



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**DESCUBRIMIENTO DE ANTIBIÓTICOS EN LA
ERA DE LA BIOLOGÍA ESTRUCTURAL**

Autor: María García Martín

Fecha: Julio de 2020

Tutor: María Concepción Civera Tejuca

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	3
2	INTRODUCCIÓN	3
3	OBJETIVOS	4
4	MATERIAL Y MÉTODOS.....	4
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4
5.1	<i>Biología Estructural</i>	4
5.2	<i>Técnicas de Biología Estructural</i>	5
5.3	<i>Antibióticos</i>.....	10
5.3.1	<i>Daptomicina</i>	10
5.3.2	<i>Dalbavancina</i>	13
5.3.3	<i>Plectasina, un antimicrobiano en investigación</i>	16
6	CONCLUSIÓN	19
7	BIBLIOGRAFÍA	20

1 RESUMEN

Con la aparición de las resistencias a los antibióticos surge la necesidad de crear nuevas opciones terapéuticas que nos permitan afrontar las infecciones antimicrobianas. Estas resistencias han aparecido como consecuencia de un uso inadecuado de los antibióticos, ya que esto favorece que las bacterias desarrollen los mecanismos de resistencias que les permiten “huir” de los antibióticos.

La Biología Estructural es una rama de la ciencia que permite el estudio de macromoléculas, sobre todo de proteínas, que nos ha servido para el desarrollo de nuevos antibióticos. Ha permitido el estudio de los mecanismos de resistencias de las bacterias, diseñar nuevos antibióticos, conocer la posible diana terapéutica y caracterizar la interacción de la diana con el antimicrobiano.

Las técnicas que se usan en la Biología Estructural son la Criomicroscopía Electrónica, la Difracción de Rayos X y la Resonancia Magnética Nuclear.

Entre los nuevos antibióticos caracterizados por los métodos de Biología Estructural que se están utilizando en terapéutica tenemos la Daptomicina y la Dalbavancina. Incluimos otro antibiótico, la plectasina, que está en investigación y los resultados demuestran una gran eficacia terapéutica y además otras posibles indicaciones como inmunosupresor o antiviral.

Palabras clave: Resistencia a Antibióticos, Antibióticos peptídicos, Biología Estructural, Daptomicina, Dalbavancina, Plectasina.

2 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha observado un aumento de las resistencias de los microorganismos a los antibióticos. El abuso en su consumo ha permitido que surjan cepas con mecanismos de resistencia que, en muchas ocasiones nos dejan prácticamente sin alternativas para el tratamiento de las infecciones (1)

La principal causa de la aparición de las resistencias es el consumo de antibióticos. Es algo inevitable pero se puede minimizar con el uso racional de los mismos. Las bacterias tienen la capacidad de desarrollar mecanismos para sobrevivir al ataque de los antibióticos y, además, intercambian esta información muy fácilmente entre ellas (2)

De esta manera surgen las **bacterias multi-fármaco-resistentes (MDR)** y **extremadamente-fármaco-resistentes (XDR)**, las cuales tienen un impacto significativo sobre la mortalidad, la estancia hospitalaria y los costes asociados. Las bacterias multiresistentes más problemáticas se engloban en las bacterias **ESKAPE** (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y Enterobacterias) y las **BLEE** organismos productores de beta-lactamasas de amplio espectro, (*Enterobacter* y *Escherichia coli*) (3). Hay que mencionar dos bacterias más que están empezando a ser un problema, son *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycobacterium tuberculosis* ya que cada vez presentan más resistencias y se están empezando a considerar un problema.

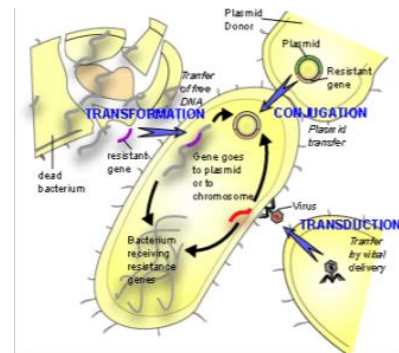


Figura 1. Formas de intercambiar la información entre las bacterias (2).

El problema de que surjan estas cepas resistentes hace que los tratamientos dejen de ser eficaces transmitiéndose de unos individuos a otros aumentando el número de infecciones producidas por estas cepas, siendo infecciones difíciles de resolver o incluso sin disponer de un tratamiento alternativo (4).

Para poder afrontar este problema, en España se ha creado el Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos. Este plan plantea dos estrategias para abordar el problema: reducir el consumo de antibióticos y disminuir la necesidad de utilizar antibióticos en medicina humana y veterinaria (5).

Una de las estrategias que se sigue es fomentar el desarrollo y la investigación de nuevos antibióticos. Una de las formas de desarrollo es la Biología Estructural. La **Biología Estructural** aborda el problema de las resistencias a nivel molecular estudia las proteínas que intervienen en procesos metabólicos y fisiológicos, para modificar así las actividades vitales para la bacteria (6).

Por tanto, la resistencia a los antibióticos es un problema que va en aumento y que se pretende abordar con distintas estrategias, en España esas estrategias están recogidas en el Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos. La Biología Estructural es una rama de la biología que va a ser usada para poder desarrollar nuevos antibióticos.

3 OBJETIVOS

Revisión bibliográfica sobre el diseño de nuevos antibióticos basándonos en su estructura molecular como estrategia para abordar las resistencias a los antibióticos.

4 MATERIAL Y MÉTODOS.

En la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de artículos y estudios disponibles en bases de datos como PubMed, Elsevier, Protein Data Bank (PDB), Google, Google Academy, entre otras; utilizando palabras clave como “antibiotic peptidic”, “Biología Estructural”. También se han consultado datos de bases oficiales como el Centro de Información de Medicamentos (CIMA).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Biología Estructural

La **Biología Estructural** es una rama de la biología molecular, la bioquímica y la biofísica, que estudia la estructura de macromoléculas biológicas, especialmente proteínas y ácidos nucleicos, y cómo afectan las alteraciones de dicha estructura en sus funciones bioquímicas (7). Es la región del estudio biológico que corresponde a las estructuras que no se pueden observar por medio de instrumentos ópticos del rango visible (6).

Las técnicas más usadas en la Biología Estructural son la Microscopía Electrónica, la Cristalografía de Rayos X y la Resonancia Magnética Nuclear. Estas técnicas están basadas en principios físicos que nos van a permitir deducir la estructura de las macromoléculas y desarrollar nuevos fármacos a partir de ellas. Son técnicas complementarias que aportan diferentes visiones de los objetos por las limitaciones que tienen cada una de ellas.

5.2 Técnicas de Biología Estructural

La **Microscopía Electrónica** consiste en la reconstrucción tridimensional de las moléculas a partir de imágenes de las mismas con orientaciones diversas proporcionando un modelo fiable en 3D (8).

La técnica más usada es la **Criomicroscopía**. Comienza con la congelación ultrarrápida de la muestra a -180°C . Después esa muestra se somete a un haz de electrones con alto brillo en un Microscopio Electrónico, obteniendo imágenes de proyección de una proteína o complejo macromolecular en diferentes direcciones. Después de tener las imágenes hay que procesarlas para poder determinar la estructura. Los pasos a seguir para procesarlas son: la corrección de los defectos de las imágenes generadas por el microscopio, la extracción, la clasificación y la selección de las partículas de interés, la generación de un modelo inicial, la determinación de la heterogeneidad presente en la muestra, el refinamiento y la obtención de la estructura final.

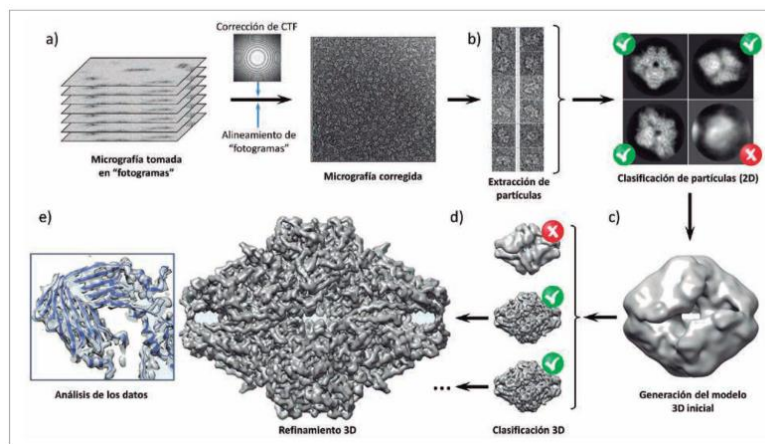


Figura. 2. Procesamiento de datos obtenidos por Criomicroscopía (9)

Con esta técnica se obtienen imágenes que no tienen distorsión y con una buena resolución, el problema es que tienen poco contraste. Para solventar el problema del contraste lo que se hace es una media de muchas imágenes y así conseguir una reconstrucción 3D de las partículas mediante procesamiento computacional de la señal.

Los factores que determinan el resultado de las imágenes son:

- La flexibilidad de la muestra. Si una molécula posee una alta variabilidad estructural, la dinámica estructural de las moléculas hace que la resolución se vea comprometida.
- El tamaño de las moléculas. Si son muy pequeñas su alineamiento es más difícil, por tanto, se obtienen imágenes con muy poca resolución.
- Factores técnicos como que las moléculas tengan tendencia a adsorberse en las rejillas en una posición concreta.

Cuando no se puede obtener la estructura atómica por esta técnica lo que se hace es complementar los resultados con estructuras atómicas que previamente se han obtenido por otras técnicas, generando así modelos estructurales.

La **Difracción de Rayos X** es una técnica que consiste en hacer pasar un haz de rayos X monocromático a través de una muestra cristalina. Debido a la cristalinidad de la muestra se produce un efecto de interferencia constructiva de las ondas de rayos X dispersadas por cada átomo. La ley de Bragg es la ley de interferencia que va a relacionar el espaciado entre planos

cristalinos, la longitud de onda incidente y el ángulo de dispersión. Para tener en cuenta la difracción anómala de algunos átomos podemos variar la energía o longitud de onda de los rayos X, obteniendo así la estructura tridimensional.

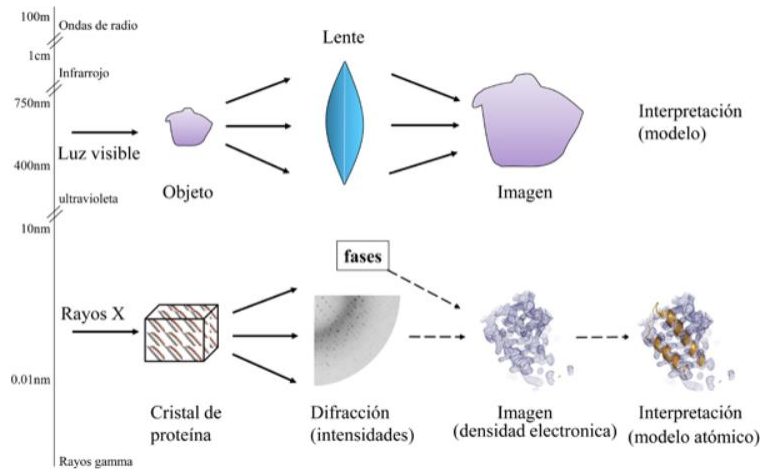


Figura. 3. Analogía entre la microscopía óptica y la difracción de rayos X (10).

Para obtener las estructuras de las moléculas proteicas se usa una variante de la Difracción de Rayos X que es la Cristalografía de rayos X, en la que hay que cristalizar la muestra antes de someterla al haz de rayos X.

A la hora de realizar la cristalografía hay que poner a punto el método de expresión y purificación de la muestra que permita obtener gran cantidad de proteína soluble, homogéneo y de calidad.

En la cristalografía, el **paso limitante** es el crecimiento de cristales de proteínas que tengan la calidad suficiente para su determinación, por lo tanto, es muy importante que las condiciones de cristalización se cumplan. Antes de continuar al siguiente paso hay que verificar que los cristales tienen la macromolécula que se va a estudiar en vez de las sales precipitantes o el tampón (11)

Una vez obtenidos los cristales, se realiza un **análisis de difracción**. Para ello, antes de la primera exposición tenemos que calcular el ángulo del cristal al detector y así ajustar la recolección de puntos difractados. Para realizar el análisis se usa una placa de imagen en la que se obtiene la remisión de los cristales en pocos minutos, pero en la actualidad se está sustituyendo por detectores que utilizan la tecnología de dispositivo acoplado cargado (CCD). Estos detectores tienen la ventaja de que los tiempos de lectura son de segundos en vez de minutos.

Antes de saber qué información podemos obtener de la imagen que nos da el detector es necesario confirmar que la difracción se extiende a una resolución suficiente para que sea posible la determinación de la estructura. Esto implica que visualmente se puedan detectar los conjuntos de puntos ordenados hacia el borde de la imagen de difracción.

La mayoría de los programas de visualización de imágenes ya incluyen un algoritmo que calcula este parámetro (11).

Ahora pasamos a la **recopilación de datos**. En la determinación de la estructura hay varias condiciones (11):

- Simetría cristalográfica: es la cantidad de simetría que hay entre el sistema cristalino y el grupo espacial.
- Simetría no cristalográfica: es la cantidad de partículas iguales que hay en la celda unitaria que están relacionadas por las operaciones de simetría.
- Disponibilidad de reemplazo molecular: se busca si existe alguna estructura con similitud estructural se puede usar como modelo inicial y calcular los nuevos elementos estructurales. La búsqueda de una estructura similar se hace en el Protein Data Bank (PDB), que es una base de datos que recoge todas las estructuras de proteínas.
- Límite superior de resolución requerido: está determinado por la calidad del cristal y por el conjunto de datos recopilados hasta el límite superior de la difracción obtenida.

Hay que tener en cuenta que esta recopilación de datos no se obtiene solo de un cristal ya que el calor y la radiación dañan el cristal, por tanto, esta información se consigue del análisis de varios cristales.

Después de recopilar los datos, pasamos a su **procesamiento**. El procesamiento de los datos de la difracción es muy difícil. Actualmente se utilizan programas que incluyen algoritmos que procesan los datos. Los pasos son:

1. Determinación del sistema del cristal y de las dimensiones de la celda unitaria.
2. Medir las intensidades de los puntos.
3. Asignar un factor de escala para poder relacionar las intensidades de todas las imágenes (11)

La intensidad está determinada por la amplitud de las ondas y por la diferencia de fases entre ellas. Para determinar ambos parámetros se usan programas matemáticos.

Una vez obtenida la amplitud y las fases se calculan los factores de estructura por el método de la transformación rápida de Fourier, a través del cual transformamos una magnitud de tiempo en una magnitud de frecuencia. Esto nos dará un mapa de densidad electrónica que formará los contornos tridimensionales en los que se construirá la estructura de la proteína. Para mejorar la calidad del mapa de densidad electrónica se usa el refinamiento, que se hace mediante algoritmos de cálculos de minimización de la energía conformacional de la estructura de la proteína (11).

La principal ventaja de la Difracción de Rayos X es que el tamaño de la molécula no es un factor limitante.

La **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)** es una técnica de espectroscopía que aprovecha las propiedades mecano-cuánticas de los núcleos de los átomos, conocidos como spin. Permite determinar las posiciones de cada uno de los átomos que constituyen la molécula. La determinación se hace en disolución acuosa, lo que permite estudiar interacciones con ligandos, efecto de la temperatura y la dinámica de la molécula.

La RMN se basa en que los núcleos poseen el spin nuclear, que es una propiedad mecano cuántica fija para cada núcleo. Cuando tiene un spin distinto a cero, los núcleos se comportan como pequeños imanes. En la espectroscopía de biomoléculas los núcleos más importantes son ^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{31}P , para conseguir mayor información se pueden marcar las muestras con ^{13}C , ^{15}N (12)

La magnitud del campo magnético de los espectrómetros de RMN suele expresarse como la frecuencia de resonancia del protón, siendo la sensibilidad y la dispersión de las señales mayores al aumentar el campo magnético. Cuanto mayor sea el tamaño de la biomolécula, mayor será el campo magnético mínimo requerido para su estudio estructural.

Las energías de los campos magnéticos están cuantizadas, estando el nivel de energía menor más poblado que el nivel de energía mayor. La diferencia entre ambos niveles de energía es muy pequeña, siendo la culpable de la baja sensibilidad de la RMN y por eso se necesita tanta cantidad de muestra. Para que haya transiciones entre los niveles de energía se aplican pulsos de radiofrecuencia.

Los distintos pasos para la determinación de la estructura no son independientes entre sí, depende de los resultados obtenidos. Como las proteínas son macromoléculas grandes, los espectros que se obtienen son muy anchos por lo que vamos a recurrir a su marcaje con isótopos y a la espectroscopía multidimensional.

Las **condiciones** de la RMN deben ser óptimas: la muestra tiene que ser muy soluble, tiene que estar muy concentrada, debe estar muy bien purificada, que tenga la forma de plegamiento correcta, que no tenga agregados, que no tenga partículas o impurezas y que sea estable a la temperatura y pH al que se realiza el estudio.

Para la adquisición de los espectros de resonancia, se va a aplicar pulsos de radiofrecuencia para que haya transiciones entre los niveles de energía. Dependiendo de la duración del pulso, el vector de magnetización va a girar en un ángulo distinto en el plano yz. Después del pulso se generan las señales de radio alrededor del campo magnético del eje z que van a decaer exponencialmente con el tiempo dando lugar a la **Free Induction Decay (FID)**. A continuación, usamos la transformada de Fourier para pasar los tiempos a frecuencias, obteniendo así el espectro de RMN (12).

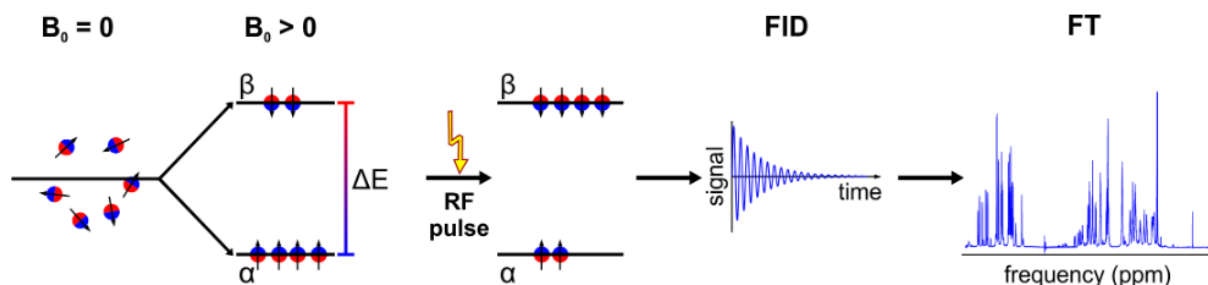


Figura. 4. Transición entre los diferentes niveles de energía tras aplicar el pulso de radiofrecuencia (12).

Para determinar la estructura se asigna un **espectro de resonancia**, que consiste en la identificación de las señales de RMN correspondientes a sistemas de spin independientes para cada aminoácido y la asignación secuencial de los residuos antes identificados. Vamos a identificar cada protón para cada aminoácido y asignarle un nombre y el número que le corresponde hasta completar la secuencia. Para ello vamos a ver 3 espectros homonucleares. El **espectro COSY** va a restringir las conectividades a 3 enlaces por no tener una buena resolución. Este espectro correlaciona las señales de los protones acoplados escalarmente.

En el **espectro TOCSY** se ven los enlaces del mismo aminoácido, es decir, las señales correlacionan los protones de un mismo sistema espín.

En el **espectro NOESY** se ve la conexión secuencial de los sistemas de spin asignados a partir de NOE entre protones de residuos contiguos en la secuencia observados en NOESY. Nos proporcionan la información espacial.

NOE es el **efecto nuclear Overhauser** que hace que se transfiera la magnetización entre núcleos cercanos y depende de la eficacia de la transferencia y la intensidad (12).

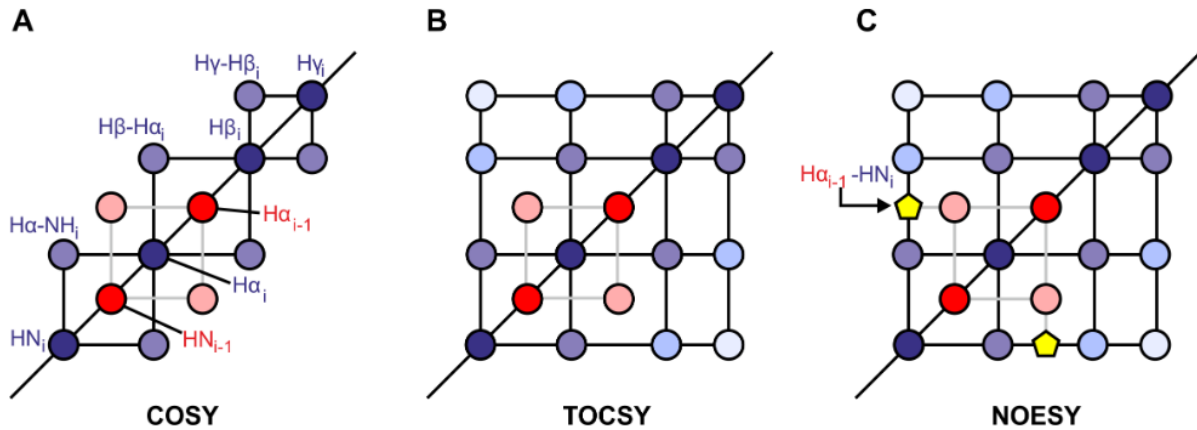


Figura 5. Espectro COSY, TOCSY y NOESY (13).

El siguiente paso es **calcular la estructura** de RMN que consiste en pasar la información de las señales a valores angulares y restricciones de distancia. Encuentra el conjunto de estructuras en las que las coordenadas atómicas sean satisfactorias para las restricciones experimentales, de distancia, angulares y de orientación. Se usa el mapa de Ramachandran para la validación de estructuras obtenidas.

La estructura calculada es una superposición de varias estructuras que mejor se adaptan a las restricciones experimentales.

Las **ventajas** que tiene esta técnica son:

- No es una técnica destructiva, por lo que una vez finalizado el experimento se puede recuperar el material biológico.
- Al hacer el estudio en disolución, se aproxima lo máximo posible a cómo podría estar en un sistema vivo.
- La información tridimensional que se obtiene es muy variada (estado plegado, desplegado, en movimiento), pudiendo así encontrar las posibles conformaciones que posee la molécula en la naturaleza. Lo que permite hacer estudio de la dinámica molecular.
- Se pueden realizar estudios de conformacionales variando la temperatura, pH, tipo de disolvente etc. (12).

Las **limitaciones** de la técnica son

- Está limitada a un tamaño máximo de proteína de 30KDa.
- Es muy poco sensible, por lo que se necesitan elevadas concentraciones.
- Es cara.
- El personal tiene que estar especializado y su formación es costosa y larga.
- La asignación de los datos requiere mucho tiempo (12).

Las principales **aplicaciones** que tiene la Resonancia Magnética Nuclear son la caracterización de las interacciones débiles en proteínas, la caracterización de las interacciones de las proteínas con diferentes ligandos (algo muy ventajoso para la industria farmacéutica) y el estudio del plegamiento de las proteínas.

5.3 Antibióticos

Gracias a la Biología Estructural y al uso de estas técnicas se ha podido identificar el mecanismo de resistencia de las bacterias y las sustancias implicadas en el proceso, permitiéndonos desarrollar nuevas estructuras de antibióticos. A continuación, hablaré de tres fármacos que se han diseñado a través de la Biología Estructural. Estos fármacos son la Daptomicina, la Dalvabancina y la Plectasina.

5.3.1 Daptomicina

La **daptomicina** es un lipopéptido cíclico que se obtiene a partir de cultivos de *Streptomyces roseosporus* y presenta actividad frente a la mayoría de las bacterias Gram-positivas. Presenta gran eficacia en las infecciones de la piel y los tejidos blandos complicadas y en las bacteriemias con o sin endocarditis (13)

I. Estructura.

La estructura de la daptomicina es un tridecapéptido cíclico que está constituido por aminoácidos generalmente con la configuración D y que no son proteínogénicos, entre los que se incluyen la kinurenina (Kyn), la ornitina (Orn) y el ácido L-3-metilglutámico (MeGlu) (14). El extremo N-terminal se acila con el n-decanoilo, que es un ácido graso. El extremo C-terminal se cicla por la kinurenina sobre el grupo hidroxilo del residuo de tirosina en la posición 4, formando el **decapéptido cíclico**. Hay que destacar también la presencia de tres residuos ácidos de aspártico (Asp) que son importantes para la unión y la actividad del calcio (14)

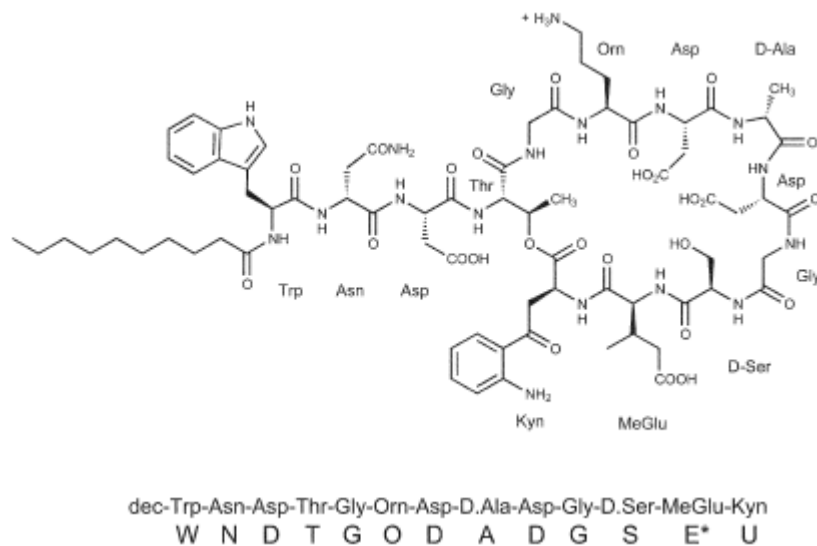


Figura. 6. Estructura de la Daptomicina (14)

II. Asignación de la resonancia específica de la secuencia de la daptomicina

La asignación de la resonancia específica de la secuencia de la daptomicina se realizó con una adquisición espectros **TOCSY** y **NOESY** en agua. A partir del espectro TOCSY se pudieron identificar los desplazamientos químicos de los NH de los 9 protones del grupo NH, también

los protones de las amidas situadas en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal (Trp y Kyn) y el protón del residuo de treonina.

El siguiente paso fue usar el espectro NOESY para poder asignar específicamente todos los protones y los picos correspondientes al efecto NOE.

III. Efecto de la unión del calcio a la daptomicina

La adición de 0,3 equivalentes molares de calcio produjo un ensanchamiento de los picos tanto en las regiones aromáticas como en las alifáticas del espectro. Al añadir más calcio se produjo un mayor ensanchamiento y al aumentar a un equivalente de calcio se produjo un ensanchamiento tan grande que produjo la superposición de los picos de resonancia, lo que dificultó el análisis.

Sin embargo, en la asignación de los espectros de titulación no hubo un cambio perceptible en los desplazamientos químicos de las resonancias. Se observó, además, que el aumento de la temperatura de medición dio lugar a un estrechamiento de las señales, lo que significa que el calcio posee menor afinidad por la daptomicina a altas temperaturas.

Para identificar los cambios en las estructuras de la daptomicina tras la unión de calcio se adquirieron los espectros NOESY del complejo a 293 K. Como resultado se obtuvo que el patrón NOE era muy similar a los de la daptomicina libre y no se identificaron nuevos picos, lo que sugiere que la estructura de la daptomicina no sufrió ningún cambio conformacional global tras la unión de calcio.

Para correlacionar el ensanchamiento de las señales del espectro tras la unión del calcio a la daptomicina se comparó la relación entre la anchura de la señal calculada a media altura en Hz frente a la relación molar de iones de calcio añadidos a la daptomicina (Figura 7). Como se observa en la gráfica, las resonancias de los protones de triptófano, de kinurenina y de treonina experimentan un aumento similar en el ancho de la línea después de añadir calcio. Esto indica que la estequiometría de la unión de iones de calcio a la daptomicina es de **1:1**. (14)

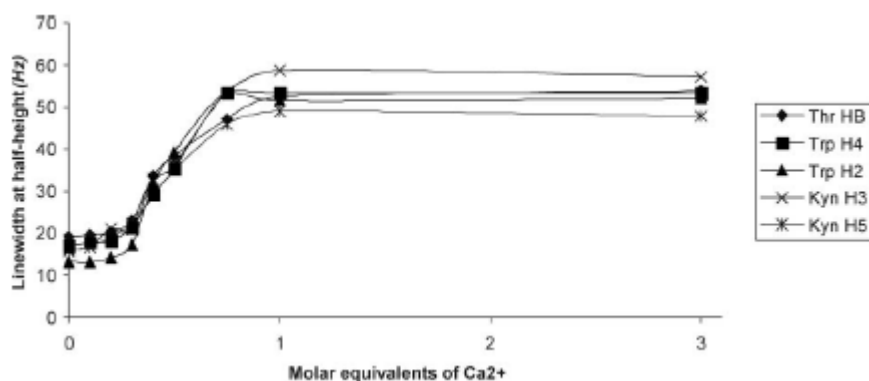


Figura 7. Valoración del trazado de anchos de líneas calculados a media altura en Hz frente a la relación molar de iones de calcio.

IV. Mecanismo de acción.

La daptomicina actúa como una molécula anfipática de manera que se inserta dentro de la membrana plasmática de la bacteria por un **proceso que es calcio-dependiente**. Esto produce una rápida despolarización de la membrana y una salida masiva de potasio al exterior, provocando un parón en los procesos de síntesis proteica y de ácidos nucleicos, provocando la muerte de la bacteria (13).

Este proceso se denomina “**intoxicación**” y se resume en 4 pasos (13,15):

1. La daptomicina se inserta y se fija en las moléculas de fosfatidilglicerol de la membrana plasmática bacteriana gracias a un cambio conformacional que sufre al unirse a iones de Ca^{2+} .
2. Después la daptomicina se oligomeriza y se disponen en la superficie formando canales iónicos.
3. A continuación, la distorsión de la membrana plasmática de la célula produce un escape iónico y una despolarización con alteración del gradiente iónico. Esto se debe a que permite el transporte pasivo de potasio desde el medio intracelular al medio extracelular.
4. Por último, se producen cambios en la célula que provocan un bloqueo en la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, matando a la bacteria. Esto se debe a que la célula es incapaz de seguir formando energía en forma de ATP, por lo que se interrumpen todos los procesos vitales.

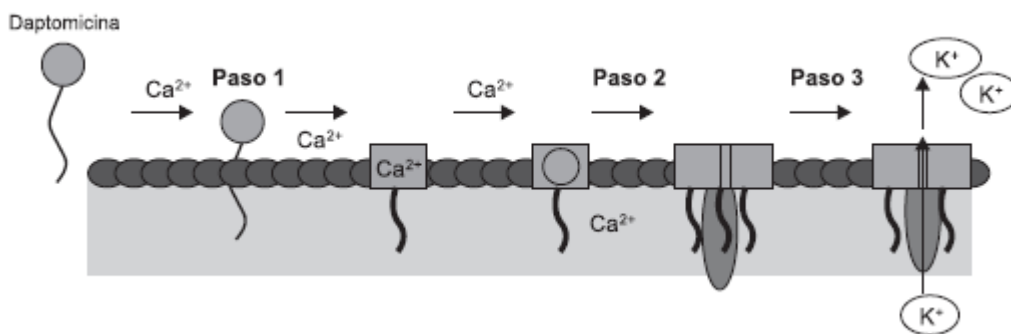


Figura. 8. Mecanismo de acción de la daptomicina (13).

La daptomicina es un antibiótico **bactericida**, pero sin destruir la estructura de la célula bacteriana. Puede actuar en **cualquier fase del ciclo bacteriano**, tanto cuando está en fase de crecimiento como cuando está en fase de reposo o estacionaria.

V. Espectro antimicrobiano.

La daptomicina presenta acción frente a **bacterias gram positivas**, tanto aerobias como anaerobias, destacando las bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus spp* (*S. aureus*, *S. epidermis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*), al género *Enterococcus spp* (*E. faecalis*, *E. faecium*) y al género *Streptococcus spp* (*S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. viridans*, *S. bovis*). También actúa sobre otros géneros como *Clostridium perfringens* y *Peptostreptococcus spp*.

VI. Mecanismos de Resistencia.

Los estudios in vitro demuestran que tiene una **tasa de resistencias relativamente baja**, en comparación con otros mecanismos que actúan sobre los ribosomas bacterianos (13).

En casos aislados si se muestran dos mecanismos de acción preocupantes y que deberán ser evaluados más adelante:

- Aparición de cepas de bacterias gram positivas resistentes durante el tratamiento en las que se ha aumentado la Concentración Mínima Inhibitoria.
- Presencia de cepas resistentes a vancomicina que presentan una Concentración Mínima Inhibitoria muy alta.

VII. Indicaciones terapéuticas.

Las **indicaciones terapéuticas** incluidas en ficha técnica son:

- Pacientes adultos y pediátricos (de 1 a 17 años de edad) con infecciones complicadas de la piel y partes blandas (IPPBc).
- Pacientes adultos con endocarditis infecciosa del lado derecho debida a *Staphylococcus aureus*. Se recomienda tener en cuenta la sensibilidad del microorganismo a los agentes antibacterianos al tomar la decisión de utilizar daptomicina, que debe estar basada en el asesoramiento de un experto.
- Pacientes adultos y pediátricos (de 1 a 17 años de edad) con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* (BSA). Para su uso en adultos la bacteriemia debe estar asociada a endocarditis infecciosa del lado derecho o infecciones complicadas de la piel y partes blandas, mientras que, para su uso en pacientes pediátricos, la bacteriemia debe estar asociada a IPPBc (16).

Hay que tener en cuenta que solo actúa frente a bacterias gram positivas por lo que en caso de infecciones mixtas con sospecha de presencia de bacterias gram negativas y/o algunos tipos de anaerobias se administrará simultáneamente con otros antibacterianos.

La **forma de administración** varía en función de la edad:

- Se administra en adultos vía perfusión intravenosa durante un periodo de 30 minutos o vía intravenosa durante un periodo de 2 minutos.
- En los pacientes pediátricos con edades comprendidas entre 7 y 17 años la vía de administración es vía perfusión intravenosa durante 30 minutos.
- En pacientes pediátricos con edades comprendidas entre 1 y 6 años se administra vía perfusión intravenosa durante un periodo de 60 minutos.

5.3.2 *Dalbavancina*

La dalbavancina es un lipoglucopeptido semisintético que deriva de un antibiótico producido por el actinomiceto *Nonomuria spp.* Posee un espectro que se limita a microorganismos gram positivos. Tiene **dos particularidades** que le distinguen de su familia de antibióticos: una es que su actividad intrínseca es mayor y la otra es que su vida media es muy prolongada, teniendo una posología semanal o bisemanal (17)

I. Estructura

La estructura de la dalbavancina unida covalentemente a la **proteína transportadora** se obtuvo mediante cristalografía de rayos X. De esta manera, se favorece la cristalización, ya que, el complejo proporciona una superficie adicional para los contactos de cristal y mejora la solubilidad del complejo antibiótico-objetivo (18)

En este caso la dalbavancina, se unió a la proteína transportadora **ubiquitina** formando el complejo **ubiquitina-dalbavancina**. Se cristalizó usando una concentración de proteína de 15mg/ml y una relación molar 1:1.

Para confirmar que la presencia de la proteína transportadora no alteraba la interacción antibiótico-diana se comprobó su capacidad de unión. El complejo ubiquitina-dalbavancina demostró mayor afinidad que el péptido solo, dejando ver que la unión sería más eficaz con una proteína transportadora.

Cada unidad asimétrica del cristal contiene dos pares de complejos ubiquitina-dalbavancina. En cada par, las dos moléculas de dalbavancina se asocian libremente de forma consecutiva a

través de sus restos de **ácidos grasos**. Como las cadenas de ácido graso bloquean estéricamente que los monómeros se encuentren cerca, no se produce la dimerización de las dos moléculas de dalbavancina (18)

En la estructura de la dalbavancina, la manosa unida al aminoácido 7 en el extremo de la molécula, está muy próxima a las cadenas laterales de los aminoácidos 1 y 3 que se encuentran en el extremo opuesto de la molécula, favoreciendo el enrollamiento de la molécula alrededor del ligando (18)

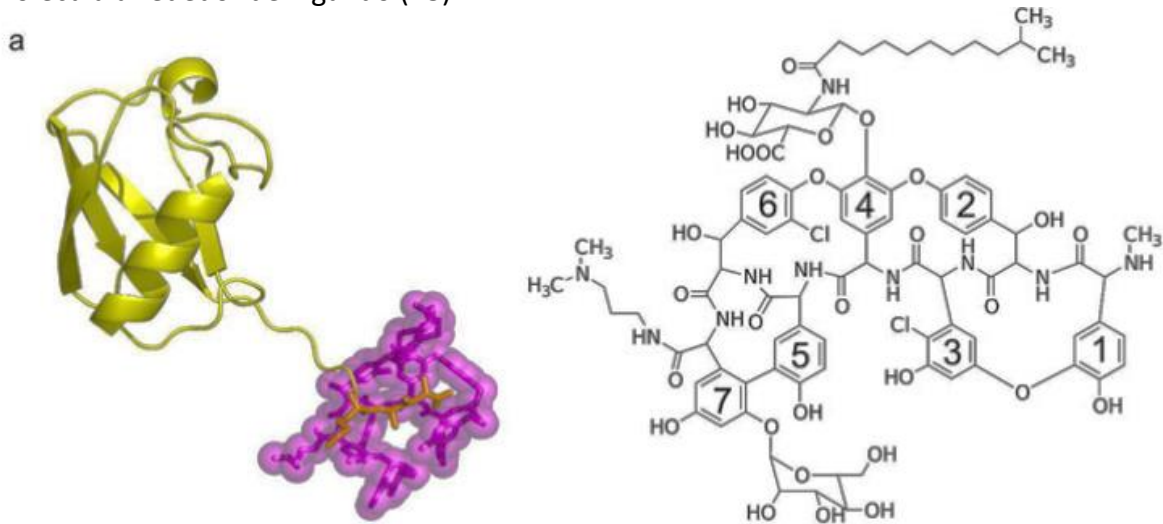


Figura 9. (Izquierda) El antibiótico glucopéptido semisintético dalbavancina (magenta) unido a su ligando Lys- d -Ala- d -Ala (naranja), que se fusiona con una molécula de ubiquitina (amarillo). (Derecha) Estructura química de la dalbavancina (18).

El grupo acilo de la dalbavancina y el resto dimetilpropilamina en el extremo C-terminal **mejoran la afinidad** por la diana, ya sea por inserción en la pared celular de la bacteria o por multidimerización de la dalbavancina. Además, el grupo dimetilpropilamina del extremo C-terminal es libre y flexible, estando disponible para unir los grupos de cabeza de los fosfolípidos negativos de la membrana bacteriana. También se muestran grupos acilo de diferentes moléculas de dalbavancina que se asocian debido a que la dalbavancina tiende a multidimerizarse (18)

II. Mecanismo de acción.

La dalbavancina es un **lipoglucopeptido bactericida** de segunda generación. El mecanismo de acción implica la formación de un complejo con la D-Alanina-D-Alanina del extremo C terminal de las cadenas del peptidoglucano que está en crecimiento. Impide el enlace cruzado (transpeptidación y transglicosilación) de subunidades disacarídicas. De esta manera se produce la inhibición de la biosíntesis de la pared celular bacteriana. Además, parece que también tiene la capacidad de dimerizarse y anclar la cadena lateral lipófila a la membrana de las bacterias. Esto aumenta la afinidad de la dalbavancina por la diana y aumenta su potencia (19)

Cada molécula de dalbavancina se cierra alrededor de la secuencia **diana Lisina-D-Alanina-D-Alanina**, formando cinco enlaces de hidrógeno con los átomos de oxígeno y nitrógeno que componen la estructura del péptido, además de presentar uniones tipo Van der Waals con las cadenas laterales de D-Alanina.

El azúcar del **ácido glucurónico** del peptidoglucano se une al aminoácido del antibiótico asignado como "4" en la figura 7, pero no realiza interacciones polares específicas con el

ligando. El grupo acilo se encuentra en la parte de la molécula que no interactúa con la diana, igual que el grupo dimetilpropilamina del extremo C-terminal.

III. Espectro antimicrobiano

En los estudios clínicos que se han hecho in vitro, se ha demostrado que presenta eficacia frente a los siguientes microorganismos (20):

- *Staphylococcus aureus*, también frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.
- *Streptococcus pyogenes*.
- *Streptococcus agalactiae*.
- *Streptococcus dysgalactiae*.
- Grupo de *Streptococcus anginosus* en los que se incluye *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius* y *Streptococcus constellatus*.

Aunque no se ha establecido eficacia clínica, in vitro si que ha demostrado eficacia frente a los siguientes microorganismos en ausencia de mecanismos de resistencia adquiridos (20) :

- Estreptococos del grupo G.
- *Clostridium perfringens*.
- *Peptostreptococcus spp.*

IV. Mecanismo de resistencia.

La resistencia a dalbavancina que aparece en *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.* está mediada por el **gen VanA**, este genotipo provoca una modificación del péptido diana de la pared celular en formación.

En cuanto a las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de dalbavancina, son mayores para los estafilococos que tienen una resistencia intermedia a la vancomicina que para cepas que son sensibles a vancomicina. El mecanismo probablemente sea por un aumento en el número de dianas glicopeptídicas en el peptidoglucano en formación ya que los grupos aislados con mayor Concentración Mínima Inhibitoria representan los fenotipos estables y tienen resistencia a otros glucopéptidos.

Además, las bacterias Gram-negativas presentan una resistencia inherente a la dalbavancina. Hay que destacar que los estudios in vitro no demostraron una resistencia cruzada entre la dalbavancina y otras clases de antimicrobianos. La resistencia a meticilina no tiene efecto en la actividad de la dalbavancina (20)

V. Eficacia clínica.

Los usos de la dalbavancina se relacionan con su larga semivida ya que se resuelven algunos de los problemas que hay con el tratamiento antimicrobiano.

La indicación que viene recogida en la EMA (European Medicines Agency) y en la FDA (Food and Drugs Administration) de la dalbavancina es para infecciones complicadas de la piel y partes blandas. Pero se ha demostrado que tiene **potenciales indicaciones** en otras patologías (17):

- Bacteriemia. Se descubrió en uno de los ensayos clínicos para la indicación de infecciones complicadas de la piel y partes blandas. Se vio que aquellos pacientes con bacteriemia tratados con dalbavancina presentaban hemocultivos negativos al final del tratamiento. También entraría la bacteriemia estafilocócica no complicada asociada a catéter, siendo muy cómoda su posología semanal y bisemanal.

- Tratamiento de consolidación de la endocarditis infecciosa por cocos Gram positivos, sobre todo cuando se ha hecho el recambio valvular y eliminado la verruga. También parece que hay que considerarlo en las infecciones de trasplantes valvulares con un periodo largo de tratamiento.
- Infecciones osteoarticulares como la osteomielitis y la artritis séptica. Un modelo de simulación indica que la dalbavancina en hueso permitiría tratar con seguridad una osteomielitis por *S. aureus*.
- Infecciones del pie diabético por cocos Gram positivos resistentes y la complementación del tratamiento de la neumonía neumocócica bacteriémica. Se usaría como alternativa a la vía oral en pacientes con infecciones recurrentes de Gram-positivos resistentes a meticilina.

En el Informe de Posicionamiento del Ministerio de Sanidad, indica que la dalbavancina puede ser una **alternativa** en 2 situaciones clínicas (21):

- En un tratamiento parenteral prolongado, ya que se reduciría el riesgo de complicaciones asociadas a la terapia parenteral en múltiples dosis.
- Tras hospitalización, el paciente tiene que seguir con el tratamiento en su casa con linezolid.

En su uso en **profilaxis**, se consideran las infecciones recurrentes por cocos Gram-positivos, sobre todo en aquellos pacientes que son alérgicos a los betalactámicos (17):

- Celulitis recurrentes.
- Colangitis e infecciones urinarias recurrentes por *Enterococcus* spp por alteraciones anatomofuncionales.
- Sepsis neumocócica en pacientes con esplenectomías.
- Pacientes portadores de material protésico con riesgo de bacteriemia estafilocócica.

5.3.3 Plectasina, un antimicrobiano en investigación

La plectasina es la primera **defensina fúngica** conocida que tiene actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas (22). Es el primer péptido similar a las defensinas aislado del hongo saprofito *Pseudoplectania nigrella* especialmente activo contra *Streptococcus pneumoniae*, incluidas las cepas resistentes.

I. Estructura

La primera estructura de la plectasina se obtuvo por Resonancia Magnética Nuclear (23) pero la estructura más reciente se ha obtenido por Cristalografía de Rayos X. La estructura de la plectasina a través de Cristalografía de Rayos X se realizó con una mezcla racémica que contiene L-plectasina y D-plectasina. Esta mezcla contenía ambos enantiómeros a partes iguales. Al realizar la cristalografía y obtener la estructura hay que destacar que el modelo final se refinó a valores cristalográficos de **factor R** superiores a 0,2 en el caso de la D-plectasina y en valores superiores a 0,15 en el caso de la L-plectasina, lo que indica un buen refinamiento de la estructura (24)

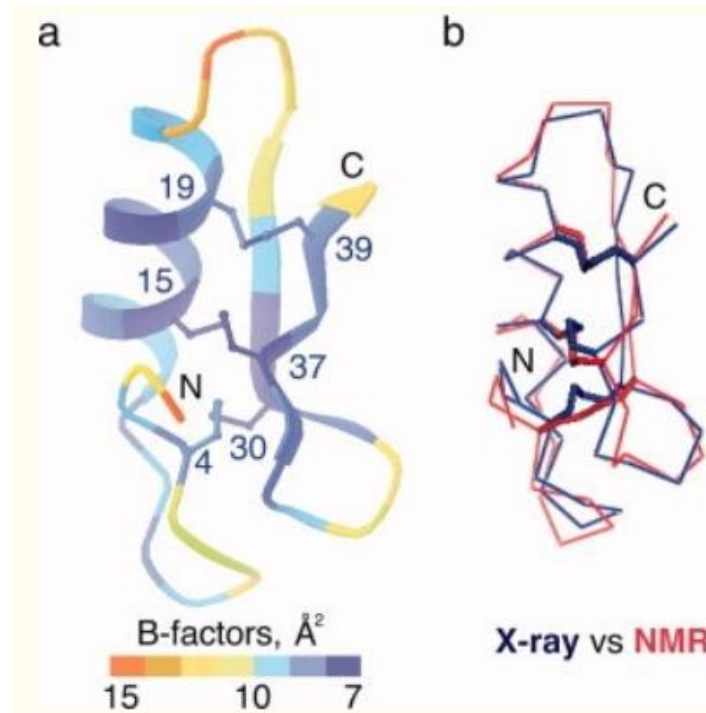


Figura 10. Estructura de rayos X de L-plectasina determinada por cristalografía racémica. (a) representación en cinta de L-plectasina; coloreada por los valores del factor B. (b) Superposición de la estructura de RMN de plectasina (en rojo) y la actual estructura cristalina de rayos X (en azul) (24).

La estructura obtenida por Cristalografía de Rayos X presenta algunas diferencias con la estructura obtenida por RMN:

- En el extremo N-terminal flexible difieren algunos residuos.
- La orientación de la cadena β es diferente.
- La disposición de los puentes disulfuro cambia en el primer y el segundo puente disulfuro.

En cuanto a la estructura de la plectasina, podemos ver que posee un **motivo α - β** que tiene una hélice α y dos cadenas β antiparalelas que se estabiliza mediante 3 puentes disulfuro (Cys4-Cys30, Cys15-Cys37 y Cys19-Cys39) (23). Hoy en día, esto se relaciona con las defensinas de los invertebrados ya que hay una gran similitud.

II. Mecanismo de acción antimicrobiano.

La plectasina actúa a nivel de la **biosíntesis de la pared celular** de la bacteria. Se fusiona con el grupo pirofosfato del precursor de la pared celular del lípido II. Se cree que los protones de los grupos amida de la molécula están involucrados en la interacción con el pirofosfato y que la porción hidrofóbica puede interactuar con la membrana bacteriana (25).

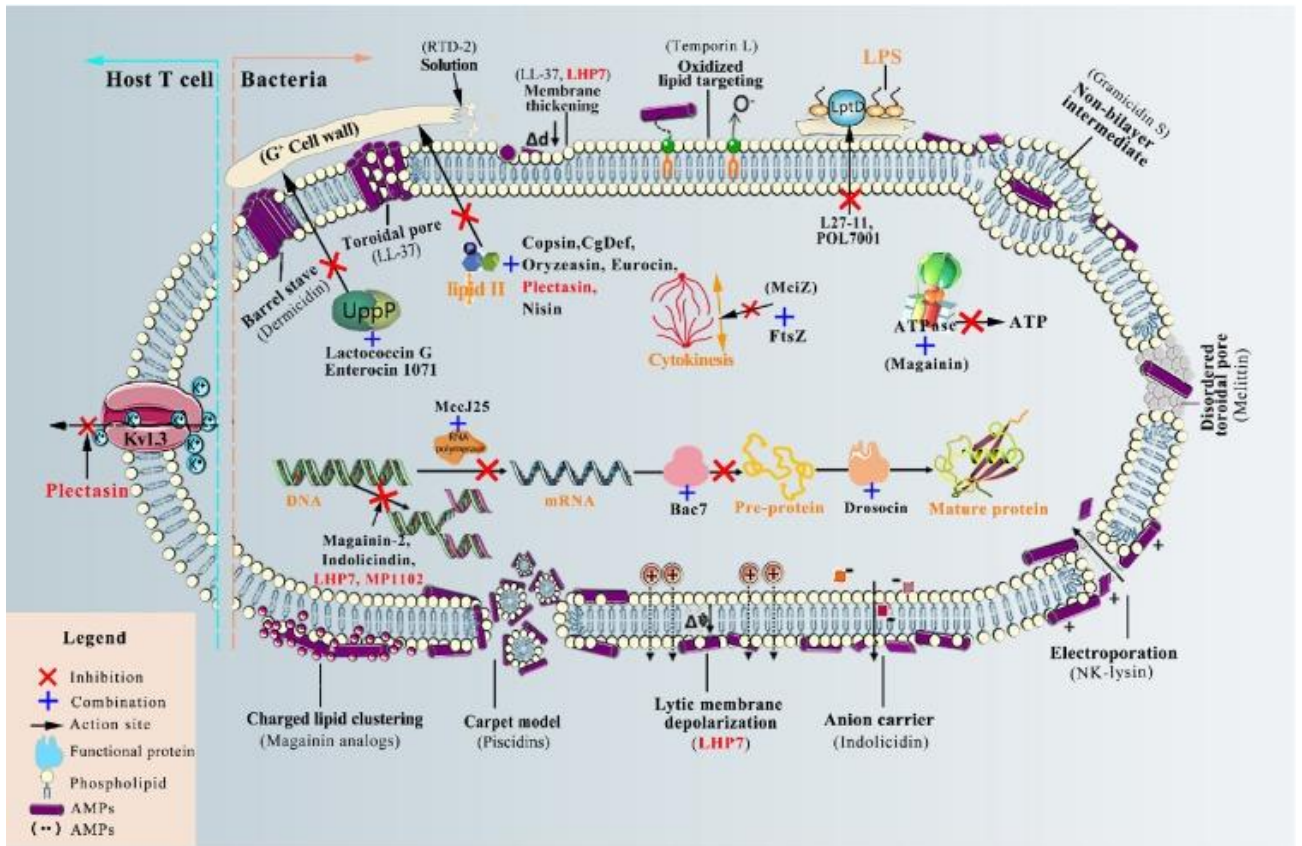


Figura 11. El mecanismo antibacteriano de la plectasina y sus derivados y otros antimicrobianos peptídicos. Los lados izquierdo y derecho de las líneas punteadas presentan la célula T huésped y la célula bacteriana, respectivamente (25).

III. Actividad biológica de la plectasina.

La plectasina ha demostrado actividad frente a **bacterias Gram-positivas**, incluidas *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Corynebacterium* spp y *Enterococcus* spp. In vitro ha demostrado que es capaz de inhibir a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Staphylococcus aureus* susceptible a meticilina si se combinaba con β -lactámicos. Hay que destacar que posee actividad frente a *Streptococcus pneumoniae* incluidas las cepas resistentes a los antibióticos convencionales (26).

Además, la plectasina inhibe la serin-proteasa del dengue, la replicación viral en las células Vero (células de cultivo) y la fusión de plectasina y una protegenina a MAP30 (inhibidor de la replicación del VIH-1) inhibió significativamente la unión y la proliferación del virus del dengue (25).

Otro efecto de la plectasina es que **bloquea los canales de potasio** ya que en un ensayo bloqueó la región extracelular de los canales de potasio en las células del riñón embrionario humano. Se ha visto que bloquea el canal de potasio Kv1.3 que ayuda a la activación de las células T porque regula el potencial de membrana. Además, promueve la activación, la migración y la proliferación de células inmunes y la secreción de IL-2 mediada por el receptor de las células T. Esto hace que la plectasina sea candidata para la esclerosis múltiple por la implicación de los canales Kv1.43 en la inmunosupresión y en la inflamación (25).

Las dificultades para producir y purificar estos péptidos a gran escala, la posibilidad de que surjan resistencias bacterianas, el hecho de que actúe como regulador inmune, su suministro y la modificación de nuevos antiinfecciosos basados en la estructura y la función hace que se dificulte el uso de la plectasina. Sin embargo, los avances en su investigación son prometedores e indican que es un buen candidato para las infecciones causadas por bacterias (25).

6 CONCLUSIÓN

Las resistencias a los antibióticos han ido aumentando en los últimos años. Esto ha llevado a buscar nuevas estrategias de tratamiento para las infecciones bacterianas.

La Biología Estructural es una rama de la ciencia que va a estudiar las posibles dianas terapéuticas dentro de las bacterias para poder diseñar un fármaco a medida. Se va a apoyar en la Criomicroscopía Electrónica, la Cristalografía de Rayos X y la Resonancia Magnética Nuclear. Estas técnicas han permitido el desarrollo de antibióticos como la Daptomicina y la Dalbavancina, que son antibióticos peptídicos, y la investigación de la Plectasina, que es una defensina con posibles propiedades antimicrobianas.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Serra Valdés MA, Cabrera E, Habana Cuba maserra L. Ciencias epidemiológicas y salubristas. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana Microbial resistance in the current context and the importance of knowledge and application in antimicrobial policy. 2013
2. Oteo Iglesias J. Resistencia a antibióticos en España. Agencia Española del Medicamento 2008.
3. Medina-Morales DA, Machado-Duque ME, Machado-Alba JE. Resistencia a antibióticos, una crisis global. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 2015;33(10):692–699
4. Del Arco Juan. Antibióticos: situación actual. Farmacia Abierta. 2014. Vol 28. Nº5.
5. Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) 2019-2021 | PRAN.
6. Albesa-Jove D O. Cifuentes J E. Guerin M. CIC Network – Biología Estructural: contribución al descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos. 2015.
7. Trajtenberg F. Biología Estructural. Unidad de Cristalografía de Proteínas, Institut Pasteur de Montevideo. 2014.
8. Coll M. BIOLOGIA ESTRUCTURAL. Treballs de la SCB. Vol. 58 (2007) 25-38.
9. Martín Benito J, Arranz R. Determinación estructural mediante criomicroscopía electrónica de partículas individuales y procesamiento de imágenes | Revista de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular | SEEBM.
10. Bravo J. Cristalografía de rayos X de macromoléculas. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular | SEEBM. 2012 Feb.
11. Smyth MS, Martin JHJ. x Ray crystallography. Vol. 53, Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology. BMJ Publishing Group Ltd; 2000. p. 8–14.
12. Partida Hanon AI. Introducción a la RMN o Resonancia Magnética Nuclear, texto para estudiantes. 2017.
13. Martí VH, Romá Sánchez E, Salavert Lletí M, Ribelles VB, Andrés JLP. Daptomicina: revitalizando un antiguo fármaco ante la necesidad de nuevos agentes activos frente a bacterias grampositivas multirresistentes. 2007 vol: 20 (3) pp: 261-276.
14. Ball LJ, Goult CM, Donarski JA, Micklefield J, Ramesh V. NMR structure determination and calcium binding effects of lipopeptide antibiotic daptomycin. Organic and Biomolecular Chemistry. 2004 Jul 7;2(13):1872–8.
15. Araos R, García P, Chanqueo L, Labarca J. Daptomicina: Características farmacológicas y aporte en el tratamiento de infecciones por cóceas gram positivas. Revista Chilena de Infectología. 2012 Apr;29(2):127–31.
16. FICHA TECNICA CUBICIN 350 mg polvo para solución inyectable y para perfusión. 2010.
17. Barberán J. Potenciales indicaciones de dalbavancina en la práctica clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2017 Jan 1;35:38–40.
18. Economou NJ, Nahoum V, Weeks SD, Grasty KC, Zentner IJ, Townsend TM, et al. A carrier protein strategy yields the structure of dalbavancin. Journal of the American Chemical Society. 2012 Mar 14;134(10):4637–45.
19. Chen AY, Zervos MJ, Vazquez JA. Dalbavancin: A novel antimicrobial. Vol. 61, International Journal of Clinical Practice. Wiley-Blackwell; 2007. p. 853–63.
20. CIMA: Xydalba 500mg de polvo para concentrado para solución para perfusión. 2016.
21. Informe de Posicionamiento Terapéutico de dalbavancina (Xydalba[®]) DALBAVANCINA (XYDALBA[®]). 2016.

22. Yang Y, Teng D, Zhang J, Tian Z, Wang S, Wang J. Characterization of recombinant plectasin: Solubility, antimicrobial activity and factors that affect its activity. *Process Biochemistry*. 2011 May 1;46(5):1050–5.
23. Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, Hansen MT, Sönksen CP, Ludvigsen S, et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*. 2005 Oct 13;437(7061):975–80.
24. Mandal K, Pentelute BL, Tereshko V, Thammavongsa V, Schneewind O, Kossiakoff AA, et al. Racemic crystallography of synthetic protein enantiomers used to determine the X-ray structure of plectasin by direct methods. *Protein Science*. 2009 Jun;18(6):1146–54.
25. Li Z, Wang X, Wang X, Teng D, Mao R, Hao Y, et al. Research advances on plectasin and its derivatives as new potential antimicrobial candidates. Vol. 56, *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd; 2017. p. 62–70.
26. Hara S, Mukae H, Sakamoto N, Ishimoto H, Amenomori M, Fujita H, et al. Plectasin has antibacterial activity and no affect on cell viability or IL-8 production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008 Oct 3;374(4):709–13.