

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Evaluación de la actividad antibacteriana y
citotóxica de péptidos derivados de la
secuencia *Pf*Rif (321-340):
RYRRKKMKKALQYIKLLKE**

Adriana Yuribeth Barreto Santamaría

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2019

**Evaluación de la actividad antibacteriana y
citotóxica de péptidos derivados de la
secuencia *Pf*Rif (321-340):
RYRRKKMKKALQYIKLLKE**

Adriana Yuribeth Barreto Santamaría

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Bioquímica

Directora:

Doctora Zuly Jenny Rivera Monroy

Codirector:

Doctor Hernando Curtidor Castellanos

Línea de Investigación:

Péptidos antimicrobianos

Grupo de Investigación:

Síntesis y aplicación de moléculas peptídicas - SAMP

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2018

A todos aquellos que tengan contacto con este documento.

Espero que esta investigación aporte algo bueno a su proceso académico y científico. No olviden que la ciencia debe ser de todos y para todos.

Agradecimientos

Expreso mi total gratitud a la Universidad Nacional de Colombia por el proceso formativo, mi sueño siempre fue estudiar en ésta institución y hoy me siento orgullosa de formar parte del Departamento de Química. Agradezco al programa de maestría en Ciencias-Bioquímica y a los profesores que conforman éste programa por la valiosa formación académica brindada.

Agradezco al Grupo de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas SAMP por recibirme como el primo lejano de la familia y por la guía en el proceso de síntesis, purificación y caracterización de los péptidos usados en éste estudio. A la División de Investigación y Extensión sede Bogotá (DIEB), Universidad Nacional de Colombia por su apoyo financiero a través del Proyecto con Código 41569.

A mi directora de tesis, la Doctora Zuly Jenny Rivera por mostrarme aspectos que sin ella no habría concebido, su guía ha sido pilar fundamental de ésta investigación. Muchas gracias por hacerme una mejor investigadora y por trasmitirme tranquilidad y seguridad en los momentos de tensión.

También quiero expresar mi agradecimiento al profesor Javier Eduardo García, quien aun sin ser mi director, estuvo atento a cada parte del proceso formativo y puso lo mejor de sí para mejorar el producto final de ésta investigación. En realidad aprecio mucho haber tenido a mi disposición ese otro punto de vista que de manera rigurosa me ha hecho ser más analítica.

Por otro lado, agradezco a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, Instituto que me acogió en mis primeros pasos en el mundo científico y me enseñó a trabajar de manera rigurosa y honesta.

Al Grupo Funcional Receptor-Ligando por hacer parte de este proceso, a Mary y Jennifer por su ayuda con el cultivo celular y por darme ánimo siempre, a Gaby por guiarme con su amplia experiencia y por ser ejemplo enfático de la importancia de un trabajo honesto.

A mi codirector, el Doctor Hernando Curtidor, quien dio origen a éste trabajo y quien desde siempre ha sido mi mentor, gracias por poner a mi disposición tus amplios conocimientos científicos y aportar a cada detalle de éste trabajo. Gracias por tu guía para trabajar con autonomía y por tu apoyo no solo a nivel académico sino personal. Gracias por centrarte siempre en nuestras virtudes sin olvidar lo que debemos mejorar.

A Jeimmy, mi compañerita de maestría, quien vivió conmigo toda esta odisea y quien durante éste tiempo ha sido para mí un ejemplo de inteligencia emocional y metodológica. Gracias porque todo fue mejor gracias a tu compañía.

Quiero agradecer a mi familia por admirarme siempre y hacerme sentir casi una heroína, espero poder servir de inspiración para mis sobrinos y hermanos, nunca es tarde para elegir bien, nada compensa lo que es sentirse feliz cada día por estar en la profesión correcta. A mi mamá, quien siempre ha creído ciegamente en mí, incluso mucho más de lo que yo misma lo he hecho, y quien con su cariño me ha apoyado en cada etapa de la vida.

Finalmente, quiero agradecer a Manuel Rincón quien me ha apoyado en todas las formas posibles para cumplir esta meta, gracias por tu amor incondicional y por ser la persona admirable que me ha ayudado a ser mejor cada día.

Resumen

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos es un problema creciente de salud a nivel mundial, la búsqueda de nuevos antimicrobianos ha venido cobrando cada vez mayor relevancia y los péptidos antimicrobianos (PAMs), de origen natural o sintético, han surgido como una opción terapéutica promisoría. El péptido sintético $[A^{331}]$ -PfRif (321-340) derivado de una proteína de *Plasmodium falciparum*, es activo contra bacterias *E. coli* ML35 (CMI 25 μ M) pero causa lisis de los glóbulos rojos desde 1,56 μ M. Con el fin de identificar péptidos de secuencia corta y actividad selectiva contra bacterias, en este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de péptidos sintéticos cortos derivados de $[A^{331}]$ -PfRif (321-340). Se observó que los péptidos $[A^{331}]$ -PfRif (324-340), $[A^{331}]$ -PfRif (325-340) y $[A^{331}]$ -PfRif (327-340) de 17,16 y 14 residuos respectivamente, son activos contra bacterias *E. coli* y no son hemolíticos a concentraciones ≤ 200 μ M. Por esto, su índice terapéutico incrementó significativamente (más de >200 , >160 y >40 veces, respectivamente), en comparación con el del péptido original $[A^{331}]$ -PfRif (321-340) (IT 0,083).

El análisis informático y por difracción circular sugiere que la capacidad de asumir una conformación α -helicoidal en ambientes que mimetizan las condiciones del entorno de membranas cargadas negativamente y la presencia de dos lisinas en la cara no polar de la hélice α anfipática son cruciales para la actividad y selectividad de estas secuencias.

Aunque las tres secuencias muestran características interesantes, $[A^{331}]$ -PfRif (324-340): RKKMKMKALQYIKLLKE fue el producto de síntesis de mayor pureza, tiene el mayor IT, fue el único activo contra una cepa de *P. aeruginosa* y adicionalmente presentó efecto sinérgico con Gentamicina; por esto sugerimos a $[A^{331}]$ -PfRif (324-340) como un candidato potencial para su uso como antimicrobiano.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos (PAMs), anfipaticidad, hidrofobicidad, actividad antimicrobiana, actividad hemolítica, índice terapéutico (IT), proteína Rifina de *Plasmodium falciparum*.

Abstract

Microorganisms resistance to antibiotics is a growing problem of health worldwide, then the search for new antimicrobials has been gaining increasing relevance and antimicrobial peptides (AMPs), of natural or synthetic origin, have emerged as a therapeutic promising option. Synthetic peptide [A³³¹]-PfRif (321-340) which is derived from a *Plasmodium falciparum* protein, is active against *E. coli* ML35 bacteria (25 µM MIC) but causes lysis of red blood cells from 1.56 µM. In order to identify peptides having short sequence and selective activity against bacteria, in this work, the antibacterial activity of short synthetic peptides derived from [A³³¹]-PfRif (321-340) was evaluated. It was observed that the peptides [A³³¹]-PfRif (324-340), [A³³¹]-PfRif (325-340) and [A³³¹]-PfRif (327-340) with 17, 16 and 14 residues respectively, are active against bacteria *E. coli* and are not hemolytic at concentrations ≤200 µM. For this, its therapeutic index increased significantly (more than > 200, > 160 and > 40 times, respectively), compared to that of the original peptide [A³³¹]-PfRif (321-340) (IT 0.083).

Bioinformatic analysis and circular dichroism suggest that ability to assume α-helical conformation in environments mimic negatively charged membranes environmental conditions and presence of two lysines in the non-polar face of the amphipathic α-helix are crucial for the activity and selectivity of these sequences.

Although the three sequences show interesting characteristics, peptide [A³³¹]-PfRif (324-340): RKKKMKKALQYIKLLKE was the synthesis product having greater purity, highest IT, and the only with activity against a *P. aeruginosa* stain; additionally presented synergistic effect with Gentamicin. For this, we suggest that the peptide [A³³¹]-PfRif (324-340) is a potential candidate for its use as an antimicrobial.

Keywords: Antimicrobial peptides (PAMs), amphipathicity, hydrophobicity, antimicrobial activity, hemolytic activity, therapeutic index (IT), *Plasmodium falciparum* Rifin protein.

Contenido

Introducción.....	14
1. Estado del arte.....	16
1.1 Características fisicoquímicas relacionadas con la actividad antimicrobiana y selectividad de los PAMs	16
1.1.1 Secuencia.....	16
1.1.2 Carga.....	17
1.1.3 Estructura	17
1.1.4 Hidrofobicidad.....	18
1.1.5 Anfipaticidad.....	18
1.2 Herramientas bioinformáticas para el diseño de PAMs y predicción de algunas de sus propiedades.....	19
1.3 Péptido [A ³³¹]-PfRif (321-340).....	20
2. Marco Teórico.....	21
2.1 Péptidos antimicrobianos (PAMs).....	21
2.1.1 PAMs de origen natural	21
2.1.2 PAMs de origen sintético	22
2.1.3 Membrana celular	23
2.1.4 Pared celular en bacterias	24
2.2 Selectividad y potencial terapéutico de los PAMs.....	24
3. Justificación	26
4. Pregunta de investigación	26
5. Hipótesis.....	27
6. Objetivos.....	27
6.1 General	27
6.2 Específicos.....	27
6.2.1 Sintetizar péptidos cortos derivados de [A ³³¹]-PfRif (321-340).	27
6.2.2 Evaluar la actividad antibacteriana y hemolítica de los péptidos sintéticos derivados de la secuencia original.	27
6.2.3 Evaluar la actividad citotóxica de los péptidos sintéticos cortos con actividad antibacteriana sobre células de mamíferos.	27
6.2.4 Comparar la tendencia de estructura secundaria del péptido [A ³³¹]-PfRif (321-340) y sus derivados.	27
7. Diseño preliminar	28
8. Metodología	29
8.1 Secuencias peptídicas	29

8.1.1	Obtención de los péptidos	30
8.2	Caracterización general de las cepas bacterianas	32
8.2.1	Estandarización de las curvas de crecimiento de las cepas bacterianas	32
8.2.2	Estandarización de las curvas de calibración.....	32
8.3	Actividad antibacteriana	32
8.3.1	CMI por dilución en caldo	32
8.3.2	Actividad bactericida.....	33
8.3.3	Sinergia con antibióticos.....	33
8.4	Permeabilidad de la membrana interna de <i>E. coli</i> ML-35.....	33
8.5	Actividad hemolítica	34
8.6	Actividad citotóxica.....	34
8.7	Análisis de las propiedades fisicoquímicas.....	35
8.7.1	Análisis bioinformático de las secuencias peptídicas	35
8.7.2	Dicroísmo circular (DC).....	35
9.	Resultados y discusión.....	36
9.1	Síntesis y caracterización de las secuencias derivadas de [A ³³¹]-P/Rif (321-340)	36
9.2	Caracterización general de las cepas bacterianas	40
9.3	Actividad antibacteriana y hemolítica	42
9.4	Evaluación del potencial terapéutico de los péptidos derivados activos	44
9.5	Aproximación al mecanismo de acción.....	47
9.6	Propiedades fisicoquímicas de las secuencias peptídicas.....	51
10.	Conclusiones.....	59

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Resultados de síntesis y caracterización por RP-HPLC de [A ³³¹]-PfRif (324-340)	39
Figura 2. Tinción de Gram y microscopía bajo luz blanca	40
Figura 3. Curvas de crecimiento y calibración de las cepas bacterianas.	41
Figura 4. Microscopía bajo luz blanca de bacterias <i>E. coli</i> ATCC 25922	48
Figura 5. Permeabilización de la membrana de <i>E. coli</i> ML35	49
Figura 6. Actividad citotóxica de los derivados de [A ³³¹]-PfRif (321-340)	50
Figura 7. Espectros de dicroísmo circular del péptido original [A ³³¹]-PfRif (321-340) y de sus derivados truncados en el extremo N-terminal	53
Figura 8. Espectros de dicroísmo circular del péptido [A ³³¹]-PfRif (324-340) y sus derivados sintetizados con longitud menor a 13 aminoácidos	55
Figura 9. Representación de la hélice anfipática de [A ³³¹]-PfRif (321-340) y sus derivados con tendencia α -helicoidal	57

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Péptidos sintéticos derivados de [A ³³¹]-PfRif (321-340)	29
Tabla 2. Caracterización de los péptidos derivados de [A ³³¹]-PfRif (321-340) por cromatografía RP-HPLC y MALDI-TOF MS.	38
Tabla 3. Ecuaciones de las curvas de calibración obtenidas para las cepas bacterianas.	41
Tabla 4. Actividad antibacteriana de los péptidos derivados de [A ³³¹]-PfRif (321-30).	42
Tabla 5. Actividad hemolítica de los péptidos derivados de [A ³³¹]-PfRif (321-30)	43
Tabla 6. Actividad de los péptidos antibacterianos derivados de [A ³³¹]-PfRif (324-30) contra diferentes cepas de <i>E. coli</i> .	45
Tabla 7. Sinergia de los péptidos antibacterianos derivados de [A ³³¹]-PfRif (324-30) con antibióticos contra <i>E. coli</i> 25922.	46
Tabla 8. Actividad antibacteriana contra <i>E. coli</i> 25922 en presencia de suero humano	47
Tabla 9. Predicción de las características fisicoquímicas de los péptidos derivados de [A ³³¹]-PfRif (321-340)	52

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término	Abreviatura	Término
PAM	Péptido antimicrobiano	CMI	Concentración mínima inhibitoria
PG	Fosfatidilglicerol	CMB	Concentración mínima bactericida
CL	Cardiolipina	GRh	Glóbulos rojos humanos
PI	Fosfatidilinositol	CMF	Concentración mínima fraccional
PS	Fosfatidilserina	CMH	Concentración mínima hemolítica
PC	Fosfatidilcardiolipina	IT	Índice terapéutico
PE	Fosfatidiletanolamina	DC	Dicroísmo circular
LPS	Lipopolisacárido	PBS	Buffer fosfatos
LB	Luria Bertani	TFE	Trifluoroetanol
AT	Ácido teicoico	SDS	Dodecilsulfato de sodio
ALT	Ácido lipoteicoico	ONPG	orto-nitrofenil- β -galactósido
TA	Temperatura ambiente	ONP	orto-nitrofenol
AC	Agitación constante		

Introducción

En la actualidad la resistencia bacteriana es un problema de gran importancia. En hospitales de Colombia y el mundo cada vez es más común que los patógenos sean resistentes a la mayoría de los medicamentos antimicrobianos disponibles (1, 2). En el mundo, anualmente se presentan alrededor de 31,5 millones de casos de sepsis, 19,4 millones de sepsis severa y aproximadamente 5,3 millones de muertes asociadas a infecciones causadas por patógenos resistentes a los antibióticos (3). Si no se aplican estrategias efectivas para contrarrestar éste fenómeno, se estima que para el año 2050 se presentarán alrededor de 10 millones de muertes anuales (4). Por ello, surge la urgente necesidad de plantear estrategias regulatorias para el uso de antibióticos y desarrollar nuevos agentes terapéuticos con diferentes mecanismos de acción que actúen eficazmente contra los patógenos responsables de estas infecciones (5).

Los péptidos aislados de plantas y animales que presentan actividad antimicrobiana han sido considerados antibióticos naturales y denominados péptidos antimicrobianos (PAMs) (6). Los PAMs son de gran interés debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana, pueden actuar por múltiples mecanismos de acción y rápida eliminación del patógeno, reduciendo la posibilidad de desarrollo de resistencia (7-9). Sin embargo, para que un péptido sea considerado como opción terapéutica, debe tener potente actividad antimicrobiana y baja o nula actividad hemolítica y citotóxica (alta selectividad) (10, 11), características que muchos PAMs naturales no cumplen. Debido a esto, la búsqueda de una nueva generación de PAMs se ha centrado en la selección de nuevos candidatos a partir de grandes bibliotecas y en el diseño computacional de péptidos (12, 13). Estos nuevos candidatos sintéticos se pueden producir mediante síntesis química o expresión recombinante (14, 15), para luego ser probados en ensayos de actividad antimicrobiana, citotóxica y hemolítica en el laboratorio (16, 17). En esta fase, la optimización temprana de las secuencias (antes de entrar a estudios preclínicos) ha cobrado gran relevancia ya que un problema importante en el desarrollo de medicamentos basados en PAMs es que generalmente los candidatos se trasladan demasiado pronto a pruebas preclínicas y clínicas sin estar totalmente optimizados (11).

En trabajos previos, se reportó que el péptido derivado de la proteína *PfRif* de *Plasmodium falciparum*, el cual tiene una sustitución de Lisina por Alanina en la posición 331 ([A³³¹]-*PfRif* (321-340):³²¹RYRRKKMKKALQYIKLLKE³⁴⁰), presentó actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* ML35. Este péptido no presentó actividad citotóxica sobre las líneas celulares

humanas HeLa y HepG2, pero si, actividad sobre GRh con CMH de 1 μ M. El IT calculado respecto a *E. coli* ML35 fue 0,045, lo que indica baja selectividad y limita su aplicación terapéutica (18). El mecanismo de acción antibacteriano del péptido [A^{331}]-P/Rif (321-340) ha sido asociado con la interacción con la membrana y el ADN, sugiriendo que es menos propenso a inducir resistencia. Esta secuencia es de gran interés ya que es posible identificar secuencias derivadas que presenten mayor actividad antibacteriana y mayor IT (19).

En este trabajo se realizó el diseño y la obtención de péptidos cortos derivados de [A^{331}]-P/Rif (321-340) con el fin de identificar péptidos con mayor potencial terapéutico y que hagan el proceso de síntesis un proceso más rápido, eficiente y menos costoso. Se evaluó la actividad antibacteriana y citotóxica de estos péptidos derivados y se llevó a cabo la caracterización de las secuencias mediante DC y herramientas bioinformáticas. Esta caracterización se hizo con el fin de establecer posibles relaciones entre las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica.

1. Estado del arte

1.1 Características fisicoquímicas relacionadas con la actividad antimicrobiana y selectividad de los PAMs

Los PAMs tienen alto potencial terapéutico debido a las ventajas que presentan en comparación con los antibióticos, como son: actividad antimicrobiana potente y de amplio espectro, además de no ser afectados por los mecanismos clásicos de resistencia (20, 21). Estos péptidos son considerados los antibióticos de nueva generación y varios de ellos se encuentran en ensayos clínicos: entre ellos el Omiganan (derivado sintético de la indolicidina) y el Pexiganan (derivado de la magainina 2) (22). Sin embargo, para el uso terapéutico de los PAMs aún existen algunas limitaciones como su toxicidad (baja selectividad), la susceptibilidad ante proteasas y su alto costo de producción (23-25).

El diseño de PAMs involucra la modificación de diversas características de la molécula que están relacionadas con su actividad antimicrobiana, citotoxicidad, estabilidad y costo de producción (26). Aunque el análisis de estas propiedades por lo general resulta complejo, diferentes estudios han permitido recolectar información acerca los efectos de estas modificaciones en diversas secuencias peptídicas (27-30). A continuación, se presenta un breve resumen de las características físico-químicas que se han asociado con la actividad antimicrobiana y hemolítica de PAMs.

1.1.1 Secuencia

La mayoría de péptidos que tienen actividad antimicrobiana son ricos en Leucina (Leu), Glicina (Gly) y Lisina (Lys) en su secuencia (<http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic.php>) (31). Igualmente, se ha reportado que la presencia de Arginina (Arg) o Lys con Triptófano (Trp) en una secuencia peptídica favorece la inserción profunda del péptido en la membrana de los patógenos. Particularmente el Trp tiene clara preferencia por la región interfacial de bicapas lipídicas en bacterias, mientras que los residuos de Arg o Lys aportan cargas catiónicas y formación de enlaces de hidrógeno necesarias para la interacción con los componentes aniónicos de las membranas bacterianas (32, 33).

La secuencia y la composición de aminoácidos son cruciales para la actividad antimicrobiana de un péptido, ya que determinan las propiedades estructurales y fisicoquímicas de la secuencia.

Por ejemplo, en el caso de [A^{331}]-P/Rif (321-340) (RYRRKKKMKKALQYIKLLKE), cuando se evaluó la actividad antibacteriana de una secuencia con la misma composición de aminoácidos pero sintetizada al azar (péptido scrambled YKLQLKRKREKKIYMRKKLA), no se presentó actividad antibacteriana indicando que la actividad de [A^{331}]-P/Rif (321-340) depende tanto de la composición y como del orden de la secuencia de aminoácidos (19).

1.1.2 Carga

Aunque se han reportado PAMs neutros (34) y aniónicos (7, 35), generalmente los péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMPs), con carga positiva entre +2 y +9 son más activos ya que son atraídos electrostáticamente por los componentes aniónicos de la membrana/pared de las bacterias (36, 37). Adicionalmente, se ha reportado que la carga podría estar relacionada con la actividad citotóxica del PAM, por ejemplo; el aumento de la carga positiva de la molécula puede reducir su actividad hemolítica (38, 39). Sin embargo, el aumento de carga en la región hidrófila del péptido, puede dar lugar al aumento tanto de la actividad antimicrobiana como de la actividad hemolítica (40). El aumento de carga neta positiva en un péptido puede ser generado por la sustitución de residuos ácidos por residuos tipo amida, lo que incluso ha conferido actividad antimicrobiana a péptidos originalmente inactivos (37). Adicionalmente, cuando se diseñan PAMs una estrategia empleada para aumentar la carga positiva sin modificar su secuencia, es cambiando la carga negativa del extremo C-terminal por un grupo $-CONH_2$ (neutro a pH fisiológico), lo que incrementa en +1 la carga neta del péptido (41, 42). Esta modificación se ha relacionado con la estabilización de la estructura secundaria en péptidos helicoidales, lo que favorece la interacción con bicapas fosfolipídicas y puede dar lugar al aumento en la actividad antimicrobiana y hemolítica del péptido modificado (42).

1.1.3 Estructura

Los PAMs pueden tener o asumir diversas estructuras secundarias que incluyen estructuras α -hélice, hoja- β , extendidas o mixtas (43, 44). Los PAMs de estructura α -hélice suelen ser los más activos sobre membranas microbianas, pero también pueden presentar actividad sobre la membrana de GRs (25, 45). Se ha reportado que la actividad hemolítica de péptidos helicoidales se puede reducir mediante la generación de cambios estructurales mediante

modificación de los extremos C y N-terminal, la formación de enlaces disulfuro y la introducción de D-aminoácidos, Gly o Prolina (Pro) (41, 45-47).

1.1.4 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad hace referencia al porcentaje de aminoácidos con cadenas laterales de naturaleza hidrofóbica en una secuencia, esta característica permite a los PAMs unirse a la membrana y desestabilizar la bicapa lipídica. Aunque el valor óptimo de hidrofobicidad varía de acuerdo a la secuencia particular del péptido, la hidrofobicidad de la mayoría de PAMs naturales es de alrededor del 50% (48). Al aumentar la hidrofobicidad, el péptido tendrá no sólo una mayor estructura α -helicoidal sino también potencialmente mayor actividad antimicrobiana (49, 50). Sin embargo, incrementarla demasiado podría generar la formación de agregados del péptido que reducen su capacidad de acción antimicrobiana (40). Además, el incremento de hidrofobicidad en péptidos catiónicos y anfipáticos, puede aumentar su afinidad por fosfolípidos zwitteriónicos (neutros), que están presentes en la membrana de células de mamíferos, aumentando su actividad hemolítica (25).

1.1.5 Anfipaticidad

La anfipaticidad es la propiedad por la cual el péptido presenta una distribución espacial de los aminoácidos que le confiere una cara hidrofílica y una hidrofóbica a la secuencia, visible mediante proyección helicoidal (51). Esta propiedad ha mostrado ser muy importante para la actividad antibacteriana y selectividad de los PAMs con estructura α -helicoidal y estructura de hoja β (52). La anfipaticidad es medida como el momento hidrofóbico del péptido (μH), cuyo valor varía entre 0 y 3,26, el cual es calculado con una escala estándar de hidrofobicidad para cada aminoácido (10, 53, 54). En péptidos helicoidales el aumento de la anfipaticidad (mayor definición de las caras hidrofílica e hidrofóbica) ha sido asociado con la actividad sobre membranas y su disminución puede dar lugar a péptidos con actividad hemolítica reducida (38, 55). Sin embargo, existen discrepancias en cuanto al efecto de la anfipaticidad perfecta (caras muy definidas) o imperfecta (caras discontinuas) sobre la función y selectividad de PAMs, debido a que péptidos diseñados con anfipaticidad imperfecta pueden ser más activos y selectivos que péptidos con anfipaticidad perfecta (56).

1.2 Herramientas bioinformáticas para el diseño de PAMs y predicción de algunas de sus propiedades

La actividad antimicrobiana y selectividad de los PAMs son el resultado de múltiples propiedades fisicoquímicas que están relacionadas, lo que hace difícil predecir el efecto causado por la modificación de una de estas propiedades sobre las demás y sobre la actividad antimicrobiana y hemolítica (50). Debido a esta complejidad, el diseño de PAMs se ha apoyado en las propiedades de secuencias de PAMs depositadas en bases de datos y en las herramientas computacionales que, basadas en homología, predicen las propiedades y posible actividad sobre membranas de microorganismos, permitiendo direccionar de forma racional las modificaciones que podrían dar lugar a mayor actividad antimicrobiana y selectividad de los péptidos diseñados (31). Se puede nombrar la base de datos Collection of Anti-microbial Peptides CAMP originada en 2010 que en su última versión CAMP3 ([www.camp3.bicnirrh.res.in.](http://www.camp3.bicnirrh.res.in)) cuenta con 10247 secuencias de AMPs (57), y otras como Yet Another Data base of AMPs (YADAMD), Database of Anuran Defense Peptides (DADP), y database Linking Antimicrobial Peptide (LAMP), que se especializan principalmente en péptidos aislados de fuentes específicas (31).

La base de datos Antimicrobial Peptide Database (APD), creada en 2003 y que en su versión más reciente: "APD3: Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor" (<http://aps.unmc.edu/AP/>), tiene depositadas 2747 secuencias antimicrobianas originarias de los seis reinos (principalmente animal y vegetal), se destaca por contar con parámetros bastante rigurosos para la introducción de una nueva secuencia, lo que le confiere alta confiabilidad a la información depositada (58). Adicionalmente, APD3 incluye un predictor de estructura secundaria y brinda información acerca de algunas características fisicoquímicas de los PAMs. Esta base de datos ha sentado parámetros importantes en cuanto a los rangos en los que se deben mantener algunas propiedades para aumentar la probabilidad de obtener secuencias con actividad antimicrobiana, es decir, carga entre -5 y +10, hidrofobicidad entre 10 y 80%, y longitud entre 5 y 174 aminoácidos pero preferiblemente menos de 60 (31).

1.3 Péptido [A^{331}]-*PfRif* (321-340)

Las proteínas de *Plasmodium falciparum* han sido ampliamente estudiadas en el desarrollo de vacunas antimaláricas (59-61). Una de las aproximaciones consiste en la síntesis de péptidos cortos (20 residuos) derivados de estas proteínas y posterior evaluación de su capacidad de unión a la célula blanco del parásito y de su efecto en el proceso de invasión (62).

Dentro de estos estudios se han evaluado péptidos derivados de la proteína *PfRif*, un miembro de la familia de proteínas Rifinas de bajo peso molecular (30-45 KDa) que se expresa durante el ciclo eritrocítico del parásito y que se ha relacionado con adhesión (63). En busca de otras aplicaciones para estas moléculas peptídicas, se realizaron estudios de relación estructura-actividad con el péptido [A^{331}]-*PfRif* (321-340) (321 RYRRKKKMKKKLQYIKLLKE 340) y péptidos análogos. Se estableció que el péptido [A^{331}]-*PfRif* (321-340): 321 RYRRKKKMKKALQYIKLLKE 340 inhibe el crecimiento de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (19). La actividad antibacteriana de [A^{331}]-*PfRif* (321-340) contra *E. coli* ML35 presentó un CMI de 22 μ M, mientras que contra *S. aureus* ATCC 25923 la CMI fue de 350 μ M y la actividad hemolítica presentó CMH de 1 μ M (17). Este péptido no exhibió efecto tóxico sobre células eucariotas HeLa y HepG2 a 1x CMI y 2x CMI y sus posibles blancos de acción son la membrana y el ADN bacteriano. Se sugirió que la hidrofobicidad, la anfipaticidad y la conformación helicoidal del péptido son relevantes en el mecanismo de acción (19). Por lo anterior la secuencia del péptido [A^{331}]-*PfRif* (321-340) es de interés particular y se tomó como plantilla para el diseño y desarrollo de péptidos cortos que presenten mayor actividad antibacteriana e índice de selectividad.

2. Marco Teórico

2.1 Péptidos antimicrobianos (PAMs)

Los PAMs son péptidos que muestran actividad contra los microorganismos y usualmente son eficaces contra un solo tipo de microorganismo, por lo que se clasifican en péptidos antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios y antivirales (20, 64-66). También hay péptidos que presentan amplio espectro de actividad e inclusive actividad antitumoral (20, 67).

En general, los PAMs contienen menos de 100 aminoácidos (33), la mayoría presenta carga positiva a pH fisiológico (68), estructura α -helicoidal (69) y aproximadamente el 50% de los aminoácidos son hidrofóbicos (43). Se ha reportado resistencia frente a algunos PAMs, por ejemplo: el mecanismo de defensa proteolítica en estafilococos inducido por el PAM aniónico Dermicidina (7). Sin embargo, los PAMs son de gran interés debido a que son menos propensos a inducir resistencia como consecuencia de su amplio espectro de actividad, pueden actuar con múltiples mecanismos de acción y actividades rápidas (8, 9, 41). En general, los PAMs asumen estructuras anfipáticas que les permite interactuar directamente con las bicapas fosfolipídicas microbianas, permeabilizándolas rápidamente (35, 52).

2.1.1 PAMs de origen natural

Los PAMs de origen natural (plantas y animales) hacen parte del sistema inmune innato y están presentes en casi todos los organismos como: bacterias como *Bacillus amyloliquefaciens* que produce la bacteriocina Plantazolicina de 42 aminoácidos FZB42); artrópodos, como el escorpión africano, del cual se han aislado la Pandinina 1 y la Opistoporina 1; mamíferos como el cerdo, que produce Cecropina P1, entre otros (70, 71) . En humanos, prácticamente todos los tejidos y células normalmente expuestos a los microbios son capaces de producir PAMs, inclusive la actividad antimicrobiana de la saliva depende en gran medida de PAMs ricos en histidina conocidos como Histatinas (72). Los PAMs naturales son parte fundamental del sistema inmune innato, lo que les confiere una acción rápida contra los agentes infecciosos microbianos (73). No obstante, se ha descartado el uso de muchos de ellos como antibióticos debido a que no son selectivos, resultando tóxicos sobre las células eucariotas (en las que también se ve afectada la membrana celular) (55), como ocurre con las Defensinas (74).

2.1.2 PAMs de origen sintético

La obtención de péptidos sintéticos permite variar las características que condicionan su actividad sobre diversas membranas. Por ejemplo, análogos del péptido Dermaseptina S4 (28 residuos) con menor hidrofobicidad, mayor carga neta positiva y menor longitud (13 y 16 residuos), presentaron mayor actividad antibacteriana y menor actividad hemolítica que el péptido nativo (49). Péptidos prometedores se han obtenido mediante diseño y síntesis química, por ejemplo, el Pexiganan (análogo de Magainina) (75), o el Omiganan (derivado de Indolicidina) (76). La producción por síntesis química ofrece un amplio rango de posibilidades con respecto al diseño y modificación de péptidos que no se obtiene al usar tecnologías recombinantes, por ejemplo, la posibilidad de incluir aminoácidos no naturales y ciclar las moléculas peptídicas con diferentes reacciones químicas para hacerlas más estables bajo condiciones fisiológicas (23, 77, 78).

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) es un enfoque rápido para la producción de PAMs (79), este método permite la producción de muestras pequeñas para ensayos de laboratorio, pero se ha considerado no rentable, con un costo estimado de \$ 100 a \$ 1,000 para 1 mg de PAM (80). A pesar de esto, la SPPS a gran escala se ha convertido en una tecnología viable para producir péptidos terapéuticos pequeños y medianos que oscilan entre 5 y 50 residuos, mientras que la síntesis convergente ha resultado ser una opción para obtener péptidos de mayor longitud (81). La optimización de los métodos de SPPS ha ganado relevancia debido a la necesidad de producir péptidos modificados que no pueden obtenerse mediante tecnologías recombinantes y para obtener productos más limpios que respondan al crecimiento en la cantidad de péptidos candidatos para uso terapéutico; por esto, continuamente se investigan estrategias para optimizar estos métodos y darle viabilidad a la producción a gran escala (82, 83).

Ahora bien, para el desarrollo de un nuevo medicamento basado en péptidos es deseable que presente alta selectividad sobre los patógenos (84). Esta selectividad está determinada por las diferencias que existen entre la superficie de células procariontas y eucariotas, como las glicoproteínas de la pared, la composición de la membrana, el potencial transmembrana, la polarización y las características estructurales (25, 40, 52). Teniendo en cuenta que la actividad de los PAMs está condicionada tanto por sus propiedades fisicoquímicas como por la célula objetivo, donde la primera interacción involucra la membrana celular, se revisaron algunas características y diferencias importantes entre las membranas bacterianas y de células de mamíferos.

2.1.3 Membrana celular

En general la membrana celular es una estructura que rodea la célula definiendo el interior y exterior de la misma, su grosor oscila entre 6 y 10 nm y consta principalmente de lípidos y proteínas (85). Los lípidos están organizados formando una doble capa fosfolipídica que se mantiene unida por los extremos de las cadenas hidrocarbonadas mediante interacciones de van der Waals. La región hidrofóbica del ácido graso se orienta hacia el interior y las cabezas polares (hidrofílicas) se orientan hacia el exterior (86). La bicapa es una barrera osmótica que se interpone a la libre difusión de moléculas entre el medio interno y externo (87). De esta forma, los componentes lipídicos de la membrana constituyen la barrera de permeabilidad mientras que las proteínas funcionan como sistema de transporte que proporcionan permeabilidad selectiva a la membrana (84).

Una membrana presenta tres tipos de lípidos: los fosfolípidos, los glicolípidos y los esteroides (colesterol en células animales) (85). Los fosfolípidos más comunes son derivados del glicerol y presentan carácter anfipático debido a la hidrofobicidad de las cadenas alifáticas de los ácidos grasos y a la presencia de la cabeza polar que corresponde al grupo fosfato y a los grupos polares que en muchos casos están cargados a pH 7 (85).

Los fosfolípidos fundamentales en una membrana plasmática son mayoritariamente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, en menor medida se encuentran también la cardiolipina, fosfatidilserina y el fosfatidilinositol (88). En la célula animal (a diferencia de la célula bacteriana) está presente el colesterol (aproximadamente en un 50%) que se inserta en la bicapa para modular la fluidez al limitar los movimientos de los ácidos grasos de los fosfolípidos (85).

Las bicapas enriquecidas con fosfolípidos zwitteriónicos como fosfatidiletanolamina (PE) o fosfatidilcolina (PC), son encontradas comúnmente en membranas citoplasmáticas de mamíferos (generalmente de carga neutra), mientras que las membranas celulares compuestas predominantemente por fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), o fosfatidilserina (PS), tienden a ser altamente negativas y se encuentran en muchos patógenos bacterianos. (48). Los PAMs al ser catiónicos se ven atraídos electrostáticamente por las membranas cargadas negativamente y por tanto actúan preferentemente contra bacterias (44).

2.1.4 Pared celular en bacterias

La pared celular es una estructura rígida presente en la mayoría de las bacterias que se sitúa por fuera de la membrana citoplasmática, su espesor oscila entre 20 y 50 nm (89). El peptidoglicano, su principal constituyente, es un copolímero constituido por dos derivados de carbohidratos, N-acetil Glucosamina y N-acetil Murámico (N-Ac.G, N-Ac.M), unidos por enlaces β 1-4 y asociados a cadenas peptídicas cortas a través del ácido N-acetil murámico. Diferencias en la composición y estructura de la pared celular permiten clasificar las bacterias en 2 tipos: bacterias Gram-positivas, en las que la pared consta de una única capa gruesa de peptidoglicano y bacterias Gram-negativas, con una pared celular que consta de una membrana externa y una capa interna de peptidoglicano (89).

2.2 Selectividad y potencial terapéutico de los PAMs

La selectividad de los PAMs se mide calculando su índice terapéutico (IT). En general, el IT se refiere a la relación entre la dosis a la que un fármaco causa efecto tóxico y la dosis a la que produce el efecto terapéutico. Por convención, el índice terapéutico se calcula según la relación de la ecuación 1:

$$IT = \frac{DT_{50}}{DE_{50}} \quad (1)$$

Donde, DT_{50} es la concentración a la que un fármaco causa el 50% de efecto tóxico (dosis tóxica) y DE_{50} es la concentración a la que el fármaco es eficaz en un 50% (dosis efectiva), estos valores son determinados según las curvas dosis-respuesta (90, 91).

Sin embargo, para evitar la superposición de las curvas dosis-respuesta, este cálculo es modificado, dando lugar a relaciones como: $IT = DT_{10}/DE_{90}$ o $IT = DT_1/DE_{99}$ (92, 93).

En el caso de los PAMs, como aproximación temprana al IT, se ha desarrollado una medida in vitro de la selectividad sobre los patógenos, es decir la relación entre la mínima concentración que genera un efecto tóxico sobre células eucariotas (generalmente GR) y la mínima concentración que genera inhibición total del crecimiento bacteriano.

De esta forma, el IT es calculado con la siguiente relación (ecuación 2):

$$IT = \frac{CMH}{CMI} \quad (2)$$

donde CMH es la concentración mínima hemolítica y CMI es la concentración mínima inhibitoria del péptido sobre el microorganismo. De esta forma, un alto índice terapéutico indica una alta selectividad sobre microorganismos (94).

3. Justificación

La continua aparición de infecciones causadas por cepas resistentes a los antibióticos ha generado un grave problema de salud pública en Colombia y el mundo (2). Por esto es necesario desarrollar nuevos agentes antimicrobianos con diferentes mecanismos de acción. Los PAMs de origen natural han sido reconocidos como buenos candidatos para la generación de antibióticos, pero la baja selectividad y estabilidad, limitan su uso a nivel terapéutico (20). Es necesario diseñar e identificar péptidos sintéticos que permitan desarrollar medicamentos para combatir las infecciones bacterianas sin inducir resistencia.

El diseño e identificación de un nuevo péptido con actividad antimicrobiana (partiendo de *novo* o de una plantilla), debe estar enfocado en la obtención de una secuencia con alta selectividad (95). El péptido [A³³¹]-PfRif (321-340) fue propuesto como un péptido plantilla para el diseño de nuevos PAMs (19). Por esa razón, en este estudio se obtuvieron y evaluaron péptidos derivados del péptido [A³³¹]-PfRif (321-340) con el fin de obtener un péptido corto con igual o mayor actividad bacteriana que el péptido plantilla y con mayor selectividad contra bacterias.

4. Pregunta de investigación

¿Péptidos cortos derivados de la secuencia [A³³¹]-PfRif (321-340) mantienen su actividad antibacteriana y hemolítica de forma independiente al cambio inherente en sus propiedades fisicoquímicas?

5. Hipótesis

Secuencias cortas derivadas del péptido [A^{331}]-P/Rif (321-340): RYRRKKKMKKALQYIKLLKE, que presentan tendencia estructural α -helicoidal mantienen la actividad antibacteriana y hemolítica del péptido original.

6. Objetivos

6.1 General

Evaluar la actividad antibacteriana y citotóxica de péptidos sintéticos cortos derivados de la secuencia [A^{331}]-P/Rif (321-340) y su relación con la conformación estructural.

6.2 Específicos

- 6.2.1 Sintetizar péptidos cortos derivados de [A^{331}]-P/Rif (321-340).
- 6.2.2 Evaluar la actividad antibacteriana y hemolítica de los péptidos sintéticos derivados de la secuencia original.
- 6.2.3 Evaluar la actividad citotóxica de los péptidos sintéticos cortos con actividad antibacteriana sobre células de mamíferos.
- 6.2.4 Comparar la tendencia de estructura secundaria del péptido [A^{331}]-P/Rif (321-340) y sus derivados.

7. Diseño preliminar

Etapas 1. Fragmentos cortos de la secuencia de [A³³¹]-PfRif (321-340) fueron sintetizados mediante síntesis química en fase sólida y caracterizados mediante RP-HPLC y MALDI-TOF MS.

Etapas 2. La actividad antibacteriana de las secuencias cortas fue evaluada contra cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Etapas 3. La actividad citotóxica de los péptidos fue evaluada sobre glóbulos rojos humanos (GRh).

Etapas 4. Se evaluó el potencial terapéutico de las secuencias activas mediante ensayos de sinergia, actividad antibacteriana en presencia de suero humano y actividad citotóxica contra dos líneas celulares humanas.

Etapas 5. Se evaluó de manera preliminar si el mecanismo de acción de la secuencia [A³³¹]-PfRif (321-340) se mantiene en sus derivados activos.

Etapas 6. Los péptidos fueron caracterizados por DC y se analizaron algunas de sus propiedades fisicoquímicas mediante análisis bioinformático.

8. Metodología

8.1 Secuencias peptídicas

A partir de la secuencia del péptido [A³³¹]-PfRif (321-340) se diseñaron y sintetizaron diez péptidos. Cinco, con remoción progresiva de los aminoácidos de la región N-terminal, tres fueron diseñados de tal forma que contengan secuencias entre 7-8 aminoácidos que cubren la región N-terminal, central y C-terminal de la secuencia y dos a los cuales se les removió de forma simultánea aminoácidos de la región N y C-terminal (Tabla 1).

Tabla 1. Péptidos sintéticos derivados de [A³³¹]-PfRif (321-340)

Nombre	Secuencia
[A ³³¹]-PfRif (321-340)	RYRRKKKMKKALQYIKLLKE
[A ³³¹]-PfRif (324-340)	RKKKMKKALQYIKLLKE
[A ³³¹]-PfRif (325-340)	KKKMKKALQYIKLLKE
[A ³³¹]-PfRif (326-340)	KKMKKALQYIKLLKE
[A ³³¹]-PfRif (327-340)	KMKKALQYIKLLKE
[A ³³¹]-PfRif (328-340)	MKKALQYIKLLKE
PfRif (321-327)	RYRRKKK
[A ³³¹]-PfRif (327-334)	KMKKALQY
PfRif (334-340)	YIKLLKE
[A ³³¹]-PfRif (326-337)	KKMKKALQYIKL
[A ³³¹]-PfRif (324-334)	RKKKMKKALQY

8.1.1 Obtención de los péptidos

Los péptidos fueron obtenidos mediante síntesis química de péptidos en fase sólida (SPPS por sus siglas en inglés) por la estrategia Fmoc/*t*Bu (79, 96). Brevemente, la resina Rink amida (100 mg, con una sustitución de 0.46 meq/g) se sometió a un proceso de hinchamiento y solvatación de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (2 h con N,N dimetilformamida (DMF) a temperatura ambiente (TA) y agitación constante (AC). La remoción del grupo Fmoc se realizó por tratamiento con solución de 4-metilpiperidina al 25%, tritón 1%, en N,N-dimetilformamida (DMF) (v/v) por 10 min con AC y TA (2x), luego la resina se lavó con DMF (4x1 min), 2-Isopropanol (IPA) (4x1 min) y Diclorometano (DCM) (4x1 min) y la presencia de los grupos amino libres se determinó por el test de Kaiser.

Las reacciones de activación y acople de los Fmoc-aminoácidos se realizaron utilizando carbodiimidas. Se empleó la estrategia de éster modificado; para esto se disolvió el aminoácido la N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y el 1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol (6-Cl-HOBt) (1:1:1; 5 excesos respecto a los meq de resina) en DMF y con AC por 15 min a TA. El aminoácido activado fue mezclado con la resina o resina-péptido y se mantuvo en reacción con AC y TA por 12 h, transcurrido el tiempo de reacción, la solución se retiró mediante filtración y se lavó con DMF (2x1 min), IPA (2x1 min) y DCM (2x1 min). La reacción fue monitoreada mediante el test de Kaiser.

Para realizar el test de Kaiser, se prepararon tres soluciones: (i) Fenol en etanol absoluto (4 g/mL); (ii) 1,0 mL de una solución acuosa de KCN (0,65 mg/mL) fue mezclado con 49,0 mL de Piridina; (iii) 1,25 g de Ninhídrina fueron disueltos en 25 mL de etanol absoluto. Las soluciones (i) y (ii) fueron mezcladas (1:1 v/v) y almacenadas y rotuladas como Solución A, la solución (iii) fue rotulada como Solución B y almacenada a 4°C en la oscuridad. Para realizar la prueba se tomó una fracción de la resina-péptido seca (~1 mg) a la que se adicionaron 150 µL de la mezcla de las soluciones A y B (2:1; v/v). La mezcla se sometió a calentamiento durante 5 min a 105°C. Una coloración azul indicó prueba positiva para la presencia de aminas primarias y la coloración amarilla indicó prueba negativa.

La desprotección de las cadenas laterales y desanclaje del péptido se realizaron tratando la resina-péptido con solución de TFA/H₂O/EDT/TIPS (92,5/2,5/2,5/2,5 % v/v) manteniéndose en reacción durante 4-6 h a TA. La solución se filtró y el péptido se precipitó por adición de éter etílico frío. La solución se centrifugó a 2500 rpm por 10 min y el sobrenadante se desechó, luego se realizaron 5 lavados con éter etílico frío bajo las mismas condiciones descritas.

3.1.2 Caracterización de péptidos por cromatografía RP-HPLC analítica

De manera general; el péptido disuelto (1 mg/mL) en solvente A (0,05% TFA en Agua), fue analizado en un equipo HPLC Agilent series 1260 usando una columna C18 (Chromolith 4,6x50 mm) y empleando un gradiente de elución del 5 al 50% de solvente B (0,05% TFA en Acetonitrilo) en solvente A, el tiempo de gradiente fue de 8 min con un flujo de 2 mL/min y lectura a una longitud de onda de 210 nm.

3.1.3 Purificación de péptidos por extracción en fase sólida (RP-SPE)

Con base en el perfil cromatográfico se diseñó para cada péptido un gradiente de elución en una columna Supelclean LC-18 RP-SPE. La columna fue acondicionada de acuerdo con los protocolos del proveedor. Los péptidos disueltos en solvente A, fueron filtrados por membrana de 0,44 μm y sembrados en la columna. La elución se realizó mediante un gradiente escalonado con concentraciones crecientes de solvente B, las fracciones fueron recolectadas y analizadas por RP-HPLC reuniendo las fracciones con mayor pureza cromatográfica.

1.1.1 Análisis de péptidos por espectrometría de masas

Se determinó la relación masa/carga de los péptidos mediante espectrometría de masas Matrix Assisted Laser Desorption Ionization -Time Of Flight (MALDI-TOF), utilizando un equipo Bruker Daltonics Microflex. El péptido (1 mg/mL) fue mezclado con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (1 mg/mL) en una relación 18:2,5 v/v. 1 μL de esta mezcla fue aplicada sobre la placa porta muestras del equipo y secada a TA, la lectura se realizó en modo de reflextrón con una potencia de láser 35-50% y 200 disparos (97).

8.2 Caracterización general de las cepas bacterianas

8.2.1 Estandarización de las curvas de crecimiento de las cepas bacterianas

Se estandarizaron las curvas de crecimiento de siete cepas bacterianas (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC11775, *E. coli* ML35 ATCC 43827, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212). Las bacterias fueron plaqueadas (por agotamiento) en medio de cultivo rico en nutrientes Luria-Bertani agar (LBA) que contiene 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl y 15 g/L de agar; y fueron incubadas toda la noche a 37 °C (18-24 h). Al día siguiente, se tomaron de 3 a 4 colonias morfológicamente similares y se inocularon en 5 mL de medio de cultivo LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl); y fueron incubadas a 37 °C en AC, monitoreando la densidad óptica (DO) a 620 nm cada hora durante 11 h.

8.2.2 Estandarización de las curvas de calibración

Una alícuota del cultivo en fase logarítmica fue diluida serialmente 1:2 v/v, luego cada dilución a su vez fue diluida serialmente en base 10 y la absorbancia fue leída a 620 nm, en un volumen de 270 µL. Posteriormente diluciones entre 10³ y 10⁸ fueron sembradas en cajas de Petri, y se agregó medio agar de conteo de placa (Agar Plate Count) que contiene 5 g/L de triptona, 1 g/L de glucosa, 2,5 g/L de extracto de levadura y 15 g/L de agar. Las cajas fueron incubadas por 48 h a 37 °C y posteriormente se contaron las UFC y se graficó UFC vs Abs.

8.3 Actividad antibacteriana

8.3.1 CMI por dilución en caldo

Para determinar la CMI de los péptidos, se empleó el método estándar de micro dilución en caldo (98). Brevemente, por duplicado, diluciones seriadas de los péptidos (concentraciones entre 100-0.098 µM) en una placa de 96 pozos con un volumen final de 50 µL fueron incubadas con un inóculo bacteriano (~5 × 10⁵ UFC/mL) en MHB (98, 99). El inóculo se obtuvo a partir de la ecuación de la curva de calibración para cada cepa en fase exponencial según la curva de crecimiento. El control negativo del tratamiento fueron células sin péptido. Los controles positivos del ensayo fueron, el péptido [A³³¹]-Pfrif (321-340) (19) y cuatro antibióticos utilizados

de acuerdo a la cepa bacteriana. La CMI fue determinada como la concentración más baja de péptido que es capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano. Para evaluar si la actividad de los péptidos podría verse afectada en suero humano, la CMI también fue medida en MHB en presencia de 50% de suero humano fresco.

8.3.2 Actividad bactericida

La actividad bactericida se evaluó por siembra en agar rico en nutrientes de los pozos donde no se detectó crecimiento en el ensayo de CMI en MHB, la CMB fue determinada como la concentración más baja de péptido que mata las bacterias, es decir, aquella donde no hubo crecimiento en el agar (99).

8.3.3 Sinergia con antibióticos

Para evaluar la actividad antibacteriana de los péptidos en combinación con antibióticos se empleó el método del tablero de ajedrez (100). Para esto, en una placa de 96 pozos se agregaron los péptidos a diferentes concentraciones (diluciones 1:2 desde $2 \times \text{CMI}$ hasta $0.03 \times \text{CMI}$) en combinación con diferentes concentraciones del antibiótico (Gentamicina o Ciprofloxacina). Posteriormente se agregó la suspensión bacteriana para una concentración final de $\sim 5 \times 10^5$ UFC/mL en MHB y se incubó a 37°C por 18 h. La absorbancia fue medida a 620 nm. Así se obtuvo la CMI individual del péptido y del antibiótico y la CMI óptima en combinación. Con estos datos se calculó la concentración inhibitoria fraccional (CIF), es decir $(\text{CMI en combinación}) / (\text{CMI individual})$. Luego la sumatoria (CIF del péptido + CIF del antibiótico) fue interpretada de la siguiente manera: sinergia ($\text{CIF} \leq 0,5$), indiferencia ($0,5 < \text{CIF} \leq 4$) y antagonismo ($\text{CIF} > 4$) (101).

8.4 Permeabilidad de la membrana interna de *E. coli* ML-35

Para evaluar el efecto de los péptidos con actividad antibacteriana sobre la permeabilidad la membrana interna de *E. coli* ML35, ésta cepa que produce constitutivamente la enzima β -galactosidasa fue sembrada en placas de 96 pozos ($\sim 5 \times 10^5$ UFC/mL) por triplicado en ausencia y presencia de los péptidos a $1 \times \text{CMI}$ en PBS suplementado con el sustrato orto-nitrofenil- β -D-galactosido (ONPG) (1.5 mM). Esta placa fue incubada a 37°C y la producción de

o-nitrofenol fue monitoreada cada 30 min por espectrofotometría a 420 nm cada 30 min durante 8 h (102). Como control positivo se utilizaron bacterias tratadas con el péptido original, [A³³¹]-Pfrif (321-340), y bacterias tratadas con Cecropina, como control negativo se usaron bacterias sin tratamiento.

8.5 Actividad hemolítica

100 µL de cada péptido a diferentes concentraciones fueron agregados por duplicado en una placa de 96 pozos, posteriormente se añadieron 100 µL de GRh frescos previamente lavados (3 veces con PBS 1X) y resuspendidos al 5 % v/v en PBS 1X. La concentración final de cada péptido varió entre 200 y 0,196 µM. Después de la incubación a 37 °C durante 1 h, las muestras fueron centrifugadas a 1000 xg por 5 min y la absorbancia de 100 µL del sobrenadante fue medida a 540 nm usando un lector de micro placas. La absorbancia de GRh tratados con 0,1 % de Tritón X-100 fue tomada como 100 % de hemólisis (103).

8.6 Actividad citotóxica

La citotoxicidad de los péptidos fue evaluada contra dos líneas celulares humanas: HepG2 ATCC HB-8065 (células derivadas de hepatocitos humanos) y HT29 ATCC HTB-38 (células epiteliales derivadas de colon humano); mediante el ensayo colorimétrico con MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio). Las células cultivadas durante 24 h a 37 °C (5 % de CO₂) en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con 10 % de Suero Fetal Bovino, fueron sembradas en micro placas de 96 pozos en un volumen de 100 µL. El péptido fue evaluado a 1×CMI y 2×CMI. Para esto, luego de las 24 h de incubación el medio fue removido (dejando solo las células adheridas al pozo) y se adicionaron los tratamientos en medio DMEM con volumen final de 100 µL/pozo. Luego, las células fueron tratadas con MTT e incubadas de 2-4 h, a las 0 h y a 24 h pos-tratamiento. En esta prueba, el tetrazolio amarillo se reduce cuando las células son metabólicamente activas dando lugar al producto púrpura Formazán en el interior de las células. Este compuesto de color púrpura fue solubilizado agregando DMSO concentrado y cuantificado a 540 nm (40). Células sin tratamiento fueron usadas como control negativo y células con DMSO concentrado como control positivo de citotoxicidad.

8.7 Análisis de las propiedades fisicoquímicas

8.7.1 Análisis bioinformático de las secuencias peptídicas

Las características fisicoquímicas de las secuencias fueron evaluadas por predicción mediante el uso de la herramienta informática online “APD3: Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor” (<http://aps.unmc.edu/AP/>); la cual calcula la carga e hidrofobicidad y predice si hay posible estructura α -helicoidal. Además APD3, con base en ciertas propiedades brinda un veredicto acerca de la posible actividad antimicrobiana de los péptidos (31). Mediante el uso del programa online “Heliquest” (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>) se llevó a cabo la proyección helicoidal y se calculó el momento hidrofóbico como medición de la anfipaticidad de la hélice (51).

8.7.2 Dicroísmo circular (DC)

Los péptidos (5 μ M) fueron analizados mediante DC, usando una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de paso de luz a TA en PBS 1X, con 2,2,2 trifluoroetanol (TFE) al 30% (v/v) en PBS) y con Dodecilsulfato de sodio (SDS) 10mM como co-disolventes individuales (104-106). Los espectros fueron obtenidos en un espectrómetro Jasco J-810 con flujo de nitrógeno haciendo un promedio de tres barridos tomados desde 260 a 190 nm a una velocidad de exploración de 20 nm/min y un ancho de banda de 1 nm. Los datos fueron recogidos usando el software Spectra Manager (95).

9. Resultados y discusión

Los PAMs son una alternativa prometedora para combatir las infecciones bacterianas y el desarrollo de resistencia de los patógenos (20). La identificación de secuencias cortas con actividad antibacteriana selectiva es relevante ya que estas secuencias presentan ventajas como facilidad de síntesis, posibilidad de escalamiento y menor costo de producción (107). En este trabajo se diseñaron y sintetizaron péptidos cortos derivados del péptido antibacteriano [A³³¹]-PfRif (321-340) (19), y se evaluó su actividad contra cepas Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) y Gram-positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*). Adicionalmente se evaluó su actividad hemolítica y citotóxica contra líneas celulares humanas (HepG2 y HT29). Los péptidos fueron caracterizados por DC y mediante análisis bioinformático.

9.1 Síntesis y caracterización de las secuencias derivadas de [A³³¹]-PfRif (321-340)

Se sintetizaron diez péptidos derivados de la secuencia [A³³¹]-PfRif (321-340), cuya longitud varió entre 7 y 17 aminoácidos. Éstos péptidos fueron obtenidos con un grupo amida en el extremo C-terminal (Tabla 2). El péptido ³²¹RYRRKKKMKKALQYIKLLKE³⁴⁰ en estudios anteriores presentó alta dificultad sintética, específicamente en la incorporación de los residuos del extremo N-terminal (subrayados). Basados en esta dificultad se diseñaron secuencias en las que se removieron algunos aminoácidos de esta región: [A³³¹]-PfRif (324-340), [A³³¹]-PfRif (325-340), [A³³¹]-PfRif (326-340), [A³³¹]-PfRif (327-340) y [A³³¹]-PfRif (328-340).

Adicionalmente, se sintetizaron tres péptidos con longitud ≤ 8 aminoácidos que abarcan la región N-terminal (PfRif (321-327)), central ([A³³¹]-PfRif (327-334)) y C-terminal (PfRif (334-340)) para evaluar si la actividad biológica de la secuencia es producto de una corta región en particular. Finalmente, se sintetizaron dos secuencias en las que se removieron aminoácidos de la región C-terminal y N-terminal en forma simultánea ([A³³¹]-PfRif (326-337) y [A³³¹]-PfRif (324-334)).

Luego del proceso de síntesis, los productos crudos obtenidos fueron caracterizados por cromatografía RP-HPLC. Los perfiles cromatográficos en todos los casos presentaron una especie mayoritaria indicando que el proceso de síntesis fue eficiente. Luego de la purificación por RP-SPE se obtuvieron productos con pureza cromatográfica entre el 71 y 98 %, como se

muestra en la Tabla 2. La síntesis del péptido [A³³¹]-P~~f~~Rif (324-340), que tiene 17 residuos de aminoácidos, mostró alta dificultad en las reacciones de acople de los aminoácidos de la región N-terminal, a partir de la Lys³²⁹ la síntesis se hace más compleja con la inserción de cada nuevo aminoácido requiriendo tres o más ciclos para completar la reacción (Figura 1). Los péptidos truncados, en la región N-terminal, presentaron de manera general dificultad en la inserción de los residuos ³²⁴RKKKMK³²⁹, (Figura 1). Este comportamiento se evidencia en los perfiles cromatográficos de los péptidos [A³³¹]-P~~f~~Rif (325-340) y [A³³¹]-P~~f~~Rif (327-340), ya que el pico mayoritario presenta asimetría en la base, hombros y ancho de banda que sugiere presencia de especies no deseadas. Lo anterior está acorde con la pureza cromatográfica calculada para estos péptidos (74% y 71% respectivamente) que indica una posible desventaja en el proceso de síntesis y purificación. Los péptidos que incluyen la región N-terminal mencionada presentaron en general purezas inferiores (con valores $\leq 90\%$) a los péptidos que no la contienen.

Los tiempos de retención de las secuencias variaron entre 0,7 y 5,1 minutos, mostrando la diversidad en la hidrofobicidad de las secuencias que genera mayor o menor interacción con la fase estacionaria hidrofóbica en RP-HPLC (Tabla 2). Éstos tiempos de retención de las secuencias parecen no estar asociados con la eficiencia en el proceso de purificación, pues en péptidos con el mismo tiempo de retención se hallaron purezas cromatográficas considerablemente diferentes. Sin embargo, el número y concentración de las especies no deseadas, y la cercanía en sus t_R podría influir en la eficiencia de la purificación. Los espectros de masas en todos los casos mostraron una señal en la relación m/z correspondiente a la especie $[M+H]^+$, corroborando la identidad de la molécula. En el caso del péptido [A³³¹]-P~~f~~Rif (325-340), adicionalmente se presenta una señal en m/z 1861,469 que corresponde a un especie con delección de Lys (Anexo A1), lo cual se relaciona también con la dificultad de inserción de las lisinas en esta región.

Tabla 2. Caracterización de los péptidos derivados de [A³³¹]-PfRif (321-340) por cromatografía RP-HPLC y MALDI-TOF MS.

Nombre	Secuencia	Longitud	Caracterización Analítica			
			RP-HPLC		MALDI-TOF	
			t _R (min)	Pureza ^a (%)	M ^b	m/z [M+H] ⁺
[A ³³¹]-PfRif (321-340)	RYRRKKKMKKALQYIKLLKE	20	-	-	-	-
[A ³³¹]-PfRif (324-340)	RKKKMKKALQYIKLLKE	17	4,9	86	2144,4	2144,6
[A ³³¹]-PfRif (325-340)	KKKMKKALQYIKLLKE	16	4,9	74	1988,3	1988,5
[A ³³¹]-PfRif (326-340)	KKMKKALQYIKLLKE	15	5,1	90	1860,2	1860,8
[A ³³¹]-PfRif (327-340)	KMKKALQYIKLLKE	14	5,0	71	1732,1	1733,7
[A ³³¹]-PfRif (328-340)	MKKALQYIKLLKE	13	5,1	98	1604,0	1603,2
PfRif (321-327)	RYRRKKK	7	0,7	90	1032,7	1034,8
[A ³³¹]-PfRif (327-334)	KMKKALQY	8	3,0	98	1007,6	1010,1
PfRif (334-340)	YIKLLKE	7	4,1	98	904,6	907,0
[A ³³¹]-PfRif (326-337)	KKMKKALQYIKL	12	4,4	97	1489,9	1490,6
[A ³³¹]-PfRif (324-334)	RKKKMKKALQY	11	3,1	98	1419,9	1420,4

^a Pureza correspondiente al porcentaje de área del pico cromatográfico respecto a todo el cromatograma, ^b Masa monoisotópica teórica.

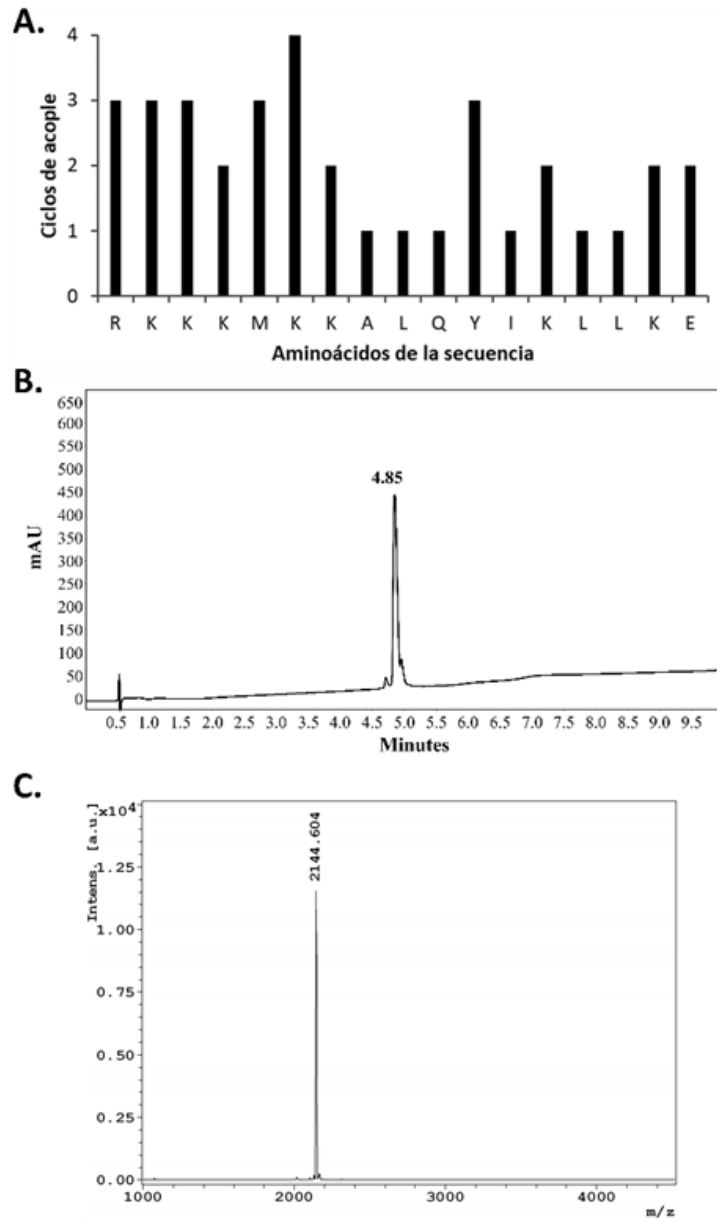


Figura 1. Resultados de síntesis y caracterización por RP-HPLC de [A³³¹]-PRif (324-340). A. Resumen del proceso de síntesis realizado desde el extremo C-terminal hacia el extremo N-terminal **B.** Perfil cromatográfico del péptido puro y **C.** Espectro de masas MALDI-TOF del péptido.

9.2 Caracterización general de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas fueron caracterizadas con el fin de establecer que no presentaran contaminación, para esto se llevó a cabo tinción de Gram y se observaron en el microscopio óptico bajo luz blanca con objetivo 100X. Como se puede ver en la figura 2, las imágenes obtenidas para *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 indican que las cepas están en buenas condiciones, la morfología corresponde con lo esperado. Las otras cepas presentaron resultados similares.

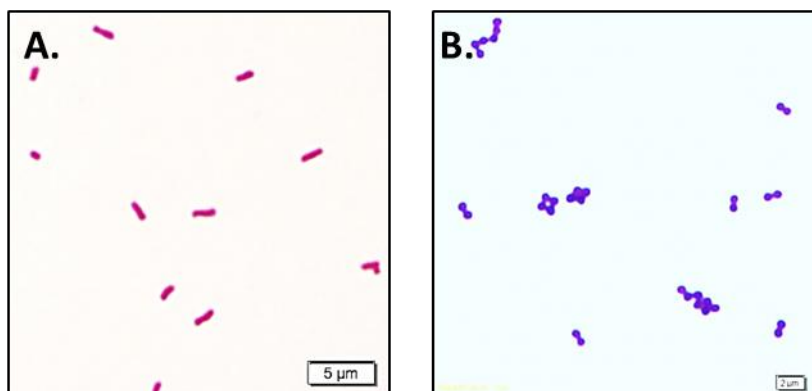


Figura 2. Tinción de Gram y microscopía bajo luz blanca. a. *E. coli* ATCC 25922. b. *S. aureus* ATCC 25923.

Posteriormente, para cada cepa se determinó el incremento de la población bacteriana (como Densidad Óptica (DO)) en función del tiempo en medio LB. Todas las curvas de crecimiento mostraron un comportamiento bacteriano característico (incluyendo la fase inicial de adaptación, fase de crecimiento exponencial y finalmente la fase estacionaria) (108). Por otro lado, las curvas de calibración muestran la relación lineal entre DO y número de UFC/mL, en la figura 3 se muestran, a modo de ejemplo, las curvas de crecimiento y calibración de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923. Para estas y las otras cepas, utilizando el ajuste de los datos por el método de mínimos cuadrados se establecieron las ecuaciones que representan las curvas de calibración, en la Tabla 3 se muestra el resumen de estas ecuaciones, su coeficiente de determinación (R^2) y el porcentaje de variación.

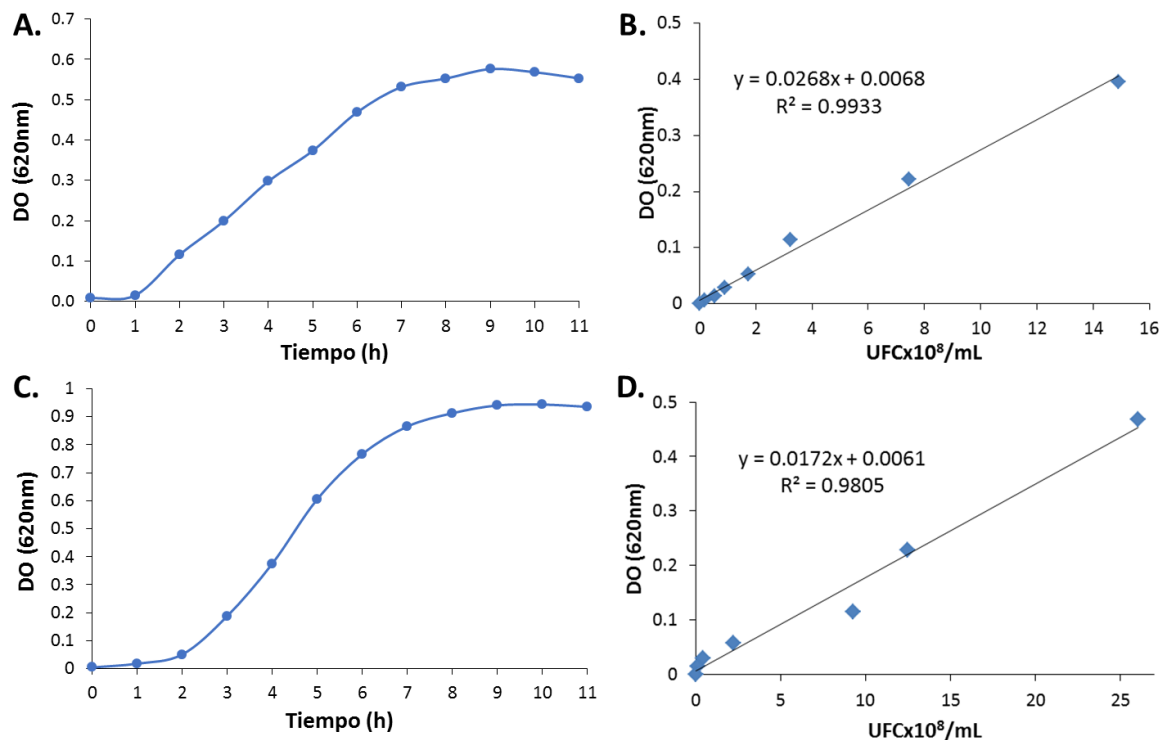


Figura 3. Curvas de crecimiento y calibración de las cepas bacterianas A. Curva de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 en medio de cultivo LB; **B.** Curva de calibración de *E. coli* ATCC 25922 en PBS 1X; **C.** Curva de crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 en medio de cultivo LB; **D.** Curva de calibración de *S. aureus* ATCC 25923 en PBS 1X.

Tabla 3. Ecuaciones de las curvas de calibración obtenidas para las cepas bacterianas.

Cepa bacteriana ATCC	Ecuación de la curva	R ²	Variación (%)
<i>E. coli</i> 25922	$y = 0,0537x + 0,0066$	0,9929	17
<i>E. coli</i> 35218	$y = 0,0537x + 0,0066$	0,9929	5
<i>E. coli</i> 11775	$y = 0,0537x + 0,0066$	0,9929	17
<i>E. coli</i> ML35 43827	$y = 0,0461x + 0,0176$	0,9920	3
<i>P. aeruginosa</i> 27853	$y = 0,0455x - 0,0023$	0,9987	2
<i>S. aureus</i> 25923	$y = 0,0172x + 0,0061$	0,9805	27
<i>E. faecalis</i> 29212	$y = 0,0107x - 0,0034$	0,9853	3

Dónde: $x = (\text{UFC}/\text{mL}) \cdot 10^8$; $y = \text{Absorbancia}$

Estas curvas fueron usadas para el cálculo y preparación del inóculo inicial en los ensayos de CMI y CMB. Este inóculo fue obtenido a partir de un cultivo bacteriano en la mitad de su fase exponencial (4,5–6 h según las curvas de crecimiento).

9.3 Actividad antibacteriana y hemolítica

En la Tabla 4 se resumen los resultados de actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos diseñados para este estudio. Aquí se puede observar que: (i) las secuencias [A³³¹]-PfRif (324-340): RKKKMKKALQYIKLLKE, [A³³¹]-PfRif (325-340): KKKMKKALQYIKLLKE y [A³³¹]-PfRif (327-340): KMKKALQYIKLLKE presentaron actividad contra *E. coli* ATCC 25922, los dos primeros con la misma CMI que el motivo original (25 µM). (ii) El péptido [A³³¹]-PfRif (324-340) fue el único que presentó actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 con CMI de 100 µM. (iii) Ninguno de los péptidos evaluados presentó actividad antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 25923 o *E. faecalis* ATCC 29212, sugiriendo que los péptidos activos son selectivos por bacterias Gram-negativas.

Tabla 4. Actividad antibacteriana de los péptidos derivados de [A³³¹]-PfRif (321-30).

Nombre	Secuencia	Actividad antibacteriana CMI (µM)/CMB (µM)			
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
PfRif(321-340)	RYRRKKKMKKALQYIKLLKE	25/50	>100/>100	>100/>100	>100/>100
PfRif(324-340)	RKKKMKKALQYIKLLKE	25/25	100/100	>100/>100	>100/>100
PfRif(325-340)	KKKMKKALQYIKLLKE	25/25	>100/>100	>100/>100	>100/>100
PfRif(326-340)	KMKKALQYIKLLKE	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100
PfRif(327-340)	KMKKALQYIKLLKE	100/100	>100/>100	>100/>100	>100/>100
PfRif(328-340)	MKKALQYIKLLKE	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100
PfRif(321-327)	RYRRKKK	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100
PfRif(327-334)	KMKKALQY	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100
PfRif(334-340)	YIKLLKE	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100
PfRif(326-337)	KMKKALQYIKL	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100
PfRif(324-334)	RKKKMKKALQY	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100

Valores CMI ± 1 dilución

1) Controles contra *E. coli* y *P. aeruginosa*: Ciprofloxacina (CMI 0,008 y 0,25 µg/mL respectivamente) y Gentamicina (CMI 0,5 y 0,25 µg/mL respectivamente).

2) Controles contra *S. aureus* y *E. faecalis*: Vancomicina (CMI 2 µg/mL).

Nuestros resultados son consecuentes con lo que se observó previamente, para [A³³¹]-PfRif (321-340): a) actividad contra *S. aureus* ATCC 25923 solo a alta concentración (CMI de 350 µM). b) Mayor liberación de calceína, es decir mayor actividad, contra liposomas con mayor contenido del fosfolípido zwitterionico fosfatidiletanolamina (19), éste fosfolípido está presente en mayor proporción en bacterias Gram-negativas que en Gram-positivas (109, 110).

Por otro lado, en los ensayos de actividad hemolítica los péptidos [A³³¹]-PfRif (327-334): KKMKKALQYIKL y [A³³¹]-PfRif (334-340): RKKKMKKALQY mostraron efecto hemolítico con diferencia estadísticamente significativa respecto a los GRs sin tratamiento a 100 y 200 µM (Tabla 5). Los ocho péptidos restantes no mostraron actividad hemolítica a las concentraciones evaluadas (≤200 µM), indicando una mayor selectividad contra bacterias en el caso de los péptidos activos.

Tabla 5. Actividad hemolítica de los péptidos derivados de [A³³¹]-PfRif (321-30).

LfcinB (20-25)₄ fue usada como control positivo de hemólisis.

Péptido	Secuencia	CMH (µM)
[A ³³¹]-PfRif(321-340)	RYRRKKKMKKALQYIKLLKE	1,56
[A ³³¹]-PfRif(324-340)	RKKKMKKALQYIKLLKE	>200
[A ³³¹]-PfRif(325-340)	KKKMKKALQYIKLLKE	>200
[A ³³¹]-PfRif(326-340)	KKMKKALQYIKLLKE	>200
[A ³³¹]-PfRif(327-340)	KMKKALQYIKLLKE	>200
[A ³³¹]-PfRif(321-327)	MKKALQYIKLLKE	>200
PfRif(327-334)	RYRRKKK	>200
[A ³³¹]-PfRif(334-340)	KMKKALQY	>200
PfRif(328-340)	YIKLLKE	>200
[A ³³¹]-PfRif(327-334)	KKMKKALQYIKL	100
[A ³³¹]-PfRif(334-340)	RKKKMKKALQY	200
LfcinB (20-25) ₄	(RRWQWR) ₄ K ₂ Ahx ₂ C ₂	6,25

Estos resultados de actividad contra bacterias y GRs permiten evidenciar que: (i) los residuos RYRR de la región N-terminal de [A³³¹]-PfRif (321-340) no son relevantes para la actividad antibacteriana de la secuencia, ya que el péptido truncado [A³³¹]-PfRif (325-340) que no contiene estos aminoácidos, presentó actividad antibacteriana y potencial bactericida similar al de la secuencia original (Tabla 4). Sin embargo, los residuos RYR sí parecen ser determinantes para la actividad hemolítica, ya que al removerlos se obtuvo

un péptido antibacteriano y no hemolítico (Tablas 4 y 5). Curiosamente, remover estos residuos de forma paralela con residuos de la región C-terminal no reduce el efecto hemolítico de la misma manera, pero sí da lugar a la pérdida de actividad antibacteriana indicando que los aminoácidos de la región C-terminal: (i) son cruciales para la actividad antibacteriana y (ii) le confieren selectividad a la secuencia, pero solo en ausencia de los residuos RYR. Por otro lado, al remover la Lys³²⁵ (péptido [A³³¹]-Pfrif (326-340)), la actividad antibacteriana decayó (CMI > 100 µM), mostrando que este residuo podría ser crítico para la actividad. Interesantemente al remover las Lys³²⁵ y Lys³²⁶ (péptido [A³³¹]-Pfrif (326-340)), se observó actividad nuevamente (CMI = 100 µM). Estos resultados son indicio de que otras propiedades, más allá de la secuencia primaria y la longitud, podrían estar involucradas en la actividad antibacteriana de estas secuencias.

Remover la región RKKK en [A³³¹]-Pfrif (324-340) generó el péptido inactivo (CMI > 100 µM) [A³³¹]-Pfrif (328-340) de 13 residuos (Tabla 4). En adición, los péptidos más cortos (menos de 13 residuos) no presentaron actividad antibacteriana independientemente de la región del péptido original abarcada indicando que una reducción importante en la longitud (≥ 45%) conduce a secuencias inactivas.

9.4 Evaluación del potencial terapéutico de los péptidos derivados activos

La selectividad de los péptidos contra bacterias Gram-negativas (particularmente contra *E. coli*) es interesante debido a la relevancia de esta especie en la resistencia bacteriana. Particularmente, la actividad de [A³³¹]-Pfrif (324-340) contra *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 es de suma importancia, ya que estas dos especies hacen parte del listado, publicado por la Organización Mundial de la Salud, de los patógenos que tienen prioridad respecto a la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos: las especies de bacterias se han clasificados como prioridad alta (*S. aureus*, *E. faecalis*, entre otros) y prioridad crítica (*E. coli* y *P. aeruginosa*, entre otros) (111). Adicionalmente, es más usual la aparición de candidatos contra bacterias Gram-positivas que contra bacterias Gram-negativas, lo que le confiere un interés particular a estas secuencias (22).

Con base en lo anterior, se evaluó la actividad antibacteriana de los péptidos contra otras cepas de *E. coli*. Los resultados muestran que los péptidos [A³³¹]-PfRif (324-340), [A³³¹]-PfRif (325-340) y [A³³¹]-PfRif (327-340) presentaron actividad antibacteriana contra tres de las cuatro cepas evaluadas (Tabla 6). Los péptidos no presentaron actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 11775 a las concentraciones evaluadas, lo que puede ser debido a características particulares de la cepa. La actividad antibacteriana de los péptidos [A³³¹]-PfRif (324-340) y [A³³¹]-PfRif (325-340) contra las cepas *E. coli* ML35 y *E. coli* ATCC 35218 (resistente a ampicilina) fue significativa, mostrando CMI entre 3 y 12,5 µM.

Tabla 6. Actividad de los péptidos antibacterianos derivados de [A³³¹]-PfRif (324-30) contra diferentes cepas de *E. coli*.

Péptido o Antibiótico	Actividad antibacteriana CMI (µM)/CMB (µM)				CMH	IT
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ML35 ATCC 43827	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>E. coli</i> ATCC 11775		
[A ³³¹]-PfRif(321-340)	25 / 50	25/25	6/6	>100/-	1,56	0,083
[A ³³¹]-PfRif(324-340)	25/25	3/3	6/6	>100/-	>200	>17,4
[A ³³¹]-PfRif(325-340)	25/25	6/12,5	12,5/25	>100/-	>200	>13,7
[A ³³¹]-PfRif(327-340)	100/100	25/50	25/50	>100/-	>200	>4
Ciprofloxacina*	0,008/-	0,004/-	0,008/-	0,016/-	-	-
Gentamicina*	0,5/-	0,5/-	0,5/-	0,5/-	-	-
Ampicilina*	<0,016/-	<0,016/-	>16/-	<0,016/-	-	-

Valores CMI y CMB ± 1 dilución

El IT se calculó con la CMI promedio contra las cepas de *E. coli* ATCC 25922, ML35 y ATCC 35218

Esta actividad contra la cepa resistente a ampicilina es muestra de la utilidad de estas secuencias como PAMs para combatir bacterias con mecanismos clásicos de resistencia frente a los antibióticos convencionales (21), una de las razones que hace a los PAMs moléculas de gran interés en investigación clínica (48). Además, la CMI de [A³³¹]-PfRif (324-340) y [A³³¹]-PfRif (325-340) contra ésta cepa presenta valores interesantes (6,25 y 12,5 µM respectivamente), ya que se ha propuesto que en general un requisito para que un antimicrobiano pueda ser evaluado en ensayos clínicos es tener valores CMI ≤ 16 µg/mL o ≤ 16 µM (112).

Debido a que ninguno de los péptidos activos mostró actividad hemolítica a las concentraciones evaluadas el valor IT incrementó considerablemente, pasando de 0,083 a valores por encima de 4. Estos resultados indican que los péptidos [A³³¹]-PfRif (324-340) y [A³³¹]-PfRif (325-340) son candidatos terapéuticos mejorados de [A³³¹]-PfRif (321-340). Sin embargo, los resultados obtenidos en el proceso de síntesis, la pureza y los ensayos de actividad antibacteriana y hemolítica sugieren superioridad del péptido [A³³¹]-PfRif (324-340) como candidato para el desarrollo de agentes terapéuticos contra infecciones causadas por *E. coli* (Tablas 2, 4 y 6).

Ahora bien, la posibilidad de administrar los PAMs en combinación con antibióticos convencionales es un aspecto que ha venido cobrando relevancia (41, 113), Por ésta razón, se evaluó *in vitro* el efecto sinérgico de los péptidos con antibioticos mediante el método de tablero de ajedrez (114, 115).

Tabla 7. Sinergia de los péptidos antibacterianos derivados de [A³³¹]-PfRif (324-30) con antibióticos contra *E. coli* 25922.

Péptido / Antibiótico	CMI individual	CMI en combinación	CIF	Índice CIF	Interpretación
[A ³³¹]-PfRif(324-340)/ C	25 / 0,008	25 / 0,016	1 / 2	3	Indiferencia
[A ³³¹]-PfRif(325-340)/ C	25 / 0,008	25 / 0,016	1 / 2	3	Indiferencia
[A ³³¹]-PfRif(327-340)/ C	100 / 0,008	100 / 0,016	1 / 2	3	Indiferencia
[A ³³¹]-PfRif(324-340)/ G	25 / 0,5	6 / 0,13	0,25 / 0,25	0,5	Sinergismo
[A ³³¹]-PfRif(325-340)/ G	25 / 0,5	6 / 0,25	0,25 / 0,50	0,75	Indiferencia
[A ³³¹]-PfRif(327-340)/ G	100 / 0,5	25 / 0,25	0,25 / 0,50	0,75	Indiferencia

C: Coprofloxacina, **G:** Gentamicina

Los resultados muestran que ninguno de los péptidos presentó interacción con Ciprofloxacina, es decir que la actividad de los péptidos no se ve favorecida o reducida en combinación con este antibiótico y viceversa. Los péptidos [A³³¹]-PfRif (325-340) y [A³³¹]-PfRif (327-340) presentaron indiferencia en combinación con Gentamicina contra *E. coli* 25922. Sin embargo, su CMI se reduce cuatro veces en combinación con este antibiótico y la del antibiotico se reduce dos (de 0,5 a 0,25 µg/mL), lo que podria

interpretarse de forma cautelosa como un efecto aditivo, es decir la sumatoria de las actividades individuales (100). La secuencia [A³³¹]-P/Rif (324-340) mostró sinergismo con Gentamicina (CIF = 0,5) (100, 101), su valor de CMI en combinación con éste antibiótico se redujo en cuatro veces (de 25 a 6,25 µM), al igual que el de la Gentamicina en combinación con el péptido (de 0,5 a 0,125 µg/mL). Éste sinergismo evidencia la posibilidad de una administración combinada para potenciar la actividad antibacteriana y reducir la posibilidad de resistencia frente a ellos.

La actividad de los tres derivados activos contra *E. coli* ATCC 25922 se matuvo en presencia de 50% de suero humano fresco (Tabla 8). Este resultado es de gran importancia teniendo en cuenta que la inestabilidad de los péptidos bajo condiciones fisiológicas es una de las principales limitaciones para su uso terapéutico (116), y que algunos PAMs, pueden perder potencial antimicrobiano bajo estas condiciones (23, 41, 117).

Tabla 8. Actividad antibacteriana contra *E. coli* 25922 en presencia de suero humano

	CMI en MHB	CMI en presencia de suero humano
Ciprofloxacina*	0,008	0,008
Gentamicina*	0,5	0,5
Ampicilina*	< 0,016	< 0,016
[A ³³¹]-P/Rif (324-340)	25	12,5
[A ³³¹]-P/Rif (325-340)	25	25
[A ³³¹]-P/Rif (327-327)	100	100

CMI: antibióticos en µg/mL y péptido en µM

9.5 Aproximación al mecanismo de acción

Ensayos preliminares fueron realizados para abordar el mecanismo de acción de los derivados de [A³³¹]-P/Rif (321-340). A pesar de que se han reportado diversos mecanismos de acción para los PAMs (8, 43), el principal mecanismo consiste en la disrupción de la bicapa lipídica (17, 46, 118, 119).

Inicialmente, se evaluó bajo microscopía de luz blanca (objetivo 100X) si las bacterias sufrían algún cambio morfológico visible, como control de cambio debido a la acción sobre el ADN se usó Ciprofloxacina, antibiótico reconocido por generar filamentación (alargamiento de los cuerpos bacterianos) (120). Aunque se sugirió que el mecanismo de $[A^{331}]$ -PfRif (321-340) podría estar asociado a la acción sobre dos blancos (ADN y membrana bacteriana), las bacterias tratadas con los péptidos derivados más que filamentación muestran un cambio morfológico indicativo de deterioro celular (Figura 4), concordante con la mayor evidencia de este efecto en el péptido original $[A^{331}]$ -PfRif (321-340) (19).

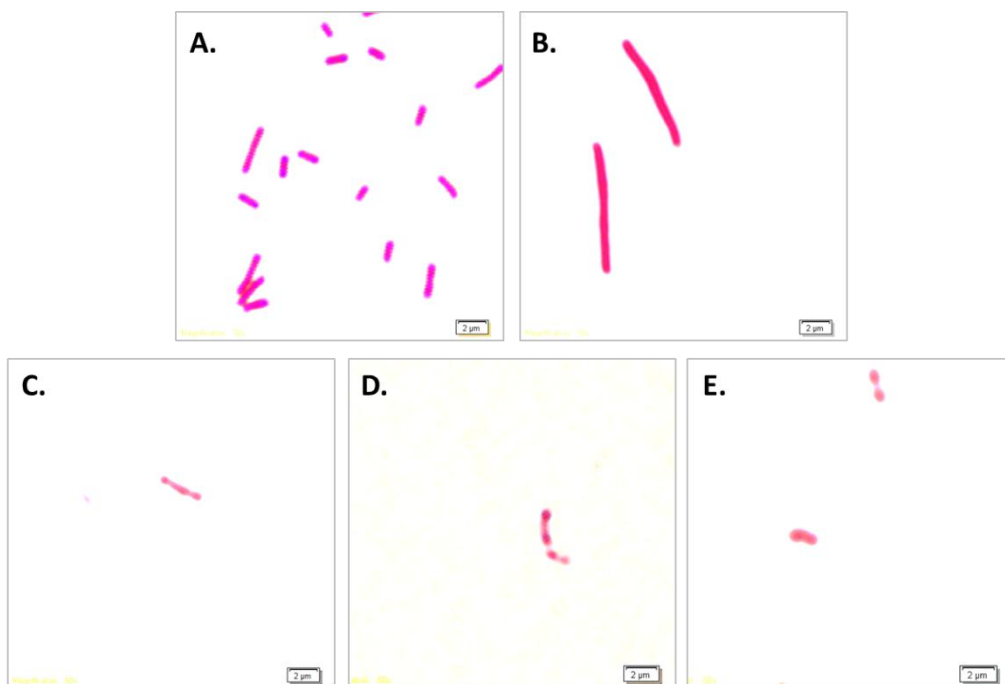


Figura 4. Microscopía bajo luz blanca de bacterias *E. coli* ATCC 25922. A. Sin tratamiento, y tratadas por tres horas con **B.** Ciprofloxacina, **C.** $[A^{331}]$ -PfRif (324-340), **D.** $[A^{331}]$ -PfRif (325-340) y $[A^{331}]$ -PfRif (327-340) a 2xCMI.

Para corroborar el efecto de los péptidos sobre la membrana de bacterias Gram-negativas se usó la cepa *E. coli* ML35, que produce la enzima β -galactosidasa constitutivamente. La permeabilización de la membrana fue estudiada mediante la hidrólisis del sustrato ONPG, la cual produce *o*-nitrofenol (color amarillo) (102). El tratamiento con los péptidos generó coloración con diferencia estadísticamente

significativa después de los primeros 30 minutos, y para los otros derivados, después de la primera hora de incubación, indicando liberación de la β -galactosidasa citoplasmática y por ende el efecto de los péptidos sobre la membrana interna de *E. coli* ML35.

El péptido [A³³¹]-PfRif (324-340) presentó el efecto membranolítico más rápido de los derivados, lo que nuevamente le confiere una ventaja como candidato terapéutico. Curiosamente, el comportamiento de la cinética de [A³³¹]-PfRif (324-340) es un poco diferente a la de la secuencia original, con un incremento de permeabilización más lento en función del tiempo pero con señales más altas luego de las 4,5 h y un máximo de permeabilización a las 6,5 h de tratamiento. Cinéticas de permeabilización más rápidas han sido reportadas (102) pero, considerando la barrera que suponen la membrana externa y la pared de la bacteria en *E. coli* (89), sería interesante evaluar esto más a profundidad en estudios futuros.

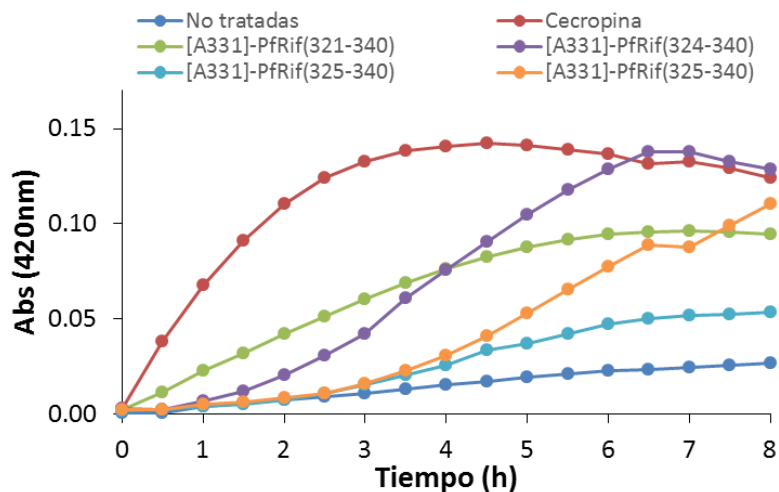


Figura 5. Permeabilización de la membrana de *E. coli* ML35. Los péptidos fueron evaluados 1xCMi contra *E. coli* ML35. Cecropina fue usada como control positivo de permeabilización.

Los resultados obtenidos indican que el péptido [A³³¹]-PfRif (324-340) es candidato promisorio para su uso como agente antibacteriano, este péptido de 17 residuos presentó mayor pureza cromatográfica, actividad antibacteriana contra la mayoría de las cepas evaluadas, fue más potente contra *E. coli* y *P. aeruginosa*. Además, esta secuencia tiene

el mayor IT, efecto sinérgico con Gentamicina y su actividad se mantiene en presencia de suero humano.

Se evaluó la actividad citotóxica de los péptidos antibacterianos contra dos líneas celulares humanas (HepG2 y HT29). La cantidad de células de cada línea fue seleccionada a través de un análisis preliminar (dilución 1:2 desde 1×10^6 células/pozo hasta 3900 células/pozo). En este análisis se tuvo en cuenta que las células no se hubieran despegado y que cuando se retirara el sobrenadante no se estuvieran removiendo los cristales de Formazán. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las células tratadas con la secuencia $[A^{331}]$ -PfRif (324-340) o $[A^{331}]$ -PfRif (325-340) a concentraciones de 1xCMI y 2xCMI (teniendo como referencia la actividad contra *E. coli* ATCC 25922). Sin embargo, la secuencia $[A^{331}]$ -PfRif (327-340) si mostró efecto citotóxico dependiente de la concentración contra la línea celular HT29.

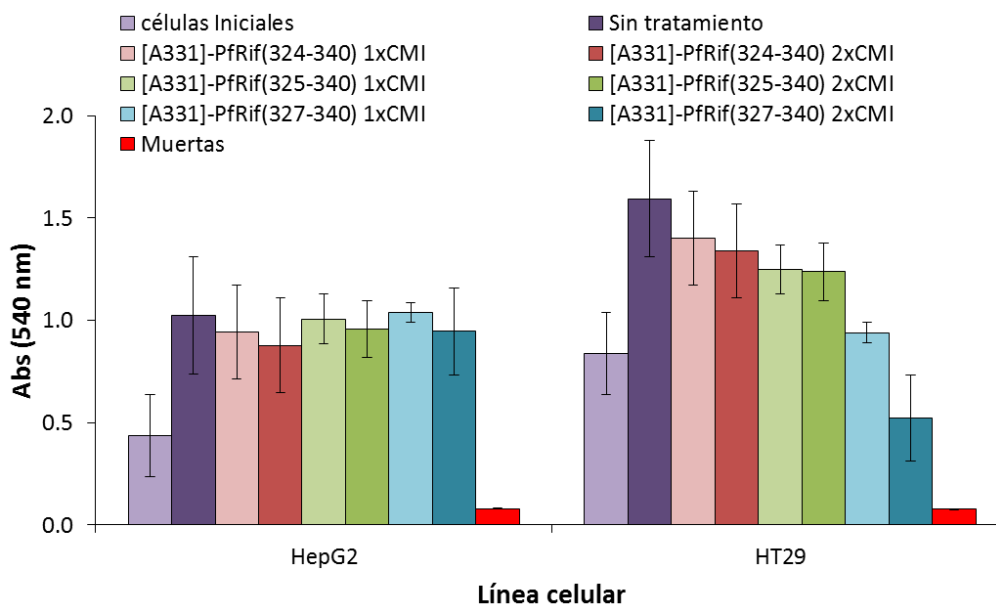


Figura 6. Actividad citotóxica de los derivados de $[A^{331}]$ -PfRif (321-340). Células HepG2 y HT29 tratadas con los péptidos derivados a 1xCMI y 2xCMI. Se muestra el promedio de dos ensayos independientes realizados por triplicado.

La ausencia de efecto citotóxico de los péptidos $[A^{331}]$ -PfRif (324-340) y $[A^{331}]$ -PfRif (325-340) contra las líneas celulares HepG2 y HT29 podría indicar ausencia de actividad contra células de mamíferos a las concentraciones cercanas a la CMI para $[A^{331}]$ -PfRif

(324-340) o [A^{331}]-PfRif (325-340). Esto podría ser indicio de alta selectividad contra células procariontas, donde líneas celulares como estas se usan como modelo eucariota (121). Sin embargo, HepG2 y HT29 provienen de tejidos cancerígenos (HepG2 de carcinoma hepático y HT29 de cáncer de colon), y la composición fosfolipídica de este tipo de células le confiere carga negativa a la cara externa de la membrana lipídica (122), por lo que la actividad del péptido [A^{331}]-PfRif (327-340) contra ellas podría ser indicio de actividad anticancerígena por parte de estas secuencias. Actividad que se ha reportado para varios PAMs (47, 123-126). Esto abre las puertas a la investigación de otra posible aplicación terapéutica para estas secuencias y deberá ser investigado más a fondo.

9.6 Propiedades fisicoquímicas de las secuencias peptídicas

Con el fin de estudiar la relación entre algunas características fisicoquímicas de los péptidos y su actividad biológica, se empleó espectroscopia de DC y análisis bioinformático predictivo con el programa APD3 y (Tabla 9 y Figuras 7 y 8). De acuerdo con este análisis, la carga de los péptidos disminuyó respecto a la del péptido original, [A^{331}]-PfRif (321-340), variando entre +2 y +8, mientras que el porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos estuvo entre 0 y 46%, y la hidrofobicidad medida como hidropatía GRAVY entre -3,79 y 0,331 (Tabla 9).

Como se observa en la Tabla 9, al disminuir la longitud de los péptidos truncados en la región N-terminal: (i) se reduce la carga y (ii) aumenta la hidrofobicidad (%AH y GRAVY). Para los demás péptidos no hay un patrón definido en estas características.

Se ha reportado que en general una menor carga en los PAMs reduce su actividad antibacteriana (37), para los péptidos [A^{331}]-PfRif (324-340) (+8) y [A^{331}]-PfRif (325-340) (+7) este comportamiento no se observó. En el caso del péptido [A^{331}]-PfRif (327-340) se evidenció una reducción de actividad antibacteriana que podría estar relacionada con la reducción de carga de +10 hasta +5. A pesar de disminuir, la carga de las secuencias activas se mantuvo dentro del rango descrito para la mayoría de PAMs (+2 a +9), lo que permite que sean atraídos electrostáticamente por las superficies microbianas (cargadas negativamente) (37, 67).

Tabla 9. Predicción de las características fisicoquímicas de los péptidos derivados de [A³³¹]-PfRif (321-340).

Péptido	Secuencia	L	Carga neta	% AH	Hidropatía a GRAVY	EH
[A ³³¹]-PfRif(321-340)	YRRKKMKKALQYIKLLKE	20	+10	30	-1,54	Sí
[A ³³¹]-PfRif(324-340)	RKKMKKALQYIKLLKE	17	+8	35	-1,20	Sí
[A ³³¹]-PfRif(325-340)	KKMKKALQYIKLLKE	16	+7	37	-1,00	Sí
[A ³³¹]-PfRif(326-340)	KKMKKALQYIKLLKE	15	+6	40	-0,81	Sí
[A ³³¹]-PfRif(327-340)	KMKKALQYIKLLKE	14	+5	42	-0,59	Sí
[A ³³¹]-PfRif(328-340)	MKKALQYIKLLKE	13	+4	46	0,33	Sí
PfRif(321-327)	RYRRKKK	7	+8	0	-3,79	No
[A ³³¹]-PfRif(327-334)	KMKKALQY	8	+4	37	-1,12	Sí
PfRif(334-340)	YIKLLKE	7	+3	42	-0,07	No
[A ³³¹]-PfRif(326-337)	KKMKKALQYIKL	12	+6	41	-0,71	Sí
[A ³³¹]-PfRif(324-334)	RKKMKKALQY	11	+7	27	-1,94	Sí

L: Longitud, **%AH:** Porcentaje de aminoácidos hidrófobos, **EH:** Posible estructural α -hélice

A partir de la información recolectada con las secuencias truncadas en el extremo N-terminal, tanto de predicción como de actividad antibacteriana y hemolítica, se sugiere que incrementos en la hidrofobicidad acompañados de reducción de carga y longitud dan lugar a la pérdida de actividad antibacteriana y hemolítica.

Al parecer se requiere una longitud superior a 13 residuos en la secuencia para que se presente actividad antibacteriana, ya que el péptido de 13 residuos PfRif (328-340) y los derivados más cortos fueron inactivos (Tabla 4).

La conformación α -helicoidal ha sido asociada con la actividad para la mayoría de PAMs; por ejemplo, en la base de datos APD3, del 41,5% de los péptidos con estructura conocida, el 18,8% involucran estructura α -hélice, siendo así la conformación estructural más común (http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic_structure.php). Además, se requiere una longitud mínima para que un péptido pueda presentar estructura helicoidal; por ejemplo, en Heliquest se requieren al menos 8 residuos para la proyección de la hélice (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>) y APD3 predijo

conformación α -helicoidal solo para los péptidos que cuentan con esta longitud, es decir para ocho de las 10 secuencias derivadas. Por otra parte, mediante DC se encontraron elementos de estructura secundaria α -hélice para seis de esas ocho secuencias con estructura α -helicoidal predicha.

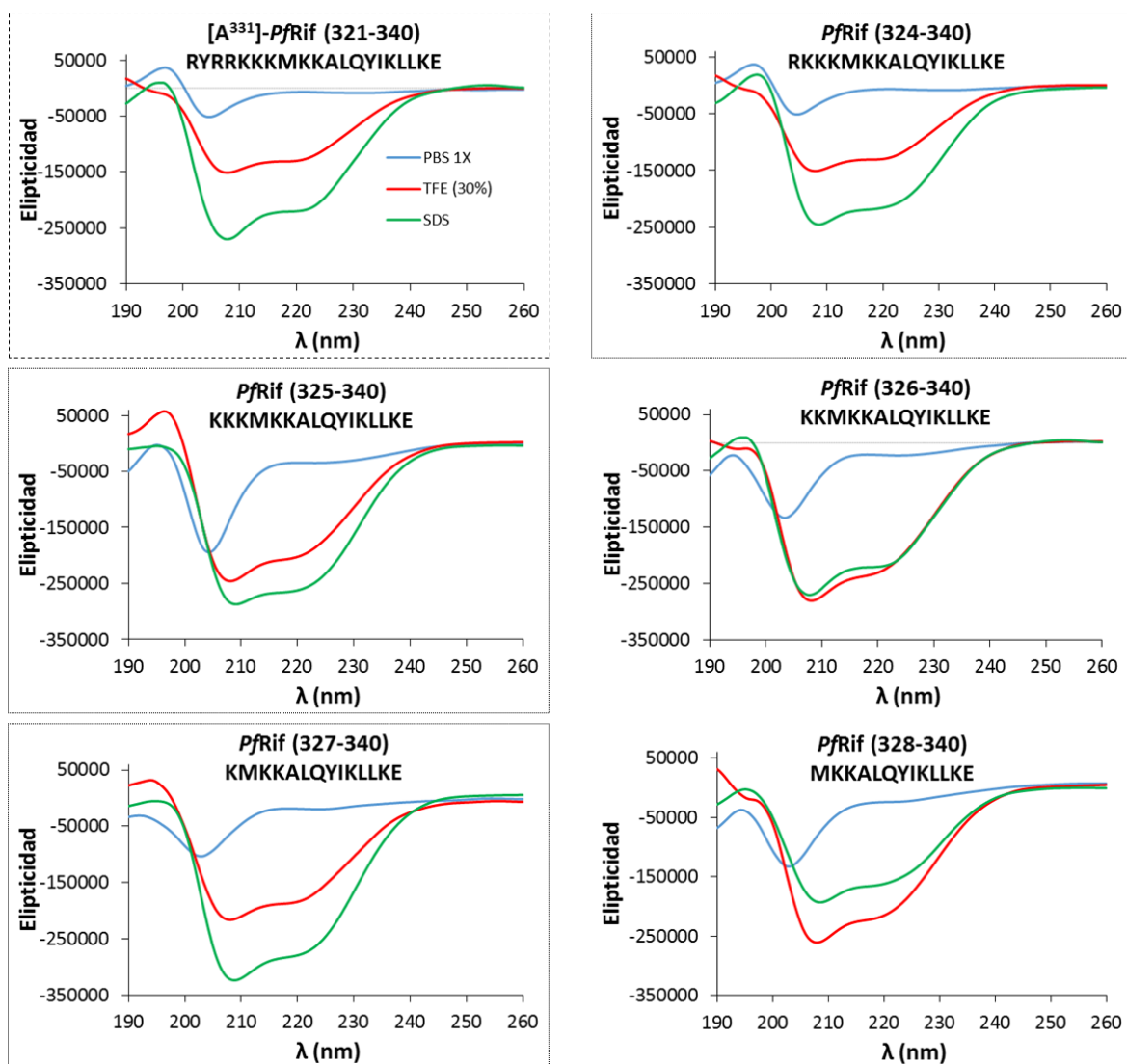


Figura 7. Espectros de dicroísmo circular del péptido original [A³³¹]-PfRif (321-340) y de sus derivados truncados en el extremo N-terminal. Con línea punteada se muestra resaltado el espectro de la secuencia original. Con línea continua los de los péptidos derivados con actividad antibacteriana. Se estudiaron los posibles elementos de estructura secundaria en: (i) PBS 1X (línea azul). (ii) TFE (30%) (línea roja) y (iii) SDS 10mM (línea verde).

La presencia de elementos de estructura secundaria se estudió mediante DC en tres solventes distintos, en PBS 1X (simulando las condiciones fisiológicas), en presencia de TFE (como ambiente hidrofóbico y estabilizador estructural) y en presencia de 10 mM de SDS (mimetizando el entorno cargado negativamente de las superficies bacterianas), ya que se han observado diferencias espectrales en estos medios que podrían estar asociados con la actividad de PAMs (33, 41, 127).

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen de la región del ultravioleta lejano (180-250nm), dado que las señales en esta región son muy sensibles a los cambios conformacionales (128). En los espectros en esta región, todas las secuencias revelaron una conformación desordenada en PBS, esto no es de sorprender ya que es el patrón usual de los PAMs en solución (33, 41, 129).

La tendencia α -helicoidal del péptido [A^{331}]-P/Rif (321-340) fue apreciable en presencia de TFE y SDS (Figuras 7 y 8). Sin embargo, el espectro parece ser una sumatoria de esta tendencia con una tendencia estructural desordenada (random coil) que reduce la banda positiva característica de α -hélice alrededor de 191 nm y genera mayor intensidad negativa de elipticidad en una de las dos bandas negativas características de la conformación estructural α -hélice respecto a la otra (130).

En los péptidos truncados progresivamente en la región N-terminal se mantiene la tendencia α -hélice en presencia de TFE y SDS, evidenciada por las señales negativas en ~208 nm y ~222 nm, características de esta tendencia estructural (130), incluso con mayor simetría que en la secuencia original. El péptido [A^{331}]-P/Rif (328-340) de 13 residuos muestra menor tendencia α -helicoidal en SDS que en TFE, ésta reducción conformacional en el ambiente cargado negativamente podría explicar la pérdida de actividad en esta secuencia y podría relacionarse con la disminución de la carga hasta +4, indicando menor capacidad de interacción con membranas cargadas negativamente, hipótesis consecuente con previos reportes (37, 55, 118).

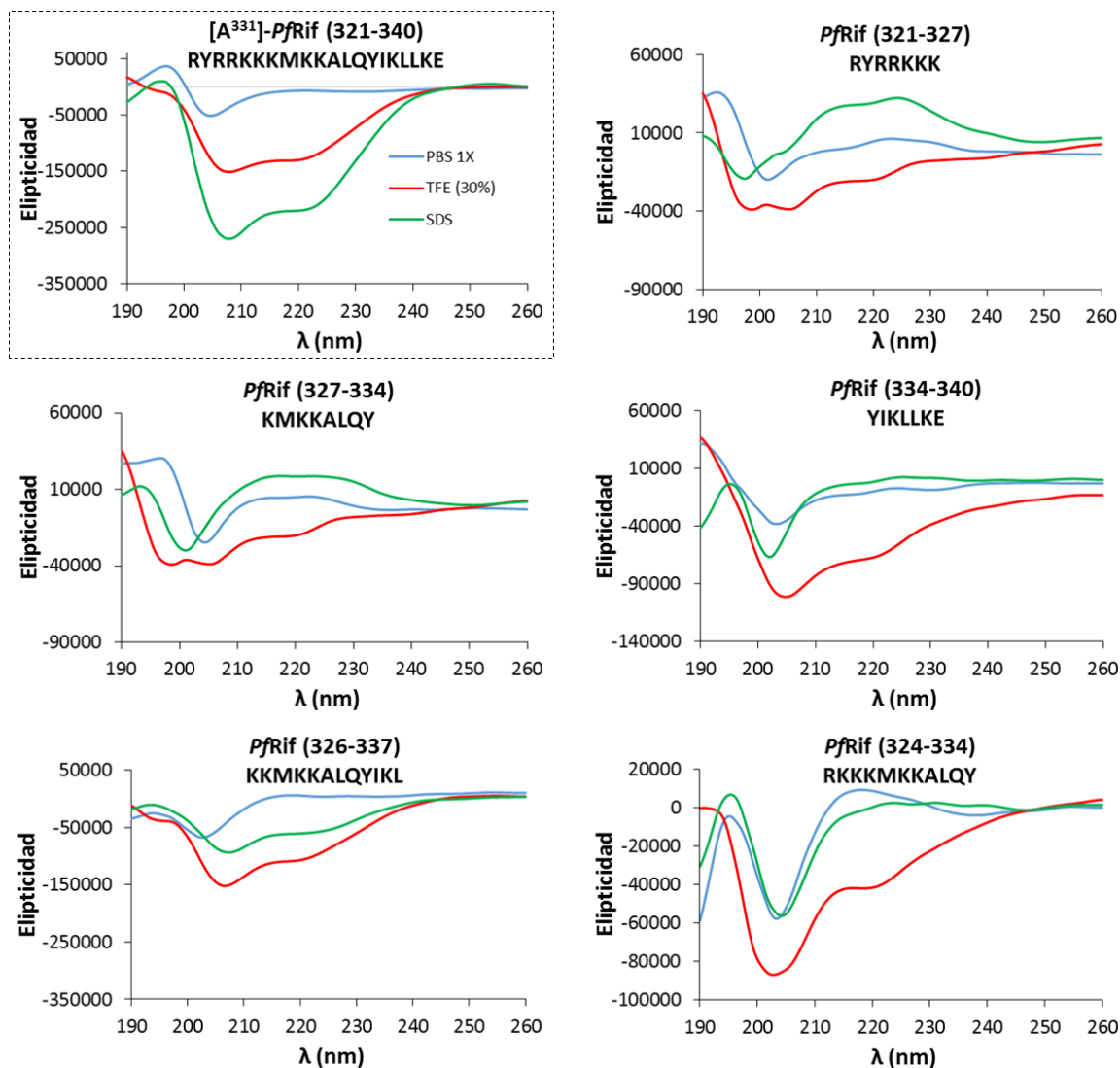


Figura 8. Espectros de dicroísmo circular del péptido [A³³¹]-PfRif (324-340) y sus derivados sintetizados con longitud menor a 13 aminoácidos. Con línea punteada se muestra resaltado el espectro de la secuencia original. Se estudiaron los posibles elementos de estructura secundaria en: (i) PBS 1X (línea azul). (ii) TFE (30%) (línea roja) y (iii) SDS 10mM (línea verde).

La secuencia [A³³¹]-PfRif (326-340) a pesar de mostrar una conformación α -hélice muy marcada en TFE y tener una carga superior a la de [A³³¹]-PfRif (327-340), tuvo una CMI por encima de 100 μ M.

Por otro lado, los péptidos más cortos (Figura 8) mostraron una tendencia estructural distorsionada en los tres solventes, solo algunos de ellos conservan algo de tendencia α -hélice en TFE, mientras que en PBS y SDS se aprecia el comportamiento espectral característico de la estructura desordena (principalmente una banda negativa entre 195 y 210 nm) (130). Esto respalda la importancia de la conformación α -hélice para la actividad antibacteriana y que la longitud es relevante para esto, al igual que la presencia de los residuos ³³⁵IKLLKE³⁴⁰ de la región C-terminal.

Así, las secuencias que mostraron elementos de conformación α -hélice en presencia de TFE y SDS fueron: [A³³¹]-PfRif (324-340) (activa CMI 25 μ M), [A³³¹]-PfRif (328-340) (inactiva), [A³³¹]-PfRif (325-340) (activa CMI 25 μ M), [A³³¹]-PfRif (326-340) (activa pero con CMI >100 μ M), [A³³¹]-PfRif (327-340) (activa con CMI 100 μ M), [A³³¹]-PfRif (326-337) (inactiva).

La reducción de actividad hemolítica con la reducción de la longitud de la secuencia (observada en éste estudio) se ha reportado antes, donde derivados cortos de PAMs han mostrado una reducción muy importante en su actividad toxica contra GRs respecto al péptido original, en ocasiones con aumento o disminución de su actividad antibacteriana (131, 132). Parece ser entonces, que la secuencia primaria de estos péptidos y su tendencia conformacional son los principales factores implicados en la actividad y selectividad de las secuencias, esta relación estructura-función es muy común en los estudios con PAMs (16, 55, 106, 127, 133).

A partir de los resultados de DC y actividad antibacteriana y hemolítica, se quiso evaluar si la anfipaticidad también podría tener alguna influencia en la actividad de las secuencias. Para esto se calculó el momento hidrofóbico (μH) y se representó la proyección helicoidal de las secuencias (Figura 9).

Los péptidos que presentaron actividad contra *E. coli* ATCC 25922 presentaron incremento en la hidrofobicidad y mayor anfipaticidad respecto al péptido original (Tabla 9 y Figura 9).

Los resultados sugieren que la presencia de las Lys³²⁷ y Lys³³⁹ en el extremo N-terminal pueden ser cruciales para la actividad y selectividad de las secuencias al generar disrupción en la cara hidrofóbica de la hélice anfipática (representada en amarillo en la Figura 9), pues estos dos residuos están presentes simultáneamente en todos los péptidos con actividad antibacteriana y, en general, ausentes en los inactivos, lo que concuerda con reportes previos, donde péptidos que tienen anfipaticidad imperfecta han presentado mayor actividad antibacteriana selectiva que los péptidos que tienen anfipaticidad perfecta (49, 56, 134). Esta disrupción causada por aminoácidos cargados positivamente en la cara hidrofóbica de las α -hélices anfipáticas puede favorecer la inserción de esta región en bicapas lipídicas cargadas negativamente para la posterior interacción de los aminoácidos no polares con las cadenas hidrófobas de estos fosfolípidos (56, 134, 135).

10. Conclusiones

Se obtuvieron tres péptidos cortos con actividad antibacteriana contra la cepa *E. coli* ATCC 25922 que no fueron hemolíticos: [A³³¹]-P α Rif (324-340), [A³³¹]-P α Rif (325-340) y [A³³¹]-P α Rif (327-340), lo que indica un incremento en su índice terapéutico respecto al péptido original. Los cuatro residuos de la región N-terminal de la secuencia [A³³¹]-P α Rif (321-340), es decir RYRK, no son relevantes para la actividad antibacteriana de la secuencia, pero los residuos RYR sí son relevantes para su actividad hemolítica ya que al removerlos se pierde dicha actividad.

El péptido [A³³¹]-P α Rif (324-340): RKKMKKALQYIKLLKE, de 17 aminoácidos con actividad antibacteriana contra *E. coli* y *P. aeruginosa* es el mejor candidato de este estudio, pues fue el producto sintético activo de mayor pureza cromatográfica, la ausencia de actividad hemolítica y su potencial antibacteriano le confieren a esta secuencia el mayor IT, mejorado en más de 200 veces respecto a la molécula original ([A³³¹]-P α Rif (321-340)), y que es soportado por la ausencia de actividad citotóxica contra las líneas celulares humanas. Características adicionales como su actividad contra una cepa resistente a Ampicilina, su selectivo efecto membranólítico, su sinergismo con Gentamicina y la estabilidad de su actividad en presencia de suero humano indican que este es un candidato potencial para ser usado en terapia clínica.

Adicionalmente, las características fisicoquímicas que parecen gobiernan la actividad biológica de esta secuencia son su conformación α -helicoidal, y en menor medida, su carga e hidrofobicidad. Además, la presencia de dos lisinas en la cara no polar la hélice α anfipática parece ser crucial para la actividad de la secuencia.

Bibliografía

1. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*. 2015;40(4):277-83.
2. Escobar-Perez J, Reyes N, Marquez-Ortiz RA, Rebollo J, Pinzon H, Tovar C, et al. Emergence and spread of a new community-genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Colombia. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):108.
3. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2016;193(3):259-72.
4. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. *Review on antimicrobial resistance*. 2016:84.
5. WHO WHO. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015.
6. Haney EF, Mansour SC, Hancock RE. Antimicrobial Peptides: An Introduction. *Methods Mol Biol*. 2017;1548:3-22.
7. Lai Y, Villaruz AE, Li M, Cha DJ, Sturdevant DE, Otto M. The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Molecular microbiology*. 2007;63(2):497-506.
8. Le CF, Fang CM, Sekaran SD. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(4).
9. Yan J, Wang K, Dang W, Chen R, Xie J, Zhang B, et al. Two hits are better than one: membrane-active and DNA binding-related double-action mechanism of NK-18, a novel antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(1):220-8.
10. Edwards IA, Elliott AG, Kavanagh AM, Zuegg J, Blaskovich MA, Cooper MA. Contribution of Amphipathicity and Hydrophobicity to the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of beta-Hairpin Peptides. *ACS infectious diseases*. 2016;2(6):442-50.
11. Fox JL. Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nature biotechnology*. 2013;31(5):379-82.
12. Kleshchenko YE, Zhigunova AV, Dalin MV, Melnikov V. Peptides Selected Using Phage Library Variants, Effectively Inhibit *Trypanosoma cruzi* Infection. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;163(3):361-4.
13. Maccari G, Di Luca M, Nifosi R. In silico design of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol*. 2015;1268:195-219.
14. Omardien S, Drijfhout JW, van Veen H, Schachtschabel S, Riool M, Hamoen LW, et al. Synthetic antimicrobial peptides delocalize membrane bound proteins thereby inducing a cell envelope stress response. *Biochimica et biophysica acta*. 2018.
15. Wang XJ, Wang XM, Teng D, Zhang Y, Mao RY, Wang JH. Recombinant production of the antimicrobial peptide NZ17074 in *Pichia pastoris* using SUMO3 as a fusion partner. *Letters in applied microbiology*. 2014;59(1):71-8.

16. Chen Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock RE, Vasil ML, Hodges RS. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(13):12316-29.
17. Malanovic N, Leber R, Schmuck M, Kriechbaum M, Cordfunke RA, Drijfhout JW, et al. Phospholipid-driven differences determine the action of the synthetic antimicrobial peptide OP-145 on Gram-positive bacterial and mammalian membrane model systems. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1848(10 Pt A):2437-47.
18. Suárez D. Evaluación y Determinación de la CMI del péptido 35409 sobre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana; 2012.
19. Barreto-Santamaria A, Curtidor H, Arevalo-Pinzon G, Herrera C, Suarez D, Perez WH, et al. A New Synthetic Peptide Having Two Target of Antibacterial Action in *E. coli* ML35. *Front Microbiol*. 2016;7:2006.
20. Ageitos JM, Sanchez-Perez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical pharmacology*. 2017;133:117-38.
21. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*. 2017;33(3):300-5.
22. Greber KE, Dawgul M. Antimicrobial Peptides Under Clinical Trials. *Current topics in medicinal chemistry*. 2017;17(5):620-8.
23. Knappe D, Henklein P, Hoffmann R, Hilpert K. Easy strategy to protect antimicrobial peptides from fast degradation in serum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(9):4003-5.
24. Aoki W, Ueda M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(8):1055-81.
25. Maturana P, Martinez M, Noguera ME, Santos NC, Disalvo EA, Semorile L, et al. Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: Implication on antimicrobial and hemolytic activity. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2017;153:152-9.
26. Midura-Nowaczek K, Markowska A. Antimicrobial peptides and their analogs: searching for new potential therapeutics. *Perspectives in medicinal chemistry*. 2014;6:73-80.
27. Mor A, Hani K, Nicolas P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(50):31635-41.
28. Ghosh JK, Shaol D, Guillaud P, Ciceron L, Mazier D, Kustanovich I, et al. Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(50):31609-16.
29. Alfred RL, Palombo EA, Panozzo JF, Bhave M. The antimicrobial domains of wheat puroindolines are cell-penetrating peptides with possible intracellular mechanisms of action. *PloS one*. 2013;8(10):e75488.

30. Conlon JM, Galadari S, Raza H, Condamine E. Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the naturally occurring frog skin peptides, ascaphin-8 and peptide XT-7. *Chemical biology & drug design*. 2008;72(1):58-64.
31. Wang G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol*. 2015;1268:43-66.
32. Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1758(9):1184-202.
33. Jin L, Bai X, Luan N, Yao H, Zhang Z, Liu W, et al. A Designed Tryptophan- and Lysine/Arginine-Rich Antimicrobial Peptide with Therapeutic Potential for Clinical Antibiotic-Resistant *Candida albicans* Vaginitis. *Journal of medicinal chemistry*. 2016;59(5):1791-9.
34. Townsley LE, Tucker WA, Sham S, Hinton JF. Structures of gramicidins A, B, and C incorporated into sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*. 2001;40(39):11676-86.
35. Becucci L, Valensin D, Innocenti M, Guidelli R. Dermcidin, an anionic antimicrobial peptide: influence of lipid charge, pH and Zn²⁺ on its interaction with a biomimetic membrane. *Soft matter*. 2014;10(4):616-26.
36. Del Cogliano ME, Hollmann A, Martinez M, Semorile L, Ghiringhelli PD, Maffia PC, et al. Cationic Antimicrobial Peptides Inactivate Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages. *Frontiers in chemistry*. 2017;5:122.
37. Ueno S, Minaba M, Nishiuchi Y, Taichi M, Tamada Y, Yamazaki T, et al. Generation of novel cationic antimicrobial peptides from natural non-antimicrobial sequences by acid-amide substitution. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2011;10:11.
38. Zhang SK, Song JW, Gong F, Li SB, Chang HY, Xie HM, et al. Design of an alpha-helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Scientific reports*. 2016;6:27394.
39. Gagnon MC, Strandberg E, Grau-Campistany A, Wadhvani P, Reichert J, Burck J, et al. Influence of the Length and Charge on the Activity of alpha-Helical Amphipathic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*. 2017;56(11):1680-95.
40. Bea Rde L, Petraglia AF, Johnson LE. Synthesis, antimicrobial activity and toxicity of analogs of the scorpion venom BmKn peptides. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2015;101:79-84.
41. Kim EY, Rajasekaran G, Shin SY. LL-37-derived short antimicrobial peptide KR-12-a5 and its d-amino acid substituted analogs with cell selectivity, anti-biofilm activity, synergistic effect with conventional antibiotics, and anti-inflammatory activity. *European journal of medicinal chemistry*. 2017;136:428-41.
42. da Silva AV, De Souza BM, Dos Santos Cabrera MP, Dias NB, Gomes PC, Neto JR, et al. The effects of the C-terminal amidation of mastoparans on their biological actions and interactions with membrane-mimetic systems. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1838(10):2357-68.
43. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013;6(12):1543-75.

44. Xiao H, Shao F, Wu M, Ren W, Xiong X, Tan B, et al. The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine. *Journal of animal science and biotechnology* [Internet]. 2015 [cited 2015 Jul]; 6(1):[19 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26019864>.
45. Hwang H, Hyun S, Kim Y, Yu J. Reduction of helical content by insertion of a disulfide bond leads to an antimicrobial peptide with decreased hemolytic activity. *ChemMedChem*. 2013;8(1):59-62.
46. Sun S, Zhao G, Huang Y, Cai M, Yan Q, Wang H, et al. Enantiomeric Effect of d-Amino Acid Substitution on the Mechanism of Action of alpha-Helical Membrane-Active Peptides. *International journal of molecular sciences*. 2017;19(1).
47. Vermeer LS, Lan Y, Abbate V, Ruh E, Bui TT, Wilkinson LJ, et al. Conformational flexibility determines selectivity and antibacterial, antiplasmodial, and anticancer potency of cationic alpha-helical peptides. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(41):34120-33.
48. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*. 2003;55(1):27-55.
49. Son M, Lee Y, Hwang H, Hyun S, Yu J. Disruption of interactions between hydrophobic residues on nonpolar faces is a key determinant in decreasing hemolysis and increasing antimicrobial activities of alpha-helical amphipathic peptides. *ChemMedChem*. 2013;8(10):1638-42.
50. Chang TW, Wei SY, Wang SH, Wei HM, Wang YJ, Wang CF, et al. Hydrophobic residues are critical for the helix-forming, hemolytic and bactericidal activities of amphipathic antimicrobial peptide TP4. *PLoS one*. 2017;12(10):e0186442.
51. Gautier R, Douguet D, Antony B, Drin G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics*. 2008;24(18):2101-2.
52. Blazys J, Wiegand R, Klein J, Hammer J, Epanand RM, Epanand RF, et al. A novel linear amphipathic beta-sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(30):27899-906.
53. Zeitler B, Herrera Diaz A, Dangel A, Thellmann M, Meyer H, Sattler M, et al. De-novo design of antimicrobial peptides for plant protection. *PLoS one*. 2013;8(8):e71687.
54. Reisser S, Strandberg E, Steinbrecher T, Ulrich AS. 3D hydrophobic moment vectors as a tool to characterize the surface polarity of amphiphilic peptides. *Biophysical journal*. 2014;106(11):2385-94.
55. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & cell*. 2010;1(2):143-52.
56. Zhu X, Dong N, Wang Z, Ma Z, Zhang L, Ma Q, et al. Design of imperfectly amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. *Acta biomaterialia*. 2014;10(1):244-57.

57. Waghu FH, Barai RS, Gurung P, Idicula-Thomas S. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D1094-7.
58. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D1087-93.
59. Malpede BM, Tolia NH. Malaria adhesins: structure and function. *Cellular microbiology*. 2014;16(5):621-31.
60. Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJ, Richards JS. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS microbiology reviews*. 2016;40(3):343-72.
61. Rodriguez LE, Curtidor H, Urquiza M, Cifuentes G, Reyes C, Patarroyo ME. Intimate molecular interactions of *P. falciparum* merozoite proteins involved in invasion of red blood cells and their implications for vaccine design. *Chemical reviews*. 2008;108(9):3656-705.
62. Patarroyo ME, Patarroyo MA. Emerging rules for subunit-based, multiantigenic, multistage chemically synthesized vaccines. *Accounts of chemical research*. 2008;41(3):377-86.
63. Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*. 2002;419(6906):520-6.
64. Endo M, Takesako K, Kato I, Yamaguchi H. Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997;41(3):672-6.
65. Patino-Marquez IA, Manrique-Moreno M, Patino-Gonzalez E, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K. Effect of antimicrobial peptides from *Galleria mellonella* on molecular models of *Leishmania* membrane. Thermotropic and fluorescence anisotropy study. *The Journal of antibiotics*. 2018.
66. Buck CB, Day PM, Thompson CD, Lubkowski J, Lu W, Lowy DR, et al. Human alpha-defensins block papillomavirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(5):1516-21.
67. Mulder KC, Lima LA, Miranda VJ, Dias SC, Franco OL. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Front Microbiol*. 2013;4:321.
68. Hancock RE, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in biotechnology*. 1998;16(2):82-8.
69. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*. 2011;29(9):464-72.
70. Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*. 1981;292(5820):246-8.
71. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a

precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(15):5449-53.

72. Rothstein DM, Spacciapoli P, Tran LT, Xu T, Roberts FD, Dalla Serra M, et al. Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(5):1367-73.

73. Izadpanah A, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005;52(3 Pt 1):381-90; quiz 91-2.

74. Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annual review of immunology*. 1993;11:105-28.

75. Flamm RK, Rhomberg PR, Simpson KM, Farrell DJ, Sader HS, Jones RN. In vitro spectrum of pexiganan activity when tested against pathogens from diabetic foot infections and with selected resistance mechanisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(3):1751-4.

76. Fritsche TR, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride tested against contemporary bacterial pathogens commonly responsible for catheter-associated infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;61(5):1092-8.

77. Domhan C, Uhl P, Meinhardt A, Zimmermann S, Kleist C, Lindner T, et al. A novel tool against multiresistant bacterial pathogens - lipopeptide modification of the natural antimicrobial peptide ranalexin for enhanced antimicrobial activity and improved pharmacokinetics. *Int J Antimicrob Agents*. 2018.

78. Liu B, Zhang W, Gou S, Huang H, Yao J, Yang Z, et al. Intramolecular cyclization of the antimicrobial peptide Polybia-MPI with triazole stapling: influence on stability and bioactivity. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*. 2017;23(11):824-32.

79. Merrifield B. Solid phase synthesis. *Science*. 1986;232(4748):341-7.

80. Cao J, de la Fuente-Nunez C, Ou RW, Torres MT, Pande SG, Sinsky AJ, et al. Yeast-Based Synthetic Biology Platform for Antimicrobial Peptide Production. *ACS synthetic biology*. 2018;7(3):896-902.

81. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug discovery today*. 2010;15(1-2):40-56.

82. Behrendt R, White P, Offer J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*. 2016;22(1):4-27.

83. Made V, Els-Heindl S, Beck-Sickinger AG. Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. *Beilstein journal of organic chemistry*. 2014;10:1197-212.

84. Hu J, Chen C, Zhang S, Zhao X, Xu H, Zhao X, et al. Designed antimicrobial and antitumor peptides with high selectivity. *Biomacromolecules*. 2011;12(11):3839-43.

85. Berg J, Tymoczko J., Stryer, L. *Lípidos y membranas celulares*. Bioquímica. 6a ed. Barcelona: Reverté; 2008. p. 326-50.

86. Yeagle P. *The Lipid composition of biological membranes. The structure of biological membranes*. 2 ed. New York: CRC Press; 2004. p. 25-7.

87. Ouardien S, Drijfhout JW, Vaz FM, Wenzel M, Hamoen LW, Zaat SAJ, et al. Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer. *Biochimica et biophysica acta Biomembranes*. 2018;1860(11):2404-15.
88. Latorre R, López J, Bezanilla F, Llinás R Organización molecular de las membranas biológicas. *Biofísica y fisiología celular*. España: Universidad de Sevilla 1996.
89. Hobot J. *Bacterial Ultrastructure*. Molecular Medical Microbiology: Elsevier Science; 2014.
90. Muse M, Moore BA. *Handbook of Clinical Psychopharmacology for Psychologists*: Wiley; 2012.
91. Finkel R CM, Cubeddu LX. *Pharmacology: Principles and Practice*: Elsevier Science; 2009.
92. Bachmann MHWMK. *Pharmacology, Principles and Practice*. 1 ed2009.
93. Prus A. *Drugs and the Neuroscience of Behavior: Drugs and the Neuroscience of Behavior*; 2017.
94. Sun S, Zhao G, Huang Y, Cai M, Shan Y, Wang H, et al. Specificity and mechanism of action of alpha-helical membrane-active peptides interacting with model and biological membranes by single-molecule force spectroscopy. *Scientific reports*. 2016;6:29145.
95. Sitaram N, Chandy M, Pillai VN, Nagaraj R. Change of glutamic acid to lysine in a 13-residue antibacterial and hemolytic peptide results in enhanced antibacterial activity without increase in hemolytic activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992;36(11):2468-72.
96. Huertas Mendez NJ, Vargas Casanova Y, Gomez Chimbi AK, Hernandez E, Leal Castro AL, Melo Diaz JM, et al. Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules*. 2017;22(3).
97. Huertas NJ, Monroy ZJR, Medina RF, Castaneda JEG. Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKRRQWQWRMKKGLA Sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Molecules*. 2017;22(6).
98. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. 2008;3(2):163-75.
99. CLSI CaLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*. 2012.
100. Shurko JF, Galega RS, Li C, Lee GC. Evaluation of LL-37 antimicrobial peptide derivatives alone and in combination with vancomycin against *S. aureus*. *The Journal of antibiotics*. 2018;71(11):971-4.
101. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;52(1):1.
102. Qu P, Gao W, Chen H, Li D, Yang N, Zhu J, et al. The Central Hinge Link Truncation of the Antimicrobial Peptide Fowlicidin-3 Enhances Its Cell Selectivity

without Antibacterial Activity Loss. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(5):2798-806.

103. Joshi S, Bisht GS, Rawat DS, Kumar A, Kumar R, Maiti S, et al. Interaction studies of novel cell selective antimicrobial peptides with model membranes and *E. coli* ATCC 11775. *Biochimica et biophysica acta.* 2010;1798(10):1864-75.

104. Daleke DL. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Current opinion in hematology.* 2008;15(3):191-5.

105. Ebenhan T, Gheysens O, Kruger HG, Zeevaart JR, Sathekge MM. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *BioMed research international.* 2014;2014:867381.

106. Lee MY, Park SC, Jung M, Shin MK, Kang HL, Baik SC, et al. Cell-selectivity of tryptophan and tyrosine in amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides against drug-resistant bacteria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;505(2):478-84.

107. Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature reviews Drug discovery.* 2011;11(1):37-51.

108. Pommerville JC. *Alcamo's Laboratory Fundamentals of Microbiology: Jones and Bartlett;* 2007.

109. Epand RF, Savage PB, Epand RM. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). *Biochim Biophys Acta [Internet].* 2007 Oct [cited 2015 Ene 20]; 1768(10):[2500-9 pp.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599802>.

110. Zawadzka K, Bernat P, Felczak A, Rozalska S, Lisowska K. Antibacterial activity of high concentrations of carvedilol against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents.* 2018;51(3):458-67.

111. World Health Organization W. GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS. 2017.

112. Ramesh S, Govender T, Kruger HG, de la Torre BG, Albericio F. Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society.* 2016;22(7):438-51.

113. Wu X, Li Z, Li X, Tian Y, Fan Y, Yu C, et al. Synergistic effects of antimicrobial peptide DP7 combined with antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Drug design, development and therapy.* 2017;11:939-46.

114. De la Fuente-Salcido NM, Villarreal-Prieto JM, Díaz León MÁ, García Pérez AP. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas.* 2015;46:7-16.

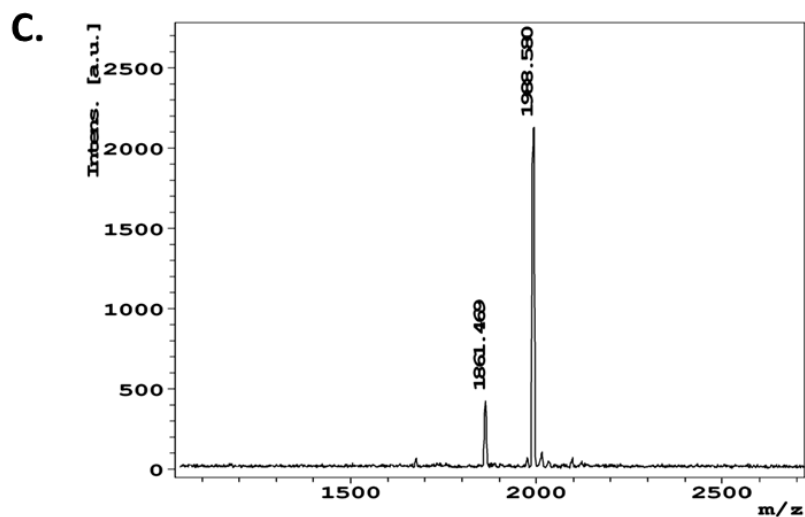
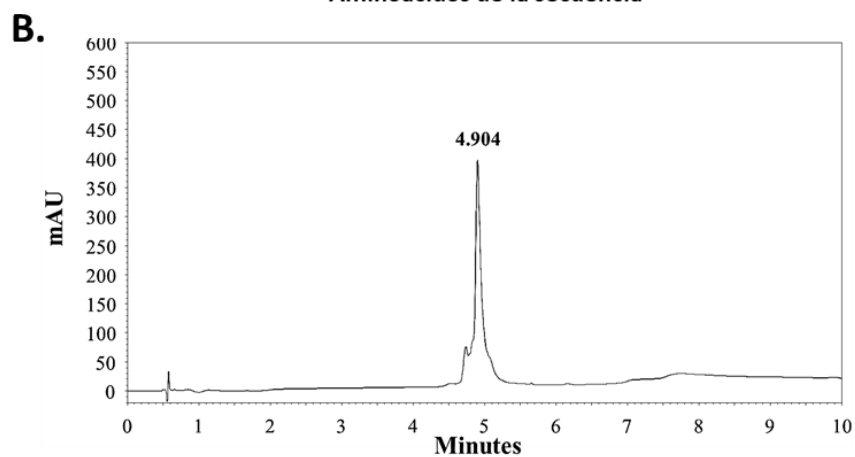
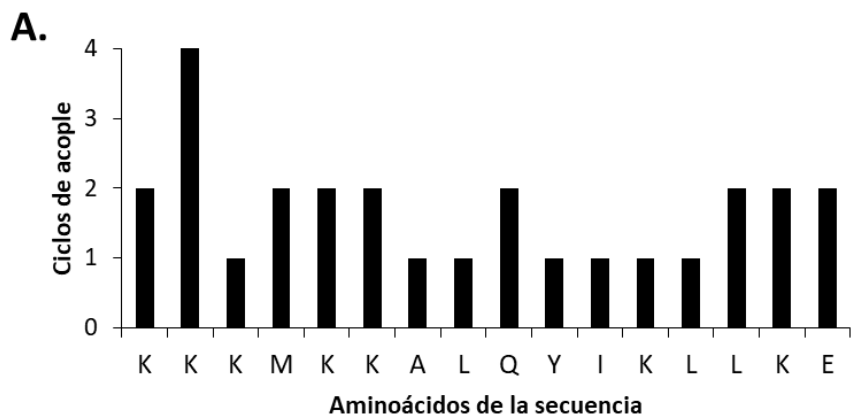
115. Umerska A, Cassisa V, Bastiat G, Matougui N, Nehme H, Manero F, et al. Synergistic interactions between antimicrobial peptides derived from plectasin and lipid nanocapsules containing monolaurin as a cosurfactant against *Staphylococcus aureus*. *International journal of nanomedicine.* 2017;12:5687-99.

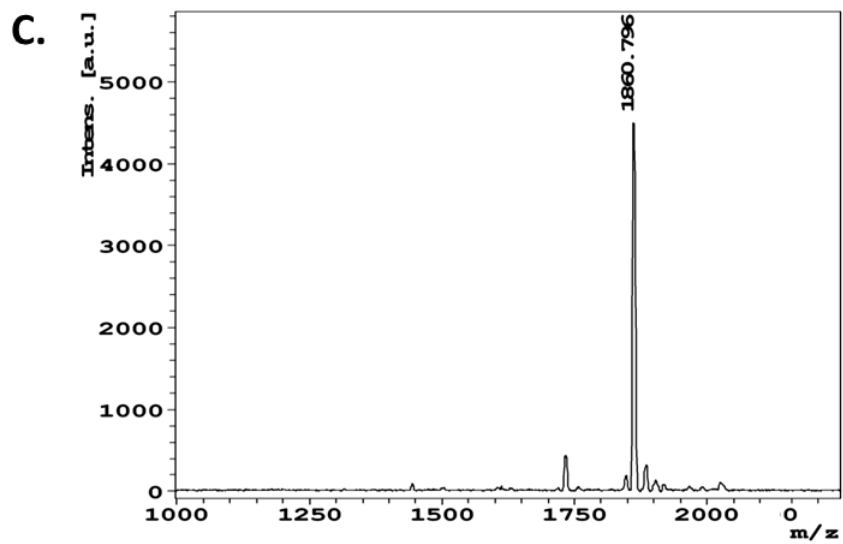
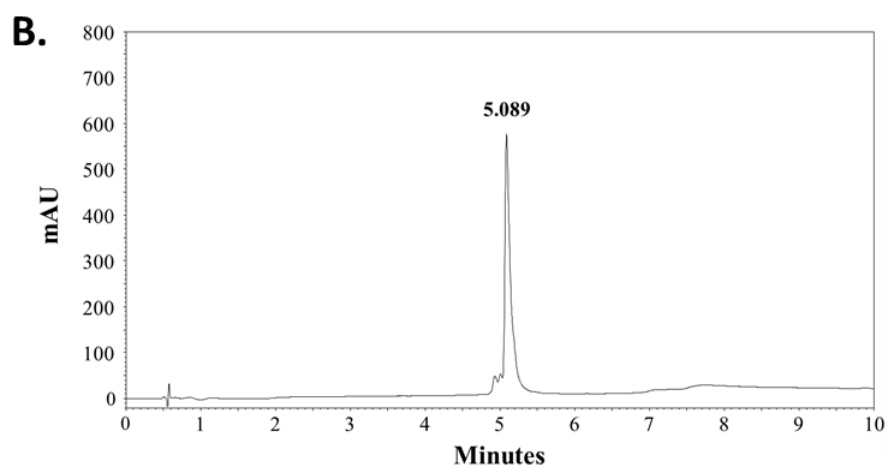
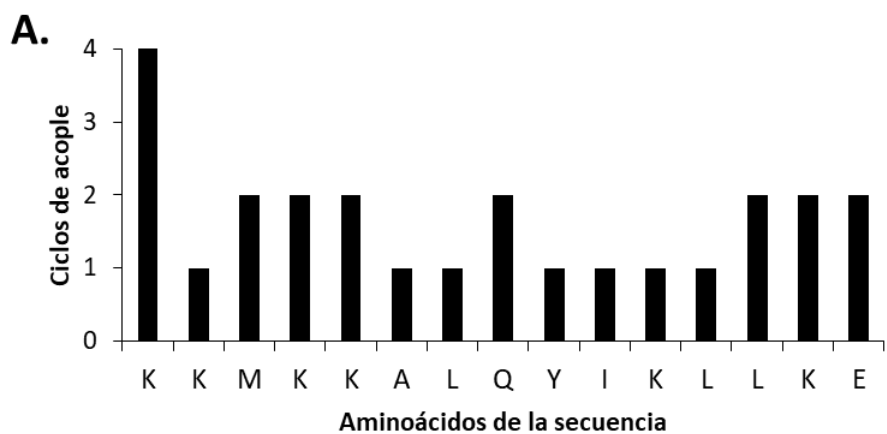
116. Bottger R, Hoffmann R, Knappe D. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLoS one*. 2017;12(6):e0178943.
117. Nguyen LT, Chau JK, Perry NA, de Boer L, Zaat SA, Vogel HJ. Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs. *PLoS one*. 2010;5(9).
118. Chou HT, Wen HW, Kuo TY, Lin CC, Chen WJ. Interaction of cationic antimicrobial peptides with phospholipid vesicles and their antibacterial activity. *Peptides*. 2010;31(10):1811-20.
119. Chai H, Allen WE, Hicks RP. Spectroscopic investigations of the binding mechanisms between antimicrobial peptides and membrane models of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2014;22(15):4210-22.
120. Wickens HJ, Pinney RJ, Mason DJ, Gant VA. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency, and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(3):682-7.
121. Paiva AD, de Oliveira MD, de Paula SO, Baracat-Pereira MC, Breukink E, Mantovani HC. Toxicity of bovicin HC5 against mammalian cell lines and the role of cholesterol in bacteriocin activity. *Microbiology*. 2012;158(Pt 11):2851-8.
122. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus*. 1996;5(5):480-7.
123. Hu J, Chen C, Zhang S, Zhao X, Xu H, Lu JR. Designed antimicrobial and antitumor peptides with high selectivity. *Biomacromolecules*. 2011;12(11):3839-43.
124. Baxter AA, Lay FT, Poon IKH, Kvansakul M, Hulett MD. Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2017;74(20):3809-25.
125. Felicio MR, Silva ON, Goncalves S, Santos NC, Franco OL. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in chemistry*. 2017;5:5.
126. Vargas Casanova Y, Rodriguez Guerra JA, Umana Perez YA, Leal Castro AL, Almanzar Reina G, Garcia Castaneda JE, et al. Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*. 2017;22(10).
127. Wang G. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(47):32637-43.
128. Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem*. 2000;287(2):252-60.
129. Kim JS, Jeong JH, Kim Y. Design, characterization, and antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide derived from bovine lactophorin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017;27(4):759-67.

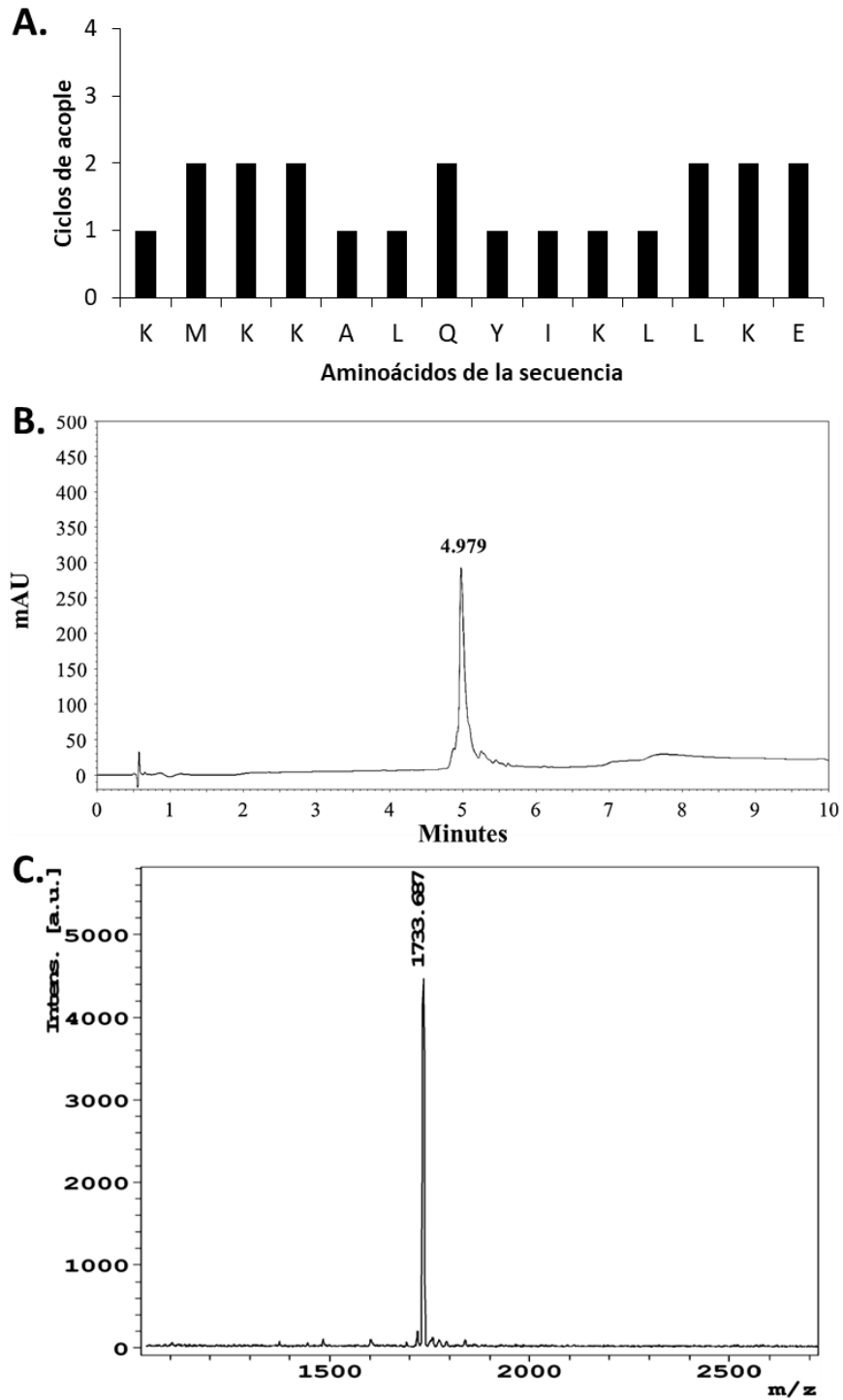
-
130. Juban M.M. JMM, Barkley M.D. Circular Dichroism Studies of Secondary Structure of Peptides In: W.M. S, editor. Antibacterial Peptide Protocols Methods In Molecular Biology™. 78: Humana Press; 1997.
131. Park Y, Park SC, Park HK, Shin SY, Kim Y, Hahm KS. Structure-activity relationship of HP (2-20) analog peptide: enhanced antimicrobial activity by N-terminal random coil region deletion. *Biopolymers*. 2007;88(2):199-207.
132. Subbalakshmi C, Nagaraj R, Sitaram N. Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. *FEBS Lett*. 1999;448(1):62-6.
133. Zelezetsky I, Tossi A. Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1758(9):1436-49.
134. Jiang Z, Vasil AI, Gera L, Vasil ML, Hodges RS. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides to target Gram-negative pathogens, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: utilization of charge, 'specificity determinants,' total hydrophobicity, hydrophobe type and location as design parameters to improve the therapeutic ratio. *Chemical biology & drug design*. 2011;77(4):225-40.
135. Jiang Z, Mant CT, Vasil M, Hodges RS. Role of positively charged residues on the polar and non-polar faces of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides on specificity and selectivity for Gram-negative pathogens. *Chemical biology & drug design*. 2018;91(1):75-92.

Anexo A: Productos de síntesis química. A) Resumen de la síntesis B) Cromatograma HPLC y C) espectro de masas.

1. [A³³¹]-PfRif (325-340)

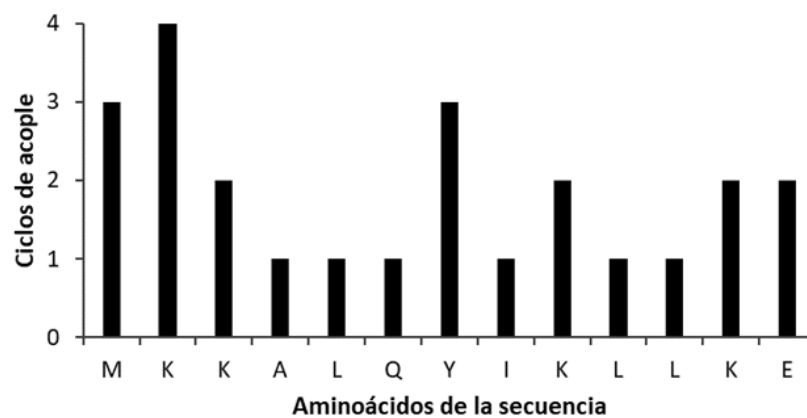


2. [A^{331}]-PfRif (326-340)

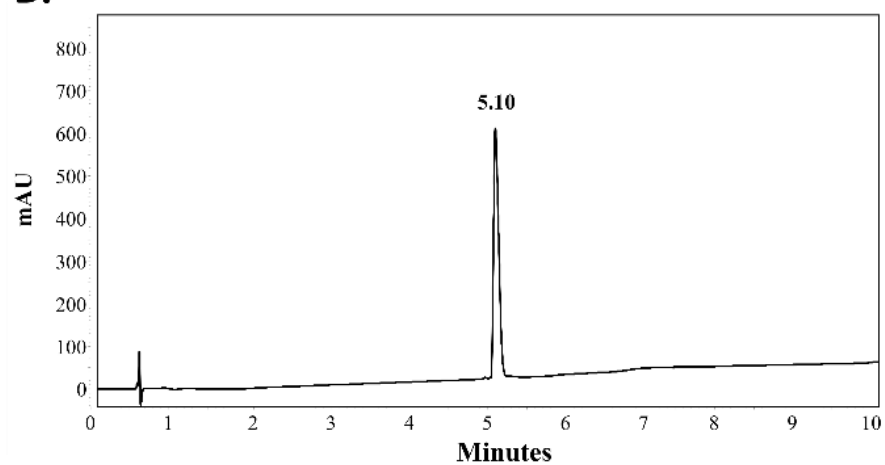
3. [A³³¹]-PfRif (327-340)

4. [A³³¹]-PfRif (328-340)

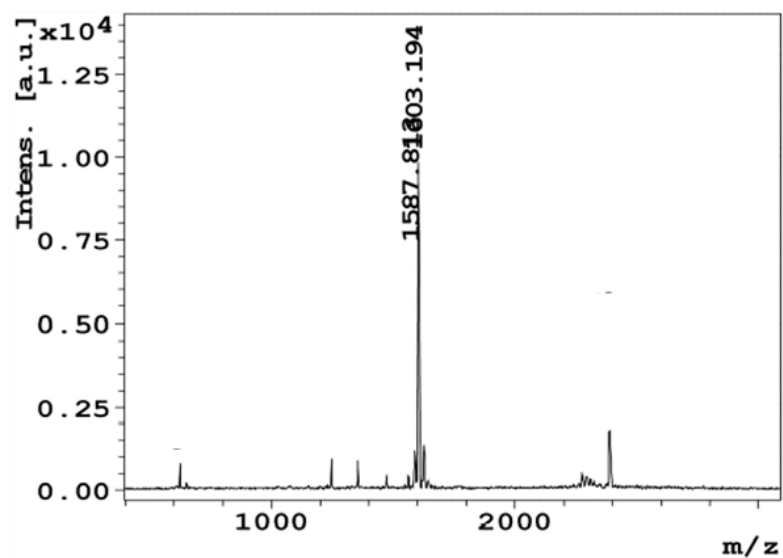
A.



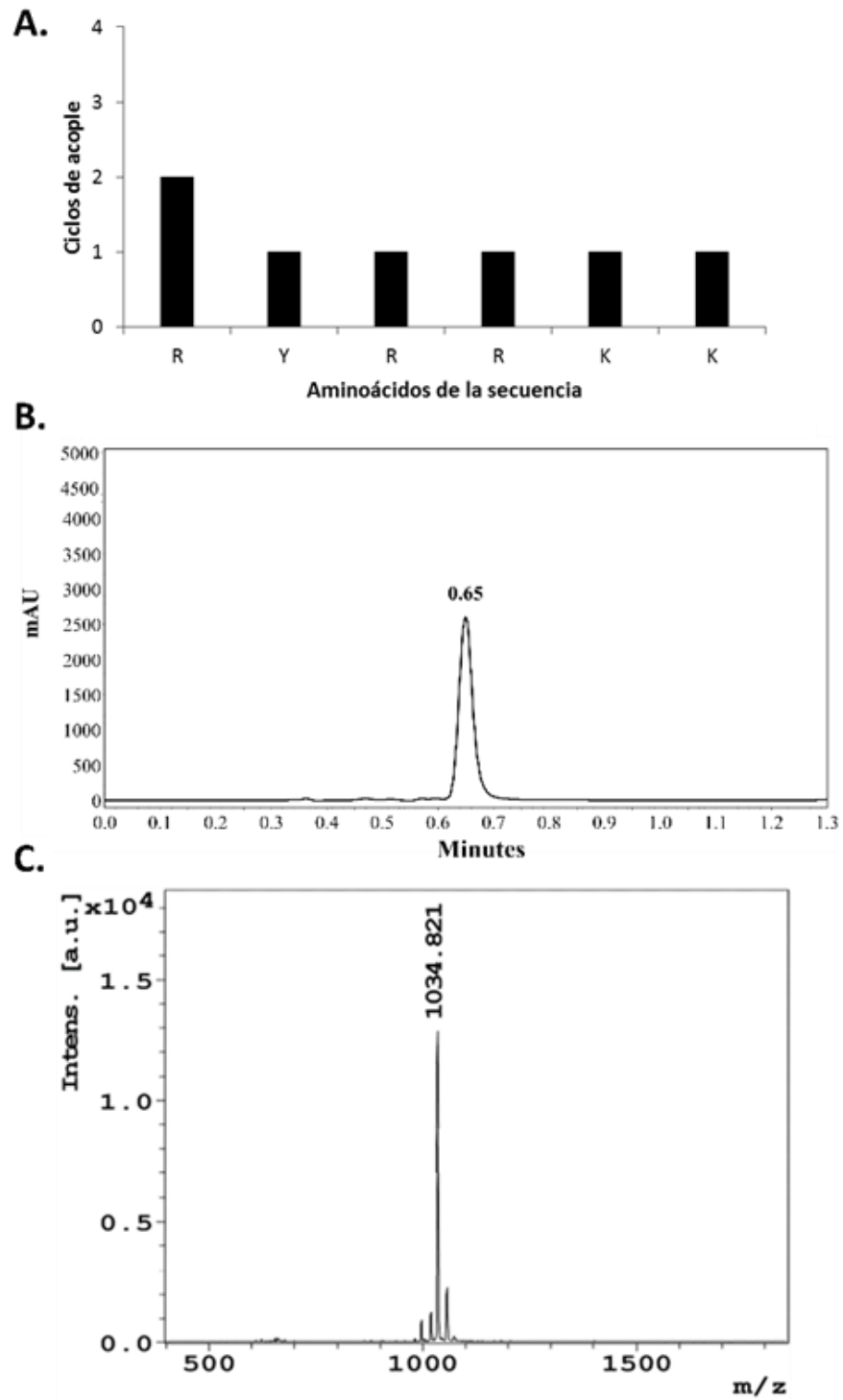
B.



C.

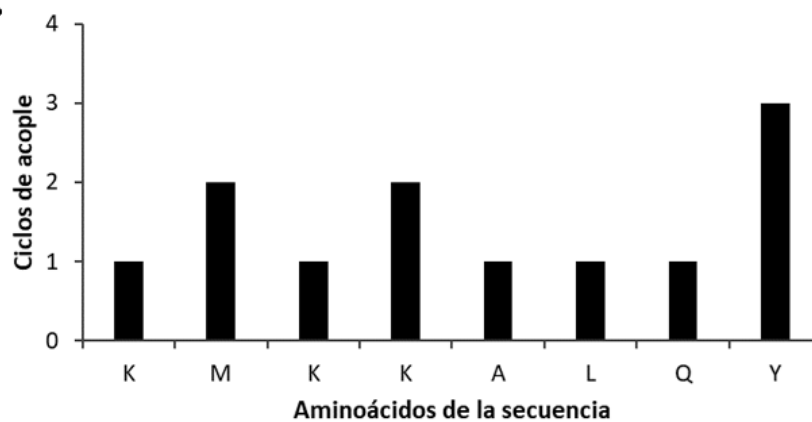


5. [A³³¹]-PfRif (321-327)

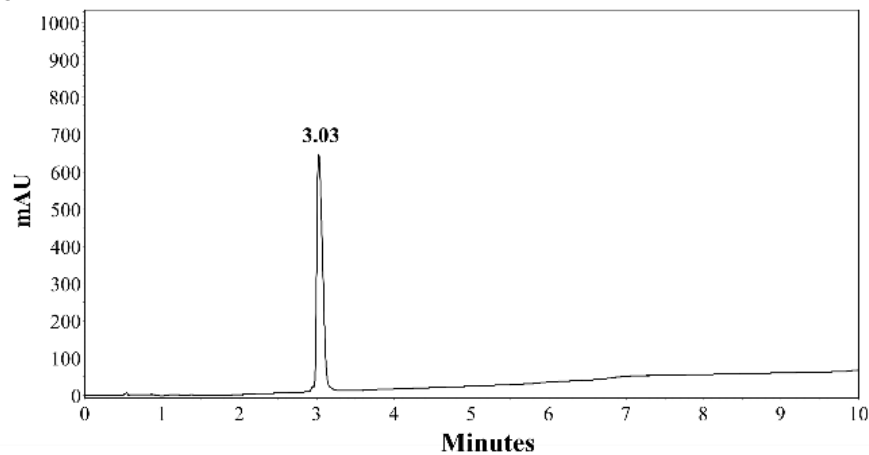


6. [A³³¹]-PfRif (327-334)

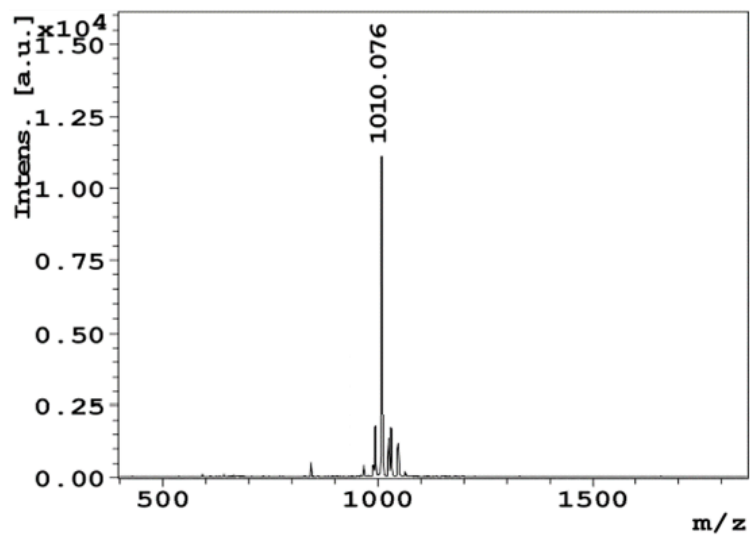
A.



B.

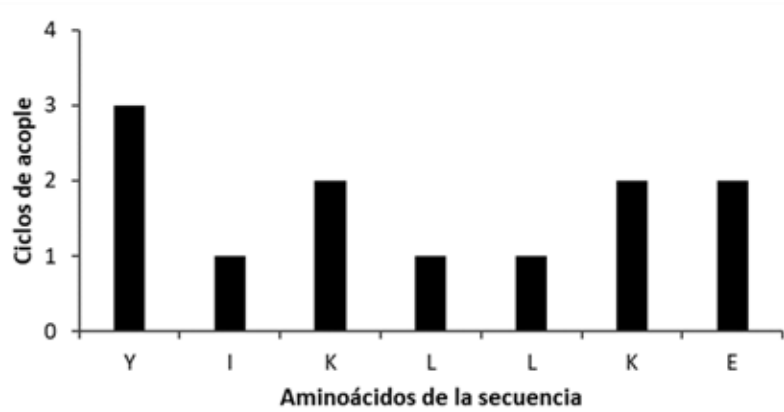


C.

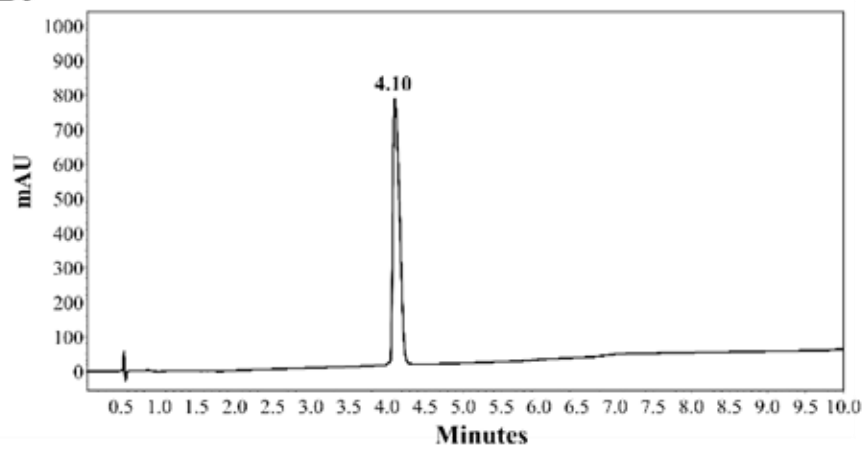


7. [A³³¹]-PfRif (334-340)

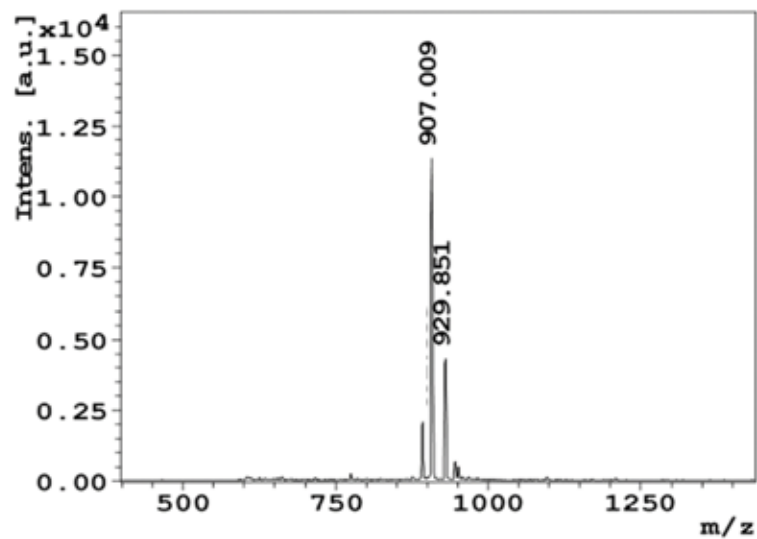
A.

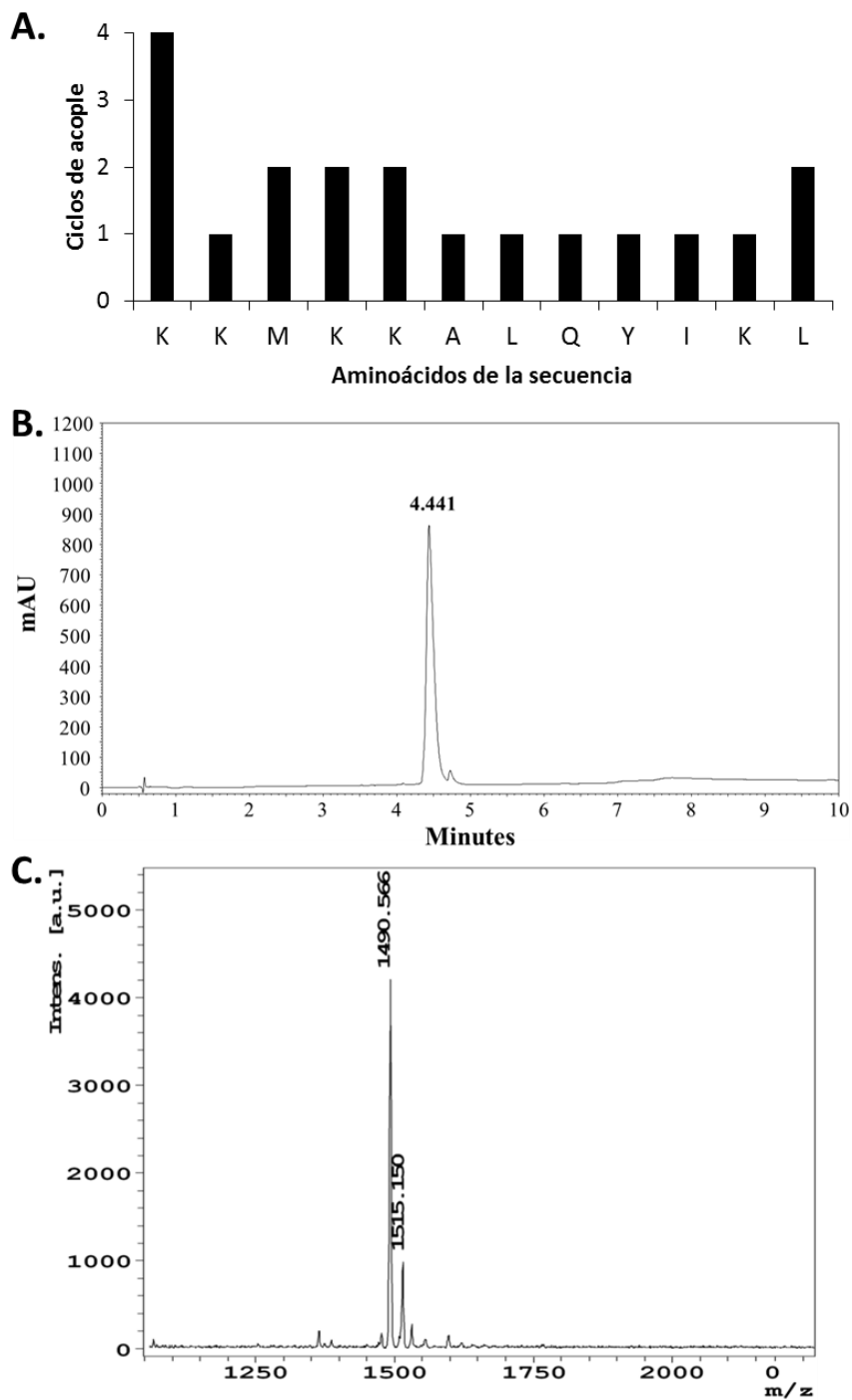


B.



C.



8. [A³³¹]-PfRif (326-340)

9. [A^{331}]-PfRif (324-334)