

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**PÉPTIDOS QUIMÉRICOS DERIVADOS DE LA
LACTOFERRICINA BOVINA Y LA BUFORINA:
SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE
SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Héctor Manuel Pineda Castañeda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C, Colombia

2019

**PÉPTIDOS QUIMÉRICOS DERIVADOS DE LA
LACTOFERRICINA BOVINA Y LA BUFORINA:
SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE
SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Héctor Manuel Pineda Castañeda

Tesis de Maestría presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Química

Director (a):

Ph.D. Zuly Jenny Rivera Monroy

Grupo de Investigación:

Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C, Colombia

2019

*Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es
también un niño colocado ante fenómenos naturales que le
impresionan como un cuento de hadas.*

~ Marie Curie ~

Agradecimientos

Durante el desarrollo de mi tesis de maestría tengo que agradecer en primera instancia a mis padres, hermanos y sobrinos, quienes me inspiraron y apoyaron en la continuación de mis estudios de posgrado. Quiero resaltar el incondicional apoyo de mi madre Luz Castañeda quien siempre ha sido un foco de inspiración, todo aquel reconocimiento y triunfo que coseche en gran medida se lo debo a ella.

A mis amigos, en especial a Paula Duarte y Luisa Espín quienes me han acompañado desde el principio de mi formación profesional y me han brindado de su absoluta compañía.

Un agradecimiento especial a mi profesora y tutora Zuly Jenny Rivera Monroy quien siempre me ha inspirado y apoyado no únicamente en mi formación profesional si no personal, gracias a su gran talento humano me ha infundido a ser mejor persona. A ella mi más fraternal agradecimiento.

Al profesor Javier Eduardo García, quien me ha apoyado con sus incontables consejos siempre buscando fomentar mi formación personal y profesional.

A los integrantes del grupo de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP), quienes siempre recurrieron con su apoyo y consejos en pro al desarrollo de mi investigación de maestría.

A la Universidad Nacional de Colombia, en especial a la Dirección Académica quienes mediante la beca Asistente Docente me brindaron la posibilidad de la continuación de mis estudios de posgrado. A la División de Investigación Sede Bogotá (DIEB) por la financiación del proyecto titulado “PÉPTIDOS QUIMÉRICOS DERIVADOS DE LA LACTOFERRICINA BOVINA Y LA BUFORINA: DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA”.

Y finalmente, al Departamento de Química, en especial al programa de Maestría en Ciencias-Química. Por abrirme sus espacios, facilitando el debido desarrollo de mis estudios e investigación de maestría.

Resumen

El uso indiscriminado de antibióticos ha generado un incremento de la resistencia por parte de las bacterias, lo que es considerado una amenaza creciente para la salud a nivel mundial. En recientes reportes, emitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se describe la importancia de la búsqueda de nuevas moléculas con potencial terapéutico, que logren combatir infecciones causadas por cepas resistentes y que su actividad se base en mecanismos de acción diferentes a los que exhiben los antibióticos convencionales. Dentro de este contexto, los péptidos antimicrobianos (PAMs) surgen como candidatos a nuevos agentes terapéuticos, el diseño de quimeras en la actualidad es una de las estrategias que busca potenciar la actividad de PAMs sintéticos. Para este estudio, se seleccionaron dos PAMs de origen animal: la Buforina II (BFII) y la Lactoferricina Bovina (LfcinB), los cuales han presentado un amplio espectro de actividad antimicrobiana. A partir de estos PAMs, se obtuvieron quimeras peptídicas que combinan los motivos mínimos de actividad antibacteriana tanto de la LfcinB como de la BFII. Se evaluó la actividad de las quimeras sintéticas, frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, encontrándose moléculas con amplio espectro de actividad cuyas concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) variaron en un rango de 6 μM a 131 μM . Las quimeras que presentaron mejor actividad contienen en su estructura los motivos RRWQWR y RLLRLLR, y presentan actividad bactericida y bacteriostática en las cepas evaluadas. Los resultados de este trabajo sugieren que el diseño de quimeras derivadas de la LfcinB y BFII es una alternativa viable para generar nuevos PAMs sintéticos, promisorios para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas.

Palabras clave: · PAMs · LfcinB · Buforina · Quimera ·

Abstract

The indiscriminate use of antibiotics has generated an increase in resistance by bacteria, which is considered a growing threat to health worldwide. In recent reports, issued by the World Health Organization (WHO), the importance of searching for new molecules with therapeutic potential is described, that they manage to fight infections caused by resistant strains and that their activity is based on different mechanisms of action. those who exhibit conventional antibiotics. Within this context, antimicrobial peptides (AMPs) arise as candidates for new therapeutic agents, the design of chimeras is currently one of the strategies that seeks to enhance the activity of synthetic AMPs. For this study, two AMPs of animal origin were selected: Buforin II (BFII) and Bovine Lactoferricin (LfcinB), which have presented a broad spectrum of antimicrobial activity. From these AMPs, peptide chimeras were obtained that combine the minimal motifs of antibacterial activity of both LfcinB and BFII. The activity of the synthetic chimeras was evaluated against strains of *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*, and molecules with a broad spectrum of activity were found whose minimum inhibitory concentrations (MICs) ranged from 6 μ M to 131 μ M. The chimeras that showed the best activity contained both RRWQWR and RLLRLLR motifs in their structures and showed bactericidal and bacteriostatic activity in the evaluated strains. The results of this work suggest that the design of chimeras derived from LfcinB and BFII is a viable alternative to generate new synthetic AMPs, promising for the development of new therapeutic options.

Keywords: · AMPs · LfcinB · Buforin · Chimera ·

Contenido

Contenido

1. Marco Teórico	3
1.1 Péptidos Antimicrobianos (PAMs).....	3
1.1.1 Lactoferrina (LF) y Lactoferricina (Lfcin).....	4
1.1.2 Buforina (BF).....	5
1.2 Estrategias empleadas para potenciar la actividad de los PAMs.....	6
1.2.1 Incorporación de aminoácidos no naturales	7
1.2.2 Estructuras con restricciones conformacionales	8
1.2.3 Estructuras con presentación múltiple del motivo activo	8
1.2.4 Estructuras palindrómicas	10
1.2.5 Quimeras que entre PAMs y secuencias capaces de internalizar la membrana 11	
1.2.6 Sustitución de Arginina (Arg) por Lisina (Lys) y cambio de la longitud de residuos catiónicos	11
2. Pregunta de investigación	13
3. Hipótesis	14
4. Objetivos.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
5. Metodología	16
5.1 Diseño experimental	16
5.2 Materiales	17
5.3 Obtención de los péptidos quiméricos y los péptidos control.....	18
5.3.1 Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)	19
5.3.2 Síntesis de la quimera QAAC: (RRWQWR)-Pra-AAC-K-(RLLR), mediante química click (CuAAC).....	20
5.4 Purificación y caracterización de las moléculas sintéticas	20
5.4.1 Caracterización mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC).....	20
5.4.2 Purificación mediante extracción en fase sólida (SPE).....	21

5.4.3	Análisis de péptidos por espectrometría de masas	21
5.5	Ensayos biológicos	22
5.5.1	Cepas bacterianas – activación y almacenamiento.....	22
5.5.2	Curva de calibración (UFC/mL vs. ABS)	22
5.5.3	Determinación Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC)	23
5.5.4	Actividad Hemolítica	23
5.5.5	Curvas de letalidad-muerte	24
5.5.6	Ensayo de sinergia. Péptidos LfcinB (20-25) y BFII (32-35) _{Pal}	24
6.	Resultados y Discusión.....	25
6.1	Síntesis, purificación y caracterización de las quimeras y controles (<i>Etapa 1</i>)	26
6.1.1	Péptido quimérico QAAC obtenido mediante química click.....	26
6.1.2	Péptidos quiméricos lineales	31
6.1.2.1	Síntesis y caracterización de las quimeras lineales.....	32
6.2	Evaluación de la actividad antibacteriana y actividad hemolítica (<i>Etapa 2</i>).....	35
6.2.1	Curvas de calibración (UFC/mL vs. ABS).....	35
6.2.2	Actividad antibacteriana, Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC).....	36
6.2.2.1	Quimera QAAC	36
6.2.2.2	Quimeras de las familias QA, QB y QC.....	37
6.2.3	Evaluación del efecto sinérgico de los péptidos RRWQWR y RLLRLLR	39
6.3	Cinética de la actividad antibacteriana de los péptidos quiméricos QA3 y QB3 (<i>Etapa 3</i>)	40
7.	Conclusiones.....	42

Lista de figuras

Figura 1. Secuencia de la LfcinB. Resaltado en negro, se muestra el bucle formado por el puente disulfuro. En rojo se presentan los aminoácidos cargados positivamente (catiónicos), los números corresponden a la posición en la proteína original [13]......	5
Figura 2. a) Representación de la histona H2A, en naranja se encuentra resaltada la BFII b) Representación de la estructura de alfa hélice de la BFII [17], [30]......	6
Figura 3. Estructuras con conformación restringida. (A) Formación del bucle, mediante puente disulfuro (Izquierda) y mediante química click (Derecha) con sus respectivos valores de MIC contra <i>E. coli</i> ATCC 25922. (B) estructuras de aminoácidos usados en SPPS-Fmoc/ <i>t</i> Bu, para posterior unión específica por CuAAC (química click). (C) Reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por Cu(I). [7].....	8
Figura 4. Representación del monómero, dímero y tetramero derivados de la secuencia LfcinB (20-25): RRWQWR con sus respectivos valores de MIC contra <i>E. coli</i> ATCC 25922 [8]......	9
Figura 5. Motivo mínimo de la LfcinB (20-25) y palíndromo, LfcinB (21-25) _{pal} , estructuras y valores de MIC contra <i>E. coli</i> ATCC 25922 [33].	10
Figura 6. Quimeras peptídicas LfcinB/LfcinH con sus correspondientes valores de MIC contra <i>E. coli</i> ATCC 11775 [7]......	11
Figura 7. Etapas involucradas en el diseño experimental.	16
Figura 8. Esquema de la síntesis del péptido RRWQWR usando la estrategia SPPS-Fmoc/ <i>t</i> Bu.	19
Figura 9. Esquema general de obtención de la quimera QAAC mediante química click. Cicloadición 1,3 dipolar de azidas y alquinos [65].	27
Figura 10. Seguimiento de la reacción de cicloadición catalizada por Cu (I) de los Fmoc-Aminoácidos. Perfil cromatográfico del a) Fmoc-Pra-OH, b) Fmoc-Lys(N ₃)-OH y c) producto de reacción, en el recuadro se presenta el espectro de masas de la especie con t _R = 7,3 min purificada.	29
Figura 11. Seguimiento de la reacción de cicloadición entre Pra-RRWQWR y Lys(N ₃)-RLLR para la formación de la quimera QAAC. Perfil cromatográfico a) antes de la adición del ácido ascórbico, b) 10 min después de la adición del ácido ascórbico. Análisis por c) RP-HPLC y d) espectrometría de masas MALDI-TOF de la quimera QAAC purificada....	30

Figura 12. Perfil cromatográfico de la quimera QA1: RRWQWRLLR antes y después del proceso de purificación.	32
Figura 13. Espectro de masas obtenido para la quimera QA1: RRWQWRLLR, M: 1523,9 u.m.a.....	35
Figura 14. Curvas de calibración de las cepas bacterianas ATCC.	35
Figura 15. Curva de cinética de muerte celular. Péptido QA3 contra <i>E. coli</i> ATCC 25922. El péptido fue probado a concentraciones de 0,5×MIC, MIC y 2×MIC.....	40

Lista de tablas

Tabla 1. Péptidos quiméricos derivados de la LfcinB (20-25) y BFII (32-35) que fueron sintetizados para este estudio.....	18
Tabla 2. Programa diseñado para la purificación de QA1 usando RP-SPE. Las fracciones 6 a la 12 corresponden a los porcentajes de solvente B donde se esperaba que eluyera el péptido. El volumen de cada fracción fue de 12 mL.....	33
Tabla 3. Resumen de la caracterización analítica de los péptidos quiméricos derivados de la LfcinB y BFII obtenidos.	34
Tabla 4. Actividad antibacteriana y hemolítica de del péptido QAAC y controles	36
Tabla 5. Actividad antibacteriana y hemolítica de los péptidos quiméricos.....	37
Tabla 6. Determinación de la concentración inhibitoria fraccionada (FIC) para el ensayo de sinergia entre los péptidos LfcinB (20-25) y BFII (32-35) _{Pal}	39
Tabla 7. Actividad bacteriostática y bactericida de péptidos quiméricos	41

Lista de símbolos y abreviaturas

Termino	Abreviatura	Siglas
Acetonitrilo	ACN	
Acetonitrilo / TFA 0.05%	Solvente B	
Ácido 6-aminohexanoico	<i>Ahx</i>	
Ácido (S)-2-(Fmoc-amino)-4-pentinoico	Fmoc-Pra-OH	
Ácido (S)-6-azido-2-(Fmoc-amino)hexanoico	Fmoc-Lys(N ₃)-OH	
Ácido Trifluoroacético	TFA	
Agar Mueller Hinton		MHA
Agar tripticasa de soya		TSA
Agua / TFA 0,05%	Solvente A	
American Type Culture		ATCC
Azide-Alkyne Cycloaddition		AAC
Caldo Muelle Hinton		CMH
Ciprofloxacina		CIP
Concentración mínima bactericida		MBC
Concentración mínima inhibitoria		MIC
Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa		RP-HPLC
N,N'-Diciclohexilcarbodiimida		DCC

Diclorometano		DCM
Dimetilsulfóxido		DMSO
N,N-dimetilformamida		DMF
Espectrometría de masas	MS	
Etanoditiol	EDT	
Extracción en fase sólida	SPE	
9-Fluorenilmetiloxycarbonilo	Fmoc	
1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol	6-Cl-HOBt	
Lactoferricina	Lfcin	
Lactoferricina Bovina	LfcinB	
Lactoferricina Humana	LfcinH	
Lactoferrina	LF	
Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization / Time-Of-Flight		MALDI-TOF
Mililitro	mL	
Organización Mundial de la salud	OMS	
Péptidos Antimicrobianos		PAMs
Agar Standar Plate Count		SPC
Síntesis de Péptidos en Fase Sólida		SPPS
Tetrafluoroborato de O-(Benzo-triazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetrametiluronio		TBTU
Tiempo de retención		tr
Temperatura Ambiente	TA	
Triisopropilsilano	TIS	
Unidades formadoras de colonias		UFC

Introducción

El uso indiscriminado de antibióticos ha generado el incremento de la resistencia por parte de las bacterias, en recientes reportes emitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se describe la importancia de la búsqueda de moléculas que logren contrarrestar la resistencia de las bacterias a los antibióticos que se emplean en la actualidad, ya que esta problemática es considerada como una amenaza creciente para la salud a nivel mundial [1], [2]. La OMS reporta las cepas bacterianas que presentan mayor resistencia, entre estas encontramos: la *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias *Enterobacteriaceae* (incluyendo *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia* y *Proteus*), seguido de *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*, entre otras [3], [4]. Dentro de este contexto, se presenta un nuevo reto para el campo de la salud: *la búsqueda de nuevas moléculas con potencial terapéutico que logren combatir infecciones causadas por cepas resistentes y que su actividad se base en mecanismos de acción diferentes a los que exhiben los antibióticos convencionales.*

En las últimas décadas se ha incursionado en el desarrollo de agentes antimicrobianos derivados de fuentes proteicas, y se han encontrado péptidos con potencial antibacteriano contra una gran variedad de cepas bacterianas resistentes, esta actividad ha sido en algunos casos mayor a la presentada por las proteínas de origen. Los péptidos antimicrobianos (PAMs), han sido descritos como una barrera primaria de defensa contra infecciones causadas por patógenos externos [5]. En la actualidad los PAMs son una fuente para el diseño y desarrollo de nuevas moléculas peptídicas que presenten actividad antimicrobiana. Para la obtención de agentes terapéuticos basados en PAMs se han propuesto modificaciones estructurales puntuales a las secuencias originales, que involucran (i) la incorporación de aminoácidos no naturales [6], (ii) secuencias con restricción conformacional [7], (iii) estructuras con presentación múltiple del motivo activo

[8], (iv) estructuras palindrómicas [9], [10], y (v) quimeras que contienen un motivo antibacteriano y secuencias peptídicas, generalmente cortas, capaces de internalizar moléculas en las células objetivo (CPPs, por sus siglas del inglés: Cell Penetrating Peptides) [7], [11].

El diseño de quimeras en la actualidad es una de las técnicas que busca la potencialización de la actividad antibacteriana de péptidos sintéticos [7], [12]. Esta estrategia explora el sinergismo de dos PAMs de fuentes diferentes con mecanismos de acción disímiles tanto intra como extracelularmente, quimeras diseñadas ya han sido probadas contra gran variedad de cepas Gram negativas como Gram positivas [7]. En este contexto, la presente tesis de maestría abordó la síntesis, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana de péptidos quiméricos derivados de la Lactoferricina Bovina (LfcinB) y la Buforina II (BFII). Específicamente, la LfcinB ha sido descrita como un PAM que presenta un alto potencial terapéutico contra un amplio espectro de acción en microorganismos y se ha propuesto que el mecanismo de acción es mediante interacciones electrostáticas entre residuos catiónicos del péptido y cargas negativas presentes en la superficie bacteriana [13]–[15]. Por otro lado, se ha reportado que péptidos derivados de la BFII presentan alta tasa de internalización y se ha sugerido que su mecanismo de acción se basa principalmente en la inhibición de la reproducción celular [16]–[19]. Para el diseño de los péptidos quiméricos se seleccionaron los motivos mínimos de actividad antibacteriana reportados para estos PAMs, específicamente las secuencias LfcinB (20-25): RRWQWR y BFII (32-35): RLLR, también se incluyó una secuencia palindrómica derivada de la BFII (BFII (32-35)_{Pal}: RLLRLLR). Las quimeras fueron sintetizadas por SPPS (por sus siglas en inglés, Solid Phase Peptide Synthesis), usando la estrategia Fmoc/tBu, purificadas por RP-SPE y caracterizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. La actividad antibacteriana de las quimeras peptídicas se evaluó frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922 y ATCC 11775) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Este trabajo permitió identificar secuencias peptídicas quiméricas promisorias para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos.

1. Marco Teórico

1.1 Péptidos Antimicrobianos (PAMs)

Los PAMs son producidos por diferentes tipos de células y constituyen un mecanismo primario de defensa contra infecciones causadas por bacterias y otros agentes externos [20]. Los PAMs son una gran fuente de nuevas moléculas biológicas con actividad antimicrobiana, que poseen un amplio espectro de acción y han sido categorizados en cuatro subgrupos, según su estructura primaria [5].

Grupo 1. Formado principalmente por péptidos aniónicos, a condiciones de pH fisiológico, son PAMs de secuencias cortas con un peso molecular que oscila entre los 700 – 800 Da. Se encuentran con regularidad en fluidos bronquioalveolares y células epiteliales del tracto respiratorio. Se ha reportado que este tipo de PAMs presentan actividad antibacteriana contra cepas Gram negativas y Gram positivas.

Grupo 2. Constituido por péptidos catiónicos con un tamaño máximo de 40 aminoácidos, no presentan residuos de Cisteína. No presentan una estructura definida, sin embargo, se han reportado casos como la Buforina II (BFII) donde la extensión de la α -hélice se correlaciona directamente con la actividad antibacteriana.

Grupo 3. Conformado por péptidos catiónicos ricos en aminoácidos como Prolina, Arginina, Triptófano y Fenilalanina. Estos péptidos carecen de residuos de Cisteína y son particularmente lineales, aunque algunos pueden tomar conformaciones de giros extendidos, similar a la α -hélice.

Grupo 4. Abarca péptidos tanto catiónicos como aniónicos los cuales se diferencian principalmente de los demás subgrupos debido a que presentan residuos de Cisteína, que facilita la formación de puentes disulfuro intramoleculares y estructuras β -plegadas estables. Son secuencias que contienen cerca de 30 aminoácidos y de estos entre 6-10 son Cisteínas.

La estructura primaria de los PAMs, en la mayoría de casos, está constituida principalmente por aminoácidos catiónicos que le confieren una mayor capacidad de interacción con las cargas negativas de la membrana externa de las bacterias, esta interacción electrostática conlleva a la desestabilización de su capa estructural externa lo que causa una posterior lisis celular [5], [6].

1.1.1 Lactoferrina (LF) y Lactoferricina (Lfcin)

La Lactoferrina Bovina (LFB), es una glicoproteína de 703 aminoácidos con un peso molecular de 80 KDa, perteneciente a la familia de las transferrinas (proteínas transportadoras de hierro). Esta proteína contiene una gran variedad de aminoácidos básicos que le confieren propiedades únicas. La LFB se encuentra en su forma libre de hierro, en fluidos corporales, tales como, secreciones de las mucosas, líquido seminal, leche materna, entre otras [13], [21]. Por otra parte, la Lactoferricina bovina (LfcinB: ¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹) es generada por la hidrólisis de la LFB mediada por la pepsina gástrica [13], este péptido presenta un bucle formado por enlaces disulfuro entre las ¹⁹Cys y ³⁶Cys (Ver Figura 1) que le confiere propiedades estructurales que están asociadas con su efecto como agente antimicrobiano [14].

La LfcinB y fragmentos más cortos derivados de este péptido han presentado igual o mayor actividad antibacteriana que la LFB; se ha logrado identificar el motivo mínimo de actividad antibacteriano, el cual corresponde a seis residuos (LfcinB (20-25): ²⁰RRWQWR²⁵), sin embargo, este motivo presenta una menor actividad en comparación a la LfcinB [22].

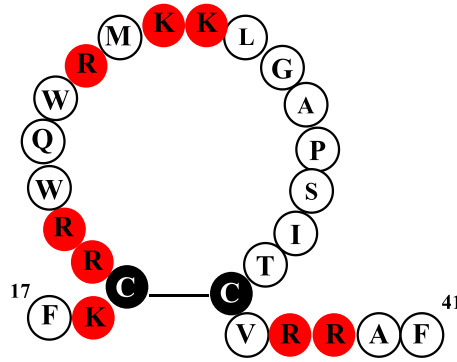


Figura 1. Secuencia de la LfcinB. Resaltado en negro, se muestra el bucle formado por el puente disulfuro. En rojo se presentan los aminoácidos cargados positivamente (catiónicos), los números corresponden a la posición en la proteína original [13].

1.1.2 Buforina (BF)

La Buforina ha sido descrita como el primer PAM derivado de una histona, se ha reportado, que estas solo presentan funciones en el núcleo de la célula como proteínas encargadas del empaquetamiento y regulación de los genes en células eucariotas. En la actualidad se conoce que presentan funciones extracelulares que están relacionadas con el sistema inmune innato mediante la liberación de PAMs. La Buforina I es un PAM constituido por 39 aminoácidos (BFI: ¹AGRGKQGGKVRKAKTRSSRAGLQFPVGRVHLLLRKGNK³⁹), aislado del tejido estomacal del sapo asiático *Bufo gargarizans*, este PAM es generado a partir de la proteólisis de la histona H2A, dirigida por la catepsina D, liberándose su región N-terminal la cual es reconocida específicamente e induce una respuesta a lesiones epidérmicas [17].

La Buforina II (BFII) consta de 21 aminoácidos (¹⁶TRSSRAGLQFPVGRVHLLLRK³⁶) (Ver Figura 2.a), es considerado como un PAM de amplio espectro [23], ya que ha presentado actividad antimicrobiana contra cepas Gram positivas, Gram negativas, bacterias multirresistentes, hongos y células cancerígenas. La BFII cuenta con un mecanismo de acción independiente del rompimiento de la membrana de la bacteria. En este mecanismo juega un papel muy importante la ¹¹Pro (Ver Figura 2.b), han demostrado que este aminoácido está directamente involucrado en el paso del péptido a través de la membrana de las bacterias, independiente de que exista o no un receptor específico, sin alterar la

membrana. Luego de atravesar la membrana, interactúa directamente con el ADN de la bacteria para interrumpir finalmente los procesos vitales de la misma [10], [24]–[29]. El motivo mínimo de actividad antibacteriano reportado corresponde a la secuencia BFII (32-35): RLLR, adicionalmente se ha demostrado la importancia de la incorporación de múltiples copias de esta secuencia en regiones específicas de PAMs, como se evidenció para el péptido BFIIb (RAGLQFPVG**RLLRLLRLLR**) que contiene tres veces este motivo en su región C-terminal, esta modificación puntual genera un aumento significativo de la actividad antibacteriana contra diferentes cepas [17].

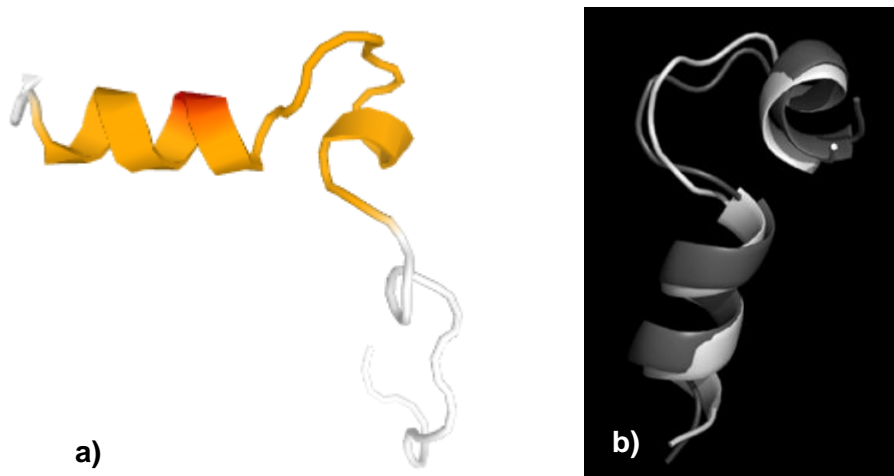


Figura 2. a) Representación de la histona H2A, en naranja se encuentra resaltada la BFII b) Representación de la estructura de alfa hélice de la BFII [17], [30].

1.2 Estrategias empleadas para potenciar la actividad de los PAMs

La resistencia antimicrobiana es consecuencia de cambios que sufren los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) al estar expuestos de manera excesiva a agentes antimicrobianos como antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos. Como resultado, los agentes antimicrobianos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación. De esta manera, la resistencia antimicrobiana es un fenómeno que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas. El proceso se ve acelerado por el uso indiscriminado y una mala dosificación de los antibióticos tanto en

personas como en animales, por ejemplo, la administración de antibióticos para tratamiento de infecciones víricas como los resfriados o gripe, o su uso como promotores del crecimiento en ganado y peces [31].

Dentro de este contexto, la OMS propone la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos para generar alternativas contra infecciones generadas por bacterias y otros microorganismos que presenten resistencia. Los PAMs han surgido como una alternativa y se han desarrollado algunas estrategias para potenciar la actividad antibacteriana en estas moléculas como se citan a continuación.

1.2.1 Incorporación de aminoácidos no naturales

La incorporación de aminoácidos no naturales o cambio de la estructura primaria del péptido puede generar alteraciones directas en el mecanismo de acción contra cepas bacterianas, ya que crea un cambio significativo en su carga neta, facilitando la interacción con las cargas negativas de la membrana externa de la bacteria. Adicionalmente, la degradación de los aminoácidos no naturales es menos viable dificultando que el PAM sea fácilmente degradado.

Para el caso específico de la LfcinB, se han reportado cambios puntuales en su secuencia, se le han incorporado aminoácidos no naturales como la β -Alanina (β -Ala), la cual dependiendo de la posición donde sea incorporada (extremo N-terminal o C-terminal) puede causar una disminución o aumento de su actividad antibacteriana [6]. Específicamente, en la secuencia LfcinB (20-25): RRWQWR, se incorporó un residuo de β -Ala en su extremo C-terminal, y se evaluó contra *E. coli* ATCC 25922; la secuencia original presentó una concentración mínima inhibitoria (MIC) mayor $>200 \mu\text{M}$, mientras que su análogo la LfcinB (20-25- β A): RRWQWR β A, presentó un MIC de $95 \mu\text{M}$. Este resultado sugiere que la incorporación de β -Ala para esta secuencia en el extremo C-terminal mejora la actividad del motivo mínimo, lo que implica que la estructura primaria del péptido está directamente involucrada en el mecanismo de acción [8].

1.2.2 Estructuras con restricciones conformacionales

Se han reportado diferentes diseños de PAMs con restricciones conformacionales, especialmente formación de ciclos. Por ejemplo, tratando de replicar la formación del bucle formado por las Cisteínas presentes en la LfcinB [7], [8] (Ver Figura 3. A), se obtuvo un péptido en el que se sustituyó la ^{19}Cys por Bpg-OH, para introducir un grupo funcional alquino, y la ^{36}Cys se cambió por un residuo de Lisina cuya cadena lateral había sido modificada y contenía el grupo funcional azida (Ver Figura 3.B). Luego para obtener un péptido cíclico se realizó la reacción específica de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre, CuAAC por sus siglas en inglés Copper(I)-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition.

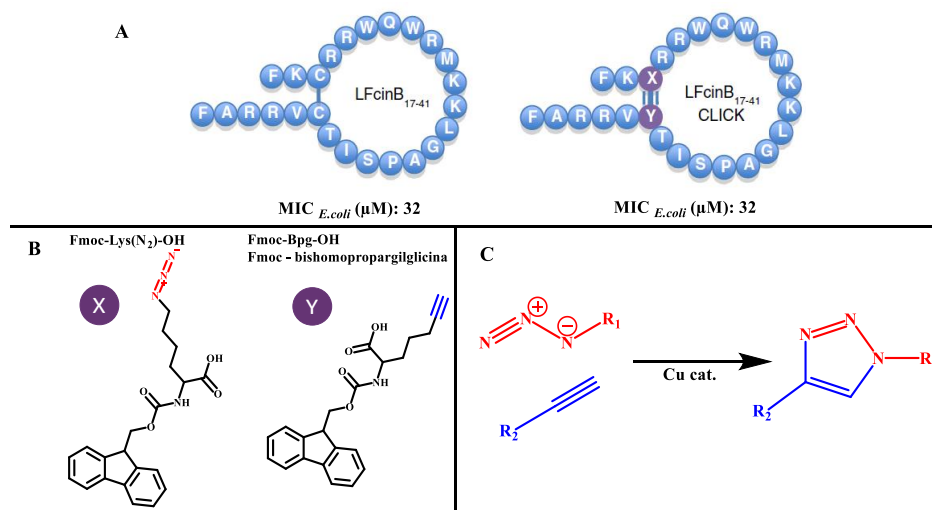


Figura 3. Estructuras con conformación restringida. (A) Formación del bucle, mediante puente disulfuro (Izquierda) y mediante química click (Derecha) con sus respectivos valores de MIC contra *E. coli* ATCC 25922. (B) estructuras de aminoácidos usados en SPPS-Fmoc/*t*Bu, para posterior unión específica por CuAAC (química click). (C) Reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por Cu(I). [7]

1.2.3 Estructuras con presentación múltiple del motivo activo

En la actualidad se incursiona en el diseño de PAMs polivalentes con repetición del motivo mínimo de actividad. Dentro de las estrategias más comúnmente usadas para la obtención de péptidos polivalentes tenemos: (i) incorporación de una Cisteína (Cys) en la secuencia peptídica, para la posterior oxidación del grupo tiol (-SH) de la cadena lateral con la

subsecuente formación de dímeros o tetrámeros y (ii) el uso de los MAPs (Multiple Antigen Peptides) [32], en la que sobre los grupos α y ϵ amino de residuos de Lisina (Lys) se construyen simultáneamente cadenas con la misma secuencia peptídica, [6], [7], [33]–[38]. Para el caso de la LfcinB, se han diseñado péptidos polivalentes que presentan el motivo mínimo LfcinB (20-25): RRWQWR, en su forma dimérica LfcinB (20-25)₂ y tetramérica LfcinB (20-25)₄ (Ver Figura 4). Se ha evaluado tanto su actividad antibacteriana como anticancerígena [8], [33], [38]. En *E. coli* ATCC 25922, el monómero LfcinB (20-25), presentó un MIC >200 μ M mientras que para el dímero LfcinB (20-25)₂ el MIC fue 6 μ M y para el tetrámero LfcinB (20-25)₄ fue 22 μ M. Otro ejemplo, es el péptido lineal [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31): FKARRWQWRMKKLG, contra *S. aureus* presentó un MIC >200 μ M y su forma dimérica LfcinB (17-31)₂ presentó mayor actividad contra esta cepa (MIC 12,5 μ M), estos resultados demuestran que la polivalencia de secuencias pueden llegar a incrementar la actividad antibacteriana [8], [33], [38].

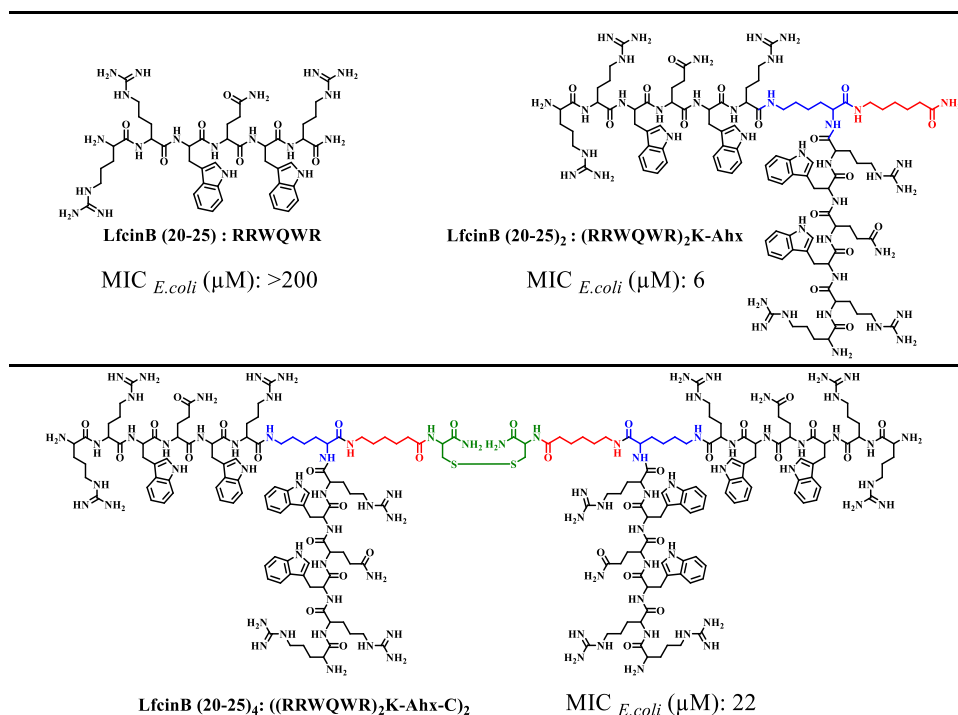


Figura 4. Representación del monómero, dímero y tetrámero derivados de la secuencia LfcinB (20-25): RRWQWR con sus respectivos valores de MIC contra *E. coli* ATCC 25922 [8].

1.2.4 Estructuras palindrómicas

El diseño de secuencias palindrómicas (palíndromo: que se lee de igual forma de izquierda a derecha que de derecha a izquierda) se ha realizado a partir de secuencias mínimas que presenten actividad antibacteriana comprobada. Para la BF, secuencias palindrómicas han sido diseñadas a partir del motivo de 4 residuos (RLLR), y su actividad antibacteriana ha sido evaluada contra cepas Gram negativas y Gram positivas. Se reportó que el palíndromo [RLLR]₅: RLLRLLRRLRLLRRLRLLR presentó un MIC de 0,7 μM contra *E. coli* en comparación con la BFII que presentó una MIC de 1,62 μM [10], [18].

Para el caso de la LfcinB se ha reportado un palíndromo (RWQWRWQWR) cuya actividad antibacteriana aumentó considerablemente en relación con su secuencia de partida (LfcinB (20-25): RRWQWR), esto se ve reflejado estructuralmente (Ver Figura 5) con la presencia de una mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos (Trp) intercalados con aminoácidos polares con carga positiva (Arg) que pueden interactuar más fácilmente con las cargas negativas de los lipopolisacáridos de las membranas en cepas Gram negativas [8], [22], [33]. Otros fragmentos palindrómicos de la LfcinB como DFKFD han sido reportados como posibles PAMs contra cepas Gram negativas y Gram positivas [39].

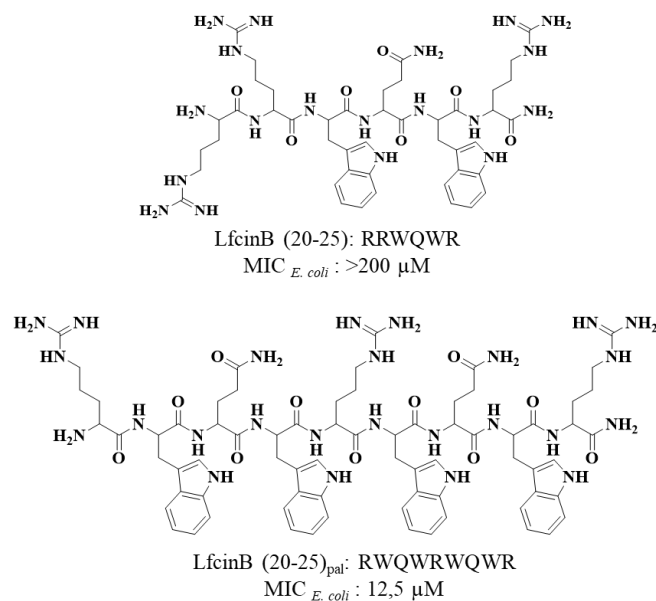


Figura 5. Motivo mínimo de la LfcinB (20-25) y palíndromo, LfcinB (21-25)_{pal}, estructuras y valores de MIC contra *E. coli* ATCC 25922 [33].

1.2.5 Quimeras que entre PAMs y secuencias capaces de internalizar la membrana

Para el diseño de quimeras, se ha propuesto la unión de un PAM a una secuencia con capacidad de internalizarse (CPPs) [11]. Los CPPs, presentan una gran diversidad de secuencias y estructuras, con capacidad de atravesar la membrana citoplasmática alcanzando el interior de la célula, otorgándole a estas estructuras varias ventajas con respecto a otros transportadores [40]–[43]. Se ha reportado la síntesis de quimeras entre la LfcinB y Lactoferricina Humana (LfcinH), la quimera LfcinB₁₇₋₂₅/H₂₇₋₄₂ presentó un MIC contra *E.coli* ATCC 11775 de 32 μ M en comparación a la LfcinH (18–42) que presentó un MIC >128 μ M, indicando un incremento considerable de su actividad antibacteriana (Ver Figura 6) [7]. Actualmente se trabaja en la síntesis de quimeras entre PAMs y CPPs de diversos orígenes con la finalidad de compaginar propiedades únicas de cada secuencia peptídica [11].

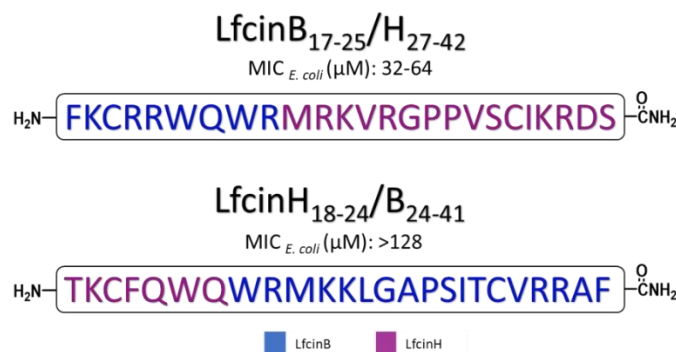


Figura 6. Quimeras peptídicas LfcinB/LfcinH con sus correspondientes valores de MIC contra *E. coli* ATCC 11775 [7].

1.2.6 Sustitución de Arginina (Arg) por Lisina (Lys) y cambio de la longitud de residuos catiónicos

Aminoácidos básicos como Arginina (Arg) y Lisina (Lys) han presentado un rol importante en las interacciones de las cadenas peptídicas con los lípidos de membrana [44]. Se ha reportado que la sustitución de residuos de Arg por residuos de Lys pueden llegar a disminuir el índice hemolítico de los PAMs conservando su actividad antibacteriana contra

cepas Gram negativas como Gram positivas [45], esto aumenta el índice terapéutico de estas moléculas. La sustitución de Arg por Lys (Arg→Lys) presenta una ventaja en el proceso de síntesis, ya que se ha reportado que residuos de Arg para algunas secuencias requieren mayores ciclos de acople que son reflejados como un aumento en el consumo de reactivos de síntesis [46]. Arias et. al [47] reporta propiedades estructurales de secuencias ricas en Trp, estos residuos fueron sustituidos por residuos básicos (Arg o Lys), demostraron que estas modificaciones reducen la degradación por proteasas, como tripsina, lo cual potencia la posibilidad de implementar este tipo de péptidos para uso terapéutico [47]. La sustitución entre residuos básicos, Arg→Lys, se ha implementado sobre secuencias derivadas de LfcinB, la secuencia LFB-RW: RRWWWRWRRW y su homólogo LFB-KW: KKWWWKWKKW fueron probados contra *E. coli* ATCC 25922 obteniendo valores de MIC de 8 y 7 μM respectivamente. Como se evidencia los valores son cercanos entre sí, la importancia sobre estas secuencias radica desde el punto de vista sintético, como se ha mencionado con anterioridad la incorporación sucesiva de residuos de Arg ha presentado un mayor requerimiento de ciclos de acople y los costos para la obtención de péptidos ricos en Arg son mayores que en comparación a secuencias ricas en Lys [46], [48].

2.Pregunta de investigación

¿Podría aumentarse la actividad antibacteriana de la LfcinB (20-25): RRWQWR y la BFII (32-35): RLLR mediante la formación de quimeras que contengan los dos motivos?

3.Hipótesis

La actividad antibacteriana de una quimera peptídica, que contenga los motivos mínimos de actividad de la LfcinB y la BFII, será mayor a la presentada por las secuencias individuales.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana de quimeras peptídicas sintéticas que contengan las secuencias LfcinB (20-25): RRWQWR y BFII (32-35): RLLR.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener péptidos quiméricos que contengan secuencias derivadas de LfcinB (20-25) y BFII (32-35) utilizando la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS-Fmoc/*t*Bu).
- Evaluar la viabilidad de síntesis de una quimera peptídica usando química click, específicamente la reacción de cicloadición entre los grupos azida y alquino.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los péptidos quiméricos mediante ensayos *in vitro* utilizando las cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*.
- Evaluar la actividad bactericida y/o bacteriostática del péptido que presente mayor actividad antibacteriana, en al menos una cepa.

5. Metodología

5.1 Diseño experimental

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos en la presente investigación se contempló el diseño experimental que se describe en la Figura 7.

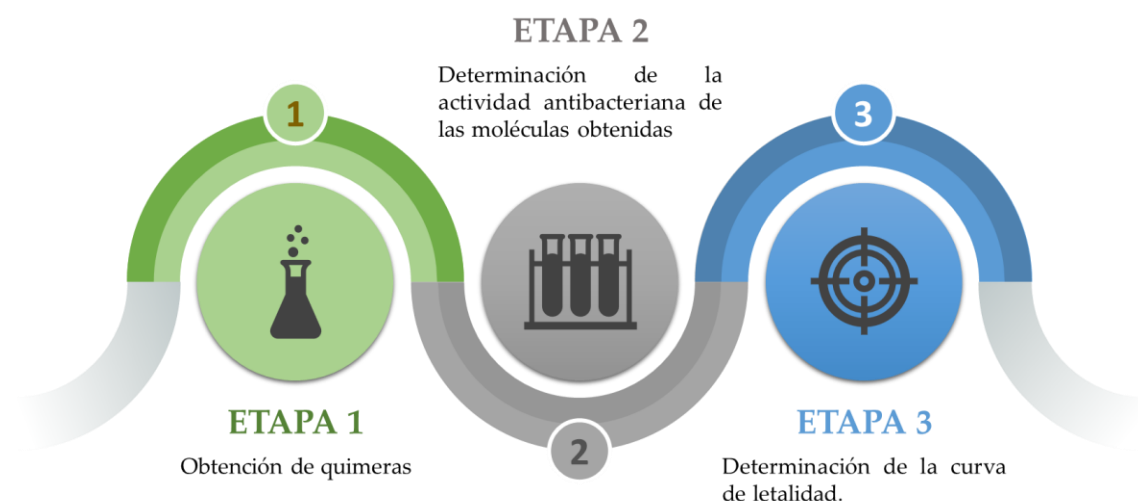


Figura 7. Etapas involucradas en el diseño experimental.

Etapa 1. Obtención de quimeras. Se diseñaron péptidos que contenían los motivos mínimos de actividad de la LfcinB y BFII, los cuales fueron sintetizados, purificados y caracterizados.

Dentro de esta etapa se desarrollaron tres actividades:

- (i) Obtención de una quimera por química click (CuAAC).
- (ii) Obtención de quimeras mediante SPPS-Fmoc/*t*Bu.
- (iii) Obtención de los péptidos control, RRWQWR, RLLR y RLLRLLR.

Etapa 2. Determinación de la actividad antibacteriana (MIC y MBC) de las moléculas obtenidas. Esta actividad fue evaluada para los péptidos que presentaron una pureza $\geq 80\%$. Se emplearon las cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922 y ATCC 11775) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

Etapa 3. Determinación de la curva de letalidad. Para la quimera que presentó mayor actividad antibacteriana se determinó su poder bactericida y/o bacteriostático en *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922 y ATCC 11775).

A continuación, se describen los métodos empleados en cada una de las etapas.

5.2 Materiales

Los reactivos, resina Rink amida, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-6-aminohexanoico, Fmoc-Cys(Trt)-OH, ácido (S)-2-(Fmoc-amino)-4-pentinoico, ácido (S)-2-(Fmoc-amino)-6-azidohexanoico, N,N-diciclohexilcarbodiimida, 1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol fueron adquiridos de AAPPTec (Louisville, KY, USA). Los reactivos acetonitrilo, ácido trifluoroacético, diclorometano, diisopropiletilamina, N,N-dimetilformamida, etanoditiol, isopropanol, metanol y triisopropilsilano fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Germany). Las columnas SPE Supelclean™ LC-18 fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los medios Trypticase Soy Agar (TSA), Mueller Hinton Agar (MHA), y Plate Count Agar (PCA) fueron adquiridos de Scharlau. El medio Mueller Hinton Broth fue adquirido de Merck. Las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922 y ATCC 11775) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) fueron adquiridas de la ATCC. Todos los reactivos fueron empleados directamente sin purificaciones previas.

5.3 Obtención de los péptidos quiméricos y los péptidos control

Para el desarrollo de esta investigación se sintetizaron, purificaron y caracterizaron quince péptidos. Diez secuencias corresponden a péptidos quiméricos derivados de la LfcinB (20-25) y BFII (32-35): (i) una quimera se sintetizó por química click, a partir de dos secuencias precursoras (P1 y P2). Y (ii) nueve quimeras se obtuvieron por síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), mediante la estrategia Fmoc/*t*Bu. Adicionalmente, se sintetizaron péptidos control, correspondientes a los motivos mínimos tanto para la LfcinB (residuos 20-25) como para la BFII (residuos 32-35), y el palíndromo de BFII (32-35)_{pal}. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de las quimeras, de los péptidos precursores y de los controles, junto con sus códigos

Tabla 1. Péptidos quiméricos derivados de la LfcinB (20-25) y BFII (32-35) que fueron sintetizados para este estudio.

Familia	Secuencia	Código
AAC	(RRWQWR)-Pra-AAC-K-(RLLR)	QAAC
Precursores AAC	Pra-RRWQWR	P1
	K(N ₃)-RLLR	P2
Quimeras QA LfcinB/BFII	RRWQWRLLR	QA1
	RRWQWR- <i>Ahx</i> -RLLR	QA2
	RRWQWR- <i>Ahx</i> -RLLRLLR	QA3
Quimeras QB BFII/LfcinB	RLLRRRWQWR	QB1
	RLLR- <i>Ahx</i> -RRWQWR	QB2
	RLLRLLR- <i>Ahx</i> -RRWQWR	QB3
Quimeras QC Sustitución R→K	RRWQWR- <i>Ahx</i> -KLLKLLK	QC1
	KKWQWK- <i>Ahx</i> -RLLRLLR	QC2
	KKWQWK- <i>Ahx</i> -KLLKLLK	QC3
Controles	RRWQWR	LfcinB (20-25)
	RLLR	BFII (32-35)
	RLLRLLR	BFII (32-35) _{pal}

5.3.1 Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)

Los péptidos se sintetizaron utilizando la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida por la estrategia Fmoc/*t*Bu [46], [49], [50]. Se utilizó la resina Rink Amida (0,46 meq/g) como soporte sólido, esta resina fue acondicionada con DMF por 12 h. La Figura 8 muestra, a manera de ejemplo, el esquema de la SPPS del péptido LfcinB (20-25).

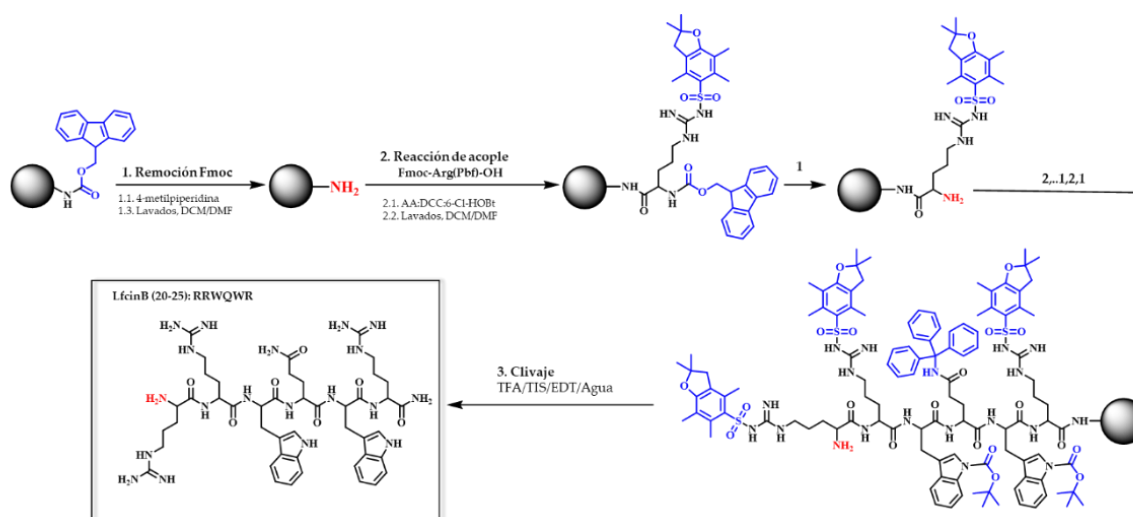


Figura 8. Esquema de la síntesis del péptido RRWQWR usando la estrategia SPPS-Fmoc/*t*Bu.

Brevemente, la SPPS-Fmoc/*t*Bu involucró tres pasos (Ver Figura 8): Paso 1. Remoción del grupo Fmoc, esta reacción se realizó por tratamiento con 4-metilpiperidina al 2,5% en DMF, durante 10 min a temperatura ambiente (TA) ($\times 2$) [49]. Luego, la resina fue lavada con DMF ($\times 5$), IPA ($\times 3$) y DCM ($\times 5$), a una fracción de la resina seca se le realizó el test de Kaiser para comprobar la presencia de grupos amino libres. Paso 2. Reacción de acople del Fmoc-aminoácido, para esto primero se activó el correspondiente Fmoc-aminoácido (0,21 mmol) mezclándolo con DCC/6-Cl-HOBt (0,20/0,21 mmol) en DMF, la reacción se agitó vigorosamente por 15 min a TA. Luego esta mezcla fue adicionada a la resina desprotegida y se dejó reaccionar, con agitación. La solución fue desechada y la resina lavada con DMF ($\times 3$) y DCM ($\times 3$), y la reacción monitoreada mediante el test de Kaiser; si esta era positivo, se realizó nuevamente el proceso de acople, cambiando el activador (a TBTU), o los disolventes hasta que el test fue negativo. Paso 3. Clivaje, esta reacción involucra la desprotección de las cadenas laterales y desanclaje del péptido de la resina, la cual se llevó

a cabo tratando la resina-péptido seca con una solución que contenía TFA/agua/TIS/EDT (9,5/2,5/2,5/2,5%, v/v), la reacción se mantuvo en agitación por 4 h a TA. Luego, se separó la resina y la solución fue tratada con éter etílico frío para precipitar el péptido, el cual fue lavado con este solvente frío ($\times 5$) y el sólido se secó a TA. Finalmente, los productos crudos obtenidos fueron analizados por RP-HPLC [8], [33], [51].

5.3.2 Síntesis de la quimera QAAC: (RRWQWR)-Pra-AAC-K-(RLLR), mediante química click (CuAAC)

Para obtener la quimera QAAC se sintetizaron mediante SPPS los dos péptidos precursores requeridos, los cuales fueron modificados en su extremo N-terminal; al precursor P1 se le introdujo el ácido (S)-2-(Fmoc-amino)-4-pentinoico (P1: NH₂-Pra-RRWQWR-CONH₂) y al precursor P2 el ácido (S)-2-(Fmoc-amino)-6-azidohexanoico (P2: NH₂-K(εN₃)-RLLR-CONH₂). Para la síntesis de la quimera se adaptaron protocolos de literatura [52]–[54], brevemente, los péptidos crudos P1 y P2 (0,012 mmol de cada uno) fueron mezclados y disueltos en H₂O/MeOH (1:1, v/v), luego se adicionó como catalizador sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O) (0,031 mmol), y ácido ascórbico (0,035 mmol) como agente reductor, la mezcla se tuvo con agitación constante, a 80 °C durante 10 min. El progreso de la reacción fue controlado mediante RP-HPLC. Finalmente, la quimera QAAC fue purificada por RP-SPE y caracterizada por cromatografía líquida (RP-HPLC) y espectrometría de masas (MALDI-TOF).

5.4 Purificación y caracterización de las moléculas sintéticas

5.4.1 Caracterización mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC)

10 µL de una solución de péptido crudo o purificado (1,0 mg/mL) fueron inyectados en una columna monolítica, Chromolith® C18 (50 × 4,6 mm), utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 (Omaha, NE, EE.UU) con detector UV/Vis. Como fase móvil se emplearon TFA al 0,05 % en agua (Solvente A) y TFA al 0,05 % en ACN (Solvente B), la

elución se realizó mediante el gradiente: 5/5/50/100/100/5/5 %B en 0/1/9/9,5/11/11,5/15 min. El flujo fue de 2,0 mL/min y la longitud de onda para la detección fue de 210 nm [55].

5.4.2 Purificación mediante extracción en fase sólida (SPE)

Los péptidos se purificaron mediante extracción en fase sólida (SPE) en columnas de dos casas comerciales (Silicycle® SiliaPrep™ C18 17%, 5 g, 45 μm, 60 Å y Supelclean™ SPE, 17 %C, 5 g, 45 μm, 60 Å). Las columnas de SPE fueron activadas antes de su uso con 30 mL de metanol, 30 mL de Solvente B y se equilibraron con 30 mL Solvente A. Aproximadamente 150 mg de péptido crudo fueron disueltos en Solvente A (1 a 2 mL), y luego sembrados en la columna de SPE activada. La elución del péptido se realizó por gradiente de Solvente B, para cada péptido se diseñó un programa de elución, para esto primero se calculó el porcentaje de Solvente B de elución del péptido (%B_e), utilizando la Ecuación (1):

$$\%B_e = t'_R \times \left(\frac{\Delta B}{t_G} \right) + \%B_i \quad (1)$$

Donde, ΔB es el cambio del %B en el análisis por HPLC (45% B), t_G corresponde al tiempo de gradiente (8 min) y t'_R es el tiempo de retención corregido, el cual se calculó restando al tiempo de retención de la especie decesada (t_R) el tiempo de retardo (t: 1,0 min), tiempo de mora del equipo (t_D: 0,90 min) y el tiempo muerto de la columna (t₀: 0,36 min).

Empleando %B_e se diseñó para cada péptido el programa de elución de la columna de SPE, cada fracción tuvo un volumen final de 12 mL, estas fueron colectadas y analizadas mediante RP-HPLC. Las fracciones más puras fueron reunidas y liofilizadas, el producto final fue analizado mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (MicroFlex-MALDI-TOF Bruker).

5.4.3 Análisis de péptidos por espectrometría de masas

La relación masa/carga (*m/z*) de los péptidos puros se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight)

utilizando un equipo Brunner Daltonics Microflex. El péptido (1,0 mg/mL) fue mezclado con ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (solución saturada) en una relación 18:2 v/v. La mezcla fue aplicada sobre una placa porta muestras y secada para su lectura. La potencia del laser estuvo entre 2700 y 3000 V y se hicieron de 100 a 250 disparos.

5.5 Ensayos biológicos

5.5.1 Cepas bacterianas – activación y almacenamiento

Las cepas bacterianas fueron activadas de acuerdo con el protocolo establecido por el proveedor (Microbiologics) [56]. Se realizaron 3 pases seriados hasta que se obtuvo una tasa de crecimiento óptima y como criterio de pureza del crecimiento se les realizó tinción de Gram.

Los cultivos se conservaron hasta por 60 días a 4 °C, cuando se cumplía este término y/o se observaban cambios o contaminación en las cajas se tomaba un inóculo nuevo del cultivo stock, este último se cultivaba realizando pases seriados hasta que se tuviera una tasa de crecimiento óptima.

5.5.2 Curva de calibración (UFC/mL vs. ABS)

Se determinó la relación entre las unidades formadoras de colonia (UFC) y la absorbancia, mediante la elaboración de una curva de calibración, se llevaron a cabo diluciones seriadas en base 2 del inóculo inicial en Caldo Mueller Hinton (CMH), en una placa de 96 pozos, posteriormente se realizaron diluciones seriadas en base 10, luego se tomaron lecturas de absorbancia en un lector de microplacas, HumaReader HS a una longitud de onda de 620 nm. Se tomaron 200 μ L de las microdiluciones predeterminadas para el conteo, así como de medio con Agua Peptonada (control negativo), estas se sembraron en profundidad en Agar Standard Plate Count (SPC), se incubaron a 37 °C durante 24 h en atmósfera aerobia. Finalmente, después de este tiempo se realizó el respectivo conteo de las UFC [57].

5.5.3 Determinación Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC)

La concentración mínima inhibitoria, por sus siglas en inglés MIC (Minimal Inhibitory Concentration), se determinó mediante ensayo de microdilución en caldo [58]. En resumen, Se tomaron 90 μL de caldo MH, posteriormente 90 μL de péptido (concentración inicial 440 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en una placa de 96 pocillos, se realizaron diluciones seriadas (200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Finalmente, se adicionaron 10 μL de inóculo (inóculo final 5×10^5 UFC/mL) a cada pocillo. El volumen final en cada uno de los pocillos fue de 100 μL . Luego se incubaron durante 24 h a 37 °C; y se realizó la lectura de absorbancia a 620 nm usando un lector de ELISA HumaReader HS [59].

Para la determinación de la concentración mínima bactericida, por sus siglas en inglés MBC (Minimal Bactericidal Concentration), se tomaron alícuotas de cada pocillo y se sembraron sobre una placa de Agar Mueller Hinton (MHA). Transcurridas 24 h de incubación a 37 °C, se determinaron los MBC correspondientes. Cada una de estas pruebas se realizó por duplicado (n=2).

5.5.4 Actividad Hemolítica

Una muestra de sangre heparinizada se centrifugó a 500 rpm durante 15 min y los eritrocitos fueron separados y lavados tres veces (3 \times) con solución salina (NaCl) al 0,9%. 100 μL del péptido (en concentraciones de 200 a 6,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se mezclaron con 100 μL de solución de eritrocitos (2% de hematocrito) y se incubaron a 37 °C por 2 h. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min. Se realizaron lecturas de absorbancia del sobrenadante a 540 nm. Como control negativo se utilizó una muestra de eritrocitos tratada con solución salina 0,9%, como control positivo eritrocitos tratados con agua destilada. El porcentaje de hemólisis se calculó utilizando la ecuación (2) según lo reportado en [38].

$$\%Hemolisis: \frac{Abs \text{ tratamiento} - Abs \text{ NaCl}}{Abs \text{ Agua destilada} - Abs \text{ NaCl}} \times 100 \quad (2)$$

5.5.5 Curvas de letalidad-muerte

Las curvas de letalidad se realizaron según el protocolo reportado por Vargas et. al [60], [61]. En una caja multipozos, se adicionaron 270 μL de solución de péptido, que fue preparado en Caldo Mueller Hinton (CMH), a diferentes concentraciones ($0,5 \times \text{MIC}$; MIC y $2 \times \text{MIC}$). Posteriormente se agregaron 30 μL del inóculo (concentración final 5×10^5 UFC/mL). Las muestras fueron incubadas durante 48 h y la lectura de la absorbancia se realizó cada hora en un equipo Bioscreen C (600 nm). Como control negativo CMH y control de crecimiento cepa (inoculo) más CMH.

5.5.6 Ensayo de sinergia. Péptidos LfcinB (20-25) y BFII (32-35)_{Pal}

El efecto sinérgico entre los péptidos RRWQWR y RLLRLLR se realizó de acuerdo con el método de tablero de ajedrez [61]. Brevemente, 25 μL de cada péptido fueron mezclados, para tener concentraciones finales: 0; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1 y 2 veces la MIC (Anexo B6), junto con el inóculo (5×10^5 UFC/mL), luego se incubó a 37°C durante 24 h. Para determinar las nuevas MIC, derivadas de este ensayo se utilizó la ecuación 3.

$$\frac{(1)}{MIC_{(1)}} + \frac{(2)}{MIC_{(2)}} = FIC_{(1)} + FIC_{(2)} = \text{Índice FIC} \quad (3)$$

Donde, 1 y 2 corresponde a la MIC de los péptidos RRWQWR y RLLRLLR, respectivamente, determinadas en la mezcla. $MIC_{(1)}$ y $MIC_{(2)}$ son las MICs individuales. FIC es la Concentración Inhibitoria Fraccionada, la cual se interpretó según lo reportado por Saiman et. al: índice $FIC \leq 0,5$: sinergia; entre 0,5 y 4 : indiferencia; > 4 : antagonismo [62].

6. Resultados y Discusión

Para el desarrollo de este proyecto se obtuvieron diez péptidos quiméricos derivados de los fragmentos 20-25 de la LfcinB y 32-35 de la BFII (Tabla 1), dos péptidos precursores y tres secuencias control. Las moléculas purificadas y caracterizadas, por cromatografía líquida (RP-HPLC) y espectrometría de masas MALDI-TOF, fueron empleadas para los ensayos de actividad biológica (MIC, MBC, hemólisis y curvas de letalidad).

Puntualmente, se sintetizaron, purificaron y caracterizaron las siguientes moléculas: (i) una quimera (QAAC) generada mediante ciclación intramolecular con un puente de triazol (química click); para obtener esta molécula fue necesaria la síntesis de dos péptidos precursores, P1 y P2, que contenían en el extremo N-terminal un residuo del ácido (S)-2-(Fmoc-amino)-4-pentinoico y ácido (S)-2-(Fmoc-amino)-6-azidohexanoico, respectivamente. (ii) Tres quimeras (QA: LfcinB/BFII), que contenían el motivo mínimo de la LfcinB (RRWQWR) en el extremo N-terminal y el motivo mínimo o palindrómico de la BFII (RLLR o RLLRLLR) en el extremo C-terminal. Estos motivos fueron unidos directamente (QA1) o se introdujo un espaciador (residuo del ácido 6-aminohexanoico, *Ahx*), entre las dos secuencias (QA2 y QA3). (iii) Tres quimeras (QB: BFII/LfcinB), en las que el orden de los motivos mínimos fue cambiado, es decir la secuencia RRWQWR se puso en el extremo C-terminal, (QB1-QB3). (iv) Tres quimeras, análogas a QA3, en las que se cambió parcial o totalmente los residuos de Arg por Lys, secuencias QC1-QC3. (v) Finalmente, tres péptidos fueron usados como controles: RRWQWR, RLLR y RLLRLLR.

A continuación, se discutirán los resultados obtenidos de (i) la síntesis de cada una de las secuencias involucradas en esta investigación junto con su caracterización, y (ii) la

evaluación de la actividad antibacteriana de las moléculas obtenidas frente a diferentes cepas tanto Gram negativas como Gram positivas.

6.1 Síntesis, purificación y caracterización de las quimeras y controles (*Etapa 1*)

6.1.1 Péptido quimérico QAAC obtenido mediante química click

La química click es una técnica eficiente y moderna implementada en la síntesis de moléculas complejas. El concepto de química click fue incorporado por Sharpless et. al. [63], para describir el ensamblaje (click) de pequeños bloques para formar estructuras más complejas. La reacción de Huisgen de cicloadición entre un azida y un alquino que procede en presencia de un catalizador de cobre (I), bajo condiciones suaves (Figura 9); denominada CuAAC (por sus siglas en inglés, Copper(I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition) es conocida como una de las principales reacciones de la química click, ya que presenta características como estereoespecificidad, facilidad de purificación del producto, uso de reactivos y catalizadores de bajo costo, alta eficiencia y condiciones suaves de reacción, es posible utilizar solventes polares y ambientalmente amigables, como el agua [64]. En la síntesis de péptidos los grupos azida y alquino son incorporados, mediante el uso de aminoácidos modificados que presentan en su cadena lateral estos grupos [12]. Para la obtención de la quimera QAAC se seleccionaron los aminoácidos (modificados en sus cadenas laterales): (i) (S)-2-(Fmoc-amino)-6-azidohexanoico (Fmoc-Lys(N₃)-OH), que contiene un grupo azida y (ii) el ácido (S)-2-(Fmoc-amino)-4-pentinoico que contiene un grupo alquino. Estos aminoácidos fueron incorporados en el extremo N-terminal de los péptidos RLLR y RRWQWR, respectivamente (Figura 9).

En la Figura 9 se muestra el proceso sintético mediante química click para la obtención de la quimera QAAC, se observa el mecanismo de reacción catalizado por cobre (I). El ciclo catalítico inicia mediante la formación de acetiluro de cobre entre la especie que contiene el grupo alquino y el catalizador de Cu (I), que lleva a la posterior reacción con el grupo

azida con la consecuente formación de un intermediario cíclico, triazol-cobre, de seis miembros. Esta especie intermediaria sufre un re-arreglo para liberar el producto y el catalizador [65].

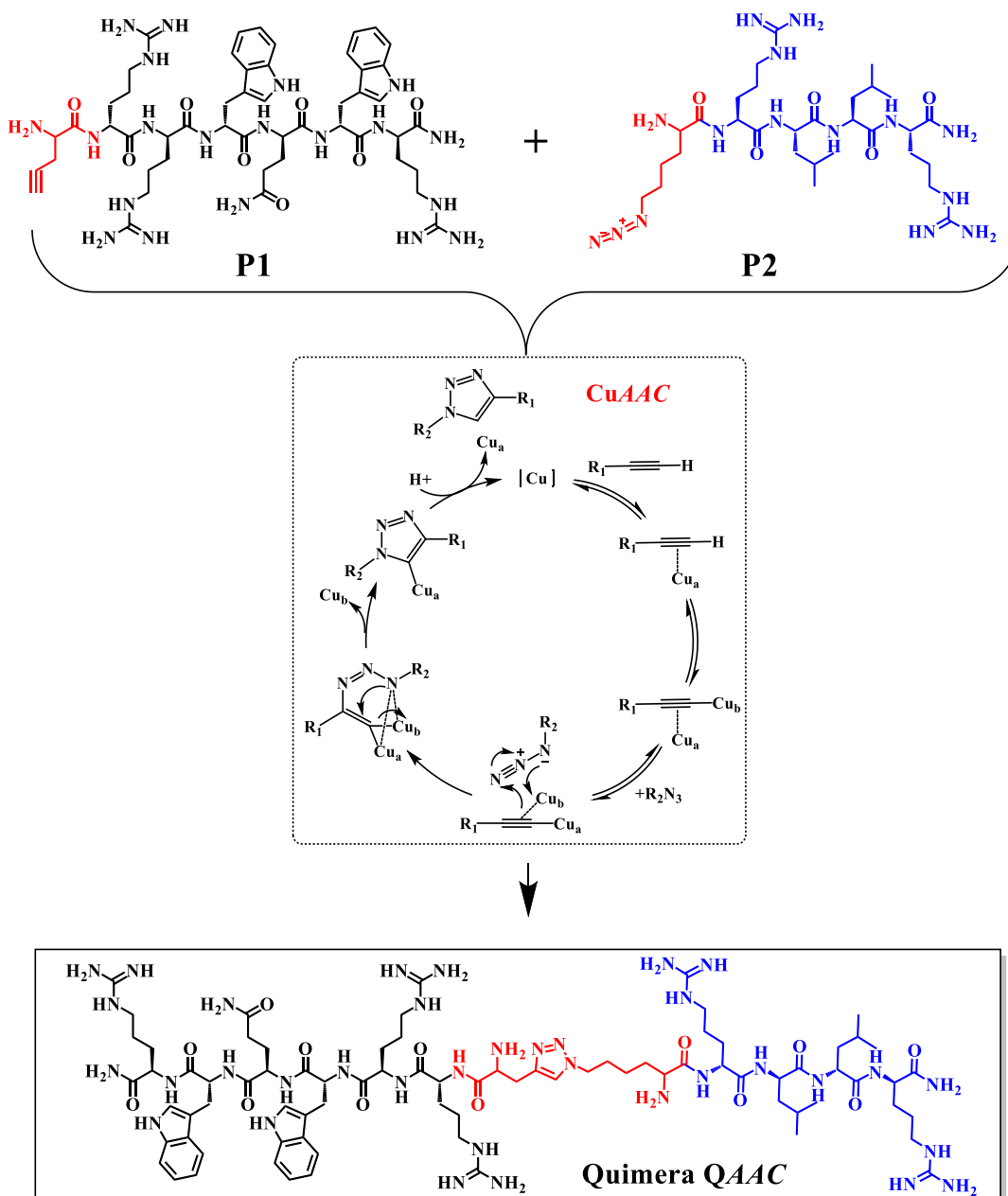


Figura 9. Esquema general de obtención de la quimera QAAC mediante química click. Cicloadición 1,3 dipolar de azidas y alquinos [65].

Para la síntesis de la quimera QAAC, primero se procedió a la obtención de los péptidos precursores P1 y P2 mediante SPPS; los aminoácidos Fmoc-Pra-OH y Fmoc-Lys(N₃)-OH

fueron fácilmente incorporados en el extremo N-terminal de las secuencias correspondientes a los motivos mínimos de actividad de la LfcinB y BFII, estos residuos solo requirieron un único ciclo de acople (Anexo A – reportes de síntesis 14-15). Los productos obtenidos presentaron porcentajes de pureza cromatográfica superiores al 80% y la señal en la relación m/z del espectro de masas correspondientes a las especies $[M+H]^+$ esperadas.

Para la reacción de *CuAAC* primero se estandarizaron los diferentes parámetros involucrados, como son, (i) cantidades de los precursores y catalizadores, (ii) solventes y proporciones de estos, (iii) tiempo de reacción y (iv) temperatura. Estos parámetros se ajustaron inicialmente usando como moléculas modelo los Fmoc-Aminoácidos modificados Fmoc-Pra-OH y Fmoc-Lys(N₃)-OH. Se ha reportado que solventes polares favorecen la generación del anillo de triazol entre la especie azida y alquino [52]–[54], [66], al tratar de llevar a cabo esta reacción en medios polares apróticos como el DMF no se ve la generación del anillo [32], para fines prácticos se utilizó como solvente H₂O:MeOH en una proporción 1:1 v/v, y la mínima cantidad de volumen necesario para disolver los precursores y los catalizadores [67]. La especie azida y alquino se emplearon en relación equimolar (0,012 mmol), el catalizador se puso en exceso según lo reportado (0,031 mmol) [52]. La temperatura se ajustó a 80 °C según lo recomendado por Arnusch et. al. [32], el tiempo de reacción fue de 10 min y el producto de reacción se analizó por RP-HPLC (Figura 10).

En la Figura 10 se pueden observar los perfiles cromatográficos obtenidos para los aminoácidos de partida y el producto obtenido. Los aminoácidos Fmoc-Pra-OH y Fmoc-Lys(N₃)-OH utilizados presentan tiempos de retención altos característicos de especies hidrofóbicas, 6,1 min y 6,9 min, respectivamente. En el perfil cromatográfico de la mezcla de reacción se observa la desaparición de la especie con t_R de 6,1 min y la aparición de una nueva especie en 7,3 min correspondiente al producto de cicloadición (Figura 10.c). Este producto fue purificado mediante RP-SPE y caracterizado mediante espectrometría de

masas MALDI-TOF en donde se obtuvo una relación m/z de 732,33 que corresponde a la especie $[M+H]^+$ (Figura 10.c).

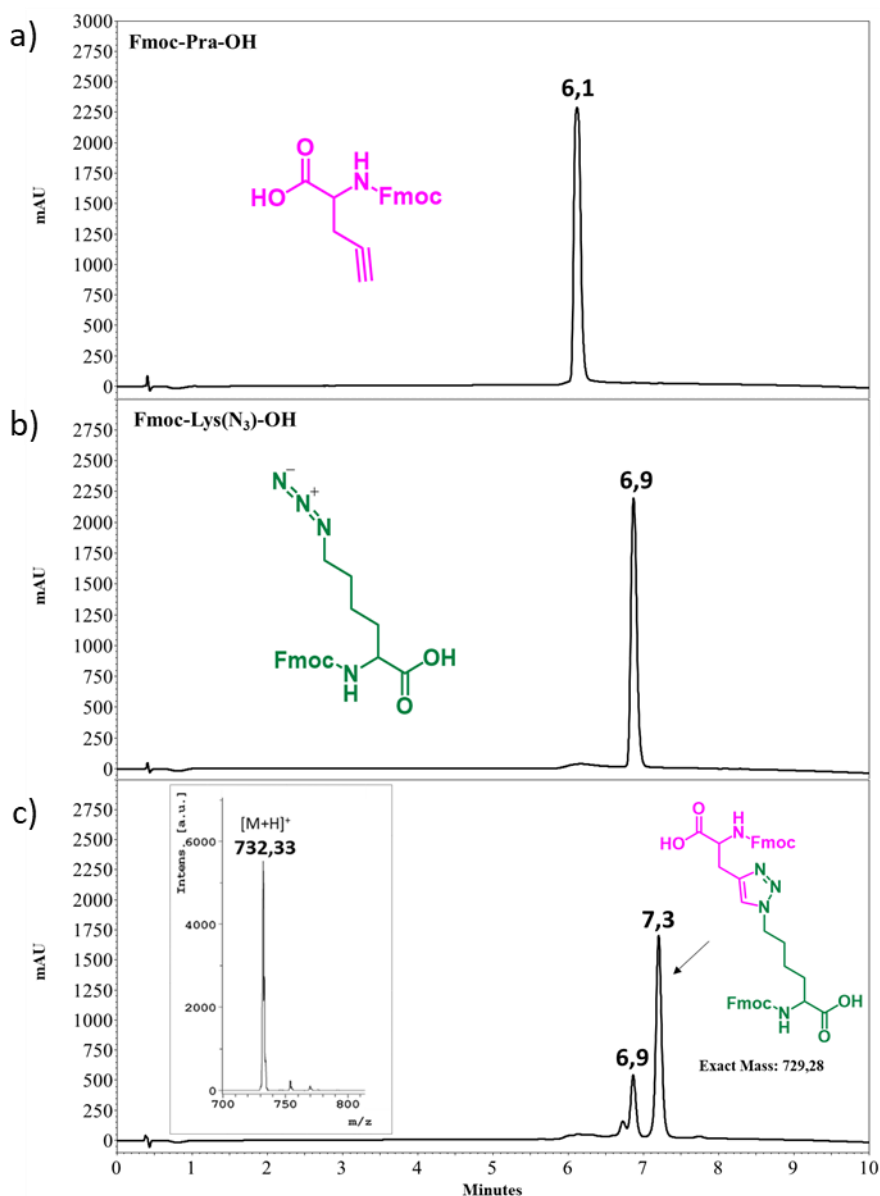


Figura 10. Seguimiento de la reacción de cicloadición catalizada por Cu (I) de los Fmoc-Aminoácidos. Perfil cromatográfico del a) Fmoc-Pra-OH, b) Fmoc-Lys(N₃)-OH y c) producto de reacción, en el recuadro se presenta el espectro de masas de la especie con $t_R = 7,3$ min purificada.

Una vez establecidas las condiciones para realizar la reacción *CuAAC*, se emplearon los parámetros experimentales estandarizados, específicamente se preparó una solución en H₂O:MeOH (1:1 v/v) que contenía los precursores crudos, P1 (Pra-RRWQWR) y P2 (K(N₃)-

RLLR), en una proporción equimolar (0,012 mmol) y el catalizador de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,031 mmol (Figura 11.a). Para iniciar la reacción se adicionó ácido ascórbico (0,035 mmol) y se dejó por 10 min a 80°C con agitación constante. Transcurrido este tiempo, la reacción fue monitoreada mediante RP-HPLC (Figura 11.b).

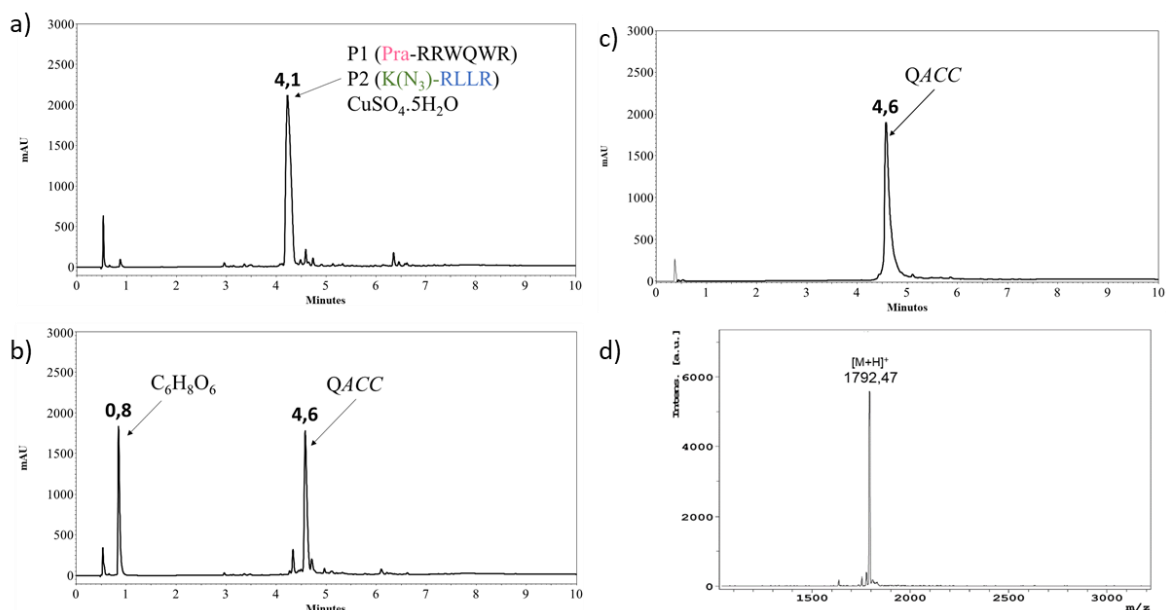


Figura 11. Seguimiento de la reacción de cicloadición entre Pra-RRWQWR y Lys(N3)-RLLR para la formación de la quimera QAAC. Perfil cromatográfico a) antes de la adición del ácido ascórbico, b) 10 min después de la adición del ácido ascórbico. Análisis por c) RP-HPLC y d) espectrometría de masas MALDI-TOF de la quimera QAAC purificada.

En la Figura 11.a se observa una señal a t_R 4,1 min correspondiente a los precursores P1 y P2 que coeluyen (Tabla 3), bajo las condiciones cromatográficas establecidas. Luego de adicionar el ácido ascórbico, y mantener la reacción por 10 min a 80°C , se analizó la mezcla nuevamente por RP-HPLC, y el perfil cromatográfico presentó una disminución de las áreas relativas de la señal de los precursores y la aparición de un nuevo pico en 4,6 min correspondiente al producto de reacción QAAC (Figura 11.b). La quimera fue purificada por RP-SPE y caracterizada por RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 11.c.d). El rendimiento global de la reacción fue del 15,5% (3,1 mg de producto puro), la pureza cromatográfica del producto fue del 80,7%, y la señal en el espectro de masas ($m/z=1792,5$) corresponde a la especie $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($M_{\text{Teórico}}=1790,1$ u.m.a). El reporte de síntesis se puede ver en el Anexo A – reporte de síntesis 16.

6.1.2 Péptidos quiméricos lineales

Para el presente estudio se diseñaron tres familias de quimeras (QA, QB y QC Tabla 1), para la quimera QA1 el diseño consistió en unir los motivos mínimos de actividad antibacteriana, de la LfcinB (20-25) y BFII (32-35), en un solo péptido es decir la secuencia RRWQWRRLLR, como se puede observar el motivo de la LfcinB (subrayado) se encuentra en el extremo N-terminal. Se ha reportado que el uso de moléculas no naturales como β -Ala y el ácido 6-aminohexanoico (*Ahx*) tienen un alto impacto sobre la actividad antibacteriana de péptidos derivados de la LfcinB [6], teniendo en cuenta esto y con el fin de mantener los motivos mínimos independientes se decidió incorporar al diseño de la quimera QA1 una molécula espaciadora, el *Ahx*: RRWQWR-*Ahx*-RLLR (QA2). Finalmente, basados en reportes en donde se ha demostrado que la presentación de múltiples copias del motivo RLLR potencia la actividad antibacteriana de PAMs derivados de BFII [10], [18], se diseñó la quimera QA3: RRWQWR-*Ahx*-RLLRLLR. Para las quimeras de la familia QB, a partir de los diseños de la familia QA, se cambió de posición el motivo mínimo de la LfcinB (20-25) del extremo N-terminal al C-terminal, con el fin de evaluar el efecto de la posición de los motivos sobre la actividad. Así, surgen las secuencias QB1 (RLLRRRWQWR), QB2 (RLLR-*Ahx*-RRWQWR) y QB3 (RLLRLLR-*Ahx*-RRWQWR). Se ha reportado que la sustitución parcial o total de residuos de Arg por Lys, en secuencias de PAMs, reduce la actividad hemolítica de estas moléculas [17], [47], [45]. Adicionalmente este cambio disminuye los costos del proceso de obtención de los PAMs ya que es bien conocida la dificultad de incorporar en la SPPS la Fmoc-Arg(Pbf)-OH [33]. A partir de la quimera QA3 se diseñaron tres secuencias (familia QC), que corresponden a la sustitución, (i) parcial de Arg por Lys: QC1 (KKWQWK-*Ahx*-RLLRLLR) y QC2 (RRWQWR-*Ahx*-KKWQWK). Y (ii) total de los residuos de Arg presentes en dos motivos mínimos de actividad de los péptidos plantilla; así surge QC3 (KKWQWK-*Ahx*-KLLKLLK).

6.1.2.1 Síntesis y caracterización de las quimeras lineales

Las quimeras de las familias QA, QB y QC, fueron obtenidos mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) usando la estrategia Fmoc/*t*Bu (Figura 8). Con base a los resultados de síntesis (Ver Anexo A – reportes de síntesis 4-13), se evidencia que la metodología implementada fue adecuada para la obtención de las quimeras diseñadas. Específicamente, en este trabajo se empleó 4-metilpiperidina al 2,5% en DMF (v/v), cabe resaltar que esta concentración es diez veces menor a la comúnmente usada en los protocolos de SPPS [49]. Para la mayoría de los aminoácidos solo se requirió un ciclo de acople para su incorporación en la secuencia peptídica (ciclos asistidos con tratamiento en microondas). Los residuos de Arg en todos los casos requirieron entre 2 y 3 ciclos de acople, estos resultados concuerdan con reportes previos en donde secuencias ricas en Arg y Trp requirieron mayores tiempos de reacción y varios ciclos de acople [33], [46]. Los péptidos crudos fueron analizados mediante RP-HPLC usando el gradiente de elución descrito en el apartado de metodologías, el perfil cromatográfico obtenido permitió evidenciar para todos los casos una especie principal con porcentajes de área que oscilaban entre el 50% y 80%. A manera de ejemplo, se presenta el perfil cromatográfico correspondiente al producto crudo obtenido para la quimera QA1: RRWQWRLLR, el cual muestra una especie mayoritaria con tiempo de retención de 5,1 min y un porcentaje de pureza cromatográfica del 60% (Figura 12).

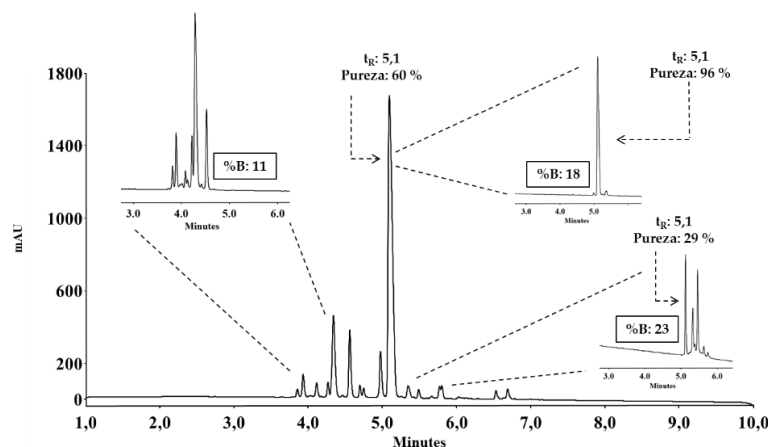


Figura 12. Perfil cromatográfico de la quimera QA1: RRWQWRLLR antes y después del proceso de purificación.

Los productos crudos se sometieron a una etapa de purificación, para esto se usaron columnas de extracción en fase sólida (C18-SPE) y para cada molécula se diseñó un programa de elución por gradiente del Solvente B, este diseño dependía de las características hidrofóbicas del péptido. Por ejemplo, para la quimera QA1 se calculó el %B_e que corresponde al 21 %B, y el gradiente de elución se presenta en la Tabla 2. Se puede observar que ese porcentaje es el punto central del programa usado. Las fracciones recolectadas fueron analizadas por RP-HPLC y se encontró que: (i) La fracción tres contiene especies correspondientes a subproductos hidrofílicos que se observan entre 4 y 5 minutos en el perfil crudo (Figura 12. % B: 11). (ii) La fracción seis (Figura 12. % B: 18) mostró un pico principal con un t_R de 5,1 min, que corresponde al péptido deseado con una pureza cromatográfica del 96%. Finalmente, (iii) la fracción once contiene el péptido con una pureza del 29% junto con especies más hidrofóbicas. Las fracciones 6 a la 8, que contienen el péptido con una pureza superior al 92%, se mezclaron y liofilizaron obteniendo 19,4 mg de producto purificado, con un rendimiento de purificación del 37%.

Tabla 2. Programa diseñado para la purificación de QA1 usando RP-SPE. Las fracciones 6 a la 12 corresponden a los porcentajes de solvente B donde se esperaba que eluyera el péptido. El volumen de cada fracción fue de 12 mL

Fracción N°	Solvente B		Pureza ^b (%)
	%	μL	
1	0	0	-
2	5	600	-
3	11	1320	-
4	16	1920	-
5	17	2040	66
6	18	2160	96
7	19	2280	94
8	20	2400	92
9 ^a	21	2520	88
10	22	2640	77
11	23	2760	23
12	24	2880	-
13	25	3000	-
14	50	6000	-
15	100	12000	-

Esta estrategia de purificación nos permitió, para todas las quimeras y péptidos control, obtener la especie de interés con purezas (determinadas por RP-HPLC) entre el 85-99% (Tabla 3, Anexo A - panel C). Los productos puros fueron caracterizados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, en donde se encontró, para todos los casos, una señal principal correspondiente a la relación m/z del ion $[M+H]^+$, donde M es la masa monoisotópica de la especie deseada (Tabla 3). En la Figura 13 se muestra, como ejemplo, el espectro de masas obtenido para la quimera QA1. Las diferencias de masa oscilan entre 1 y 3 unidades de masa atómica a excepción del péptido BFII (32-35): RLLR que presentó una diferencia de 7 unidades, esto debido a que la calibración del equipo es con patrones de masa superior a 1000 u.m.a. En el Anexo A - panel D se presentan los espectros de masas de todos los péptidos sintetizados.

Tabla 3. Resumen de la caracterización analítica de los péptidos quiméricos derivados de la LfcinB y BFII obtenidos.

Familia	Secuencia	Código Péptido	RP-HPLC t_R (min)	Pureza (%)	MASA	
					Teórica	m/z $[M+H]^+$
AAC	(RRWQWR)-Pra-AAC-K-(RLLR)	QAAC	4,6	80,7	1790,1	1792,5
Precursores AAC	Pra-RRWQWR	P1	4,1	96,5	1080,6	1080,7
	K(N ₃)-RLLR	P2	4,1	96,4	709,5	709,9
Quimeras QA LfcinB/BFII	RRWQWRLLLR	QA1	5,0	96,0	1523,9	1523,1
	RRWQWR-Ahx-RLLR	QA2	5,1	94,3	1637,0	1640,2
	RRWQWR-Ahx-RLLRLLLR	QA3	6,1	90,0	2175,4	2179,1
Quimeras QB BFII/LfcinB	RLLRRRWQWR	QB1	4,7	95,5	1523,9	1523,6
	RLLR-Ahx-RRWQWR	QB2	5,4	85,5	1637,0	1638,6
	RLLRLLLR-Ahx-RRWQWR	QB3	5,9	90,0	2175,4	2179,6
Quimeras QC Sustitución R→K	RRWQWR-Ahx-KLLKLLK	QC1	5,9	85,2	2063,3	2067,4
	KKWQWK-Ahx-RLLRLLLR	QC2	5,8	99,4	2091,3	2089,0
	KKWQWK-Ahx-KLLKLLK	QC3	5,7	86,6	1979,3	1983,7
Controles	RRWQWR	LfcinB (20-25)	2,8	92,5	985,5	988,2
	RLLR	BFII (32-35)	2,8	97,2	555,4	564,0
	RLLRLLLR	BFII (32-35) _{pal}	4,4	98,2	1093,8	1096,2

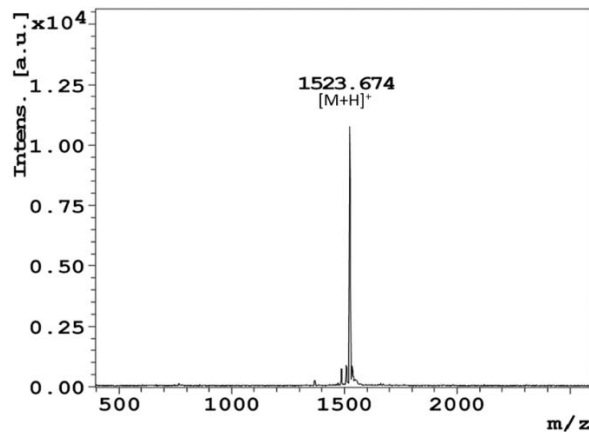
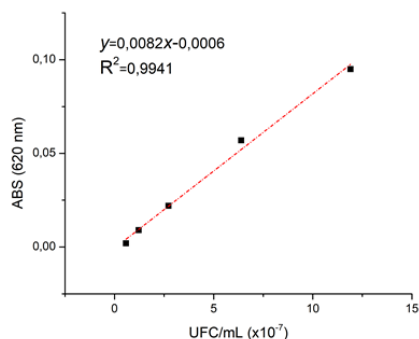


Figura 13. Espectro de masas obtenido para la quimera QA1: RRWQWRLLR, M: 1523,9 u.m.a

6.2 Evaluación de la actividad antibacteriana y actividad hemolítica (Etapa 2)

6.2.1 Curvas de calibración (UFC/mL vs. ABS)

En la determinación de la MIC es indispensable tener estandarizado la concentración de inóculo de la cepa. Para tal fin, se construyó una curva de calibración (UFC/mL vs absorbancia) a una longitud de onda de 620 nm para cada una de las cepas usadas en este estudio. Como se muestran en la Figura 14 los valores fueron ajustados mediante regresión lineal y se presenta la ecuación de la recta y su coeficiente de determinación; la comprobación de las curvas dio porcentajes de variación entre el 6-18 %.



E. coli ATCC 11775

Cepa	Ecuación	R ²
<i>E. coli</i> ATCC 25922	$y = 0,0101x + 0,0131$	0,9924
<i>E. coli</i> ATCC 11775	$y = 0,0082x - 0,0006$	0,9941
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	$y = 0,0064x - 0,0053$	0,9884
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	$y = 0,0042x + 0,0572$	0,9736
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	$y = 0,0071x + 0,0176$	0,9895

Figura 14. Curvas de calibración de las cepas bacterianas ATCC.

6.2.2 Actividad antibacteriana, Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC)

6.2.2.1 Quimera QAAC

La actividad antibacteriana de la quimera QAAC fue probada en dos cepas: *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, como se muestra en la Tabla 4. Esta quimera contiene los motivos mínimos de actividad de la LfcinB y BFII unidos mediante un anillo 1,2,3-triazol, generado por una cicloadición dipolar de azida y alquino catalizada con Cu(I). QAAC presentó una MIC de 93 μ M, para las dos cepas, es de resaltar que *E. coli* es una bacteria Gram negativa y *S.aureus* Gram positiva. Adicionalmente, al comparar este valor de MIC con los obtenidos para los péptidos control, LfcinB (20-25) y BFII (32-35), se evidencia que la quimera presenta mayor actividad que los motivos individuales. La quimera no presentó un porcentaje de hemólisis relevante a la concentración de la MIC, mientras que para la BFII (32-35) se encontró una alta actividad hemolítica (63%) a 200 μ M. La actividad antibacteriana y hemolítica de los péptidos precursores de QAAC también fueron evaluadas, es interesante observar que el precursor P1: Pra-RRWQWR presentó actividad contra las dos cepas evaluadas (MIC: 112 μ M y 56 μ M), y no fue hemolítico. Mientras que P2: Lys(N₃)-RLLR no presentó actividad antibacteriana ni hemolítica a las concentraciones ensayadas. La baja actividad hemolítica de P2 y QAAC sugiere que al bloquear el extremo N-terminal del péptido RLLR el efecto hemolítico disminuye drásticamente (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad antibacteriana y hemolítica de del péptido QAAC y controles

		Actividad antibacteriana (MIC, μ M)		%Hemólisis ^a
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
Controles	QAAC	93	93	3
	LfcinB (20-25)	203	>200	1
	BFII (32-35)	>200	>200	63
	P1	112	56	3
	P2	>200	>200	2

^a Determinado al rango de concentraciones de los valores de MIC

6.2.2.2 Quimeras de las familias QA, QB y QC.

Para las quimeras QA, QB y QC, se evaluó su actividad frente a cinco cepas, tres Gram negativas: *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* ATCC 11775 y dos Gram positivas: *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* ATCC 29212. Como punto de partida se evaluó la actividad antibacteriana de las secuencias seleccionadas como péptidos control (Tabla 5): para (i) el péptido LfcinB (20-25) se encontró actividad en las cepas de bacterias Gram negativas con valores de MIC de 200 μ M, que concuerda con lo reportado [51]; (ii) la secuencia BFII (32-35) no presentó actividad a las concentraciones evaluadas (hasta 200 μ M), y (iii) BFII (32-35)_{pal} solo exhibió actividad en las cepas Gram negativas (entre 91-183 μ M).

Tabla 5. Actividad antibacteriana y hemolítica de los péptidos quiméricos.

Código Péptido			Actividad antibacteriana (MIC, μ M)					%Hemólisis ^a
			<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 11775	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	
QA1	RRWQWRLLLR	16	66	131	66	131	5-2	
QA2	RRWQWR-Ahx-RLLR	15	31	31	122	>200	3-2	
QA3	RRWQWR-Ahx-RLLRLLLR	11	23	11	23	46	9-5	
QB1	RLLRRRWQWR	33	33	131	131	>200	4	
QB2	RLLR-Ahx-RRWQWR	15	15	61	122	>200	5-3	
QB3	RLLRLLLR-Ahx-RRWQWR	6	11	23	46	46	7-4	
QC1	RRWQWR-Ahx-KLLKLLK	12	24	48	48	97	9-2	
QC2	KKWQWK-Ahx-RLLRLLLR	24	24	24	48	48	13	
QC3	KKWQWK-Ahx-KLLKLLK	25	51	101	101	101	6-2	
Controles	LfcinB (20-25)	RRWQWR	200	200	200	>200	>200	1
	BFII (32-35)	RLLR	>200	>200	>200	>200	>200	63
	BFII (32-35) _{pal}	RLLRLLLR	91	183	183	>200	>200	2-1

^a Determinado al rango de concentraciones de los valores de MIC

En la Tabla 5 se resumen los valores de MIC obtenidos para cada una de las quimeras frente a las diferentes cepas bacterianas trabajadas, en esta tabla el tono gris se emplea para

resaltar valores de MIC bajos ($< 20 \mu\text{M}$) y el azul para valores de MIC entre $20 \mu\text{M}$ y $51 \mu\text{M}$. Como se puede observar, las quimeras de las familias QA, QB y QC presentaron actividad con valores de MIC en un rango de $6 \mu\text{M}$ a $131 \mu\text{M}$ contra las bacterias Gram negativas. Para las bacterias Gram positivas, todas las quimeras presentaron actividad frente *S. aureus* (MIC: $23 \mu\text{M}$ a $131 \mu\text{M}$), mientras que para *E. faecalis* seis (de nueve) de las quimeras presentaron actividad (MIC: $46 \mu\text{M}$ a $131 \mu\text{M}$). Los valores de MBC también fueron determinados y se encontraron en un rango entre $11 \mu\text{M}$ y $131 \mu\text{M}$ (Anexo B1). Estos resultados de MIC y MBC demuestran que las quimeras lineales, que contienen los motivos mínimos de actividad de la LfcinB y la BFII, presentan mayor actividad antibacteriana que las secuencias individuales, comprobando la hipótesis de este trabajo.

Las bacterias más sensibles a las quimeras fueron las *E. coli* con valores de MIC entre $6 \mu\text{M}$ y $66 \mu\text{M}$, siendo las quimeras más activas QA3 (MIC: $11\text{-}23 \mu\text{M}$) y QB3 (MIC: $6\text{-}11 \mu\text{M}$). Adicionalmente, estas quimeras también presentaron actividad sobre *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis* ($11\text{-}46 \mu\text{M}$), lo cual las hace promisorias como agentes antibacterianos de amplio espectro. Cabe resaltar, que QA3 y QB3 presentan en su estructura los motivos LfcinB (20-25): RRWQWR y BFII (32-35)_{Pal}: RLLRLLR separados por una molécula espaciadora (*Ahx*). La alta actividad antibacteriana presentada por las dos quimeras sugiere que el cambio de posición del motivo mínimo de la LfcinB (20-25), del extremo N-terminal al C-terminal, no causa un efecto sobre la actividad antibacteriana. En términos generales este mismo comportamiento se observa al comparar los datos de MIC de QA1/QB1 y QA2/QB2.

Las quimeras que presentan en su estructura la secuencia RLLRLLR, exhibieron una mayor actividad que las moléculas que contenían únicamente una copia del motivo RLLR, específicamente comparando QA3 vs QA2 y QB3 vs QB2. Este resultado concuerda con lo reportado por Wang et. al. [10]. De manera general, la incorporación del residuo del *Ahx* como espaciador causó una reducción de los valores de MIC, como se evidencia al comparar los datos de QA1 vs QA2 y QB1 vs QB2. Este resultado sugiere que para las quimeras derivadas de LfcinB y BFII la incorporación de este aminoácido no natural puede

ser una estrategia para potenciar la actividad y no hay un efecto adverso en el proceso sintético.

A partir de la secuencia de QA3 se diseñaron las quimeras de la familia QC, sustituyendo las Arg por Lys, cuando la sustitución fue total la actividad disminuyó en todas las cepas. Específicamente, para QC3 se encontraron valores de MIC entre 25 μM y 101 μM , comparado con QA3 que presentó MICs entre 11 μM y 46 μM . Cuando el cambio de las Arg por Lys fue parcial (QC1, QC2), es decir en uno de los dos motivos, la actividad se mantiene cercana a la presentada por QA3. Cabe anotar, que el proceso sintético de las quimeras de la familia QC fue mejor, ya que las Lys fueron incorporadas en ciclos sencillos de acople (Anexo A, reporte 10-12).

6.2.3 Evaluación del efecto sinérgico de los péptidos RRWQWR y RLLRLLR

Debido a la alta actividad antibacteriana obtenida para las quimeras QA3 y QB3, se decidió evaluar si los motivos mínimos que estas contenían, es decir los péptidos RRWQWR y RLLRLLR, podrían tener un efecto sinérgico al mezclarlos físicamente. Se seleccionó la cepa más sensible, *E coli* ATCC 25922, para este ensayo y se empleó el método de tablero de ajedrez. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Determinación de la concentración inhibitoria fraccionada (FIC) para el ensayo de sinergia entre los péptidos LfcinB (20-25) y BFII (32-35)_{Pal}

	MIC LfcinB (20-25)	MIC BFII(32-35) _{pal}	MIC (1) LfcinB (20-25) Mezcla	MIC (2) BFII(32-35) _{pal} Mezcla	FIC _{MIC(1)}	FIC _{MIC(2)}	Índice FIC
1	200	100	100	6,25	1,00	0,03	1,03
2	200	100	100	12,5	1,00	0,06	1,06
3	200	100	100	25	1,00	0,13	1,13
4	200	100	50	50	0,50	0,25	0,75
5	200	100	50	100	0,50	0,50	1,00
6	200	100	25	200	0,25	1,00	1,25
PROMEDIO							1,04

En la Tabla 6 se presentan los valores de MIC de los péptidos mezclados ($MIC_{(1)}$ y $MIC_{(2)}$) calculados para cada uno de los casos, junto con su concentración inhibitoria fraccionada (FIC). La FIC promedio tiene un valor de 1,04; según la escala propuesta por Saiman et. al [62], este valor indica indiferencia. Con base en este resultado, se concluye que los péptidos RRWQWR y RLLRLLR deben encontrarse químicamente unidos, en una quimera, para aumentar la actividad antibacteriana de estas secuencias.

6.3 Cinética de la actividad antibacteriana de los péptidos quiméricos QA3 y QB3 (Etapa 3)

Para las curvas de muerte celular se seleccionaron las quimeras QA3 y QB3 y se estudió la cinética de la actividad antibacteriana en un rango de tiempo de 48 horas, tomando lecturas de absorbancia cada hora. A manera de ejemplo, en la Figura 15, se presenta el efecto de la quimera QA3 sobre *E. coli* ATCC 25922, a diferentes concentraciones en función del tiempo.

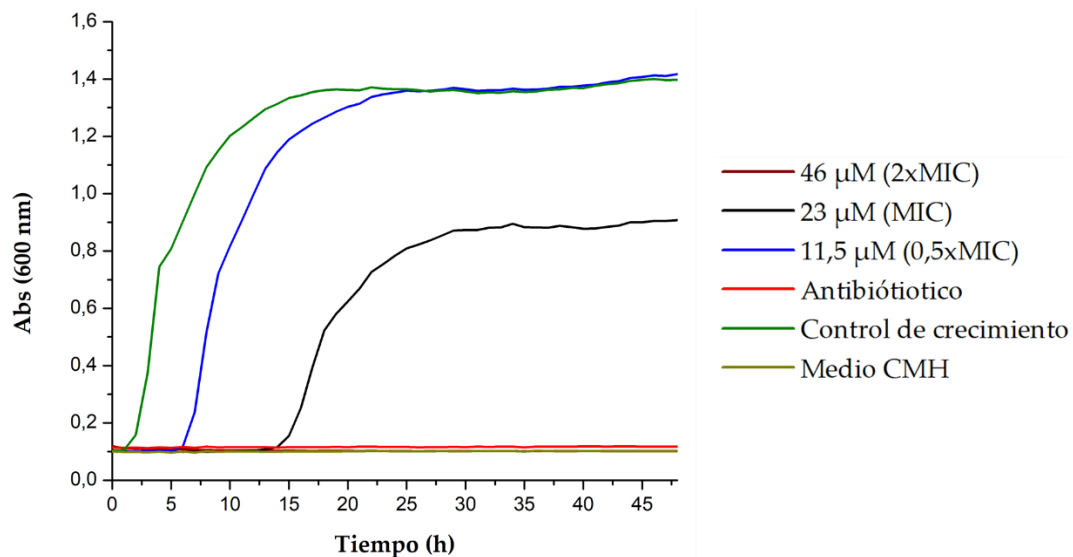


Figura 15. Curva de cinética de muerte celular. Péptido QA3 contra *E. coli* ATCC 25922. El péptido fue probado a concentraciones de 0,5×MIC, MIC y 2×MIC.

En la Figura 15 se puede observar que: (i) el control de inocuidad (CMH) y con tratamiento de antibiótico no presentan un crecimiento de la bacteria a lo largo de las 48 horas, (ii) en el control de crecimiento se evidencia la fase de adaptación (2 horas), fase exponencial (entre 2-15 horas) y la fase estacionaria (desde las 15 horas en adelante). Cuando la cepa fue

tratada con la quimera QA3 a una concentración de 11,5 μM (0,5 \times MIC) se observó un aumento de la fase de adaptación sin disminución de las UFC. Al usar una concentración de 23 μM (MIC), la fase de adaptación se extiende hasta las 13 horas, y la absorbancia en la fase estacionaria disminuye a la mitad del valor obtenido para el control de crecimiento, indicando un efecto bacteriostático de la quimera a esta concentración. Por otra parte, a una concentración de 46 μM (2 \times MIC) se presenta un efecto bactericida en el periodo de tiempo del estudio.

En la Tabla 7, se presentan los valores de concentración en donde las quimeras QA3 y QB3 presentan efecto bacteriostático o bactericida, para las cepas evaluadas. De estos resultados cabe resaltar que la quimera QA3 presentó efecto bactericida a 2 \times MIC en las cepas de *E. coli* y *E. faecalis*. Por otro lado, para la cepa de *S. aureus* se observó efecto bacteriostático a las concentraciones ensayadas. Para la quimera QB3 se observó un efecto bactericida a 2 \times MIC, en las cepas Gram positivas y bacteriostático para las cepas de *E. coli*.

Tabla 7. Actividad bacteriostática y bactericida de péptidos quiméricos

Quimera	Cepa Bacteriana	MIC (μM)	Efecto (μM)	
			Bacteriostático	Bactericida
QA3 RRWQWR-Ahx-RLLRLLR	<i>E. coli</i> ATCC 11775	23	23	46
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	11	11	22
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	23	46	>46
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	46	46	92
QB3 RLLRLLR-Ahx-RRWQWR	<i>E. coli</i> ATCC 11775	11	11	>22
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	6	12	>12
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	46	46	92
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	46	46	92

7. Conclusiones

Mediante química click, fue posible obtener una quimera que contiene los motivos mínimos de actividad de la LfcinB y la BFII unidos mediante un anillo de 1,2,3-triazol. Esta quimera presentó actividad antibacteriana en *E. coli* y *S. aureus*.

Empleando la estrategia de SPPS-Fmoc/*t*Bu, fue posible obtener nueve PAMs quiméricos, que no han sido reportados, los cuales presentaron un amplio espectro de actividad antibacteriana (contra bacterias Gram positivas y Gram negativas). Sugiriendo que estas quimeras son moléculas promisorias para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas.

Se demostró que la actividad antibacteriana de quimeras que contienen las secuencias RRWQWR, RLLR y RLLRLLR, presentaron mayor actividad antibacteriana que los péptidos individuales.

Las quimeras QA3: RRWQWR-*Ahx*-RLLRLLR y QB3: RLLRLLR-*Ahx*-RRWQWR presentaron actividad antibacteriana en todas las cepas evaluadas, lo cual sugiere que poseen un amplio espectro de acción. Para estas quimeras se encontró efecto bactericida y bacteriostático en las cepas evaluadas. Se demostró que los motivos mínimos RRWQWR y RLLRLLR no presentan efecto sinérgico al ser mezclados físicamente.

La relación entre el diseño de las quimeras estudiadas en este trabajo y su actividad biológica nos permite resaltar que:

- (i) la incorporación de la molécula espaciadora (*Ahx*) entre los motivos mínimos, generó un aumento en la actividad antibacteriana.

-
- (ii) Las quimeras que contienen en su secuencia dos copias del motivo mínimo de la BFII (RLLR) presentaron mayor actividad antibacteriana.
 - (iii) El cambio de posición del motivo mínimo de la LfcinB (20-25), del extremo N-terminal al C-terminal, no causó un efecto sobre la actividad de las quimeras.
 - (iv) La sustitución parcial de los residuos de Arg por Lys no afectó considerablemente los valores de MIC de los péptidos quiméricos, pero si benefició el proceso sintético.

Bibliografía

- [1] “WHO | Antibiotic resistance,” *WHO*, 2017. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>. [Accessed: 25-Dec-2017].
- [2] WHO, “Prevention & AMP,” 2016. [Online]. Available: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/amr-aidememoire-may2016.pdf>. [Accessed: 25-Dec-2017].
- [3] “WHO | WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed,” *WHO*, 2017. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>. [Accessed: 25-Dec-2017].
- [4] “WHO | World Health Organization,” *WHO*, 2016. [Online]. Available: http://www.who.int/antimicrobial-resistance/Microbes_and_Antimicrobials/en/. [Accessed: 25-Dec-2017].
- [5] J. Castañeda-casimiro *et al.*, “Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones,” *Alergia, asma e Inmunol.*, vol. 18, no. 1, pp. 16–29, 2009.
- [6] M. A. León-Calvijo, A. L. Leal-Castro, G. A. Almanzar-Reina, J. E. Rosas-Pérez, J. E. García-Castañeda, and Z. J. Rivera-Monroy, “Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–8, 2015.
- [7] M. Arias, L. J. McDonald, E. F. Haney, K. Nazmi, J. G. M. Bolscher, and H. J. Vogel, “Bovine and human lactoferricin peptides: Chimeras and new cyclic analogs,” *BioMetals*, vol. 27, no. 5, pp. 935–948, 2014.

- [8] N. D. J. Huertas Méndez *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*, vol. 22, no. 3, pp. 1–10, 2017.
- [9] C. B. Park, K. Yi, K. Matsuzaki, M. S. Kim, and S. C. Kim, "Structure – activity analysis of buforin II , a histone H2A-derived antimicrobial peptide : The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II," *PNAS*, vol. 97, no. 15, pp. 1–6, 2000.
- [10] Q. Wang, F. Zhu, Y. Xin, J. Liu, L. Luo, and Z. Yin, "Expression and purification of antimicrobial peptide buforin IIb in *Escherichia coli*," *Biotechnol. Lett.*, vol. 33, no. 11, pp. 2121–2126, 2011.
- [11] X. C. Pulido, M. Royo, F. Albericio, and H. Rodríguez, "Péptidos que atraviesan la membrana celular como potenciales transportadores de fármacos Cell Penetrating Peptides as potential drug carriers," pp. 208–216.
- [12] B. Liu *et al.*, "Design of novel antimicrobial peptide dimer analogues with enhanced antimicrobial activity in vitro and in vivo by intermolecular triazole bridge strategy," *Peptides*, vol. 88, pp. 115–125, 2017.
- [13] J. L. Gifford, H. N. Hunter, and H. J. Vogel, "Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 22, pp. 2588–2598, 2005.
- [14] S. Farnaud and R. W. Evans, "Lactoferrin - A multifunctional protein with antimicrobial properties," *Mol. Immunol.*, vol. 40, no. 7, pp. 395–405, 2003.
- [15] S. Farnaud *et al.*, "Interactions of lactoferricin-derived peptides with LPS and antimicrobial activity," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 233, no. 2, pp. 193–199, 2004.
- [16] C. B. Park, H. S. Kim, and S. C. Kim, "Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 244, no. 1, pp. 253–257, 1998.
- [17] J. H. Cho, B. H. Sung, and S. C. Kim, "Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial

- peptides from toad stomach," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 8, pp. 1564–1569, 2009.
- [18] C. B. Park, K.-S. Yi, K. Matsuzaki, M. S. Kim, and S. C. Kim, "Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 15, pp. 8245–8250, 2000.
- [19] S. A. Jang *et al.*, "Mechanism of action and specificity of antimicrobial peptides designed based on buforin IIb," *Peptides*, vol. 34, no. 2, pp. 283–289, 2012.
- [20] R. Salvatierra-González, Y. Benguigui, Pan American Health Organization., Pan American Sanitary Bureau., and World Health Organization., *Resistencia antimicrobiana en las Américas magnitud del problema y su contención*. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 2000.
- [21] N. Bruni *et al.*, "Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine," *Molecules*, vol. 21, no. 6, 2016.
- [22] D. J. Schibli, P. M. Hwang, and H. J. Vogel, "The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles," *FEBS Lett.*, vol. 446, no. 2–3, pp. 213–217, 1999.
- [23] G. Tonarelli and A. Simonetta, "Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos," *Fabciib*, vol. 17, pp. 137–177, 2014.
- [24] M. Camargo and H. Groot, "El secreto antimicrobiano de las histonas," pp. 14–16, 2014.
- [25] G. S. Yi, C. B. Park, S. C. Kim, and C. Cheong, "Solution structure of an antimicrobial peptide buforin II," *FEBS Lett.*, vol. 398, no. 1, pp. 87–90, 1996.
- [26] H. S. Lee *et al.*, "Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide," *Cancer Lett.*, vol. 271, no. 1, pp. 47–55, 2008.
- [27] E. Fleming, N. P. Maharaj, J. L. Chen, R. B. Nelson, and D. E. Elmore, "Effect of lipid composition on buforin II structure and membrane entry," *Proteins Struct. Funct.*

- Bioinforma.*, vol. 73, no. 2, pp. 480–491, 2008.
- [28] S. Kobayashi, K. Takeshima, C. B. Park, S. C. Kim, and K. Matsuzaki, “Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers: Proline as a translocation promoting factor,” *Biochemistry*, vol. 39, no. 29, pp. 8648–8654, 2000.
- [29] P. Kumar, J. N. Kizhakkedathu, and S. K. Straus, “Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo,” *Biomolecules*, vol. 8, no. 1, 2018.
- [30] “P55897: 3D Model From MODBASE Based On 1kx5C -- Protein Model Portal - PSI SBKB.” [Online]. Available: https://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&provider=MODBASE&template=1kx5C&pmpuid=1001165126102&range_from=1&range_to=39&ref_ac=P55897&mapped_ac=P55897&zid=async. [Accessed: 21-Mar-2018].
- [31] “OMS | Resistencia a los antimicrobianos,” *WHO*, 2017. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>. [Accessed: 25-Dec-2017].
- [32] C. J. Arnusch, H. Branderhorst, B. De Kruijff, R. M. J. Liskamp, E. Breukink, and R. J. Pieters, “Enhanced Membrane Pore Formation by Multimeric / Oligomeric Antimicrobial,” *Society*, no. 8, pp. 13437–13442, 2007.
- [33] N. De Jesús Huertas, Z. J. R. Monroy, R. F. Medina, and J. E. G. Casta, “Antimicrobial activity of truncated and polyvalent peptides derived from the FKRRWQWRMKKGLA sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,” *Molecules*, vol. 22, no. 6, 2017.
- [34] M. B. Strøm, B. E. Haug, M. L. Skar, W. Stensen, T. Stiberg, and J. S. Svendsen, “The pharmacophore of short cationic antibacterial peptides,” *J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 9, pp. 1567–1570, 2003.
- [35] M. Dathe, H. Nikolenko, J. Klose, and M. Bienert, “Cyclization increases the antimicrobial activity and selectivity of arginine- and tryptophan-containing hexapeptides,” *Biochemistry*, vol. 43, no. 28, pp. 9140–9150, 2004.
- [36] K. Wakamatsu, A. Takeda, T. Tachi, and K. Matsuzaki, “Dimer structure of magainin 2 bound to phospholipid vesicles,” *Biopolymers*, vol. 64, no. 6, pp. 314–327, 2002.

- [37] S. B. Tencza, D. J. Creighton, T. Yuan, H. J. Vogel, R. C. Montelaro, and T. A. Mietzner, "Lentivirus-derived antimicrobial peptides: Increased potency by sequence engineering and dimerization," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 44, no. 1, pp. 33–41, 1999.
- [38] V. Solarte, J. Rosas, Z. Rivera, J. E. García, M. Arango, and J.-P. Vernot, "A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin exhibits specific cytotoxic effects against Oral Squamous-Cell Carcinoma cell lines," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, p. 13, 2015.
- [39] A. Kubik, P. Stefanowicz, and I. Z. Siemion, *Conformational investigation on palindromic sequence of lactoferrin: DKFKD*, vol. 71, 1997.
- [40] J. Regberg, A. Srimanee, and Ü. Langel, "Applications of cell-penetrating peptides for tumor targeting and future cancer therapies," *Pharmaceuticals*, vol. 5, no. 9, pp. 991–1007, 2012.
- [41] S. Galdiero, M. Vitiello, A. Falanga, M. Cantisani, N. Incoronato, and M. Galdiero, "Intracellular delivery: exploiting viral membranotropic peptides," *Curr. Drug Metab.*, vol. 13, no. 1, pp. 93–104, Jan. 2012.
- [42] C.-Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I. D. Alves, G. Chassaing, and S. Sagan, "Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 49, pp. 33957–33965, Dec. 2009.
- [43] Z. Guo, H. Peng, J. Kang, and D. Sun, "Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications," *Biomed. reports*, vol. 4, no. 5, pp. 528–534, May 2016.
- [44] L. Li, I. Vorobyov, and T. W. Allen, "The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, no. 40, pp. 11906–11920, 2013.
- [45] S. T. Yang, S. Y. Shin, C. W. Lee, Y. C. Kim, K. S. Hahm, and J. Il Kim, "Selective cytotoxicity following Arg-to-Lys substitution in tritrypticin adopting a unique amphipathic turn structure," *FEBS Lett.*, vol. 540, no. 1–3, pp. 229–233, 2003.
- [46] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, and E. Giralt, *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. CRC Press, 1997.

- [47] M. Arias, K. Piga, M. Hyndman, and H. Vogel, "Improving the Activity of Trp-Rich Antimicrobial Peptides by Arg/Lys Substitutions and Changing the Length of Cationic Residues," *Biomolecules*, vol. 8, no. 2, p. 19, Apr. 2018.
- [48] P. Chen, C. Shyu, and F. C. Mao, "Antibacterial activity of short hydrophobic and basic-rich peptides," vol. 64, no. 9, 2003.
- [49] V. Rodríguez *et al.*, "Efficient Fmoc Group Removal Using Diluted 4-Methylpiperidine: An Alternative for a Less-Polluting SPPS-Fmoc/tBu Protocol," *Int. J. Pept. Res. Ther.*, no. 0123456789, pp. 4–6, 2019.
- [50] W. Kowalczyk, M. Monsó, B. G. de la Torre, and D. Andreu, "Synthesis of multiple antigenic peptides (MAPs)-strategies and limitations," *J. Pept. Sci.*, vol. 17, no. 4, pp. 247–251, 2011.
- [51] Y. Vargas Casanova *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*, vol. 22, no. 10, p. 1641, Sep. 2017.
- [52] X. Li, "Click to join peptides/proteins together," *Chem. - An Asian J.*, vol. 6, no. 10, pp. 2606–2616, 2011.
- [53] O. Avrutina *et al.*, "Application of copper(I) catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition to the synthesis of template-assembled multivalent peptide conjugates," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 7, no. 20, pp. 4177–4185, 2009.
- [54] A. Suárez, "Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares a alquinos catalizadas por cobre," *An. Quím.*, vol. 108, no. 4, pp. 306–313, 2012.
- [55] D. Insuasty Cepeda *et al.*, "Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Extraction with Gradient Elution: A Simple, Economical, Fast, and Efficient Methodology," *Molecules*, vol. 24, no. 7, p. 1215, 2019.
- [56] Microbiologics, "KWIKSTIK - INSTRUCTIONS FOR USE," 2018. [Online]. Available: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=516&c=915960&h=be1fe2eebf3be3ec26d4&_xt=.pdf. [Accessed: 18-Jun-2019].
- [57] D. P. Singh and S. K. Dwivedi, *Environmental microbiology and biotechnology*. New Age

- International Ltd, 2004.
- [58] M. A. Wikler *et al.*, "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition Volume 29 Number 2 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition," vol. 29, no. 2, pp. 7–7, 2009.
- [59] M. A. León-Calvijo, Z. J. Rivera-Monroy, A. L. Leal-Castro, J. E. García-Castañeda, G. A. Almanzar-Reina, and J. E. Rosas-Pérez, "Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–8, 2015.
- [60] M. D. C. C. S. Arthur L. Barry, Ph.D. William A. Craig, M.D. Harriette Nadler, Ph.D. L. Barth Reller, "M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline," *Clin. Lab. Stand. Inst.*, vol. 19, no. 1, pp. 56–78, 1999.
- [61] Y. Vargas-Casanova *et al.*, "Synergistic bactericide and antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or palindromic peptides containing the RWQWR motif against Gram-positive and Gram-negative strains," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 13, pp. 7239–7245, 2019.
- [62] L. Saiman, "Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: 'the motion for,'" *Paediatr. Respir. Rev.*, vol. 8, no. 3, pp. 249–255, 2007.
- [63] H. C. Kolb and K. B. Sharpless, "The growing impact of click chemistry on drug discovery.," *Drug Discov. Today*, vol. 8, no. 24, pp. 1128–37, Dec. 2003.
- [64] J. Thundimadathil, "ChemInform Abstract: Click Chemistry in Peptide Science: A Mini-Review: Synthesis of Clickable Peptides and Applications," *ChemInform*, vol. 44, no. 45, p. no-no, 2013.
- [65] C. J. H. D. Díaz Díaz, M.G. Finn, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, "Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos. I: principales aspectos sintéticos," *An. Química*, vol. 104, no. 3, pp. 173–180, Jul. 2008.
- [66] L. D. Pachón, J. H. Van Maarseveen, and G. Rothenberg, "Click chemistry: Copper clusters catalyse the cycloaddition of azides with terminal alkynes," *Adv. Synth.*

-
- Catal.*, vol. 347, no. 6, pp. 811–815, 2005.
- [67] Y. L. Angell and K. Burgess, “Peptidomimetics via copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, no. 10, pp. 1674–1689, 2007.



**PÉPTIDOS QUIMÉRICOS DERIVADOS DE LA
LACTOFERRICINA BOVINA Y LA BUFORINA:
SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE
SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Héctor Manuel Pineda Castañeda

ANEXO 1

**Resultados. Síntesis y caracterización de los péptidos
sintetizados**

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C, Colombia

2019

A. Resultados. Síntesis y caracterización de los péptidos sintéticos

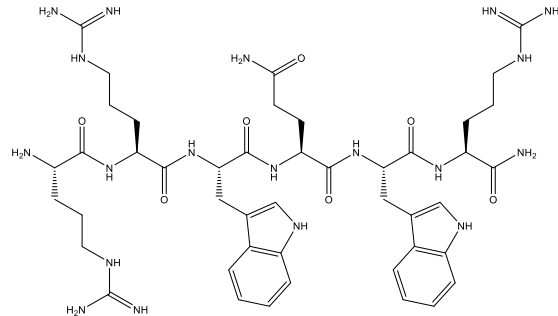
A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la síntesis química de los péptidos diseñados (Tabla 1), en cada una de las figuras se encuentra reportada la siguiente información: Estructura (Panel A), comportamiento de síntesis (Panel B), caracterización del péptido puro por RP-HPLC (Panel C) y espectrometría de masas MALDI-TOF (Panel D).

Tabla 4. Secuencias derivadas de LfcinB(20-25) y BFII(32-35) sintetizadas, purificadas y caracterizadas

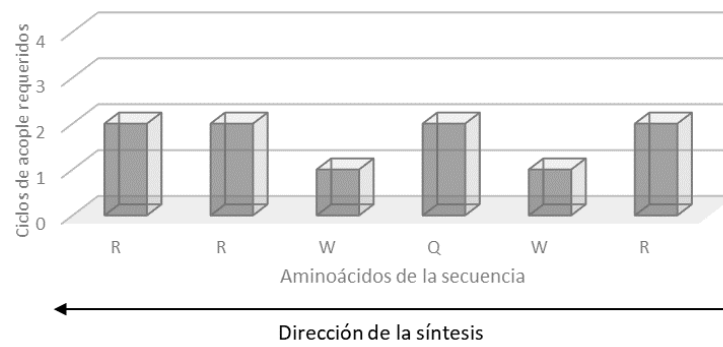
	Código Péptido	Página
Controles	LfcinB(20-25): RRWQWR	54
	BFII(32-35): RLLR	55
	BFII(32-35) _{pal} : RLLRLLR	56
Quimeras	QA1 RRWQWRLLR	57
	QA2 RRWQWR-Ahx-RLLR	58
	QA3 RRWQWR-Ahx-RLLRLLR	59
	QB1 RLLRRRWQWR	60
	QB2 RLLR-Ahx-RRWQWR	61
	QB3 RLLRLLR-Ahx-RRWQWR	62
	QC1 RRWQWR-Ahx-KLLKLLK	63
	QC2 KKWQWK-Ahx-RLLRLLR	64
	QC3 KKWQWK-Ahx-KLLKLLK	65
	P1 Pra-RRWQWR	66
	P2 Lys(N ₃)-RLLR	67
QAAC (RRWQWR)-Pra-AAC-K-(RLLR)	68	

REPORTE DE SÍNTESIS (1) – LfcinB(20-25): RRWQWR

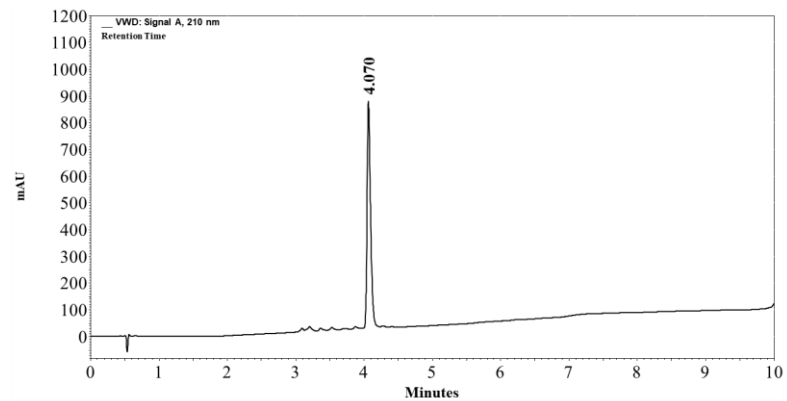
A



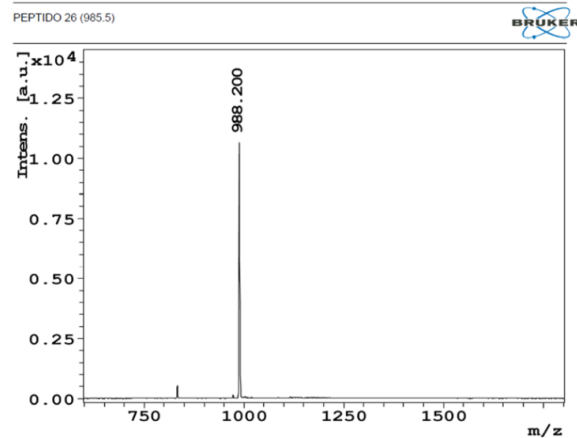
B



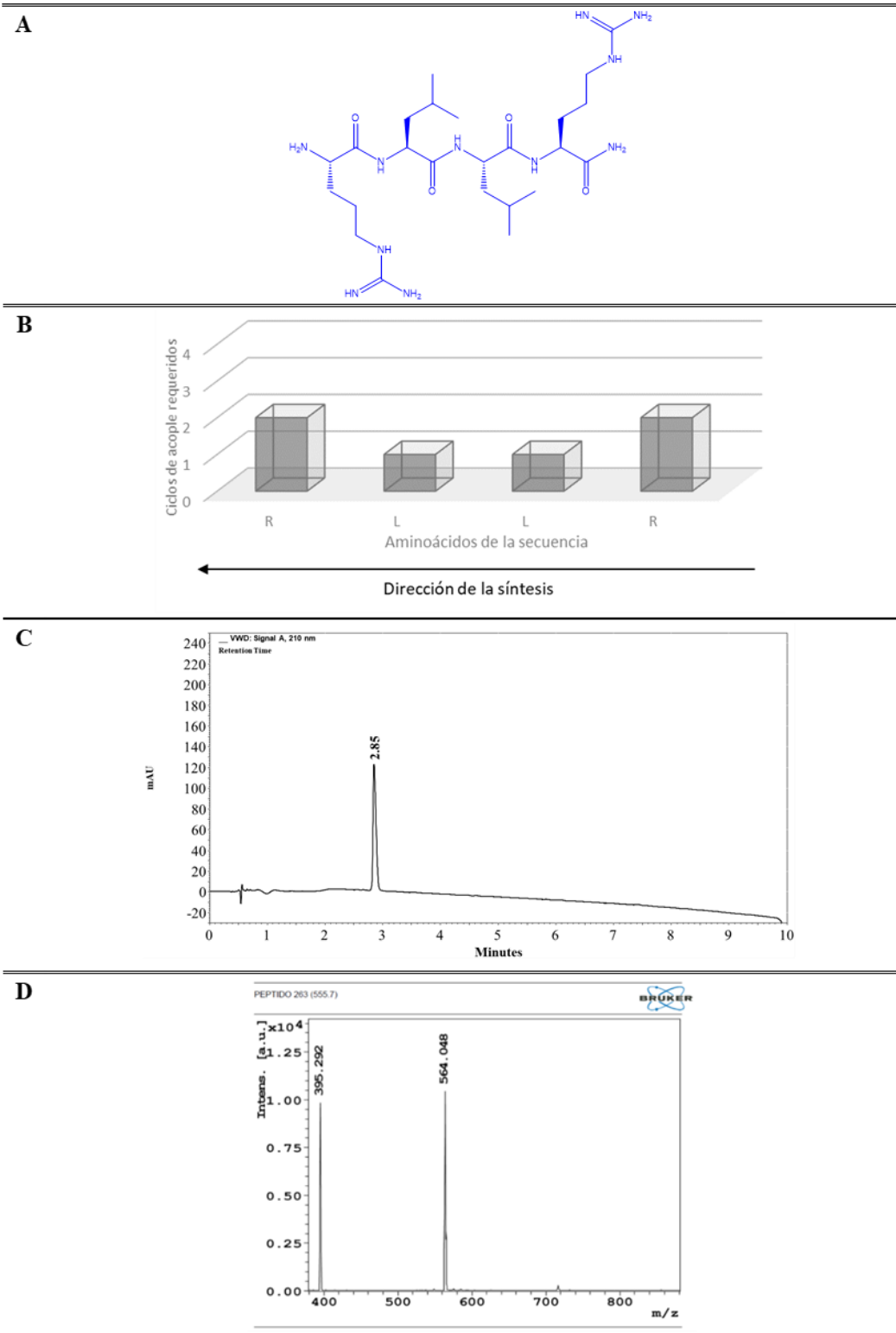
C



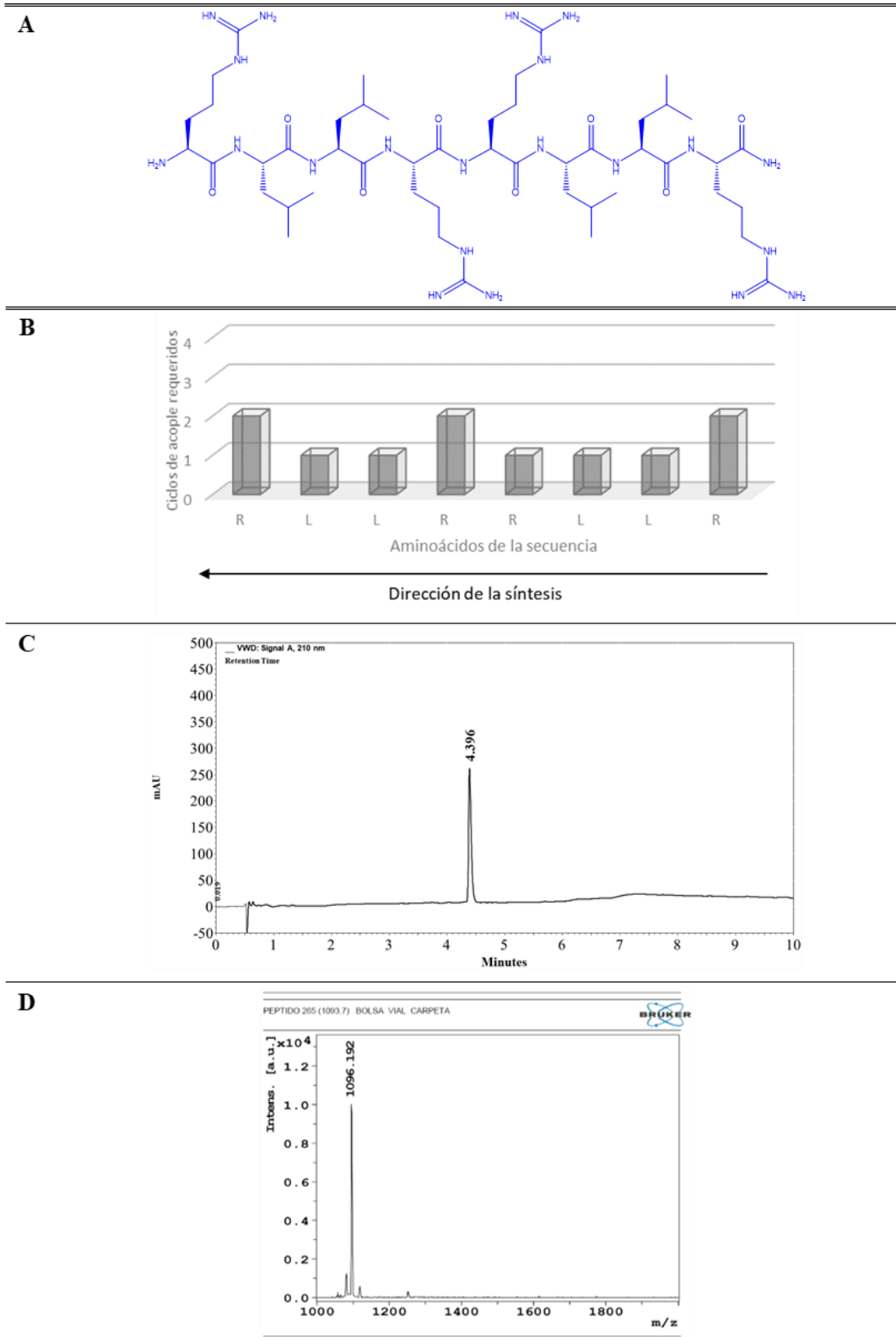
D



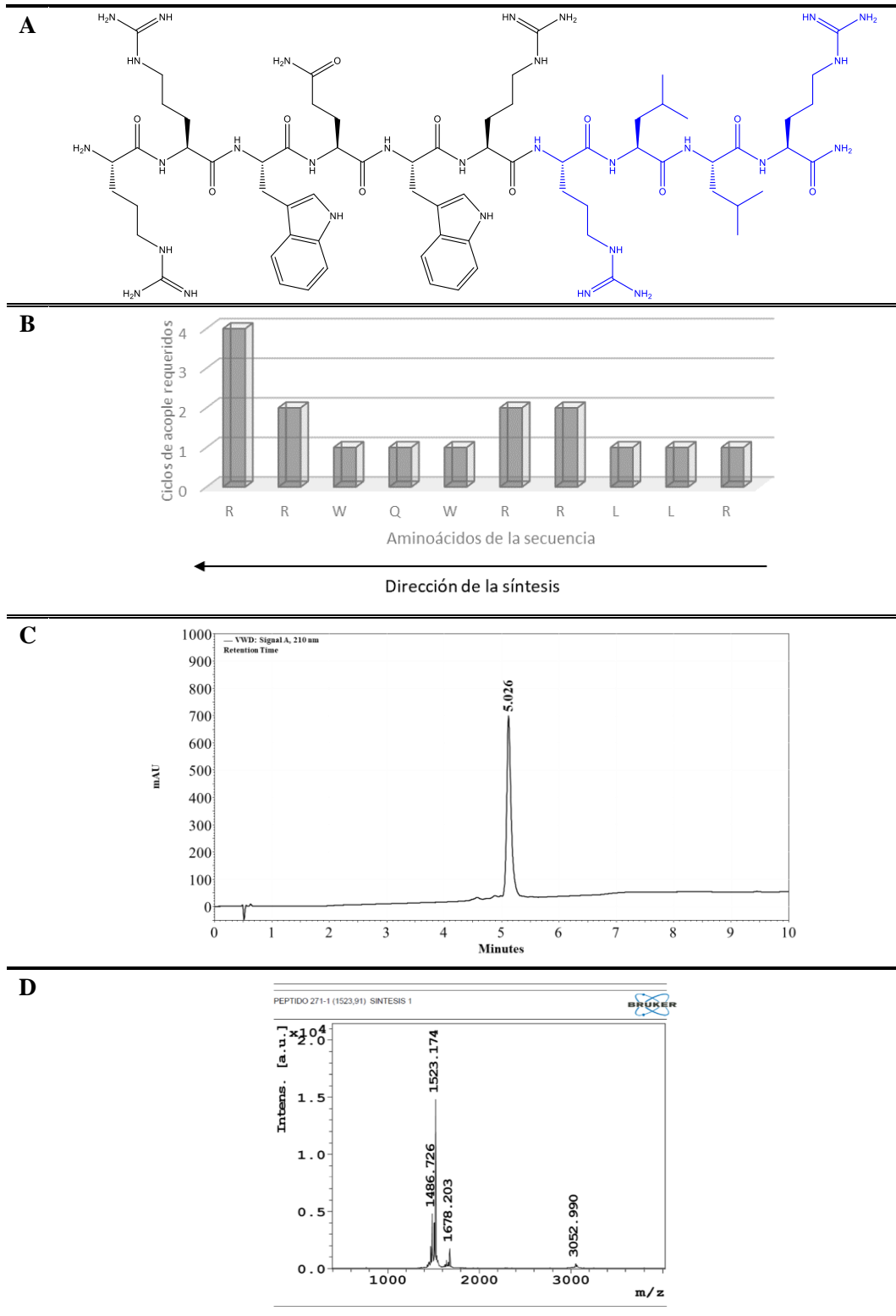
REPORTE DE SÍNTESIS (2) – BFII(32-35): RLLR



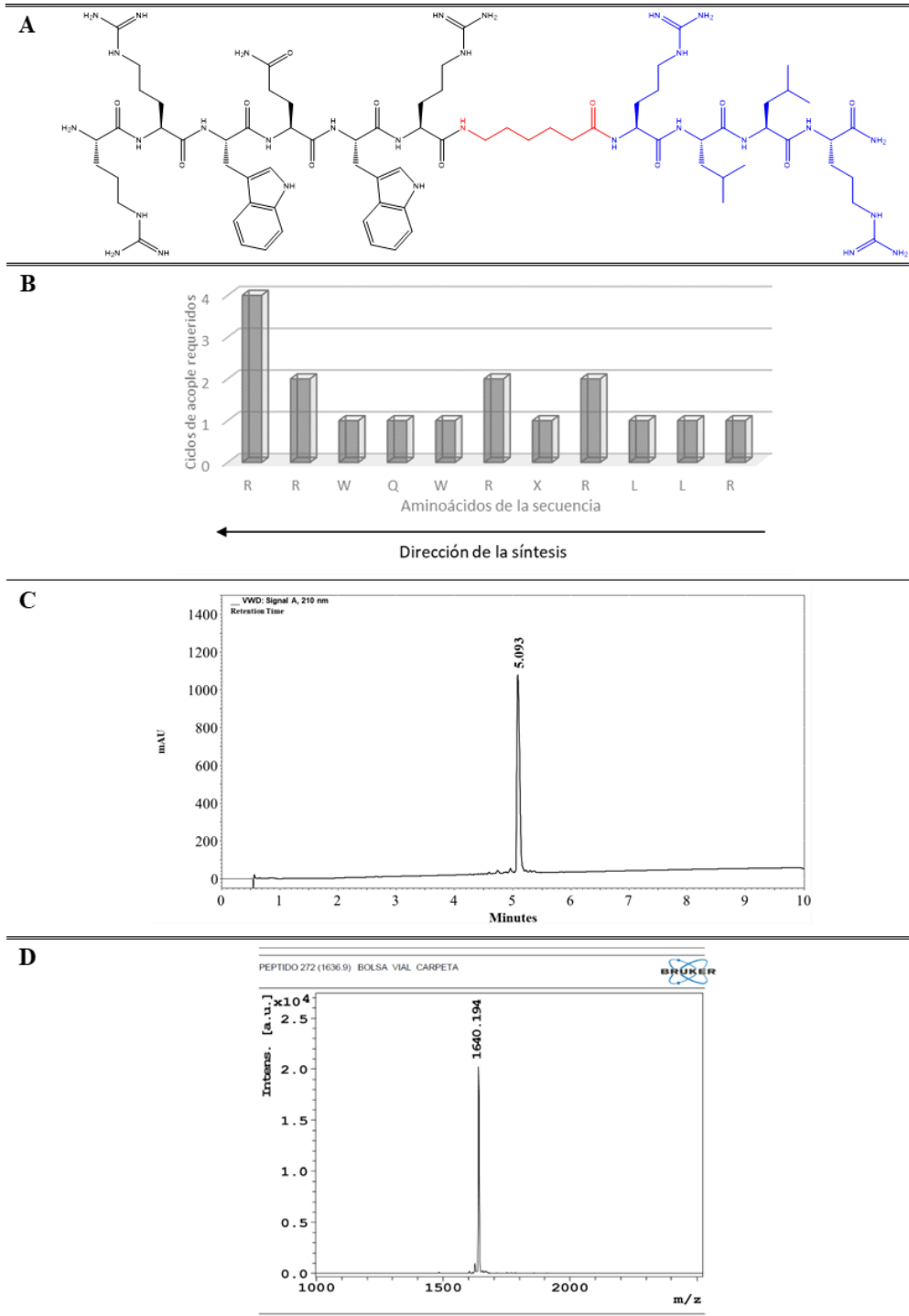
REPORTE DE SÍNTESIS (3) – BFII(32-35)_{pal}: RLLRLLR



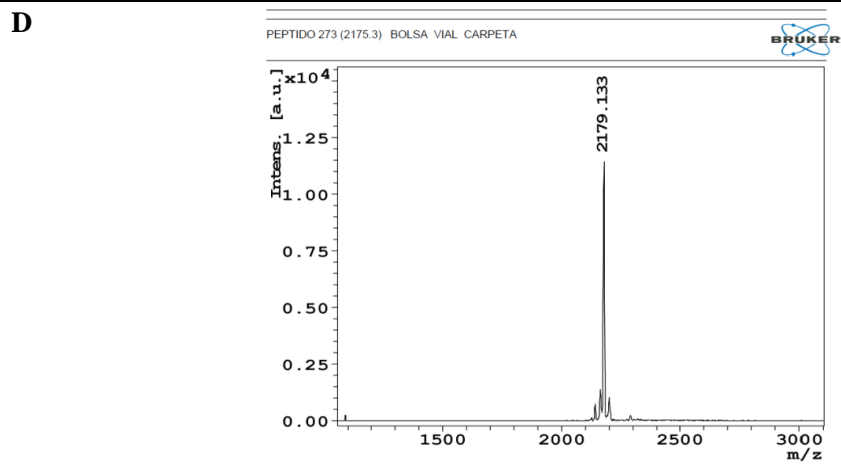
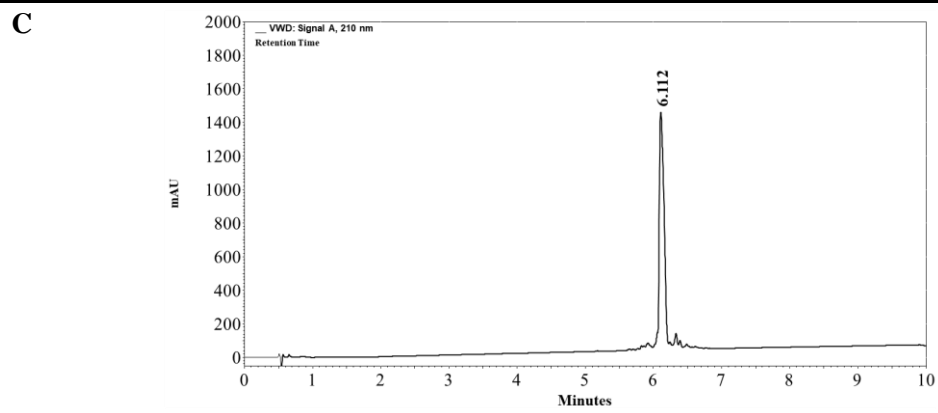
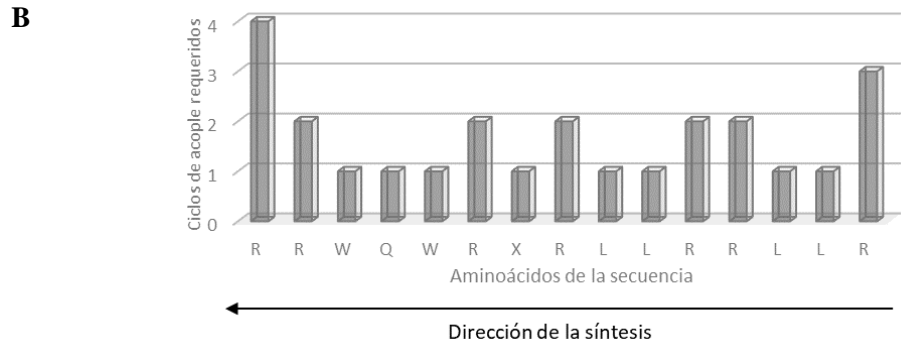
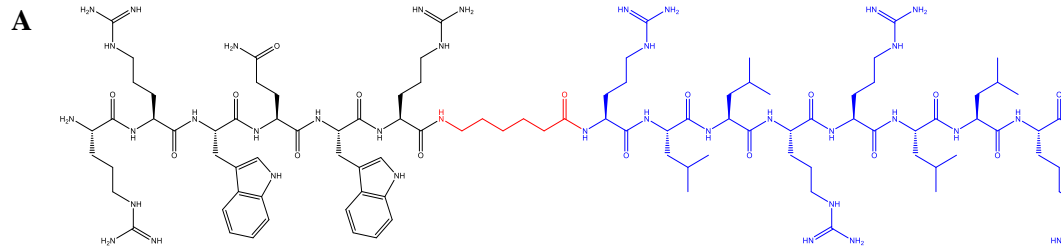
REPORTE DE SÍNTESIS (4) – QA1: RRWQWRLLR



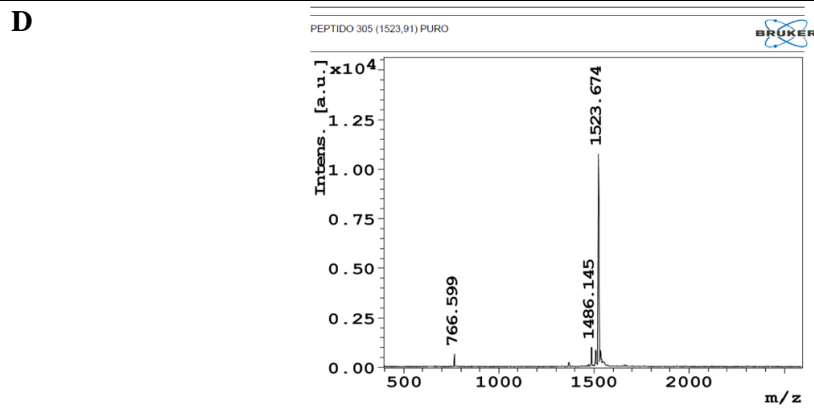
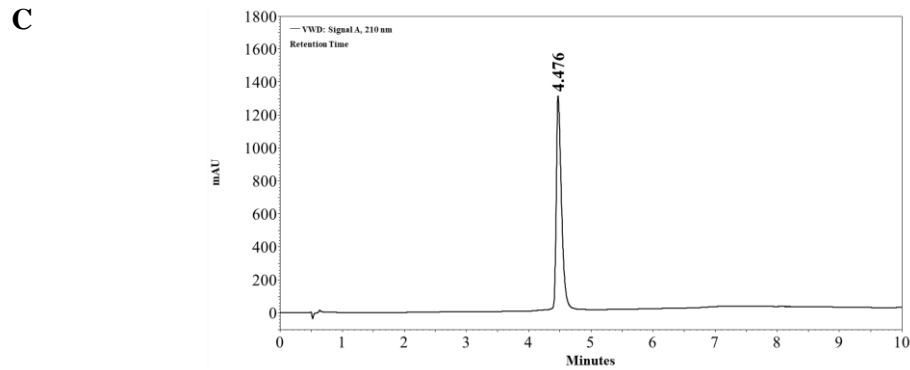
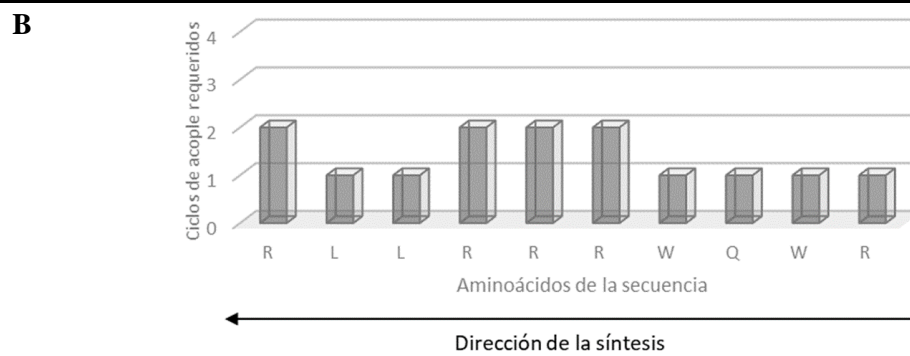
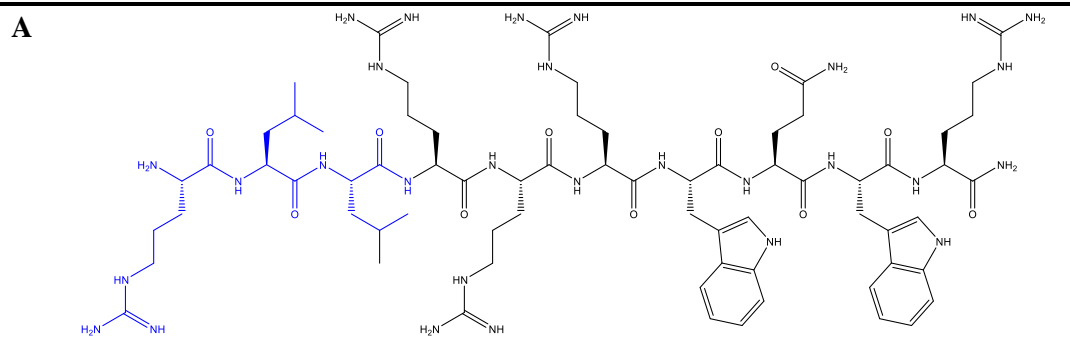
REPORTE DE SÍNTESIS (5) – QA2: RRWQWRXRLLR



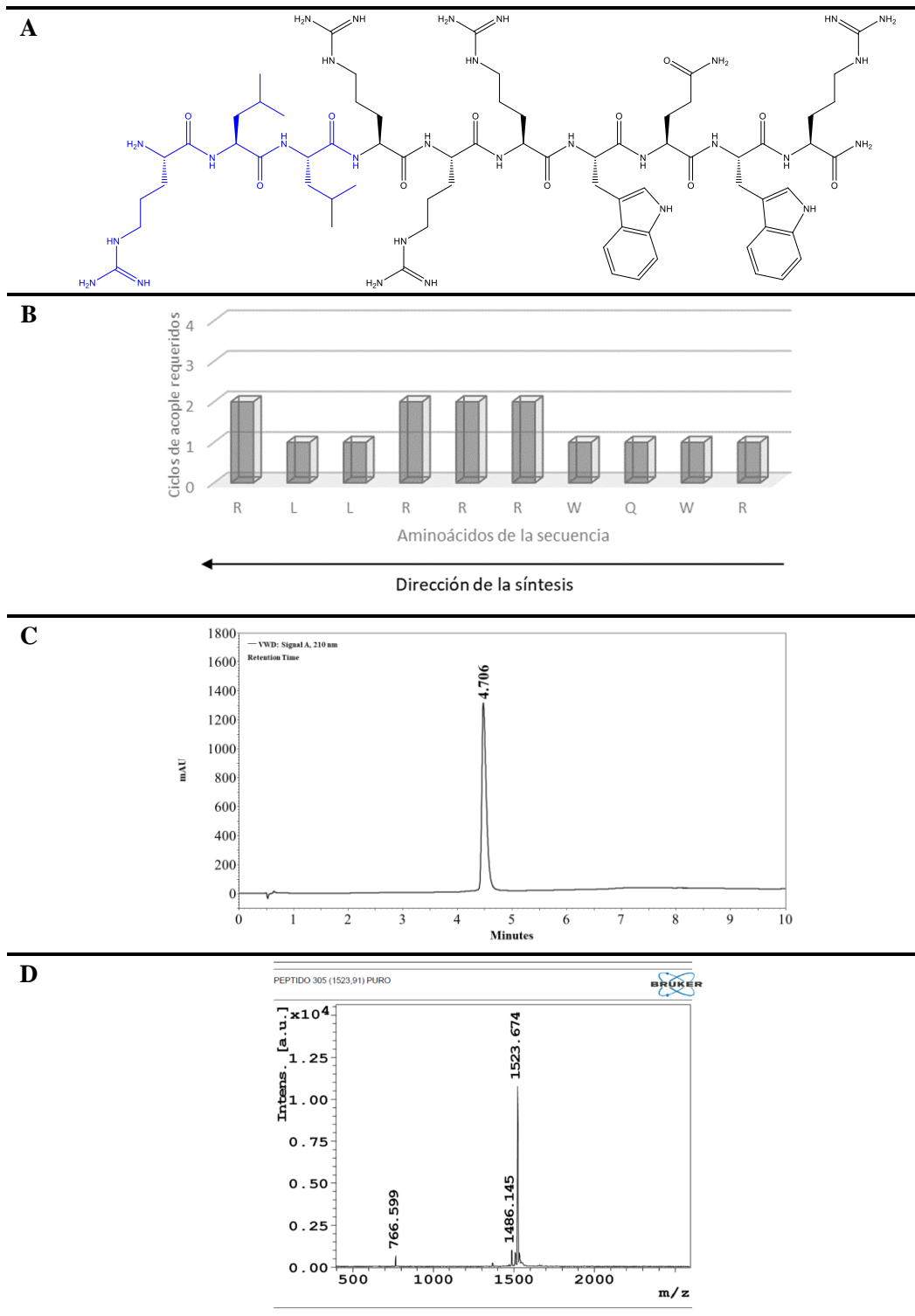
REPORTE DE SÍNTESIS (6) – QA3: RRWQWRXLLRLLR



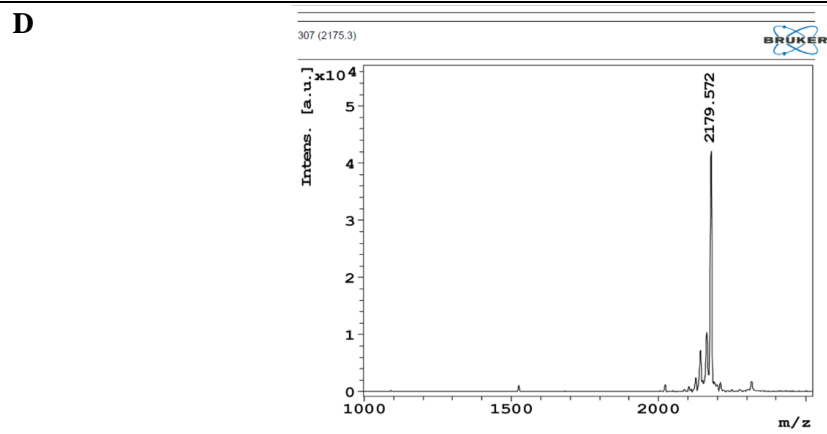
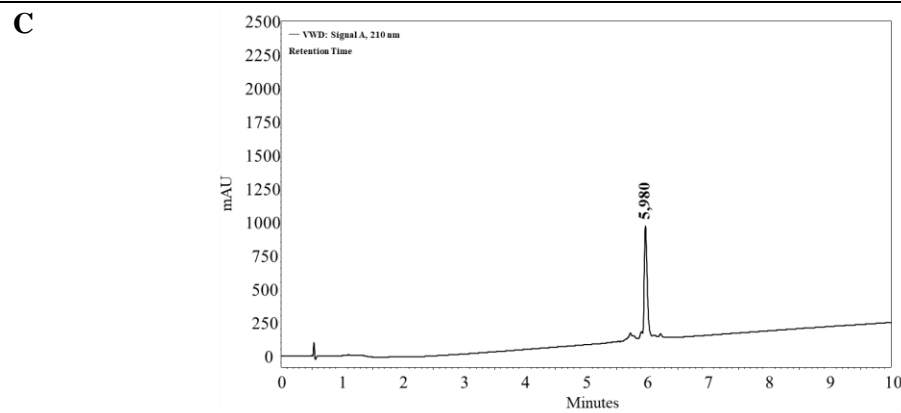
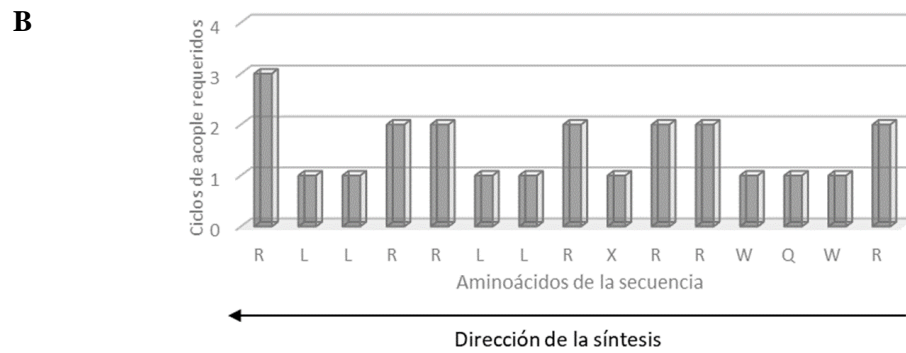
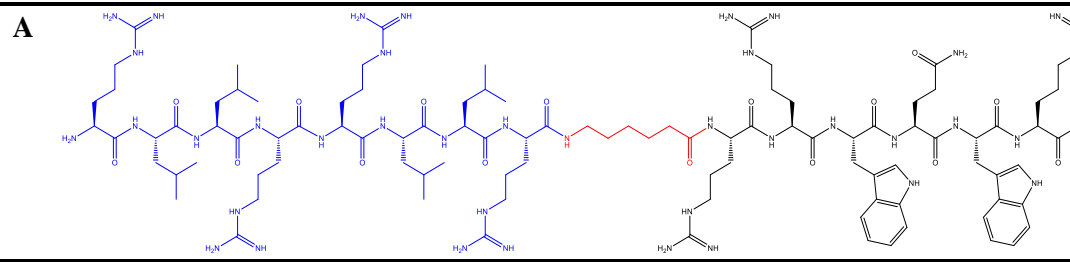
REPORTE DE SÍNTESIS (7) – QB1: RLLRRRWQWR



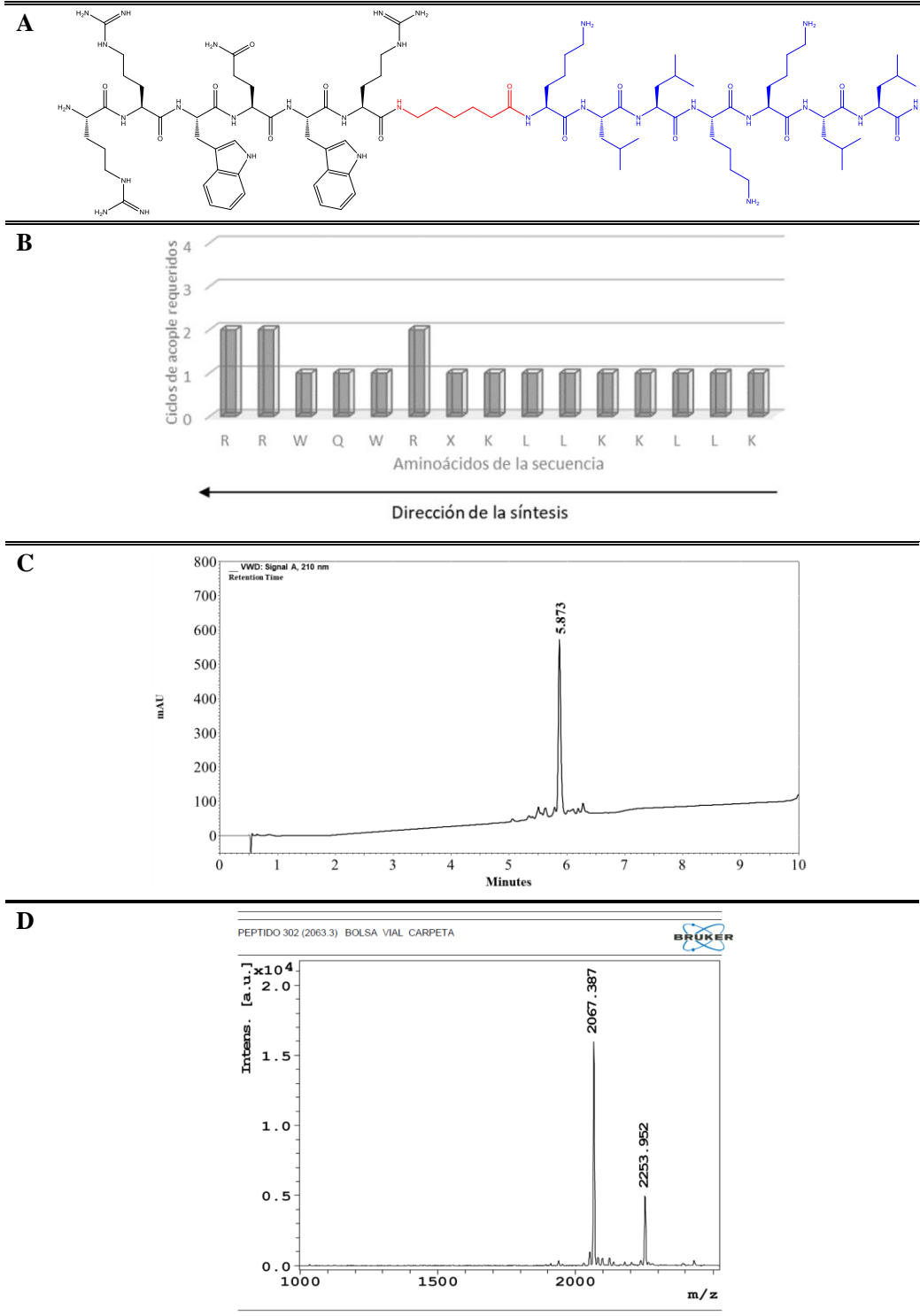
REPORTE DE SÍNTESIS (8) – QB2: RLLRXRRWQWR



REPORTE DE SÍNTESIS (9) – QB3: RLLRLLRXRRWQWR

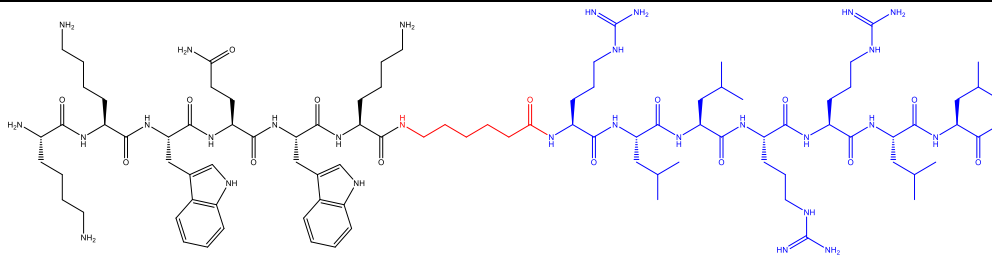


REPORTE DE SÍNTESIS (10) – QC1: RRWQWRXKLLKLLK

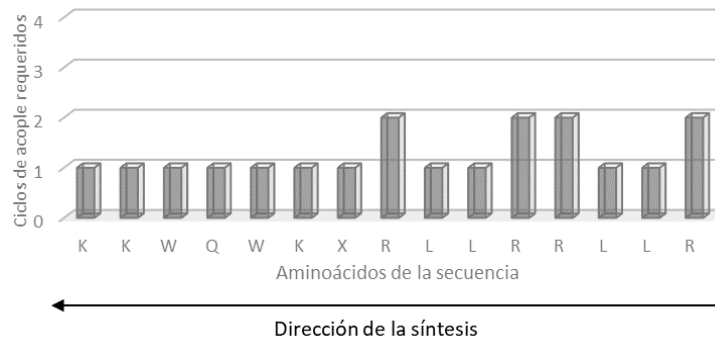


REPORTE DE SÍNTESIS (11) – QC2: KKWQWKXRLRLRLR

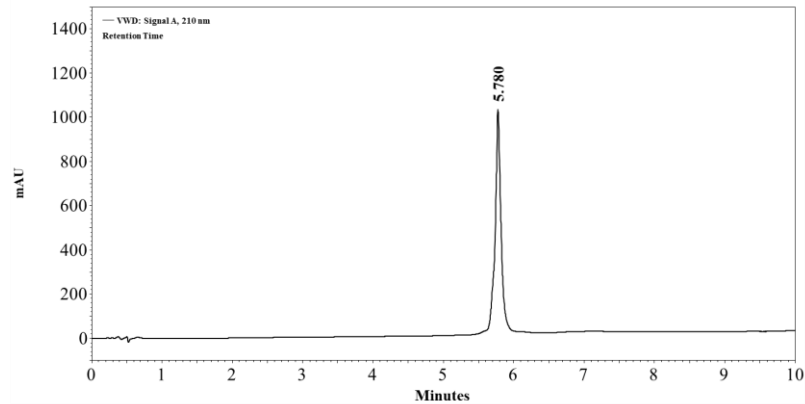
A



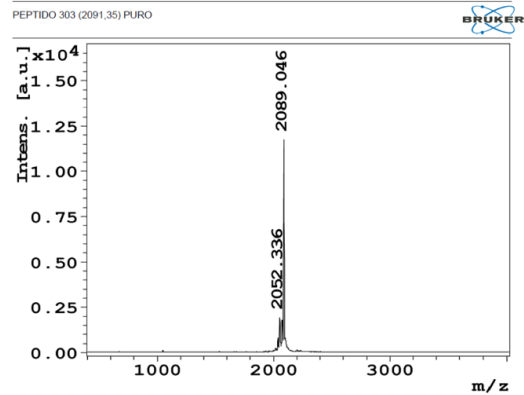
B



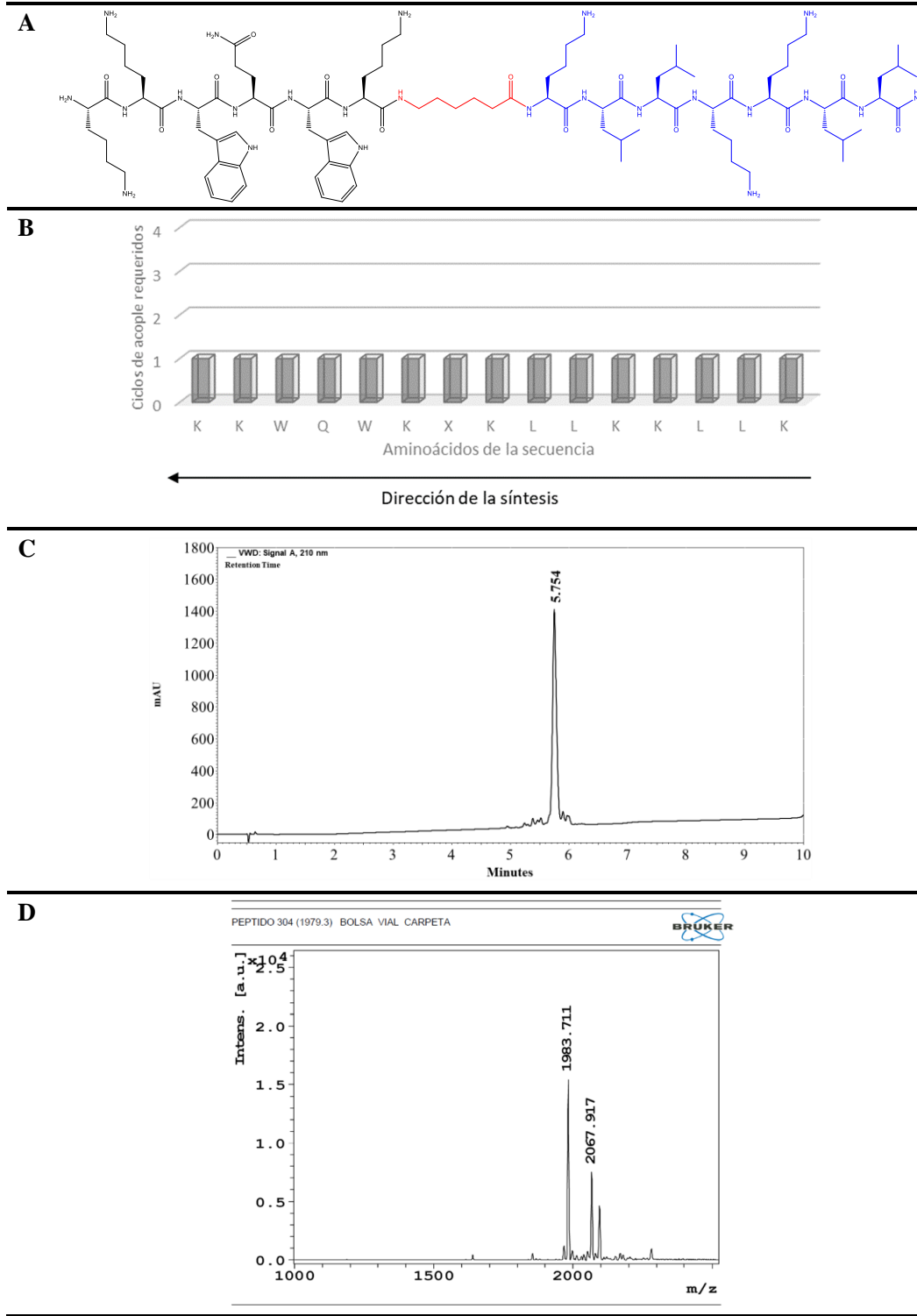
C



D

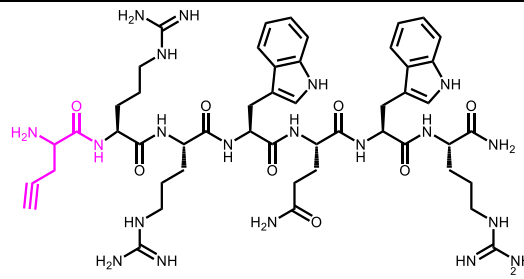


REPORTE DE SÍNTESIS (12) – QC3: KKWQWKXKLLKLLK



REPORTE DE SÍNTESIS (14) – P1: Pra-RRWQWR

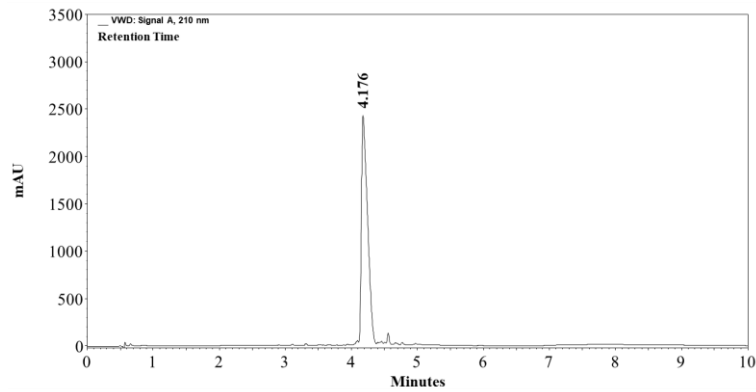
A



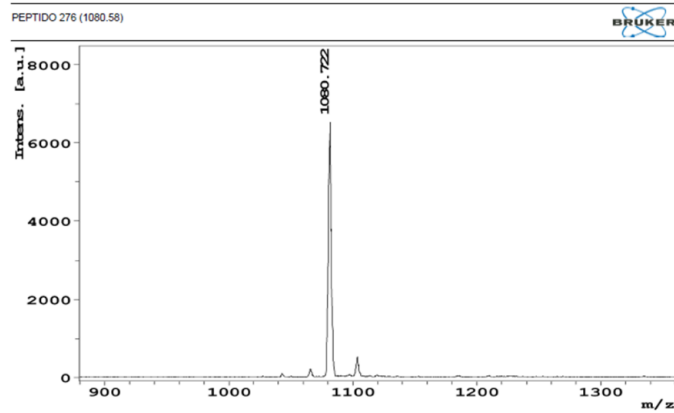
B



C

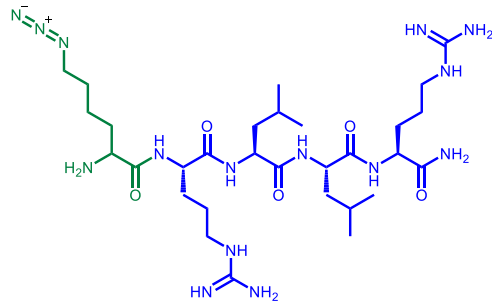


D

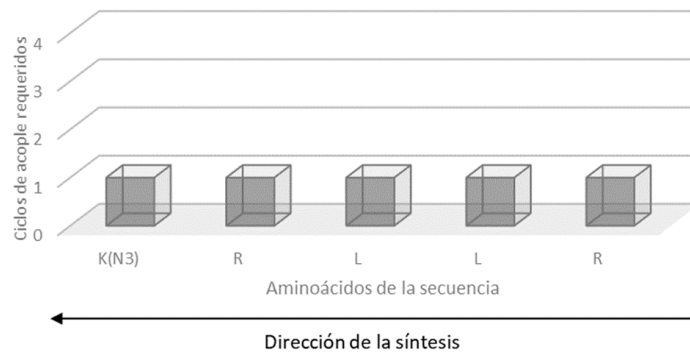


REPORTE DE SÍNTESIS (15) – P2: K(N₃)-RLLR

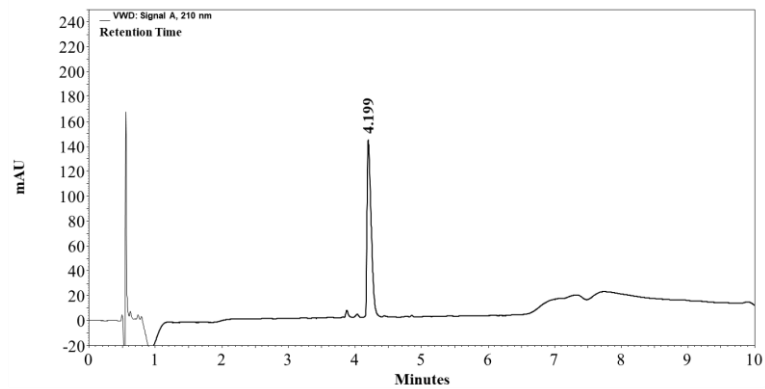
A



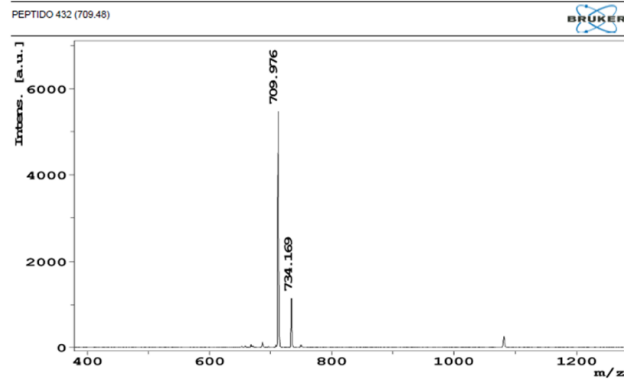
B

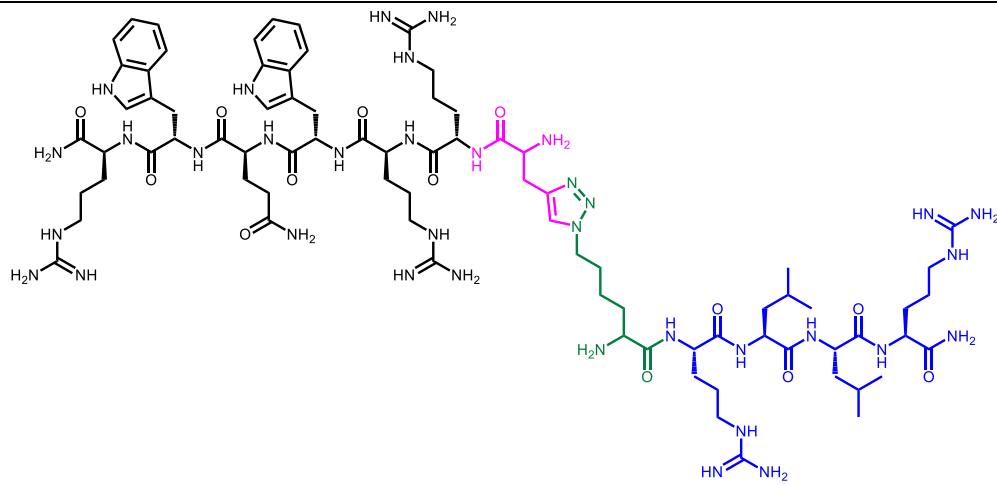
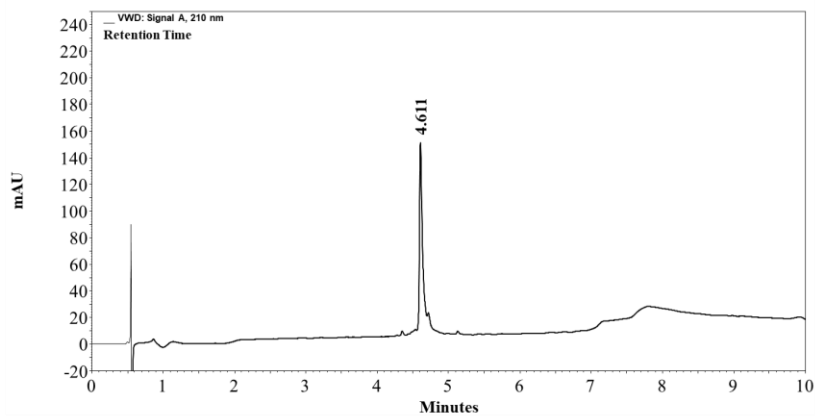
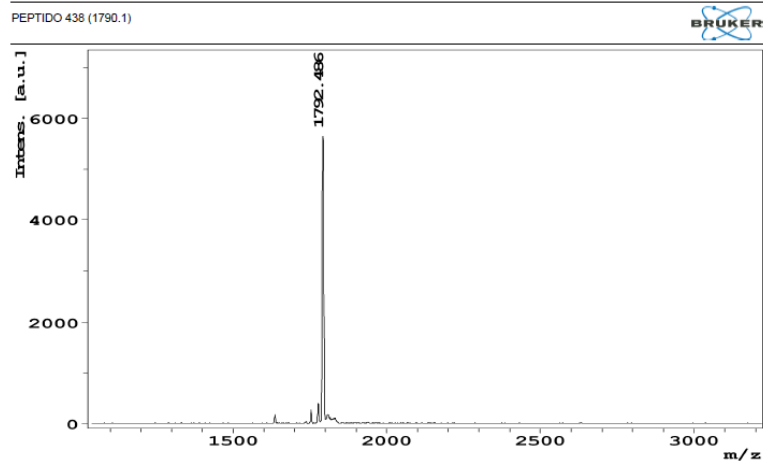


C



D



REPORTE DE SÍNTESIS (16) – QAAC: (RRWQWR)-Pra-AAC-K-(RLLR)**A****C****D**

B. Actividad Antibacteriana y Curvas de muerte celular

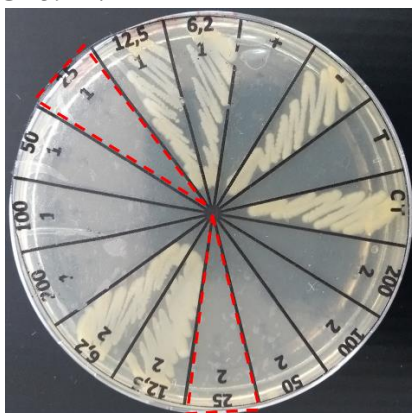
Anexo B1. Valores de MBC obtenidos para la quimera QAAC y precursores P1 y P2.

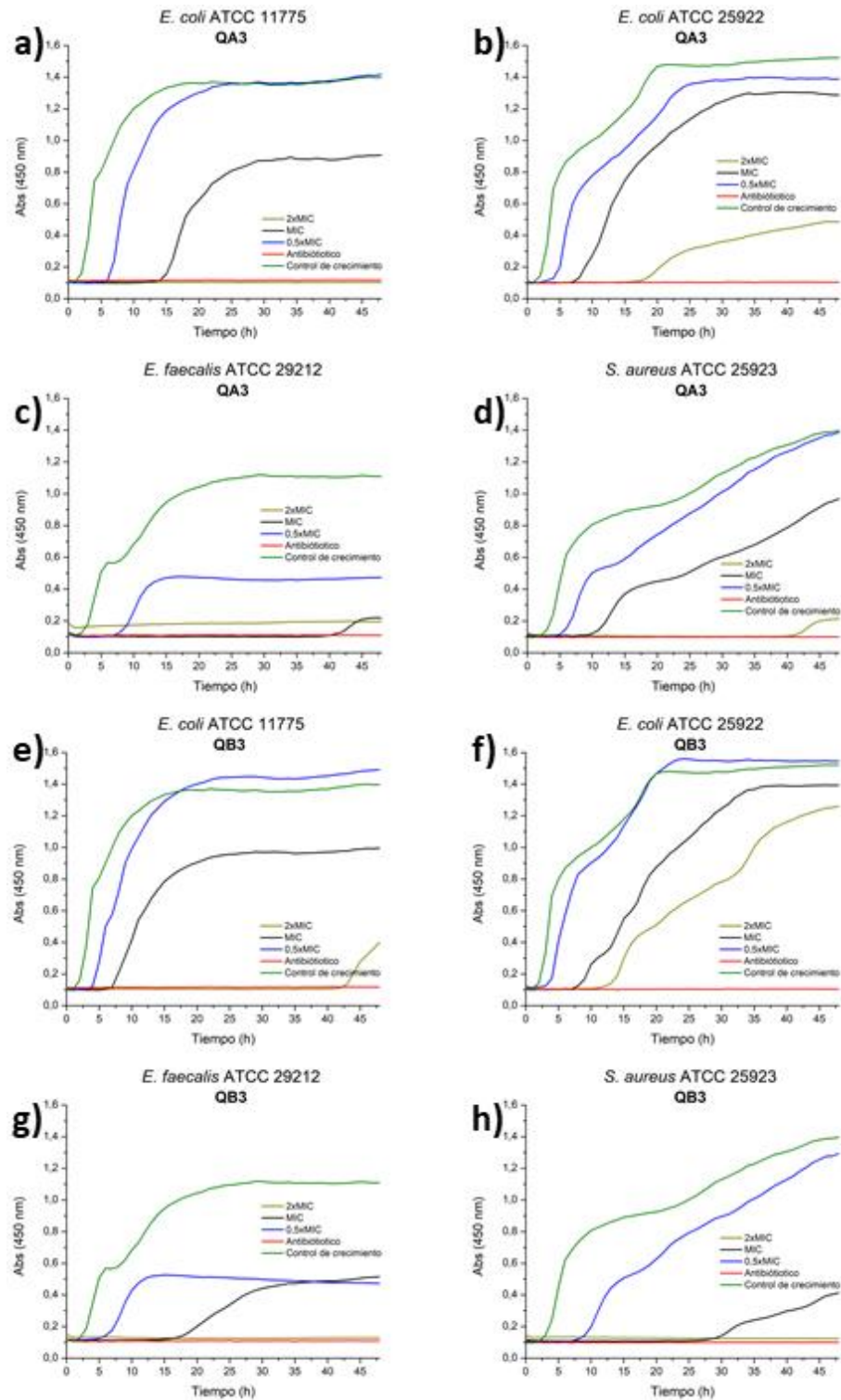
		Actividad antibacteriana (MIC, μM)	
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Controles	QAAC	93	185
	LfcinB (20-25)	203	>200
	BFII (32-35)	>200	>200
	P1	112	112
	P2	>200	>200

Anexo B2. Valores de MBC obtenidos para los peptidos quimericos QA, QB y QC

Código Péptido	Actividad antibacteriana (MBC, μM)					
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 11775	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	
QA1	33	131	131	131	>200	
QA2	31	61	61	122	>200	
QA3	23	23	11	46	92	
QB1	66	33	131	131	>200	
QB2	31	31	122	>200	>200	
QB3	11 ^a	11	23	>200	92	
QC1	24	48	48	97	>200	
QC2	48	24	48	>200	96	
QC3	101	51	101	101	101	
Controles	LfcinB(20-25)	203	>200	>200	>200	>200
	BFII(32-35)	>200	>200	>200	>200	>200
	BFII(32-35) _{pal}	91	183	>200	>200	>200

^a A manera de ejemplo se muestra el valor de la MBC 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (11 μM) obtenido para la quimera QA3 contra *E. coli* ATCC 25922.





Anexo B3. Curvas de cinética de muerte celular para las quimeras QA3 y QB3. Los péptidos fueron probados a concentraciones de 0,5 MIC (línea azul) MIC (línea negra) y 2 MIC (línea vino tinto).

Anexo B4. Generalidades biológicas de las cepas bacterianas

B4.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

S. aureus ATCC 25923 es un aislado clínico, usado para control de calidad en ensayos de concentrado de humo de madera, evaluación de Agar MH, examen de productos lácteos, pruebas de medios, difusión de disco CLSI y productos Abbott, API y Autobac [68].

B4.2 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

E. faecalis ATCC 29212 es un aislado de orina, usado para ensayos en alimentos, cepa de control, evaluación del Agar MH, prueba de medios, control de calidad de la cepa, prueba susceptibilidad en disco, control de calidad para los productos API, bioMérieux VITEK, IDS, Micro-Media, MicroScan y Sensititre [69].

B4.3 *Escherichia coli*

B4.3.1 *Escherichia coli* ATCC 25922

Es una cepa de control del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), para pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. Se utiliza para pruebas de medios de cultivo, como un control negativo para la producción de toxinas LT, y como control de calidad para productos Abbott, API, entre otros [70].

B4.3.2 *Escherichia coli* ATCC 11775

Aislada de orina, las propiedades antigénicas son: Serovar O1:K1:H7, es usada para control de medios de cultivo, detección de aerosoles, material de referencia, control de calidad para productos API y pruebas de agua [71].

B4.4 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Se utiliza en pruebas de sensibilidad y medios, para evaluación de Agar Mueller Hinton (MH) y como control de calidad para Abbott, API, Autobac, BBL, bioMérieux Vitek,

MicroMedia, MicroScan TM, Roche Diagnostics y productos Sensititre. La *P. aeruginosa* ATCC 27853 es un aislado de cultivos de sangre [73].

Anexo B5. Valores de absorbancia (620 nm) obtenidos para los controles del ensayo de sinergia

Controles	Abs (620 nm)
C+ (Antibiotico + Inoculo)	0,140
CT (CMH + H ₂ O _p)	0,033
C- (CMH + H ₂ O _d + Inoculo)	0,508
CC (CMH + Inoculo)	0,729

Anexo B6. Valores de absorbancia (620 nm) obtenidos para el ensayo de sinergia entre los péptidos LfcinB (20-25) y BFII (32-35)

		RLLRLLR					
		0,06xMIC (6,25 µg/mL)	0,12xMIC (12,5 µg/mL)	0,25xMIC (25 µg/mL)	0,5xMIC (50 µg/mL)	MIC (100 µg/mL)	2xMIC (200 µg/mL)
RRWQR	2xMIC (400 µg/mL)	0,046	0,045	0,065	0,039	0,038	0,017
	MIC (200 µg/mL)	0,004	0,015	0,021	0,041	0,022	0,02
	0,5xMIC (100 µg/mL)	0,044 (1)	0,042 (2)	0,031 (3)	0,029	0,038	0,025
	0,25xMIC (50 µg/mL)	0,407	0,353	0,311	0,174 (4)	0,140 (5)	0,053
	0,12xMIC (25 µg/mL)	0,549	0,533	0,503	0,479	0,371	0,199 (6)
	0,06xMIC (12,5 µg/mL)	0,524	0,596	0,615	0,576	0,416	0,336