ ) o ApoA-I ( $5,2 \mu\text{M}$ ) (o los tampones respectivos como control) en un volumen final de 65  $\mu\text{L}$  a  $37^{\circ}\text{C}$  y 100 r.p.m. por 6 h. Transcurrido el tiempo, las incubaciones se centrifugaron a  $8.300 \times g$  por 5 min, se

lavarón los sedimentos dos veces con PBS (400  $\mu$ L cada lavado) y se resuspendieron en 50  $\mu$ L de PBS. Se sembraron 15  $\mu$ L de cada suspensión en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina (0,011% [v/v]) y se dejaron secar a 37°C por 30 min. Posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos, utilizando BSA 1% en PBS, este proceso se realizó a 4°C por 2 h en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo se lavó una vez para remover el exceso de BSA y eliminar las bacterias sueltas. Posteriormente se incubó con antisero anti-ApoA-I preparado en conejo, diluido 1/5.000 en BSA 1% en PBS (100  $\mu$ L) por 2,5 h a 4°C, en cámara húmeda. Luego el portaobjeto se lavó 3 veces por 5 min cada vez con BSA 1% en PBS (100  $\mu$ L por lavado). Finalmente se incubó con anticuerpo Anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488, diluido 1/1.000 en PBS (30  $\mu$ L), por 4 h a 4°C, en cámara húmeda y oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación se lavó 3 veces con BSA 1% en PBS (100  $\mu$ L por lavado), se dejó secar a 37°C y en oscuridad. Finalmente, sobre la preparación se adicionó medio de montaje para fluorescencia y se montó un cubreobjeto. Las preparaciones fueron selladas con cútex por las orillas y guardadas a 4°C en oscuridad hasta que fuese posible su visualización. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioscop 2.

### **3.2.7.2 Ensayos de competencia**

Se utilizaron bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  en etapa de crecimiento exponencial ( $DO_{590} \sim 0,7-1,0$ ). Se tomó 1 mL de este cultivo y se centrifugó a 14.100 x g. por 5 min, el sedimento fue lavado tres veces con PBS y resuspendido en PBS a una densidad óptica de 1. Cien microlitros de esta suspensión fue incubada con HDL-RITC (2,5 $\mu$ g) o

con una mezcla de HDL-RITC/HDL sin marcar (1:13) por 1 h a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron lavadas exhaustivamente con PBS y fijadas en un portaobjeto tratado con poli-L-lisina (0,011% [v/v]). Finalmente fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia y sobre ellas un cubreobjeto. Las muestras fueron visualizadas utilizando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioscop 2.

### **3.2.8 Ensayos de integridad de membranas bacterianas**

#### **3.2.8.1 Ensayos de permeabilización**

Las células bacterianas poseen membranas semipermeables, las cuales posibilitan el mantener un equilibrio iónico y de metabolitos entre el medio externo y el interno. Este equilibrio puede ser alterado por debilitamiento o destrucción de las membranas celulares. Existen ciertas moléculas que son capaces de demostrar pérdida de la integridad de la membrana (McFeters y col., 1995). En nuestro caso se utilizó como marcador de permeabilización yoduro de propidio, fluoróforo que tiene la propiedad de entrar a las bacterias solo cuando la membrana se encuentra dañada. Una vez en el citoplasma, el yoduro de propidio se une al DNA bacteriano, estado en el cual muestra una fuerte fluorescencia (Trevors, 2003; Roth y col., 1997, Laflamme y col., 2004). Para estos ensayos se utilizó *E. coli* DH5 $\alpha$  en crecimiento exponencial ( $DO_{590} \sim 0.7-1.0$ ). Se tomó 1 mL de este cultivo y se centrifugó a 14.100 x g. por 5 min, el sedimento fue lavado tres veces con PBS. Una alícuota equivalente a 1 DO de esta suspensión se centrifugó nuevamente a 14.100 x g. por 5 min y se incubó utilizando HDL a una concentración de 0,4 mg/mL. Junto con esto se adicionó yoduro de propidio a una concentración de 4  $\mu$ g/mL (6  $\mu$ M) y se ajustó a 1 mL utilizando PBS. El control se

realizó utilizando solo el tampón en que se encontraba la proteína. Como control de permeabilización en los primeros ensayos con bacterias Gram negativas se utilizó una solución que contenía Tritón X-100 1,25% (v/v) y EDTA 50 mM. Para el caso de Gram positivos se utilizó una solución de Tritón X-100 0,1% (v/v). En los ensayos posteriores se utilizó el péptido antimicrobiano Melitina a una concentración de 50 $\mu$ M en PBS, que corresponde a la concentración mínima bactericida (MBC). Las diferentes muestras se incubaron a 37°C o temperatura ambiente según corresponda y 150 r.p.m en agitador termoregulado. Las lecturas de fluorescencia fueron medidas en un fluorímetro Perkin-Elmer LS50, sin control de temperatura, utilizando el software Fluorescence Data Manager (FLDM).

***Condiciones de fluorescencia (para ioduro de propidio)***

$\lambda_{exc}$ : 532nm Slit exc:10.0

$\lambda_{em}$ : 600nm Slit em: 20.0

**3.2.8.2 Análisis del daño de la membrana bacteriana por microscopia electrónica de barrido**

Este análisis se realizó utilizando microscopia electrónica de barrido fundamentalmente como describe Mangoni y col. (2004). Para ello se incubaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  en cultivo exponencial (1 DO/mL), las cuales fueron tratadas con HDL (2,1  $\mu$ M), ApoA-I (5,2  $\mu$ M), o los tampones respectivos como control, como se describe en 3.2.7.1. Las muestras se incubaron a 37°C por 1, 3, 6 y 24 h con agitación de 150 r.p.m. Posteriormente se tomaron 5  $\mu$ L de estas suspensiones, y se fijaron (en cámara húmeda) por 2 h utilizando glutaraldehido al 2,5% en tampón fosfato de sodio

0,1 M pH 7,4 sobre cubreobjetos redondos tratados previamente con poli-L-lisina (0,011% [v/v]). Las muestras se lavaron exhaustivamente con tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4 y luego fueron deshidratadas por un gradiente de etanol (30, 50, 70, 90 100% x 2). Posteriormente los cubreobjetos fueron montados en un porta-muestras de aluminio utilizando un adhesivo en base a carbono y sombreados con una mezcla de oro-paladio, con el fin de hacer las muestras conductoras para poder ser visualizadas. Finalmente, las muestras fueron observadas utilizando un microscopio electrónico de barrido marca LEO modelo 420 de Zeiss.

### **3.2.9 Ensayos de unión de HDL a fracciones bacterianas**

#### **3.2.9.1 Preparación de fracciones bacterianas**

##### **3.2.9.1.1 Extracción de proteínas periféricas (tratamiento con bicarbonato)**

La obtención de proteínas periféricas se basó en un protocolo descrito por Santander (2002) para células eucariontes. *E. coli* DH5 $\alpha$  se crecieron toda la noche a 37 °C en medio Luria-Bertani (LB) y luego subcultivadas en medio fresco (1/50) a 37 °C hasta alcanzar una DO<sub>590</sub> de (0.7-1.0). Se tomó 1 mL de este cultivo y se centrifugó a 14.100 x g por 5 min, el sedimento fue lavado tres veces con PBS. El sedimento finalmente fue resuspendido en carbonato de sodio 50 mM pH 11,5, EDTA 10 mM y mantenido a 4°C por 20 min, para permitir la liberación de las proteínas periféricas. Finalmente se rescató el sobrenadante que contiene las proteínas periféricas y el sedimento de bacterias sin proteínas periféricas fue lavado tres veces con PBS y ajustado a una DO de 1.

### **3.2.9.1.2 Tratamiento de bacterias con Tripsina (desnudamiento)**

Se trataron bacterias como describe Wentzel y col., 2001. Mediante este tratamiento con tripsina se puede eliminar la presencia de proteínas externas en bacterias. Para esto se crecieron *E. coli* DH5 $\alpha$  toda la noche a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) y luego subcultivadas en medio fresco (1/50) a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>590</sub> de (0,7-1,0). Se tomó 1 mL de este cultivo y se centrifugó a 14.100 x g por 5 min, el sedimento fue lavado tres veces con Tris-HCl 10 mM pH 8,0. La suspensión bacteriana fue ajustada a 10 DO<sub>590</sub> e incubada por 20 min a 37°C con Tripsina a una concentración final de 50  $\mu$ g/mL. Para remover la Tripsina luego del tratamiento, las bacterias fueron lavadas tres veces con PBS y resuspendidas a 1 DO final.

### **3.2.9.1.3 Formación de protoplastos a partir de bacterias Gram negativas (*E. coli* DH5 $\alpha$ )**

Los protoplastos, en bacterias Gram negativas, corresponden a bacterias que no poseen su membrana externa. El tratamiento consiste en desestabilizar la pared bacteriana, mediante EDTA y posteriormente degradar el peptidoglicano que une la membrana externa con la interna, utilizando Lisozima (Weiss, 1976; Dai y col., 2005). Se crecieron *E. coli* DH5 $\alpha$  toda la noche a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) y luego subcultivadas en medio fresco (1/50) a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>590</sub> de (0,7-1,0). Se tomó 1 mL de este cultivo y se centrifugó a 14.100 x g por 5 min, el sedimento fue lavado tres veces con Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y resuspendido en 1 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0; sacarosa 0,5 M. A ésta suspensión se le adicionó EDTA 0,1 M pH 8,0 lentamente por un periodo de 20 min hasta alcanzar una concentración final de 0,01 M.

La suspensión bacteriana fue agitada a 100 r.p.m y 37°C por un período de 20 min adicionales para comenzar a remover la membrana externa. Luego la suspensión bacteriana fue centrifugada a 14.100 x g. por 5 min, a 4°C, y lavada dos veces con 1 mL de tampón SMM (sacarosa 0,5 M; malato de sodio 20 mM pH 6,5; MgCl<sub>2</sub> 20 mM). Luego las bacterias fueron resuspendidas en tampón SMM, al cual se le adicionó Lisozima a una concentración final de 1 mg/mL. Las bacterias fueron agitadas por 1 h a 100-150 r.p.m. y 37°C, para permitir la hidrólisis del peptidoglicano. Nuevamente se volvió a centrifugar en las condiciones descritas y se extrajo el sobrenadante que contenía la **membrana externa**. Finalmente las bacterias fueron resuspendidas en 1 mL de tampón SMM.

### 3.2.9.2 Purificación de anticuerpos anti-ApoA-I

Con el propósito de minimizar las interacciones inespecíficas que se producen entre el antisuero y las proteínas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se procedió a purificar anticuerpos antiApoA-I desde un antisuero contra esta proteína. Para ello se realizó un gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes al 12,5% (SDS-PAGE) el cual se dividió en dos partes. En A se separaron 16  $\mu$ g de HDL por pocillo (8 pocillos) y en B se cargó un pocillo con 3  $\mu$ g de HDL. La parte A del gel fue electrotransferida y la B fue teñida con Azul de Coomassie como se describe en 3.2.5.1, con el propósito de utilizarlo como patrón de migración de ApoA-I. Una vez finalizada la transferencia se cortó la parte de la membrana en que migró ApoA-I y se bloqueó con solución que contenía leche descremada 5% (p/v), TBS pH 7,4, Tween 20 0,05% (v/v) por 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Transcurrido el tiempo de bloqueo, se lavó la

membrana con TBS pH 7,4; Tween 20 0,05% (v/v). Luego se incubó con suero anti-ApoA-I de carpa, preparado en conejo, diluido 1/100 en solución de bloqueo por 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana, fue lavada 3 veces por 5 min cada vez, con TBS pH 7,4. Luego se incubó con 1 mL de glicina acidificada (100 mM glicina pH 2,5) durante 10 min con agitación constante, con el fin de eluir los anticuerpos unidos a ApoA-I. La solución fue recuperada y traspasada a un tubo eppendorf al cual se le adicionó 100  $\mu$ L de Tris-HCl 1M pH 8,0 con el fin de neutralizar y ajustar el pH a 7,0. El eluato fue centrifugado a 14.100 x g por 5 min con el fin de eliminar cualquier precipitado que pudiese haber estado presente. Finalmente se le adicionó Azida de sodio y BSA para alcanzar una concentración de 5 mM y 1 mg/mL, respectivamente.

### **3.2.9.3 *Ligand blot* de HDL a fracciones bacterianas**

Las distintas preparaciones de bacterias se inmovilizaron en membranas de nitrocelulosa (1 cm<sup>2</sup>), utilizando un equipo *Bio-dot* (BioRad) conectado a un sistema de vacío, y luego fueron bloqueadas por 1 h con agitación constante con Tris-HCl 25 mM pH 7,5; Tween 20 2% (v/v). Posteriormente las membranas fueron incubadas por 1 h a temperatura ambiente con HDL a una concentración final de 0,1 mg/mL diluida en Tris-HCl 25 mM pH 7,5. Las membranas fueron lavadas abundantemente, 3 veces por 10 min cada vez, con solución de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05% [v/v]) y luego incubadas con los anticuerpos purificados anti-ApoA-I de carpa preparados en conejo (1/1.000) por 1 h en solución de bloqueo. Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas nuevamente se lavaron como se describió anteriormente. Luego se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con

fosfatasa alcalina (1/2.500) por 1 h diluido en solución de bloqueo. Luego de lavar 3 veces con solución de lavado, se equilibró durante 10 min con tampón fosfatasa (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 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 a temperatura ambiente.

A pesar de la purificación de anticuerpos anti-ApoA-I (descrita 3.2.9.2) y la utilización de un anticuerpo secundario comercial, ambos presentaron reacción cruzada con las bacterias, por lo cual debieron ser preabsorbidos con un extracto bacteriano previo a su utilización. Como controles se utilizaron membranas con las distintas fracciones, pero sin incubar con HDL, seguido de la inmunodetección de ApoA-I.

#### **3.2.9.4 Interacción de proteínas con LPS-FITC**

Estos ensayos se realizaron utilizando cromatografías en columna Superdex 200 HR basado en un protocolo establecido por De Hass y col., 2000, con leves modificaciones. Mediante el uso de esta cromatografía se pueden separar moléculas de acuerdo a su peso molecular y determinar interacciones por diferencias en los tiempos de retención. La columna (1cm x 38 cm Vc = 30 mL) fue acoplada a un cromatógrafo de baja presión, BioLogic LP de BioRad, y equilibrada con Tris-HCl 25 mM pH 7,5; NaCl 100 mM; EDTA 0,1 mM. Las muestras de plasma (2,6 mg) y HDL (220 µg) fueron incubadas con LPS-FITC (2,5 µg) y ajustadas a un volumen de 500 µL con tampón de equilibrio. Luego fueron incubadas por 1 ó 18 h según corresponda, cargadas en la columna mediante un loop inyector de 400 µL, y eluidas utilizando el mismo tampón de equilibrio. El perfil de elución se obtuvo por lectura de la absorbancia a 280 nm

utilizando una celda de flujo. El perfil de fluorescencia se obtuvo por lectura de las fracciones de 0,5 mL en las siguientes condiciones:  $\lambda$  excitación: 490 nm,  $\lambda$  emisión: 512 nm. Previo a la lectura de fluorescencia a las fracciones se les agregó deoxicolato de sodio para alcanzar una concentración de 0,1% (p/v), con el fin de disminuir el apagamiento de la fluorescencia para obtener lecturas estables y reproducibles.

Las muestras colectadas de la cromatografía fueron concentradas en un primer paso utilizando un sistema de concentración al vacío (Speed-Vac) y luego un sistema de concentración por filtración (Microcon YM-10) que además permite eliminar el exceso de sales presentes en la muestra. Posteriormente las muestras fueron cuantificadas y analizadas por SDS-PAGE y *Western blot*.

### **3.2.10 Análisis bioinformático del extremo C-terminal de ApoA-I**

Los análisis de alineamiento múltiple se realizaron con el programa ClustalW (1.83) disponible en <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> (Thompson y col., 1994). Las siguientes secuencias de ApoA-I fueron obtenidas de la base de datos Swiss-Prot/TrEMBL: *Oncorhynchus mykiss* (O57523), *Brachydanio rerio* (O42363), *Gallus gallus* (P08250), *Homo sapiens* (P02647).

Las predicciones de *Helical wheel* de Melitina (P01502) y de los extremos carboxilos terminales de las distintas proteínas fueron realizados utilizando el programa bioinformático ANTHEPROT V6.0, disponible en <http://antheprot-pbil.ibcp.fr/> (Deleage y col., 2001)

La predicción de la estructura 3D de ApoA-I de carpa se realizó en el servidor ExPaSy (<http://www.expasy.org/>), utilizando como modelo la estructura tridimensional de ApoA-I humano.

Los análisis de las estructuras tridimensionales del extremo carboxilo terminal de ApoA-I de carpa y de Melitina (2MLT), se realizaron utilizando el programa PyMOL 0.99rc6 disponible en <http://pymol.sourceforge.net/>.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análisis bioinformático del extremo C-terminal de ApoA-I de carpa

Está demostrado que en mamíferos el extremo carboxilo terminal de la apolipoproteína ApoA-I, es esencial para una mayor eficiencia en la interacción de estas proteínas con bicapas lipídicas (Pownall y col., 1979; Holvoet y col., 1996; Laccotripe y col., 1997; López, 2006), etapa que jugaría un papel central en uno de los mecanismos de transporte reverso de colesterol y que podría ser clave para la actividad antimicrobiana de éstas proteínas. El criterio utilizado para determinar el extremo C-terminal en este estudio se basó en lo publicado por Brouillette y col., (2001), el cual describe repeticiones internas de 11 y 22 aminoácidos en la secuencia de ApoA-I humana, siendo éstas capaces de formar 10  $\alpha$ -hélices. Estos antecedentes estructurales son conservados en las distintas especies. López (2006) encontró por análisis bioinformático que ApoA-I de carpa a pesar de presentar baja homología con su contraparte de mamíferos, también exhibe las repeticiones de 11 y 22 aminoácidos flanqueados por residuos de prolina. Esto indica que las  $\alpha$ -hélices presentes en ApoA-I en otras especies pueden ser extrapoladas a la secuencia de carpa por análisis bioinformático, como alineamiento de secuencia. Junto con esto, la estructura cristalina determinada para ApoA-I humana libre de lípidos, por Ajees y col., (2006), indica que las hélices 9 y 10 forman el extremo carboxilo terminal. Por lo tanto, del alineamiento de secuencia de las múltiples especies se extrapolaron aquellas que alinean con las hélices 9 y 10 de ApoA-I humana. En la **Figura 1**, se aprecia el resultado del alineamiento para ApoA-I de distintas especies, en el cual se destacan en amarillo las

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

ApoA-I_C.carpio      MMRFVVLALTVLLAG-CQARFLQDQPPS---QLEHLKSAQLYADQMRQS 46
ApoA-I_O.mykiss     -MKFLALALTIILLAGTQAFPMQADAPS---QLEHVKAALSMTYIAQVKLT 46
ApoA-I_D.rerio      -MKFVALALTLILLALGSQANLFDQADAPT---QLEHYKAAALVYLNQVKDQ 46
ApoA-I_G.gallus     -MRGVLVTLAVLFLTGTQARSFWQHDEP-QTPLDRIRDMVDVYLETVKAS 48
ApoA-I_H.sapiens    -MKA AVLTLAVLFLTGSQARHFQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDS 49

ApoA-I_C.carpio      AHKTLTHLDDTEF-ADYKEFLGQSVDNLHGYPQNGFQAIT---PIGDQV 91
ApoA-I_O.mykiss     AQRSIDLDDTEY-KEYRMQLTQSLDNLQYADATSQSLAPYSEAFGTQL 95
ApoA-I_D.rerio      AEKALDNLDDGTDY-EQYKQLQLSESLTKLQEQYATTSQALTPLYAETISTQL 95
ApoA-I_G.gallus     GKDAIAQFESSAVGKQLDLKLDNLDTLSAAAALREDMAPYYKEVREMW 98
ApoA-I_H.sapiens    GRDYVSQFESSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLRQLGPPVTEQFWDNL 99

ApoA-I_C.carpio      LEATKDTREKLVKDVVEELRKKIEPMRAELRQVLEKHLQEQYRDELKPFVVEE 141
ApoA-I_O.mykiss     TDATAAVRAEVMKDVVEELRSQLEPKRAELKEVLDKHI DEYRKKLEPLIKE 145
ApoA-I_D.rerio      MENTKQLRERVMTDVEDIRSKLEPHRAELYTALQKHI DEYREKLEPVVFE 145
ApoA-I_G.gallus     LKDTEALRAELTKDLEEVKIRPFLDQFSAKWTEELEQYRQLTPVAQE 148
ApoA-I_H.sapiens    ERETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEMELYRQKVEPLRAE 149

ApoA-I_C.carpio      YLTKHQKFL EEMRIKLEPVVKSLEKFGPNWEETKSKLMPILEAVREKVA 191
ApoA-I_O.mykiss     HIELRRTEMEAFRAKMEPIVEELRAKVAINVEETKTKLMPIVEIVRAKLT 195
ApoA-I_D.rerio      YSALNRQNAEQLRAKLEPLMDDIRKAFESNIEETKSKVVPVMEAVRTKLT 195
ApoA-I_G.gallus     LKELTKQKVELMQAKLT PVAAEARDRLRGHVEELRKNLAPYSDELRLQKLS 198
ApoA-I_H.sapiens    LQEGARQKLEHLEQEKLSPLGEEMRDRARAHVDAIRTHIAPYSDELRLQRLA 199

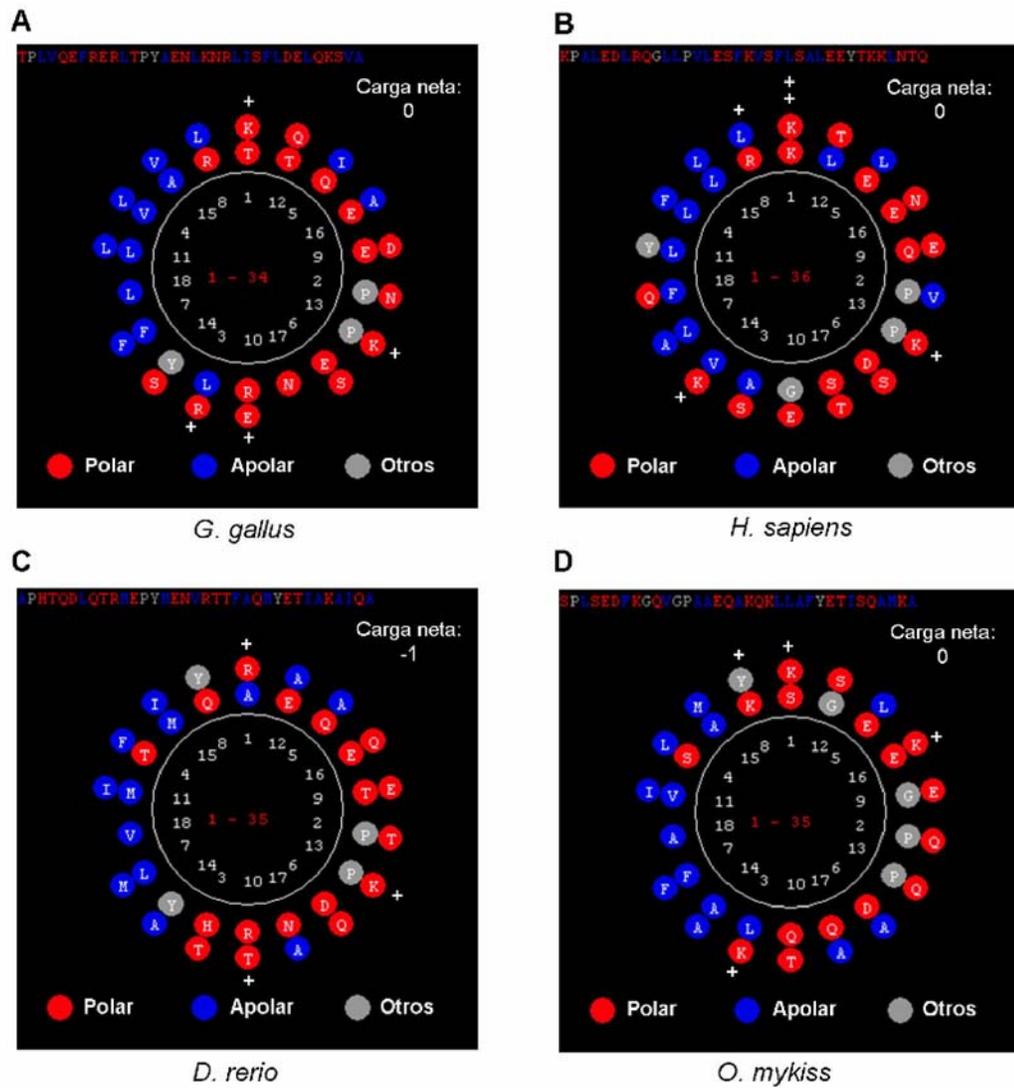
ApoA-I_C.carpio      EHLQDLKKLLEPYMQDYREQMEKGAQEFQSVK--SGELRKKMNELGEEV 239
ApoA-I_O.mykiss     ERLEELRTLAAPYAEYKQMIKAVGEVREKVSPLSEDFKGVGPAAEQA 245
ApoA-I_D.rerio      ERLEDLRTMAAPYAEYKQLVKAVEEAREKIA PHTQDLQTRMEPYMENV 245
ApoA-I_G.gallus     QKLEEIREKGIPOASEYQAKVMEQLSNLREKMTPLVQEFRERLTPYAENL 248
ApoA-I_H.sapiens    ARLEALKENGGARLA EYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESF 249

ApoA-I_C.carpio      KPHFEAIFAAVQKAIYKP 257
ApoA-I_O.mykiss     KQKLLAFYETISQAMKA 262
ApoA-I_D.rerio      RTTFAQMYETIAKAIQA 262
ApoA-I_G.gallus     KNRLISFLDELQKSVAA 264
ApoA-I_H.sapiens    KVSFLSAL EYTKKLNTO 267

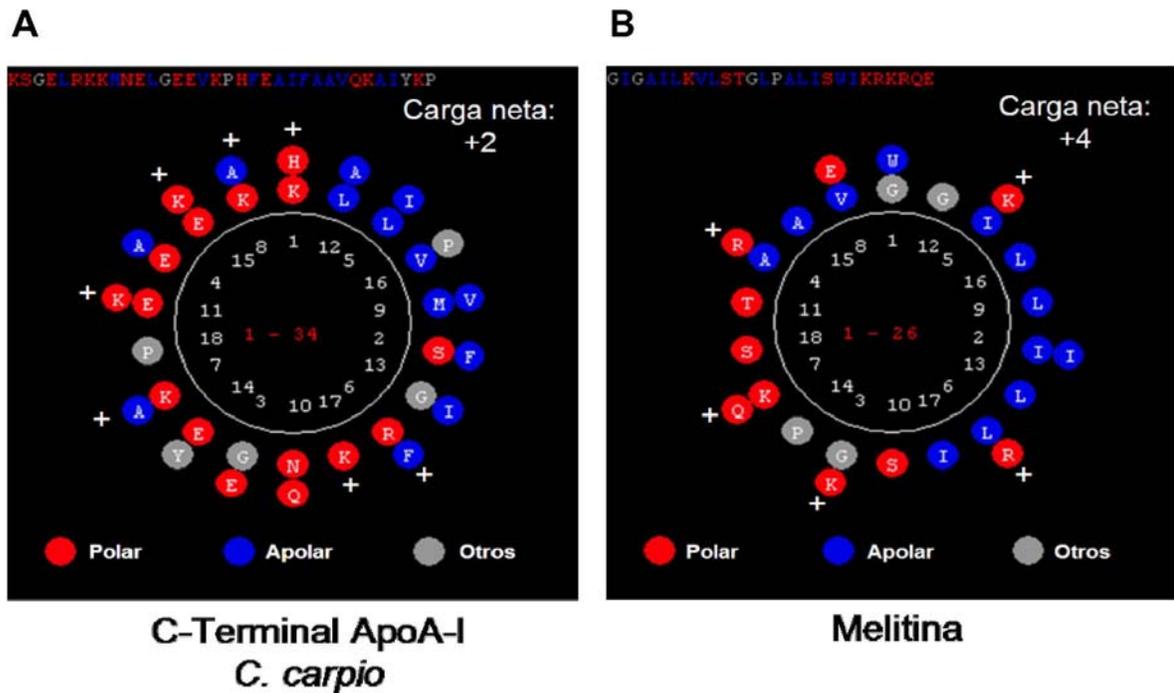
```

**Figura 1: Alineamiento de ApoA-I de distintas especies.** Se alinearon secuencias de ApoA-I y se extrapolaron a estas especies las secuencias correspondientes a las hélices 9 y 10 de ApoA-I humano. Se destacan en rojo los residuos de prolina conservados en todas las especies analizadas y en amarillo los extremos carboxilos terminales extrapolados a las distintas especies.

secuencias C-terminal que forman las hélices 9 y 10, para ApoA-I humano y que fueron extrapoladas a las otras especies. Finalmente para las secuencias obtenidas del alineamiento se realizaron análisis de *Helical wheel*. Este análisis consiste en una representación de la disposición de los residuos formando una  $\alpha$ -hélice con 3,6 residuos por vuelta. Se realizaron estos análisis para el extremo C-terminal de ApoA-I de diversas especies, entre ellas algunas alejadas evolutivamente (pollo y humano) y otras más cercanas como pez cebra y trucha arcoiris. Estos análisis muestran una disposición anfipática de los residuos aminoacídicos dentro de las  $\alpha$ -hélices, encontrándose los residuos polares (en rojo) en una cara de la  $\alpha$ -hélice y los apolares en la cara opuesta (en azul), adicionalmente se obtuvo la carga neta para éstos péptidos, resultando que la carga neta es 0 para pollo, humano, y trucha (**Figura 2A, B y D**), y -1 para pez cebra (**Figura 2C**). El análisis realizado para el péptido C-terminal de ApoA-I de carpa (**Figura 3A**), muestra esencialmente la misma disposición anfipática de los residuos aminoacídicos encontrada en las otras especies, sin embargo se destaca el carácter catiónico de este péptido, el cual presenta una carga neta de +2. Las condiciones particulares que presenta el extremo C-terminal de ApoA-I de carpa, tanto en su estructura secundaria como su carga neta, también se encuentran en un grupo de péptidos antimicrobianos ampliamente estudiados. Como ejemplo, se analizó por *Helical wheel* un péptido antimicrobiano como Melitina, el cual muestra una disposición de residuos muy similar a la descrita para el C-terminal de ApoA-I y una carga neta de +4 (**Figura 3B**).



**Figura 2:** Representación en *Helical wheel* del extremo C-terminal de ApoA-I de pollo (*G. gallus*), humano (*H. sapiens*), pez cebra (*D. rerio*) y trucha arcoiris (*O. mykiss*). Las proyecciones se realizaron mediante el programa ANTHEPROT V6.0, tomando las secuencias descritas en la **Figura 1**. En **A**: se muestra la proyección realizada para ApoA-I de *G. gallus*. **B**: *H. sapiens*. **C**: *D. rerio*. **D**: *O. mykiss*. En todos los casos se aprecia la disposición anfipática de los residuos y baja presencia de residuos cargados positivamente.



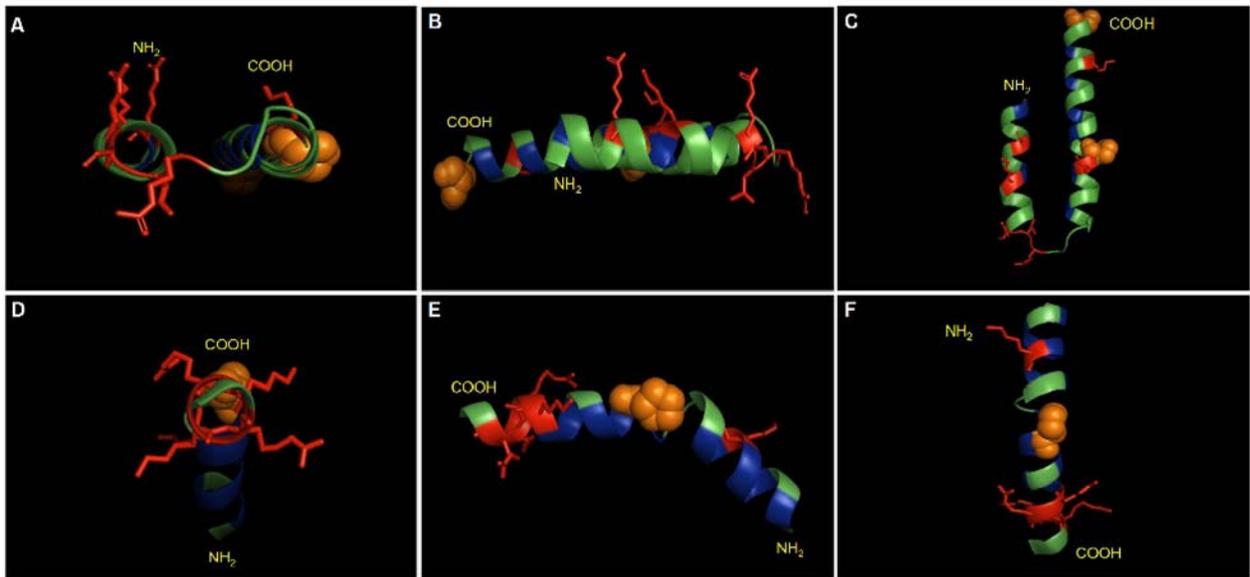
**Figura 3: Representación en *Helical wheel* del extremo C-terminal de ApoA-I de carpa y Melitina.** La proyección se realizó mediante el programa ANTHEPROT V6.0, tomando la secuencia descrita en la **Figura 1** para el C-terminal de ApoA-I de carpa. En **A** se muestra la disposición anfipática de los residuos, además de una gran cantidad de cargas positivas presentes en el extremo C-terminal de ApoA-I. En **B** se muestra la proyección en *Helical wheel* del péptido antimicrobiano Melitina, el cual exhibe una clara disposición anfipática. Además presenta varios residuos cargados positivamente, lo cual le otorga una carga neta de +4.

En las **Figuras 4A, B y C**, se visualizan distintas vistas de un modelo 3D del péptido C-terminal de ApoA-I de carpa, el cual muestra la estructura  $\alpha$ -helicoidal de este segmento y la disposición de los residuos básicos (en rojo) principalmente en una de las caras del péptido. Además se destaca en azul los residuos apolares, los cuales se encuentran principalmente inter-hélices, las cuales deben abrirse para adoptar la clásica forma de herradura, como describe Ajees y col. (2006), y que serían esenciales para aumentar la afinidad de ésta proteína por lípidos. En la misma Figura, en **D, E y F**, muestra la estructura 3D de Melitina, donde se aprecia claramente su estructura  $\alpha$ -helicoidal, destacándose la presencia de un residuo de prolina (naranja) que produce un quiebre en su estructura. Además, los residuos básicos (en rojo) se agrupan principalmente en un extremo del péptido, esto favorece la inserción del péptido y posterior desestabilización de las bicapas lipídicas.

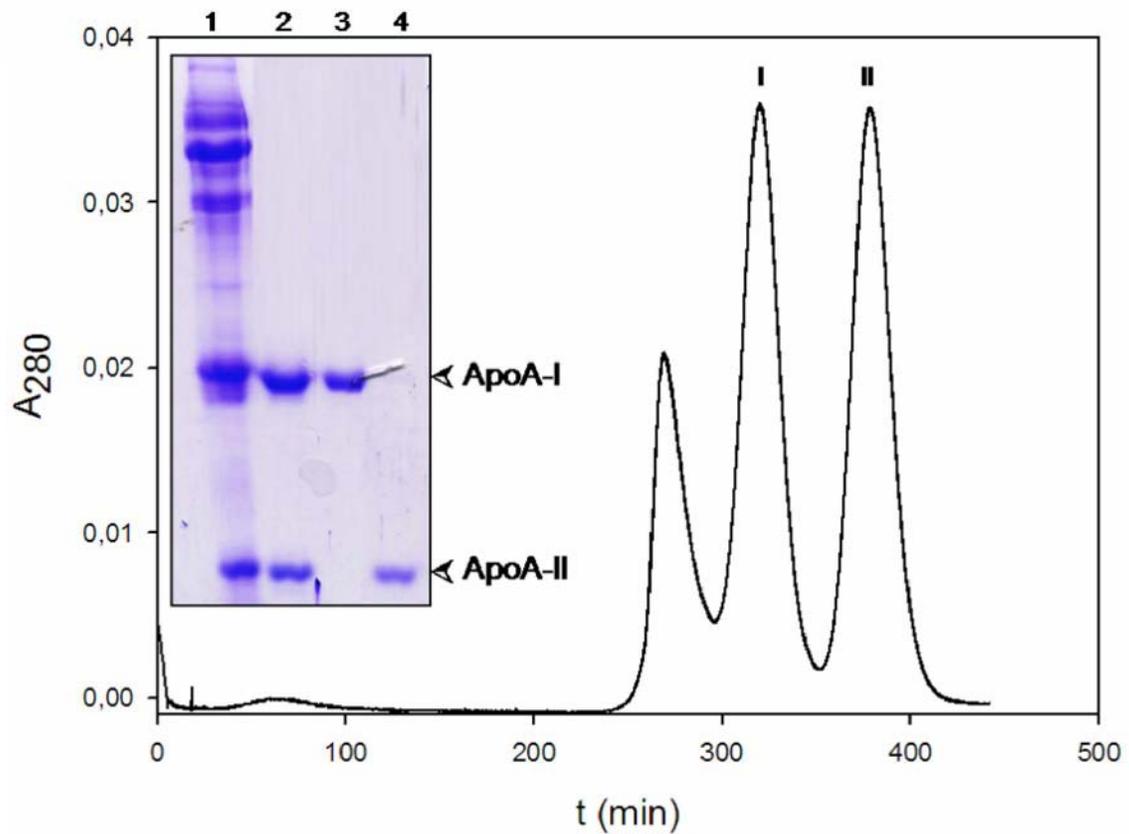
#### **4.2 Purificación de HDL y apolipoproteínas A-I y A-II**

La purificación de HDL de carpa se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, protocolo establecido por Amthauer (1988, 1989).

La purificación de apolipoproteína A-I se realizó por cromatografía de filtración en gel, Sephacryl S-200, en condiciones denaturantes como se describe en Materiales y Métodos. El perfil de elución obtenido se muestra en la **Figura 5**, en el cual se aprecian 3 picos principales, que de acuerdo a análisis previos los de interés son **I y II**, los cuales corresponden a ApoA-I y ApoA-II, respectivamente.



**Figura 4: Modelo tridimensional del extremo C-terminal de ApoA-I de carpa y de Melitina.** Se modeló, por homología con ApoA-I humano, el extremo C-terminal de ApoA-I de carpa mediante predicción con “Swiss Model”. El modelo obtenido fue visualizado con el programa PyMOL 0.99rc6 (<http://pymol.sourceforge.net/>). En **A**, **B** y **C** se muestran distintas vistas del extremo C-terminal de ApoA-I de carpa. En **C**, **D** y **E**, se observa desde distintos ángulos el modelo 3D del péptido antimicrobiano Melitina, el cual presenta características estructurales similares al C-terminal de ApoA-I. En ambos casos se resaltan en rojo los residuos con carga positiva, en naranja las prolina y en azul los residuos apolares.



**Figura 5: Purificación de ApoA-I por cromatografía de filtración en columna Sephacryl S-200.** En el perfil de elución los picos I y II corresponden a ApoA-I y ApoA-II, respectivamente. En el inserto se muestra el análisis de los picos I y II mediante SDS-PAGE al 12,5 %. **Surco 1:** plasma de carpa (10  $\mu$ g), **surcos 2, 3 y 4** a HDL de carpa, pico I y pico II, respectivamente.

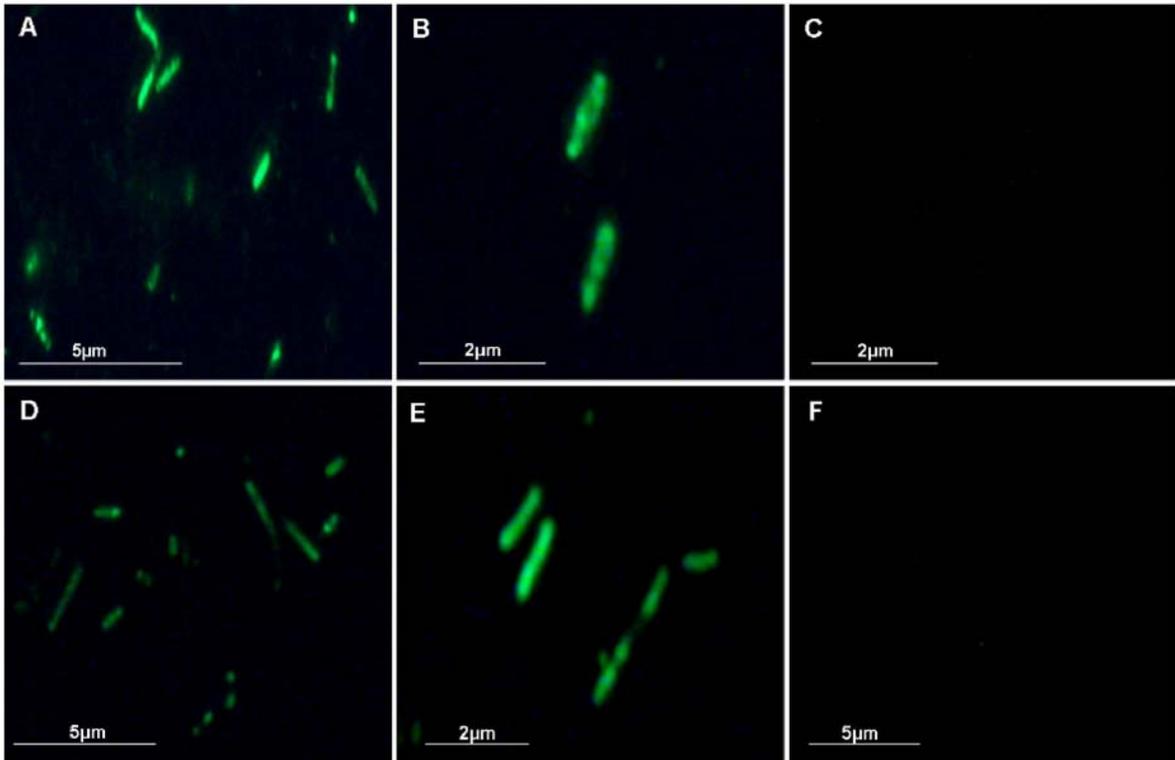
El inserto de la **Figura 5**, muestra el análisis de las fracciones por SDS-PAGE al 12,5%. Se puede observar claramente que el pico **I** corresponde a ApoA-I purificada (Inserto **Figura 5**, surco **3**) y el pico **II** de la cromatografía a ApoA-II (Inserto **Figura 5**, surco **4**).

### 4.3 Estudio de la unión de HDL y ApoA-I con bacterias

Para poder dilucidar un posible mecanismo de acción antimicrobiano para HDL y/o ApoA-I, es necesario establecer, como primera etapa, si existe una interacción directa entre éstas proteínas y las bacterias.

Para estudiar la unión, se incubaron bacterias con HDL y mediante inmunofluorescencia, utilizando un antisuero contra ApoA-I y un anticuerpo secundario fluorescente, se logró inmunodetectar HDL unida a *E. coli* DH5 $\alpha$  (**Figura 6A y B**). Estos resultados demuestran que existe una unión de la partícula de HDL a la superficie bacteriana.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que ApoA-I posee actividad antimicrobiana *per se*, por lo tanto para demostrar que esta proteína por si sola estaría interaccionando con bacterias, se incubaron *E. coli* DH5 $\alpha$  con ApoA-I. El resultado de la inmunodetección muestra que existe unión de ApoA-I con la superficie bacteriana (**Figura 6D y E**). De estos resultados se puede concluir que existe una interacción directa de HDL y ApoA-I sobre bacterias. Además la acción antimicrobiana no solo podría ser producida por la partícula de HDL, sino que también por ApoA-I. Al menos en humanos se ha logrado demostrar que una pequeña fracción de ApoA-I se encuentra libre en el plasma por lo tanto no asociada a HDL (Liang y col., 1994).

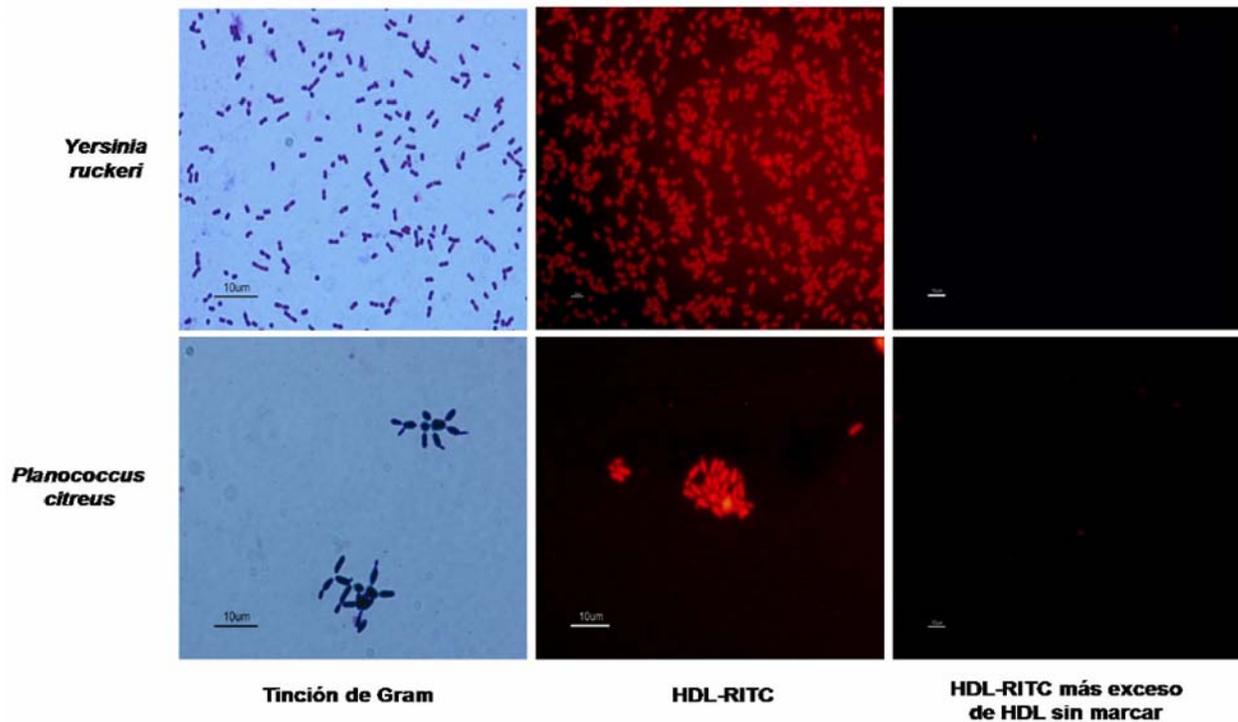


**Figura 6: Inmunodetección de HDL y ApoA-I de carpa unida a *E. coli* DH5 $\alpha$ .** Las bacterias se incubaron con las respectivas proteínas por 6 h a 37°C. Luego de lavar tres veces, la proteína unida se detectó utilizando un antisuero anti-ApoA-I preparado en conejo (1/5.000) y revelado con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (1/1.000). **A y B:** *E. coli* DH5 $\alpha$  incubada con HDL (1  $\mu$ M). **C:** control sin HDL. **D y E:** *E. coli* DH5 $\alpha$  incubada con ApoA-I (5,2  $\mu$ M). **F:** control sin ApoA-I. Los resultados demuestran tanto la unión de la partícula de HDL y de ApoA-I purificada.

Con el fin de demostrar que la unión de HDL a bacterias es específica, se realizaron ensayos de competencia. Para ello se preparó una HDL conjugada con el fluoróforo RITC. Al incubar *Yersinia ruckeri* o *Planococcus citreus* con HDL-RITC, se observa una intensa fluorescencia indicando la unión de la proteína a la superficie bacteriana (**Figura 7**). Cuando se incubaron bacterias con HDL-RITC y un exceso de HDL sin marcar se puede apreciar el desplazamiento de la unión de HDL-RITC. Resultados similares se obtienen con *E. coli* DH5 $\alpha$  (datos no mostrados). Estos resultados indican que HDL se uniría de manera específica, a las cepas bacterianas estudiadas.

#### **4.4 Estudios de permeabilización de membranas bacterianas incubadas con HDL y ApoA-I**

Los estudios se realizaron utilizando el fluoróforo yoduro de propidio que tiene la propiedad de unirse al DNA en bacterias que han sido permeabilizadas (McFeters y col., 1995; Trevors, 2003). En un primer momento, para bacterias Gram negativas se utilizó como control de permeabilización una solución que contenía Tritón X-100 al 1,25% (v/v) y EDTA 50 mM, siguiendo el protocolo de incubación descrito en Materiales y Métodos.



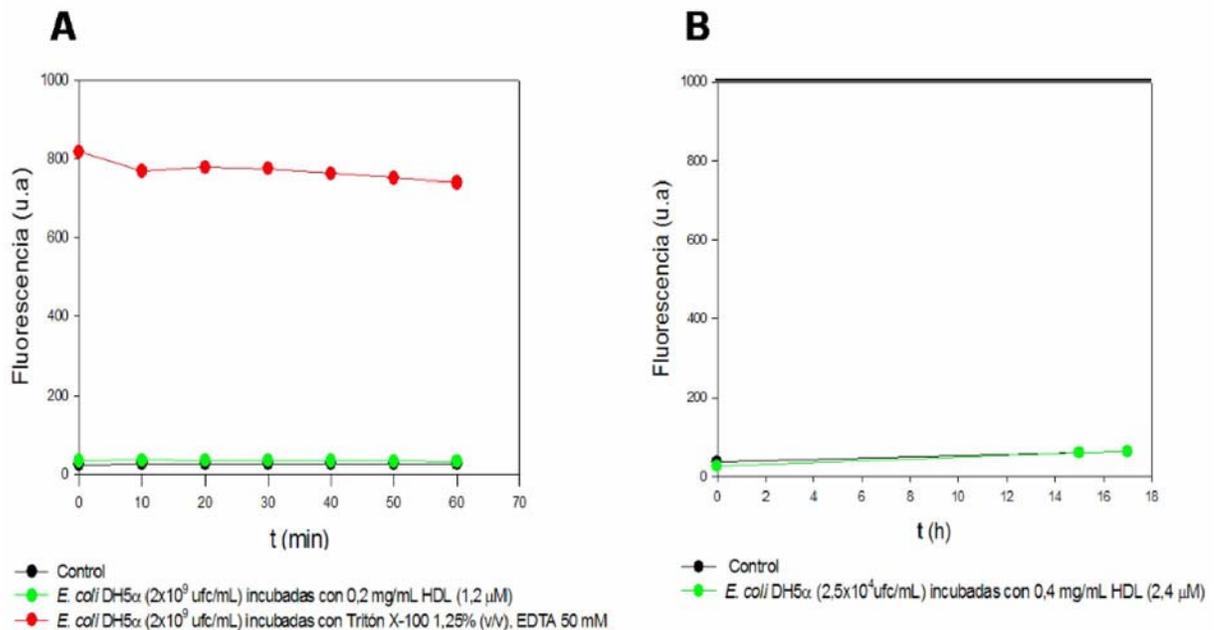
**Figura 7: Unión específica de HDL sobre bacterias Gram negativas y positivas.** El ensayo de competencia se realizó incubando los distintos tipos bacterianos con una mezcla de ambas proteínas en una razón 1/13 de HDL-RITC/HDL durante 1 h y posteriormente tratadas como se describe en Materiales y Métodos.

Los experimentos realizados con *E. coli* DH5 $\alpha$  mostraron que HDL no es capaz de producir permeabilización de las membranas a tiempos cortos de incubación (**Figura 8A**). Asimismo, cuando se incrementó considerablemente el tiempo de incubación (17 h), tampoco fue observable un aumento en la permeabilidad bacteriana (**Figura 8B**).

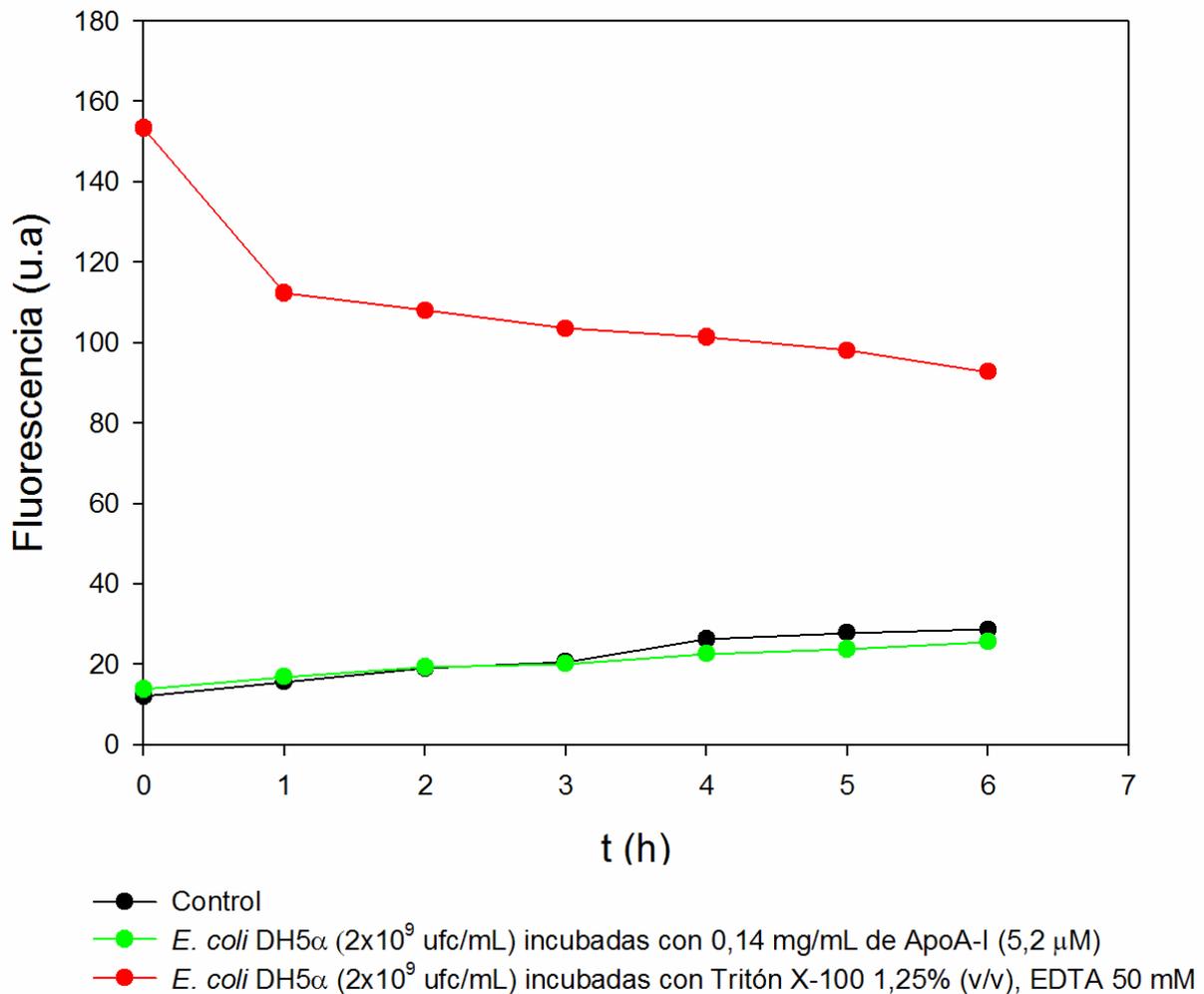
Así también se evaluó la posibilidad que ApoA-I, principal constituyente proteico de HDL y que además posee actividad antimicrobiana, sea capaz de producir permeabilización. En la **Figura 9** se muestra que, al igual que HDL, ApoA-I no es capaz de permeabilizar *E. coli* DH5 $\alpha$ .

A pesar que bajo estas condiciones, HDL y ApoA-I no fueron capaces de permeabilizar bacterias Gram negativas, se decidió probar si HDL era capaz de producir permeabilización sobre bacterias Gram positivas. De acuerdo a lo que se muestra en la **Figura 10**, HDL tampoco es capaz de permeabilizar la membrana de *B. subtilis*, en contraste a lo obtenido con una solución Tritón X-100 0,1% (v/v). Estos resultados indican que HDL no es capaz de permeabilizar bacterias, bajo las condiciones ensayadas.

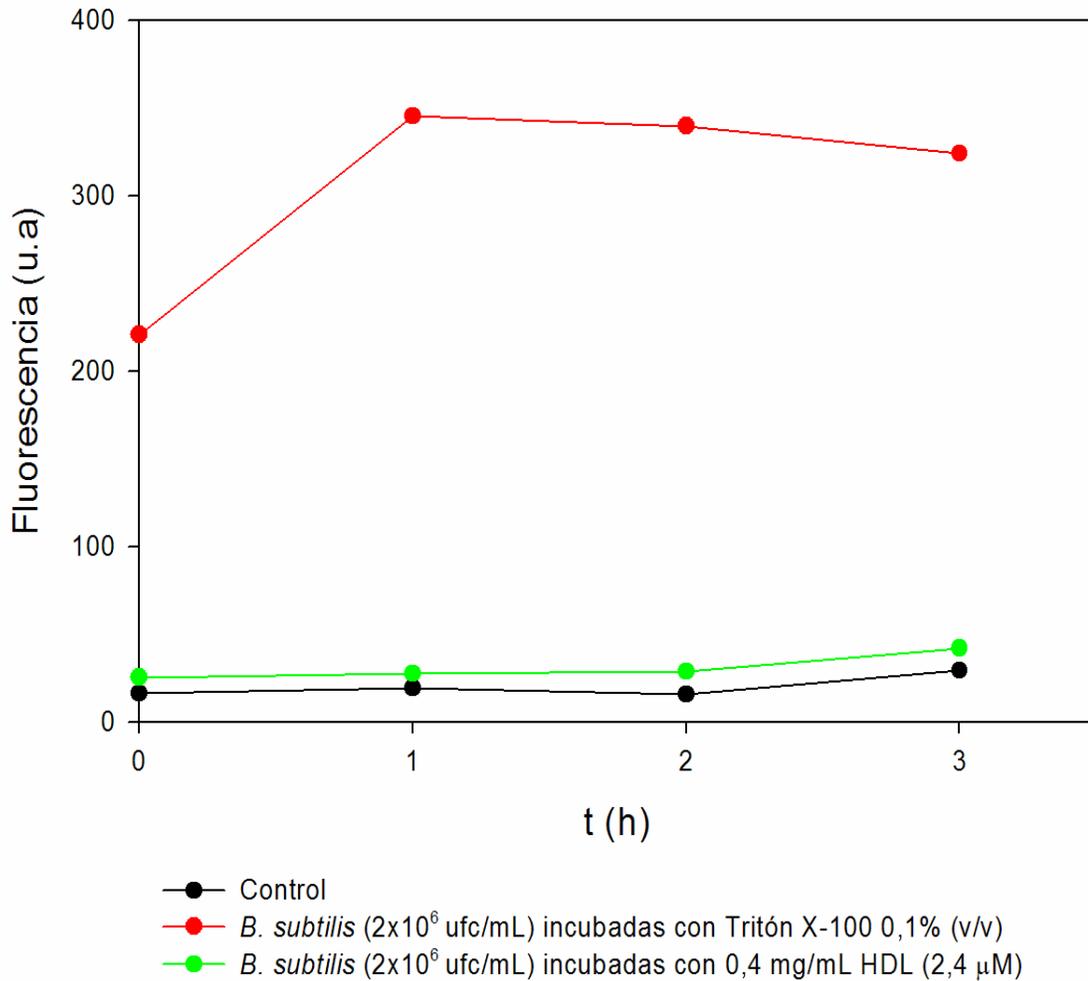
Los resultados obtenidos anteriormente se realizaron utilizando Tritón X-100, el cual no es el agente más apropiado para ser utilizado como control de permeabilización. Por ello se decidió utilizar Melitina, un péptido antimicrobiano aislado del veneno de abejas (*Apis mellifera*), el cual posee reconocida actividad antimicrobiana y presenta un mecanismo de acción que involucra permeabilización de la membrana bacteriana (Dempsey, 1990; Papo y Shai, 2003).



**Figura 8: Análisis de permeabilización de *E. coli* DH5 $\alpha$  por HDL.** Las incubaciones fueron realizadas a 37°C y utilizando ioduro de propidio como indicador de permeabilidad y bacterias tratadas con Tritón X-100 y EDTA como control de permeabilización. En **A** se muestra el nulo efecto que produce HDL (1,2  $\mu$ M) (●), en comparación a Tritón X-100 1,25% (v/v) y EDTA 50 mM (●) en 60 min de incubación. En negro (●) se muestra el control, el cual contiene bacterias y ioduro de propidio. **B** muestra que HDL (2,4  $\mu$ M) (●) no es capaz de permeabilizar incluso al aumentar el tiempo de incubación a 17 h. En negro (●) se muestra el control, el cual solo contiene bacterias y ioduro de propidio. En este caso la escala fue ajustada al máximo de permeabilización alcanzado en **A**.



**Figura 9: Análisis de permeabilización de *E. coli* DH5α por ApoA-I.** Las incubaciones fueron realizadas a 37°C y utilizando yoduro de propidio como indicador de permeabilidad y bacterias tratadas con Tritón X-100 y EDTA como control de permeabilización. Se muestra el nulo efecto que produce ApoA-I (●), en comparación a Tritón X-100 1,25% (v/v) y EDTA 50 mM (●) durante 6 h de incubación. En negro (●) se muestra el control, el cual contiene solo bacterias y yoduro de propidio.

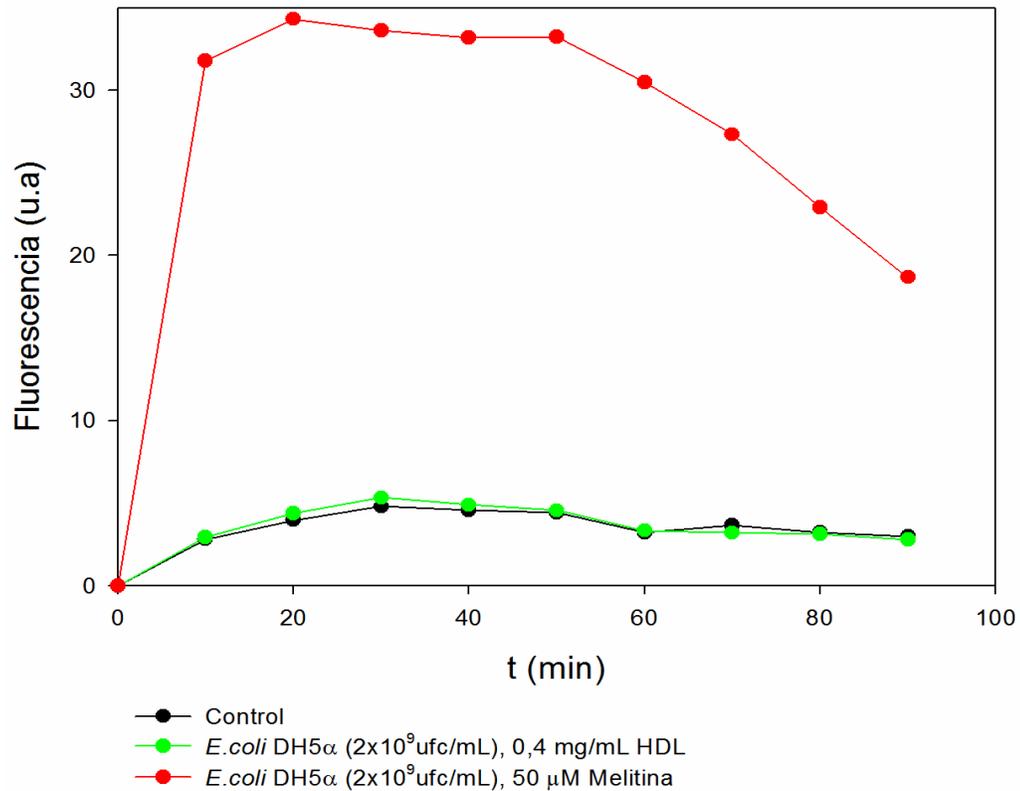


**Figura 10: Análisis de permeabilización de *B. subtilis* por HDL.** Las incubaciones fueron realizadas a 37°C y utilizando ioduro de propidio como indicador de permeabilidad y bacterias tratadas con Tritón X-100 y EDTA como control de permeabilización. Se muestra el nulo efecto que produce HDL (●), en comparación a Tritón X-100 0,1% (v/v) (●) durante 3 h de incubación. En negro (●) se muestra el control, el cual solo contiene bacterias y ioduro de propidio.

En la **Figura 11** se observa que HDL no es capaz de permeabilizar la membrana de bacterias Gram negativas, como *E. coli* DH5 $\alpha$ . En contraste se observa el efecto que produce Melitina sobre la membrana de esta bacteria, permeabilizándola y produciendo un gran aumento en la fluorescencia. Estos resultados confirman los datos obtenidos anteriormente, comprobando que HDL y ApoA-I no son capaces de permeabilizar bacterias en las condiciones ensayadas.

#### **4.5 Análisis del daño de la membrana bacteriana producido por HDL y ApoA-I**

La gran mayoría de los péptidos y proteínas antimicrobianas que se han descrito hasta el momento, presentan un mecanismo de acción basado fundamentalmente en un ataque sobre la membrana blanco. Este efecto producido sobre la membrana es responsable a su vez de inducir alteraciones morfológicas, hecho que ha sido ampliamente documentado (Matsuzaki y col., 1997b; Chen y col., 2003; Mangoni y col., 2004; Brogden, 2005). El tiempo requerido para producir estas alteraciones, es variable dependiendo del péptido utilizado. Existen algunos que son capaces de inducir alteraciones en solo minutos, y otros requieren horas, incluso manteniendo un efecto posterior a la muerte bacteriana. Los posibles efectos de HDL y ApoA-I sobre la membrana bacteriana no han sido estudiados. Por ello se evaluó si HDL y ApoA-I aislada, son capaces de causar un efecto similar al que producen los péptidos antimicrobianos. Este efecto se caracteriza por inducir una disrupción visible de la membrana y la formación de ampollas en su superficie.



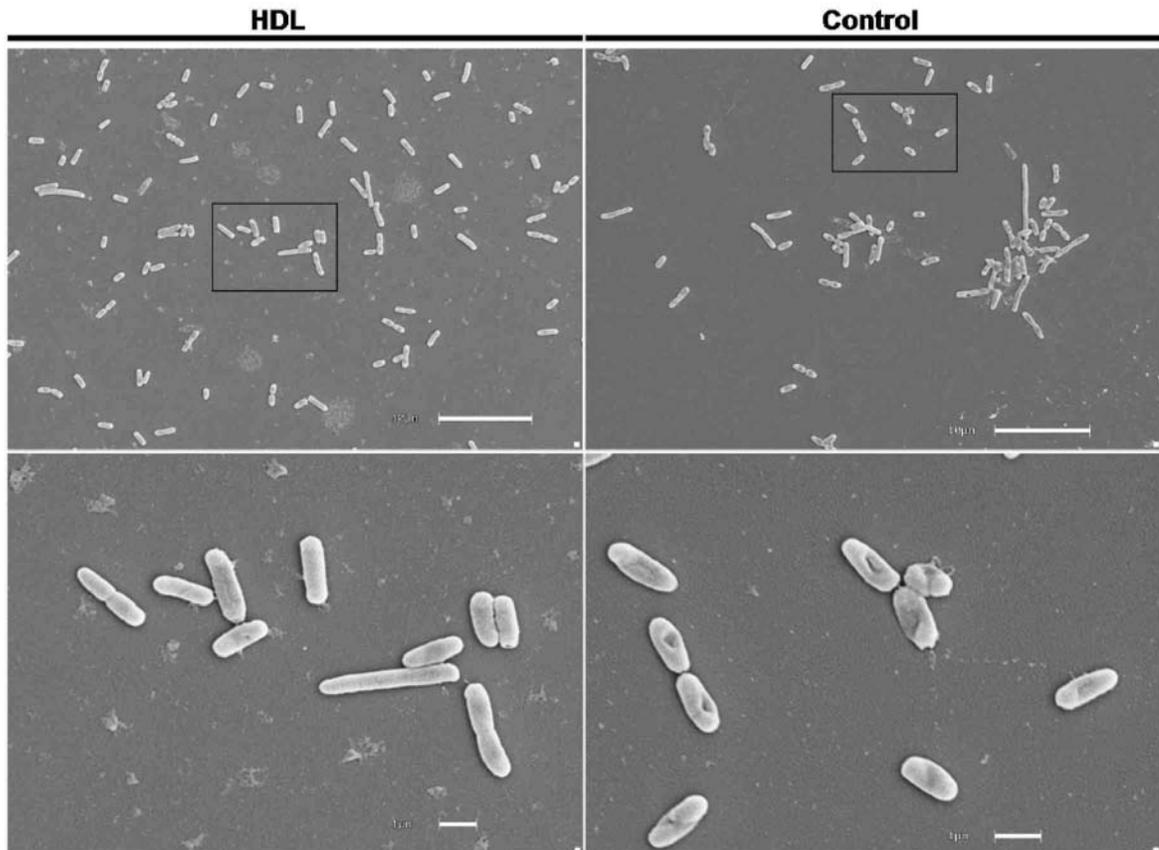
**Figura 11: Análisis de permeabilización de *E. coli* DH5 $\alpha$  por HDL.** Las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente y utilizando ioduro de propidio como indicador de permeabilidad. Estos ensayos muestran el nulo efecto que produce HDL (●), en comparación con Melitina (●), péptido antimicrobiano capaz de permeabilizar bacterias. En negro (●) se muestra el control, el cual contiene bacterias y ioduro de propidio.

Con el fin de determinar algún posible efecto de HDL o ApoA-I sobre la morfología bacteriana, se realizaron incubaciones de *E. coli* DH5 $\alpha$  con las respectivas proteínas y luego se procedió a evaluar su morfología mediante microscopía electrónica de barrido, herramienta clásicamente utilizada para evaluar este tipo de efecto.

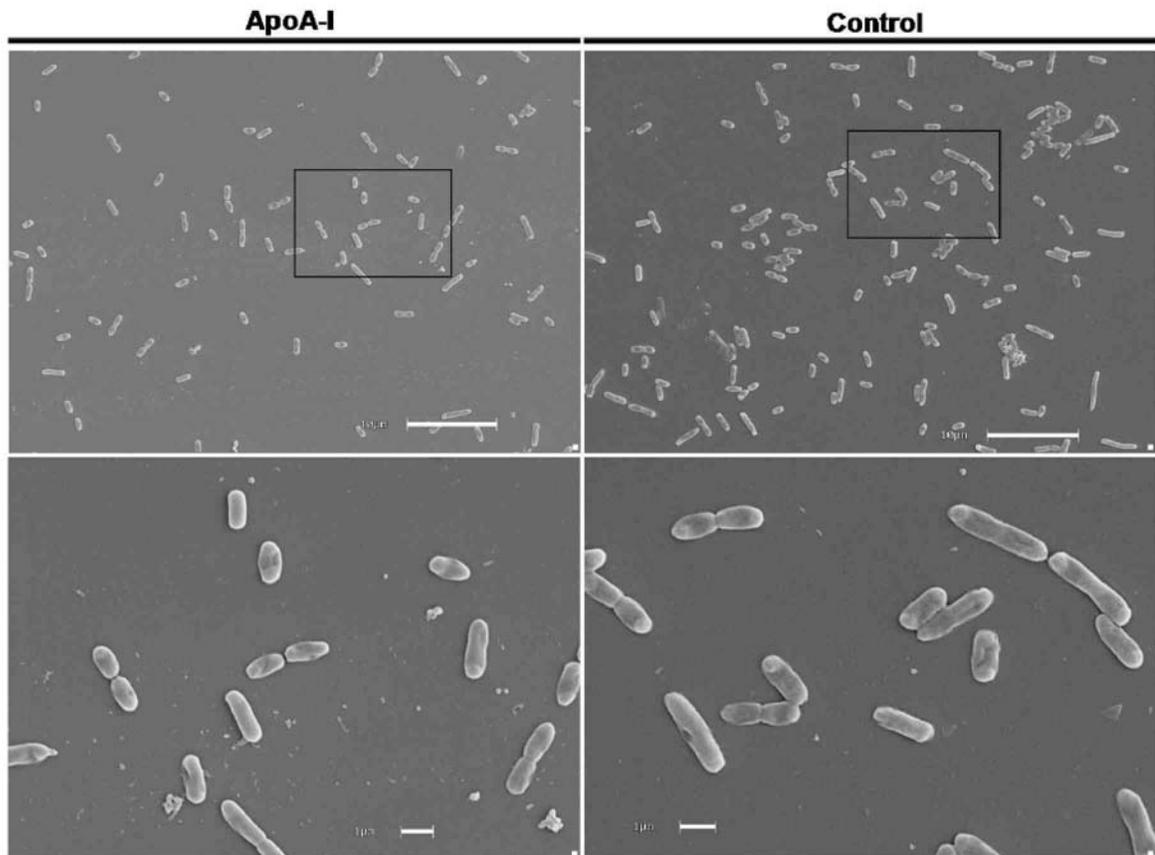
En las **Figuras 12 y 13**, se muestra de forma evidente que tanto HDL como ApoA-I no son capaces de inducir alteraciones morfológicas evidentes en una hora de incubación con las respectivas proteínas.

Teniendo en cuenta que el tiempo puede ser un factor importante para poder ver de forma clara un efecto, se realizaron ensayos utilizando las mismas cantidades de ambas proteínas, y un tiempo de incubación de 6 h, tiempo descrito por Concha y col., (2003) en los cuales se obtienen resultados reproducibles de un efecto de HDL sobre la viabilidad bacteriana. En las **Figuras 14 y 15**, se pueden ver los resultados de las incubaciones, en los cuales tampoco se pudo apreciar alteraciones evidentes en la morfología bacteriana, independiente de cual fue la proteína en estudio. Sin embargo, resulta claro el efecto de HDL en la proliferación bacteriana, ya que tanto en bacterias control como bacterias tratadas con HDL, se utilizaron las mismas cantidades en un comienzo del ensayo y se tomaron iguales volúmenes cuando se trataron las muestras. En el caso de ApoA-I, al menos en los campos estudiados, no se aprecia una diferencia considerable en cantidad de bacterias entre el control y las tratadas.

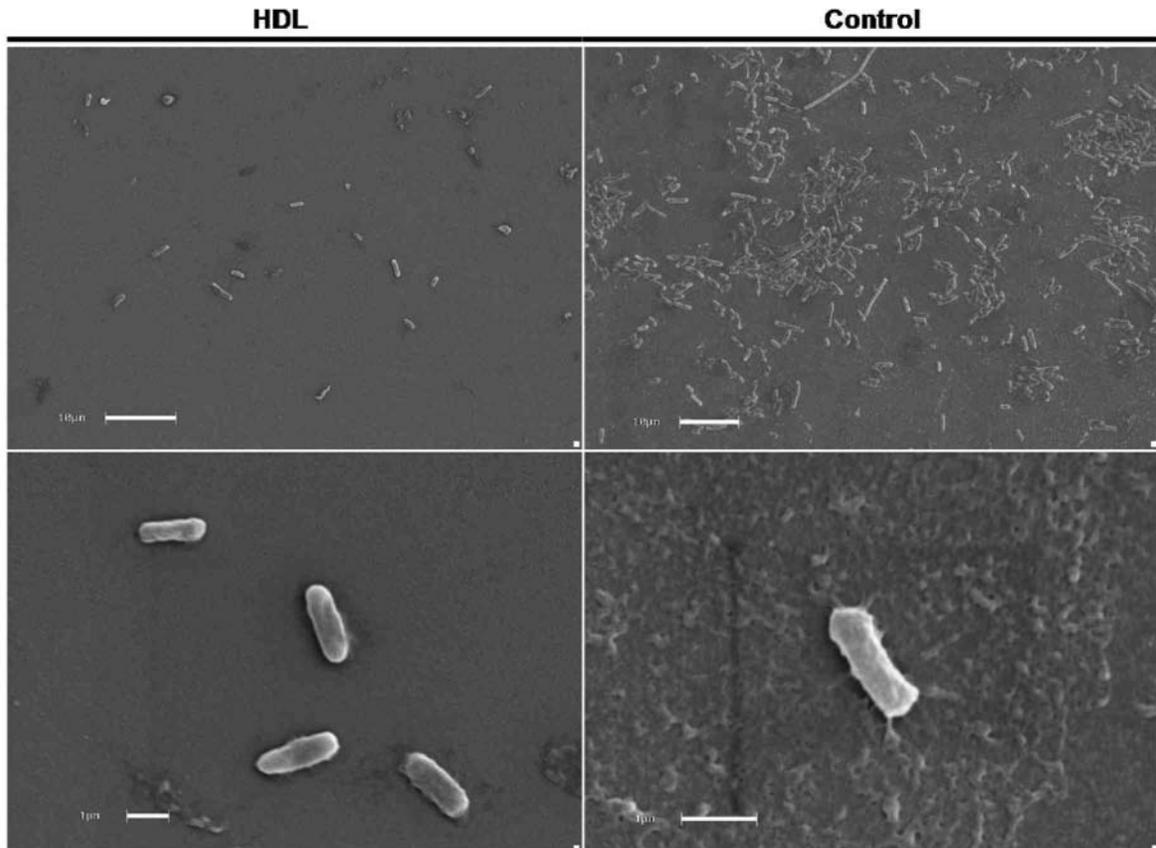
El mismo ensayo se realizó utilizando un tiempo de incubación de 24 h, en el cual tampoco se logró apreciar alteraciones morfológicas evidentes en las bacterias (datos no mostrados).



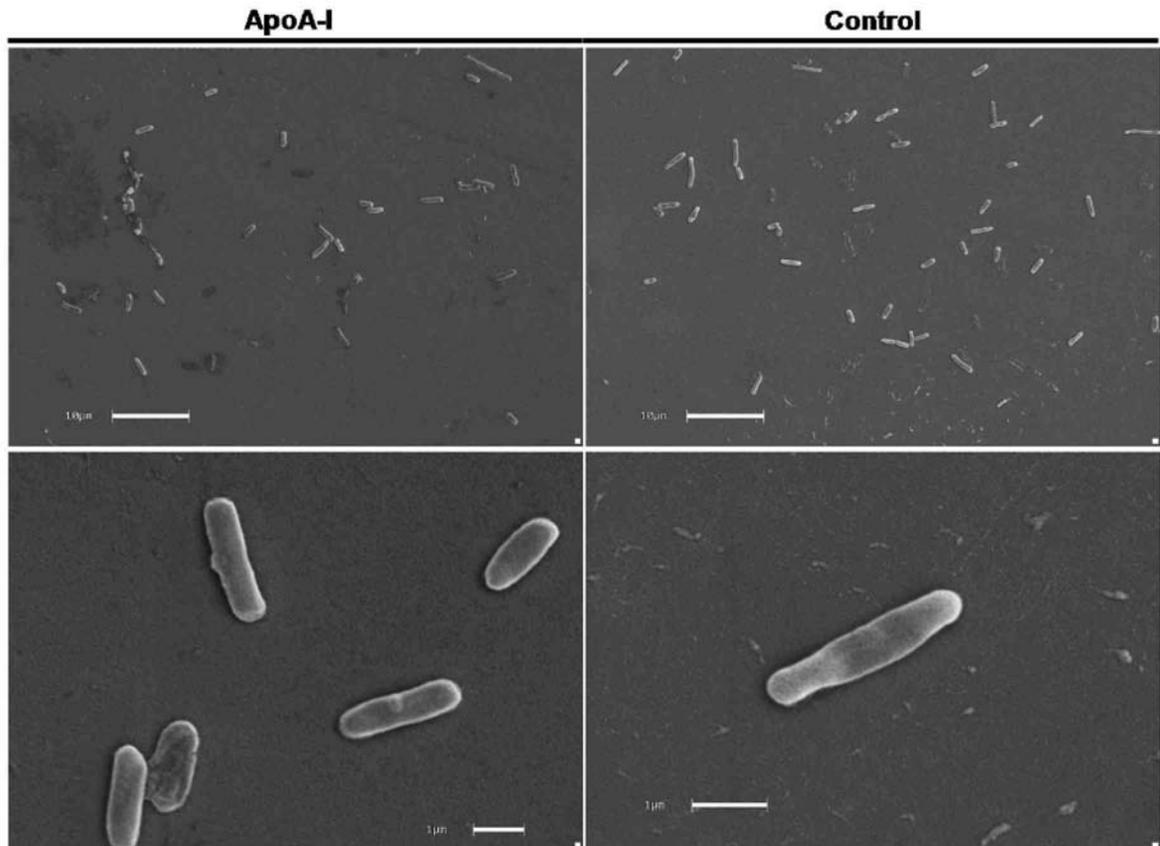
**Figura 12: Análisis morfológico por microscopía electrónica de bacterias incubadas con HDL por 1 h.** Se incubó *E. coli* DH5α con HDL (2,1 µM) por 1 h, las muestras posteriormente se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. Se aprecia la diferencia en la cantidad de bacterias en la muestra tratada con HDL, respecto al control. Sin embargo no se aprecian alteraciones morfológicas evidentes. Imágenes superiores, barra: 10 µm, imágenes inferiores, barra: 1 µm.



**Figura 13: Análisis morfológico por microscopia electrónica de bacterias incubadas con ApoA-I por 1 h.** Se incubó *E. coli* DH5α con ApoA-I (5,2 µM) por 1 h, las muestras posteriormente se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. Panel superior: vista panorámica del frotis, panel inferior: mayor magnificación de los correspondientes recuadros del panel superior. Imágenes superiores, barra: 10 µm, imágenes inferiores, barra: 1µm.



**Figura 14: Análisis morfológico por microscopia electrónica de bacterias incubadas con HDL por 6 h.** Se incubó *E. coli* DH5α con HDL (2,1 μM) por 6 h, las muestras posteriormente se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. Se aprecia la diferencia en la cantidad de bacterias en la muestra tratada con HDL, respecto al control. Sin embargo no se aprecian alteraciones morfológicas evidentes. Imágenes superiores, barra: 10 μm, imágenes inferiores, barra: 1 μm.



**Figura 15: Análisis morfológico por microscopia electrónica de bacterias incubadas con ApoA-I por 6 h.** Se incubó *E. coli* DH5α con ApoA-I (5,2 μM) por 6 h, las muestras posteriormente se procesaron como se describe en Materiales y Métodos. No se aprecian alteraciones morfológicas evidentes en las bacterias tratadas con ApoA-I, a pesar del aumento en el tiempo de incubación. Imágenes superiores, barra: 10 μm, imágenes inferiores, barra: 1 μm.

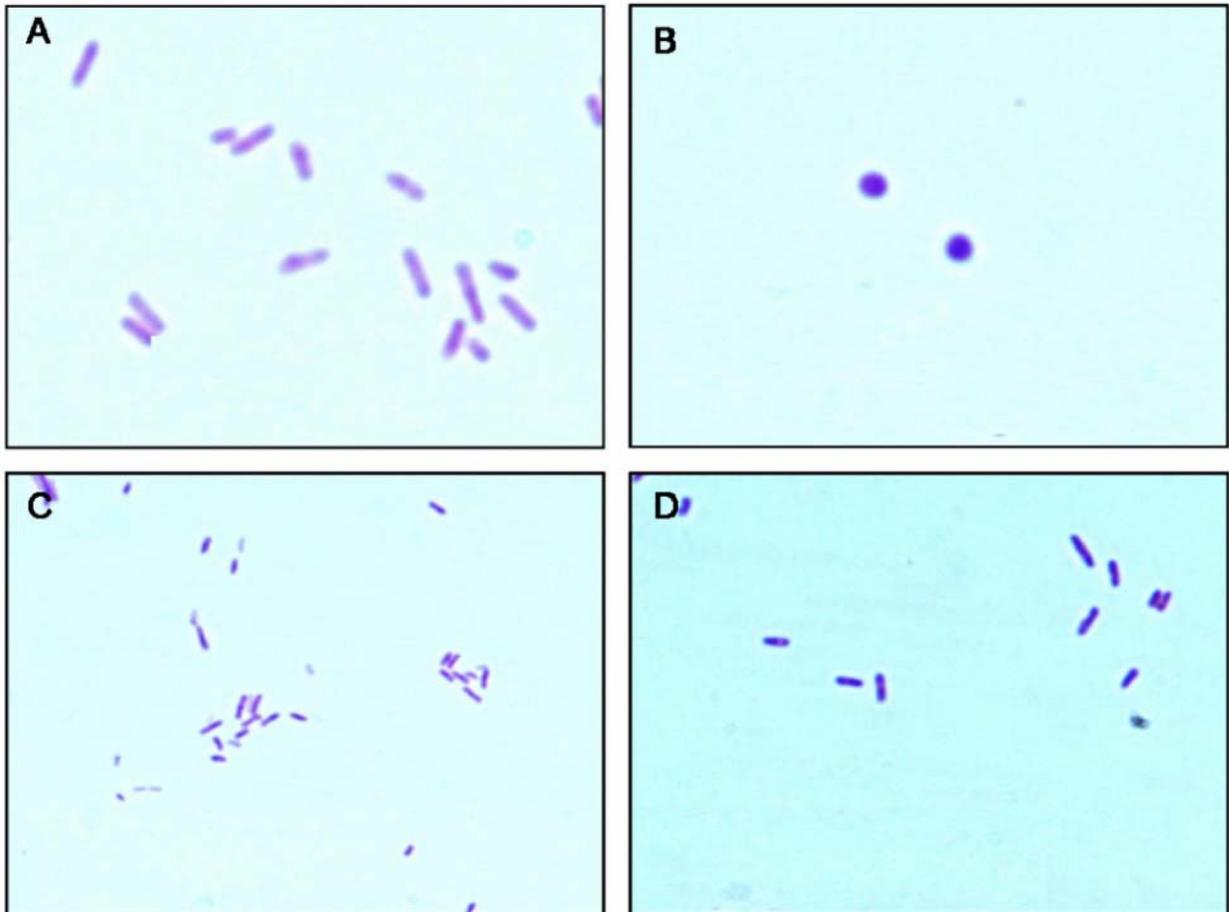
## 4.6 Identificar posibles sitios de unión para HDL y/o ApoA-I en membranas bacterianas

### 4.6.1 Ensayo de unión mediante *Ligand blot*

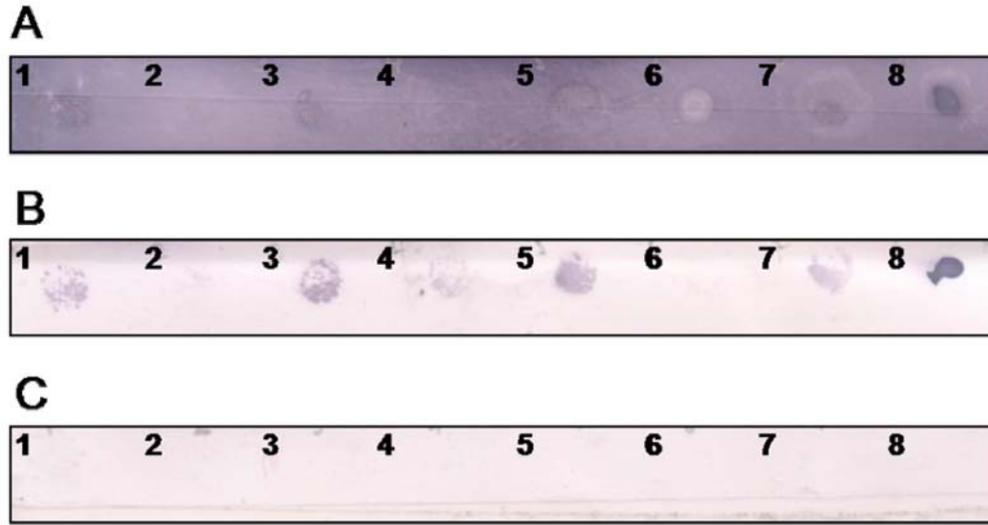
Se siguieron protocolos establecidos para el tratamiento de bacterias, *E. coli* DH5 $\alpha$ , mediante los cuales se consiguió obtener diversos preparados de bacterias, enriquecidos con alguna fracción en particular. Los protocolos se siguieron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, obteniéndose las siguientes fracciones: bacterias tripsinizadas, proteínas periféricas, bacterias sin proteínas periféricas, membrana externa y protoplastos. En la **Figura 16C y D**, se muestra que las bacterias luego de los distintos tratamientos mantienen su integridad y que efectivamente se logra obtener protoplastos (**Figura 16B**).

Las distintas preparaciones obtenidas fueron utilizadas para realizar ensayos de *Ligand blot*. Estos ensayos se utilizan para poder determinar unión proteína-proteína o de proteínas con otros compuestos, mediante *Dot blot*. Para ello se inmovilizan en membranas de nitrocelulosa ciertas proteínas o extractos de interés y luego se incuban con la proteína en estudio. Este proceso es seguido por inmunodetección de la proteína con que se incubó la membrana y posterior análisis de la posible unión.

Como se observa en la **Figura 17A**, en los primeros ensayos se observó un fondo muy alto, indicando que el bloqueo de la membrana no fue satisfactorio. Además se observó problemas de reacción cruzada del primer anticuerpo, contra alguna de las fracciones (**Figura 17B**) y con la utilización solo del anticuerpo secundario no se produjeron problemas de interacción cruzada (**Figura 17C**).



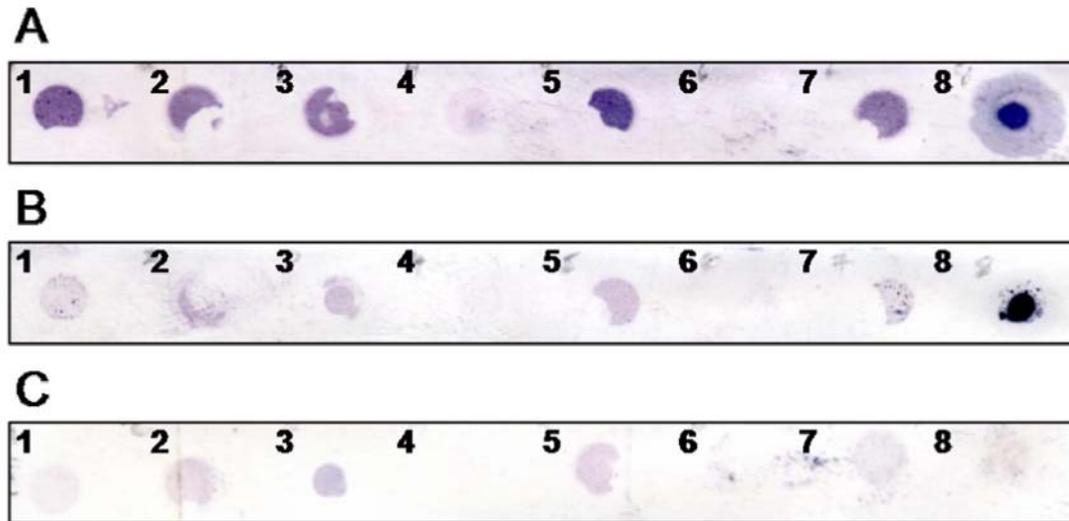
**Figura 16: Tinción de Gram de *E. coli* DH5 $\alpha$  luego de diversos tratamientos.** Gram control (A), protoplastos (B), tratadas con bicarbonato (C), tripsinizadas (D). Se observa que la obtención de protoplastos fue efectiva (B), presentándose como cocos Gram positivos, además los otros tratamientos realizados con el fin de obtener fracciones bacterianas no afectaron la morfología bacteriana (C y D).



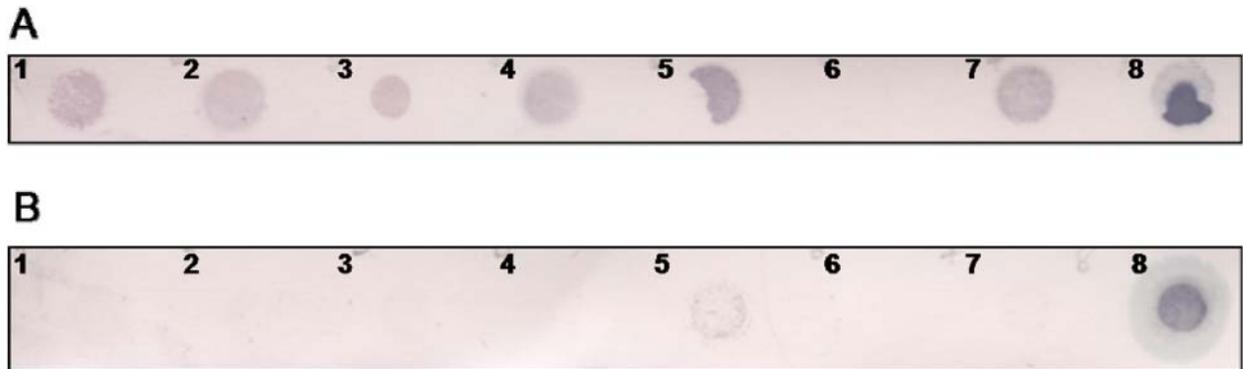
**Figura 17: Ligand blot de fracciones bacterianas de *E. coli* DH5 $\alpha$  con HDL.** Se inmovilizaron las fracciones bacterianas en membranas de nitrocelulosa y se bloquearon utilizando PBS conteniendo leche descremada al 5% (p/v) y Tween 20 al 0,05% (v/v), luego de bloquearlas se incubaron con 0,1 mg/mL de HDL por 1 h, y posteriormente se inmunodetectaron utilizando un antisuero anti-ApoA-I. En este caso, la señal de fondo no permite distinguir claramente la marca inmunoreactiva. En **A** se muestra la unión de HDL a algunas fracciones bacterianas, excepto LPS. Las fracciones se encuentran en el siguiente orden: **1:** bacterias tripsinizadas, **2:** proteínas periféricas, **3:** bacterias sin proteínas periféricas, **4:** membrana externa, **5:** protoplastos, **6:** LPS, **7:** bacterias sin tratar, **8:** HDL. En **B** se aprecia la inmunodetección de las fracciones, sin incubación con HDL. El orden en la membrana es el mismo que en **A**. En **C** se muestra la inmunodetección de las diversas fracciones, utilizando solo el anticuerpo secundario.

Para solucionar estos problemas, se ensayaron distintas soluciones de bloqueo y se purificaron por afinidad anticuerpos anti-ApoA-I a partir del antisuero utilizado anteriormente, con el fin de disminuir la fuerte reacción cruzada que presentaba el antisuero contra las distintas fracciones. Como se observa en la **Figura 18**, se obtuvo un mejor resultado utilizando Tris-HCl 25 mM pH 7,5; conteniendo Tween 20 al 2% (v/v), apreciándose claramente una disminución de la señal de fondo, sin embargo fue posible detectar reacción cruzada de ambos anticuerpos con *E. coli* DH5 $\alpha$ . A pesar de esto se observa una mayor marca reactiva en el *Ligand blot* que en los controles, lo que nos indica unión de HDL a algunas fracciones bacterianas.

Con el fin de obtener un resultado mas limpio, se procedió a preabsorber el anticuerpo primario y secundario con un extracto de *E. coli* DH5 $\alpha$ , realizando una dilución 1/500 de los anticuerpos con el extracto e incubándolos por 1 h a temperatura ambiente. Antes de su utilización fueron centrifugados a 14.100 x g, para eliminar cualquier precipitado presente y finalmente llevados a la dilución respectiva con los tampones que se indican en Materiales y Métodos. El resultado del *Ligand blot*, muestra que existe unión de HDL a las distintas fracciones bacterianas, sin embargo no fue posible detectar unión de HDL a LPS (**Figura 19, A6**). En el control se muestra inmunodetección leve en la fracción **B5**, la cual corresponde a protoplastos, sin embargo la misma fracción incubada con HDL es capaz de producir una reacción mucho más intensa, lo cual demuestra que HDL es capaz de unirse a esta fracción.



**Figura 18: Ligand blot de fracciones bacterianas de *E. coli* DH5 $\alpha$  con HDL.** Se inmovilizaron las fracciones bacterianas en membranas de nitrocelulosa y se bloquearon utilizando una solución de Tris-HCl 25 mM pH 7,5 conteniendo Tween 20 al 2% (v/v), Luego de bloquearlas se incubaron con 0,1 mg/mL de HDL por 1 h, y posteriormente se inmunodetectaron utilizando anticuerpos anti-ApoA-I purificados por afinidad. En **A** se muestra la unión de HDL a las distintas fracciones, excepto para LPS. Las fracciones se encuentran en el siguiente orden: **1:** bacterias tripsinizadas, **2:** proteínas periféricas, **3:** bacterias sin proteínas periféricas, **4:** membrana externa, **5:** protoplastos, **6:** LPS, **7:** bacterias sin tratar, **8:** HDL. En **B** se aprecia la inmunodetección de las fracciones utilizando anticuerpo primario y secundario, sin incubación con HDL. El orden en la membrana es el mismo que en **A**. En **C** se muestra la inmunodetección de las diversas fracciones, utilizando solo el anticuerpo secundario.



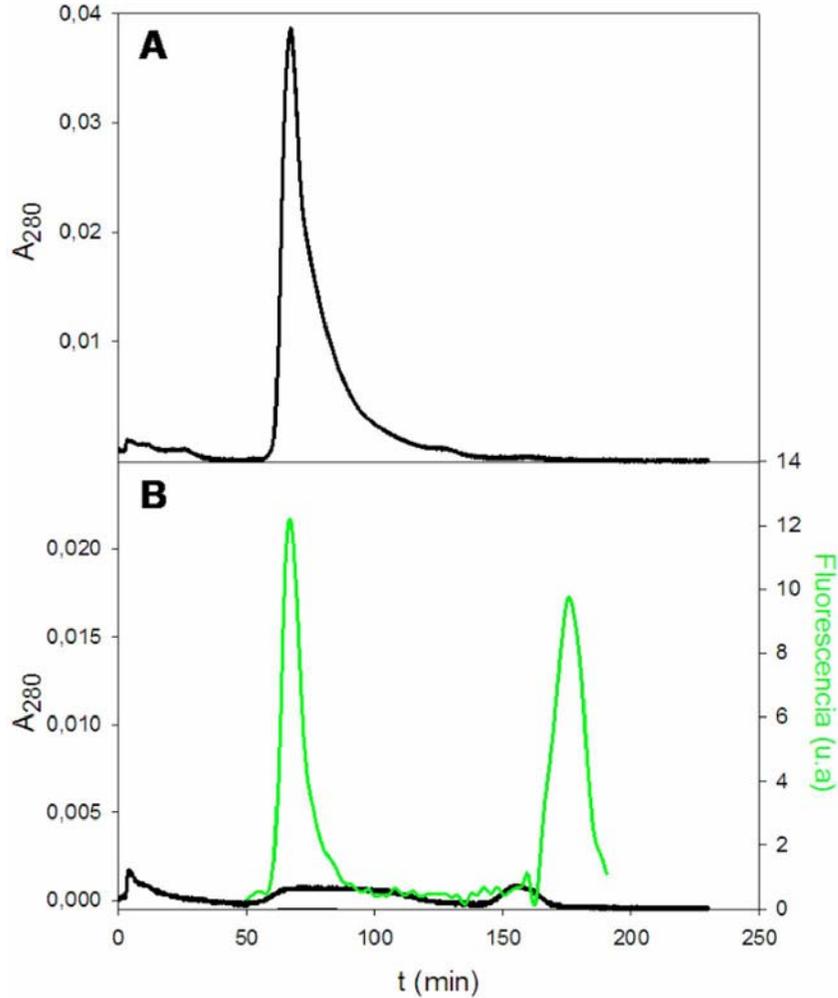
**Figura 19: Ligand blot de fracciones bacterianas de *E. coli* DH5 $\alpha$  con HDL.** Se inmovilizaron las fracciones bacterianas en membranas de nitrocelulosa y luego de bloquearlas se incubaron con 0,1 mg/mL de HDL por 1 h, y posteriormente se inmunodetectó utilizando anticuerpos anti-ApoA-I purificados por afinidad y pre-absorbidos con un extracto de *E. coli* DH5 $\alpha$ . En **A** se muestra la unión de HDL a las distintas fracciones, excepto para LPS. Las fracciones se encuentran en el siguiente orden: **1:** bacterias tripsinizadas, **2:** proteínas periféricas, **3:** bacterias sin proteínas periféricas, **4:** membrana externa, **5:** protoplastos, **6:** LPS, **7:** bacterias sin tratar, **8:** HDL. En **B** se aprecia la inmunodetección de las fracciones, sin incubación con HDL. El orden en la membrana es el mismo que en **A**.

#### 4.6.2 Interacción de proteínas plasmáticas con LPS-FITC, mediante cromatografía de filtración

Es conocida la capacidad de HDL de interactuar con LPS, sin embargo no se detectó unión entre estos compuestos por *Ligand blot*. Por ello se decidió probar una técnica soluble y de mayor sensibilidad. La técnica de cromatografía de filtración ha sido utilizada para determinar interacción de HDL humana con LPS-FITC (De Haas y col., 2000). El LPS, al ser conjugado con el fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC), adquiere propiedades fluorescentes. El LPS-FITC por lo tanto nos permite detectar aquellas proteínas a las que se une, ya que si existe interacción debe coeluir el LPS-FITC y la(s) proteína(s) de interés, hecho que puede ser visualizado por lectura de la fluorescencia asociada al LPS.

En la **Figura 20**, se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos durante la estandarización de las condiciones para realizar este ensayo. En **A** se puede observar la determinación del volumen de exclusión ( $V_0$ ) de la columna (66 min), tiempo en que eluyen las proteínas de mayor peso molecular. Se obtuvo este valor utilizando Azul de dextrano como muestra, este compuesto tiene un peso molecular mayor a 2.000.000 Da y es excluido de los poros de la resina.

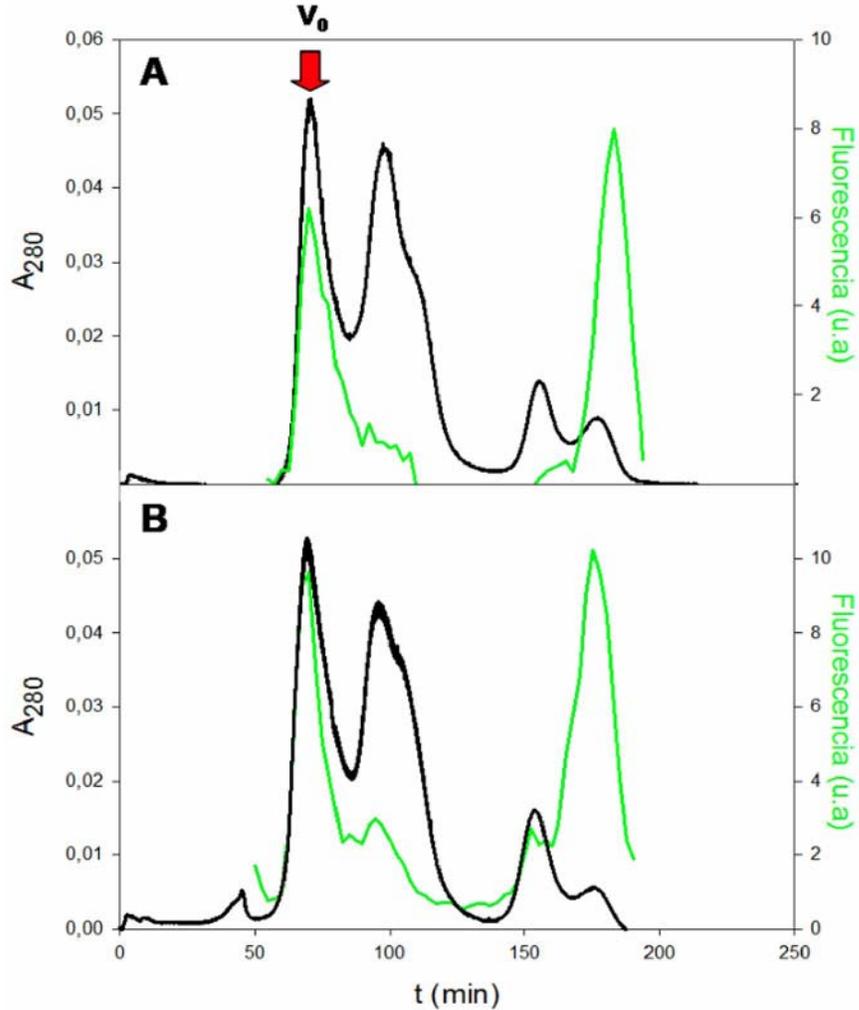
En **B** se observa un perfil cromatográfico de LPS-FITC, en el perfil de fluorescencia se ven dos picos, uno de los cuales eluye en el  $V_0$  y otro de un menor peso molecular. El primer pico se puede deber a un agregado de LPS y el segundo a LPS monomérico, complejos moleculares ya descritos por Jann y col., (1975).



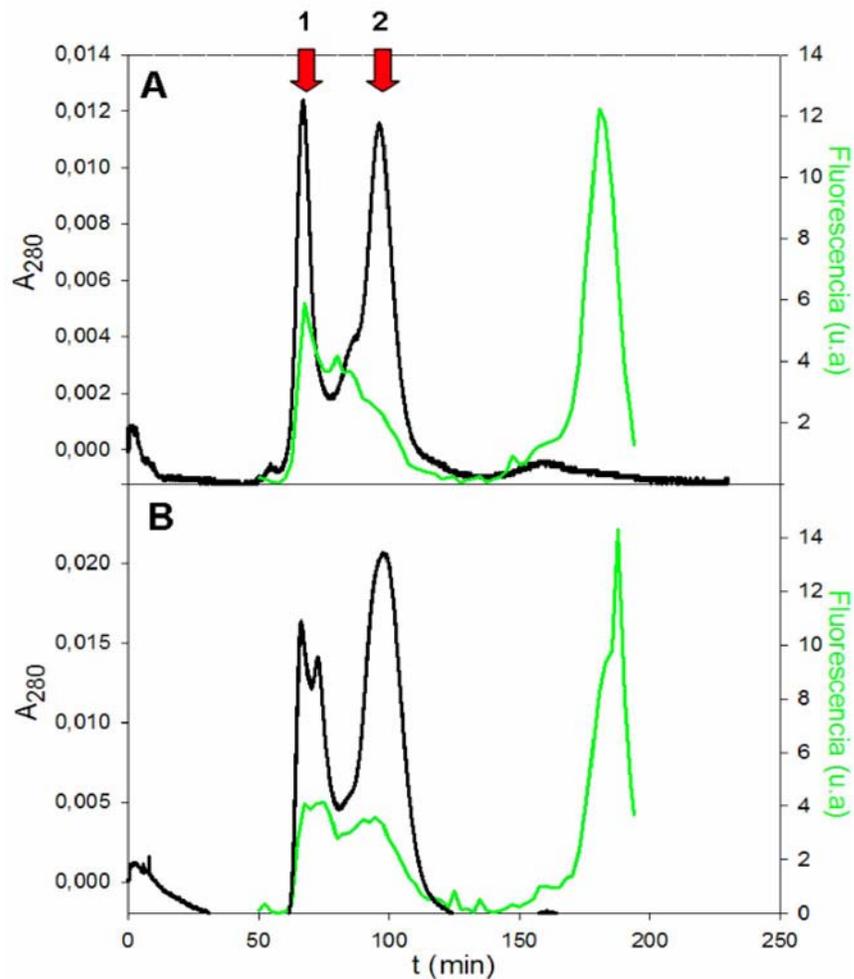
**Figura 20: Análisis de LPS-FITC por cromatografía de filtración.** El fraccionamiento se realizó en una columna Superdex 200 HR utilizando el tampón de elución descrito en Materiales y Métodos. **A:** Determinación del  $V_0$  experimental, mediante cromatografía de Azul de dextrano (2.000.000 Da), el cual eluye en el minuto 66. **B:** perfil cromatográfico de LPS-FITC, en el cual se aprecian dos picos, el primero que eluye en el  $V_0$ , y el segundo de un menor peso molecular, que eluye en el minuto 180.

En la **Figura 21A**, se aprecia el perfil cromatográfico de una muestra de plasma de carpa incubada con LPS-FITC por 1 h. Se observan dos picos que no se encuentran cuando se utiliza solo LPS-FITC y los cuales estarían asociados a algún tipo de proteína, por la lectura que se obtiene de la muestra por absorbancia a 280 nm. Estos picos eluyen aproximadamente al minuto 97 y 153. Posteriormente una muestra de plasma se incubó con LPS-FITC por 18 h, el resultado de la cromatografía se puede observar en la **Figura 21B**. En este caso se puede apreciar un aumento en la cantidad de fluorescencia que es capaz de retener el pico del minuto 97. Esto es indicativo que alguna proteína presente en el plasma es capaz de interactuar con LPS.

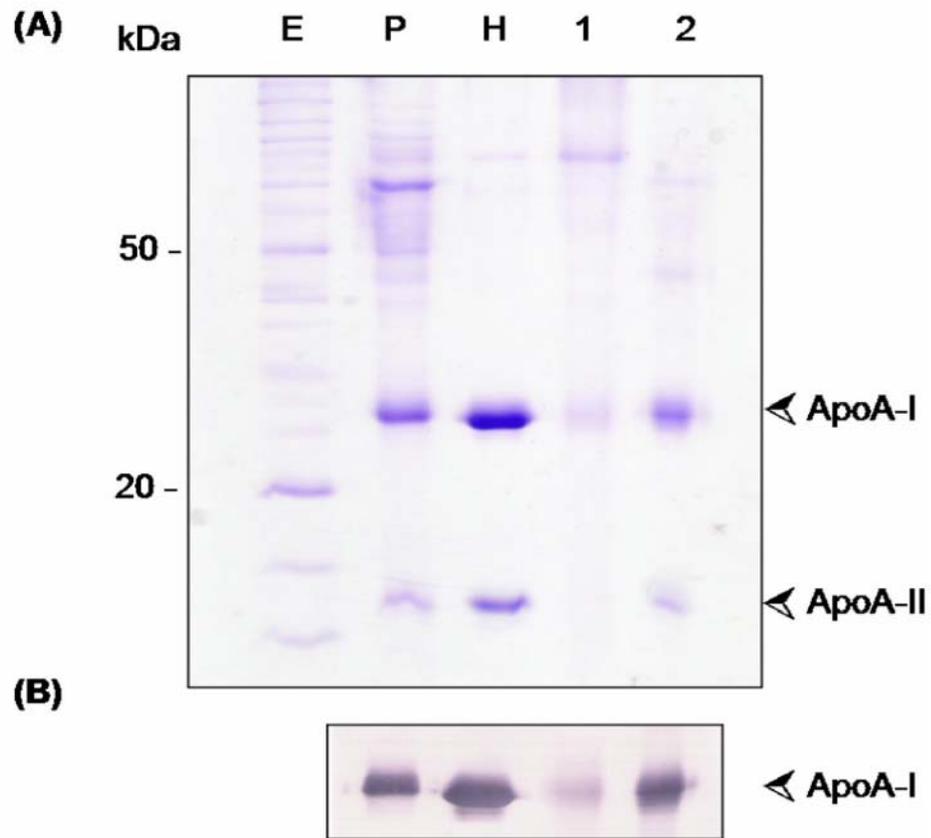
Con el fin de determinar si la proteína plasmática que une LPS y eluye al minuto 97 corresponde a HDL, se realizaron incubaciones utilizando HDL purificada y LPS-FITC por 1 h y 18 h. En la **Figura 22A** se demuestra unión de HDL con LPS-FITC con solo una hora de incubación, hecho que se manifiesta por un desplazamiento en la elución de parte del LPS-FITC desde el  $V_0$  hasta el tiempo de elución de 97 min. Por otro lado, cuando se realizó una incubación por 18 horas, se ve un pico claramente definido en el minuto 97, lo cual permite determinar que HDL es capaz de interactuar con LPS-FITC, y que el tiempo de incubación es determinante para inducir el desagregamiento de los complejos de LPS (**Figura 22B**). Este fenómeno se deduce por la disminución de la fluorescencia del pico que eluye en el  $V_0$ . Debido a que en la cromatografía de HDL se obtienen dos picos mayoritarios, y al menos uno de ellos une LPS, se confirmó mediante SDS-PAGE al 12,5 % y *Western blot* que realmente el pico del minuto 97 es HDL. En la **Figura 23**, se aprecia el análisis electroforético de los picos



**Figura 21: Interacción entre LPS de *E. coli* y fracciones proteicas del plasma de carpa.** LPS-FITC (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fue incubado con plasma de carpa por 1 h (A) y 18 h (B), posteriormente la muestra fue sometida a cromatografía en una columna Superdex 200 HR y eluida en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Las muestras colectadas fueron tratadas con deoxicolato de sodio 0,1% (p/v), para disminuir del apagamiento de la fluorescencia, y leídas en fluorímetro en las siguientes condiciones:  $\lambda$  excitación: 490 nm,  $\lambda$  emisión: 512 nm.



**Figura 22: Interacción entre LPS de *E. coli* y HDL de carpa.** LPS-FITC (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fue incubado con HDL de carpa por 1 h (A) y 18 h (B), posteriormente la muestra fue sometida a cromatografía en una columna Superdex 200 HR y eluida en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Las muestras colectadas fueron tratadas con deoxicolato de sodio 0,1% (p/v), para disminuir del apagamiento de la fluorescencia y leídas en fluorímetro en las siguientes condiciones:  $\lambda$  excitación: 490 nm,  $\lambda$  emisión: 512 nm.



**Figura 23: Análisis en SDS-PAGE de los picos de elución obtenidos luego de cromatografía de HDL en columna Superdex 200 HR.** Se analizó por SDS-PAGE al 12,5% los picos de elución obtenidos en la cromatografía de la **Figura 22**. **E:** estándar de peso molecular; **P:** Plasma de carpa; **H:** HDL purificada; **1:** Pico 1; **2:** Pico 2. **(A):** Tinción con Azul de Coomassie, **(B):** Inmunodetección de ApoA-I por *Western blot*. Se observa claramente que el pico 2 corresponde a HDL, debido a la presencia de ApoA-I.

obtenidos, luego de fraccionar HDL incubada con LPS (marcados con flechas en la **Figura 22**). Mediante tinción con Azul de Coomassie y *Western blot* para ApoA-I se aprecia que el pico 2 corresponde a HDL, (**Figura 23A**), debido a la presencia de ApoA-I y A-II en la tinción con Azul de Coomassie, y posterior confirmación por inmunodetección de ApoA-I (**Figura 23B**).

## 5. DISCUSIÓN

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa de diversos organismos y proporciona protección inmediata e inespecífica frente a infecciones. Uno de sus principales componentes, lo constituyen péptidos y proteínas con propiedades antimicrobianas (Cristofaro y Opal, 2006; Hume y Hertzog, 2006).

En este contexto existen antecedentes que relacionan a HDL y su componente principal, ApoA-I, con funciones protectoras, sugiriendo de ésta manera su posible participación en la inmunidad innata. Estudios realizados por Concha y col., (2003, 2004) han demostrado la importante función defensiva que presenta HDL y ApoA-I de carpa, debido a la potente actividad antimicrobiana que presentan ambas proteínas contra diversos tipos bacterianos.

En el presente trabajo se planteó investigar un posible mecanismo de acción antimicrobiano para HDL y/o ApoA-I, y de esta manera entender uno de los aspectos menos estudiados de éstas proteínas, como es su participación en la inmunidad innata de peces.

En carpa, estudios realizados por López (2006) han mostrado el carácter anfipático de ésta proteína, además ha dejado en evidencia lo poco conservado, a nivel de secuencia primaria, que es el extremo C-terminal de ApoA-I. Sin embargo, éste se considera muy importante para la remoción de colesterol y la interacción de ApoA-I y HDL con bicapas lipídicas. Esto indica, que a pesar de la importancia que presenta este dominio en la interacción con lípidos, sería mucho más relevante para su función la disposición que adquieren los residuos en la estructura secundaria de la proteína.

De acuerdo al análisis bioinformático realizado del extremo carboxilo terminal de ApoA-I de pollo, humano, pez cebra y trucha arcoiris, éste muestra una clara disposición anfipática de sus residuos aminoacídicos y baja presencia de residuos básicos, lo cual le proporciona una carga neta 0 ó -1, dependiendo de la especie (**Figura 2**). En el caso de la carpa se aprecia la misma disposición anfipática de los residuos, pero una mayor presencia de residuos básicos, adquiriendo una carga neta de +2 (**Figura 3**). Como comparación, se realizó el mismo análisis a Melitina, un péptido ampliamente estudiado por sus propiedades antimicrobianas, el cual presentó una disposición anfipática y una carga neta de +4. Estos estudios muestran homología estructural entre el extremo C-terminal de carpa y un grupo de péptidos antimicrobianos ampliamente estudiados. Se destaca de las proyecciones de *Helical wheel* que la presencia de los residuos cargados positivamente se encuentran adyacentes a la agrupación de residuos hidrofóbicos, en una clara disposición de  $\alpha$ -hélice tipo A (Frank y Marcel, 2000). Esta disposición de los residuos, favorece la interacción del extremo C-terminal de ApoA-I con membranas, debido a las interacciones hidrofóbicas producidas entre las colas alifáticas de los fosfolípidos y los residuos apolares, además de la interacción electroestática entre la cabeza de los fosfolípidos (de carga negativa) con los residuos cargados positivamente. Asimismo el modelo tridimensional deducido del péptido C-terminal de ApoA-I presentó una estructura netamente  $\alpha$ -helicoidal (**Figura 4A, B y C**), agrupándose los residuos básicos principalmente en una cara de la proteína, lo cual favorecería su interacción con las cargas negativas presentes en la membrana bacteriana. Además, los residuos apolares se encuentran agrupados en la interacción hélice-hélice presente entre las hélices 9 y 10, por lo cual se encuentran

menos expuestos a la polaridad del solvente. Sin embargo, de acuerdo a lo propuesto por Ajees y col. (2006), a medida que ApoA-I va uniendo lípidos estas hélices se van abriendo lo cual aumenta su afinidad por lípidos, lo cual presenta otro motivo por el cual la interacción de ApoA-I con membranas es clave en el mecanismo de acción de estas proteínas. Para el caso de Melitina (**Figura 4D, E y F**) el modelo tridimensional muestra una disposición  $\alpha$ -helicoidal, con un quiebre en su estructura producido por una prolina. En contraste a lo presentado en carpa, la presencia de residuos básicos no se encuentran agrupados en una cara del péptido, sino en un extremo, lo que favorecería la inserción del péptido en la bicapa lipídica que junto con el quiebre en su estructura secundaria, produciría desestabilización y permeabilización de la membrana bacteriana (Yeaman y Yount, 2003). En conclusión, el tipo de estructura secundaria, la disposición anfipática de los residuos aminoacídicos y la carga neta positiva presente en ApoA-I, y que además comparte con diversos péptidos antimicrobianos, fueron claves en esta tesis para plantear una hipótesis de un posible mecanismo de acción antimicrobiano para HDL y ApoA-I.

La asociación de péptidos y proteínas antimicrobianas sobre la superficie bacteriana se considera un paso fundamental en cualquier mecanismo de acción antimicrobiano, puesto que debe existir una interacción directa con la bacteria para poder atribuir un efecto a las proteínas estudiadas. Por lo tanto se decidió estudiar la unión que debe existir entre HDL y ApoA-I con la superficie bacteriana. Mediante inmunofluorescencia se logró determinar la unión de HDL en bacterias Gram negativas que fueron tratadas con esta proteína (**Figura 6A y B**). Además, se demostró la unión de ApoA-I purificada a *E. coli* DH5 $\alpha$  (**Figura 6D y E**). Estos resultados muestran que

ApoA-I es capaz de interaccionar con bacterias, ya sea formando parte de la partícula de HDL, desde la cual podría ser liberada por ser una apolipoproteína intercambiable o alternativamente a través de su forma libre en el plasma. De acuerdo a lo descrito por Liang y col., (1994) existe una pequeña fracción de ApoA-I libre de lípidos en el plasma humano, y teniendo en cuenta las altas concentraciones plasmáticas de HDL en carpa, los niveles de ApoA-I libre que pueden estar presentes en el plasma podrían ser no despreciables.

Se determinó la especificidad de la unión de HDL a diversos tipos de bacterias, mediante ensayos de competencia utilizando HDL-RITC y HDL sin marcar como competidor. Este resultado mostró que HDL-RITC fue desplazada por HDL sin marcar, lo cual demuestra que la unión bacteria-proteína es específica (**Figura 7**). Estos antecedentes indican que HDL es capaz de unirse a diversos tipos bacterianos.

Estos antecedentes proporcionan un primer paso, que se considera fundamental en el mecanismo de acción antimicrobiano para péptidos y proteínas, el cual es la unión a la superficie bacteriana.

Los análisis estructurales realizados para ApoA-I muestran una estructura muy similar a la descrita para un grupo de péptidos antimicrobianos que poseen un mecanismo de acción basado esencialmente en desestabilización y permeabilización de la membrana bacteriana. Además, nuestros resultados indican que HDL y ApoA-I son capaces de unirse a diversos tipos bacterianos, lo cual sugiere un mecanismo de acción antimicrobiano similar al descrito anteriormente. Con el fin de confirmar este posible mecanismo, se realizaron ensayos de permeabilización utilizando HDL y yoduro de propidio como indicador de permeabilidad. Estos ensayos mostraron, que tanto a

tiempos cortos como largos de incubación, no se observó un incremento significativo en la fluorescencia (**Figura 8**). Resultados similares se obtuvieron al incubar bacterias con ApoA-I (**Figura 9**) y al incubar *B. subtilis* (Gram positivo) con HDL (**Figura 10**). Además se realizaron los mismos ensayos antes descritos, pero utilizando como control de permeabilización Melitina, el cual mostró esencialmente los mismos resultados para HDL y ApoA-I (**Figura 11**). Esto sería indicativo que una proteína con estos motivos estructurales no sigue el mecanismo clásicamente descrito, siendo pocos los antecedentes bibliográficos que describen situaciones similares. A pesar de esto, existen ciertos mecanismos de acción antimicrobianos basados en permeabilización bacteriana, los cuales presentan características particulares. En estos casos, la permeabilización bacteriana se produciría por formación de poros de menor tamaño, lo cual lleva a la salida de iones y no necesariamente de metabolitos, para lo cual se requeriría un poro de mayor tamaño (Juretic y col., 1989; Otha y col., 1992; Matsuzaki y col., 1997b; Park y col., 2000; Brogden, 2005).

Los diversos estudios que se han enfocado en los péptidos antimicrobianos que producen permeabilización, han determinado que estos eventos se acompañan de alteraciones morfológicas observables en la membrana bacteriana. Por ello, se analizaron bacterias por microscopia electrónica de barrido, con el fin de estudiar los posibles efectos que son capaces de producir ApoA-I y HDL. Nuestros ensayos mostraron que HDL no fue capaz de producir cambios morfológicos en *E. coli* con 1 ó 6 h de incubación (**Figura 12 y 14**). Asimismo, la incubación de bacterias, por 1 ó 6 h, con ApoA-I, tampoco produjo un efecto sobre la morfología bacteriana (**Figura 13 y 15**) A pesar de que mediante estos ensayos no se observaron cambios morfológicos en las

bacterias analizadas, fue posible apreciar la potente actividad antimicrobiana de HDL, lo cual se refleja por la clara disminución en la cantidad de bacterias presentes en los distintos campos observados. El hecho de que las proteínas en estudio presenten las características estructurales necesarias como para producir efectos drásticos a nivel de membrana bacteriana, pero que no hayan sido capaces de provocarlos, es poco descrito en la literatura para péptidos y proteínas antimicrobianas similares a las estudiadas. Existe al menos un caso que describe una situación similar a la presentada por nosotros: oncorrincina III. Este péptido purificado a partir del mucus del pez *Oncorhynchus mykiss* no fue capaz de generar poros estables en bicapas lipídicas y tampoco producir alteraciones morfológicas en las bacterias tratadas con éste péptido (Fernandes y col., 2003).

En esta tesis se planteó la hipótesis que HDL y/o ApoA-I eran capaces de permeabilizar bacterias, pero también se evaluaron otras posibilidades, como la unión de HDL a alguna estructura bacteriana en particular. Los ensayos realizados por *Ligand blot* demostraron que existe unión de HDL a distintas fracciones de bacterias Gram negativas (**Figura 18 y 19**). Este hecho indica a primera vista que HDL es capaz de unirse a diversas fracciones bacterianas, como por ejemplo: proteínas bacterianas, bacterias sin estas proteínas, bacterias que no poseen membrana externa, protoplastos y bacterias sin tratar. No deja de ser curioso que nuestra proteína no presente una mayor selectividad sobre algún componente bacteriano en específico, y es poco probable que exista un compuesto en común, entre las fracciones antes mencionadas, lo cual sugiere que HDL debe presentar múltiples y diversos sitios de unión en la superficie bacteriana. Curiosamente en el ensayo de *Ligand blot* no se logró apreciar

unión de HDL a LPS, sin embargo mediante cromatografía de filtración utilizando LPS-FITC se demostró que existe una fracción proteica en plasma, que presenta un tiempo de retención de 97 min, la cual es capaz de interactuar con LPS (**Figura 21A**). Además la capacidad de unión entre estos dos compuestos aumenta cuando se incrementa el tiempo de incubación (**Figura 21B**). Los ensayos realizados utilizando HDL purificada muestran que esta proteína efectivamente presenta un tiempo de retención de 97 min y que la purificación no afectó la capacidad de unión a LPS-FITC (**Figura 22A**). Además, al igual que los resultados observados con plasma, la utilización de HDL purificada acompañada de un mayor tiempo de incubación, llevó a una mayor retención de LPS-FITC (**Figura 22B**). Estos resultados discrepan con los obtenidos en el *Ligand blot*, sin embargo esto se puede deber fundamentalmente a la diferencia en sensibilidad en ambos métodos. Esto porque la utilización de compuestos fluorescentes genera señales mucho más sensibles para ser detectadas, de las que puede entregar una inmunodetección revelada por métodos convencionales.

Luego de fraccionar HDL en la columna Superdex 200 HR, se obtuvieron dos picos principales, uno de un tamaño mayor o igual a 600 kDa (que eluye en el  $V_0$ ) y otro que eluye en el minuto 97. A pesar de que HDL presenta un peso molecular estimado en 160 kDa, por lo cual no debería eluir en el  $V_0$ , se decidió confirmar si uno o ambos picos corresponden a HDL. Para ello se analizaron por SDS-PAGE, y posterior tinción con Azul de Coomasie, las fracciones obtenidas luego de la cromatografía. De este análisis se comprobó efectivamente que el pico que corresponde a HDL es el que eluye en el minuto 97, debido a la presencia de sus dos proteínas principales, ApoA-I y ApoA-II. Sin embargo, para el pico que eluye en el  $V_0$  y que presenta una gran

absorbancia a 280 nm, no fue posible obtener un patrón de proteínas que refleje de alguna manera la cantidad de absorbancia obtenida en la cromatografía (**Figura 23A**). La cuantificación de proteínas de este pico, tampoco se correlacionó con la intensidad de la absorbancia obtenida (datos no mostrados). Se puede descartar que este pico sea un agregado de HDL que se produzca durante la etapa de incubación, debido a que no existe una gran presencia de ApoA-I (por tinción con Azul de Coomassie), además se corroboró por *Western blot* de ApoA-I, obteniéndose el mismo resultado anterior (**Figura 23B**). La posibilidad que este pico sea un pigmento que se encuentre en estos peces y que presenta un gran absorbancia a 280 nm, es muy poco probable, debido a que los estudios por cromatografía de filtración permiten diferenciar compuestos de acuerdo a su peso molecular, lo que implicaría que este pico sería un compuesto con un tamaño superior a los 600 kDa, no encontrándose colorantes con tal peso molecular, lo cual desecharía esta posibilidad. Tampoco se puede atribuir este pico de absorbancia a LPS-FITC, ya que este compuesto no presenta absorbancia a 280 nm, como lo indica la **Figura 20B**. Una posibilidad menos probable, es que si este pico corresponde a una proteína, ésta no presente las características necesarias para unir el colorante Azul de Coomassie.

En conclusión podemos decir que los ensayos de *Ligand blot* y de unión de LPS-FITC a HDL se realizaron como una forma de determinar una posible estructura blanco que pudiese estar mediando la actividad antimicrobiana de HDL, al menos en bacterias Gram negativas, encontrándose unión de HDL a diversas estructuras, incluyendo LPS, lo cual sugiere que HDL presenta múltiples sitios de unión en la superficie bacteriana.

La presencia de residuos de prolina en la estructura primaria de ApoA-I, pueden ser claves en la acción antimicrobiana de ésta proteína, tal como ha sido descrito para algunos péptidos antimicrobianos (Boman, 1995; Brogden, 2005). En estos péptidos los residuos de prolina se encuentran dispuestos al azar en su estructura, sin embargo en algunos casos la mutación de la única prolina presente, disminuye considerablemente su actividad (Park y col., 2000). Más importante aún es que los péptidos con estas características poseen un mecanismo de acción donde la permeabilización de la membrana no es el paso fundamental que produce la muerte bacteriana (Otvos, 2005; Park y col., 2000), sino que la acción que ejercen sobre las membranas es desestabilizarla, sin necesariamente formar poros estables, y junto con ello favorecer la internalización y acumulación de péptidos al interior de la célula. Algunos de estos péptidos actúan inhibiendo proteínas como Hsp70 y GroEL, las cuales son fundamentales en generar la respuesta bacteriana anti-estrés. (Otvos y col., 2000; Otvos, 2005; Podda y col., 2006). Los residuos de prolina en ApoA-I, son ampliamente conservados en las diversas especies, tal como lo indica la **Figura 1**, delimitando repeticiones de 11 y 22 aminoácidos, características de este tipo de proteínas, por lo que se podría especular que ApoA-I pueda presentar un mecanismo similar al descrito.

HDL es una partícula que ha sido principalmente caracterizada por su rol en el transporte reverso de colesterol. Este es un punto importante debido a que han sido descritos los efectos antibacterianos de ácidos grasos como son el ácido oleico, linoleico, linolénico y otros más, produciendo la inhibición de enzimas claves en la biosíntesis de ácidos grasos propios de las bacterias, (Zheng y col., 2005). Asimismo se postula que la actividad citotóxica que ejerce HDL sobre *Trypanosoma brucei*, se debe

fundamentalmente a la composición de los fosfolípidos presentes, los cuales alterarían drásticamente la conformación lipídica de la membrana produciendo su lisis (Rifkin, 1991). Este autor además postula que la activación enzimática que es capaz de producir HDL sobre enzimas claves en la síntesis de ácidos grasos, como HMGCoA reductasa, y la activación de síntesis de glicolípidos podrían afectar de manera adversa la viabilidad de estos parásitos, lo cual también podría producirse en bacterias (Rifkin, 1991). Debemos recordar que los peces, en particular, se caracterizan por poseer un alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados como los descritos anteriormente (Brooks y col., 2002). Además en carpa, así como en algunos otros peces teleósteos, no ha sido descrita la presencia de Albúmina (Amthauer y col., 1989; Babin y Vernier, 1989), por lo cual el transporte de ácidos grasos, que en mamíferos es principalmente efectuado por ésta proteína, debe ser suplido por otra con características similares como lo es HDL, como lo describe Metcalf y col., (1999).

La utilización de HDL reconstituida (rHDL), puede ser una buena manera de descartar muchos de los efectos descritos anteriormente. De este modo, la reconstitución de la partícula con un solo tipo de lípido, y eliminando otras proteínas que pueden ser transportadas por HDL de carpa (y que no hayan sido descritas hasta el momento), desestimarían la contribución en la acción antimicrobiana de otras proteínas asociadas a la partícula de HDL y de los lípidos transportados por ella.

Un efecto no menor puede ser atribuido a la presencia de colesterol, una de las principales moléculas transportadas por HDL (Yokoyama, 2005; Zannis y col., 2006), esto debido a que es conocido el efecto que tiene esta molécula en producir una menor fluidez en membranas celulares (Ridgway y col., 1999). En bacterias se ha descrito el

crecimiento de *E. coli* en medios ricos en colesterol, pero esto no ha producido una disminución en la viabilidad bacteriana ni una variación en la composición de los ácidos grasos, sino un descenso en la fluidez de membrana (Eaton y col., 1981). Esta disminución en la fluidez de la membrana puede favorecer la interacción subsecuente de otras moléculas de HDL y por lo tanto promover la acción antimicrobiana de esta proteína.

Como se ha descrito, el transporte de lípidos y colesterol es la función más conocida de HDL. La extracción de lípidos y colesterol desde tejidos periféricos para ser llevados al hígado para su eliminación, pueden dar pie para sospechar que HDL podrían ejercer una función similar sobre bacterias, removiendo lípidos esenciales para el normal desarrollo bacteriano lo cual podría terminar en la muerte celular. Uno de los mecanismos de extracción de lípidos en células de mamíferos se basa en la unión de ApoA-I a receptores celulares como ABCA1 y SR-BI, pero también se ha descrito la transferencia de lípidos y colesterol por un mecanismo denominado de difusión acuosa (Yancey y col., 2003), el cual no necesita de receptores para producirse. Además recientemente López (2006), demostró la unión de HDL a células BHK-21, las cuales no presentan este tipo de receptores, apoyando esta hipótesis.

Los efectos antimicrobianos que posee HDL pueden ser explicados por diversos factores, como los mencionados anteriormente. Junto con esto, la complejidad que presentan estas partículas, tanto en su composición lipídica como proteica, hace que determinar un mecanismo antimicrobiano para esta proteína resulte altamente complejo. Los datos obtenidos indican, que HDL es capaz de unirse y ejercer un efecto sobre distintos tipos bacterianos. Sin embargo, existen diversos factores que podrían

explicar un efecto de ésta proteína. Por ejemplo, algunas proteínas que pueden ser claves en la unión de la partícula sobre bacterias, son LBP-BPI y A-SAA, las cuales son transportadas por HDL y presentan la capacidad de unir el LPS presente en las bacterias Gram negativas (Fenton y Golenbock, 1998; Bingle y Craven, 2004; Wu y col., 2004; Zweigner y col., 2006; Magnadottir, 2006). La presencia de transcritos que codifican para estas proteínas en carpa, fueron reportados recientemente por Kono y Sakai (2003). De ésta manera la unión, y su posible efecto, puede ser en parte mediado por proteínas transportadas por la partícula de HDL. En el caso de bacterias Gram positivas, existe evidencia que HDL humana es capaz de unirse a ácido lipoteicoico, el cual es un componente del peptidoglicano presente en este tipo de bacterias. Por lo tanto existe evidencia que explica, al menos en otra especie, la unión y efecto que es capaz de ejercer esta proteína sobre bacterias Gram positivas (Levels y col., 2003).

El sistema inmune innato juega un rol central en el control de enfermedades infecciosas en los peces, por lo cual la investigación enfocada en este sistema se ha tornado fundamental, particularmente porque el uso excesivo de antibióticos ha incrementado la aparición de microorganismos multiresistentes a estas drogas (Ho y col., 2000; Schmidt y col., 2000). Investigaciones como esta, contribuyen a comprender la multifuncionalidad de una proteína abundante y fisiológicamente fundamental, como la HDL y sus apolipoproteínas. Así también, un mayor entendimiento del sistema inmune de peces puede llevar a buscar nuevas maneras de ser potenciado y de esta manera combatir ciertas enfermedades infecciosas.

Diversas investigaciones se han centrado en el estudio de los mecanismos de acción y potenciación de péptidos y proteínas antimicrobianas. Junto con esto, se ha

producido un aumento de investigaciones enfocadas en la posible utilización de péptidos antimicrobianos con fines biotecnológicos (Cole y Ganz, 2000; Shai, 2002; Bradshaw, 2003; Marshall y col., 2003; Gordon y col., 2005; Papo y Shai, 2005; Jenssen y col., 2006; Nell y col., 2006; Muñoz y Marcos, 2006; Stallmann y col., 2006). El estudio de estos componentes ha llevado al descubrimiento de un gran número de derivados sintéticos, dejando abierta la posibilidad de encontrar muchos más, a los cuales se les puedan encontrar diversas aplicaciones (Gallo y col., 2002; Vizioli y Salzet, 2002).

En el caso de HDL, y específicamente para ApoA-I, se han desarrollado péptidos miméticos que fueron capaces de inhibir el proceso inflamatorio asociado a endotoxemia por LPS, reducir el proceso aterogénico e inhibir la respuesta inflamatoria inducida por virus influenza tipo A (Van Lenten y col., 2004; Navab y col., 2005; Gupta y col., 2005). Así también un péptido derivado del extremo C-terminal de ApoA-I de carpa, presenta una fuerte actividad antimicrobiana (Concha y col., 2004), lo que lleva a pensar que hallar futuras aplicaciones biotecnológicas, para estas proteínas o sus fragmentos, y relacionadas fundamentalmente a la acción que ejercen en el sistema inmune innato no deben desestimarse.

Finalmente de este trabajo de tesis, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Del análisis bioinformático se pudo establecer que el extremo C-terminal de carpa es el único que presenta carga neta positiva dentro de las especies estudiadas, y

además posee las características estructurales necesarias para producir un efecto antimicrobiano ( $\alpha$ -helicoidal, anfipático y catiónico).

- HDL, y su componente principal ApoA-I, son capaces de unirse a la superficie de diversos tipos bacterianos. Siendo la interacción de HDL específica, lo que quedó demostrado por ensayos de competencia.
- Los análisis de permeabilización demostraron que si bien HDL y ApoA-I son capaces de interactuar con la membrana bacteriana, no son capaces de permeabilizar bacterias bajo distintas condiciones de ensayo.
- Por microscopia electrónica de barrido se demostró que efectivamente HDL y ApoA-I ejercen una acción antibacteriana, sin embargo no producen alteraciones morfológicas evidentes en la superficie bacteriana, lo cual sugiere que la permeabilización de la membrana no sería el mecanismo de acción antimicrobiano.
- Los ensayos de *Ligand blot* muestran que HDL presentaría múltiples sitios de unión en la superficie bacteriana.
- HDL es capaz de interactuar con LPS, lo cual sugiere que esta molécula constituye un posible sitio de unión a la superficie de bacterias Gram negativas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Ajees, A.A., Anantharamaiah, G.M., Mishra, V.K., Hussain, M.M. y Murthy, H.M. (2006). Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(7): 2126-2131.

Amthauer, R., Concha, M., Villanueva, J. y Krauskopf, M. (1988). Interaction of cibacron blue and anilinonaphthalenesulphonate with lipoproteins provides a new means for simple isolation of these plasma proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. **154**(2): 752-757.

Amthauer, R., Villanueva, J., Vera, M.I., 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 B Biochem Mol Biol*. **92**(4): 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, 153 pp.

Babin, P.J. y Vernier, J.M. (1989). Plasma Lipoproteins in Fish. *J Lipid Res*. **30**(4): 467-489.

Bauer, R. y Dicks, L.M. (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int J Food Microbiol.* **101**(2): 201-216.

Bingle, C.D. y Craven, C.J. (2004). Meet the relatives: a family of BPI and LBP related proteins. *Trends Immunol.* **25**(2): 53-55.

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.

Boman, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol.* **13**: 61-92.

Borregaard, N. (2001). Antibiotic Molecules: Intracelullar. En: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons: 1-8.

Bradshaw, J.P. (2003). Cationic antimicrobial peptides - Issues for potential clinical use. *Biodrugs.* **17**(4): 233-240.

Breukink, E., van Heusden, H.E., Vollmerhaus, P.J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A.J.R. y de Kruijff, B. (2003). Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J Biol Chem.* **278**(22): 19898-19903.

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

Brooks, S., Clark, G.T., Wright, S.M., Trueman, R.J., Postle, A.D., Cossins, A.R. y Maclean, N.M. (2002). Electrospray ionisation mass spectrometric analysis of lipid restructuring in the carp (*Cyprinus carpio* L.) during cold acclimation. *J Exp Biol.* **205**(Pt 24): 3989-3997.

Brotz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P.E. y Sahl, H.G. (1998). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**(1): 154-160.

Brotz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E. y Sahl, H.G. (1995). Mode of action of the lantibiotic Mersacidin - Inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**(3): 714-719.

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**(1-2): 4-46.

Bulet, P., Stocklin, R. y Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.* **198**(1): 169-184.

Byrnes, L., Luo, C.C., Li, W.H., Yang, C.Y. y Chan, L. (1987). Chicken apolipoprotein A-I: cDNA sequence, tissue expression and evolution. *Biochem Biophys Res Commun.* **148**(1): 485-492.

Cabana, V.G., Reardon, C.A., Wei, B., Lukens, J.R. y Getz, G.S. (1999). SAA-only HDL formed during the acute phase response in ApoA-I  $+/+$  and ApoA-I  $-/-$  mice. *J Lipid Res.* **40**(6): 1090-1103.

Chen, H.M., Chan, S.C., Lee, J.C., Chang, C.C., Murugan, M. y Jack, R.W. (2003). Transmission electron microscopic observations of membrane effects of antibiotic cecropin B on *Escherichia coli*. *Microsc Res Tech.* **62**(5): 423-430.

Cho, J.H., Park, I.Y., Kim, H.S., Lee, W.T., Kim, M.S. y Kim, S.C. (2002). Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish. *FASEB J.* **16**(1): 429-431.

Cole, A.M. y Ganz, T. (2000). Human antimicrobial peptides: Analysis and application. *Biotechniques.* **29**(4): 822-831.

Concha, M.I., Molina, S., Oyarzun, C., Villanueva, J. y Amthauer, R. (2003). Local expression of apolipoprotein A-I gene and a possible role for HDL in primary defence in the carp skin. *Fish Shellfish Immunol.* **14**(3): 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., 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.* **208**(Pt 7):1393-1399.

Cristofaro, P. y Opal, S.M. (2006). Role of Toll-like receptors in infection and immunity - Clinical implications. *Drugs.* **66**(1): 15-29.

Dai, M., Ziesman, S., Ratcliffe, T., Gill, R.T. y Copley, S.D. (2005). Visualization of protoplast fusion and quantitation of recombination in fused protoplasts of auxotrophic strains of *Escherichia coli*. *Metab Eng.* **7**(1): 45-52.

De Haas, C.J.C., van Leeuwen, H.J., Verhoef, J., van Kessel, K.P.M. y van Strijp, J.A.G. (2000). Analysis of lipopolysaccharide (LPS)-binding characteristics of serum components using gel filtration of FITC-labeled LPS. *J Immunol Methods.* **242**(1-2): 79-89.

Deleage, G., Combet, C., Blanchet, C. y Geourjon, C. (2001). ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput Biol Med.* **31**(4): 259-267.

Dempsey, C.E. (1990). The actions of melittin on membranes. *Biochim Biophys Acta.* **1031**(2): 143-161.

Du Pasquier, L. (2005). Meeting the demand for innate and adaptive immunities during evolution. *Scand J Immunol.* **62 Suppl 1**: 39-48.

Eaton, L.C., Erdos, G.W., Vreeland, N.L. y Ingram, L.O. (1981). Failure of *Escherichia coli* to alter its fatty acid composition in response to cholesterol-induced changes in membrane fluidity. *J Bacteriol.* **146**(3): 1151-1153.

Fenton, M.J. y Golenbock, D.T. (1998). LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol.* **64**(1): 25-32.

Fernandes, J.M., Kemp, G.D., Molle, M.G. y Smith, V.J. (2002). Anti-microbial properties of histone H2A from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem J.* **368**(Pt 2): 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**(Pt 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-function relationships. *J Lipid Res.* **41**(6): 853-872.

Gallo, R.L., Murakami, M., Ohtake, T. y Zaiou, M. (2002). Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol.* **110**(6): 823-831.

Ganz, T. (2002). Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest.* **109**(6): 693-697.

Garner, B., Waldeck, A.R., Witting, P.K., Rye, K.A. y Stocker, R. (1998). Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem.* **273**(11): 6088-6095.

Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L.L. y Deber, C.M. (2005). Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *J Biol Chem.* **280**(40): 33960-33967.

Gordon, Y.J., Romanowski, E.G. y McDermott, A.M. (2005). A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res.* **30**(7): 505-515.

Gruys, E., Toussaint, M.J., Niewold, T.A. y Koopmans, S.J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* **6**(11): 1045-1056.

Gupta, H., Dai, L., Datta, G., Garber, D.W., Grenett, H., Li, Y., Mishra, V., Palgunachari, M.N., Handattu, S., Gianturco, S.H., Bradley, W.A., Anantharamaiah, G.M. y White, C.R. (2005). Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by an apolipoprotein AI mimetic peptide. *Circ Res.* **97**(3): 236-243.

Hancock, R.E. y Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett.* **206**(2): 143-149.

Hancock, R.E.W. y Chapple, D.S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**(6): 1317-1323.

Ho, S.P., Hsu, T.Y., Chen, M.H. y Wang, W.S. (2000). Antibacterial effect of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria. *J Vet Med Sci.* **62**(5): 479-485.

Hoek, K.S., Milne, J.M., Grieve, P.A., Dionysius, D.A. y Smith, R. (1997). Antibacterial activity in bovine lactoferrin-derived peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**(1): 54-59.

Holvoet, P., Zhao, Z., Deridder, E., Dhoest, A. y Collen, D. (1996). Effects of deletion of the carboxyl-terminal domain of ApoA-I or of its substitution with helices of ApoA-II on in vitro and in vivo lipoprotein association. *J Biol Chem.* **271**(32): 19395-19401.

Hu, G., Chen, B. y Yan, X. (1994). The physiological function of plasma ApoA-I - the anti-viral effects of ApoA-I and its fragments. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* **16**(2): 98-103.

Hume, D. y Hertzog, P. (2006). Innate immunity - Editorial overview. *Curr Opin Immunol.* **18**(1): 1-2.

Huttenhuis, H.B., Grou, C.P., Taverne-Thiele, A.J., Taverne, N. y Rombout, J.H. (2006). Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching. *Fish Shellfish Immunol.* **20**(4): 586-596.

Hyka, N., Dayer, J.M., Modoux, C., Kohno, T., Edwards, C.K., 3rd, Roux-Lombard, P. y Burger, D. (2001). Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood.* **97**(8): 2381-2389.

Janeway, C.A. y Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* **20**: 197-216.

Jann, B., Reske, K. y Jann, K. (1975). Heterogeneity of lipopolysaccharides. Analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Biochem.* **60**(1): 239-246.

Jenssen, H., Hamill, P. y Hancock, R.E.W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microb Rev.* **19**(3): 491-511.

Juretic, D., Chen, H.C., Brown, J.H., Morell, J.L., Hendler, R.W. y Westerhoff, H.V. (1989). Magainin-2 amide and analogs - Antimicrobial activity, membrane depolarization and susceptibility to proteolysis. *FEBS Lett.* **249**(2): 219-223.

Karlsson, H., Leanderson, P., Tagesson, C. y Lindahl, M. (2005). Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* **5**(5): 1431-1445.

Kawasaki, H., Isaacson, T., Iwamuro, S. y Conlon, J.M. (2003). A protein with antimicrobial activity in the skin of Schlegel's green tree frog *Rhacophorus schlegelii* (Rhacophoridae) identified as histone H2B. *Biochem Biophys Res Commun.* **312**(4): 1082-1086.

Kirschning, C.J., Au-Young, J., Lamping, N., Reuter, D., Pfeil, D., Seilhamer, J.J. y Schumann, R.R. (1997). Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics*. **46**(3): 416-425.

Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krotz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrucker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P.S., Vogelmeier, C., Gallo, R.L., Clauss, M. y Bals, R. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest*. **111**(11): 1665-1672.

Kono, T. y Sakai, M. (2003). Molecular cloning of a novel bactericidal permeability-increasing protein/lipopolysaccharide-binding protein (BPI/LBP) from common carp *Cyprinus carpio* L. and its expression. *Mol Immunol*. **40**(5): 269-278.

Laccotripe, M., Makrides, S.C., Jonas, A. y Zannis, V.I. (1997). The carboxyl-terminal hydrophobic residues of apolipoprotein A-I affect its rate of phospholipid binding and its association with High Density Lipoprotein. *J Biol Chem*. **272**(28): 17511-17522.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**(5259): 680-685.

Laflamme, C., Lavigne, S., Ho, J. y Duchaine, C. (2004). Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. *J Appl Microbiol.* **96**(4): 684-692.

Lehrer, R.I., Barton, A., Daher, K.A., Harwig, S.S.L., Ganz, T. y Selsted, M.E. (1989). Interaction of human defensins with *Escherichia coli* - Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest.* **84**(2): 553-561.

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**(6): 755-764.

Levels, J.H., Abraham, P.R., van Barreveld, E.P., Meijers, J.C. y van Deventer, S.J. (2003). Distribution and kinetics of lipoprotein-bound lipoteichoic acid. *Infect Immun.* **71**(6): 3280-3284.

Liang, H.Q., Rye, K.A. y Barter, P.J. (1994). Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from High Density Lipoproteins. *J Lipid Res.* **35**(7): 1187-1199.

López, R. (2006). Estudio comparativo de apolipoproteína A-I de carpa y humana a nivel estructural y funcional. Tesis para optar al grado de Bioquímico, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, 107 pp.

Luo, C.C., Li, W.H., Moore, M.N. y Chan, L. (1986). Structure and evolution of the apolipoprotein multigene family. *J Mol Biol.* **187**(3): 325-340.

Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* **20**(2): 137-151.

Mak, P., Wojcik, K., Silberring, J. y Dubin, A. (2000). Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: hemocidins. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **77**(3): 197-207.

Mangoni, M.L., Papo, N., Barra, D., Simmaco, M., Bozzi, A., Di Giulio, A. y Rinaldi, A.C. (2004). Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. *Biochem J.* **380**(Pt 3): 859-865.

Marshall, S.H. y Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology.* **6**(3): 271-284.

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**(6): 1133-1140.

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**(3): 516-525.

Matsuzaki, K., Nakamura, A., Murase, O., Sugishita, K., Fujii, N. y Miyajima, K. (1997 (a)). Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge. *Biochemistry.* **36**(8): 2104-2111.

Matsuzaki, K., Sugishita, K., Harada, M., Fujii, N. y Miyajima, K. (1997 (b)). Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta.* **1327**(1): 119-130.

McFeters, G.A., Yu, F.P.P., Pyle, B.H. y Stewart, P.S. (1995). Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J Microbiol Methods.* **21**(1): 1-13.

Medzhitov, R. y Janeway, C. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med.* **343**(5): 338-344.

Metcalf, V.J., Brennan, S.O., Chambers, G. y George, P.M. (1999). High density lipoprotein (HDL), and not Albumin, is the major palmitate binding protein in New Zealand long-finned (*Anguilla dieffenbachii*) and short-finned eel (*Anguilla australis schmidtii*) plasma. *Biochim Biophys Acta.* **1429**(2): 467-475.

Motizuki, M., Itoh, T., Yamada, M., Shimamura, S. y Tsurugi, K. (1998). Purification, primary structure, and antimicrobial activities of bovine apolipoprotein A-II. *J Biochem (Tokyo)*. **123**(4): 675-679.

Muñoz, A. y Marcos, J.F. (2006). Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferricin-derived peptides. *J Appl Microbiol*. **101**(6): 1199-1207.

Navab, M., Anantharamaiah, G.M., Reddy, S.T., Hama, S., Hough, G., Grijalva, V.R., Yu, N., Ansell, B.J., Datta, G., Garber, D.W. y Fogelman, A.M. (2005). Apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **25**(7): 1325-1331.

Nell, M.J., Tjabringa, G.S., Wafelman, A.R., Verrijck, R., Hiemstra, P.S., Drijfhout, J.W. y Grote, J.J. (2006). Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. *Peptides*. **27**(4): 649-660.

Nibbering, P.H., Ravensbergen, E., Welling, M.M., van Berkel, L.A., van Berkel, P.H., Pauwels, E.K. y Nuijens, J.H. (2001). Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect Immun*. **69**(3): 1469-1476.

Ohta, M., Ito, H., Masuda, K., Tanaka, S., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R. y Kato, N. (1992). Mechanisms of antibacterial action of tachypleins and polyphemusins, a group of antimicrobial peptides isolated from Horseshoe-Crab hemocytes. *Antimicrob Agents Chemother.* **36**(7): 1460-1465.

Otvos, L., O, I., Rogers, M.E., Consolvo, P.J., Condie, B.A., Lovas, S., Bulet, P. y Blaszczyk-Thurin, M. (2000). Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry.* **39**(46): 14150-14159.

Otvos, L. (2005). Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *J Pept Sci.* **11**(11): 697-706.

Pancer, Z. y Cooper, M.D. (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* **24**: 497-518.

Panzenböck, U., Kritharides, L., Raftery, M., Rye, K.A. 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**(26): 19536-19544.

Papo, N. y Shai, Y. (2003). Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. *Biochemistry.* **42**(2): 458-466.

Papo, N. y Shai, Y. (2005). Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci.* **62**(7-8): 784-790.

Park, C.B., Yi, K.S., Matsuzaki, K., Kim, M.S. y Kim, S.C. (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 U S A.* **97**(15): 8245-8250.

Pasare, C. y Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* **6**(15): 1382-1387.

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.

Podda, E., Benincasa, M., Pacor, S., Micali, F., Mattiuzzo, M., Gennaro, R. y Scocchi, M. (2006). Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide. *Biochim Biophys Acta.* **1760**(11): 1732-1740.

Pownall, H.J., Massey, J.B., Kusserow, S.K. y Gotto, A.M., Jr. (1979). Kinetics of lipid-protein interactions: effect of cholesterol on the association of human plasma high-density apolipoprotein A-I with L-alpha-dimyristoylphosphatidylcholine. *Biochemistry.* **18**(4): 574-579.

Ridgway, N.D., Byers, D.M., Cook, H.W. y Storey, M.K. (1999). Integration of phospholipid and sterol metabolism in mammalian cells. *Prog Lipid Res.* **38**(4): 337-360.

Rifkin, M.R. (1991). Role of phospholipids in the cytotoxic action of High Density Lipoprotein on trypanosomes. *J Lipid Res.* **32**(4): 639-647.

Rohrer, L., Hersberger, M. y von Eckardstein, A. (2004). High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* **15**(3): 269-278.

Roth, B.L., Poot, M., Yue, S.T. y Millard, P.J. (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl Environ Microbiol.* **63**(6): 2421-2431.

Santander, C. (2002). Caracterización parcial del receptor para peroxidasa en membranas de ribete en cepillo del pez *Cyprinus carpio*. Tesis para optar al grado de Bioquímico, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, 71 pp.

Satchell, D.P., Sheynis, T., Shirafuji, Y., Kolusheva, S., Ouellette, A.J. y Jelinek, R. (2003). Interactions of mouse paneth cell alpha-defensins and alpha-defensin precursors with membranes. *J Biol Chem.* **278**(16): 13838-13846.

Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K. y Larsen, J.L. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl Environ Microbiol.* **66**(11): 4908-4915.

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.

Shai, Y. (2002). From innate immunity to de-novo designed antimicrobial peptides. *Curr Pharm Des.* **8**(9): 715-725.

Shin, K., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Tomita, M., Otsuka, Y. y Yamazaki, S. (1998). Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol.* **26**(6): 407-411.

Sorensen, O., Bratt, T., Johnsen, A.H., Madsen, M.T. y Borregaard, N. (1999). The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. *J Biol Chem.* **274**(32): 22445-22451.

Stallmann, H.P., Faber, C., Amerongen, A.V.N. y Wuisman, P.I.J.M. (2006). Antimicrobial peptides: review of their application in musculoskeletal infections. *Injury.* **37**: 34-40.

Tada, N., Sakamoto, T., Kagami, A., Mochizuki, K. y Kurosaka, K. (1993). Antimicrobial activity of lipoprotein particles containing apolipoprotein AI. *Mol Cell Biochem.* **119**(1-2): 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**(12): 7714-7720.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**(22): 4673-4680.

Thompson, K., Kobayashi, J., Childs, T., Wigle, D. y Rabinovitch, M. (1998). Endothelial and serum factors which include apolipoprotein A1 tether elastin to smooth muscle cells inducing serine elastase activity via tyrosine kinase-mediated transcription and translation. *J Cell Physiol.* **174**(1): 78-89.

Tossi, A., Tarantino, C. y Romeo, D. (1997). Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *Eur J Biochem.* **250**(2): 549-558.

Trevors, J.T. (2003). Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *J Biochem Biophys Methods.* **57**(2): 87-103.

Van der Kraan, M.I., Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E.C., Bolscher, J.G. y Nieuw Amerongen, A.V. (2004). Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*. **25**(2): 177-183.

Van der Kraan, M.I., Nazmi, K., van 't Hof, W., Amerongen, A.V., Veerman, E.C. y Bolscher, J.G. (2006). Distinct bactericidal activities of bovine lactoferrin peptides LFampin 268-284 and LFampin 265-284: Asp-Leu-Ile makes a difference. *Biochem Cell Biol*. **84**(3): 358-362.

Van Heusden, H. E., de Kruijff, B. y Breukink, E. (2002). Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry*. **41**(40): 12171-12178.

Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Navab, M., Anantharamaiah, G.M., Hui, E.K.-W., Nayak, D.P. y Fogelman, A.M. (2004). D-4F, an apolipoprotein A-I mimetic peptide, inhibits the inflammatory response induced by influenza a infection of human type II pneumocytes. *Circulation*. **110**(20): 3252-3258.

Verlhac, V. y Kiron, V. (2004). Nutrition and immune modulation in aquatic animals. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond*. **1**(4): 5-9.

Villarroel, F., Bastías, A., Casado, A., Amthauer, R. y Concha, M. (2007). Apolipoprotein A-I, an antimicrobial protein in *Oncorhynchus mykiss*: Evaluation of its expression in primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish. *Fish Shellfish Immunol.* **23**(1): 197-209.

Vizioli, J. y Salzet, M. (2002). Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci.* **23**(11): 494-496.

Wang, M. y Briggs, M.R. (2004). HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chem Rev.* **104**(1): 119-137.

Watts, M., Munday, B.L. y Burke, C.M. (2001). Immune response in teleost Fish. *Aust Vet J.* **79**(8): 570-574.

Weiss, R. L. (1976). Protoplast formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **128**(2): 668-70.

Wentzel, A., Christmann, A., Adams, T. y Kolmar, H. (2001). Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. *J Bacteriol.* **183**(24): 7273-7284.

Wu, A.H., 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.

Wurfel, M.M., Kunitake, S.T., Lichenstein, H., Kane, J.P. y Wright, S.D. (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med.* **180**(3): 1025-1035.

Yancey, P.G., Bortnick, A.E., Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Phillips, M.C. y Rothblat, G.H. (2003). Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23**(5): 712-719.

Yeaman, M.R. y Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* **55**(1): 27-55.

Yokoyama, S. (2005). Assembly of High Density Lipoprotein by the ABCA1/apolipoprotein pathway. *Curr Opin Lipidol.* **16**(3): 269-279.

Zannis, V.I., Chroni, A. y Krieger, M. (2006). Role of ApoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med.* **84**(4): 276-294.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* **415**(6870): 389-395.

Zheng, C.J., Yoo, J.S., Lee, T.G., Cho, H.Y., Kim, Y.H. y Kim, W.G. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* **579**(23): 5157-5162.

Zweigner, J., Schumann, R.R. y Weber, J.R. (2006). The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect.* **8**(3): 946-952.