

DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CATIÓNICOS

Lina Vargas^{1*} y José Oñate-Garzón ¹

¹ Grupo de investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Calle 5 No. 62-00, Cali 760035, Colombia; jose.onate00@usc.edu.co (J.O.-G.)

* Correspondencia: lina-vargas29@hotmail.com (L.V.). Tel: +57- 318 765 2122

RESUMEN

La resistencia antibacteriana hacia los antibióticos convencionales es un problema emergente a nivel mundial. Esta urgencia por desarrollar antibióticos alternativos ha motivado a los investigadores a buscar nuevas moléculas para superar este problema de resistencia, tales como, los péptidos antimicrobianos (PAMs). Los PAMs son importantes moléculas efectoras del sistema inmune innato, el cual es el principal mecanismo de defensa para la mayoría de los organismos vivos. El Alyteserin 1c, es un péptido antimicrobiano secretado en la piel del sapo *Alytes obstetricans* caracterizado por tener una carga neta +2 (WT). Con base al péptido WT, se procedió a elaborar un análogo (ΔM), el cual presenta una carga neta +5 como resultado de diferentes sustituciones de aminoácidos en la cara polar de la hélice del Alyteserin 1c. Ambos péptidos fueron sintetizados empleando el método de síntesis de péptidos por fase sólida. El rendimiento de la síntesis sin purificar fue del 29,7% para cada péptido. Después del proceso de purificar por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, el rendimiento fue del 4,95% para el WT y de 13,2% para el ΔM . Posteriormente se verificó la pureza de los péptidos utilizando el espectrofotómetro de masas Bruker Daltonics MALDI-TOF, que fue del 95% en ambos péptidos. Respecto a la actividad antibacteriana, el péptido WT exhibió una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 62,5 μM y 250 μM , frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, respectivamente, por otro lado, con el ΔM se obtuvieron MICs de 125 μM y 62,5 μM , para ambas cepas respectivamente. Respecto a la actividad hemolítica del péptido WT y ΔM se observó que la concentración mínima hemolítica es de 62,5 μM en cada uno.

Palabras Calves: diseño de péptido, síntesis en fase sólida, RP- HPLC, actividad antibacteriana, péptidos, Alyteserin 1c. **SUMMARY**

Antibacterial resistance to conventional antibiotics is an emerging problem worldwide. This urge to develop alternative antibiotics has motivated researchers to look for new molecules to overcome this resistance problem, such as antimicrobial peptides (PAMs). PAMs are important effector molecules of the innate immune system, which is the main defense mechanism for most living organisms. Alyteserin 1c, is an antimicrobial peptide secreted in the skin of the toad *Alytes obstetricans* characterized by having a net charge +2 (WT). Based on the WT peptide, an analogue (ΔM) was developed, which presents a +5 net charge as a result of different amino acid substitutions in the polar face of the Alyteserin 1c helix. Both peptides were synthesized using the solid phase peptide synthesis method. The yield of the unpurified synthesis was 29.7% for each peptide. After the process of purification by reverse phase high efficiency liquid chromatography, the yield was 4.95% for the WT and 13.2% for the ΔM . Subsequently, the purity of the peptides was verified using the Bruker Daltonics MALDI-TOF mass spectrophotometer, which was 95% in both peptides. Regarding the antibacterial activity, the WT peptide exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) of 62.5 μM and 250 μM , against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*, respectively, on the other hand, with the ΔM MICs were obtained from 125 μM and 62.5 μM , for both strains respectively. Regarding the hemolytic activity of the peptide WT and ΔM , it was observed that the minimum hemolytic concentration is 62.5 μM in each one.

Keywords: peptide design, solid phase synthesis, RP-HPLC, antibacterial activity, peptides, Alyteserin 1c.

1. INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos, muchas enfermedades infecciosas han sido controladas gracias a la amplia variedad y efectividad de estos compuestos, aumentando la expectativa de vida de humanos y animales. Sin embargo, en los últimos años el tratamiento de las infecciones bacterianas se ha complicado debido al incremento acelerado de resistencia bacteriana contra los antibióticos convencionales, volviendo a ser una de las principales causas de muerte cada año en todo el mundo.¹

De acuerdo con lo descrito anteriormente, los péptidos antimicrobianos (PAMs) desempeñan funciones importantes en la inmunidad innata de los organismos, donde su función es matar a los microorganismos invasores. Una característica especial de los PAMs es la probabilidad de la baja resistencia de las bacterias contra ellos² dado que los PAMs

ejecutan su actividad biológica a través de un mecanismo no específico, dirigido principalmente a las membranas celulares bacterianas. La superficie exterior de la célula procariota está cargada negativamente debido a la presencia de lipopolisacáridos o ácido teicoico, mientras que la cara externa de la célula eucariota se compone de fosfolípidos zwitterionicos como la fosfatidilcolina y la esfingomiélin. La interacción electrostática de péptidos con las moléculas cargadas negativamente en la membrana microbiana provoca la ruptura de la membrana liberando contenido citoplasmático hasta la muerte³.

Los péptidos antimicrobianos se pueden clasificar con base en su estructura secundaria como: hélices- α , láminas- β , extendidos y bucles⁴. Las hélices- α constituyen la mayoría de los péptidos antimicrobianos naturales conocidos⁵. Los péptidos β -laminares son clasificados así por la formación de láminas- β antiparalelas y paralelas estabilizadas por dos o más enlaces disulfuro. Los péptidos antimicrobianos extendidos contienen altas proporciones de ciertos aminoácidos como triptófano, histidina y prolina. Por último, la estructura de los péptidos en bucle ocurre por la formación de un solo enlace disulfuro, amida o peptídico⁶.

Desde su descubrimiento, miles de péptidos antimicrobianos naturales y sintéticos han sido reportados⁷, pero, muchos de ellos no son adecuados para aplicaciones terapéuticas debido a sus largas secuencias, alto costo de producción, baja potencia antimicrobiana, susceptibilidad a enzimas proteolíticas y alta citotoxicidad contra células de mamífero (por ejemplo, actividad hemolítica). Sin embargo, la gran cantidad de secuencias y la información estructural proporcionada por los péptidos antimicrobianos naturales conocidos, facilita el diseño de nuevos péptidos más potentes, menos tóxicos y con mayor potencial para múltiples aplicaciones⁸.

Emil Fischer ha sido considerado el padre fundador de la química de péptidos y quien los designó con ese nombre. En 1901, junto con E. Fourneau reportaron por primera vez la síntesis de un dipeptido glicina-glicina, obtenido por hidrólisis parcial de la dicetopiperacina de glicina en el laboratorio⁹. Desde ese momento se han desarrollado diversas metodologías de síntesis de péptidos, pero en 1963 R.B. Merrifield desarrollo una nueva técnica denominada Síntesis de Péptidos en Fase Sólida, conocida como SPPS por sus siglas en inglés¹⁰. La metodología de síntesis de péptidos en fase sólida, consiste en la adición secuencial de alfa-aminoácidos, protegidos en la cadena lateral y su alfa amino, a un soporte polimérico insoluble que es químicamente inerte y mecánicamente estable a las condiciones de síntesis¹¹. Esta estrategia sintética permite obtener péptidos con secuencias deseadas y además que se eliminan fácilmente los reactivos por los procesos de lavado y filtrado.

Este trabajo tuvo como finalidad diseñar y sintetizar a partir del alyteserin 1c (WT), un análogo con carga neta ΔM , reemplazando por aminoácidos hidrofílicos algunos de los aminoácidos hidrofóbicos de la cara polar de la hélice del WT, con el fin de aproximarse a una hélice ideal. Los péptidos WT y ΔM se sintetizaron manualmente empleando la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). Se evaluó la actividad antibacteriana en las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, posteriormente se reportó la actividad hemolítica. Con este trabajo se espera contribuir al entendimiento y diseño de nuevos y más eficaces antibióticos con potencial uso terapéutico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CEPAS Y REACTIVOS

S. aureus ATCC25213 y *S. typhimurium* ATCC14028, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, EE.UU.). Resina NovaPEG Rink Amida, aminoácidos con grupo amino protegido con Fmoc, piperidina, ninhidrina, dimetilformamida (DMF), ácido trifluoroacético (TFA), 1,2-etanoditiol (EDT), triisopropilsilano (TIS) y caldo Mueller Hinton fueron comprados en Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. DISEÑO DE PÉPTIDOS

Como secuencia molde para la sustitución de aminoácidos, se utilizó la del péptido Alyteserin-1c (WT) con carga neta = +2 y código PDB 2L5R, constituido por 23 residuos de aminoácidos (GLKEIFKAGLGSLVKGIAAHVAS). Se realizaron cuatro sustituciones de aminoácidos en la cara polar de la hélice de WT (resaltadas en negrilla), para generar un péptido análogo catiónico ΔM (GLKRIFKSGLGKLVKGISAHVAS). La carga neta de cada péptido se calculó como la suma de los residuos básicos. La hidrofobicidad del péptido <H> es definida como la media de los valores de hidrofobicidad de todos los residuos de acuerdo con una escala estándar¹². Para delimitar la cara hidrofílica de la hidrofóbica, se realizó una proyección de ruedas usando el software en línea Heliquest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>).

2.3. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

La síntesis del Aliteserin 1c y su análogo se realizó mediante la técnica de fase sólida utilizando una resina NovaPEG Rink Amida. La resina se hincho con piperidina al 20% en dimetilformamida (DMF), luego se lavó con diclorometano e isopropanol. Se mezcló una solución de activadores TBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilamino tetrafluoroborato) y DIEA (N,N-Diisopropiletilamina) con el aminoácido para acoplarse por el extremo COOH-terminal con la resina y se continua el procedimiento de acople entre la unión del extremo NH-terminal protegido con el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) y el extremo COOH-terminal del aminoácido a acoplar empleando microondas. Posteriormente, se lavó tres veces con diclorometano (DMC) y dos más con isopropanol. La desprotección (piperidina al 20% en DMF/ Diclorometano e Isopropanol) y el acoplamiento se repitieron las veces que fueron requeridas para obtener una mezcla de péptido-resina con los 23 residuos de aminoácidos completos. La prueba de ninhidrina o kaiser se realizaba en cada uno de los procesos de desprotección y acople como método de comprobación. Luego, la resina se lavó sucesivamente con éter dos veces y se secó a 37°C. El péptido se desancho de la resina por tratamiento con 94% de TFA / 2,5% de agua / 2,5% de EDT / TIS 1%, dejándose en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente y para llevar a precipitación con éter etílico frío durante 10 minutos. Después, se eliminó el éter etílico por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos, repitiendo lo anterior tres veces. Finalmente se dejó secar el péptido a temperatura ambiente.

2.2.1. CONTROL DE CALIDAD

Se pesó 0,2 mg de péptido en un eppendorf de 0,5 mL y se adiciona 100 μ L de agua destilada preparada con 0,05% de TFA. Se realizó una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa utilizando Chromolith® RP-18e semipreparativa aplicando una mezcla de: (A) H₂O con TFA al 0,05% (v / v) y (B) acetonitrilo que contiene 0,05% de TFA (v / v) como fase móvil. Para la elución de los péptidos, se utilizó el siguiente gradiente: 0-50% de B a 3 ml/min por 70 minutos y detección a 220 nm. Posteriormente se realizó la verificación de la pureza del péptido en un espectrómetro de masas Bruker Daltonics (Bruker Daltonics Inc. Billerica, U. S. A.) Serie Microflex MALDI-TOF.

2.2.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Se empleó como matriz una solución sobresaturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. La concentración peptídica fue de $5,0 \times 10^{-4}$ mg/ μ L, se dispensó en placa 2,5 μ L de una solución

que contenía una relación 2,5:18 de péptido y matriz respectivamente. El rendimiento de la síntesis sin purificación se expresó como: $((\text{Peso teórico del péptido} - \text{Peso experimental del péptido}) / \text{Peso teórico del péptido}) \times 100$; teniendo en cuenta que el rendimiento de la reacción es del 33%¹³, y el rendimiento de la síntesis con purificación se calcula empleando la misma fórmula.

2.3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Los ensayos antimicrobianos se realizaron de acuerdo al CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015). Un cultivo bacteriano se inoculó en caldo Mueller Hinton (aproximadamente 1×10^5 UFC / mL), posteriormente se diluyó en caldo Mueller Hinton hasta alcanzar una DO_{625} de 0,08 a 0,1 UA (aproximadamente 5×10^5 UFC / mL). Luego, se incubaron 90 μ L de cultivo bacteriano con 10 μ L de péptido. El tiempo de incubación fue de 18 h en placas de 96 pozos estériles a 37 °C. Los péptidos se aplicaron a diferentes diluciones seriadas a la mitad desde 250 μ M hasta 0,97 μ M. Como control negativo, se utilizó buffer fosfato salino (PBS, NaCl 138 mM, KCl 3 mM, NaH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, pH 7,4). Como controles positivos se utilizaron gentamicina y ampicilina, para Gram-negativas y Gram positivas, respectivamente. Después de la incubación, se visualizó el crecimiento bacteriano para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

2.4. EFECTO HEMOLÍTICO

1 ml de sangre periférica extraída de donantes sanos se lavó con PBS centrifugando a 3000 rpm durante 5 min. Los lavados se repitieron tres veces. Posteriormente, se incubaron 90 μ L de una suspensión de eritrocitos humanos, diluidos a una concentración final del 4% en una solución tamponada de PBS a 37°C durante 1 hora, con 10 μ L de péptido a diferentes concentraciones en serie: 125-62,5-31,25-15,63-7,81 y 3,91 μ M. Triton X100 (1%) se usó como control positivo y PBS como control negativo. Después de la incubación, la solución se centrifugó a 3000 rpm y el sobrenadante se midió por absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 1800. El porcentaje de hemólisis se definió como: $((\text{Abs Pépt} - \text{Abs PBS}) / (\text{Abs Triton X100} - \text{Abs PBS})) \times 100$. La Concentración Mínima Hemolítica (MHC) es la concentración más baja donde los eritrocitos son lisados. Los resultados se expresaron como el promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. DISEÑO DEL PEPTIDO

El péptido +2 está conformado por 23 residuos, el cual tiene una secuencia descrita por Conlon et al¹⁴. El péptido +5 es un análogo del péptido descrito anteriormente, donde se aumentó su carga debido a los reemplazos racionales de los residuos aniónicos e hidrófobos, por los catiónicos e hidrofílicos teniendo como base las sugerencias de Bordo y Argos¹⁵. Es importante tener en cuenta, que todos los cambios realizados fueron llevados a cabo con el fin de analizar el efecto de la carga, hidrofobicidad y anfipaticidad en función a la actividad hemolítica y antibacteriana.

Las sustituciones fueron: E4R, A8S, S12K y A18S, reemplazando dos hidrofóbicos por dos polares neutros y reduciendo la hidrofobicidad, un aminoácido aniónico y un polar neutro también fueron sustituidos por polares cargados catiónicos, aumentando la carga neta de +2 a +5, tal y como se ilustra en la tabla 1.

Tabla No.1. Características fisicoquímicas de los péptidos.

PÉPTIDO	SECUENCIA	<H>	<μH>	CARGA
WT	GLKEIFKAGLGSLVKGIAAHVAS	0.461	0.380	+2
ΔM	GLKRIFKSGLGKLVKGISAHVAS	0.373	0.434	+5

<H>=Hidrofobicidad, <μH>=Anfipaticidad.

Las sustituciones realizadas buscaban mantener la estructura hélice α del Alyteserin 1c con el fin de aproximarse a una hélice ideal, donde deben existir dos aminoácidos hidrófobos y dos aminoácidos hidrofílicos en cada un giro de la hélice. Al modificar los residuos hidrofóbicos por residuos polares con carga neutra o positiva en la cara polar de la hélice del WT, se logró aumentar la carga neta, disminuir la hidrofobicidad y aumentar la Anfipaticidad. En la Figura 1 se observa el aumento hidrofílico realizado.

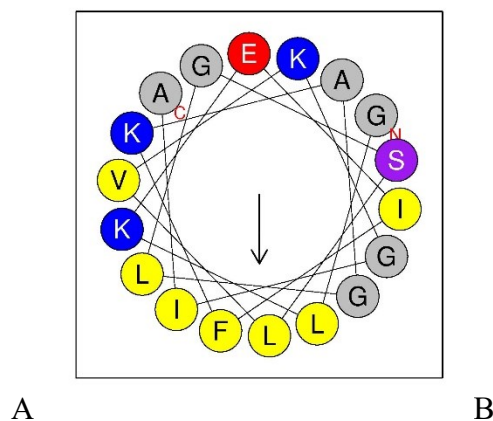


Figura 1. A. Secuencia de trabajo GLKEIFKAGLGSLVKGIAAHVAS péptido WT. B. Secuencia de trabajo GLKRIFKSGLGKLVKGISAHVAS péptido ΔM.

Las proyecciones de rueda corresponden a los primeros 18 residuos de la secuencia de cada péptido. Los aminoácidos hidrófobos son los de color amarillo y los aminoácidos cargados positivos son azules. Los cargados negativos son rojos y los polares neutros son de color púrpura. Por último, los de características intermedias son de color gris.

3.2. PUREZA DEL PÉPTIDO

Las secuencias diseñadas fueron sintetizadas por la estrategia SPPS-Fmoc manualmente, siguiendo el protocolo de síntesis descrito en la metodología. Durante cada ciclo de acople, del aminoácido activado por el extremo carboxy a la resina, se le realizaron cinco tratamientos con microondas (15s cada uno), ya que el uso de éste ayuda a acelerar y asegurar la reacción de acople entre los aminoácidos¹⁶. Ningún aminoácido necesitó más de tres ciclos de acople para tener un test de ninhidrina (Kaiser) negativo.

Se obtuvieron 90 mg de cada péptido, respectivamente. Los péptidos obtenidos fueron verificados con HPLC analítico empleando una longitud de onda de 220 nm y una columna Chromolith RP 18 que se caracteriza por ser apolar; este tipo de cromatografía es conocida como partición en fase reversa, ya que al poseer una fase estacionaria apolar la retención está basada en la interacción de tipo hidrófobo entra dicha fase y la región apolar del análogo, mientras que su fase móvil es polar. Lo anterior se realizó con el fin de reconocer los picos y luego recoger cada fracción con impureza o puro. Posteriormente, estas fracciones fueron enviadas a un espectrómetro de masas para tomar la fracción que correspondiera a cada péptido. El rendimiento de la síntesis sin purificación fue del 29,7% para cada uno de los péptidos.

Al determinar que fracción correspondía a cada péptido, se incorpora la muestra al rotaevaporador en una mezcla de agua/acetonitrilo donde se evaporó el acetonitrilo a alto vacío y se liofilizaron las muestras para eliminar el agua.

La purificación se efectuó por HPLC en columna semi preparativa Chromolith RP 18e obteniéndose el cromatograma de la figura 2.A que corresponde al péptido WT con un rendimiento de síntesis de 4,95% en un tiempo de retención de 23 min con una intensidad de 270 mV. El cromatograma de la figura 3.A corresponde al péptido Δ M con un tiempo de retención de 25 min y una intensidad de 295 mV obteniendo un rendimiento de síntesis del 13%.A.

B.

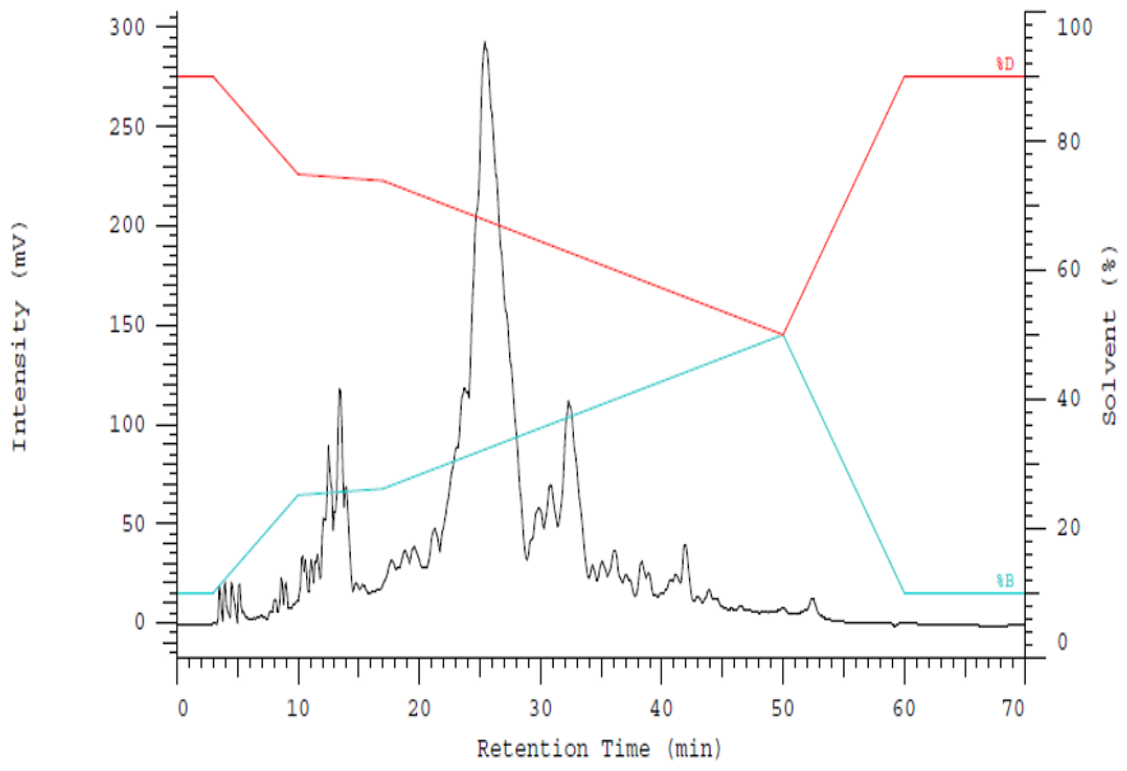
Figura 2. Cromatograma y espectro de masas del péptido WT. (A) Cromatograma por HPLC en fase reversa. (B) Espectro de masas por MALDI-TOF.

Las fracciones anteriormente nombradas se caracterizaron por maldi-TOF, por tanto, en el espectro de la figura 2.B se observa una correspondencia entre la masa molecular teórica y la obtenida experimentalmente, en este caso para el péptido del Alyteserin 1c la teórica era de 2266,88 Da, mientras la experimental fue 2266,51 Da, en este espectro no solo se visualiza el pico molecular sino un pico isotópico con m/z 2287,590 Da $[M+2H]^{+2}$, el cual presenta un potencial de aparición más bajo, es decir, el pico que aparece a una mínima energía de los electrones de bombardeo, la diferencia m/z entre el pico molecular y el pico isotópico es de 21,077 Da; lo cual podría deberse al flúor (^{19}F) y 2 hidrógenos (^1H) unidos al péptido, ya que el fluor posee una masa de 18,9984 y el hidrogeno de 1.0078, lo cual es posible ya que son isotopos naturales con una abundancia relativa del 100%.

Además, cuando se trata de una molécula orgánica donde solamente contiene carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno, el pico isotópico tendrá una intensidad relativa entre 0,5 y 2,5 con respecto al pico molecular, lo cual ocurre en este caso que es de 0,5.

En el caso del espectro de masas del péptido modificado (Figura 3) fue 2366,88 Da y 2366.76 Da el experimental, en el cual no se observa alguna señal de impureza. La pureza final de los péptidos fue de aproximadamente el 95%, de acuerdo con los espectros obtenidos por maldi-TOF donde los pesos experimentales coinciden con los teóricos.

A



B

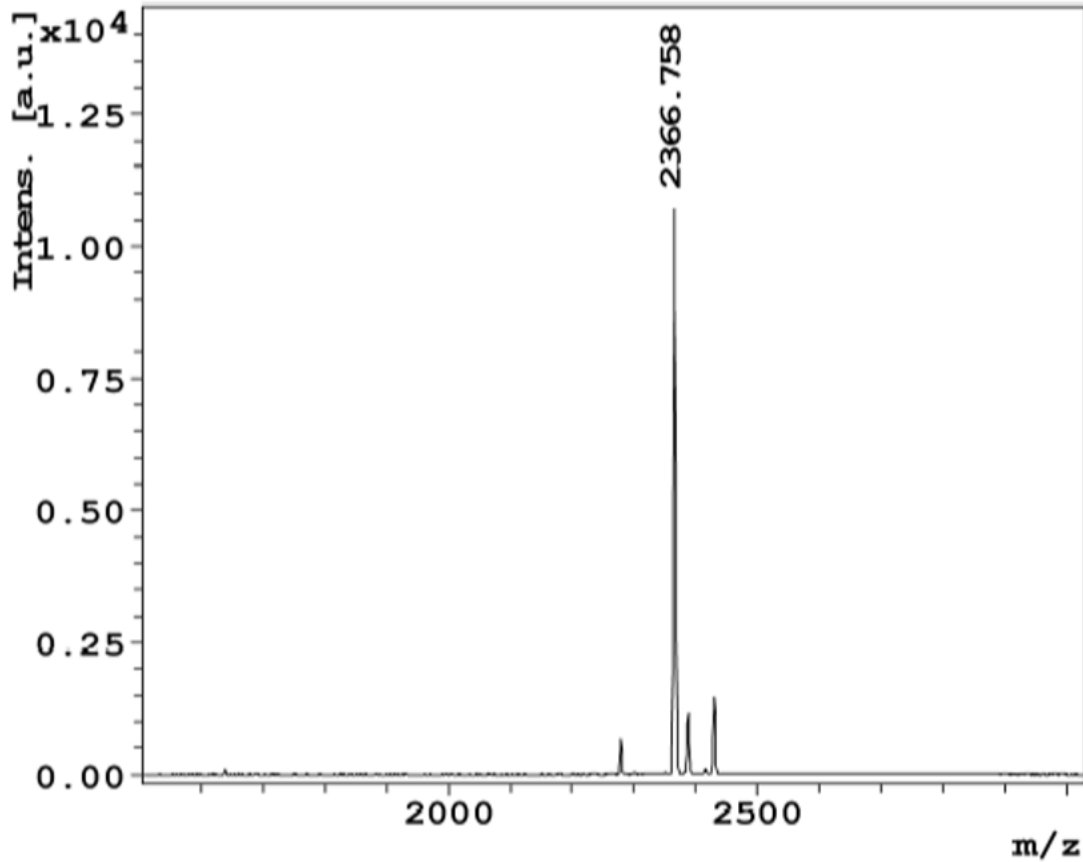


Figura 3. Cromatograma y espectro de masas del péptido ΔM . (A) Cromatograma por HPLC en fase reversa. (B) Espectro de masas por MALDI-TOF.

3.3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Al evaluar la actividad antibacteriana se encontró que, el péptido modificado tiene mejor actividad bactericida para la *S. aureus* requiriendo una menor concentración para inhibir el crecimiento de dicha bacteria, sin embargo, no se observaron los mismos resultados para la *Salmonella typhimurium* ATCC14028, ya que en este caso el péptido WT empleó menor concentración tal y como se muestra en la tabla 2. Esto sugiere que las sustituciones realizadas aumentan la selectividad hacia bacterias Gram-positivas.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de ambos péptidos.

CEPA	PÉPTIDO WT	PÉPTIDO ΔM
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028.	62,5	125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25213	250	62,5

El Aliteseryn-1c es de interés, ya que presenta una actividad antibacteriana frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).

Los resultados descritos en la tabla 2 sugieren que la actividad antibacteriana no está directamente relacionada con el número de cargas positivas de los péptidos, ya que se observó que el péptido WT presento mayor actividad en *S. typhimurium* (Gram-negativa), mientras que el péptido Δ M exhibió mejor actividad en *S. aureus* (Gram-positiva), si bien, el principal mecanismo de acción propuesto para péptidos antimicrobianos, corresponde a la permeabilización de las membranas bacterianas, la cual, se desarrolla a través de un proceso que consiste inicialmente en una interacción electrostática entre los residuos catiónicos y los LPS de la membrana externa (bacterias Gram negativas), o los ácidos teicoicos o lipoteicoicos (bacterias Gram positivas) permitiendo el acercamiento del péptido a la membrana¹⁷. Sin embargo, en este caso se observó que la actividad antibacteriana encontrada frente a *S. typhimurium*, fue mejor para el péptido WT que tiene menor carga catiónica, lo que puede indicar que la actividad puede estar mediada también por otros factores determinantes como la conformación espacial específica de la molécula y/o la asimetría de cargas¹⁸.

La poca actividad mostrada por el péptido +5 podría deberse al impedimento de cruzar la membrana Gram-negativa externa para alcanzar la membrana interna, como consecuencia de la hidrofobicidad disminuida al realizar el cambio de Alanina por Serina en la cara polar¹⁹. Por lo tanto, la hidrofobicidad es un parámetro importante para la actividad antibacteriana del péptido, ya que controla la medida en que el péptido puede insertarse en el núcleo hidrófobo de la membrana²⁰.

Los péptidos con carga +2 y carga +5 pueden ser atraídos electrostáticamente por los grupos aniónicos, peptidoglicano y los grupos fosfatos de los ácidos teicoicos que se encuentran hacia el exterior de la pared celular de las bacterias Gram-positivas debido a los grupos amino que poseen ambos péptidos²¹. Los fosfolípidos aniónicos constituyen el 62% de las membranas anionicas de *S. aureus*, por lo tanto, contribuyen a la atracción electrostática del péptido²⁰. En las bacterias Gram negativas el mecanismo de acción se basa en la vía de absorción auto-promovida en el que el péptido catiónico desplaza a los cationes divalentes asociados a los lipopolisacaridos (LPS), desestabilizando el complejo macromolecular y

facilitando la internalización del péptido a la membrana interna²², provocando la letalidad de la bacteria.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que el péptido con carga +2 presentó una mayor actividad frente a las bacterias Gram-negativas, mientras que el péptido con carga +5 fue en las bacterias Gram-positivas, por tanto, se podría plantear que la carga no tiene una relación directa con la actividad antibacteriana. Giangaspero et al., reportó que un análogo del péptido P19 con carga neta aumentada hasta +8, mostró una mejor actividad antimicrobiana en levaduras pero una actividad reducida en bacterias²³. En otro estudio realizado por Jiang et al., se evidenció que los péptidos con carga de +8 tenían la mayor actividad en bacterias Gram-negativas, pero una actividad reducida frente a bacterias Gram-positivas en comparación a su análogo +6²⁴.

La pared celular de las bacterias Gram-positivas es más gruesa que la pared de las Gram-negativa y difícilmente podría atravesarla un péptido dimerizado. En el caso del péptido con carga +5, que es más catiónico, las cadenas peptídicas pueden repelerse evitando la dimerización y facilitando la difusión a través de la pared celular gruesa²⁴, mientras que el péptido con carga +2, necesitará una concentración umbral más alta para atravesar la pared. Además, la arginina en la posición 4 de la secuencia del péptido con carga +5, desempeñaría un papel importante en la interacción con las membranas Gram-positivas, ya que la cadena lateral de la arginina puede aproximarse a la cabeza de fosfatidilglicerol (PG) a una distancia de 5 Å²⁵. De hecho, la arginina tiene la capacidad de internalizar los péptidos a través de las membranas²⁶.

La actividad antibacteriana del péptido con carga +5 en bacterias Gram-negativas se redujo. Esto puede deberse al impedimento de cruzar la membrana externa para alcanzar el espacio periplásmico y la membrana interna, ya que la reducción de los aminoácidos apolares puede disminuir la capacidad de insertarse en el núcleo hidrofóbico de la membrana externa o interna, debido a la disminución de la afinidad por los lípidos; pues bien, la hidrofobicidad es un parámetro importante para la actividad antibacteriana del péptido. En un estudio previo se determinó que la reducción de la hidrofobicidad debido a la ausencia de aminoácidos con grandes cadenas laterales alifáticas abolía completamente la actividad en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas²⁴.

3.4. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

La actividad hemolítica de los péptidos se evaluó en eritrocitos humanos. En las concentraciones entre 3,9 y 31,3 µM, no se observó algún efecto hemolítico. En concentraciones más elevadas como 62.5 µM y 125 µM, se observa un efecto de concentración y actividad hemolítica (tabla 3), lisando entre 0,003% y 0,04% de la población total de eritrocitos a la concentración máxima de cada péptido. La concentración mínima hemolítica (MHC) fue de 62.5 µM para ambos péptidos (Figura 4).

Tabla No.3. Porcentaje de la actividad hemolítica medida en eritrocitos humanos.

Concentración (μM)	% HEMOLISIS WT	DVS	% HEMOLISIS ΔM	DVS
125,0	0,0405	0,0016	0,0205	0,0019
62,5	0,0183	0,0041	0,0038	0,0041
31,3	0,0000	0,0016	0,0000	0,0041

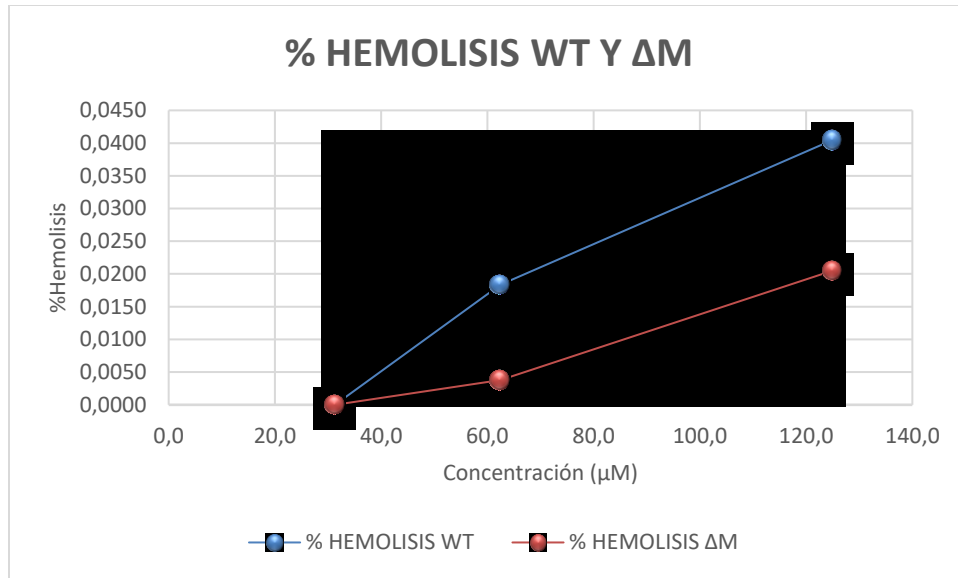


Figura 4. Actividad hemolítica medida en eritrocitos humanos.

CONCLUSIONES

Mediante la Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS), empleando la estrategia Fmoc, se lograron obtener dos péptidos donde una secuencia pertenece al Alyteserin-1c y la segunda a un análogo con sustituciones racionales de algunos residuos, usando un protocolo de síntesis optimizado que incluye el uso de microondas, con el fin de realizar la compleción de secuencias peptídicas de gran longitud alcanzando rendimientos elevados y con poco grado de racemización²⁷. Este resultado nos permite prever que la obtención de estas moléculas es viable, económica y el método es versátil. Los porcentajes de rendimiento de la síntesis sin purificación fue del 29,7% para cada péptido, obteniéndose un rendimiento de purificación de 4,95% y 13,2% para el péptido WT y ΔM , respectivamente; siendo una reacción eficiente que permitió obtener moléculas de puridades adecuadas para los ensayos de actividad antibacteriana y actividad hemolítica.

Se identificó que el péptido WT tiene mejor actividad en la *S. typhimurium*. con una MIC de 62,5 μ M, mientras que el péptido Δ M actuó mejor en la *Staphylococcus aureu*, obteniendo una concentración mínima inhibitoria de 62,5 μ M. En la actividad hemolítica se evidencia una concentración mínima hemolítica del 62,5 μ M en cada péptido.

REFERENCIAS

1. Rice lb. Do we really need new anti-infective drugs? *Current Opinion in Pharmacology*. 2003; 3:459–463. Doi: 10.1016/j.coph.2003.05.001.
2. Instituto de Química, Department of Chemistry, Universidad de Antioquía, Grupo de Biquímica Estructural de Macromoléculas, Medellín, Colombia.
3. Oñate-Garzón, J., Manrique-Moreno, M., *et al.* (2017a) 'Antimicrobial activity and interactions of cationic peptides derived from *Galleria mellonella* cecropin D-like peptide with model membranes', *J Antibiot (Tokyo)*, 70(3), pp. 238–245. doi: 10.1038/ja.2016.134.
4. Zasloff m. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002; 415: 389–395.
5. Yeaman mr, Yount ny. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 2003. 55: 27–55.
6. Powers jp, Hancock re. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. 2003; 24: 1681–1691.
7. Wang g, li x, Wang z. apd2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*. 2009; 37: D933-D937.
8. Brogden nk, Brogden ka. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011, 38: 217–225.
9. Kimmerlin, T.; Seebach, D. "100 years of peptide synthesis": ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to beta-peptide assemblies. *J. Pept. Res.* 2005, 65, 229–60.
10. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2149–2154.
11. Wieland T. The history of peptide chemistry. *ChemInform*. 1996;27(29).
12. Fauchere, J. L. and Pliska, V. (1983) 'Hydrophobic parameters pi of amino acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino acid amides', *European Journal of Medicinal Chemistry*.
13. ATHERTON E. and R.C. Sheppard. *Solid Phase Peptide Synthesis: a practical approach*. IRL Press: Oxford University Press. pp. 9-10.
14. Conlon, J.M.; Demandt, A.; Nielsen, P.F.; Leprince, J.; Vaudry, H.; Woodhams, D.C. The alyteserins: two families of antimicrobial peptides from the skin secretions of the midwife toad *Alytes obstetricans* (Alytidae). *Peptides* 2009, 30, 1069–1073.

15. Bordo, D.; Argos, P. Suggestions for “safe” residue substitutions in site-directed mutagenesis. *J Mol Biol* **1991**, *217*, 721–729.
16. Kappe, C.O. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2004**, *43*, 6250.
17. Andrä J, Lohner K, Blondelle S, Jerala R, Moriyon I, Koch M, et al. Enhancement of endotoxin neutralization by coupling of a C12-alkyl chain to a lactoferrin-derived peptide. *Biochem J.* **2005**; *385*:135–43.
18. Huertas Méndez, N. D. J. Síntesis de péptidos derivados de la lactoferrina bovina y evaluación de su actividad antibacteriana. (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).
19. Lee, T.H.; Hall, K.N.; Aguilar, M.I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Curr Top Med Chem* **2016**, *16*, 25–39.
20. Teixeira, V.; Feio, M.J.; Bastos, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res* **2012**, *51*, 149–177.
21. Sonnenfeld, E. M. *et al.* (1985) ‘Asymmetric distribution of charge on the cell wall of *Bacillus subtilis*’, *Journal of Bacteriology*.
22. Hancock, R. E. (1997) ‘Peptide antibiotics’, *Lancet*, *349*(9049), pp. 418–422.
23. Giangaspero, A., Sandri, L. and Tossi, A. (2001) ‘Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides’, *Eur J Biochem*, *268*(21), pp. 5589–5600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11683882>.
24. Jiang, Z. *et al.* (2008) ‘Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides’, *Biopolymers*, *90*(3), pp. 369–383.
25. Wang, G. (2007) ‘Determination of solution structure and lipid micelle location of an engineered membrane peptide by using one NMR experiment and one sample’, *Biochim Biophys Acta*, *1768*(12), pp. 3271–3281.
26. Mitchell, D. J. *et al.* (2000) ‘Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers’, *J Pept Res*, *56*(5), pp. 318–325. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11095185>.
27. Stacey A. Palasek, Zachary J. Cox, Jonathan M. Collins (2007). Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science* *13* (3): 143-148.