

IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS AISLADOS DEL CARACOL GIGANTE AFRICANO (*Achatina fulica*) Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Richard Andrés Martínez Esquivel

Director

Ruben Eduardo Varela Miranda. MSc, PhD.

Codirector

José Oñate. MSc, PhD.

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2020**

ISO 9001:2015

BUREAU VERITAS
Certification

N° C018.00577



Calle 5 Carrera 62 Campus Pampalinda A.A. 4102 / Teléfono: PBX 5183000
web: www.usc.edu.co / Nit. 890.303.797-1 / Santiago de Cali - Colombia



**IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS AISLADOS DEL CARACOL GIGANTE
AFRICANO (*Achatina fulica*) Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA**

Richard Andrés Martínez Esquivel

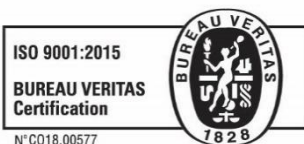
**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título
de: Microbiólogo industrial**

Director
Ruben Eduardo Varela Miranda MSc, PhD
Director
José Oñate MSc, PhD

Línea de Investigación:
Biología
Grupo de Investigación
QUIBIO

**Centro de Estudios e Investigaciones en Ciencias Básicas, Ambientales y
Desarrollo Tecnológico CICBA**

Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Ciudad, Colombia
2020



Calle 5 Carrera 62 Campus Pampalinda A.A. 4102 / Teléfono: PBX 5183000
web: www.usc.edu.co / Nit. 890.303.797-1 / Santiago de Cali - Colombia



IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social	Participante: XVI Encuentro de Investigación Formativa 2020.	Comunidad en general
Científico	Identificación de péptidos en proceso (España)	Comunidad en general
Indicadores de Gestión Tecnológico	Solicitud de permisos de ética	Personal y académico
Técnico	Pasantía investigativa sede de investigación universitaria Universidad de Antioquia (SIU)	Investigador tesista
Ambiental	Proyecto colaborativo con el DAGMA-VALLE	Departamento de gestión del medio ambiente
Social		
Cultural		

ISO 9001:2015

BUREAU VERITAS
Certification

N° C018.00577



Calle 5 Carrera 62 Campus Pampalinda A.A. 4102 / Teléfono: PBX 5183000
 web: www.usc.edu.co / Nit. 890.303.797-1 / Santiago de Cali - Colombia



IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS AISLADOS DEL CARACOL GIGANTE AFRICANO (*Achatina fulica*) Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Richard Andrés Martínez Esquivel, José Oñate y Ruben Varela Miranda

¹Grupo de investigación en QUIBIO, Programa de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Calle 5 # 62-00, Santiago de Cali. Colombia. ^{2,3,4} Docente, Facultad de Ciencias Básicas.

RESUMEN

Los caracoles, por su potencial en bioprospección, se han estudiado en diferentes escenarios, siendo uno de ellos la obtención de péptidos con actividad terapéutica a partir de la baba de caracol africano ya que se han identificado péptidos antitumorales y para uso cosmético en esta especie. La rápida diseminación de microorganismos resistentes a antibióticos en las últimas décadas y el poco desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos ha representado un problema significativo en la salud pública a nivel mundial. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas para el diseño de nuevos fármacos, por ejemplo, los péptidos antimicrobianos a partir de baba de caracol del tipo (PAMs).

Para la extracción de péptidos a partir de la baba de caracol africano se utilizó el reactivo *TRI Reagent*® como método de extracción de proteínas totales, con un previo tratamiento con N-acetilcisteína para la eliminación de la mucina presente en la baba y así mejorar la calidad de la muestra. Posteriormente, las proteínas extraídas y filtradas con AMICON se visualizaron mediante geles SDS con tricina al 14 y 16%, obteniéndose bandas pequeñas principalmente

por debajo de los 10 KDa, confirmando la presencia de péptidos, a pesar de ello el extracto evaluado no presentó actividad antimicrobiana.

Por último, los datos del CIC (Centro de Investigación del Cáncer) de España también reportaron el aislamiento de péptidos en las muestras; sin embargo, está pendiente su identificación y síntesis para la evaluación de su actividad antimicrobiana con péptidos puros y en concentraciones adecuadas. Dichos resultados validan que la metodología utilizada es apropiada para el aislamiento de péptidos de la baba del caracol africano en aislados de la ciudad de Cali.

Palabras clave: CARACOL AFRICANO, PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS, TRIZOL



Calle 5 Carrera 62 Campus Pampalinda A.A. 4102 / Teléfono: PBX 5183000
web: www.usc.edu.co / Nit. 890.303.797-1 / Santiago de Cali - Colombia



IDENTIFICATION OF ISOLATED PEPTIDES OF THE AFRICAN GIANT SNAIL (*Achatina fulica*) AND STUDY OF ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY

ABSTRACT

Snails, due to their potential in bioprospecting, have been studied in different settings, one of which is obtaining peptides with therapeutic activity from African snail slime, since antitumor and cosmetic peptides have been identified in this species. The rapid spread of antibiotic-resistant microorganisms in recent decades and the poor development of new antimicrobial drugs has represented a significant public health problem worldwide. Therefore, it is necessary to look for alternatives for the design of new drugs, for example, antimicrobial peptides from snail slime type (PAMs).

For the extraction of peptides from the African snail slime, the TRI Reagent®, reagent was used as a total protein extraction method, with a previous treatment with N-acetylcysteine for the elimination of the mucin present in the slime and thus improve the sample quality. Subsequently, the proteins extracted and filtered with AMICON were visualized with SDS gels with tricine at 14 and 16%, obtaining small bands mainly below 10 KDa, confirming the presence of peptides, despite this, the extract evaluated did not show antimicrobial activity.

Finally, the data from the CIC (Cancer Research Center) of Spain also reported the isolation of peptides in the samples; however, its identification and synthesis are pending for the evaluation of its antimicrobial activity with pure peptides and in adequate concentrations. These results validate that the methodology used is appropriate for the isolation of peptides from the African snail slime in isolates from the city of Cali.



Keywords: AFRICAN SNAIL, ANTIMICROBIAL PEPTIDES, TRIZOL

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial De la salud (OMS), la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno en el cual un organismo deja de ser sensible a un antibiótico [1]. La resistencia a los antibióticos es un fenómeno preocupante, tanto en el ámbito nacional como internacional, representa una amenaza a la salud mundial debido a que los tratamientos habituales dejan de ser eficaces.

En el año 2006 en Colombia se reportó por primera vez la aparición de bacterias productoras de carbapenemasas, específicamente *Klebsiella pneumoniae*, y desde entonces la INS (Instituto Nacional de Salud) reportó un aumento significativo de la resistencia de estas al antibiótico. Ejemplo de ello, fueron encontradas cepas de *E. coli* resistentes a cefalosporinas en un porcentaje del 30.8 al 38.3%, la resistencias de *Klebsiella spp* a carbapenémicos en un rango de 9.5 a 10.9% y en el caso de organismos no fermentadores como *A. baumannii* y *P.aeruginosa*, la resistencia a carbapenémicos reporto rangos entre 46.6 a 64% y 25.8% hasta 28.4% respectivamente [2][3]. A esto se suman acciones comunes que aumentan la problemática, la automedicación, la toma de dosis sub-óptimas, un inadecuado sistema de control y un deficiente seguimiento a los esquemas de tratamiento con antibióticos por parte de los sistemas de salud. Son algunos de los factores que afectan el control de diversas enfermedades infecciosas en Colombia [4][5][6][7].

Desde hace aproximadamente 200 años El caracol gigante africano se ha diseminado desde su lugar de origen, África, hacia el resto del mundo. Sus capacidades adaptativa, reproductiva

y polifagia además de ser vector y huésped, tanto de protozoos como nematodos, lo convierten en prioridad para los sistemas de salud pública y organismos de control ambiental [8] [9][10]. Recientes estudios han demostrado que la baba del caracol gigante africano, el caracol común de jardín (*Helix aspersa*) y también el veneno de caracoles marinos depredadores de la familia de los cónidos, contiene un gran número de componentes activos, entre los que se encuentran algunos benéficos para la piel humana como la alatonina, ácido glicólico y otros con efecto antienviejamiento. Pero el factor más importante y el objetivo de este estudio, es la presencia de moléculas con capacidad antimicrobiana en del caracol africano [11][12][13]. Se estima que la baba es un buen producto biológico por su fácil extracción y accesibilidad para la identificación moléculas antimicrobianas.

Los péptidos antimicrobianos son pequeñas proteínas que forman parte del sistema inmune innato de muchos seres vivos, como plantas, animales, hongos, protozoos e incluso bacterias[14]. Estas moléculas tienen un amplio espectro de acción contra bacterias, hongos, incluso virus, y son especialmente abundantes, fáciles de aislar y analizar de organismos que los secreten al exterior como parte de su mecanismo de defensa, tales como los caracoles y las babosas. Estos PAMS (péptidos antimicrobianos) son oligopéptidos compuestos hasta de 100 aminoácidos cuyas conformaciones pueden ir desde α -hélices hasta β -hojas o ambas; otra de sus características es la tendencia a tener carga catiónica, además de actividad hidrofóbica y anfipática, siendo estas las que les atribuyen la capacidad de atacar diferentes estructuras, sean de hongos, virus, protozoos, tumores o bacterias gram positivas y negativas [15]–[17]. Nosotros, teniendo en cuenta el potencial de bioprospección del caracol africano, pretendemos en este estudio de Investigación encontrar péptidos con potencial antimicrobiano.

MATERIALES Y METODOS

Recolección de la baba de caracol.

Los caracoles africanos (*A. fulica*) se obtuvieron de las comunas 19 y 21 de la ciudad de Cali después de ser recolectados por la autoridad ambiental del municipio (DAGMA-Cali), los caracoles seleccionados deben tener un peso promedio entre 10 a 15 gr. La baba fue recolectada en el laboratorio del pie y concha del caracol, el volumen de recolección de muestra fue de 10 mL. El transporte de los especímenes se realizó en recipiente duro y hermético plástico, garantizando la seguridad del animal hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio estos fueron lavados con agua destilada y estimulados mediante un pequeño pulso eléctrico directamente en el pie del caracol, se les aplicaron 9 V a 500 Mah (véase Figura 1) con una duración de 9 segundos, pulsos aplicados dependiendo del tiempo que tarde el caracol en liberar la baba más espesa, después del estímulo se devuelve a la caja y se deja para su completa recuperación; el procedimiento continuó hasta recolectada la cantidad de baba necesaria, como se mencionó anteriormente 10 ml. En caso de no usarse la baba inmediatamente se almacenara a -20°C para su posterior uso (véase anexo 1).

Después de la obtención de la baba, los caracoles vivos se entregarán al DAGMA-Cali para su disposición final. Este proyecto cuenta con permiso de ética de la USC para la manipulación y estudio del caracol gigante africano y permiso del DAGMA, como entidad cooperante.

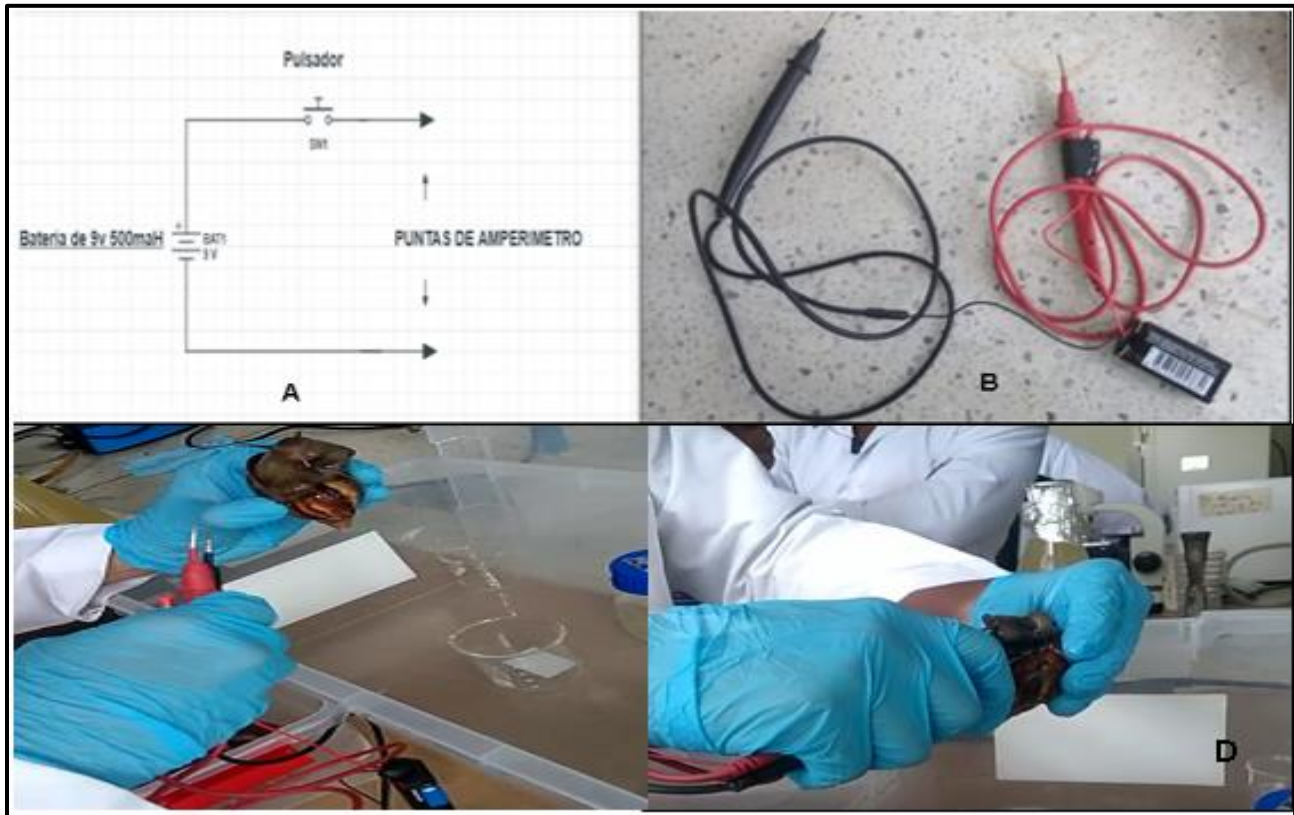


Figura 1. Diagrama eléctrico del estimulador (A), electro-estimulador (B), trabajo con el estimulador para extracción de baba de caracol (C y D)

Estandarización de los métodos.

La recolección de la baba se efectuó a lo largo de múltiples recolectas realizadas por el DAGMA-Cali, cada uno de los extractos se procesó siguiendo el protocolo estándar del TRI reagent, incluyendo los lavados con alcohol al final el proceso de precipitación del pellet con isopropanol. En total se realizaron dos extracciones por grupo de caracoles recolectados, obteniéndose un total de 8 muestras inicialmente. El procedimiento se realizó a partir de 10 mL

de baba e igual cantidad de reactivo en relación 1:1, obteniendo como resultado un pellet de consistencia mucosa, los pellets fueron liofilizados y almacenados a -20°C . La recolección y extracción se llevó a cabo a lo largo de tres meses.

Los 8 pellets fueron re-suspendidos en 0.5 mL de solución de PBS (Bufer Fosfato Salino) 1X pH 7.4, pero no se logró una disolución total, así que se agregaron 0.5 ml más para un total de 1mL de muestra que aun presentaba consistencia viscosa la cual dificultaba su manejo. Estas muestras se montaron en geles SDS page con tricina al 16% y se realizó una tinción estándar de proteínas en gel, que se visualizó en en IMAGE SCANNER III LabScan (GE Healthcare), donde fácilmente logró observarse una banda tenue alrededor de los 10kDa; el procedimiento se repitió aumentando la concentración de la muestra de proteínas de 20 μL a 60 μL de muestra, observándose mejor definición de las muestras después del cambio de contraste (véase Figura 2).

Teniendo en cuenta los resultados, al protocolo de extracción de proteínas se le realizo un cambio adicionándole un disolvente de la mucina conocido como N-acetil-Cisteina y se omitieron los lavados de los pellets con etanol después de la precipitación, logrando una gran mejoría, no solo en calidad de la muestra para su majeo al eliminarse la viscosidad sino también una mejoría sustancial en la resolución de las proteínas.

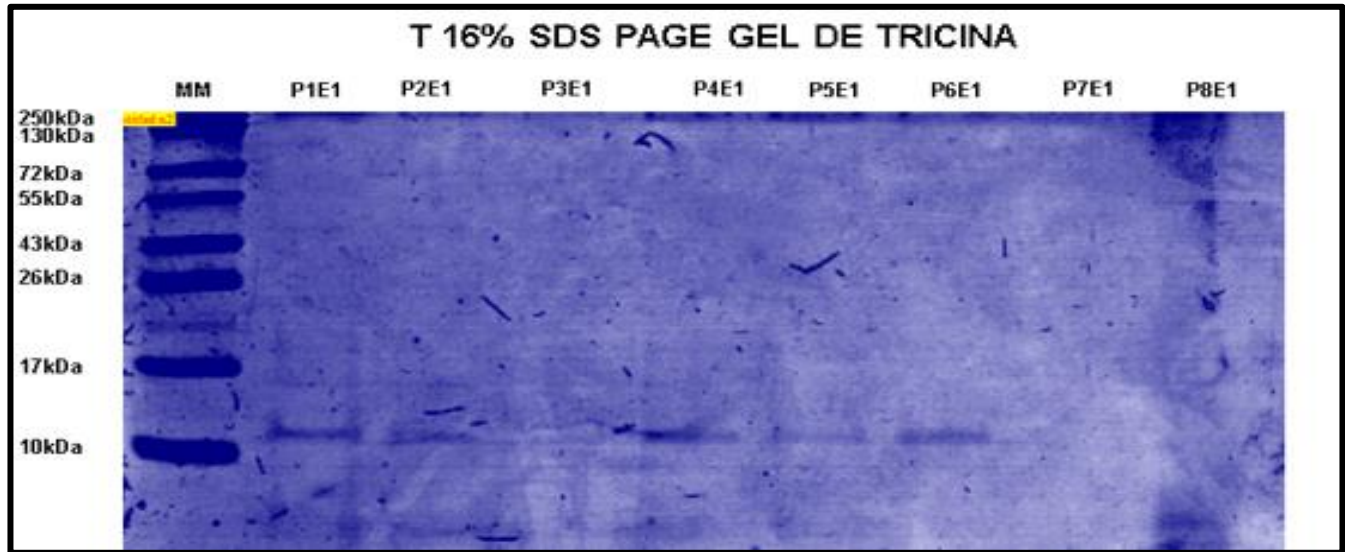


Figura 2. Visualización de los 8 extractos procesados. Las bandas peptídicas son visibles alrededor del marcador de 10 kDa, se utilizó el software de IMAGE SCANNER III LabScan de la empresa GE Healthcare, en la imagen MM es el marcador de peso molecular. La “P” de los carriles indica el número de extracción y “E” la repetición de la extracción.

Extracción de proteínas.

Para la extracción de proteínas se realizó con un protocolo modificado usando el reactivo TRI Reagent de Sigma Aldrich®.

Preparación de la muestra y separación de la mucina.

Debido a la naturaleza de la muestra (baba de caracol), que no está estandarizada en el protocolo base del TRI reagent, no se necesitó tratamiento previo, pues esta no contenía material celular considerable. Sin embargo, a 10 ml de baba de caracol se le agregó 1 mL de una solución de N-acetil Cisteína (La Santé), con una concentración de 600mg/mL y se dejó en agitación durante 30 minutos a 4°C. Logrando separar la mucina de su parte acuosa donde son contenidas las proteínas, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C para separar fácilmente la fase acuosa de la sólida. Se tomó la fase acuosa y se recolecto en dos tubos falcón con capacidad de 15 ml.

Extracción de proteínas por TRI reagent.

A cada tubo se le agrego 1 ml de TRI reagent y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos, posterior a eso se centrifugo a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, precipitando cualquier material insoluble que haya podido quedar de la extracción de la fase acuosa. Posteriormente se agregó 0.2mL de cloroformo y se agito vigorosamente para iniciar la fase de separación, se dejó 15 minutos en reposo a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugo a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C para separar las tres fases y se recolecto la fase acuosa (incolora en la parte superior) para los siguientes pasos.

A los sobrenadantes se les agrego 1 mL de etanol absoluto para precipitar cualquier rastro de ADN que se encontrara en la muestra, se dejó en reposo durante 3 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugarse a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se trasvaso de nuevo el sobrenadante a un nuevo tubo.

Al sobrenadante obtenido se le agrego 1.5 mL de 2-propanol y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido a esto se centrifugo a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C donde se obtuvo un pellet blanquecino por tubo (No se realizó los lavados posteriores descritos en el protocolo debido a la posible pérdida de los péptidos debido a su solubilidad)[18][19][20][21]. El procedimiento se repitió una vez más con nuevos caracoles. Los dos pellets y sus copias fueron liofilizados durante 4 horas y conservados a -20°C (una copia de los dos aislamientos fue enviada a realizar la separación de proteínas mediante electroforesis e identificación mediante equipos LC-MS/MS que constan de un sistema de cromatografía líquida nanoUPLC nanoAcquity (Waters) acoplado a un equipo de espectrometría de masas LTQ Orbitrap velos con ETD (Thermo) en la CIC (centro de investigación del cancer) de la universidad de Salamanca España.

Cuantificación de proteína y SDS page.

La cuantificación de proteína se efectuó mediante Pierce™ BCA Protein Assay Kit, preparándose una solución de trabajo de 16 mL, mezclando 16 mL de reactivo A con 0,32mL de reactivo B. Para la curva de calibración se preparó un estándar de 2mg/mL de BSA (bovin serum albumin) para la preparación de los estándares de 1.00, 0.500, 0.250, 0.125 y 0.625 mg/mL. A los cuales se les agrego 2 mL de la solución de trabajo a cada uno, las muestras se re-suspendieron en 0.5 mL de PBS 1X y se filtraron en columnas amicon ultra centrifugar filter de 10kDa, permitiendo solo el paso de moléculas igual o menores a 10kDa.

Se tomaron 0.1mL de los estándares de proteína a los cuales se les agrego 20mL de la solución de trabajo. Para la evaluación de los extractos filtrados se tomó 25 µl a los cuales se les agrego

250 μ l de la solución de trabajo, los estándares y los extractos se incubaron a 37°C durante 30 min y se leyeron a 562nm en el espectrofotómetro[22] [23][24].

Para la visualización de proteínas se realizó SDS page en la SIU (sede de investigación universitaria en la universidad de Antioquia). Para la preparación del gel de tricina de 14% se usó 0.6mL de ddH₂O, 1.66mL de 3M tris HCl/SDS pH 8.45, 1.75mL de acrilamida al 40%, 1mL de glicerol 0.02mL de APS al 10% y 0.005mL de TEMED; para el gel con una concentración del 16% se usó 0.35mL de ddH₂O, 1.66mL de 3M tris HCl/SDS pH8.45, 2.00 mL de acrilamida al 40%, 1mL de glicerol, 0.02mL de APS al 10% y 0.005mL de TEMED.

Se preparó el regulador del ánodo pesando 6.057g de Tris, se disolvió en agua (Aprox 150 ml), se ajustó a pH 8.9 con HCl y aforo a 250ml. Para el regulador del cátodo se pesó 1 g de SDS, 12.08g de tris, 17.88g de tricina se disolvió y aforo a 1L. Para el regulador del gel se pesó 90.855 g de tris y 0.75 de SDS. Se disolvió y ajusto a pH 8.45 finalmente se aforo a 250ml de agua y Para la solución de tinción se usaron 100 ml de ácido acético 900 ml H₂O: Metanol (1:1) y 2.5 g azul de Comasie G-250 todo aforado a un litro Agua.

La solución de desteñido se realizó con 100 ml de ácido acético y 900 ml ddH₂O: Metanol (1:1). La corrida de las muestras se realizó con gel de tricina a una concentración del 14% y 16% con voltaje de 120V durante 90 minutos, se trabajó con la proteína nativa por lo que las muestras no se trataron con β -mercaptoetanol. Para evitar la posible pérdida de los péptidos por evaporación durante el tratamiento térmico necesario al usarse β -mercaptoetanol[25], Para mejorar la visualización de las bandas los geles se visualizaron y escanearon en IMAGE SCANNER III LabScan de la empresa GE Healthcare

Prueba de sensibilidad antimicrobiana.

Las pruebas antimicrobianas se realizaron con *E. coli* y *S. aureus* activados en caldo Mueller-Hinton, sembrados posteriormente en agar Mueller Hinton para separar las colonias usadas para preparar un inóculo ajustado una escala de McFarland 0.5 con una concentración aproximada de 1×10^8 células. Se toman 10 μ l de los extractos P7 Y P8 a concentraciones de 0.43 y 1.58 mg/mL, se agregaron en la primera columna de pozos de la microplaca, con 90 μ l de medio estéril, se diluyo secuencialmente hasta llegar al pozo 6 de cada fila. Se ejecutaron controles de medio solo y con extracto y controles del crecimiento bacteriano. Después de 24 horas de crecimiento se le agrego 10 μ l de reactivo de resazurina y se dejó incubando durante 45 minutos. [26]–[29].

RESULTADOS.

Los caracoles recolectados por su tamaño ya tenían una edad adulta, lo que permitió una fácil recolección de la baba. El estado adulto garantiza que estos animales ya han sido expuestos a muchos patógenos durante su tránsito normal en tierra. Así pues, La primera recolección se realizó en el barrio potrero grande de la comuna 21 en el Jarillón y la segunda en el barrio la cascada de la comuna 19 por los alrededores de la Universidad Santiago De Cali, en ambos casos se tomaron 7 individuos para realizar la extracción de baba.

En la primera fase de recuperación de la baba, mediante estimulación eléctrica, que fue desarrollada (véase Figura 1) con 7 individuos, se logró una recolección aproximada de 10 a 20 ml. Este material, después de un proceso de separación y purificación, se encontró que las

muestras P7 Y P8 tenían una concentración de 0.43 y 1.58 mg/mL en una curva de calibración con un $r^2=0.985$ (véase figura 3).

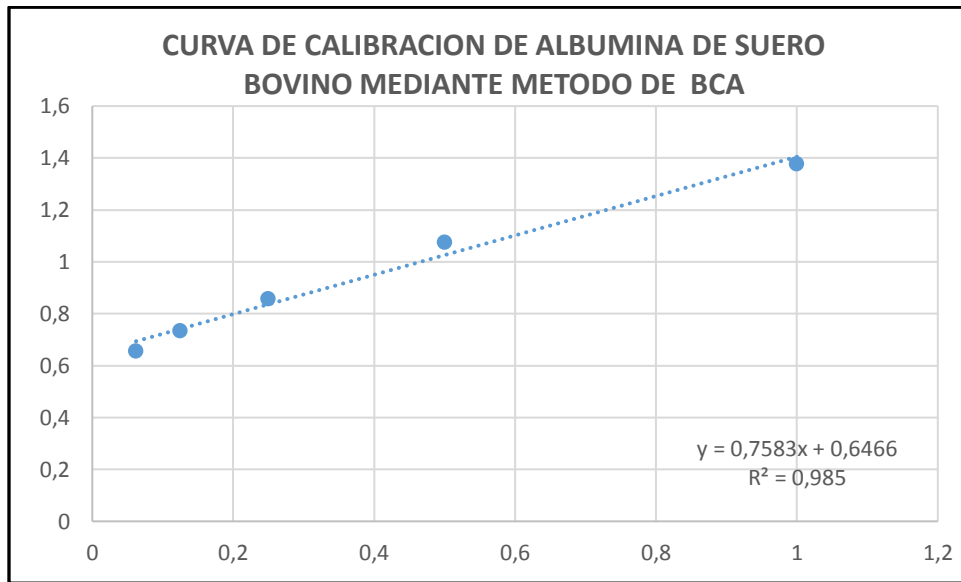


Figura 3.

Curva de calibración usando albumina de suero bovino mediante método de BCA (Ácido Bicinconínico), lectura de los datos realizada a una longitud de onda 562 nm.

Después de cuantificada la concentración de las proteínas se procedió a su posterior visualización mediante la técnica de SDS page en gel de tricina de 14 y 16%. Mediante esta técnica se logro ver la calidad de la proteína y el tamaño de estas, encontrándose en un peso molecular menos a 10kDa, un valor esperado en la búsqueda de péptidos.

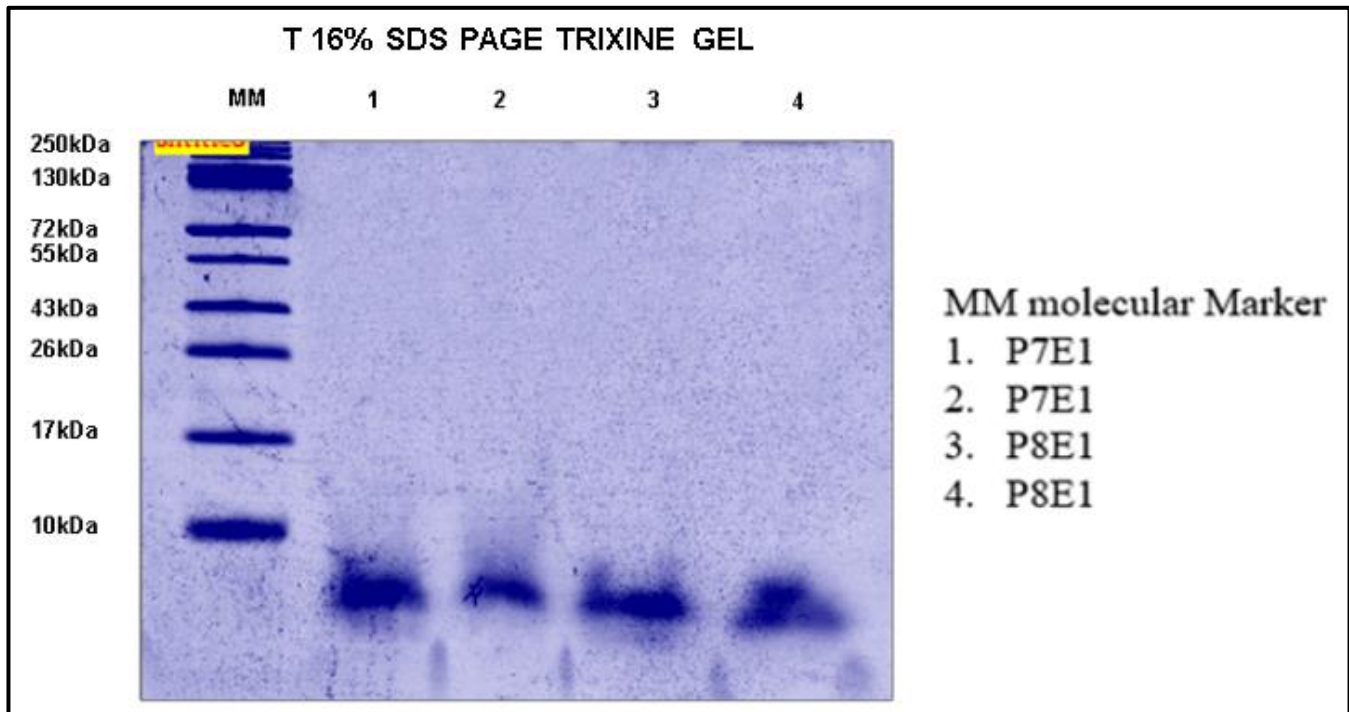


Figura 4. Gel de tricina a una concentración del 16% de poliacrilamida con muestras sin tratamiento de mercaptoetanol a un voltaje de 150V durante 90 minutos con un marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa.

En el montaje de SDS page en gel en tricina al 16% se lograron observar las bandas de proteínas con un tamaño menor a 10 kDa, confirmando la presencia de péptidos. Teniendo en cuenta que se buscan péptidos de bajo peso molecular, el segundo paso fue concentrar el gel al 14% para mejorar la resolución y se observó una separación adicional de bandas de menor tamaño; lo que indica posiblemente una mezcla de péptidos en la muestra analizada.

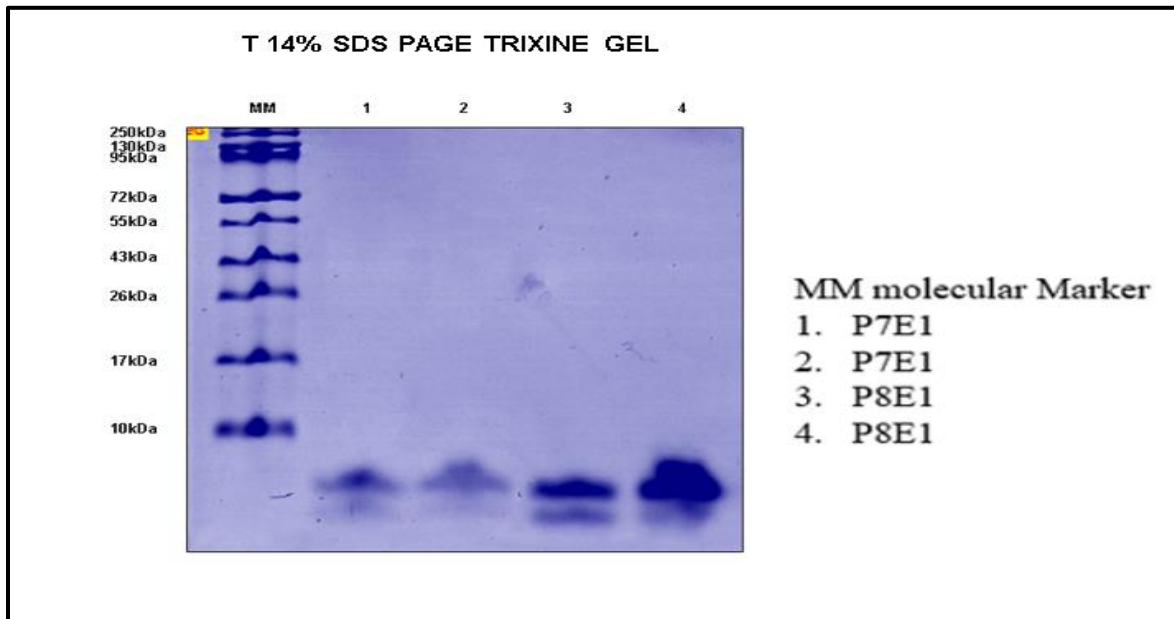


Figura 5. Gel de tricina a una concentración del 14% de poliacrilamida con muestras sin tratamiento de mercaptoetanol a un voltaje de 150V durante 90 minutos con un marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa.

Identificación de péptidos.

Las muestras de baba fueron purificadas, procesadas y liofilizadas en Colombia, se enviaron al Servicio de Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca que cuenta con certificado de Calidad ISO 9000, en la comunidad europea. Este laboratorio cuenta con Equipos de separación y tecnología de punta para este propósito.

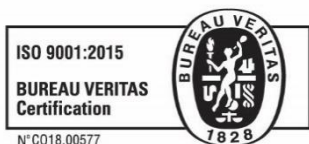
Alguna tecnología reportada por el laboratorio:

Ettan IPGPHOR, Ettan Dalt-6 Electrophoresis system, Hoefer SE 600 Ruby y Hoefer miniVE electrophoresis (Amersham, GEHealthcare) y Protean Xi cell (Bio-Rad), HPLC1100 series (Agilent), 3100 OFFGEL (Agilent), Equipos LC-MS/MS: NanoAcquity (Waters)-LTQ Orbitrap velos ETD (Thermo), NanoElute-TIMSTOF PRO (Bruker).

Separación de péptidos y proteínas. electroforesis: geles de las siguientes dimensiones: 10x8 cm (minigel); 16x14 cm; 18,5x20 cm; 26x22 cm. Realizan diferentes tipos de tinciones compatibles con espectrometría de masas. Electroforesis Bidimensional, isoelectroenfoces en tiras de 7, 13, 18 o 24 cms y una segunda dimensión de 10x8 (minigel), 16x14, 18.5x20 o 26x22 cms. Tinciones compatibles con espectrometría de masas. Fraccionamiento por punto isoelectrico OFFGEL, Fraccionamos péptidos y proteínas en tiras de 12 y 24 cms de acuerdo a su punto isoelectrico en el sistema Agilent OFFGEL 3100. Fraccionamiento por HPLC, HPLC 1100 series analítico (Agilent) para el fraccionamiento de proteínas o péptido, Micro fraccionamiento por SPE y filtros de SPE para fraccionar o desalar muestras de péptidos. Actualmente, este laboratorio reporto la presencia de péptidos en las muestras y estamos a la espera de la identificación.

Prueba antimicrobiana con extractos totales de péptidos sin purificación.

La reducción de la resarzuina (azul) a resorfurina (rosa), muestra una actividad metabólica activa en las células de los pozos inoculados con bacterias, tanto los que contenían el extracto como en los controles de crecimiento positivo. Los controles negativos del medio de cultivo y moléculas no presentan cambios confirmando la esterilidad del extracto y el medio.



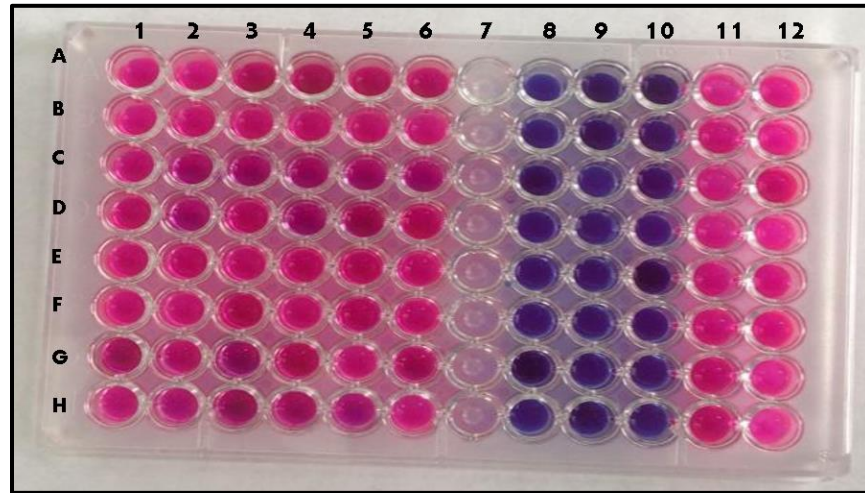


Figura 6. Cultivo en microplaca de dilución seriada del extracto proteico. Las diluciones seriadas se clasifican por columnas y filas donde las columnas reciben una numeración de 1 a 12 comenzando de izquierda a derecha y las filas se nombran con las letras de la A hasta la H. las filas A1 B1 y E1 F1 hasta A6 B6 7 E6 F6 corresponden a *E. coli* con su réplica para los extractos P7 y P8 respectivamente. Las filas C1 D1 y G1 H1 hasta C6 D6 y G6 H6 corresponden al cultivo de *S. aureus* con su réplica para los extractos P7 y P8 respectivamente. Los pozos A11, A12, B1, B12, E11, E12, F11 y F12 corresponden al control de crecimiento de *E. coli* solo con medio, sin extracto agregado; los pozos C11, C12, D11, D12, G11, G12, H11 y H12 corresponden al control de crecimiento de *S. aureus* solo con medio sin extracto agregado. La columna numero 8 corresponde a control de crecimiento negativo solo con el medio sin la adición de moléculas, las columnas 9 y 10 respectivamente corresponden a control de crecimiento negativo de medio con molécula sin la adición de inóculo.

DISCUSIÓN

Entre las diferentes formas de extracción de la baba del caracol, la estimulación eléctrica es la más efectiva para los análisis y procedimientos de cuantificación e identificación de péptidos. Otros métodos como la extracción con soluciones estimulantes agregan componentes a la muestra que afectarían la calidad de los resultados, durante procesos como la espectrofotometría de masas. El estímulo eléctrico es el método más fácil de aplicar, el menos exigente en términos de maquinaria y con cero insumos para su realización (véase Figura 1) [30] además, las cantidades de baba obtenidas son apropiadas para el uso de reactivos como el TRI reagent, que se debe usar a una proporción de 10/1 respecto a la muestra [21].

La extracción de proteínas mediante TRI reagent se ve facilitada por el poco tiempo necesario para la purificación, además de mostrar una gran eficiencia en la recuperación de péptidos provenientes de diferentes tejidos según lo mostrado por Nolan, R. L., & Teller, J. K [31]. Para la extracción de proteínas mediante el uso de este reactivo se obtuvieron los pellets esperados por la precipitación de proteínas con isopropanol [32][33] pero fue necesario modificar la última fase del protocolo que mencionaba el triple lavado con etanol al 96% para eliminar rastros del reactivo, debido a que en este paso se solubilizaba el pellet precipitado por completo y se debía recuperar con la adición de isopropanol, esto se debe a la gran solubilidad que tienen estos péptidos en agua (véase Figura 2) [34][35].

Se identificó como un extracto peptídico al momento de realizarse la filtración mediante la columna amicon ultra centrifugal filter de 10 kDa, donde solo se permitió el paso de moléculas menores o iguales al tamaño mencionado.

Los péptidos en general suelen estar conformados por menos de 100 aminoácidos sin superar un tamaño de 10 kDa para aquellos que presenten actividad antimicrobiana, en concordancia con los tamaños promedios de otros péptidos con esta misma capacidad, como lo son las defensinas que oscilan entre un tamaño de 1 a 3 kDa aislada de humanos, la Apamina y Andropina sintetizados a partir de secuencias de bases de datos, la Mytimacina-AF y Hemocyanin β c-HaH aislados de caracol gigante africano que se encuentran en este mismo rango de tamaño [36][37][38]. En la visualización mediante SDS page se seleccionó una concentración del 16%, recomendada por los autores para la separación de proteínas tipo péptido a un voltaje de 120 V durante 90 minutos [39], la obtención de las bandas (véase figura 4), confirmo la presencia de proteínas por debajo del marcador de 10 kDa, tanto en la muestra inicial como en su copia para ambas extracciones. Se repitió el procedimiento con una concentración de gel del 14% para lograr una mejor definición de la banda de proteínas, se pudo observar una segunda banda más tenue debajo de la primera encontrada (véase figura 5), esto indica la presencia de péptidos de diferentes tamaños en los extractos de la baba de caracol [40][41]. Estos péptidos fueron aislados en las muestras analizadas en España.

En la prueba de concentración mínima inhibitoria contra *Echerichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923, con diluciones seriadas del extracto proteico, partiendo de las concentraciones conocidas de 0.43 para el extracto P7 y 1.58 mg/mL para el extracto P8, trabajando con un porcentaje por pozo de 10% del extracto en diluciones seriadas las concentraciones serian 0.043 , 0.021, 0.010, 0.005, 0.002, 0.001 y 0.158, 0.079, 0.039, 0.019, 0.009, 0.005 mg/mL respectivamente. Después de 24 horas de inoculadas las bacterias y el extracto se evidencia en el fondo de todos los pozos, a excepción de los controles negativos, un botón de crecimiento. Se evalúa la actividad celular mediante el método de resarzurina,

permitiendo identificar la actividad metabólica; después de 45 minutos de incubación a 37°C, todos los pozos inoculados con bacterias presentaron actividad metabólica activa (véase figura 6), lo que indica que las moléculas evaluadas podrían encontrarse en dos situaciones, una donde la concentración fuera insuficiente para la inhibición o las moléculas no presentarían actividad antimicrobiana, siendo esta última opción la menos viable debido a los múltiples estudios donde se muestra la actividad antimicrobiana de la baba de caracol en bruto y de los péptidos aislados contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* como lo reportado por Giovanni Cilia y Filippo Fratini en su estudio de propiedades antimicrobianas del moco del caracol terrestre [13]. Esta duda solo se lograría resolver con la síntesis específica de los posibles péptidos con propiedades antimicrobianas y a las concentraciones adecuadas de cada péptido purificado, provenientes de la identificación peptídica de la universidad de Salamanca España.

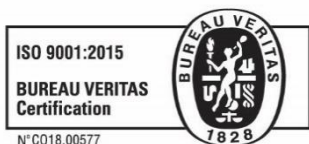
CONCLUSIONES

La baba de caracol y sus derivados han mostrado actividad antimicrobiana y cosmética en muchos documentos. En el caso de esta investigación los resultados no son concluyentes respecto a la actividad antimicrobiana, puede deberse a una baja concentración de péptidos con potencial antimicrobiano en el extracto purificado, no todos los péptidos tienen este potencial y no sabemos cuánto representan del total de la muestra. Los resultados del centro de investigación del cáncer CIC evidencian la presencia de péptidos en la muestra y esto unido a los resultados de los geles evidencia, la presencia de péptidos de diferente tamaño < 10 Kda,

que pueden tener un efecto antimicrobiano. También, podemos concluir que la metodología estandarizada es efectiva para la recuperación de péptidos de la baba del caracol africano. Dada la imposibilidad de continuar la investigación no se debe rechazar la posibilidad de encontrar nuevos péptidos con actividad antimicrobiana o terapéutica ya que el uso indiscriminado de antibióticos ha llevado a la selección de clones bacterianos resistentes, de los cuales a menudo ya no se cuenta con una terapia adecuada para su tratamiento. El manejo de estas bacterias multi resistentes a varios fármacos necesitan de una mayor atención hacia las moléculas o productos antibacterianos utilizados. Por esta razón, las investigaciones que se dirijan al uso de sustancias antimicrobianas alternativas, especialmente sustancias naturales como extractos de plantas, aceites esenciales y péptidos antimicrobianos aislados de animales diferentes, especialmente de aquellos que se encuentren en constante contacto con agentes infecciosos. Por ello este podría ser un tema potencial de investigaciones adicionales especialmente usarse como una alternativa a los antibióticos convencionales cuando se logre continuar con la investigación.

AGRADECIMIENTOS

Agradecerle a la dirección general de investigaciones de la USC, por financiar el proyecto investigación código de aprobación 934-621118-137. A mis padres y mi pareja por su apoyo durante mi carrera y al profesor Ruben Eduardo Varela de la facultad de ciencias básicas, por mostrarme los caminos del conocimiento y la investigación que deseo seguir. Al profesor Marcel Marín Villa, por su asesoría durante mi estancia en SIU de la Universidad de Antioquia, Al profesor José Oñate, por sus asesorías y colaboración, Al director de laboratorios Herman por



Calle 5 Carrera 62 Campus Pampalinda A.A. 4102 / Teléfono: PBX 5183000
web: www.usc.edu.co / Nit. 890.303.797-1 / Santiago de Cali - Colombia



facilitar mi trabajo en los laboratorios, A la dirección del programa, por estar pendiente de mi formación, Al DAGMA por facilitar mi trabajo y colaborar con las capturas, en especial a Angelina que me entrego las muestras en los momentos indicados. Al centro de investigación del Cáncer de Salamanca -España, que permitió el análisis de las muestras, ya que no fue posible realizarlo en muchas partes donde consultamos previamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. K. Byarugaba, “Antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 24, no. 2, pp. 105–110, 2004, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.02.015.
- [2] INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, “RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIMICROBIANOS EN EL AMBITO HOSPITALARIO.” p. 17, 2018.
- [3] E. Invitado, “Bacterias Gram negativas resistentes a carbapenemicos en Colombia : un desafío continuo al sistema de salud,” vol. 24, no. 2, pp. 55–56, 2020.
- [4] A. M. Rada, C. Hernández-Gómez, E. Restrepo, and M. V. Villegas, “Distribution and molecular characterization of beta-lactamases in Gram negative bacteria in Colombia (2001-2016),” *Biomedica*, vol. 39, 2019, doi: 10.7705/biomedica.v39i3.4351.
- [5] Sandra Yamile Saavedra and GonzálezMaría Nilse, “Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud,” *Biomédica*, pp. 473–485, 2017.

- [6] S. Liliana, P. Felipe, M. Alejandra, S. L. Valderrama, P. F. González, and M. A. Caro, "84346573010," 2016.
- [7] R. Castro-Orozco, L. Villafañe-Ferrer, J. Rocha-Jiménez, and N. Alvis-Guzmán, "RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *Staphylococcus aureus* Y *Staphylococcus epidermidis*: TENDENCIA TEMPORAL (2010-2016) Y FENOTIPOS DE MULTIRRESISTENCIA, CARTAGENA (COLOMBIA)," *Biosalud*, vol. 17, no. 2, pp. 25–36, 2018, doi: 10.17151/biosa.2018.17.2.2.
- [8] D. Córdoba R, A. Patiño Montoya, and A. Giraldo, "Prevalencia de parásitos nematodos Strongylidos asociados al Caracol africano, *Achatina fulica*, en el Valle del Cauca, Colombia," *Rev. MVZ Córdoba*, vol. 22, no. 3, pp. 6276–6286, 2017, doi: 10.21897/rmvz.1132.
- [9] A. Patiño-Montoya, S. Giraldo-Ocampo, and A. Giraldo, "Perception of giant African snail (*Achatina fulica*) in urban community from Colombia," *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellin*, vol. 72, no. 1, pp. 8717–8727, 2019, doi: 10.15446/rfnam.v72n1.73085.
- [10] L. F. Jiménez-Segura *et al.*, "Biota colombiana," *Ictiofauna y Desarro. del Sect. hidroeléctrico en la cuenca del río Magdal. - Cauca, Colomb.*, vol. 15, no. Clc, pp. 3–25, 2014, doi: 10.21068/c001.
- [11] S. M. M. Iguchi, T. Aikawa, and J. J. Matsumoto, "Antibacterial activity of snail mucus mucin," *Comp. Biochem. Physiol. -- Part A Physiol.*, vol. 72, no. 3, pp. 571–574, 1982, doi: 10.1016/0300-9629(82)90123-2.
- [12] Y. Kubota, Y. Watanabe, H. Otsuka, T. Tamiya, T. Tsuchiya, and J. J. Matsumoto, "Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus," *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.*, vol. 82, no. 2, pp. 345–348, 1985, doi: 10.1016/0742-8413(85)90173-2.

- [13] G. Cilia and F. Fratini, "Antimicrobial properties of terrestrial snail and slug mucus," *J. Complement. Integr. Med.*, vol. 15, no. 3, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1515/jcim-2017-0168.
- [14] H. G. Boman, "Antibacterial peptides: Key components needed in immunity," *Cell*, vol. 65, no. 2, pp. 205–207, 1991, doi: 10.1016/0092-8674(91)90154-Q.
- [15] R. K. Thapa, D. B. Diep, and H. H. Tønnesen, "Topical antimicrobial peptide formulations for wound healing: Current developments and future prospects," *Acta Biomater.*, vol. 103, pp. 52–67, 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2019.12.025.
- [16] S. H. Burstein, "ur I P re," *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, p. 106408, 2020, doi: 10.1016/j.prostaglandins.2020.106408.
- [17] R. Esfandiyari, R. Halabian, E. Behzadi, H. Sedighian, R. Jafari, and A. A. Imani Fooladi, "Performance evaluation of antimicrobial peptide Il-37 and hepcidin and β -defensin-2 secreted by mesenchymal stem cells," *Heliyon*, vol. 5, no. 10, p. e02652, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02652.
- [18] F. Vorreiter, S. Richter, M. Peter, S. Baumann, M. von Bergen, and J. M. Tomm, "Comparison and optimization of methods for the simultaneous extraction of DNA, RNA, proteins, and metabolites," *Anal. Biochem.*, vol. 508, pp. 25–33, 2016, doi: 10.1016/j.ab.2016.05.011.
- [19] N. I. Lenchik, D. M. Desiderio, and I. C. Gerling, "Two-dimensional gel electrophoresis characterization of the mouse leukocyte proteome, using a tri-reagent for protein extraction," *Proteomics*, vol. 5, no. 8, pp. 2202–2209, 2005, doi: 10.1002/pmic.200401107.
- [20] A. C. Fogaça, D. M. Lorenzini, L. M. Kaku, E. Esteves, P. Bulet, and S. Daffre, "Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: Isolation, structural characterization and tissue expression profile," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 28, no. 3, pp.

- 191–200, 2004, doi: 10.1016/j.dci.2003.08.001.
- [21] Sigma-Aldrich, “Technical bulletin TRI Reagent,” p. 4, 2007, [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/t9424bul.pdf>.
- [22] P. P. Bio-l, “qPROTEIN (BCA),” p. 1, [Online]. Available: <http://www.pb-l.com.ar/wp-content/uploads/2016/07/RA03-qPROTEIN.pdf>.
- [23] K. N. Kapoor *et al.*, “Estimation of peptide concentration by a modified bicinchoninic acid assay,” *Anal. Biochem.*, vol. 393, no. 1, pp. 138–140, 2009, doi: 10.1016/j.ab.2009.06.016.
- [24] T. Scientific, “BCA™ Protein Assay Kit,” *BCA Protein Assay Kit*, vol. 0747, no. 23225, pp. 6–7, 2007, doi: 10.1016/j.ijproman.2010.02.012.
- [25] G. Biosa *et al.*, “Comparison of blood serum peptide enrichment methods by Tricine SDS-PAGE and mass spectrometry,” *J. Proteomics*, vol. 75, no. 1, pp. 93–99, 2011, doi: 10.1016/j.jprot.2011.06.025.
- [26] I. Wiegand, K. Hilpert, and R. E. W. Hancock, “Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances,” *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 2, pp. 163–175, 2008, doi: 10.1038/nprot.2007.521.
- [27] F. Jamali *et al.*, “Minimal inhibitory concentration of ceftazidime and Co-trimoxazole for *Stenotrophomonas maltophilia* using E-test,” *J. Glob. Infect. Dis.*, vol. 3, no. 3, pp. 254–258, 2011, doi: 10.4103/0974-777X.83531.
- [28] M. Elshikh *et al.*, “Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 38, no. 6, pp. 1015–1019, 2016, doi: 10.1007/s10529-016-2079-2.
- [29] F. C. Tenover and R. C. Moellering, “The Rationale for Revising the Clinical and

Laboratory Standards Institute Vancomycin Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Criteria for *Staphylococcus aureus*,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 44, no. 9, pp. 1208–1215, 2007, doi: 10.1086/513203.

- [30] T. Z. A. T and G. Maria, “Tepzz¥_¥5_z7a t (11),” vol. 2, no. 19, 2017.
- [31] R. L. Nolan and J. K. Teller, “Diethylamine extraction of proteins and peptides isolated with a mono-phasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate,” vol. 68, pp. 127–131, 2006, doi: 10.1016/j.jbbm.2006.04.002.
- [32] L. C. Marney, T. J. Laha, G. S. Baird, P. M. Rainey, and A. N. Hoofnagle, “Isopropanol protein precipitation for the analysis of plasma free metanephrines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Clin. Chem.*, vol. 54, no. 10, pp. 1729–1732, 2008, doi: 10.1373/clinchem.2008.104083.
- [33] G. Egusa, D. W. Brady, S. M. Grundy, and B. V. Howard, “Isopropanol precipitation method for the determination of apolipoprotein B specific activity and plasma concentrations during metabolic studies of very low density lipoprotein and low density lipoprotein apolipoprotein B,” *J. Lipid Res.*, vol. 24, no. 9, pp. 1261–1267, 1983.
- [34] D. Marion, M. Zasloff, and A. Bax, “A two-dimensional NMR study of the antimicrobial peptide magainin 2,” *FEBS Lett.*, vol. 227, no. 1, pp. 21–26, 1988, doi: 10.1016/0014-5793(88)81405-4.
- [35] M. Zhang, “ポスタ一発表 Poster Sessions,” p. 2008, 2008.
- [36] J. Lei *et al.*, “The antimicrobial peptides and their potential clinical applications,” vol. 11, no. 7, pp. 3919–3931, 2019.
- [37] A. A. Bahar and D. Ren, “Antimicrobial Peptides,” pp. 1543–1575, 2013, doi: 10.3390/ph6121543.
- [38] B. Soraya and C. Cano, “PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS Y SU,” 2012.

- [39] H. Schägger, “Tricine – SDS-PAGE,” vol. 1, no. 1, pp. 16–23, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.4.
- [40] W. Yang *et al.*, “Functional Divergence among Silkworm Antimicrobial Peptide Paralogs by the Activities of Recombinant Proteins and the Induced Expression Profiles,” vol. 6, no. 3, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0018109.
- [41] D. Williams *et al.*, “Precipitation and selective extraction of human serum endogenous peptides with analysis by quadrupole time-of-flight mass spectrometry reveals posttranslational modifications and low-abundance peptides,” pp. 1223–1247, 2010, doi: 10.1007/s00216-009-3345-0.