

**DESARROLLO DE NUEVOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS ANÁLOGOS DE
LACTOFERRAMPINA BOVINA 265-284 CON POTENCIAL ANTIBIÓTICO
FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE
A METICILINA (SARM)**

JOHANNY PÉREZ SANTAMARÍA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARMANGA
2015**

**DESARROLLO DE NUEVOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS ANÁLOGOS DE
LACTOFERRAMPINA BOVINA 265-284 CON POTENCIAL ANTIBIÓTICO
FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE
A METICILINA (SARM)**

JOHANNY PÉREZ SANTAMARÍA
Trabajo de grado para optar al título de Químico

DIRECTOR:
RODRIGO GONZALO TORRES SÁEZ, Ph.D.

CO-DIRECTORA:
YULY ANDREA PRADA VARGAS, MSc.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARMANGA
2015**

CC. No 1.098.711.736 de Bucaramanga

DEDICATORIA

A mi Padre Celestial, a Jesucristo y al Espíritu Santo

A mis padres, Ana Lucila Santamaria y Diogenes Pérez

A mi novia, Brigitte Bernal

A mi Hermana, Alexandra Pérez

A mi Baby, Juan Sebastián, uno de mis grandes amores

A mi abuelita, Rosa Maria Mendoza, quien sigue viva en mi corazón

AGRADECIMIENTOS

A mi Señor Dios por darme la vida, disciplina, constancia y sabiduría para alcanzar este gran objetivo en mi vida.

A mis padres por su infinito e incomparable amor, esfuerzo, esmero y por los principios éticos, morales y espirituales infundidos.

Al Profesor Rodrigo Torres por darme la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación GIBIM, por sus asesorías y enseñanzas académicas y personales.

A la Dra Claudia Ortiz por su valiosa orientación, formación académica, paciencia y confianza en mi trabajo.

A la Dra Fanny Guzmán por su constante ayuda, colaboración y orientación durante todo el proceso de la Síntesis de Péptidos.

A todos los integrantes del GIBIM quienes fueron de gran ayuda y con quienes tuve la oportunidad de compartir, reír y vivir diferentes momentos.

A mi hermana Alexandra Pérez por hacer las veces de mamá cuando siendo un niño lo necesité, por estar conmigo en los momentos de enfermedad y por su orientación espiritual.

A mi novia Brigitte Bernal por su apoyo incondicional en los momentos de dificultad, por su amor, paciencia, lealtad y dedicación "*Mi Consentida*".

A la Familia Martínez Aldana quienes fueron por varios años mi Hogar y mi Familia.

A todas aquellas personas las cuales se alegraron con mis triunfos y Yo con los de ellos, a quienes supieron entenderme, perdonarme y ayudarme en diferentes tiempos y etapas de mi estancia en la UIS. "*A quienes corresponda, los llevo en mi corazón*"

A todos los docentes UIS que aportaron en mi formación académica y personal.

A la Universidad Industrial de Santander - **UIS** de la cual me siento muy orgulloso.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	18
1 MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES	20
1.1 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAM).....	20
1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PAM.....	21
1.3 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LA LACTOFERRAMPÍNA BOVINA.....	25
1.4 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA.....	32
1.4.1 Soporte sólido.....	34
1.4.2 Espaciadores “linkers” entre el péptido y la resina.	36
1.4.3 Reactivos de acoplamiento	37
1.4.4 Síntesis múltiple de péptidos.....	39
1.5 PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS.....	40
1.6 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR Y ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS.....	42
1.6.1 Espectrometría de masa de tiempo de vuelo (MALDI -TOF).....	42
1.6.2 Dicroísmo circular (DC)	42
2 OBJETIVOS	44
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3 MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1 MATERIALES.....	45
3.2 MÉTODOS	45
3.2.1 Diseño bioinformático de los PAM análogos de LFamp B.....	46
3.2.2 Síntesis de los PAM utilizando la estrategia de protección F-moc y purificación por HPLC	47
3.2.3 Caracterización de los PAM por MALDI- TOF y DC	49
3.2.4 DETERMINACIÓN DE LA CMI Y LA CMB DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS (LFAMP B Y SUS ANÁLOGOS) FRENTE A <i>E. COLI</i> O157:H7 Y SARM	50
4 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	52
4.1 DISEÑO BIOINFORMÁTICO Y SÍNTESIS DE PAM	52

4.2 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PAM	55
4.2.1 Determinación de la pureza por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (HPLC-RP)	55
4.2.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF	56
4.2.3 Dicroísmo circular (DC)	56
4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS PAM	59
5 CONCLUSIONES.....	71
6 RECOMENDACIONES.....	73
BIBLIOGRAFIA.....	73
ANEXOS.....	79

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Concentración letal 50% (CL50) de la LFamp-B 268-284 y LFamp B 265-284, frente a cepas Gram (+) y Gram (-)..	29
Tabla 2. Alineamiento múltiple de secuencias (Clustal W) de LFamp B contra diferentes proteínas.	52
Tabla 3. Secuencias diseñadas y sintetizadas de PAM análogos de LFamp B.	53
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de los PAM.	54
Tabla 5. Valores de masa teóricos y experimentales de los PAMs sintetizados.	56
Tabla 6. Resultados obtenidos de CMI y CMB de los péptidos sintetizados contra SARM.	63
Tabla 7. Resultados obtenidos de CMI y CMB de los péptidos sintetizados contra <i>E. coli</i> O157:H7.	68

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales clases estructurales de los péptidos antimicrobianos (PAM).	21
Figura 2. Formación de poro por parte de los PAM α -helicoidales en el modelo de ruptura por barril.	23
Figura 3. Disolución de la membrana fosfolipídica por la formación de micelas..	24
Figura 4. En el modelo de poro toroidal, los PAM permanecen unidos con los LPS de la membrana hasta la lisis celular.	25
Figura 5. Modelo de la estructura secundaria de la Lactoferrina.....	26
Figura 6. Representación estructural de la LF-b.	27
Figura 7. Péptidos antimicrobianos catiónicos identificados en la región N-terminal de la LF-b.....	28
Figura 8. Representación esquemática de la estructura de la LFamp B en ambientes químicos hidrofóbicos.....	30
Figura 9. Daño estructural bacteriano.	31
Figura 10. Representación esquemática de la protección del aminoácido L-Alanina con el grupo F-moc.....	32
Figura 11. Esquema de la SPFS utilizando la estrategia Fmoc.	34
Figura 12. Solvatación de la resina por causa de los disolventes DCM y DMF. ...	35
Figura 13. Diagrama del espaciador bifuncional Rink amida MBHA-Fmoc unido al soporte polimérico P.	37
Figura 14. Estructura de las carbodiimidias y los aditivos utilizados en la SPFS. .	38
Figura 15. Estructura de las sales de fosfonio (BOP - PyBOP) y de uronio (HBTU - TBTU)	39
Figura 16. Representación de la síntesis en bolsa de polipropileno40	
Figura 17. Montaje de microextracción en fase sólida.	48
Figura 18. Estructuras secundarias de los PAM visualizadas en el programa PyMol.....	55
Figura 19. Espectros de DC de los péptidos LFamp B, A1, A2, A3 y A4..	58
Figura 20. Perfiles de la cinética de crecimiento de SARM en presencia de la LFamp B y el análogo A4.....	60
Figura 21. Representación de la estructura 1-D y 2-D del péptido A1.	62
Figura 22. Perfil de la cinética de crecimiento de <i>E.coli</i> O157:H7 en presencia de la LFam B y el análogo A4.....	64
Figura 23. Representación de la estructura 1-D y 2-D del péptido A4.	66
Figura 24. Determinación de la CMB.	69

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Cromatogramas HPLC-RP de los péptidos sintéticos.	80
Anexo B. Tiempos de retención de los PAM.....	81
Anexo C. Espectro de MALDI-TOF del péptido LFamp B.	82
Anexo D. Espectro de MALDI-TOF del análogo A1.	83
Anexo E. Espectro de MALDI-TOF del análogo A2.	84
Anexo F. Espectro de MALDI-TOF del análogo A3.....	85
Anexo G. Espectro de MALDI-TOF del análogo A4.....	86
Anexo H. Perfiles de la cinética de crecimiento de SARM en presencia de los análogos A1, A2 y A3 respectivamente	87
Anexo I. Perfiles de la cinética de crecimiento de E. coli O157:H7 en presencia de los análogos A1, A2 y A3 respectivamente.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda
ϵ	Elepticidad Molar
ACN	Acetonitrilo
BHI	Infusión Cerebro Corazón
CAMP	Colletion of Anti-Microbial Peptides
CL ₅₀	Concentración letal 50%
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Da	Daltons
DC	Dicroísmo circular
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DFC	Dodecilfosfocolina
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
EDT	Etanoditiol
F-moc	9 -flurenilmetoxicarbonilo
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il) 1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluoroborato
HCCA	α -ciano-4-hidroxicinámico
HoAT	1- hidroxibenzotriazol
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC-RP	Cromatografía liquida de alta eficiencia en fase reversa
LB	Luria Bertani
LFamp B	Lactoferrampina bovina
LF-b	Lactoferrina bovina
LFchimera	Lactoferrina Quimera
LFcin	Lactoferricina

MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo
MH	Mueller-Hinton
MBHA	4-metilbencilhidrilamina
NCBI	National Center for biotechnology information
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAM	Péptido antimicrobiano
PEG	Polietilenglicol
PPG	Polipropilenglicol
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SPFS	Síntesis de péptidos en fase sólida
t-BOC	terc-Butiloxicarbonilo
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	Trifluoroetanol
TIS	Triisopropilsilano
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

RESUMEN

TITULO: DESARROLLO DE NUEVOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS ANÁLOGOS DE LACTOFERRAMPINA BOVINA 265-284 CON POTENCIAL ANTIBIÓTICO FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM)*.

AUTOR: JOHANNY PÉREZ SANTAMARÍA**

PALABRAS CLAVES: Péptidos antimicrobianos, Lactoferrampina Bovina, Diseño de péptidos, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* resistente a meticilina.

DESCRIPCIÓN: En este trabajo de investigación se llevó a cabo la síntesis de cinco péptidos con potencial actividad antimicrobiana frente a las bacterias patógenas *E. coli* O157:H7 y SARM. Inicialmente se comparó la secuencia de la LFamp B contra diferentes proteínas de la familia de las transferrinas con el fin de determinar las posibles modificaciones aminoacídicas responsables de la actividad biológica en la secuencia de la LFamp B 265-284. Posteriormente, se sintetizaron los péptidos LFamp B 265-284 y cuatro de sus análogos a través de la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) con la estrategia de protección Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo). Todos los péptidos se obtuvieron una pureza $\geq 90\%$ y mostraron un perfil típico de α -hélice, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante dicroísmo circular (DC). Adicionalmente, se verificó la masa molar de los cinco péptidos sintetizados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Finalmente se realizó la determinación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos frente a las dos cepas mencionadas previamente. Las concentraciones de péptido utilizadas, estuvieron entre el rango de 0.5 a 100 μM . El análogo A4 de la LFamp B fue el péptido más activo frente a las dos cepas evaluadas comparado con los demás péptidos sintetizados. La concentración mínima inhibitoria cincuenta (CMI₅₀) del análogo A4 frente a SARM fue 52 μM y 77 μM frente a *E. coli* O157:H7. SARM fue más susceptible que *E. coli* O157:H7 al tratamiento con los péptidos sintetizados y evaluados en este estudio.

* Tesis de Grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: TORRES, R. Co-directora: PRADA, Y.

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF NEW SYNTHETIC PEPTIDES ANALOG LACTOFERRAMPINA BOVINE 265-284 WITH ANTIBIOTIC POTENTIAL AGAINST *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA).*

AUTHOR: JOHANNY PÉREZ SANTAMARÍA**

KEYWORDS: Antimicrobial peptides, Lactoferrampin Bovine, Peptide Design, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* methicillin-resistant.

DESCRIPTION: In this research the synthesis of five peptides with potential antimicrobial activity against pathogenic bacteria *E. coli* O157: H7 and MRSA was carried out. Initially the sequence of LFamp B was compared against different proteins belonging to the transferrin family in order to determine any amino acid changes responsible for the biological activity in the sequence of B LFamp 265-284. Subsequently, LFamp B 265-284 and four of its analog peptides were synthesized by the synthesis of peptides in solid phase (SPPS) following the strategy of Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) protection. The purity of the peptides was around 90% and they showed a typical profile of α -helix, according to the results obtained by a circular dichroism (DC). In addition, the molar mass of the five peptides synthesized by MALDI-TOF was evaluated. Finally, the *in vitro* studies of the antimicrobial activity of the synthetic peptides against the two strains mentioned above was performed. The peptide concentrations used in this research was in the range of 0.5 to 100 μ M. The A4 LFamp B analog peptide was the most active against both, *E. coli* O157: H7 and MRSA strains tested compared to the other peptides synthesized. The MIC₅₀ A4 analog was 52 μ M against MRSA and 77 μ M against *E. coli* O157: H7. MRSA was more susceptible than *E. coli* O157: H7 to the treatment with the synthesized peptides.

* Graduate thesis

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Research advisors: TORRES, R., PRADA, Y.

INTRODUCCIÓN

Los problemas de salud pública afectan a gran parte de la población mundial, en especial a los habitantes de países subdesarrollados de África, Asia y América Latina. Muchos de estos problemas son causados por bacterias patógenas tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, entre otras. Estas bacterias han logrado desarrollar mecanismos de resistencia contra distintos fármacos aprobados por la FDA; el fenómeno de resistencia bacteriana está en aumento debido al uso indiscriminado de fármacos, la automedicación y la interrupción temprana de los tratamientos, incrementando el número de especies resistentes (Organización Mundial de la Salud, 2005).

Anualmente se presentan cerca de 15 millones de muertes provocadas por agentes patógenos según la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo los niños menores de 5 años los más afectados (Organización Panamericana de la Salud, 2008; Organización Mundial de la Salud, 2010). El fenómeno de resistencia bacteriana está en continuo aumento y no parece detenerse. La evidencia que deja al descubierto este problema, es el incremento de la resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina (ERP) (Hawkey & Jones, 2009), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem y *Klebsiella pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación; el incremento de la resistencia, en las dos últimas especies mencionadas ha sido superior al 20% en el año 2003 comparado con la prevalencia presentada entre 1998 y 2002 (Jeyanthi *et al.*, 2013).

El fenómeno de resistencia bacteriana ha llamado la atención de la comunidad científica, por lo que se han invertido esfuerzos en la búsqueda de alternativas

terapéuticas efectivas para el tratamiento de enfermedades infecciosas ocasionadas por agentes patógenos.

Los péptidos antimicrobianos (PAM) han surgido como una opción prometedora que puede llegar a ser utilizada clínicamente en el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos. Los PAM son biomoléculas que se hallan en el sistema inmune innato de las plantas, vertebrados e invertebrados y desempeñan su función en la primera línea de defensa del huésped frente a diversos agentes infecciosos tales como microorganismos, virus, hongos, parásitos o intrusos celulares (Lehrer, 2013; Taber, 2002). En los humanos, los PAM además de sus características antibióticas también sirven como señalizadores de respuesta inmune, moléculas efectoras importantes en la inflamación y están involucrados en los procesos de cicatrización (Gordon & Romanowski, 2005).

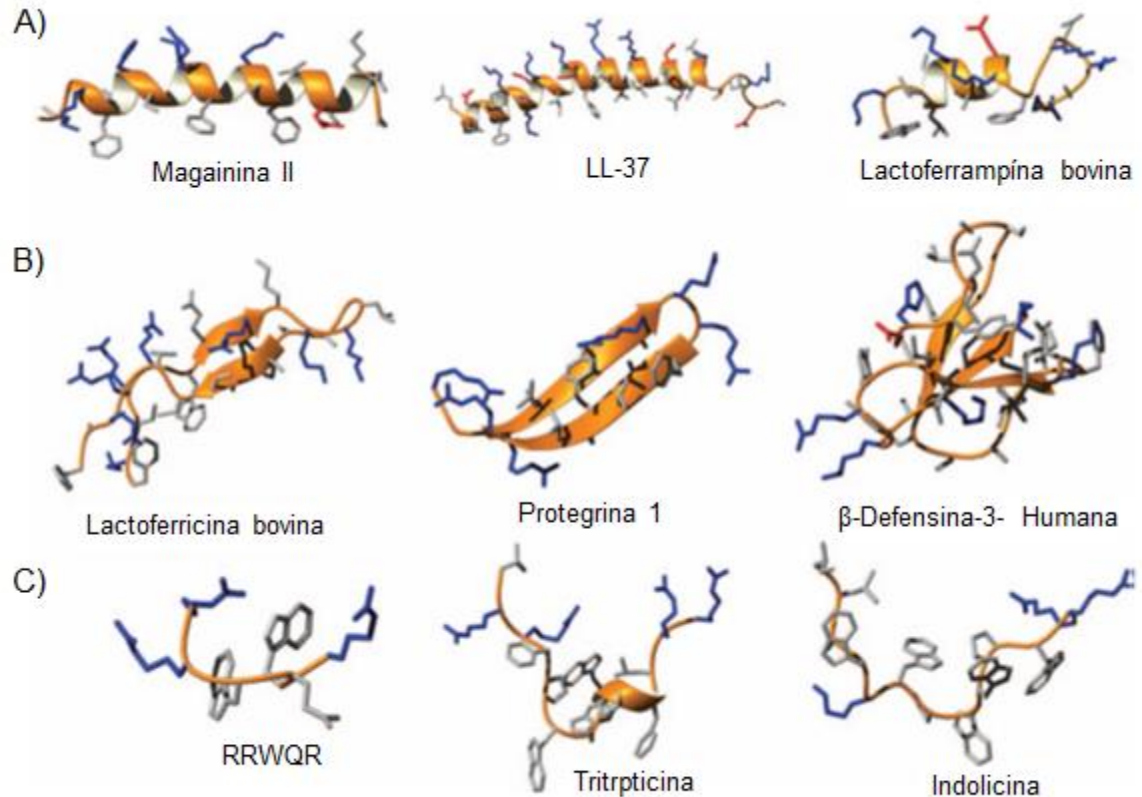
Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación, se realizó la síntesis de péptidos análogos de lactoferrampina bovina (LFamp B) con estructura helicoidal, como potenciales agentes biológicos activos frente a bacterias patógenas Gram positivas (+) y Gram negativas (-) de SARM y *E. coli* O157:H7, respectivamente. Los PAM sintetizados fueron sometidos a ensayos de microdilución en caldo y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos en presencia de las dos cepas patógenas mencionadas anteriormente.

1 MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES

1.1 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAM)

Los primeros péptidos antimicrobianos fueron aislados a partir de ranas e insectos en la década de 1980 (Chan *et al.*, 2006). Treinta años después se han identificado cientos de péptidos, los cuales se pueden clasificar en cinco grupos de acuerdo a las características estructurales (Cézard *et al.*, 2011; Hyunsoo & Janda, 2002): 1) Péptidos lineales, mayoritariamente helicoidales, 2) Péptidos lineales sin cisteína, con abundancia de un residuo aminoacídico, 3) Péptidos con un enlace disulfuro, 4) Péptidos con dos o más enlaces disulfuro, que forman prioritariamente hojas beta, 5) Péptidos antimicrobianos derivados de otros polipéptidos o proteínas con funciones conocidas (Lehrer, 2013; Taber, 2002). La actividad biológica de los PAM es atribuida principalmente a la estructura secundaria (**Figura 1**), la cual está determinada por la naturaleza de la secuencia aminoacídica y el entorno al que está expuesto el péptido (Cruz *et al.*, 2014; Cézard *et al.*, 2011; Nguyen, 2011).

Figura 1. Principales clases estructurales de los péptidos antimicrobianos (PAM). A) Representa algunos péptidos α -helicoidales, B) representa algunos péptidos β -plegados y C) representa algunos péptidos en espiral al azar



Fuente: Nguyen et al., 2011.

1.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PAM

Para comprender el mecanismo de acción de los PAM, es fundamental conocer la estructura de la membrana celular y el sitio activo de la bacteria (Thomson, 2004; Hodges *et al.*, 2010). La membrana desempeña diversas funciones vitales para la célula, como: protección del mundo exterior, barrera osmótica, transducción de energía, sitio de anclaje para flagelos y puede interactuar con péptidos y proteínas para controlar el transporte de moléculas al interior de la célula (Cézard *et al.*, 2011; Doerrler, 2006); además, la membrana compuesta por una bicapa de

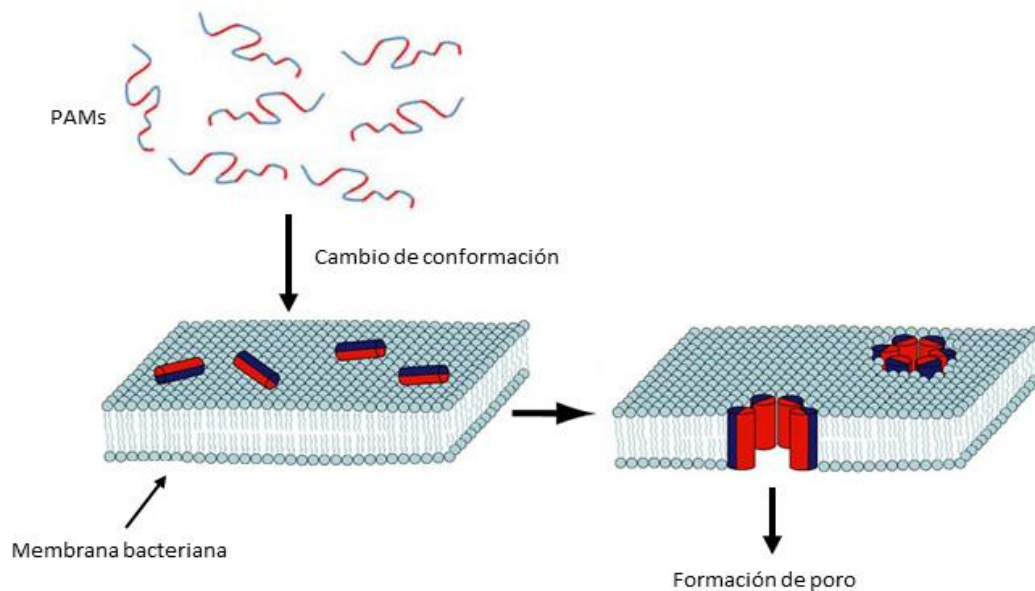
fosfolípidos entre los cuales se encuentran el fosfatidilglicerol, cardiolipina y fosfatidilserina, principalmente (Chen *et al.*, 2012).

La mayoría de los PAM actúan sobre la membrana bacteriana causando alteraciones morfológicas seguidas de la formación de poros y posterior despolarización de la bicapa fosfolipídica. A continuación, se presentan algunos modelos que intentan explicar el daño sufrido por la membrana bacteriana al interactuar con los PAM, en muchos casos el daño en la membrana es tan grave que ocasiona la ruptura de la bicapa y finalmente la muerte celular (Bahar & Ren, 2013; Nguyen, 2011; Chan *et al.*, 2006).

➤ *Modelo de ruptura por barril*

Este modelo sugiere que los PAM se acumulan como monómeros en la superficie de la bicapa lipídica, conservando un patrón en forma de círculo. Luego de la unión de suficientes monómeros orientados en forma paralela a la bicapa ocurre una inserción y posterior reorganización perpendicular en el núcleo lipídico de la membrana por parte de los PAM dando lugar a la formación de una estructura semejante a un barril, donde los bastones son los péptidos α -helicoidales. El interior del poro presenta características hidrófilas debido a la conformación que adoptan los péptidos anfipáticos en este arreglo estructural (Hodges *et al.* 2010; Chan *et al.*, 2006). La inserción progresiva de monómeros adicionales incrementa el tamaño del poro, generando pérdida del contenido celular (**Figura 2**).

Figura 2. Formación de poro por parte de los PAM α -helicoidales en el modelo de ruptura por barril

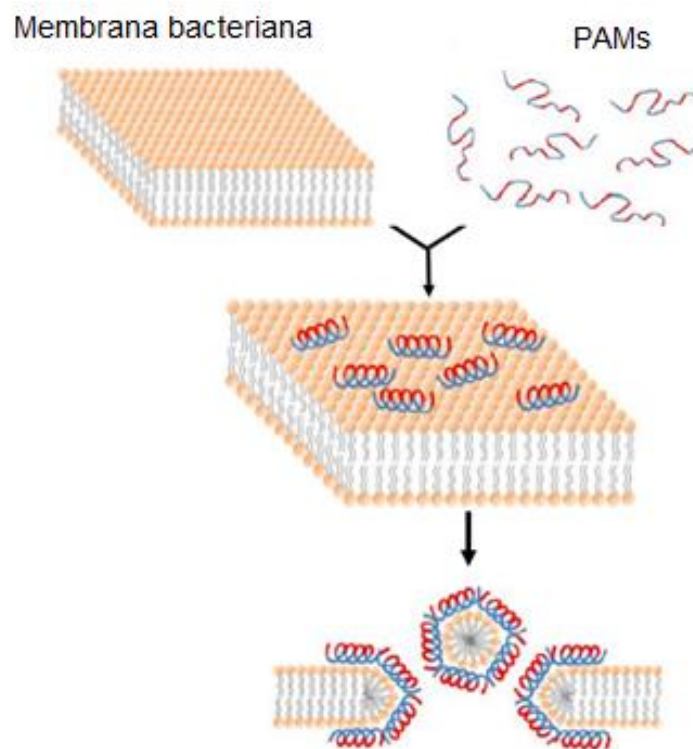


Fuente: Bahar & Ren, 2013; Chan *et al.*, 2006

➤ *Modelo de capa*

De manera similar que en el modelo de ruptura por barril, en este modelo los PAM se agregan a la superficie de la bicapa fosfolipídica conservando la orientación paralela a la superficie de la membrana durante el proceso. Los PAM se unen a la membrana por la cara lateral hidrófoba, mientras que la zona hidrófila se dispone hacia el exterior. Los PAM recubren la superficie de la membrana bacteriana de manera similar a una alfombra ocasionando que la bicapa fosfolipídica se debilite por la curvatura generada por la acumulación de péptidos, los cuales actúan como detergente, disolviendo la membrana a través de la formación de micelas (Chen & Maker 2011; Chan *et al.*, 2006). Para que el modelo de capa sea eficaz, la concentración de PAM debe ser alta (**Figura 3**).

Figura 3. Modelo de capa



Fuente: Bahar & Ren, 2013; Nguyen, 2011

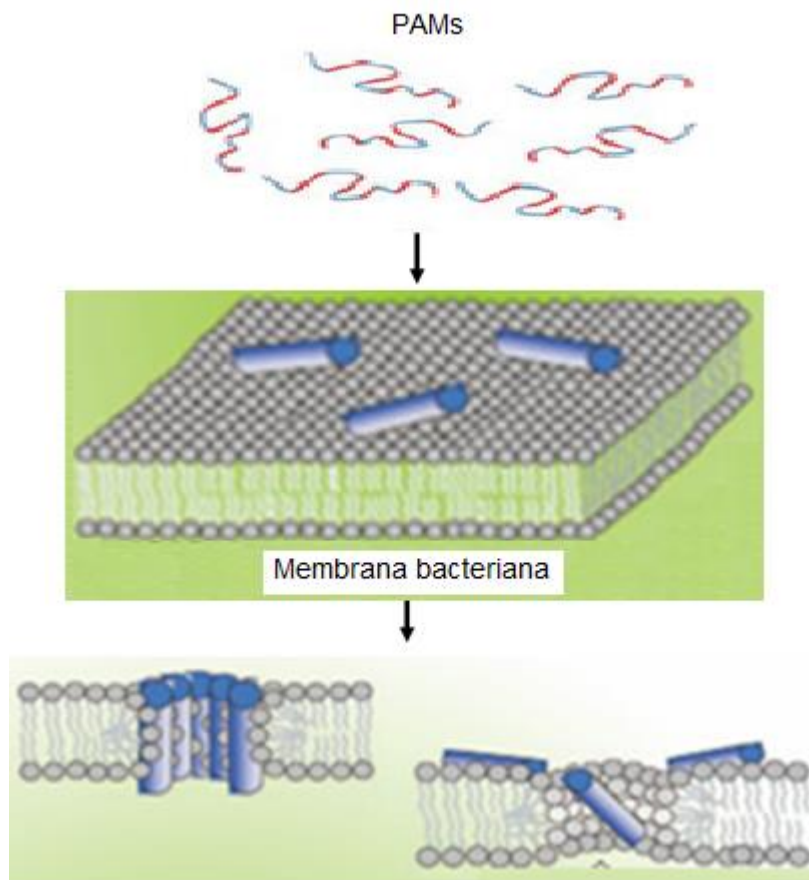
➤ *Modelo del poro toroidal*

En el modelo del poro toroidal, los PAM se agregan a la membrana de manera similar al modelo de capa y luego se insertan perpendicularmente al interior provocando la deformación de la bicapa. A diferencia del modelo por barril, este modelo los PAM se intercalan con los fosfolípidos para formando canales transmembrana.

Al interactuar con la membrana, los PAM adoptan una estructura α -helicoidal y se orientan de forma paralela a la superficie de la membrana favoreciendo la unión entre la cara apolar de los PAM y la cabeza polar de los fosfolípidos, provocando que la membrana se curve (Chen *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2012; Cézard *et al.*,

2011). Durante el proceso de inserción, los PAM se mantienen permanentemente unidos a los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana, a diferencia con los dos modelos anteriores (Pushpanathan *et al.*, 2013) (**Figura 4**).

Figura 3. En el modelo de poro toroidal, los PAM permanecen unidos con los LPS de la membrana hasta la lisis celular



Fuente: Chen *et al.*, 2012; Nguyen, 2011

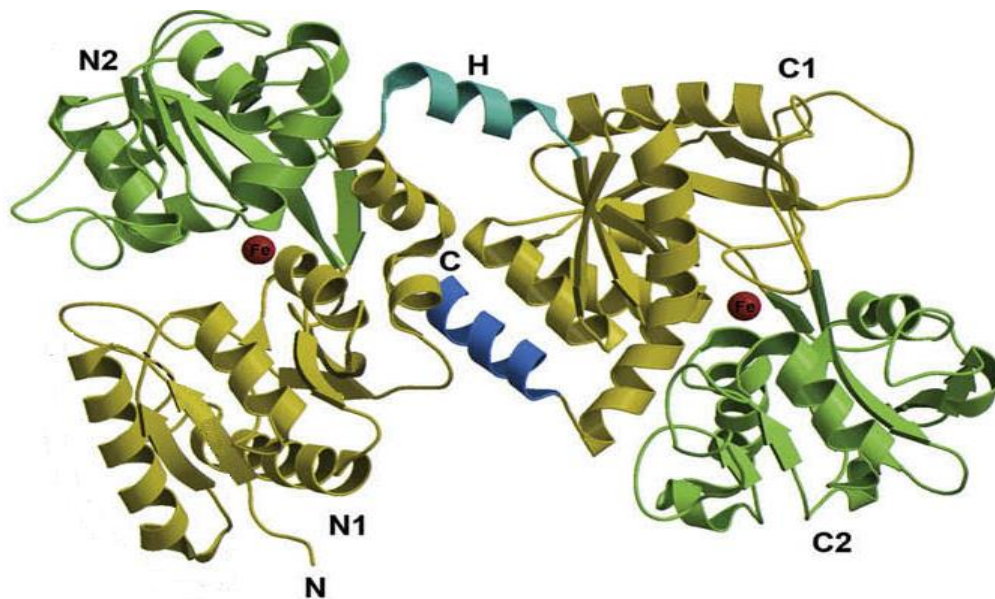
1.3 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE LA LACTOFERRAMPÍNA BOVINA

En los últimos veinte años se han descubierto un gran número de péptidos antimicrobianos, los cuales han sido aislados de diferentes organismos incluyendo mamíferos, insectos y anfibios (Lizzi *et al.*, 2009). Los PAM son un grupo

heterogéneo, ya que difieren en tamaño, secuencia aminoacídica, carga neta y estructura secundaria pero la mayoría de los péptidos son anfipáticos y catiónicos, indicando que estas propiedades son fundamentales para la actividad antimicrobiana.

Algunos PAM se derivan de proteínas con alto peso molecular, por proteólisis enzimática o por síntesis química posterior al aislamiento y secuenciación de fragmentos con actividad biológica (Brouwer *et al.*, 2011). La Lactoferrina bovina (LF-b) es una proteína globular de 80 kDa que presenta gran afinidad por iones hierro, esta proteína ha sido aislada de algunos fluidos (sangre, leche, lágrimas, semen, saliva) de los mamíferos y juega un papel importante en el sistema inmune del huésped (Haney *et al.*, 2012).

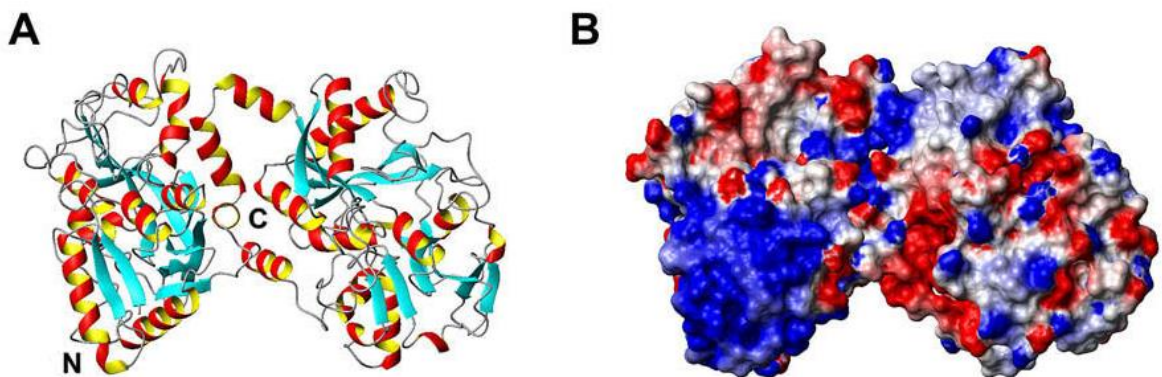
Figura 4. Modelo de la estructura secundaria de la Lactoferrina



Fuente: Baker & Baker, 2009. *N y C representan los lóbulos N-terminal y C-terminal, respectivamente. Se han identificado cuatro dominios; los dominios N1-C1 en amarillo y los dominios N2-C2 en verde.

En la estructura de la LF-b se han identificado dos lóbulos, el N-terminal y el C-terminal. Estos dos lóbulos están organizados en dos dominios; el dominio N1- C1 y N2- C2 (**Figura 5**). La mayor parte de la actividad antimicrobiana de la LF-b se le atribuye a la región N-terminal (**Figura 6**) por su elevado contenido catiónico (Lizzi *et al.*, 2009). Esta proteína presenta actividad antiviral, bactericida, fungicida, antitumoral, antiinflamatoria y propiedades inmunoregulatoras (Van der Kraan *et al.*, 2005).

Figura 5. Representación estructural de la LF-b.

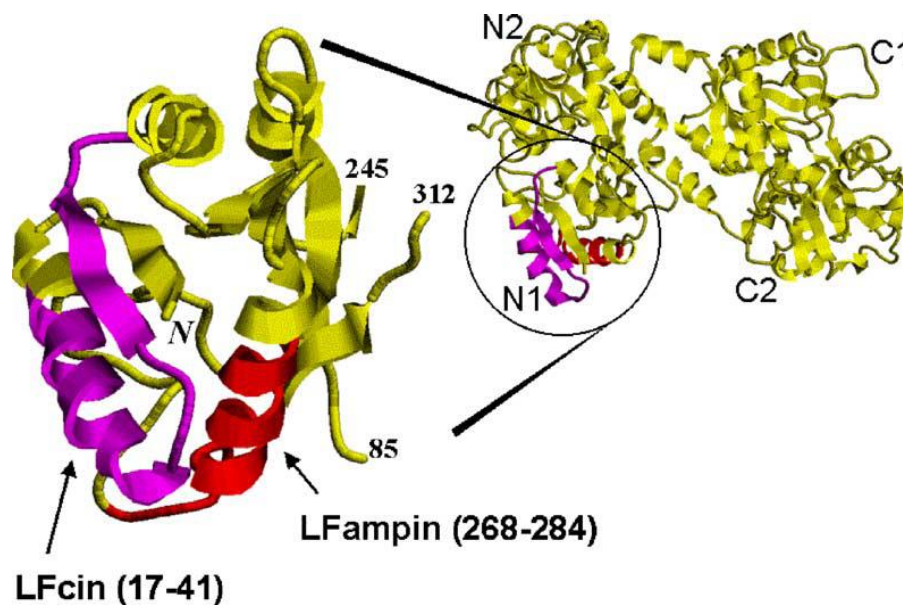


Fuente: Jenssen & Hancock, 2009. * A) Estructura cristalina de la LF-b presentada como un diagrama animado. Se observan la regiones N y C terminal. B) Gráfico de distribución de carga de la lactoferrina en la misma orientación de (A). Los colores azul, blanco y rojo, corresponden a la carga neta positiva, neutra y negativa, respectivamente. Se indica la alta porción catiónica en la región N-terminal.

Se han identificado dos péptidos antimicrobianos en el dominio N1 de la LF-b (**Figura 7**). Estos péptidos se conocen como Lactoferricina (LFcin) y Lactoferrampina (LFamp). La LFcin se produce naturalmente a través de la digestión proteolítica de la LF por la pepsina gástrica y se ha encontrado que este péptido presenta mayor actividad antimicrobiana en contraste con la proteína nativa (Bolscher *et al.*, 2009). Por otra parte la Lactoferrampina bovina (LFamp B)

se identificó a través del análisis de la secuencia de la LF-b y la primera secuencia reportada del péptido LFamp B corresponde a los residuos 268-284 de la LF-b, mostrando actividad frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Van der Kraan *et al*, 2004).

Figura 6. Péptidos antimicrobianos catiónicos identificados en la región N-terminal de la LF-b.



Fuente: Marieke *et al.*, 2004. *En violeta se muestra la LFcin y en rojo se muestra la LFamp B.

Posteriormente se publicó una secuencia más larga de LFamp B, la cual presentaba tres residuos aminoacídicos (DLI) adicionales en el extremo N-terminal. Estos residuos le confieren estabilidad a la estructura helicoidal a través de interacciones por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas a los 4 residuos en los extremos N-terminal y C-terminal de la hélice. La LFamp B 265-284 muestra mayor actividad antimicrobiana frente a una gama más amplia de especies bacterianas en comparación con la secuencia más corta a pesar de la disminución de carácter catiónico del péptido (**Tabla 1**).

Tabla 1. Concentración letal 50% (CL50) de la LFamp-B 268-284 y LFamp B 265-284, frente a cepas Gram (+) y Gram (-)

Bacteria	Gram (+/-)	CL ₅₀ (μmol/L)	
		LFampina 268-284	LFampina 265-284
<i>Bacillus subtilis</i>	+	20.0±5.0	5.5±0.5
<i>Actinomyces naeslundii</i>	+	>100.0	4.3±0.6
<i>Streptococcus mutans</i>	+	>100.0	5.5±1.5
<i>Streptococcus sanguis</i>	+	>100.0	4.8±1.0
<i>Escherichia coli</i> K12	-	5.8±0.6	10.0±3.0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	25.0±5.0	38.0±10.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	7.0±0.9	20.0±8.0
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	>100.0	>100

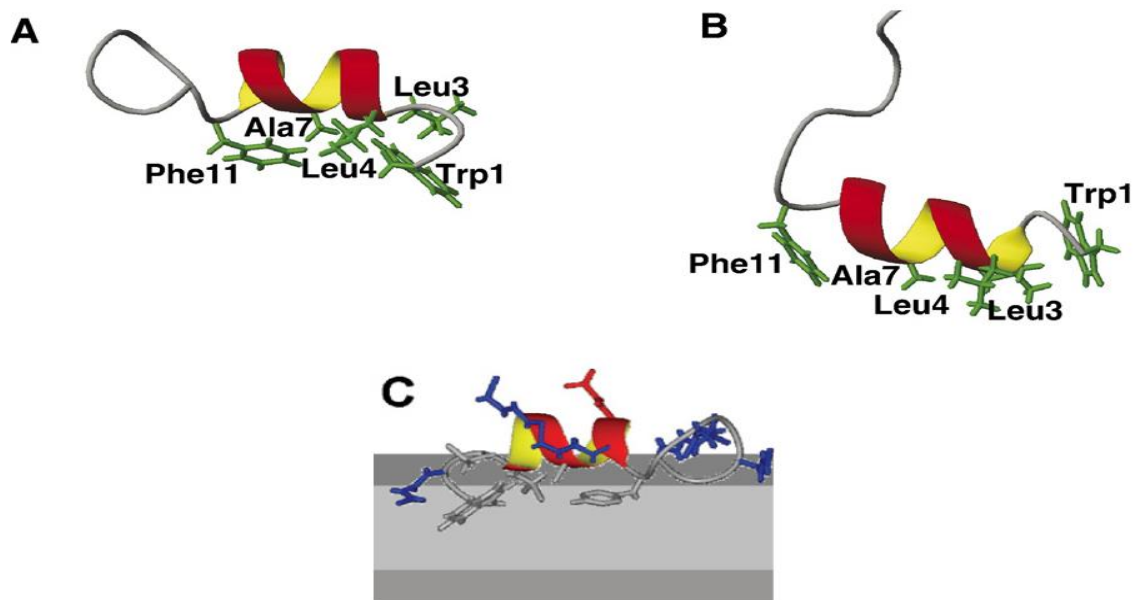
Fuente: Browner, 2011; Leon *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009; Van der Kraan *et al.*, 2005; Van der Kraan *et al.*, 2004.

La región C-terminal de la LFamp B es fundamental para la actividad frente a *Candida albicans* debido a la presencia de residuos aminoacídicos cargados positivamente mientras que la región N-terminal es de gran importancia para la formación de la alfa hélice (Lizzi *et al.*, 2009). Aunque el mecanismo de acción de la LFamp B no se conoce muy bien, se cree que actúa principalmente sobre la membrana bacteriana (Haney *et al.*, 2007).

Otros estudios realizados empleando la técnica espectroscópica de resonancia magnética nuclear (RMN), muestran la interacción de la LFamp B con ambientes químicos de dodecilsulfato de sodio (SDS) y dodecilsulfocolina (DFC) (Haney *et al.*, 2007), los cuales mimetizan la superficie de la membrana bacteriana (Tsumi *et al.*, 2012). La LFamp B adopta una conformación α -helicoidal anfipática en los primeros 11 residuos del péptido; los siguientes residuos de la región C-terminal

se mantienen en una conformación alargada o extendida. La superficie hidrófoba de la hélice anfipática, está delimitada por las cadenas laterales de los residuos de Triptófano (W) y fenilalanina (F). Un modelo de acción propone que la atracción inicial de LFamp B está mediada por las cargas positivas en la región C-terminal seguido por la formación de la hélice en la zona N-terminal, la cual se une a la superficie de la bicapa lipídica bacteriana (Haney *et al.*, 2007) (**Figura 8**).

Figura 7. Representación esquemática de la estructura de la LFamp B en ambientes químicos hidrofóbicos

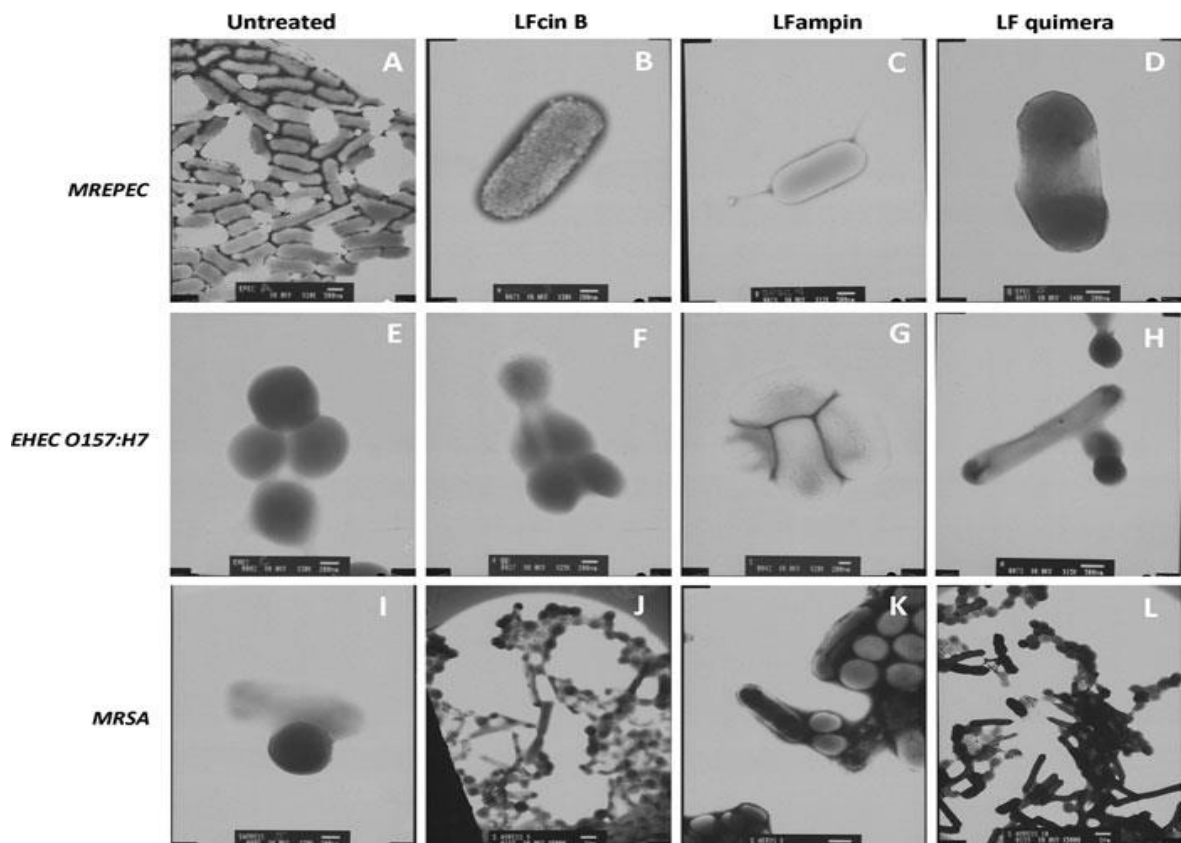


Fuente: Haney *et al.*, 2007. *. A) y B) representan a la LFamp B en SDS y DFC, respectivamente. C), representa la interacción de la LFamp B con una bicapa fosfolipídica.

Un estudio realizado por Flores *et al* en el 2010, evaluó el efecto bactericida de la LF, LFcín, LFamp y LFchimera, frente a cepas de SARM y *E. coli* aisladas en centros médicos. Las bacterias fueron susceptibles a LF, LFcín17-30 y LFampin B, inhibiendo el crecimiento bacteriano entre 85 y 90%, respectivamente. Sin

embargo, la LFchimera mostró mayor inhibición del crecimiento bacteriano a concentraciones de 1 μM y 10 μM , para *E. coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Los resultados de este estudio insinúan que los péptidos LFcín17-30, LFamp B 265-284 y LFchimera pueden contribuir a la protección contra infecciones causadas por *E. coli* O157: H7, ECEP multirresistente y SARM. El mecanismo de acción de estos péptidos probablemente está dirigido a la membrana bacteriana (**Figura 9**).

Figura 8. Daño estructural bacteriano.



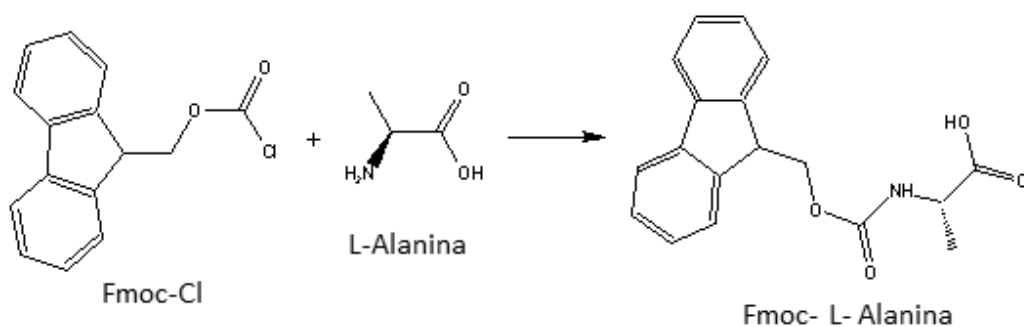
Fuente: Flores *et al.*, 2010. **Escherichia coli* enteropatógena multirresistente (ECEPMR), *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) O157:H7 y SARM en presencia de los péptidos LFcín17-30(paneles B, F, J), LFamp B 265-284(paneles C, G, K) y LFchimera (paneles D, H, L) respectivamente.

1.4 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

Bruce Merrifield desarrolló la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) en 1963 y fue galardonado con el Premio Nobel por este logro. Merrifield fue capaz de anclar el aminoácido por el extremo carboxílico del péptido que se sintetiza a un soporte de resina insoluble, agregando grandes cantidades de reactivos con el fin de desplazar el equilibrio de la reacción a la formación del péptido y posteriormente desanclar el péptido de la resina en forma relativamente pura. El uso del soporte polimérico le permitió automatizar el proceso de síntesis de péptidos. Estos avances hacen que sea práctico sintetizar péptidos más grandes y complejos. La alta disponibilidad de péptidos ha revolucionado la investigación en la biología, bioquímica, la microbiología y la química médica (Crich, 2009).

En 1978 Meienhofer y colaboradores desarrollaron la síntesis de péptidos empleando el grupo 9-fluorenilmetilo carbamato (Fmoc) como protector temporal del grupo amino (**Figura 10**). El grupo protector Fmoc, es muy estable a condiciones ácidas y puede ser removido en condiciones básicas suaves usando piperidina.

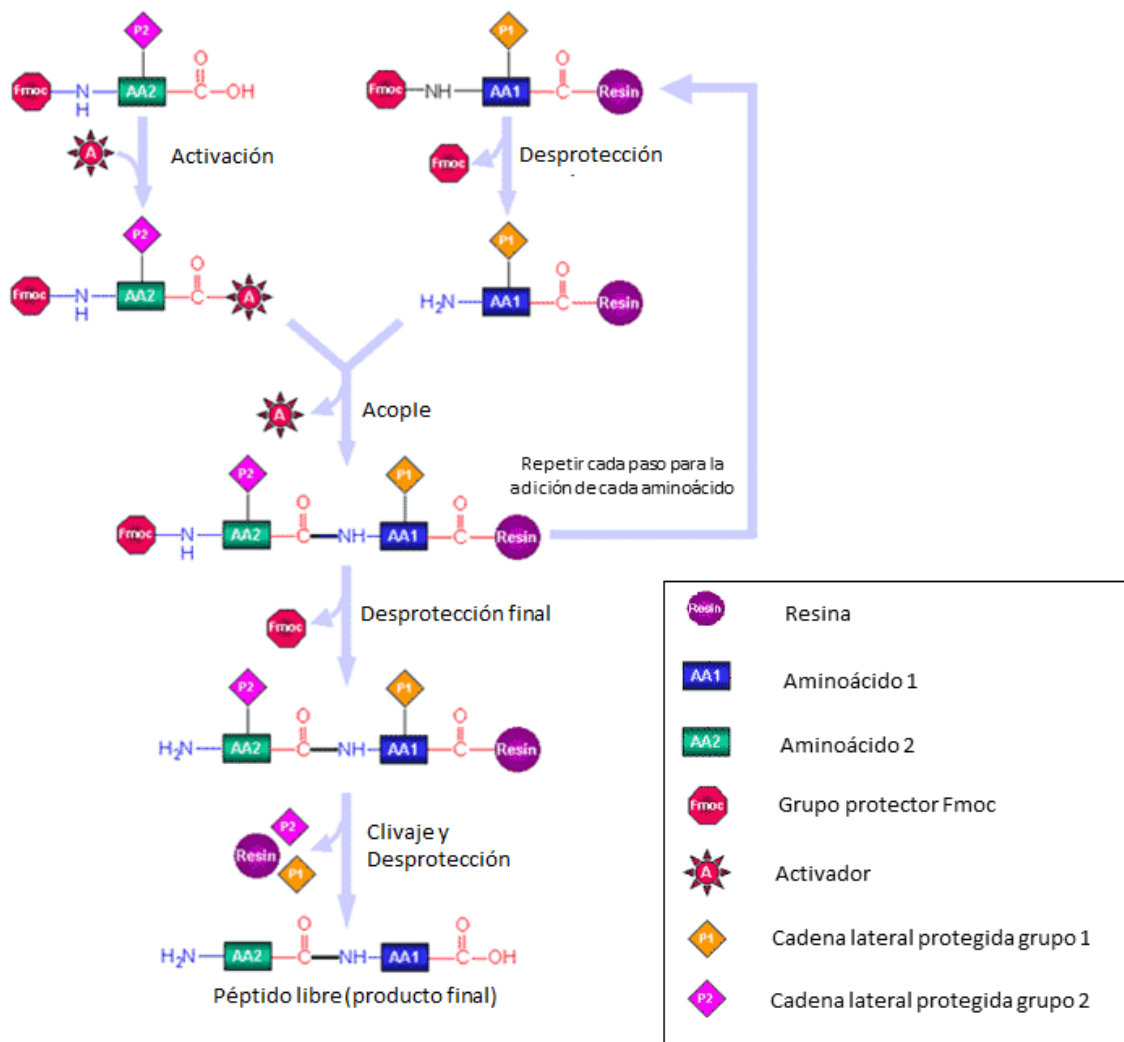
Figura 9. Representación esquemática de la protección del aminoácido L-Alanina con el grupo F-moc.



El crecimiento de la cadena peptídica se presenta desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal mediante la adición sucesiva de aminoácidos, cuyos grupos laterales están preservados adecuadamente con diferentes grupos protectores de acuerdo a las características del aminoácido, y el grupo α -amino está protegido con el grupo Fmoc. El proceso de desprotección y acoplamiento se repite tantas veces como sea necesario hasta obtener el péptido deseado (**Figura 11**). Luego del tratamiento con piperidina el péptido se lava y posteriormente se hace reaccionar con exceso del aminoácido y aditivos necesarios para generar un acople eficaz. Una vez culminada la síntesis, se realiza el proceso de clivaje con el fin de obtener el péptido libre o des anclado de la resina (ollivier *et al.*, 2005).

En la actualidad existen algunas variantes al método propuesto por Merrifield, siendo las estrategias Fmoc y terc-Butiloxicarbonilo (t-Boc) ampliamente usadas en la obtención de péptidos sintéticos (Soriano, 2002). La estrategia de síntesis Fmoc es suave, flexible y versátil brindando más opciones que la estrategia t-Boc; en la metodología de protección Fmoc, el ácido trifluoroacético (TFA) se utiliza solamente para el clivaje, mientras que en la estrategia t-Boc, el TFA se utiliza en cada ciclo para la desprotección del grupo amino, exponiendo el péptido a condiciones ácidas fuertes favoreciendo la formación de productos no deseados (Coin *et al.*, 2007).

Figura 10. Esquema de la SPFS utilizando la estrategia Fmoc.

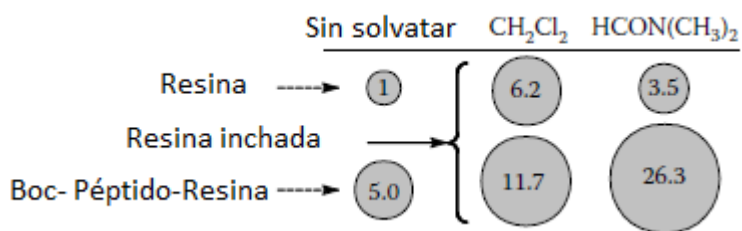


1.4.1 Soporte sólido

En los últimos años, el desarrollo de matrices poliméricas ha avanzado considerablemente, favoreciendo la versatilidad de la SPFS. La resina o soporte polimérico debe ser inerte en las condiciones empleadas en toda la síntesis y completamente insoluble en los disolventes empleados. Las resinas tienden a

aumentar el volumen superficial al interactuar con disolventes orgánicos como diclorometano (DCM) y dimetilformamida (DMF); la resina se solvata y se “incha” (**Figura 12**), siendo una característica fundamental para el buen desarrollo de la síntesis (Benoiton, 2006)

Figura 11. Solvatación de la resina por causa de los disolventes DCM y DMF.



Fuente: Benoiton, 2006.

Para la SPFS se han desarrollado diferentes soportes, entre ellos los soportes de tipo gel. Estos soportes son los más usados debido a la igual distribución de los grupos funcionales a través de la red polimérica. La red polimérica es flexible y la resina puede expandirse para acomodar a la molécula creciente dentro del gel. A continuación se mencionaran cuatro tipos de resinas de gel.

- La resina hidrófoba de poliestireno desarrollada por Merrifield, inicialmente era una resina con un 2% de entrecruzamiento con divinilbenceno clorometilado; posteriormente fue modificada a 1% debido a los problemas presentados en la síntesis de péptidos más complejos. Ésta resina es estable en un amplio rango de pH y temperatura.
- Las resinas de poliacrilamida desarrolladas por Sheppard surgieron como una alternativa hidrofílica para las resinas de poliestireno, son obtenidas mediante el entrecruzamiento de poly-N,N-dimetilacrilamida con 5% de bis-N,N'-acriloletilendiamina y como grupos funcionales N-acrilailsarcosina metil éster. Es una resina mucho más flexible porque permite mayor entrecruzamiento. Las resinas de poliacrilamida se hinchan mejor con

solventes polares y tiene mejores propiedades que las de poliestireno bajo condiciones polares de síntesis (Mende & Seitz, 2011)

- Las resinas funcionalizadas con pequeñas cantidades de polietilenglicol (PEG) se desarrollaron con el fin de aumentar su estabilidad y facilitar la elaboración de péptidos difíciles de sintetizar. Estas resinas se obtienen por la reacción de oligoetilenos con perlas de poliestireno aminometilado. Las perlas tienen la propiedad de hincharse con solventes polares y no polares pudiendo ser usadas indistintamente para t-Boc-aminoácidos o Fmoc-aminoácidos.
- Las resinas basadas en PEG, están compuestas exclusivamente de una red de polietilenglicol/polipropilenglicol (PEG/PPG) o por una combinación de PEG con una pequeña cantidad de poliamida o poliestireno. La resina es termoestable y quimioestable compatible con la síntesis con microondas. Además presentan mayor grado de expansión en comparación con las resinas con mayor porcentaje de poliestireno. Las moléculas de PEG son altamente dinámicas permitiendo que las reacciones de acoplamiento se lleven a cabo rápidamente. El carácter anfipático del PEG también impide que los péptidos se agreguen (Olliver, 2005).

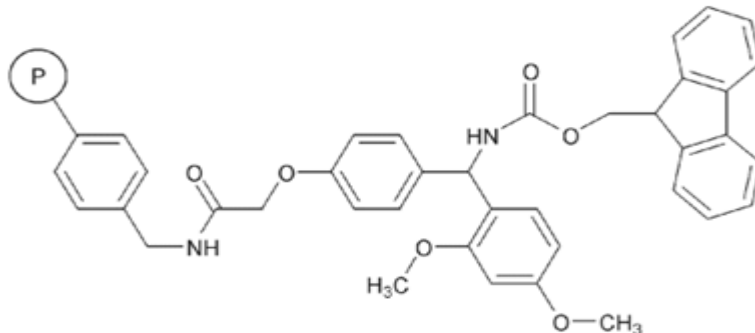
1.4.2 Espaciadores “linkers” entre el péptido y la resina.

El anclaje y desanclaje del péptido al soporte, se logra mediante el uso de moléculas bifuncionales, las cuales se adhieren de manera permanente al soporte sólido por un extremo y por el otro extremo se unen de manera temporal al grupo C-terminal del primer aminoácido que dará inicio a la formación del péptido. El espaciador debe formarse fácilmente, ser lo suficientemente estable a las continuas reacciones de desprotección y acoplamiento, y al mismo tiempo permitir

la liberación del péptido recién formado sin dañar ninguno de sus enlaces peptídicos.

Las resinas de “Rink” son las más utilizadas para generar la formación de amidas, originalmente se diseñaron y desarrollaron para la síntesis de amidas de péptidos mediante la estrategia Fmoc. La resina Rink amida 4-metilbencilhidrilamina (MBHA) (**Figura 13**), posee un grupo amino que permite la formación del enlace amida con el primer aminoácido acoplado; el clivaje se realiza en condiciones ácidas con 95% de TFA en agua, puede ser necesario el uso de captadores de carbocationes “scavengers”, como etanododitiol (EDT) y Triisopropilsilano (TIS) para evitar la formación de productos no deseados (Navarrete, 2007).

Figura 12. Diagrama del espaciador bifuncional Rink amida MBHA-Fmoc unido al soporte polimérico P.



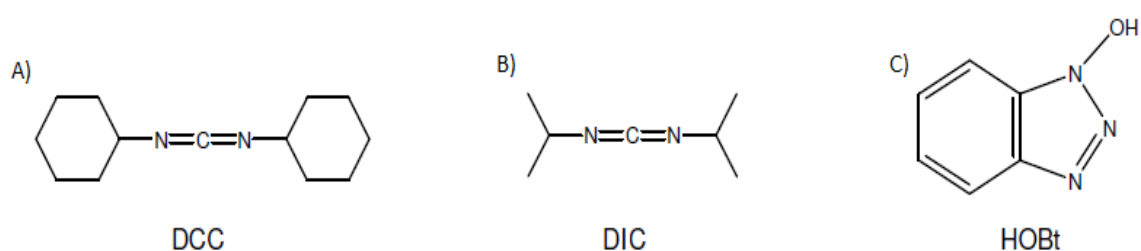
1.4.3 Reactivos de acoplamiento

Para que la reacción de acoplamiento sea eficiente y se minimicen los productos de racemización, es necesario que el grupo α -carboxílico del aminoácido esté fuertemente activado.

Las carbodiimidas son los reactivos de acoplamiento más utilizados en la SPFS (**Figura 14**). Inicialmente se usó la N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y en la

actualidad sigue siendo utilizada. Otra de las carbodiimidas más usadas es la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) aún más recomendada que la DCC, debido a la buena solubilidad de las ureas que se forman como subproductos. Cuando se emplean carbodiimidas como agentes de condensación, se recomienda el uso de aditivos como el 1-hidroxybenzotriazol (HOBt) los cuales aceleran la reacción y reducen el riesgo de racemización (Perez, 2007).

Figura 13. Estructura de las carbodiimidas y los aditivos utilizados en la SPFS.

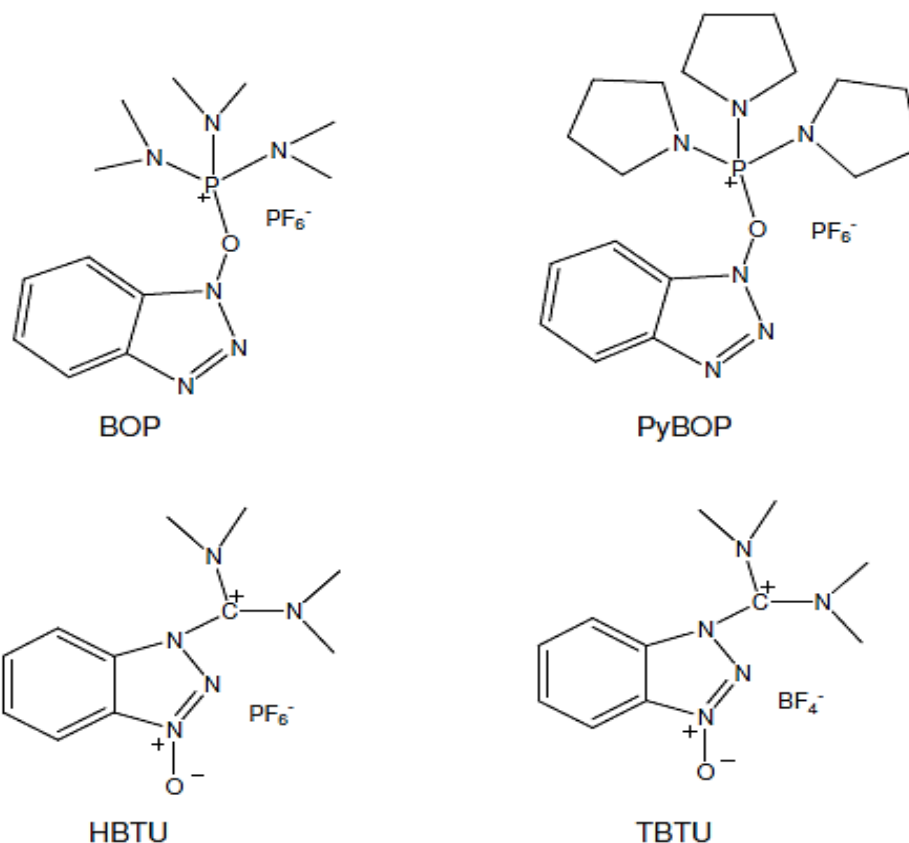


Fuente: Perez, 2007. *A) Estructura de la N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC). B). Estructura de la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). C). Estructura del 1-hidroxybenzotriazol (HOBt)

En los últimos años han surgido nuevos reactivos que minimizan la formación de subproductos no deseados y a su vez los tiempos de acople. La implementación de las sales de fosfonio (BOP - PyBOP) y de uronio (HBTU - TBTU) ha incrementado siendo indispensables en la SPFS (**Figura 15**).

Las sales de fosfonio y uronio, en presencia de una base, pueden convertir el carboxilato del aminoácido protegido en una especie activada. Entre las sales de uronio se encuentran el 2-(1H-benzotriazol-1-il) 1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluoroborato (HBTU) y el O-(benzotriazol-1-il) N, N, N', N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU).

Figura 14. Estructura de las sales de fosfonio (BOP - PyBOP) y de uronio (HBTU - TBTU)



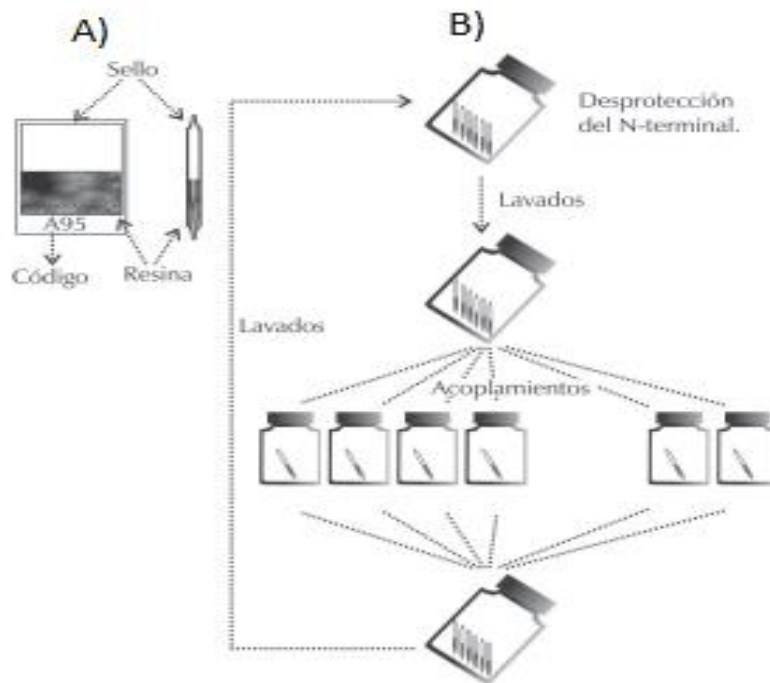
Fuente: Soriano, 2002.

1.4.4 Síntesis múltiple de péptidos

Éste método consiste en la síntesis de péptidos sobre porciones de resina contenidas en pequeñas bolsas porosas de polipropileno (**Figura 16**). Las bolsitas se sumergen dentro de soluciones individuales de los aminoácidos activados para llevar a cabo el acoplamiento. Los lavados y los pasos de desprotección se realizan simultáneamente en un único recipiente con agitación vigorosa. Posteriormente se separan las bolsas para poder acoplar un nuevo aminoácido; este proceso se repite las veces que sean necesarias para lograr los productos deseados. Como cada bolsa fue sometida a una secuencia de acoplamientos

definida, al final se obtiene un único péptido en cada una de ellas. Las bolsas deben ser etiquetadas para distinguir la secuencia sintetizada. Finalmente se separa el péptido de la resina mediante la utilización de un coctel de clivaje apropiado (Furlan *et al.*, 1996).

Figura 15. Representación de la síntesis en bolsa de polipropileno



Fuente: Reyes & Garay, 2000. *A) Bolsa debidamente rotulada, a la cual se le adiciona determinada cantidad de resina. B) Esquema de la síntesis múltiple con el uso de las bolsas permeables

1.5 PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS

Los avances en el campo biotecnológico han promovido el desarrollo de herramientas eficaces para la separación y purificación de compuestos orgánicos con el fin de estudiar adecuadamente sus propiedades biológicas y fisicoquímicas. La cromatografía líquida es una técnica eficiente para la separación de mezclas complejas de compuestos como péptidos, proteínas y ácidos nucleicos (Jiang *et*

al., 2006). Los métodos más potentes para el fraccionamiento o separación de péptidos y proteínas se basan en la cromatografía en columna, que aprovecha propiedades como diferencias de carga, tamaño, afinidad de unión, entre otras. Los diferentes tipos de cromatografía líquida son procesos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son retenidos de manera selectiva sobre una matriz sólida y porosa (fase estacionaria) y posteriormente son eluidos secuencialmente con el solvente (fase móvil). Los tipos de cromatografía más empleados para la purificación de péptidos y proteínas son los siguientes (Ye, 2006; Neverova & Van Eyk, 2005):

- *Cromatografía de intercambio catiónico.* En este tipo de cromatografía la matriz polimérica contiene grupos cargados negativamente los cuales interactúan por más tiempo con las moléculas de carga positiva neta disueltas en la fase móvil ocasionando que eluyan lentamente a través de la columna.
- *Cromatografía de exclusión molecular.* El principio de este tipo de cromatografía consiste en separar los péptidos y proteínas según su peso moléculas. En este método, las moléculas de mayor tamaño emergen de la columna antes que las de menor tamaño. La fase estacionaria está formada por partículas que contienen cavidades de tamaño calibrado, evitando que las moléculas más grandes puedan entrar en las cavidades, por lo que toman el camino más corto a través de la columna.
- *Cromatografía de afinidad.* Se basa en la afinidad de unión de los péptidos y proteínas a la fase estacionaria. En este caso, las partículas de la columna presentan un grupo químico unido covalentemente, permitiendo que una molécula afín disuelta en la fase móvil se una a las partículas de la columna, retardando su migración.

- *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*. La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica más utilizada para la purificación de péptidos. Mediante HPLC es posible separar el péptido de interés de una mezcla formada durante la SPFS. El método más usado es la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) ya que ofrece un amplio rango de manipulación de las características de la fase móvil y estacionaria para mejorar las separaciones peptídicas (Mant, 1997).

1.6 DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR Y ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Existen dos técnicas de gran utilidad, ampliamente utilizadas para determinar la masa molar y la estructura secundaria de péptidos y proteínas, estas técnicas se describen brevemente a continuación.

1.6.1 Espectrometría de masa de tiempo de vuelo (MALDI -TOF)

El método de desorción/ionización laser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF) es una técnica que permite determinar la masa molecular de los péptidos sintéticos, debido a la alta sensibilidad, velocidad de análisis y alto grado de especificidad molecular (Standing, 2003). Esta técnica es ampliamente utilizada para la identificación de biomoléculas como proteínas, lípidos, azúcares y péptidos que tienden a fragmentarse cuando son ionizadas por métodos convencionales como ionización electrónica o bombardeo con átomos rápidos.

1.6.2 Dicroísmo circular (DC)

La técnica de dicroísmo circular permite predecir el contenido de la estructura secundaria en los péptidos. Esta técnica emplea un rayo de luz conformado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la

izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, es decir, que rota el plano de la luz polarizada, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes en el medio. La desviación en el plano de la luz polarizada se debe al cambio en el índice de refracción entre la luz polarizada circular a la izquierda y a la derecha (Greenfield, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar nuevos péptidos análogos de Lactoferrampina Bovina (LFamp B) 265-284 con potencial actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas de *E. coli* O157:H7 y SARM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar péptidos con estructura helicoidal análogos de LFamp B 265-284 con actividad biológica contra bacterias patógenas de *E. coli* O157:H7 y SARM utilizando herramientas bioinformáticas.
- Sintetizar péptidos antimicrobianos análogos de LFamp B usando la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc (SPPS- Fmoc).
- Caracterizar los péptidos sintéticos antimicrobianos empleando las técnicas instrumentales MALDI-TOF y dicroísmo circular (DC), para verificar el peso molecular y la estructura 2D.
- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los péptidos sintéticos frente a las bacterias patógenas de *E. coli* O157:H7 y SARM.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Los L-aminoácidos protegidos en el extremo N-terminal con el grupo Fmoc fueron adquiridos de IRIS Biotech GmbH, los aditivos de SPFS como el TBTU, HBTU y HoAT, la DCC y la DIPEA fueron obtenidas de Alfa Aesar y la resina Rink amida 4MBHA de Merck Novabiochem.

Los medios de cultivo Luria-Bertani y Muller-Hilton, junto con el agar fueron obtenidos de OXIOI. Los disolventes grado HPLC como el acetonitrilo y metanol fueron adquiridos desde Merck. El diclorometano e isopropanol fueron obtenidos de Merck. Todos los reactivos utilizados son grado analítico.

La cepa bacteriana de *E. coli* O157:H7 fue donada por la Universidad Pontificia Javeriana de Colombia. *S. aureus* metilcilino resistente fue adquirida del Laboratorio de Bacteriología de la UIS.

Las reacciones y ensayos de actividad antimicrobiana fueron realizados empleando agua MilliQ de resistividad 18,2 Ω adquirida en el Laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

3.2 MÉTODOS

Se diseñaron cuatro péptidos análogos de LFamp B los cuales se sintetizaron y caracterizaron mediante el uso de las técnicas analíticas MALDI TOF y DC; la LFamp B también se sintetizó y se caracterizó del mismo modo que sus análogos. Finalmente, se determinó la actividad antimicrobiana de la LFamp B y sus análogos, por el método de microdilución en caldo, frente a *E. coli* O157:H7 y SARM. En la figura 17 se muestra la metodología general.

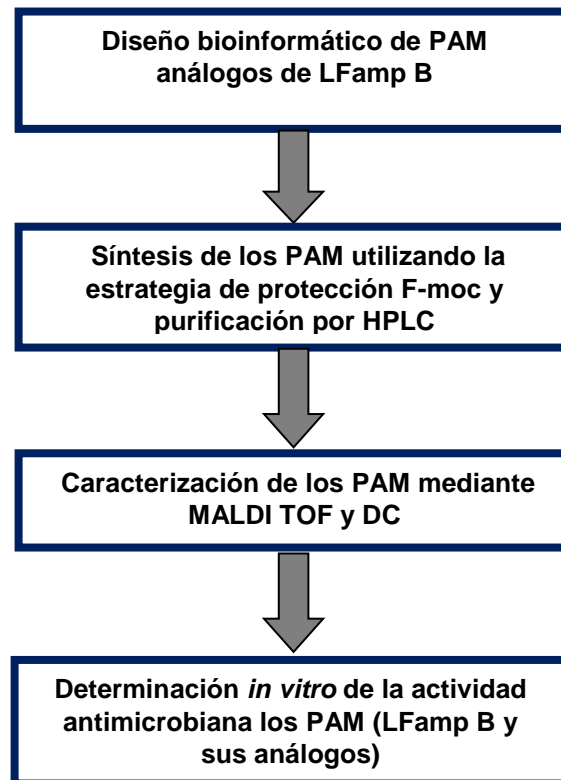


Figura 17. Metodología general.

3.2.1 Diseño bioinformático de los PAM análogos de LFamp B

La secuencia de la LFamp B fue alineada contra diferentes proteínas homólogas, de la familia de las transferrinas, todas reportadas en la base de datos en línea y de acceso libre *National Center for biotechnology information* (NCBI) cuyo sitio en internet es: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>. La secuencia de la LFamp B fue alineada usando la herramienta de búsqueda básica local de la alineación de proteínas BLAST y el método de alineamiento múltiple de secuencia Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) con el fin de obtener residuos conservados en los nuevos péptidos diseñados y a su vez, determinar los aminoácidos que podían ser cambiados en la secuencia del péptido, para originar péptidos análogos a la secuencia nativa con propiedades antimicrobianas mejoradas. Además se utilizó la base de datos denominada *Collection of Anti-*

Microbial Peptides (CAMP), para determinar de forma teórica los valores de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos (Lfamp B y sus análogos), como hidrofobicidad, índice alifático, carga neta, punto isoeléctrico y peso molecular. Adicionalmente, para cada secuencia, se calculó el porcentaje de predicción para ser un péptido antimicrobiano (% PAM). A partir del análisis teórico descrito anteriormente se diseñaron cuatro análogos de LFamp B con potencial actividad antimicrobiana.

El programa PEP FOLD (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) se utilizó para predecir la estructura secundaria de las secuencias peptídicas correspondientes a la LFamp y sus cuatro análogos. Posteriormente, las secuencias modeladas se visualizaron empleando el programa PyMol.

3.2.2 Síntesis de los PAM utilizando la estrategia de protección F-moc y purificación por HPLC

Los péptidos se obtuvieron realizando síntesis química en fase sólida, empleando la estrategia Fmoc en bolsas de polipropileno (Lloyd-Williams, 1997; Andreu, 1994). Se usó la resina Rink amida 4MBHA (capacidad: 0.36 mmol/gramo) como soporte sólido para la síntesis de los péptidos a partir del extremo C-terminal. Los aminoácidos correspondientes en cada secuencia fueron acoplados con N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) como neutralizador *in situ* y O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) como agente antirracémico (7 equivalentes DIPEA /5 equivalentes TBTU) para acoples de 6 horas de duración y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) junto con el 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) para los acoples de 12 horas (Merrefield, 1997). La desprotección del grupo Fmoc se llevó a cabo con piperidina al 25% en DMF; realizando dos lavados de 20 minutos. El indicador azul de bromofenol (1% en DMF) se añadió a la

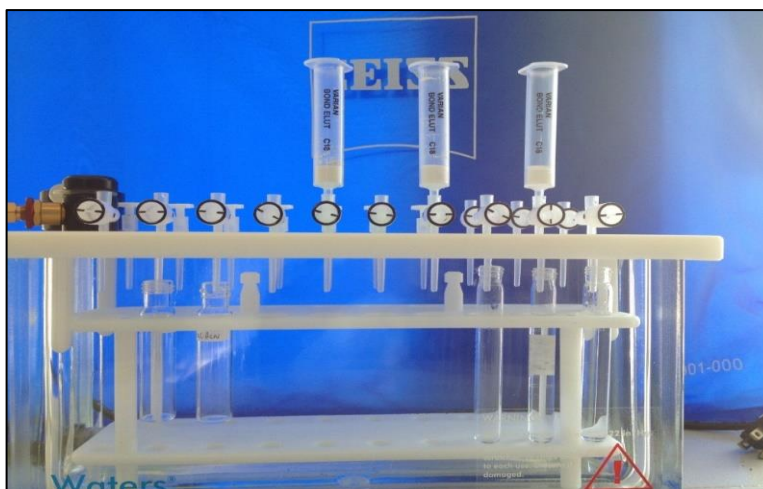
solución al finalizar cada ciclo de desprotección para verificar de forma cualitativa la eficiencia de los acoples en la reacción.

Finalizada la síntesis del péptido, se realizó el procedimiento de clivaje para desanclar el péptido del soporte sólido. Para la escisión del péptido, se utilizó una mezcla de ácido trifluoroacético/ agua/ Etanoditiol/ trihidroxipropilsilano (TFA/H₂O/EDT/TIS) (92,5:2,5:2,5:2,5), posteriormente se dejaron los reactores en agitación durante 2 horas, luego se filtró la resina y se precipitó la solución filtrada con 2mL de éter frío. Luego se centrifugó el filtrado a 7000 rpm a 4°C durante 15 minutos (Nilsson *et al*, 2005). El precipitado obtenido en cada reactor se disolvió en tres mL de agua MilliQ y se liofilizó. Todas las muestras se almacenaron a – 20°C.

3.2.2.1 Purificación de los PAM

Los péptidos fueron sometidos al proceso de purificación empleando una microcolumna LiChrolut RP SepPack C-18 y se eluyeron con soluciones de ACN/H₂O a diferentes concentraciones, con un flujo aproximado de 1mL/min (Figura 17).

Figura 16. Montaje de microextracción en fase sólida.



Los porcentajes de las soluciones de ACN/H₂O utilizados fueron 10%, 20%,30%,50%,70% y 100%. La pureza de los péptidos se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa RP-HPLC usando una columna Vydac C-18 (250mm X 10mm), con un tamaño de poro de 80 Å. La fase móvil estaba constituida por la solución A:B; solución A (0.01% TFA en H₂O), solución B (0.01% TFA en ACN). Se utilizó un método isocrático 30:70 durante 15 minutos, el volumen de inyección fue de 40µL y la detección se realizó a través de un detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 220nm.

3.2.3 Caracterización de los PAM por MALDI- TOF y DC

La caracterización de los péptidos se llevó a cabo utilizando la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF y dicroísmo circular DC, con el fin de confirmar la masa molecular de los péptidos y la estructura secundaria, respectivamente.

Espectrometría de masas MALDI-TOF. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando un espectrómetro Bruker Daltonics. Los ensayos se realizaron usando la técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) con un analizador de tiempo de vuelo (TOF). La matriz fue preparada con solución saturada de 1mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) en una mezcla de ACN:H₂O (50:50) con TFA al 0.01%. Posteriormente en la placa de análisis, se colocó 1µL de cada péptido en medio de una doble capa de matriz; el volumen dispuesto para cada capa de matriz fue de 1µL. Las muestras se dejaron secar antes de realizar el análisis.

Dicroísmo circular (DC). El análisis por dicroísmo circular se llevó a cabo a temperatura ambiente en celdas lavadas con nitrógeno y usando un espectropolarímetro Jasco J-810. El espectro se tomó en un intervalo de longitud de onda entre 190-260nm usando una celda rectangular con paso óptico de 1 mm.

Cada espectro fue obtenido como un promedio de tres escáneres tomados a una velocidad de 20nm/min con un ancho de banda espectral de 1nm. El perfil de DC de cada molécula fue obtenido en una solución acuosa del 0-30% de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) en un volumen final de 500µL. Los resultados fueron expresados como el grado de elipticidad (θ):

$$(\theta) = \frac{\theta_{\lambda}}{100 * l * c * n} (\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1})$$

Donde:

l = la longitud del camino óptico (cm).

c = concentración del péptido (mg/mL).

n = número de residuos de aminoácidos en la secuencia.

3.2.4 DETERMINACIÓN DE LA CMI Y LA CMB DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS (LFAMP B Y SUS ANÁLOGOS) FRENTE A *E. Coli* O157:H7 Y SARM

Para determinar el efecto antimicrobiano de los péptidos sintéticos, se empleó el método de micro dilución en caldo (Martínez, 2010; Wayne, 2003). Inicialmente, se preparó un preinóculo de *E. coli* O157:H7 y SARM empleando como medios de cultivo Luria-Bertani y Muller-Hilton respectivamente. Cada preinóculo se incubó durante 12 horas a 37°C y agitación a 200rpm hasta alcanzar una concentración aproximada de 1×10^8 UFC/mL. La cinética de crecimiento se realizó adicionando 100 µL de suspensión bacteriana de concentración conocida a microplacas de 96 pozos que previamente contenían soluciones de concentración (5, 10, 25, 50, 75 y 100) µM de los péptidos sintetizados. Las medidas de densidad óptica fueron realizadas en un espectrofotómetro lector de microplacas ELISA marca Biorad-Imarck a 595nm, cada hora durante 8 horas. La CMI fue determinada como la mínima concentración necesaria de agente antimicrobiano para causar inhibición en el crecimiento bacteriano. Las CMI consideradas fueron: CMI₅₀ CMI₉₀ y CMI₉₉

que corresponden a la inhibición de crecimiento en un 50%, 90% y 99% respectivamente.

Posterior a la cinética de crecimiento, se tomaron alícuotas de 100 μL de cada pozo donde no se evidenció crecimiento bacteriano, 100 μL de medio estéril y 100 μL de suspensión bacteriana en ausencia de péptido y se re suspendieron en 900 μL de medio esteril Infusión Cerebro Corazón (BHI por sus siglas en ingles) en tubos eppendorf y se incubaron a 37°C durante 12 horas. Luego, se sembraron por triplicado en cajas Petri de agar BHI alícuotas de 5 μL de cada uno de las muestras incubadas, incluidos el medio estéril, el cual se estableció cómo el control de esterilidad y la solución con suspensión bacteriana, la cual se estableció como control de crecimiento, con el fin de corroborar el efecto bactericida de los péptidos donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. Luego que se sembraron las muestras, se incubaron durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) como aquella concentración que inhibió el 100% del crecimiento bacteriano en comparación con el control de crecimiento de la cepa evaluada (sin tratamiento con el agente antimicrobiano).

4 RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 DISEÑO BIOINFORMÁTICO Y SÍNTESIS DE PAM

El alineamiento múltiple de secuencia de la LFamp B se realizó en la base de datos NCBI comparando diez proteínas diferentes con alta homología (>90% de identidad); las diez proteínas pertenecen a la familia de las transferrinas. Los números de acceso de las proteínas alineadas están reportados en la **Tabla 2**. El programa Clustal W ([http:// www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)) se utilizó para alinear las secuencias y realizar el análisis de las regiones conservadas.

Tabla 2. Alineamiento múltiple de secuencias (Clustal W) de LFamp B contra diferentes proteínas.

Nº de acceso GENBANK	Fragmento proteico con homología de secuencia superior al 90%
P24627.2	DLIWKLLSKAQEKFGKNKSR
O77698.1	DLIWKLLSKAQEKFGKNKSG
Q29477.1	NLIWELLRKAQEKFGKNKSQ
Q9TUM0	DLIWKLLVKAQEKFGRGKPS
Q29545.1	DLIWELLNQAQENFGKDKSA
O77811.1	DLIWRLHRAQEEFGRNKSS
P19134.4	DLIWELLNQAQEHFGKDKSG
P02787.3	DLIWELLNQAQEHFGKDKSK
A5A6I6.1	DLIWELLNQAQEHFGKDKSK
P02788.6	DAIWNLLRQAQEKFGKDKSP
LFamp B	DLIWKLLSKAQEKFGKNKSR
	: ** .** : * * * . * * : . * .

(*) Representa: mismo aminoácido en todas las secuencias comparadas, (:) sustituciones conservadas (Aa con las mismas propiedades), (.) sustituciones no conservadas (Aa con distintas propiedades).

Los análogos se diseñaron realizando modificaciones a la secuencia de la LFamp B en los aminoácidos no conservados principalmente. En la **Tabla 3** se muestran los cuatro análogos diseñados.

Tabla 3. Secuencias diseñadas y sintetizadas de PAM análogos de LFamp B.

Nombre	Nombre abreviado	Secuencia
Lactoferrampina bovina	LFamp B	DLIWKLLSKAQEKFGKNKSR : * * . ** : * * * . ** : . *
Análogo 1	A1	DLIWKLLKKAQEKFGKNKSR
Análogo 2	A2	DLIWKLLSKAQEKFGKNKSK
Análogo 3	A3	DIIWKLLSKAQEKFGKNKIK
Análogo 4	A4	DLIWKLFSKAWKFGKNKSR

*En rojo se muestran los aminoácidos conservados en la secuencia, en verde se muestran los aminoácidos incluidos al remplazar un aminoácido de la secuencia base (LFamp B) y en negro, se muestran los aminoácidos no modificados en la secuencia.

Las modificaciones realizadas en la LFamp B fueron: Sustitución del aminoácido serina (S) por lisina (K) en la posición 272 para el análogo 1. Sustitución del aminoácido arginina (R) por lisina (K) en la posición 284 para el análogo 2. Sustitución de los aminoácidos leucina (L), serina (S), arginina (R) por isoleucina (I), isoleucina (I), lisina (K) en las posiciones 266, 283, 284 respectivamente para el análogo 3. El análogo A4 se diseñó realizando dos modificaciones en la región N-terminal de la LFamp B con el fin de aumentar el número de residuos hidrofóbicos responsables de la inserción del péptido en la membrana bacteriana (Hanney, 2012). Las modificaciones realizadas en la secuencia de la LFamp B para diseñar el péptido A4 implicó, en los dos casos, la sustitución de residuos conservados en la secuencia nativa (LFamp B). La primera modificación fue la sustitución del residuo de leucina (L) en la posición 271 por el residuo de fenilalanina (F), seguido por la sustitución del residuo de glutamina (Q) en la posición 275 por triptófano (W).

Las características fisicoquímicas de los PAM diseñados tales como carga neta, hidropatía, volumen, punto isoeléctrico (PI), entre otras, fueron calculados en los sitios web de libre acceso (<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp> y <http://www.camp.bicnirrh.res.in>). Los valores obtenidos se encuentran registrados en la **Tabla 4**.

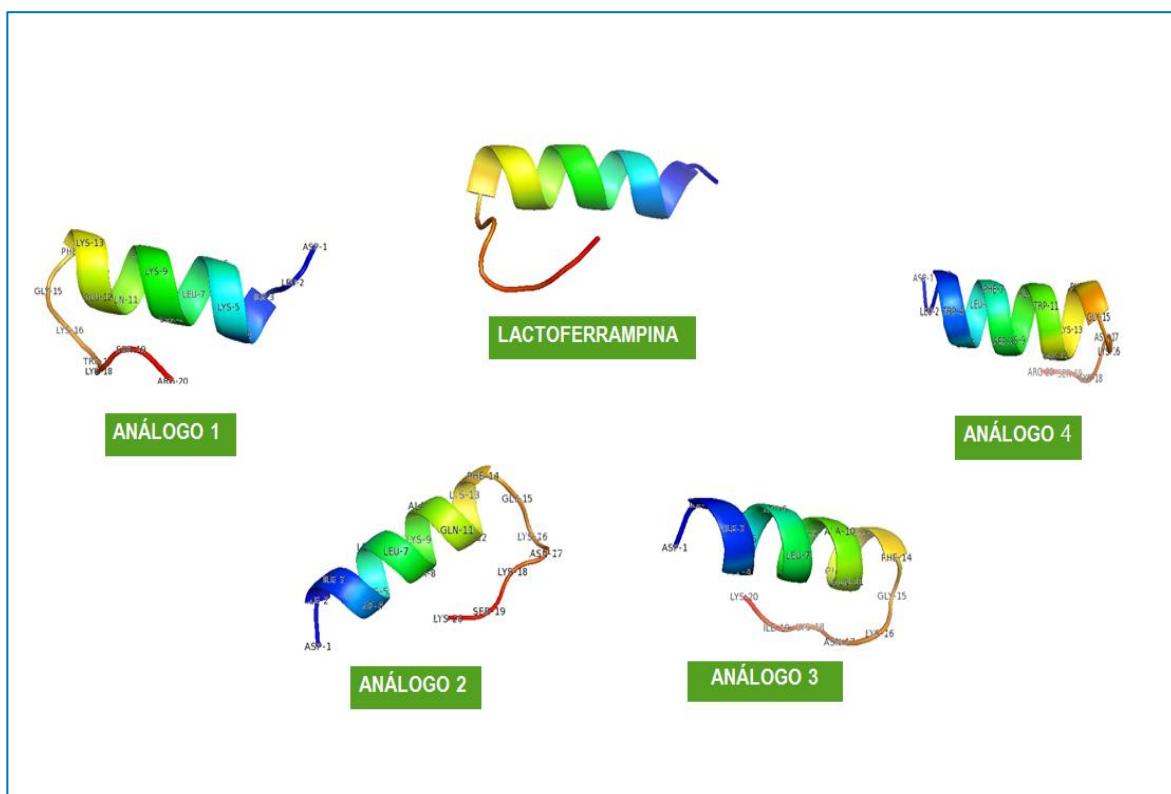
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de los PAM

Nombre	Secuencia	Carga neta	M [g/mol]	Hidropatía	Estructura 2-D	Volumen [Å ³]	PI
LFamp B	DLIWKLLSKAQ EKFGKNKSR	+4	2390	-1.02	α-Hélice	2892	10.7
A1	DLIWKLLKKAQ EKFGKNKSR	+5	2431	-1.18	α-hélice	2942	10.8
A2	DLIWKLLSKAQ EKFGKNKSK	+4	2362	-0.99	α-hélice	2858	10.5
A3	DIWKLLSKAQ EKFGKNKIK	+4	2388	-0.69	α-hélice	2889	10.5
A4	DLIWKLFSKAW EKFGKNKSR	+4	2482	-0.94	α-hélice	3003	10.7

El valor de PI corresponde al punto isoeléctrico calculado a pH neutro.

La predicción de la estructura secundaria de los PAM (LFamp B y sus análogos) se realizó con el programa PEP FOLD, posteriormente las estructuras se visualizaron usando el programa PyMol. Todas las secuencias diseñadas, incluyendo la LFamp B, se caracterizaron por adquirir la conformación α-hélice (**Figura 18**).

Figura 17. Estructuras secundarias de los PAM visualizadas en el programa PyMol.



*Todas las secuencias presentan estructura secundaria tipo α -helice.

4.2 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PAM

Los PAM fueron caracterizados por MALDI-TOF y DC, adicionalmente se verificó la pureza de cada uno de los compuestos sintetizados por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.

4.2.1 Determinación de la pureza por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (HPLC-RP)

Los péptidos sintetizados fueron purificados por RP-HPLC obteniéndose en todos los cromatogramas una señal principal, sin deleciones (**Anexo 1**). Los productos finales se obtuvieron con un grado de pureza entre el 90 y 98%. Los tiempos de

retención (**Anexo 2**) de los compuestos sintetizados fueron cercanos a 1.904min con una desviación estándar de 7.12×10^{-3} , indicando que los péptidos interactúan de manera similar con la fase estacionaria de la columna C₁₈.

4.2.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Todos los péptidos sintetizados se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados obtenidos a partir del análisis por MALDI-TOF son presentados en la **tabla 5**, los valores experimentales de m/z (unidades de masa) para cada péptido fueron acordes con sus respectivas masas moleculares teóricas obtenidas del sitio web de libre acceso <http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>. Los espectros de masas de los péptidos sintetizados se muestran en los **anexos 3, 4, 5, 6 y 7**.

Tabla 5. Valores de masa teóricos y experimentales de los PAM sintetizados.

Nombre	[M+H] _{Cal} (g/mol)	[M+H] _{Exp} m/z (Da)	Δm (Da)
LFamp B	2389.84	2389.275	0.56
A1	2430.94	2429.518	1.42
A2	2362.27	2361.270	0.96
A3	2387.91	2387.384	0.47
A4	2479.01	2478.950	0.06

*M representa la masa molar expresada en g/mol y m/z representa la relación masa-carga expresada en Dalton (Da).

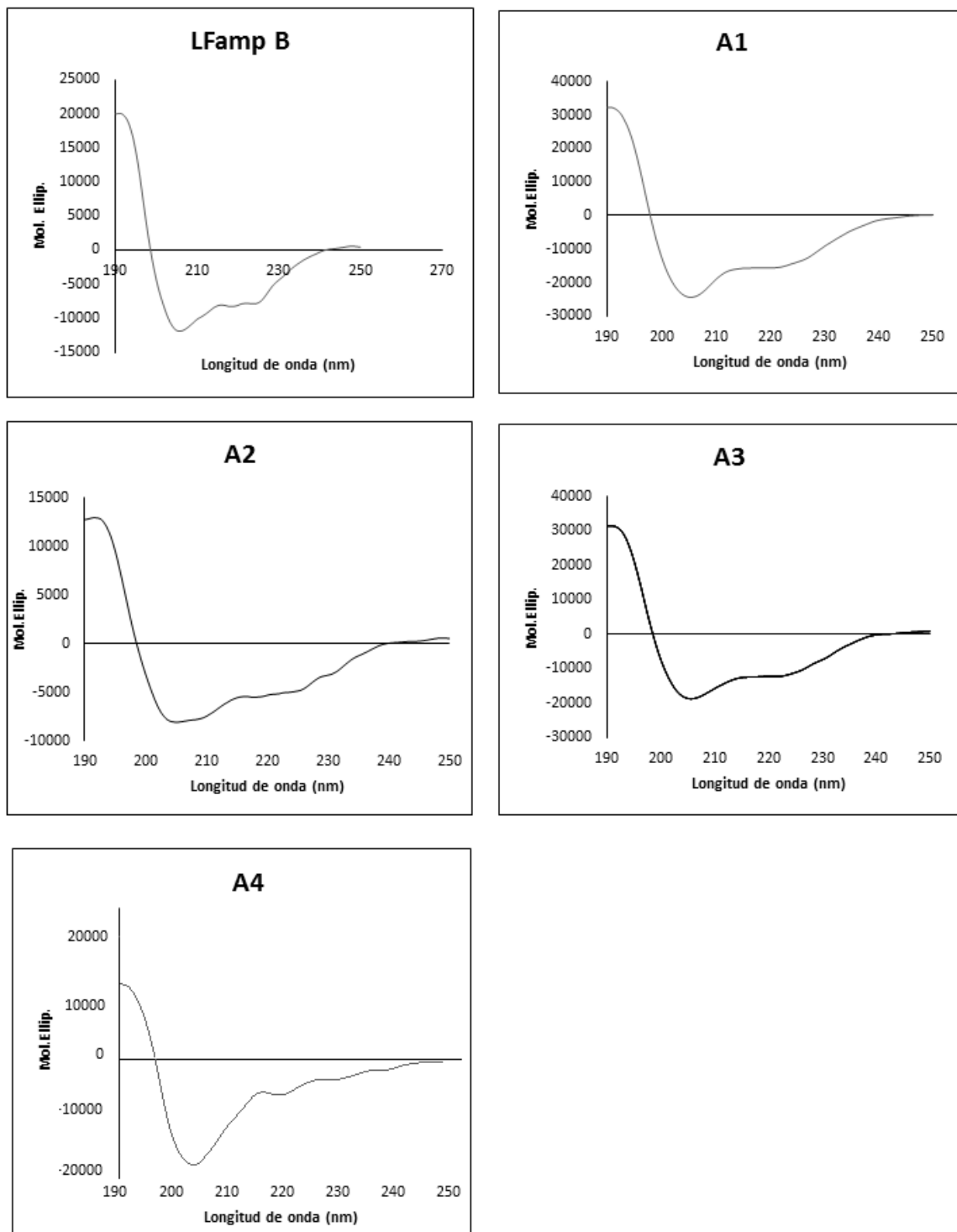
4.2.3 Dicroísmo circular (DC)

Para determinar la estructura secundaria de la LFamp B y sus análogos se realizaron los espectros de DC de los PAM en condiciones simuladas de membrana en presencia de TFE/H₂O al 30% v/v.

Los espectros de DC de la LFamp B y los análogos 1, 2, 3 y 4 (**Figura 19**) exhibieron una banda positiva con un máximo entre 190 y 195 nm, adicionalmente, mostraron dos mínimos cercanos a 205 y 217nm. El DC es útil en la determinación de la estructura secundaria de los péptidos, ya que el espectro muestra la disposición espacial de las unidades quirales de la cadena peptídica. Un péptido con estructura helicoidal genera un perfil de DC fácilmente diferenciable exhibiendo una banda positiva cerca de 192 nm la cual corresponde a transiciones electrónicas de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ y dos máximos negativos cerca de 222 y 208 nm correspondiente a transiciones de tipo $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ respectivamente (Juban *et al.*, 1997). La LFamp B y sus análogos mostraron un perfil similar al conferido por una estructura α -hélice bien definida (Keiderling, 2002).

Todos los péptidos sintetizados presentan un fragmento hidrofóbico en la región N-terminal y un fragmento hidrofílico en la región C-terminal. El fragmento hidrófobo va desde el residuo de W 268 hasta el residuo de F 278 y pueden adquirir la estructura tipo helicoidal, de acuerdo con los resultados de DC y el predictor de estructura 2-D PEP-FOLD.

Figura 18. Espectros de DC de los péptidos LFamp B, A1, A2, A3 y A4. Cada uno de los espectros fue tomado utilizando solución de TFE al 30% en H₂O.



4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS PAM

La actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos fue evaluada empleando el método de microdilución en caldo utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas ELISA, la densidad óptica fue registrada a 595 nm.

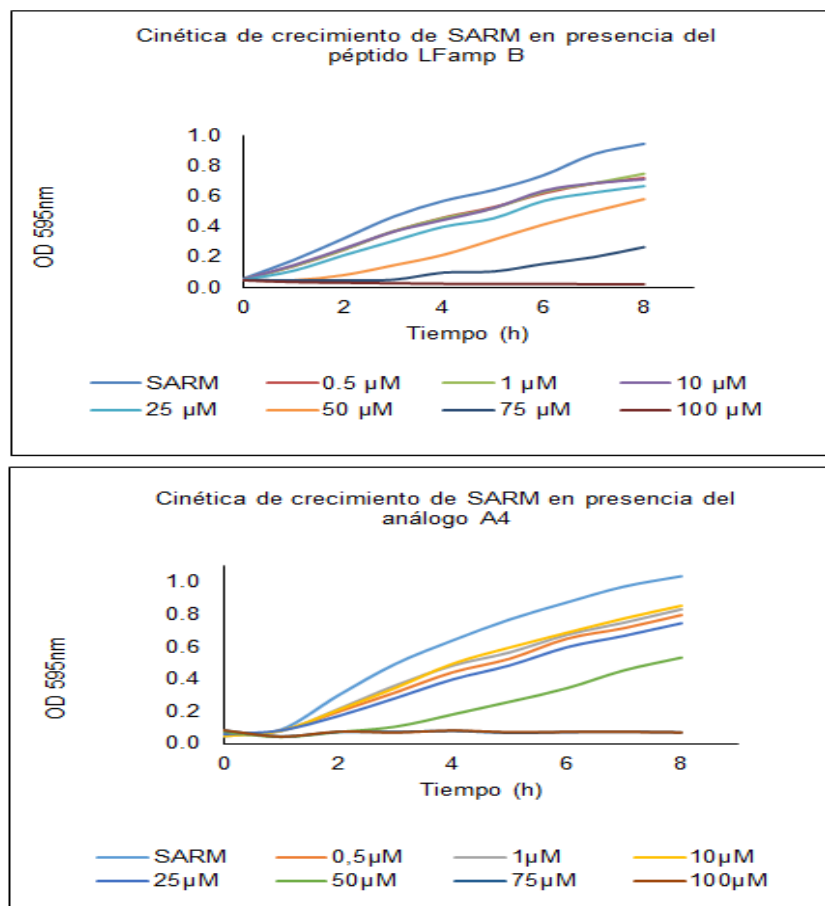
Con el fin de evaluar el posible efecto antimicrobiano de los péptidos sintetizados, se realizó la cinética de crecimiento de las cepas de SARM y *E.coli* O157:H7 en presencia de la LFamp B y sus análogos. Las concentraciones de péptido utilizadas en todos los ensayos fueron: (0.5, 1, 10, 25, 50, 75 y 100)µM. Las muestras se incubaron a 37°C con agitación constante de 200 rpm y la cinética de crecimiento se evaluó durante un periodo de ocho horas, realizando mediciones cada hora.

En la **figura 20** se observa un efecto inhibitorio dependiente de la concentración, es decir, el aumento de la concentración de la LFamp B y el análogo A4 causaron mayor inhibición del crecimiento de la bacteria SARM. La concentración 75 µM de la LFamp B inhibió el 70% del crecimiento de SARM y la concentración 100 µM inhibió más del 99% del crecimiento del patógeno Gram positivo al igual que las concentraciones 75µM y 100µM del péptido A4, lo que corresponde a un aumento del 29% de la actividad biológica de la concentración 75 µM del análogo A4 comparado con la LFamp B a la misma concentración.

Este comportamiento se debe posiblemente al carácter catiónico de la LFamp B ya que las cargas positivas son esenciales para el acercamiento inicial con la membrana citoplasmática de los microorganismos (Haney *et al.*, 2012). Además, otros estudios revelan que la carga neta positiva de los péptidos está estrechamente relacionada con la actividad frente a microorganismos como bacterias y levaduras (Van der Kraam, 2004).

Ha sido ampliamente demostrado que los PAM catiónicos interactúan en primera instancia por medio de fuerzas electrostáticas con los ácidos teicoicos y LPS de la membrana (Haney *et al.*, 2012; Dautin & Bernstein, 2007; Doerrler, 2006; Chan *et al.*, 2006) y de esta manera, los PAM quedan expuestos a un ambiente relativamente más hidrofóbico. El entorno hidrofóbico minimiza el contacto de los péptidos con el agua estabilizando la estructura 2-D tipo helicoidal (Yin *et al.*, 2012), como se observó en los espectros de DC. Posteriormente los péptidos ejercen su acción antimicrobiana sobre la bacteria.

Figura 19. Perfiles de la cinética de crecimiento de SARM en presencia de la LFamp B y el análogo A4, respectivamente.



*SARM representa el control de crecimiento de la bacteria en ausencia de antimicrobiano.

La bacteria SARM fue menos susceptible al tratamiento con el análogo A1, mostrando menor inhibición del crecimiento bacteriano en comparación con la LFamp B y el análogo A4; el análogo A1 inhibió el 82%, 55% y 39% del crecimiento de la bacteria SARM a las concentraciones 100 μM , 75 μM y 50 μM , respectivamente. La inhibición del crecimiento de SARM en presencia de los análogos A2 y A3 no fue significativa siendo inferior al 50%. Los perfiles de la cinética de crecimiento bacteriano de SARM en presencia de los péptidos A1, A2 y A3 se muestran en el **anexo 8**.

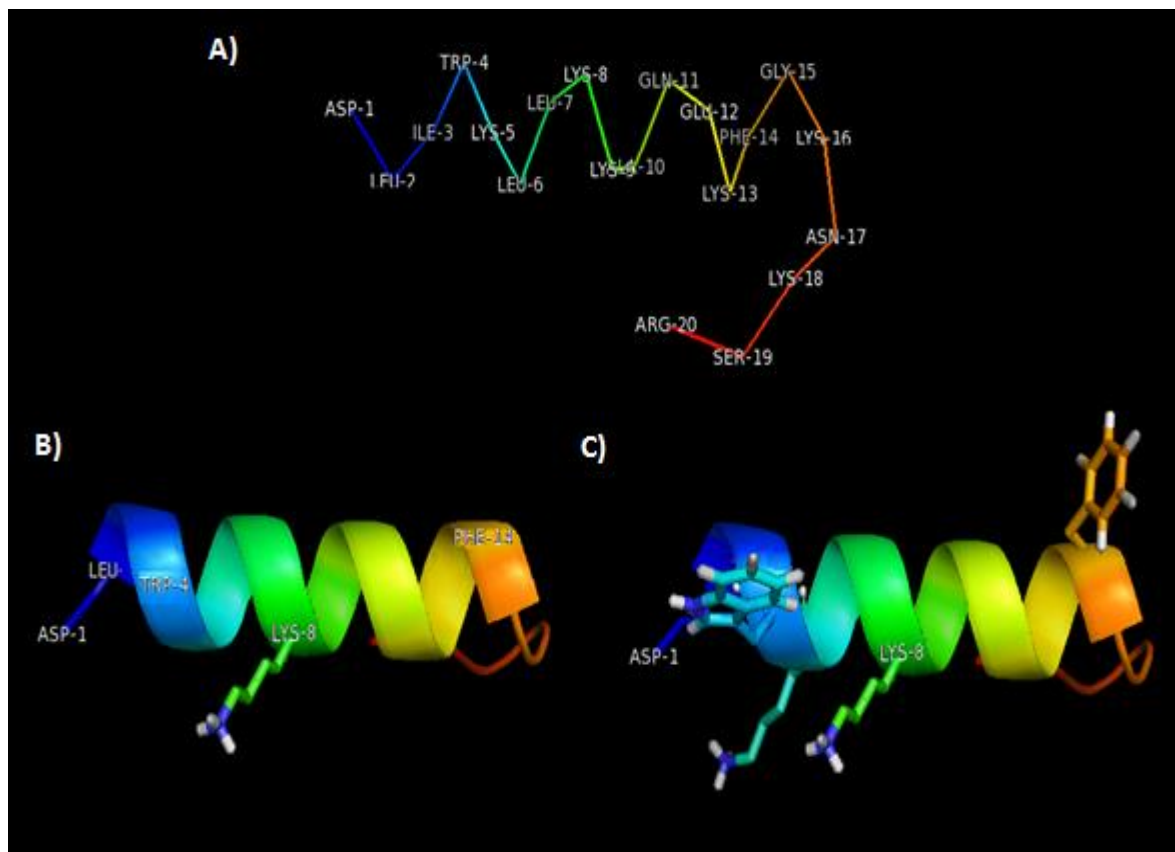
El diseño del análogo A1 consistió en la sustitución del residuo de serina (S) en la posición 272 de la LFamp B por un residuo de lisina (K), con el fin de aumentar la carga neta del péptido y de esta manera, mejorar la interacción con la membrana bacteriana. Los resultados obtenidos mostraron disminución de la actividad biológica del péptido A1 frente a SARM en comparación con la LFamp B y el análogo A4 pese a que fue el péptido con un valor de carga neta superior, en comparación con los demás péptidos sintetizados. Posiblemente el residuo de K 272 cargado positivamente, interactúa a través de fuerzas electrostáticas con las cabezas polares de los fosfolípidos ubicadas en la superficie de la membrana, evitando la inserción de los residuos de W y F en la bicapa lipídica. Se cree que durante las ocho horas de la cinética de crecimiento, el péptido A1 no adquiere sitios de anclaje contundentes, la interacción electrostática no es suficiente para mantener el péptido unido a la membrana (Haney *et al.*, 2012) induciendo que el antimicrobiano se suelte y la bacteria sobreviva. En la **figura 21** se propone un modelo que sustenta lo dicho anteriormente acerca del comportamiento del péptido A1.

La sustitución del residuo de arginina (R) por lisina (K) en la posición 284 del análogo A2, causó disminución de la actividad del péptido frente a las cepas estudiadas. El residuo de R en el extremo C-terminal favorece la atracción del péptido con la membrana, permitiendo la interacción de tipo enlaces de hidrogeno

con especies negativas de la superficie de la bacteria, tales como fosfolípidos, LPS, ácidos teicoicos y fosfatidil glicerol (Chan *et al.*, 2006).

El análogo A3 fue el péptido menos activo. Además de la sustitución de R 284 por K, se le suma la modificación de S 283 por el aminoácido apolar isoleucina (I) y la sustitución de leucina (L) en la posición 266 por I. En este caso, la modificación de uno de los aminoácidos conservados en la secuencia, generó disminución drástica en la actividad del péptido sintético.

Figura 20. Representación de la estructura 1-D y 2-D del péptido A1



*A) representa la estructura lineal o secuencia 1-D. B) representa la estructura 2-D con la cadena lateral del residuo de K 272 equivalente a la posición 8 del panel A). C) representa la estructura 2-D con visualización de las cadenas laterales de los residuos W 268, K 269, K 272 y F 278. Posiblemente los residuos de K 269 y K 272 interactúan con la membrana a través de fuerzas electrostáticas dejando los

residuos de W y F orientados hacia el exterior sin posibilidad de anclaje en la bicapa lipídica.

Los valores de CMI y CMB de los péptidos sintéticos frente a la cepa SARM se pueden ver en la **tabla 6**.

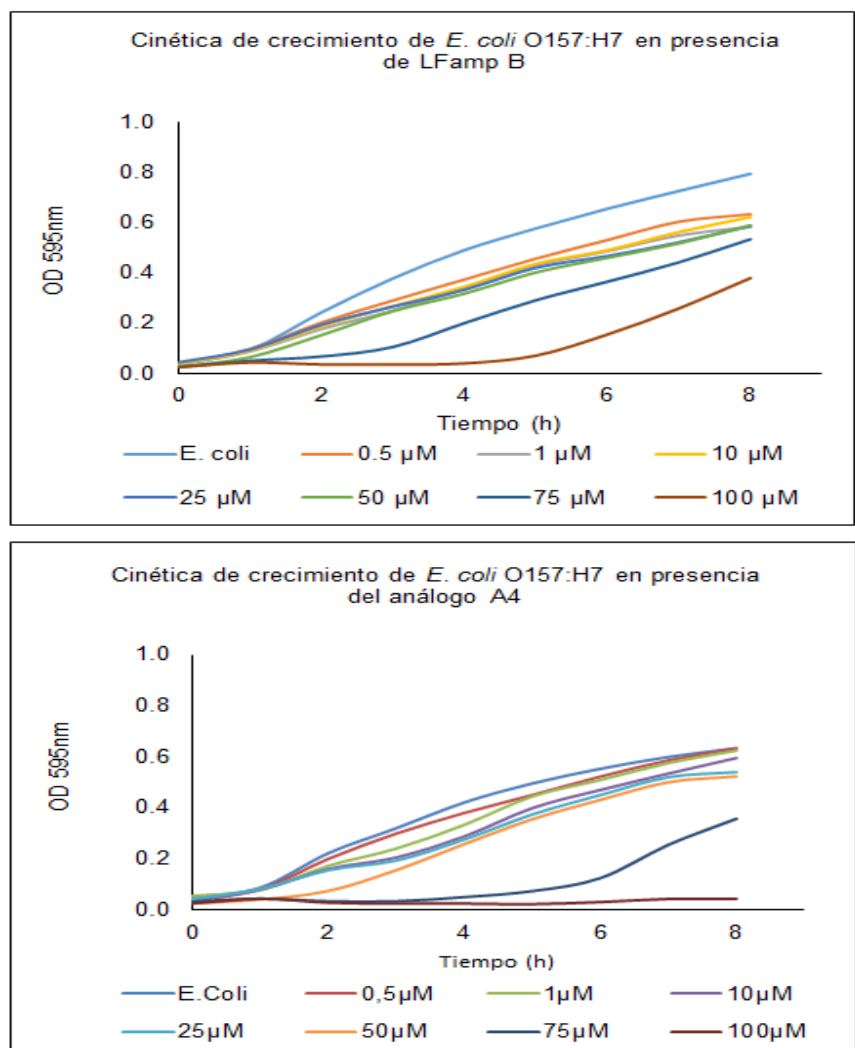
Tabla 6. Resultados obtenidos de CMI y CMB de los péptidos sintetizados contra SARM.

Péptido	SARM			
	CMI ₅₀ (μM)	CMI ₉₀ (μM)	CMI ₉₉ (μM)	CMB (μM)
LFamp B	60 ± 0.5	81 ± 0.3	100 ± 0.2	100
A1	62 ± 2.0	>100	>100	>100
A2	>100	>100	>100	>100
A3	>100	>100	>100	>100
A4	52 ± 0.9	68 ± 0.6	75 ± 0.2	>100

En la **tabla 6**, se puede observar que la bacteria SARM fue más susceptible al análogo A4 derivado de la LFamp B en comparación con los otros péptidos sintetizados. El análogo A4 inhibió el crecimiento de SARM en un 50% a una concentración 52μM, mientras que la LFamp B causó el mismo efecto a una concentración 60μM, seguido del análogo A1 el cual lo hizo a una concentración 62μM. Las concentraciones 68μM y 75μM del análogo A4 causaron la inhibición de SARM en un 90% y 99% respectivamente, a diferencia de la LFamp B quien causó el mismo efecto a concentraciones más altas, las cuales fueron 81μM y 100μM respectivamente. Los análogos A2 y A3 inhibieron menos del 50% del crecimiento del patógeno Gram positivo. Un estudio realizado por Flores *et al* en 2010, indicó que la LFamp B 265-284 a una concentración 40μM inhibe el 90% del crecimiento de SARM, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio durante la primera hora de la cinética de crecimiento, donde una concentración 50 μM inhibe el 99% del crecimiento de SARM.

Por otra parte, las concentraciones 100 μM y 75 μM de la LFamp B inhibieron el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en 53% y 32%, respectivamente, mientras que las concentraciones 100 μM y 75 μM del análogo A4 inhibieron el crecimiento de la misma cepa en 96.7% y 44.4%, respectivamente. Los perfiles de la cinética de crecimiento de la LFamp B y el péptido A4 se pueden observar en la **figura 22**.

Figura 21. Perfil de la cinética de crecimiento de *E.coli* O157:H7 en presencia de la LFam B y el análogo A4 respectivamente.

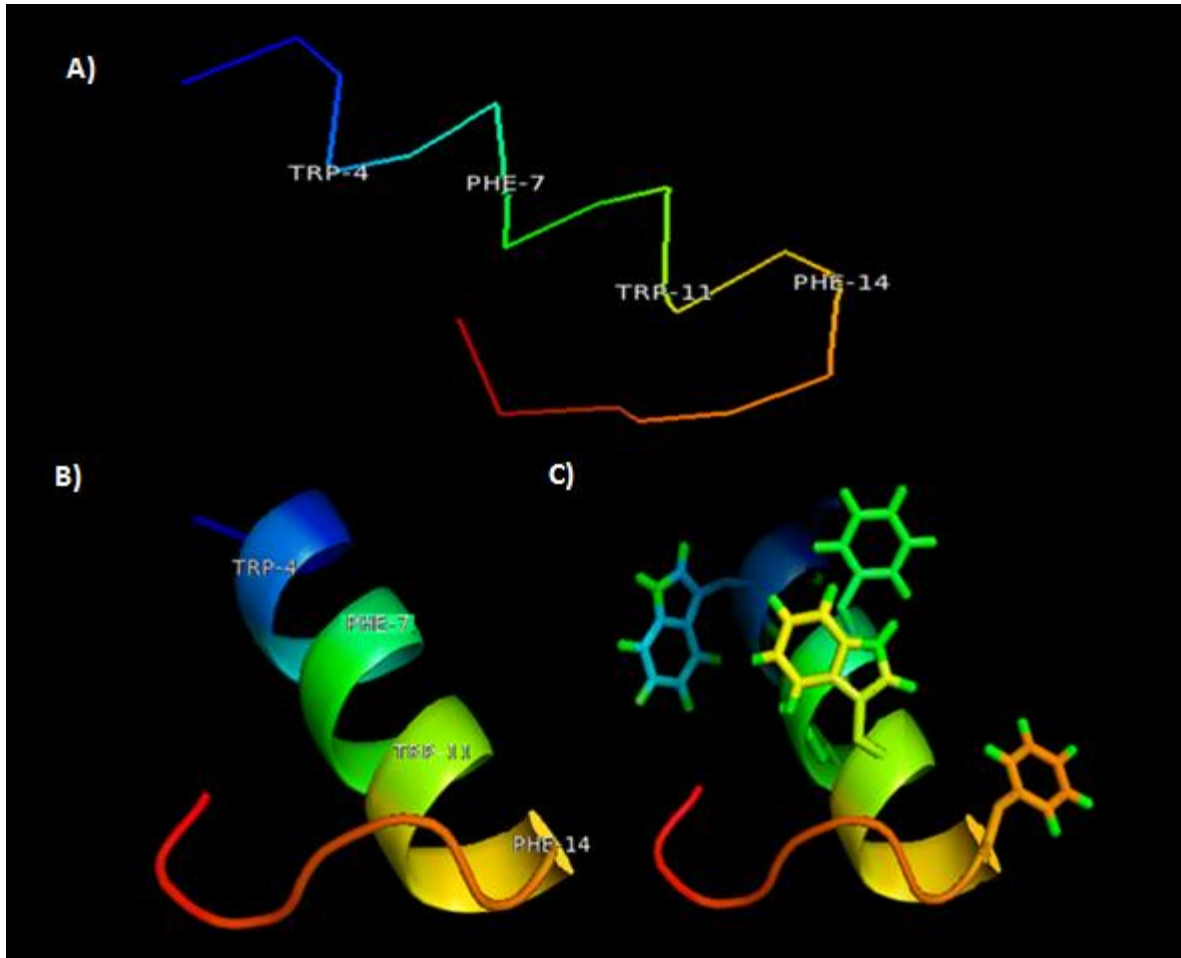


**E.coli* representa el control de crecimiento de la bacteria *E.coli* O157:H7 en ausencia de antimicrobiano.

El incremento de la actividad biológica del análogo A4 frente a las dos cepas utilizadas en este estudio, posiblemente se produjo por la inclusión de los residuos hidrofóbicos de fenilalanina y triptófano en el extremo N-terminal de la secuencia aminoacídica. Además, en otros estudios se ha evidenciado que las cadenas laterales de los residuos de triptófano (W) y fenilalanina (F) son vitales para el anclaje del péptido a la membrana bacteriana. De manera general, los residuos hidrofóbicos están directamente comprometidos con la profundidad de penetración del péptido en el núcleo apolar de la bicapa lipídica (Haney *et al.*, 2012; Nguyen, 2011).

La **figura 23** muestra la distribución espacial de los residuos de fenilalanina y triptófano en las posiciones W 268, F 271, W 275 y F 278. La distancia entre cada residuo de W y F es de tres o cuatro aminoácidos, permitiendo el plegamiento adecuado del péptido para adquirir la conformación helicoidal responsable de la actividad biológica; (Bahar & Ren, 2013). Probablemente los grupos fenilo de la fenilalanina y los anillos indólicos del triptófano se orientan hacia la misma cara hidrofóbica de la α -hélice, aumentando la adherencia del péptido en la membrana. Al aumentar los sitios de anclaje, el péptido se estabiliza sobre la superficie de la membrana, causando daño a la integridad del microorganismo (Haney *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2006), lo que evidencia el aumento en un 43.7% de la actividad biológica frente a *E.coli* O157:H7 de la concentración 100 μ M del análogo A4 comparado con la LFamp B.

Figura 22. Representación de la estructura 1-D y 2-D del péptido A4.



*A) representa la estructura primaria del análogo A4; Trp 4, Phe 7, Trp 11, Phe 14, representan los aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones W 268, F 271, W 275, F278 respectivamente. B) representa la estructura 2-D del análogo A4. C) representan la estructura 2-D del análogo A4 con las cadenas laterales de los residuos de W 268, F 271, W 275, F278 orientadas hacia la misma cara de la α -hélice.

Los análogos A1, A2 y A3 no fueron activos frente a la bacteria *E. coli* O157:H7. Los perfiles de crecimiento bacteriano de *E. coli* O157:H7 en presencia de los péptidos A1, A2 y A3 se muestran en el **anexo 9**. De manera general, las bacterias Gram negativas como *E. coli* O157:H7 presentan en su envoltura celular

una capa delgada de péptidoglicano unida a una membrana exterior. La membrana exterior, está compuesta por fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS) y en menor cantidad por proteína. Entre la membrana citoplasmática y la pared celular, se encuentra el espacio periplasmático; en este lugar residen enzimas hidrolíticas, enzimas inactivadoras de antibióticos y proteínas de transporte. Finalmente hay una membrana citoplasmática compuesta por fosfolípidos y proteínas, esta membrana es semipermeable, selectiva y controla los nutrientes que ingresan a la célula (Speradeo, 2009; Futaki *et al.*, 2001).

La evidencia indica que los PAM sintetizados presentaron menor actividad biológica frente a la cepa *E. coli* O157:H7 posiblemente por la presencia de la doble membrana característica de las bacterias Gram (-). Este comportamiento sugiere, que el sitio de acción de los PAM puede estar orientado a la membrana bacteriana y en menor medida a posibles alteraciones del material genético del microorganismo.

Un estudio realizado por Marieke *et al* en 2006, muestra que la LFamp B 265-284 presenta mayor actividad contra bacterias Gram (+) en comparación con la LFamp B 268 -284. Este mismo estudio indicó que la LFamp 265-284 presentó disminución en la actividad biológica frente a bacterias Gram (-) en comparación con la secuencia más corta. Los residuos DLI en la región N-terminal de la LFamp B 265-284 aumentaron la actividad frente a bacterias Gram (+) las cuales no eran susceptibles a la acción de la LFamp 268-284 en el rango de concentraciones evaluadas. Adicionalmente la LFamp 265-284 presentó disminución de la actividad contra bacterias Gram (-) en comparación con la secuencia más corta. Por ejemplo, la LFamp 265-284 a una concentración 38µM inhibe el 50% de *E. coli* O157:H7, mientras que la LFamp 268-284 causa este mismo efecto a una concentración 25µM.

Los valores de CMI y CMB de los péptidos sintéticos frente a *E. coli* O157:H7 se pueden ver en la **tabla 7**.

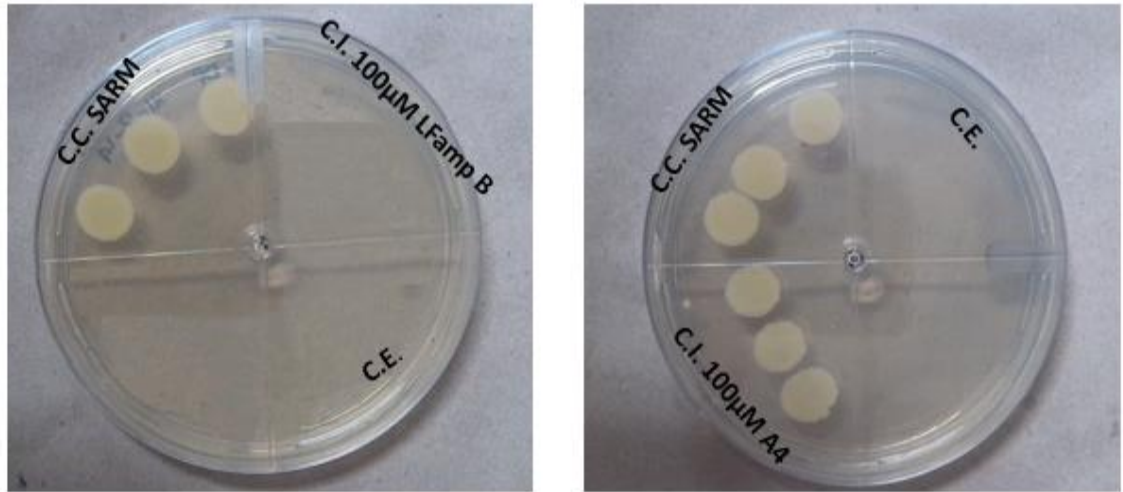
Tabla 7. Resultados obtenidos de CMI y CMB de los péptidos sintetizados contra *E. coli* O157:H7.

Péptido	<i>E. coli</i> O157:H7			
	CMI ₅₀ (µM)	CMI ₉₀ (µM)	CMI ₉₉ (µM)	CMB
LFamp B	97 ± 0.6	>100	>100	>100
A1	>100	>100	>100	>100
A2	>100	>100	>100	>100
A3	>100	>100	>100	>100
A4	77 ± 0.6	92 ± 0.5	>100	>100

En la tabla 7 se observa que la LFamp B inhibió el 50% del crecimiento de *E. coli* O157:H7 a una concentración de 97 µM mientras que el análogo A4 inhibió el 50% del crecimiento de la misma cepa a una concentración de 77 µM disminuyendo en un 20.6% la concentración de péptido necesaria para lograr la CMI₅₀ en comparación con la LFamp B. Además la concentración 92 µM del péptido A4 inhibió el 90% del crecimiento del patógeno Gram negativo. Solamente el análogo A4 causó un efecto inhibitorio por encima del 90% frente a *E. coli* O157:H7 en el rango de concentraciones evaluadas en comparación con los demás péptidos sintetizados. Las concentraciones de péptido necesarias para obtener los valores de CMI₉₉ son superiores a 100 µM.

Por otra parte, se evaluó la CMB de los péptidos que causaron más del 99% de inhibición durante la cinética de crecimiento; los péptidos que ocasionaron este efecto inhibitorio fueron la LFamp B y el análogo A4 frente a la cepa SARM como se puede ver en la **figura 24**.

Figura 23. Determinación de la CMB.



*C.C. Representa el control de crecimiento de la cepa en ausencia de péptido, C.I. Representa el control de inhibición de la bacteria tratada con el péptido a una concentración determinada; en los dos casos fue 100µM. C.E Representa el control de esterilidad; es el medio de cultivo estéril MH.

La naturaleza bactericida de los antibióticos es propia de cada compuesto y varía según las características de los grupos químicos presentes en su estructura (Nam *et al.*, 2014; Mayud *et al.*, 2008), además, la acción bactericida de un antibiótico dado, no es una propiedad intrínseca del antibiótico, pero puede estar influenciada por el sitio activo del microorganismo y la concentración del fármaco (Ílic *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2012; Hancock, 2005).

A nivel de laboratorio se ha establecido cierta distinción entre el efecto bactericida y bacteriostático. Los agentes bacteriostáticos previenen el crecimiento de la bacteria, manteniendo el microorganismo en la fase estacionaria, mientras que los agentes bactericidas destruyen todas las células bacterianas (Pankey & Sabath, 2004), lo que está de acuerdo con lo observado en la determinación de la CMB para la LFamp B y el péptido A4.

Los resultados obtenidos indican que la LFamp B a una concentración 100 μ M tuvo efecto bactericida sobre SARM mientras la concentración 100 μ M del péptido A4 presentó un efecto bacteriostático sobre la misma cepa. Sin embargo, a nivel clínico, pocas veces se ha documentado que una acción bactericida sea mejor que una acción bacteriostática (Mayud *et al.*, 2008), ya que existen agentes bacteriostáticos como el cloranfenicol y el linezolid, los cuales se han utilizado para el tratamiento de la meningitis. Además, la clindamicina es otro ejemplo de antibiótico bacteriostático, el cual se ha utilizado para inhibir completamente el síndrome de choque toxico producido por *S. aureus* (Pankey & Sabath, 2004), por lo tanto el análogo A4 derivado de la LFamp B puede ser una opción prometedora que podría implementarse para el tratamiento de enfermedades causadas por SARM.

5 CONCLUSIONES

- ✓ Se diseñó una nueva secuencia peptídica derivada de la LFamp B con actividad biológica mejorada frente a las cepas patógenas de SARM y *E. coli* O157:H7, mediante el uso de herramientas bioinformáticas.
- ✓ Se obtuvieron cinco péptidos mediante la síntesis en fase sólida utilizando la estrategia de protección Fmoc, con porcentajes de pureza superiores al 90%.
- ✓ Todos los péptidos sintéticos presentaron estructura secundaria tipo α -hélice en condiciones simuladas de membrana de acuerdo con los resultados obtenidos por DC.
- ✓ El análogo A4 inhibió el crecimiento de SARM en 50%, 90% y 99% a concentraciones 52 μ M, 67 μ M y 75 μ M respectivamente, mientras que LFamp B causó este mismo efecto a concentraciones más altas, las cuales fueron 60 μ M, 81 μ M y 100 μ M. Sin embargo, la concentración 100 μ M de LFamp B tuvo efecto bactericida sobre SARM, mientras que la CMB del análogo A4 frente a la misma cepa es superior a 100 μ M.
- ✓ El análogo A4 inhibió el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en un 96.7% a una concentración 100 μ M, mientras que la concentración 100 μ M de la LFamp B inhibió el 53% del crecimiento de la misma cepa. Los demás péptidos sintetizados causaron la inhibición de la bacteria Gram negativa en un porcentaje inferior a 50% en el rango de concentraciones utilizadas.
- ✓ El análogo A4 presentó mayor actividad sobre SARM y *E. coli* O157:H7 comparado con los demás péptidos sintetizados, posiblemente por la adición estratégica de residuos aminoacídicos de triptófano y fenilalanina en

la región N-terminal de la secuencia peptídica. Sin embargo, SARM fue más susceptible que *E.coli* O157:H7 al tratamiento con los PAM sintetizados.

6 RECOMENDACIONES

- ✓ Diseñar nuevos análogos de LFamp B, aumentando la carga catiónica en el extremo C-terminal con residuos aminoacídicos como Arginina o Lisina, manteniendo las modificaciones realizadas en la región N-terminal del análogo A4.
- ✓ Evaluar la actividad de los PAM en diferentes líneas celulares para determinar la citotoxicidad.
- ✓ Usar un marcador fluorescente como rodamina para elucidar el mecanismo de acción de los PAM, mediante microscopía de fluorescencia.
- ✓ Usar ácido fosfowulfrámico para determinar el daño celular causado en los microorganismos, utilizando la técnica microscopía electrónica de transmisión (TEM).

BIBLIOGRAFÍA

BAHAR, A., & REN, D. Antimicrobial Peptides. En: Pharmaceuticals. Vol.; 6. (2013); p. 1543-1575.

BAKER, E., & BAKER, H. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. En: Biochimie. Vol.; 91. (2009); p. 3-10.

BENOITON Leo.N. CHEMISTRY OF PEPTIDE SYNTHESIS. Solid-Phase Synthesis. Ottawa, Ontario, Canada: Taylor & Francis Group, 2006. 134 p.

BOLSCHER, J., ADAO, R., NAZMI, K., VAN DEN KEYBUS, P., VAN 'T HOF, W., NIEUW, A., BASTOS, M., & VEERMAN, E. Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides. En: Biochimie. Vol.; 91. (2009); p.123-132.

BROUWER, C., RAHMAN, M., & WELLING, M. Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use. En: Peptides. Vol.; 32. (2011); p. 1-11.

CÉZARD, C., SILVA-PIRES, V., MULLIÉ, C., & SONNET, P. Antibacterial Peptides: A Review. Science against microbial pathogens. En: Communicating current research and technological advances. (2011); p. 926-937.

CHAN, D., PRENNER, E., & VOGEL, H. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. En: Biochimica et Biophysica Acta. Vol.; 1758. (Abr. 2006); p. 1184-1202.

CHEN, L., GAO, FANG, W.L., & GOLUBOVIC, L. How the Antimicrobial Peptides Kill Bacteria: Computational Physics Insights. En: Commun. Comput. Phys. Vol.; 11. (Mar. 2012); p. 709-725.

CHEN, R., & MARK, E. The effect of membrane curvature on the conformation of antimicrobial peptides: implications for binding and the mechanism of action. En: Eur Biophys J. Vol.; 40. (2011); p. 545–553.

COIN, I., BEYERMAN, M., & BIENERT, M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. En: Nature protocols. Vol.; 2 No 12 (Dic 13. 2007); p. 3247-3256.

CRICH, D. Triblock Peptide and Peptide Thioester Synthesis by the Use of Reactivity-Differentiated Sulfonamides and Peptidyl Thioacids. En: Angewandte Chemie International Edition. Vol.; 48. (2009); p. 7591-7594.

CRUZ, J., GUZMÁN, F., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., & TORRES, R. Antimicrobial Peptides: Promising Compounds Against Pathogenic Microorganisms. En: Current Medicinal Chemistry. Vol.; 21. (2014); p. 2299-2321.

DAUTIN, N., & BERNSTEIN, H. Protein Secretion in Gram-Negative Bacteria via the Autotransporter Pathway. En: Microbiol. Vol.; 61. (2007); p. 89–112.

DOERRLER, W. Lipid trafficking to the outer membrane of Gram-negative bacteria. En: Molecular Microbiology. Vol.; 60. (2006); p. 542–552.

FLORES, H., CANIZALEZ, A., REYES, M., NAZMI, K., DE LA GARZA, M., ZAZUETA, J., LEON, N., & BOLSCHER, J. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFc_{in}, LFc_{ampin} and LFc_{chimera} on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. En: Biometals. Vol.; 23. (2010); p. 569–578.

FURLAN, R., LABADIE, G., PELLEGRINET, S., & PONZO, V. QUÍMICA COMBINATORIA: ESTRATEGIAS PARA LA GENERACIÓN DE DIVERSIDAD MOLECULAR. En: QUÍMICA NOVA. Vol.; 19. (1996); p. 411-422.

FUTAKI, S., SUZUKI, T., OHASHI, W., YAGAMI, T., TANAKA, S., UEDA, K., & SUGIURA, Y. Arginine-rich Peptides AN ABUNDANT SOURCE OF MEMBRANE-PERMEABLE PEPTIDES HAVING POTENTIAL AS CARRIERS FOR INTRACELLULAR PROTEIN DELIVERY. En: The journal of biological chemistry. Vol.; 276. (Feb. 2001); p. 5836-5840.

GORDON, Y., & ROMANOWSKI, E. A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. En: Taylor & Francis Group. Vol.; 30. (2005); p. 505-515.

GREENFIELD, N. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. En: NATURE PROTOCOLS. Vol.; 1. (Ene. 2007); p. 2876-2890.

HANCOCK, R.E.W. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. En: Lancet Infect Dis. Vol.; 5. (Abr. 2005); p. 209-218.

HANEY, E., LAU, F., & VOGEL, H. Solution structures and model membrane interactions of lactoferrampin, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. En: Biochimica et Biophysica Acta. (2007). 1768.

HANEY, E., NAZMI, K., BOLSCHER, J., & VOGEL, H. Influence of specific amino acid side-chains on the antimicrobial activity and structure of bovine lactoferrampin. En: Biochem. Cell Biol. Vol.; 90. (2012); p. 362–377.

HAWKEY, P., & JONES, A. The changing epidemiology of resistance. En: Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol.; 64. (2009); p. i3-i10.

HODGES, R., ZIQING, J., WHITEHURST, J., & MANT, C. DEVELOPMENT OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AS THERAPEUTIC AGENTS. Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing. (2010); p. 1-73.

HYUNSOO, A., & JANDA, K. Peptide Diversity and Chemical Libraries. Frontiers of Peptide. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. 19-21 p.

ÍLIC, N., NOVKOVIĆ, M., GUIDA, F., XHINDOLI, D., BENINCASA, B., TOSSI, A., & JURETIĆ, D. Selective antimicrobial activity and mode of action of adepantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences. En: Biochimica et Biophysica Acta. Vol.; 1828. (2013); p. 1004-1012.

JENSSEN, H., & HANCOCK, R. Antimicrobial properties of lactoferrin. En: Biochimie. Vol.; 91. (2009); p. 19-29.

JEYANTHI, T., SUBRAMANIAN, P., & KUMARAVEL, P. A Comparative Analysis of Antibacterial Activity of Withania somnifera Root Extract with Commercial Antibiotics. En: Asian J. Pharm. Vol.; 3. (2013); p. 98-102.

JIANG, W., FISCHER, G., GIRMAY, Y., & IRGUM, K. Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode. En: Journal of Chromatography A. Vol. 1127. (2006); p. 82-91.

JUBAN, M., JAVADPOUR, M., & BARKLEY, M. Circular Dichroism Studies of Secondary Structure of Peptide. En: Methods in Molecular Biology. Vol.; 78. (1997); p.73-77.

KEIDERLING, T. Protein and peptide secondary structure and conformational determination with vibrational circular dichroism. En: Current Opinion in Chemical Biology. Vol.; 6. (2002); p. 682–688.

Lehrer, R. Evolution of Antimicrobial Peptides: A View from the Cystine Chapel. Antimicrobial Peptides and Innate Immunity. Dordrecht London: Springer, 2013. 2-3 p.

LEON, N., CANIZALEZ, A., DE LA GARZA, M., REYES, M., ZAZUETA, J., NAZMI, K., GOMEZ, B. & BOLSCHER, J. Bactericidal effect of lactoferrin and lactoferrin chimera against halophilic *Vibrio parahaemolyticus*. En: Biochimie. Vol.; 91. (2009); p. 133-140.

LIZZI, A., CARNICELLI, V., CLARKSON, M., DI GIULIO, A., & ORATOTE, A. Lactoferrin Derived Peptides: Mechanisms of Action and their Perspectives as Antimicrobial and Antitumoral Agents. En: *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol.; 9. (2009); p. 687-695.

MARIEKE, I.A., KRAAM, V., NAZMI, K., VAN'T HOF, W., ARIE, V., AMERONGEN, N., VEERMAN, E., & BOLCHER, J.G.M. Distinct bactericidal activities of bovine Lactoferrin peptides LFampin 268-284 and LFampin 265-284: Asp, Leu, Ile makes a difference. En: *Biochem. Cell Biol.* Vol.; 84. (2006); p.358-362.

MAYUD, L., CARRICAJO, A., ZHIRI, A., & AUBERT, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. En: *Letters in Applied Microbiology*. Vol.; 47. (2008); p. 167-173.

MENDE, M., & SEITZ, O. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Based Solid-Phase Synthesis of Peptide α -Thioesters. En: *Angew. Chem. Int.* Vol.; 50. (2011); p. 1232 – 1240.

MERREFIELD, B. Concept and Early Development of Solid-Phase Peptide Synthesis. En: *Methods in enzymology*. Vol.; 289. (1997); p. 3-13.

NAM, B., MOON, J., PARK, E., KIM, Y., KIM, D., KONG, H., KIM, W., JEE, Y., AN, C., PARK, N., & SEO, J. Antimicrobial Activity of Peptides Derived from Olive Flounder Lipopolysaccharide Binding Protein/Bactericidal Permeability-Increasing Protein (LBP/BPI). En: *Marine Drugs*. Vol.; 12. (Oct. 2014); p. 5240-5257.

NAVARRETE, Erandi. Síntesis de Péptidos. Cuernavaca, 2007, II-57. UNAM. Instituto de Biotecnología.

NEVEROVA, I., & VAN EYK, J. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. En: *Journal of Chromatography B*. Vol.; 815. (2005); p. 51-63.

NGUYEN, T., HANEY, E., & VOGEL, H. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. En: *Trends in Biotechnology*. Vol.; 29. (Sep. 2011); p. 464-472.

NILSSON, B., SOELLNER, M. & RAINES, R. Chemical Synthesis of Proteins. En: *Annual Review of Biophysics*. Vol.; 34. (2005); p.91-118.

OLLIVIER, N., BEHR, J., EL-MAHDI, B. BLANPAIN, E., & MELNYK, O. Fmoc Solid-Phase Synthesis of Peptide Thioesters Using an Intramolecular N,S-Acyl Shift. En: *American Chemical Society*. Vol.; 7. (2005); p. 2647-2650.

Organización Mundial de la salud. Resistencia a los antimicrobianos: Una amenaza para la seguridad sanitaria mundial. 58ª Asamblea mundial de la salud. (2005); A58/14: 1-6.

Organización Panamericana de la Salud. Tratamiento de la diarrea: Manual Clínico para los servicios de salud. Washington, DC. 2008.

PANKEY, G., & SABATH, L. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram- Positive Bacterial Infections. En: Infectious Diseases Society of America. Vol.; 38. (Mar. 2004); p. 864-870.

PEREZ. Teresa. Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV). Barcelona, 2007. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia, Departamento de fisicoquímica.

PUSHPANATHAN, M., GUNASEKARAN, P., & RAJENDHRAN, J. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. En: International Journal of Peptides. (2013); p. 1-15

Reyes, O., & Garay H. BIBLIOTECAS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS. {En línea}. 2000. {Ene 2014}. Disponible en: <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Muestras/chapter02.pdf>

SPERADEO, P. The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. En: Biochimica et Biophysica. Vol.; 1791. (2009); p. 594–602.

SORIANO. José. M. Nuevos reactivos poliméricos para el acoplamiento y protección de aminoácidos. Valencia, 2002, 133. Tesis de doctorado, Universidad de Alicante. Facultad de Ciencias.

STANDING, K.G. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. En: Current Opinion in Structural Biology. Vol.; 13. (2003); p. 595–601.

TABER. H. Introduction to the Peptide Antibiotics. Discovery, modes of action, and applications. USA: copyright, 2002. 1-2 p.

TAN, Y., MATTHEWS, K., DI, R., & AYOB, M. Bacteriostatic Mode of Action of Trypsin-Hydrolyzed Palm Kernel Expeller Peptide Against Bacillus cereus. En: Probiotics and Antimicrobial Proteins. Vol.; 4. (Ene. 2012); p. 59–65.

TANG, Z., YIN, Y., ZHANG, Y., HUANG, R., SUN, Z., LI, T., CHU, W., KONG, X., LI, L., GENG, M., & TU, Q. Effects of dietary supplementation with an expressen

fusion peptide bovine lactoferricin-lactoferrampin on performance, immune function and intestinal mucosal morphology in piglets weaned all age 21 d. En: British Journal of Nutrition. Vol.; 101. (2009); p. 998-1005.

TEIXEIRA, V., FEIO, M., & BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. En: Progress in Lipid Research. Vol.; 51. (2012); p. 149–177.

THOMSON, C., POWER, E., RUEBSAMEN-WAIGMANN, H., & LABISCHINSKI, H. Antibacterial research and development in the 21st Century – an industry perspective of the challenges. En: ScienceDirect. Vol.; 7. (Sep. 2004); p. 445–450.

TSUTSUMI, A., AVKHLANTUGS, N., KIRA, A., UMEYAMA, M., KAWAMURA, I., NISHIMURA, K., UEDA, K., & NAITO, A. Structure and Orientation of Bovine Lactoferrampin in the Mimetic Bacterial Membrane as Revealed by Solid-State NMR and Molecular Dynamics Simulation. En: Biophysical Journal. Vol.; 103. (Oct. 2012); p. 1735–1743.

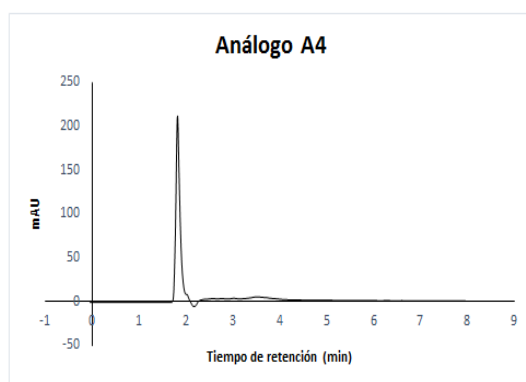
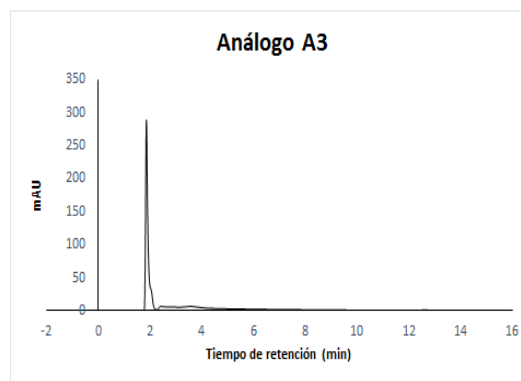
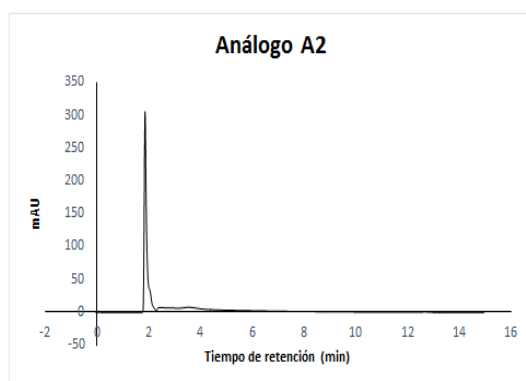
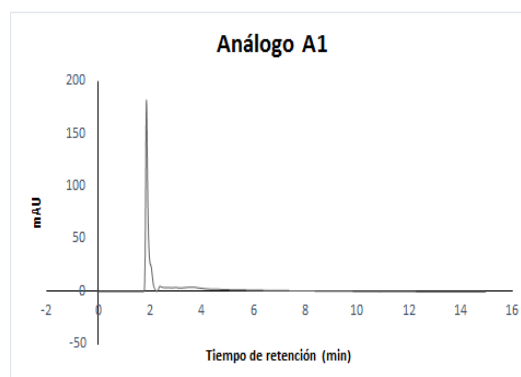
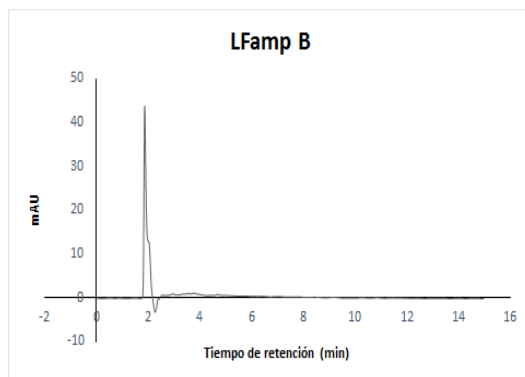
VAN DER KRAAN, M., GROENINK, J., NAZMI, K., VEERMAN, E., BOLSCHER, J., & NIEUW, A. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. En: Peptides. Vol.; 25. (2004); p. 177–183.

VAN DER KRAAN, M., MARLE, J., NAZMI, K., GROENINK, J., VAN 'T HOF, W., VEERMAN, E., BOLSCHER., & J. NIEUW, A. Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of *Candida albicans* and *Escherichia coli*. En: Peptides. Vol.; 26. (2005); p. 1537–1542.

YE, H. Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography–multiangle laser light scattering. En: Analytical Biochemistry. Vol.; 356. (2006); p. 76-85.

YIN, L., EDWARDS, M., LI, J., YIP, C., & DEBER, C. Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions. En: J. Biol. Chem. Vol.; 287. (Ene. 2012); p. 7738-7745.

ANEXOS

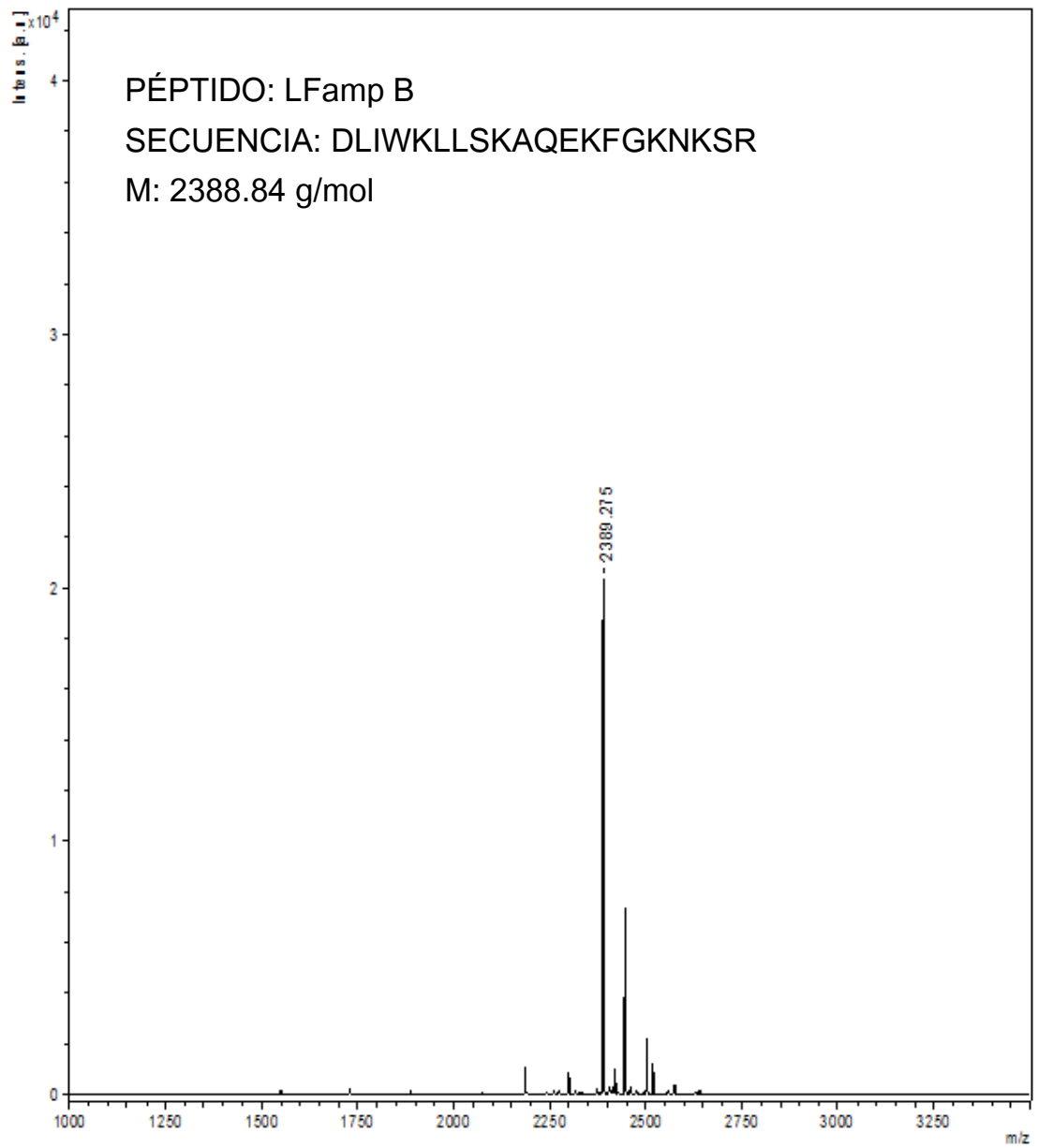


Anexo A. Cromatogramas HPLC-RP de los péptidos sintéticos.

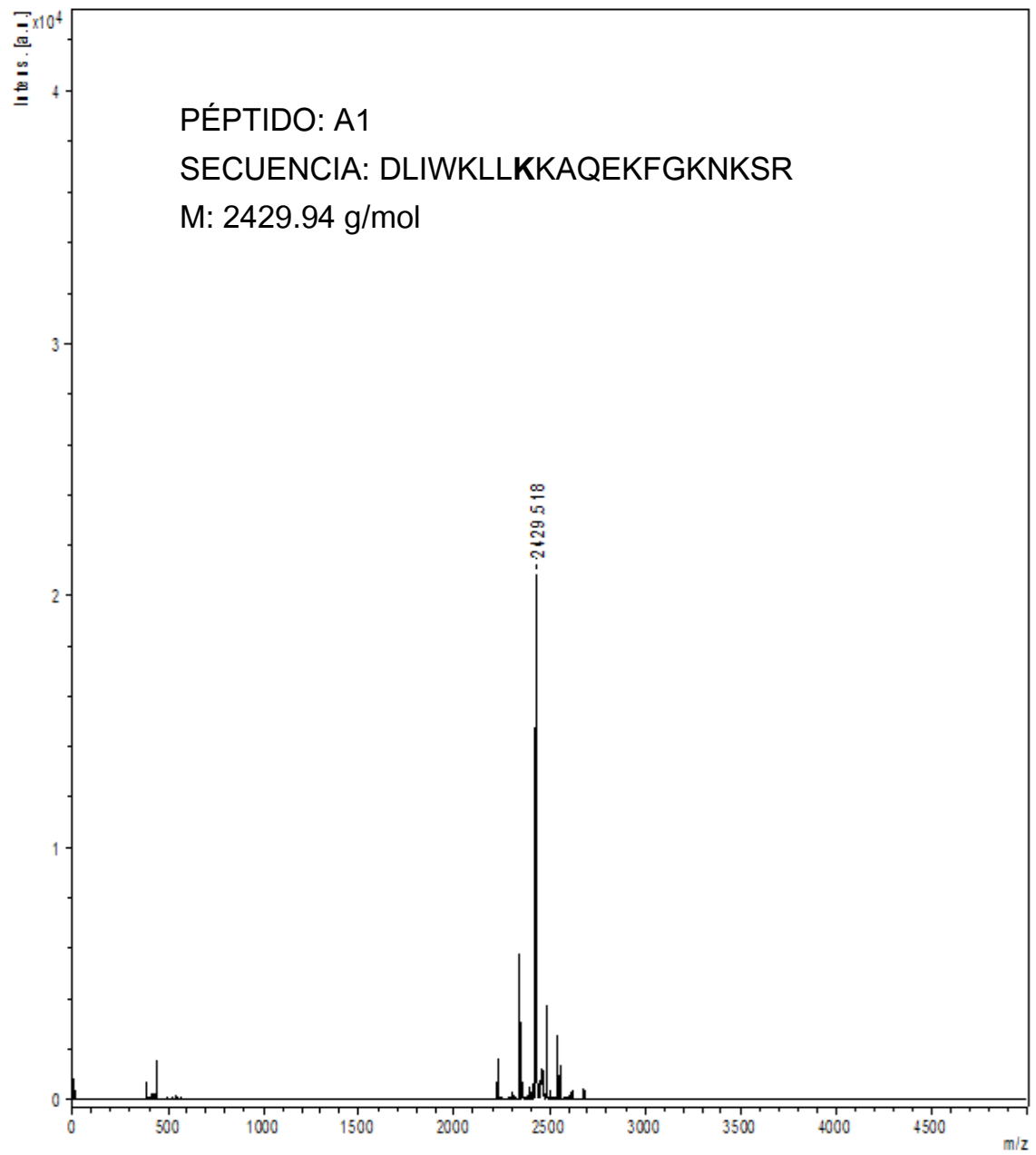
Anexo B. Tiempos de retención de los PAM.

Nombre	Secuencia	Tiempo de retención (min)
LFamp B	DLIWKLLSKAQEKFGKNKSR	1.899
A1	DLIWKLLKKAQEKFSGKNKSR	1.897
A2	DLIWKLLSKAQEKFGKNKSK	1.902
A3	DIIWKLLSKAQEKFGKNKIK	1.915
A4	DLIWKLFSKAWKFKGNKSR	1.906

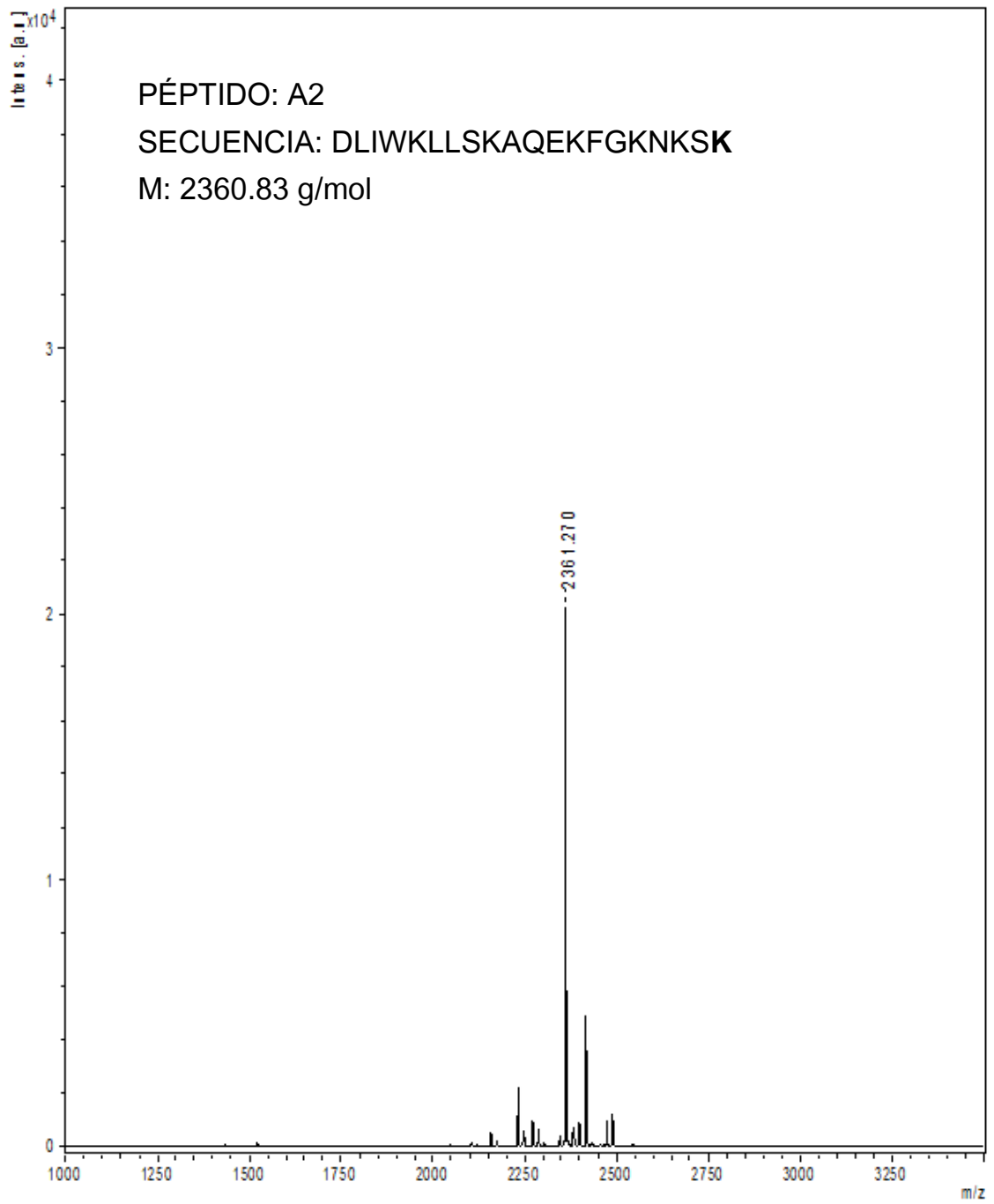
Anexo C. Espectro de MALDI-TOF del péptido LFamp B.



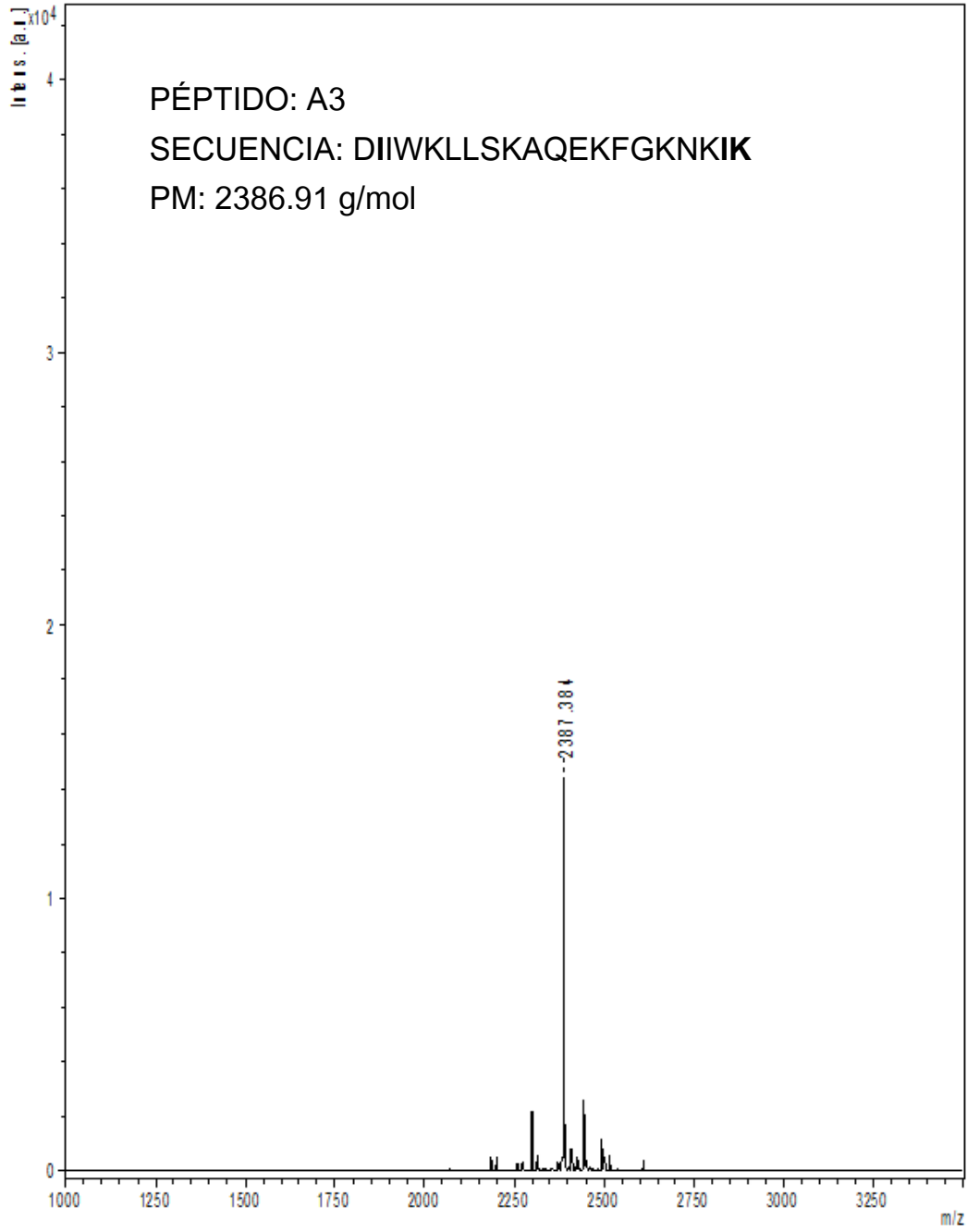
Anexo D. Espectro de MALDI-TOF del análogo A1.



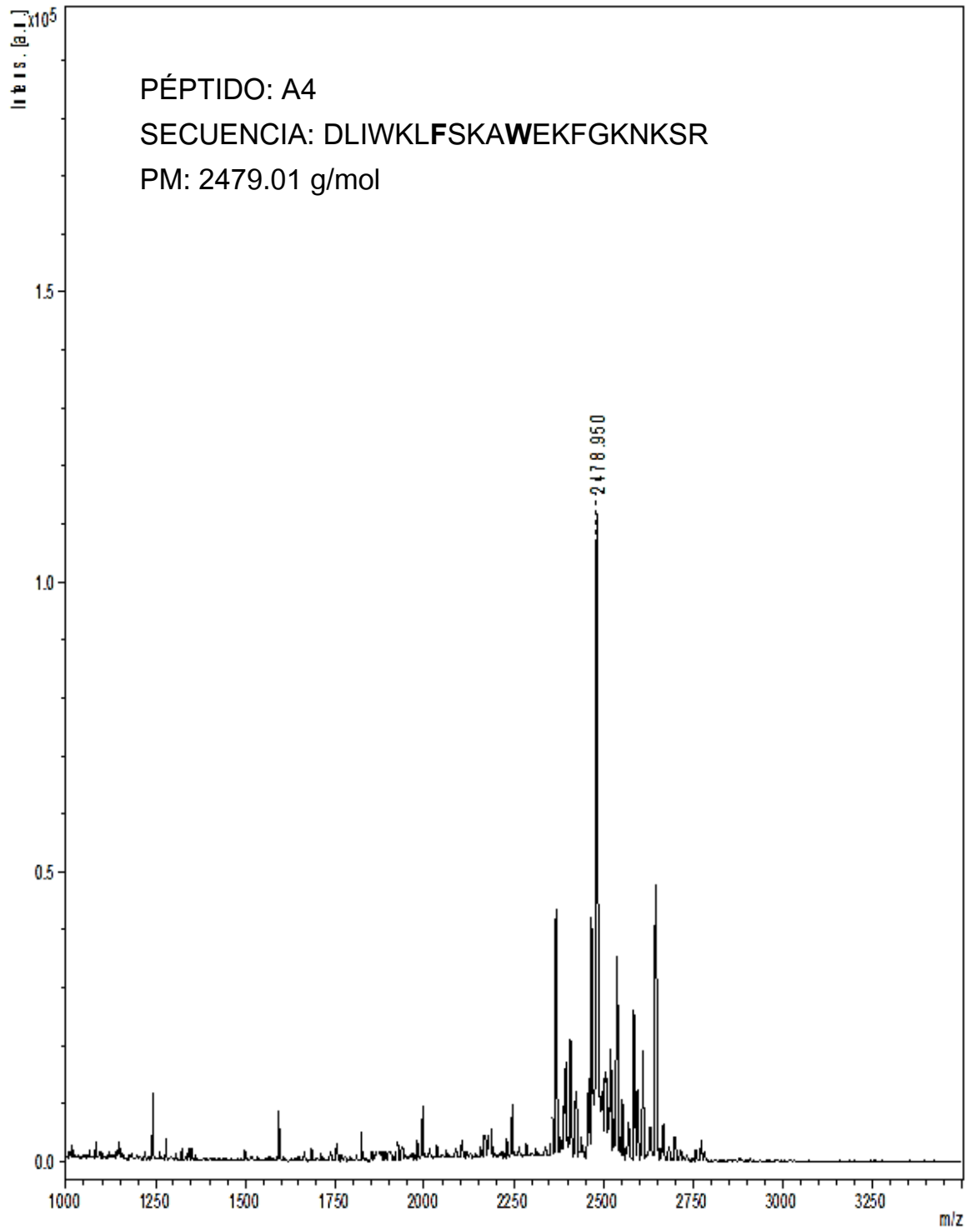
Anexo E. Espectro de MALDI-TOF del análogo A2.



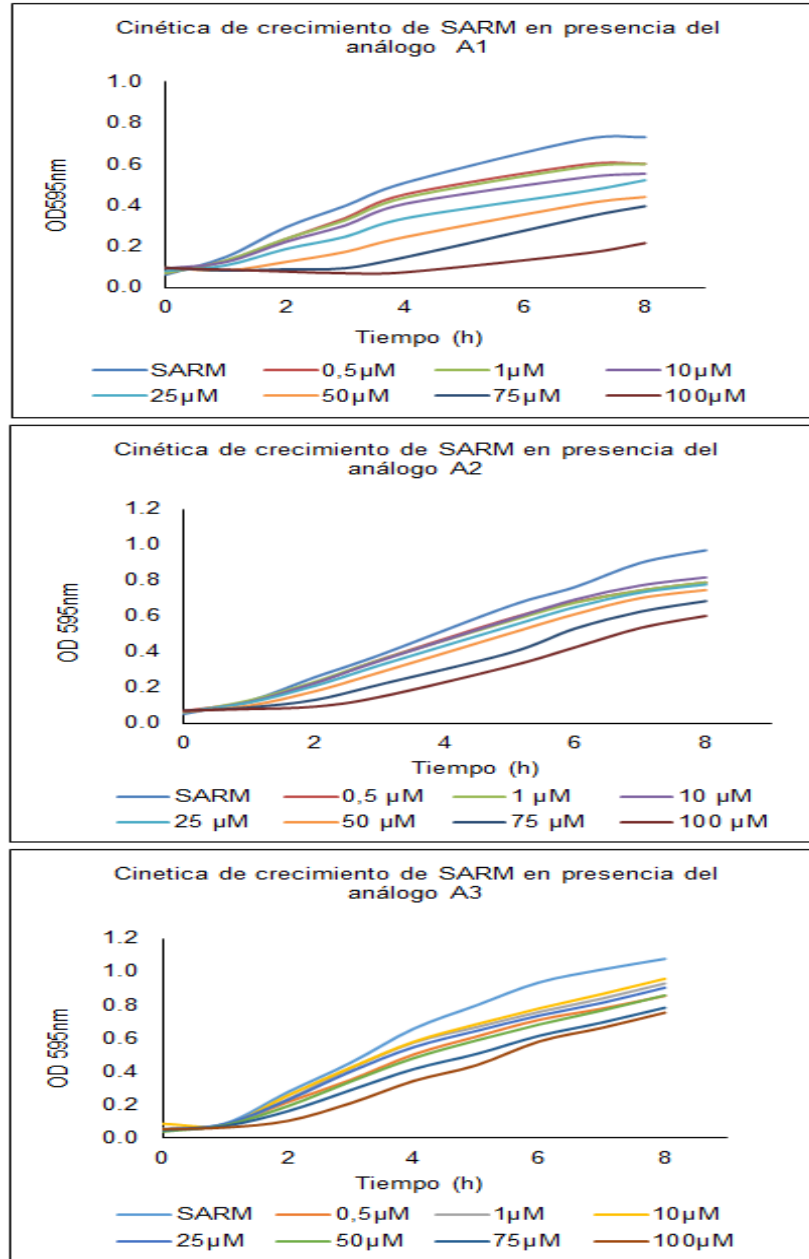
Anexo F. Espectro de MALDI-TOF del análogo A3.



Anexo G. Espectro de MALDI-TOF del análogo A4.



Anexo H. Perfiles de la cinética de crecimiento de SARM en presencia de los análogos A1, A2 y A3 respectivamente



Anexo I. Perfiles de la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de los análogos A1, A2 y A3 respectivamente

