

Sensibilidad *in vitro* de micobacterias a dos péptidos sintéticos híbridos con actividad antimicrobiana

E. ZERBINI^{1,3*}, D. ANDREU², G. TONARELLI³, M. D. SEQUEIRA¹

¹Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Dr. Emilio Coni - ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán - Blas Parera 8260, (3000) Santa Fe; ²Laboratorio de Síntesis - Universidad de Pompeu Fabra - Barcelona España;

³Departamento de Química Orgánica - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral - Santa Fe, Argentina

*Correspondencia: E-mail: elsazerbini@arnet.com.ar

RESUMEN

El aumento de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a las drogas esenciales y de casos de micobacteriosis diseminadas debidas al complejo *Mycobacterium avium* hacen necesario investigar nuevos agentes antimicobacterianos. Los péptidos antimicrobianos son un nuevo grupo de antibióticos que poseen un mecanismo de acción particular. Algunos de ellos, como la cecropina y la melitina, han sido aislados de insectos y han demostrado buena actividad *in vitro* contra bacterias gram positivas y gram negativas. Híbridos sintéticos de esos péptidos han presentado mayor actividad que los péptidos individuales. En este trabajo se evaluó la actividad *in vitro* de dos péptidos híbridos sintéticos de melitina y cecropina contra *M. tuberculosis*, complejo *M. avium*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium smegmatis*. Se determinó la concentración inhibitoria mínima empleando la técnica de macrodilución en caldo. Luego se estableció la concentración bactericida mínima en medio Lowenstein Jensen. Los péptidos evaluados mostraron ser activos *in vitro* contra *M. smegmatis*, mientras que no presentaron ninguna actividad contra las otras micobacterias estudiadas.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos, micobacterias, cecropina, melitina

ABSTRACT

In-vitro activity of two hybrid synthetic peptides having antimicrobial activity against mycobacteria. The increase in both *Mycobacterium tuberculosis* human clinical isolates resistant to the essential drugs and cases of disseminated micobacteriosis due to *Mycobacterium avium* Complex, underlines the need to investigate new antimicobacterial agents. The antimicrobial peptides are a new group of active antibiotics with a particular mechanism of action. Some of them, like cecropin and melittin, isolated from insects, have demonstrated good *in vitro* activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Synthetic hybrids of those peptides have been more active than individual peptides. In this study, the *in vitro* activity of two hybrid synthetic peptides from melittin and cecropin against *M. tuberculosis*, *M. avium* Complex, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis* has been evaluated. The minimal inhibitory concentration was determined by using the broth macrodilution technique. The minimal bactericide concentration in Lowenstein Jensen medium was then obtained. The peptides studied were active, *in vitro*, against *M. smegmatis*, but they did not show any activity against the other mycobacteria analyzed.

Key words: antimicrobial peptides, mycobacteria, cecropin, melittin

Cerca de un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* y en riesgo de desarrollar la enfermedad. Cada año más de ocho millones de personas padecen tuberculosis (TBC) y alrededor de dos millones mueren (4). La pandemia de SIDA ha tenido gran impacto sobre la distribución de esta enfermedad, ya que la infección por el VIH contribuyó a incrementar significativamente la incidencia mundial de TBC.

Otro factor que contribuye al aumento de la TBC y de las tasas de mortalidad es la emergencia de nuevas cepas de *M. tuberculosis* resistentes a algunas o a todas las drogas antituberculosas disponibles. Esta resistencia es causada principalmente por los tratamientos deficientes, ya sea por falta de adherencia del enfermo o por discontinuidad en la provisión de los medicamentos.

La TBC resistente a las drogas es más difícil y más cara de tratar. En Argentina, el esquema de tratamiento completo con drogas esenciales que provee el Programa Nacional de Control de TBC cuesta 20 US\$. Un esquema con drogas de reserva para un paciente multirresistente (resistente por lo menos a isoniazida y rifampicina) incrementa el costo entre 100 y 200 veces, según el tipo de tratamiento utilizado. Por otra parte, los tratamientos alternativos deben ser administrados durante no menos de 18 meses, y presentan serios problemas de intolerancia o efectos adversos indeseables.

También ha aumentado la frecuencia de infección diseminada por micobacterias del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) en los pacientes inmunocomprometidos, particularmente por el VIH. Estas micobacterias son na-

turalmente resistentes a las drogas antituberculosas esenciales. Frente a lo expuesto, se hace necesario investigar nuevos agentes antimicobacterianos.

Los péptidos antimicrobianos (PA) son un nuevo grupo de antibióticos activos con un mecanismo de acción particular. Estos péptidos son parte de un sistema inmune innato ampliamente distribuido en la naturaleza, que ha sido encontrado en muchas especies animales (8).

Algunos de estos PA, como el PR-39 –aislado del intestino de cerdo y rico en prolina-arginina– y otros derivados de la granulisina, presentes en los gránulos de los linfocitos T citotóxicos humanos, han demostrado ser activos contra *M. tuberculosis* (11, 15). Otros péptidos, como las siringopeptinas producidas por bacterias presentes en vegetales, resultaron activos contra *Mycobacterium smegmatis* (7).

Los insectos presentan poderosas reacciones de defensa antimicrobiana. Si bien están expuestos continuamente a microorganismos potencialmente patógenos y parásitos eucariotas, sólo unos pocos encuentros resultan en infección. Utilizan como mecanismo de defensa principalmente su inmunidad innata, la cual parece ser 100 veces más eficiente que la adquirida. Los PA pueden ser detectados en la hemolinfa de los insectos dos a cuatro horas después de la injuria séptica. Un insecto produce de 10 a 15 péptidos antibióticos y cada uno de ellos exhibe un espectro de actividad diferente (12).

Las cecropinas, como la A, B y D, se ubican entre los primeros péptidos aislados de insectos. Tienen 35 a 39 residuos de aminoácidos con un extremo C-terminal tipo amida. Tanto el rango de actividad como su conformación proveen claves significativas para explicar su modo de acción. Las cecropinas muestran un amplio espectro de actividad contra bacterias gram positivas y negativas (12). Se ha postulado que la unión de los péptidos a la superficie externa de la bacteria podría ayudar a que estos difundan eficientemente hacia la membrana interna, la cual probablemente sea el blanco de acción de la cecropina. El ordenamiento estructural anfipático de los PA juega un rol clave en el mecanismo de acción. El dominio cargado positivamente iniciaría la interacción del péptido con la superficie bacteriana cargada negativamente, y la propiedad hidrofóbica permitiría que el péptido entre en la membrana interna. Las moléculas adoptarían una conformación helicoidal para formar canales o poros que, según varios autores, serían los responsables de la actividad (9, 10). Otros autores sugieren que el mecanismo de acción consistiría en un primer pasaje a través de la membrana, pero que el blanco se encontraría en el citoplasma (3). Tanto la cecropina A (CA) como la B mostraron muy poca actividad hemolítica contra eritrocitos de carnero; así también, la CA no presentó toxicidad contra las células COS originadas en primates, aun en las máximas concentraciones estudiadas (50 µM). La CA, de 37 aminoácidos, presenta residuos aminoácidos cargados positivamente en la región N-terminal.

La melitina (ME), péptido alfa-helicoidal anfipático citotóxico con amplia actividad antibacteriana, es el principal componente del veneno de abeja y representa el 50% de su peso seco. Posee 26 residuos aminoácidos y es activa contra un amplio rango de agentes infecciosos, incluyendo bacterias gram positivas y negativas, pero presenta actividad hemolítica (5).

Se han realizado esfuerzos para sintetizar híbridos que contengan porciones de secuencias aminoacídicas de dos péptidos con diferentes propiedades. Varios híbridos de segmentos de CA combinados con segmentos de ME han demostrado mayor actividad antimicrobiana y un espectro de acción más amplio que los péptidos individuales de los cuales provienen, sin introducir las propiedades hemolíticas de la melitina (12).

El único antecedente de estudios de acción de estos dos péptidos y sus híbridos contra micobacterias fue reportado por Merrifield et al (1994), quienes evaluaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) y las concentraciones bactericidas mínimas (CBM) frente a aislamientos de *M. smegmatis*. Estos investigadores encontraron CIMs entre 1,1 y 9,4 µM para diferentes híbridos de CA y ME, con una actividad relativa promedio entre 60 y 490% con relación a una actividad de 100% para la rifampicina (12).

Varias compañías biotecnológicas han desarrollado diferentes aplicaciones terapéuticas para controlar infecciones microbianas, desde la administración tópica de los péptidos hasta tratamientos sistémicos. Ensayos clínicos de fase I y II han demostrado una resistencia bacteriana limitada por parte de las cepas probadas (6).

En este trabajo se estudió la actividad *in vitro* de dos péptidos sintéticos híbridos de ME y CA contra *M. tuberculosis*, MAC, *Mycobacterium fortuitum* y *M. smegmatis*.

Los péptidos fueron provistos por el Laboratorio de Síntesis de la Universidad de Pompeu Fabra. Estos fueron sintetizados en fase sólida.

Se describen a continuación las secuencias de los dos híbridos de CA y ME empleados en este trabajo:

CA(1-7)Me(2-9): KWKLFFKKIGAVLKVL-amida PM: 1789,3

CA(1-8)Me(1-18): KWKLFFKKIGIGAVLKVLTGGLPALS-amida PM: 2794,56

Los péptidos se disolvieron en agua desmineralizada estéril y se almacenaron a -20 °C.

Se emplearon aislamientos clínicos en medio Lowenstein Jensen de *M. tuberculosis* (n=10), MAC (n=6), *M. fortuitum* (n=2) y *M. smegmatis* (n=1), a 37 °C. Para determinar la sensibilidad *in vitro* de los aislamientos en estudio frente a las drogas antituberculosas esenciales y a las de reserva, como son la kanamicina, la cicloserina y la etionamida, se utilizó el método de las proporciones en medio de Lowenstein Jensen, que consiste en determinar la proporción de mutantes resistentes que tiene la cepa (2). Para evaluar la actividad *in vitro* de los péptidos contra las cepas en estudio, se empleó el método de

macrodilución en caldo 7H9 de Middlebrook, con el agregado de OADC (ácido oleico, dextrosa, albúmina y catalasa) (14). El inóculo se ajustó a 10^4 - 10^5 UFC/ml. Se probaron concentraciones de péptidos de 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En el caso particular de *M. smegmatis* se probaron, además de las anteriores, concentraciones de 256 y 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se consideró CIM a la menor concentración del antimicrobiano que inhibió el 99% del desarrollo, o sea, a la concentración del tubo cuya opacidad fue igual o menor que la de un control correspondiente a una dilución 1/100 del inóculo.

Para determinar la CBM, una vez leída la CIM, se sembraron muestras de las distintas diluciones en medio Lowenstein Jensen y se incubaron a 37 °C. Se consideró CBM a la concentración del tubo cuyo desarrollo en medio Lowenstein Jensen fue igual o menor que el observado en el control correspondiente a una dilución 1/1000 del inóculo.

Los aislamientos de *M. tuberculosis*, tanto resistentes como sensibles a las drogas antituberculosas de primera línea, así como los de MAC y los de *M. fortuitum*, resultaron resistentes a ambos péptidos híbridos en todo el rango de concentraciones estudiadas. El aislamiento de *M. smegmatis* resultó sensible a los mismos; la CIM fue de 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (35,5 μM de CA(1-7)Me(2-9) y 22,8 μM de CA(1-8)Me(1-18)) y la CBM mayor a 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (71 μM y 45,6 μM , respectivamente).

Los 10 aislamientos de *M. tuberculosis* estudiados (6 sensibles y 4 resistentes a todas las drogas antituberculosas esenciales) resultaron sensibles a las otras drogas de segunda línea probadas, sólo uno resultó resistente a claritromicina. Asimismo, de los 6 aislamientos de MAC sólo uno resultó resistente a todas las drogas probadas.

Este trabajo corrobora lo reportado por otros autores acerca de que los péptidos estudiados presentan actividad antimicrobiana contra *M. smegmatis*; sin embargo, las CIM y CBM obtenidas son mayores que las previamente reportadas. Esto puede deberse a las diferentes cepas utilizadas y/o a las técnicas empleadas. El medio utilizado contenía albúmina bovina, la cual demostró en otros estudios poseer actividad inhibitoria contra otros péptidos antimicrobianos (1).

Aunque CA(1-7)Me(2-9) y CA(1-8)Me(1-18) demostraron actividad contra aislamientos hospitalarios multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, ninguno de estos péptidos presentó actividad antimicrobiana frente a *M. tuberculosis* (tanto sensible como resistente a drogas esenciales), a MAC y a *M. fortuitum* en el rango de concentraciones probadas (5).

Sería conveniente estudiar posibles sinergismos de estos péptidos con otros antimicobacterianos, ya que la formación de poros en la cubierta externa de la bacteria,

debido a un aumento de permeabilidad de la membrana plasmática, facilitaría la acción de los mismos (1).

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado en parte por los Proyectos CAI+D 2002 N°18-Programa 127- UNL y PICTO N°14-13215-UNL-SECYT.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers (Peptide Science)* 1998; 47: 415-33.
2. Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Rev Tuberc Pneumol* 1963; 27: 217-72.
3. Cudic M, Otvos L Jr. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr Drug Targets* 2002; 3: 101-6.
4. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Ravaglione MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. *JAMA* 1999; 282: 677-86.
5. Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, D'Amato G, Silvestri C, Del Prete MS, et al. Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9) NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 2003; 24: 1315-8.
6. Gordon Y, Romanowski E. A review of antimicrobial peptides and their therapeutics potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res* 2005; 30: 505:15.
7. Grgurina I, Bensaci M, Pocsfalvi G, Mannina L, Cruciani O, Fiore A, et al. Novel cyclic lipopeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* strain 508 and syringopeptin antimicrobial activities. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 5037-45.
8. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet* 1997; 349: 419-22.
9. Johansen C, Verheul A, Gram L, Gill T, Abie T. Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 1155-9.
10. Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial defensins peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 210-4.
11. Linde C, Hoffner S, Refai E, Andersson M. In vitro activity of PR-39, a proline-arginine-rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 575-80.
12. Merrifield RB, Merrifield EL, Juvvadi P, Andreu D, Boman HG. Design and synthesis of antimicrobial peptides. En: Boman HG, Marsh J, Goode JA, editors. *Antimicrobial Peptides*. Ciba Foundation Symposium 186. Chichester, John Wiley and Sons, 1994, p. 5-26.
13. Otvos Jr L. Antibacterial peptides isolated from insects. *J Peptide Sci* 2000; 6: 497-511.
14. Siddiqi SH, Hawkins JE, Laszlo A. Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radiometric procedure and two conventional methods. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 919-23.
15. Toro JC, Hoffner S, Linder C, Andersson M, Andersson J, Grundstrom S. Enhanced susceptibility of multidrug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* to granulysin peptides correlates with a reduced phitness phenotype. *Microbes Infect* 2006; 8: 1985-93.