

Evaluación de la actividad antibacteriana de nuevos péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* frente a *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM) y

*Escherichia coli* O157:H7

Andrés Esteban Pereira Patiño

Trabajo de grado para optar el título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en Química

Universidad Industrial De Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Bucaramanga

2025

**Tabla de Contenido**

	Pág.
Introducción.....	11
1 Estado del arte y marco de referencia.....	13
1.1 Resistencia antimicrobiana.....	13
1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina (SARM) .....	15
1.1.2 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	16
1.2 <i>Achatina fulica</i> : más allá de la plaga, una potencial fuente de PAMs .....	17
1.3 Péptidos Antimicrobianos (PAMs) .....	20
1.4 Hemocianina como modelo para la obtención de PAMs .....	22
1.5 Diseño <i>in silico</i> , síntesis y caracterización fisicoquímica de PAMs .....	27
1.5.1 Diseño <i>in silico</i> de PAMs .....	27
1.5.2 Síntesis y caracterización de PAMs .....	27
1.6 Estudios previos complementarios a la presente tesis doctoral.....	29
1.6.1 Obtención péptidos de la secreción mucosa de <i>A. fulica</i> .....	29
2 Pregunta de investigación.....	36
3 Hipótesis .....	36
4 Objetivo general .....	36
5 Objetivos específicos.....	36
6 Metodología.....	38

6.1	Análisis de secuencias .....	39
6.2	Diseño de análogos.....	39
6.3	Determinación de propiedades fisicoquímicas y estructura secundaria.....	40
6.4	Síntesis de péptidos .....	43
6.4.1	Preparación de las “bolsas de té” .....	44
6.4.2	Desprotección .....	44
6.4.3	Acoples .....	45
6.4.4	Clivaje.....	45
6.4.5	Desalinización.....	46
6.4.6	Purificación mediante extracción en fase sólida (SPE) .....	46
6.4.7	Congelación y liofilización de péptidos.....	47
6.5	Caracterización físico-química de péptidos .....	49
6.5.1	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS).....	49
6.5.2	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) .....	50
6.5.3	Dicroísmo circular (DC) .....	51
6.6	Scan de alanina.....	51
6.7	Actividad antimicrobiana .....	52
6.7.1	Reactivación de los microorganismos a evaluar.....	54
6.7.2	Inóculo .....	54
6.7.3	Montaje de la microplaca.....	54

NUEVOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE ACHATINA FULICA	4
6.7.4 Análisis de datos .....	55
6.8 Actividad citotóxica .....	58
6.9 Actividad hemolítica .....	60
7 Resultados y discusión.....	63
7.1 Análisis de secuencias.....	63
7.2 Diseño de análogos.....	67
7.3 Determinación de propiedades fisicoquímicas y estructura secundaria.....	74
7.4 Síntesis de péptidos .....	86
7.5 Actividad antimicrobiana .....	101
7.6 Análogos del péptido 4397 y scan de alanina .....	110
7.7 Análogos 4735 y 4738.....	115
7.8 Actividad citotóxica .....	127
7.9 Actividad hemolítica .....	132
8 Conclusiones.....	133
9 Divulgación .....	134
Referencias Bibliográficas.....	136
Apéndices .....	159

**Lista de Tablas**

	Pág.
Tabla 1. PAMs derivados de hemocianina con actividad antimicrobiana.....	25
Tabla 2. Péptidos que hacen parte de la hemocianina identificados en fracciones semipurificadas de la secreción mucosa de <i>A. fulica</i> (Suárez <i>et al.</i> , 2021).....	31
Tabla 3. Regiones de la hemocianina de gasterópodos terrestres con identidad >80% con los péptidos identificados en la secreción mucosa de <i>A. fulica</i> .....	63
Tabla 4. Péptidos derivados de la hemocianina de <i>A. fulica</i> y análogos diseñados <i>in silico</i>	75
Tabla 5. Péptidos sintetizados inicialmente.....	86
Tabla 6. Scan de alanina y análogos del péptido AfH5 (4397).....	89
Tabla 7. CMI <sub>50</sub> de los péptidos 4397, 4398, 4405 y 4406 frente a <i>S. aureus</i> CMPUJ015 y <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....	102
Tabla 8. Actividad antimicrobiana a 30 µM frente a <i>S. aureus</i> ATCC43300.....	112
Tabla 9. CMI <sub>50</sub> de los péptidos 4405, 4735 y 4738 frente a <i>S. aureus</i> ATCC 43300.....	115
Tabla 10. Actividad citotóxica sobre células HaCat y Vero.....	127
Tabla 11. Actividad hemolítica.....	132

**Lista de Figuras**

	Pág.
Figura 1. Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos .....	14
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Achatina fulica</i> .....	17
Figura 3. Estructuras y mecanismos de acción de los PAMs a nivel de membrana.....	20
Figura 4. Esquema de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) .....	28
Figura 5. Obtención de péptidos de la secreción mucosa de <i>A. fulica</i> .....	30
Figura 6. Regiones de la Hc donde se generan los péptidos identificados .....	34
Figura 7. Herramientas bioinformáticas empleadas para el diseño racional <i>in silico</i> de PAMs .....	42
Figura 8. Metodología para síntesis de péptidos .....	47
Figura 9. Metodología para evaluación de actividad antimicrobiana.....	55
Figura 10. Metodología para evaluación de actividad citotóxica.....	60
Figura 11. Metodología para evaluación de actividad hemolítica.....	62
Figura 12. Alineamiento múltiple y logotipos de secuencia .....	66
Figura 13. Cribado de secuencias con base en el alineamiento múltiple y PAP .....	68
Figura 14. Diseño racional.....	70
Figura 15. Secuencia y estructura de Haliotisina y AfH2-4K11K .....	83
Figura 16. Cromatogramas de HPLC del péptido 4397 y sus primeros tres análogos del scan de alanina.....	93
Figura 17. Cromatogramas de HPLC de los péptidos 4397, 4752, 4753, 4754 y 4755 .....	94
Figura 18. Espectro de masas del péptido 4397 .....	95
Figura 19. Espectros de DC.....	96

Figura 20. Cribado ( <i>screening</i> ) de actividad antimicrobiana a 50 $\mu$ M frente a <i>S. aureus</i> CMPUJ015 y <i>E. coli</i> O157:H7 .....	101
Figura 21. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos 4397 y 4398 .....	103
Figura 22. Potencial de hidrofobicidad molecular (MHP) de los péptidos 4404 y 4405 ...	108
Figura 23. Modelo de posicionamiento de los péptidos 4405, 4735 y 4738 en la membrana de bacterias Gram positivas .....	116
Figura 24. Estructura secundaria de los péptidos 4405, 4735 y 4738 .....	118
Figura 25. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos 4405, 4735 y 473 .....	120
Figura 26. Visualización de las propiedades electrostáticas de los péptidos 4405, 4735 y 4738, proyectadas sobre bicapas lipídicas de DLPC .....	125

**Lista de Apéndices**

**Los apéndices están disponibles en el Repositorio Institucional**

	Pág.
Apéndice A. Alineamiento múltiple de las secuencias de Hc de gasterópodos terrestres..	159
Apéndice B. Cromatogramas de HPLC y espectros de masas .....	159

## RESUMEN

**TÍTULO:** Evaluación de la actividad antibacteriana de nuevos péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* frente a *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM) y *Escherichia coli* O157:H7\*

**AUTOR:** Andrés Esteban Pereira Patiño\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Actividad antibacteriana, Actividad citotóxica, *Escherichia coli*, Hemocianina, Péptidos antimicrobianos, *Staphylococcus aureus*.

## DESCRIPCIÓN:

La aparición de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos convencionales ha generado la necesidad de descubrir nuevos agentes antimicrobianos. En este sentido, los Péptidos Antimicrobianos (PAMs), que hacen parte del sistema inmune innato de los seres vivos como mecanismo de defensa frente a las infecciones, han surgido como una alternativa prometedora para afrontar el problema de la resistencia antimicrobiana. En la presente tesis doctoral se realizó el diseño, síntesis, caracterización físico-química y evaluación de nuevos péptidos sintéticos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* resistentes a antibióticos convencionales. Posteriormente, se determinó la actividad citotóxica y hemolítica de los péptidos que presentaron mayor actividad biológica.

Los resultados mostraron que los péptidos sintéticos de 15 residuos, alfa-helicoidales y catiónicos, fueron los de mayor actividad biológica frente a los microorganismos Gram positivos evaluados, con Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) en el rango de 7.5 a 30  $\mu$ M. El índice de selectividad para los péptidos 4735 y 4738 sugiere una mayor selectividad hacia las membranas bacterianas que sobre las membranas de las células de los mamíferos.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la hemocianina de *A. fulica* puede ser utilizada como modelo proteico para el diseño racional *in silico* de PAMs activos frente a bacterias de importancia en Salud Pública, tales como *S. aureus* Resistente a Meticilina (SARM). Si bien los péptidos evaluados en este trabajo no mostraron buena actividad biológica frente a cepas de *E. coli*, se requieren más estudios para determinar si la hemocianina de *A. fulica* puede ser un modelo para el diseño de PAMs activos frente a otras bacterias Gram negativas.

---

\* Tesis doctoral

\*\* Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Director: William Hidalgo Bucheli, Doctor en Química.

## ABSTRACT

**TITLE:** Evaluation of the antibacterial activity of new peptides derived from *Achatina fulica* hemocyanin against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli* O157:H7\*

**AUTHOR:** Andrés Esteban Pereira Patiño\*\*

**KEYWORDS:** Antimicrobial peptides; antibacterial activity; cytotoxic activity; *Escherichia coli*; Hemocyanin; *Staphylococcus aureus*.

## DESCRIPTION:

The rise of pathogenic bacteria resistant to conventional antibiotics has generated the need to discover new antimicrobial agents. In this sense, Antimicrobial Peptides (AMPs), which are part of the innate immune system of living beings as a defence mechanism against infections, have emerged as a promising alternative to address the problem of antimicrobial resistance. In this doctoral thesis, the design, synthesis, physical-chemical characterization and evaluation of new synthetic peptides derived from *Achatina fulica* hemocyanin against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant to conventional antibiotics were carried out. Subsequently, the cytotoxic and haemolytic activity of the peptides with the highest biological activity was determined.

The results showed that the synthetic peptides of 15 residues, alpha-helical and cationic, were the ones with the highest biological activity against the Gram-positive microorganisms evaluated, with Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) in the range of 7.5 to 30  $\mu$ M. The positive selectivity index determined for peptides 4735 and 4738, suggest a greater selectivity mainly on the microorganisms evaluated and not on eukaryotic cells.

The results obtained allow us to conclude that *A. fulica* hemocyanin is a possible protein model for the rational *in silico* design of PAMs active against bacteria of importance in Public Health, such as Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA). Although the peptides evaluated in this work did not show great biological activity against *E. coli* strains, it cannot be ruled out that *A. fulica* hemocyanin could be a model for the design of PAMs active against Gram negative bacteria.

---

\* Doctoral Thesis

\*\* Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Director: William Hidalgo Bucheli, Doctor en Química.

## Introducción

La resistencia a los antimicrobianos es una amenaza para la salud humana, animal y ambiental, así como el bienestar de la economía global y el desarrollo mundial (OMS, 2022). La aparición de bacterias patógenas resistentes a estos medicamentos se debe, en gran parte, al uso inadecuado de los antibióticos en los tratamientos. El descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos ha sido lento, y la poca diversidad de antibióticos disponibles en el mercado ha contribuido a la crisis de resistencia antibiótica.

En este contexto, los Péptidos Antimicrobianos (PAMs) han surgido como una alternativa prometedora para afrontar el problema. Los PAMs son moléculas naturales que forman parte del sistema inmune innato de los seres vivos y que actúan como mecanismo de defensa frente a las infecciones (Pandi *et al.*, 2022). Los PAMs se han estudiado como alternativa a los antibióticos convencionales desde hace décadas (Pfalzgraff *et al.*, 2018). En la base de datos *Antimicrobial Peptide Database* se registran más de 3940 PAMs a enero de 2024, la mayoría de los cuales han sido obtenidos del reino animal y presentan actividad antibacteriana (APD3, 2023; Wang *et al.*, 2022).

Los PAMs ofrecen varias ventajas sobre los antibióticos convencionales, como su amplio espectro de acción, mecanismos de acción distintos y poca capacidad de inducir resistencia (Lazzaro *et al.*, 2020). Los moluscos gasterópodos, como los caracoles, son una fuente poco explorada de PAMs con actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y virus (Cilia y Fratini, 2018). Sus secreciones mucosas contienen una potencial variedad de PAMs que podrían ser una fuente prometedora para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (García *et al.*, 2020; Topalova *et al.*, 2022).

Los gasterópodos terrestres son la clase más diversa de los moluscos, pero solo seis especies han sido estudiadas por sus propiedades antimicrobianas. Las primeras investigaciones se centraron en *Achatina fulica* (Iguchi *et al.*, 1982; Zhong *et al.*, 2013; Daud *et al.*, 2018), seguida de *Arion ater* (Cottrell *et al.*, 1994), *Archachatina marginata* (Adikwu, 2005; Kenechukwu *et al.*, 2013), *Helix pomatia* (Greistorfer *et al.*, 2017), *Cornu aspersum* (Kostadinova *et al.*, 2018; Dolashki *et al.*, 2020) y *Hemiplecta distincta* (Noothuan *et al.*, 2021). La elección de la especie a estudiar depende de su disponibilidad e importancia económica.

*A. fulica*, el caracol gigante africano, es una especie exótica invasora en Colombia (Ministerio de Ambiente, 2008). Es una plaga agrícola, que también puede afectar la biodiversidad y la salud pública. Las autoridades ambientales han restringido su uso y cría para controlar su propagación (MAVDT, 2011). Sin embargo, a nivel internacional se ha demostrado que la secreción mucosa de *A. fulica* tiene propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras (Ghosh *et al.*, 2010; Kantawong *et al.*, 2016; Noothuan *et al.*, 2021). Si bien es una especie difícil de erradicar, su presencia podría aprovecharse para explorar sus potenciales beneficios.

En esta tesis doctoral se estudió la hemocianina de *A. fulica* como modelo para el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos. A partir de esta, se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron péptidos derivados de la hemocianina y se evaluó su actividad antibacteriana contra cepas de *S. aureus* y *E. coli* resistentes a antibióticos convencionales. También se evaluó la actividad citotóxica y hemolítica de los péptidos más activos.

## 1 Estado del arte y marco de referencia

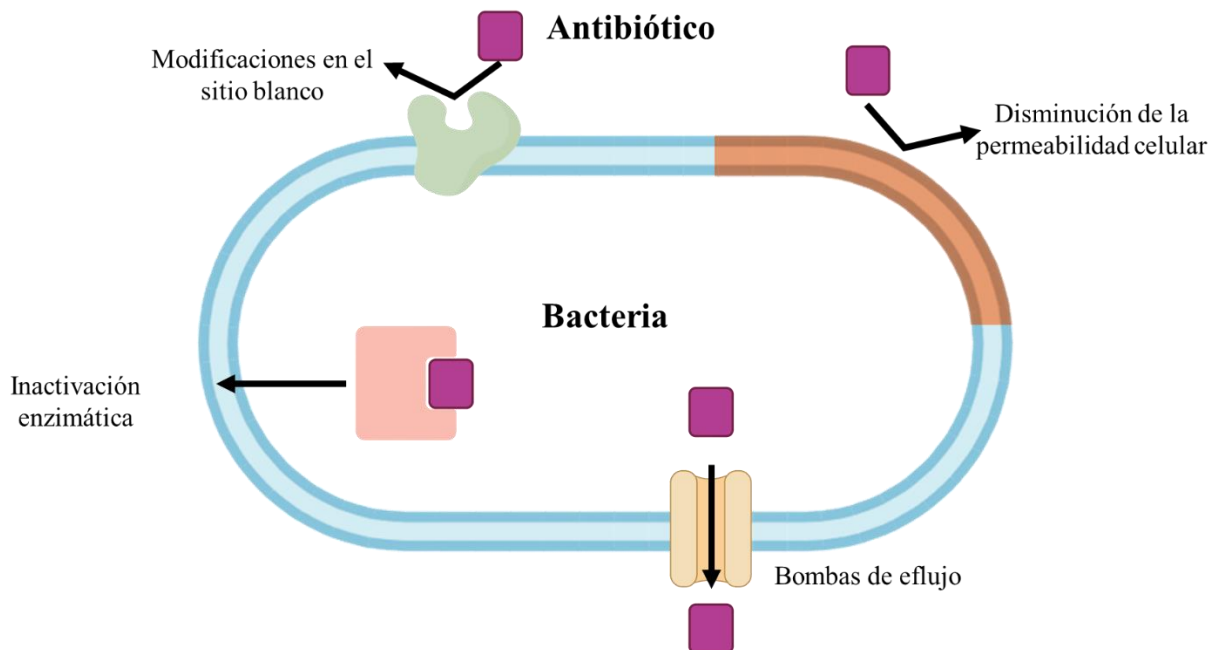
### 1.1 Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos es reconocida por la Organización Mundial de la Salud, como una de las diez principales amenazas para la humanidad (OMS, 2024). En 2019, las bacterias multirresistentes se asociaron a 4.95 millones de muertes, una cifra que se prevé que aumente a 10 millones anuales para 2050 (Neill, 2014; Murray *et al.*, 2022). A pesar de esta amenaza inminente, el desarrollo de nuevos antimicrobianos es insuficiente. En 2021 se evaluaron 40 agentes antimicrobianos para ensayos clínicos, pero ninguno de ellos fue eficaz contra bacterias Gram negativas resistentes a múltiples fármacos (Miethke *et al.*, 2021). Esta disparidad subraya la necesidad urgente de acelerar el desarrollo de nuevos antimicrobianos para combatir la resistencia antimicrobiana y salvaguardar la salud pública.

La resistencia antimicrobiana en bacterias es un proceso natural que se produce por modificaciones genéticas. Estas modificaciones pueden ser causadas por mutaciones en el ADN cromosómico de la bacteria, o por el intercambio de material genético con otras bacterias. Los principales mecanismos por los cuales se desarrolla este proceso son: inactivación enzimática, modificaciones en el sitio blanco, disminución de la permeabilidad de celular y bombas de eflujo (Figura 1) (Moreno *et al.*, 2009; Tafur *et al.*, 2008).

**Figura 1**

*Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos.* Adaptado de (Reygaert, 2018). Creado con BioRender (<https://www.biorender.com/>).



Con el propósito de abordar la resistencia antimicrobiana, se han implementado estrategias a nivel nacional e internacional (MinSalud, 2018; OMS, 2014). Estas buscan mejorar la comprensión de la problemática tanto en la población general como en los profesionales de la salud, con el objetivo de optimizar el uso de antibióticos en la salud humana y animal. Se destaca la relevancia de fortalecer los sistemas de vigilancia epidemiológica de la resistencia antimicrobiana, así como la aplicación de medidas preventivas y de control para disminuir la incidencia de enfermedades infecciosas (OMS, 2022).

La investigación de nuevos antimicrobianos ha sido destacada como una prioridad en la lucha contra las bacterias resistentes (CDC, 2019; OMS, 2017). En este contexto, en las últimas décadas se ha observado un aumento significativo en la exploración de potenciales medicamentos

basados en productos naturales (como los aceites esenciales), nanopartículas metálicas y péptidos antimicrobianos (PAMs). Específicamente, los PAMs han captado la atención de la comunidad académica debido a sus ventajas sobre los antibióticos convencionales, considerándolos una alternativa prometedora. Por lo tanto, se subraya la importancia de continuar la investigación tanto básica como aplicada en este ámbito.

En esta investigación se eligieron cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ya que representan un modelo de bacteria Gram positiva y Gram negativa. En particular, se emplearon cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y cepas *Escherichia coli* enteropatógenas por su alta importancia en salud pública.

### ***1.1.1 Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina (SARM)***

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva capaz de ocasionar diversas infecciones graves en la piel y tejidos blandos, como bacteriemia, artritis, osteomielitis y abscesos pulmonares. Está presente en la piel y fosas nasales de aproximadamente el 20% de la población mundial, y se transmite entre personas mediante el contacto directo con la piel o las secreciones respiratorias de individuos infectados (Tong *et al.*, 2015).

La resistencia a la meticilina en *S. aureus* se atribuye al gen *mecA*, responsable de codificar una enzima transpeptidasa modificada conocida como PBP2a. La baja afinidad de PBP2a por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos confiere resistencia a cepas de SARM contra la penicilina, la meticilina y otros antibióticos que contienen un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura química (Tong *et al.*, 2015).

La presencia inicial de cepas de SARM se identificó en muestras de pacientes hospitalizados en la década de 1960, y desde entonces, su expansión ha sido significativa, extendiéndose tanto en entornos hospitalarios como en la comunidad a nivel mundial. La prevalencia global de SARM ha difuminado las fronteras entre su adquisición asociada a la atención en salud, en la comunidad o asociada al ganado (Turner *et al.*, 2019). Considerando su impacto significativo en la salud pública, es imperativo desarrollar nuevas estrategias para prevenir la propagación de SARM y abordar las infecciones causadas por esta bacteria.

### **1.1.2 *Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa del orden Enterobacterales que forma parte de la microbiota intestinal humano y animal. Aunque generalmente benéfica, la cepa *E. coli* O157:H7 muestra alta virulencia y está asociada a infecciones gastrointestinales graves (Kaper *et al.*, 2004; Vila *et al.*, 2016). Sus toxinas dañan el endotelio vascular causando colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Transmitida principalmente por alimentos y agua contaminada, afecta a todas las edades, siendo más común en niños y adultos mayores. Esta cepa evidencia resistencia a varios antibióticos, incluyendo betalactámicos, carbapenémicos, cefalosporinas, quinolonas, aminoglucósidos y tetraciclinas (Amézquita-López *et al.*, 2016; Obaidat y Stringer, 2019; Schroeder *et al.*, 2002). Estos hallazgos resaltan la importancia de monitorear los patrones de resistencia en patógenos bacterianos entéricos y la urgencia de desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos.

## 1.2 *Achatina fulica*: más allá de la plaga, una potencial fuente de PAMs

El caracol gigante africano *Achatina (Lissachatina) fulica*, es endémico de África oriental y está catalogado como el molusco terrestre más invasor a nivel mundial (ISSG, 2015). Es un gasterópodo de gran tamaño perteneciente a la familia Achatinidae, caracterizado por su concha helicoidal y cuerpo compuesto por cabeza, pie y masa visceral (Figura 2). La concha en espiral proporciona defensa contra factores ambientales y depredadores. El cuerpo incluye una cabeza con cuatro tentáculos retráctiles para funciones sensoriales, un pie con fibras lisas que secretan mucina para facilitar el desplazamiento, y una masa visceral cuya capa cutánea produce un moco protector, comúnmente conocido como "baba" (Noothuan *et al.*, 2021; Raut & Barker, 2002).

### Figura 2

*Ciclo de vida de Achatina fulica.* El ciclo comprende cinco fases: 1. Cópula y fecundación. 2. Oviposición. Los caracoles hermafroditas se reproducen por fertilización cruzada, colocando lotes de 150 huevos aproximadamente cuatro veces al año. 3. Incubación. 4. Eclosión. Los huevos eclosionan en 7-12 días, liberando caracoles juveniles que se alimentan de residuos y detritus. 5. Los adultos tienen una esperanza de vida de tres a cuatro años y se reproducen al año o año y medio de vida. Su entorno óptimo incluye plantaciones, jardines, parques y sitios sombríos con humedad del 70%. Son nocturnos y se refugian debajo de piedras, bloques y hojas secas (Noothuan *et al.*, 2021; Raut & Barker, 2002). Imágenes del autor.



La presencia de *A. fulica* en Bucaramanga se identificó a partir de 2011. En 2015, la Subdirección Ambiental del Área Metropolitana de Bucaramanga (AMB) implementó medidas de control, recolectando e incinerando 4.2 toneladas de este espécimen en 145 barrios. Estas acciones redujeron significativamente la población, ya que en 2018 se atendieron 11 barrios colectando 2.2 toneladas (AMB, 2020). Su presencia actual se limita a focos estacionales en zonas periurbanas con basuras y material orgánico.

Aunque la introducción de *A. fulica* en Colombia se ha abordado centrándose principalmente en su control y erradicación, a nivel internacional se investigan sus propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras. Además, se exploran posibles aplicaciones en diversos

campos, incluso como fuente de proteína animal (Ghosh *et al.*, 2010; Diarra *et al.*, 2015; Kantawong *et al.*, 2016).

En algunos estudios se han identificado péptidos y proteínas presentes en la secreción mucosa de *A. fulica* con acción inhibitoria frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Por ejemplo, la glicoproteína *Achacin* de 150 kDa es activa frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Obara *et al.*, 1992; Ogawa *et al.*, 1999). El Péptido Rico en Cisteína (PRC) de 9.7 kDa denominado *mytimacin-AF* con actividad contra *S. aureus*, *B. megatherium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Candida albicans*, reportándose por primera vez actividad antifúngica de la secreción (Zhong *et al.*, 2013). Además, se han reportado proteínas de 50.81 kDa, 15 kDa, 11.45 kDa activos frente a *Streptococcus mutans* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Kriswandini, 2014). La actividad de la secreción mucosa contra bacterias resistentes también ha sido reportada para *S. aureus* Resistente a la Meticilina (SARM) (Pereira *et al.*, 2016; Suárez *et al.*, 2021). Lo anterior demuestra la potencial diversidad de PAMs y proteínas con actividad biológica que se pueden obtener de este caracol.

Además del efecto microbicida directo, la actividad antimicrobiana de los PAMs puede darse a través de la actividad inmunomoduladora sobre el hospedero (Taylor *et al.*, 2008). Esta actividad se ha observado en los PRC de tipo defensinas, los cuales también han sido obtenidos de *A. fulica* y otros moluscos (Kantawong *et al.*, 2016; H. Li *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2013).

### 1.3 Péptidos Antimicrobianos (PAMs)

Los PAMs son cadenas cortas de aminoácidos (habitualmente de 5 a 50) vinculados por enlaces peptídicos, generalmente con un peso inferior a 10 kDa. Poseen estructuras secundarias diversas, clasificándose en tres grupos: alfa-helicoidales, láminas beta y extendidos (Figura 3). Su flexibilidad y estructuras específicas, como puentes disulfuro en los de lámina beta, influyen en sus propiedades biológicas (Huan *et al.*, 2020; Reddy *et al.*, 2004). Además, se han reportado péptidos cíclicos y péptidos con topologías complejas que incluyen puentes tioéster (Huan *et al.*, 2020).

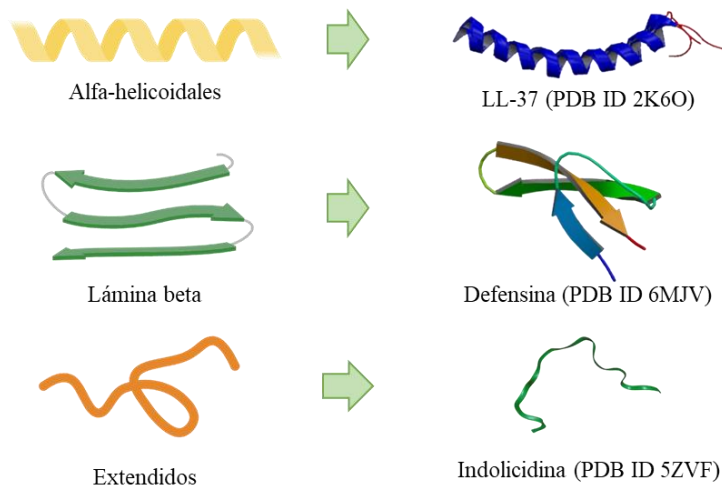
La carga neta positiva y naturaleza anfipática de los PAMs facilita su interacción con las membranas bacterianas. Los mecanismos de acción basados en la permeabilización y formación de poros se han explicado a través de modelos como el de barril, poro toroidal y alfombra (Figura 3) (Lazzaro *et al.*, 2020; Luo, 2021). Además de actuar en membranas, los PAMs pueden inhibir la síntesis de ADN, ARN, proteínas y afectar la síntesis de la pared bacteriana, demostrando su versatilidad (Luo, 2021). Aunque los mecanismos precisos no se comprenden completamente, su actividad antimicrobiana es evidente.

#### **Figura 3**

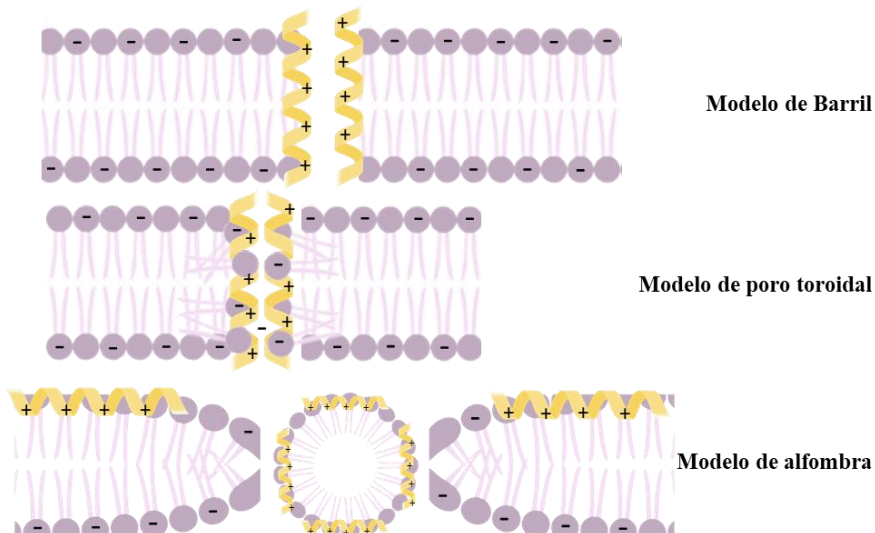
*Estructuras y mecanismos de acción de los PAMs a nivel de membrana.* A. Representaciones esquemáticas de la estructura secundaria de PAMs y ejemplos. LL-37: Catelicidina. B. En el mecanismo de acción a nivel de la membrana destacan tres modelos principales: barril, poro toroidal y alfombra. En el primero, los péptidos se agrupan en la membrana, protegiendo las partes hidrofílicas y creando un canal interno, con la porción hidrofóbica hacia la membrana. En el

modelo de poro toroidal, los péptidos a bajas concentraciones se unen a la membrana, mientras que a concentraciones altas se insertan verticalmente, formando poros al doblar las moléculas de la membrana, generando canales internos donde residen los péptidos. En el modelo de alfombra, los péptidos se organizan en la superficie, y al superar una concentración crítica, alteran la estructura de los fosfolípidos, aumentando la fluidez y causando la ruptura de la membrana en micelas. Adaptado de (Balandin & Ovchinnikova, 2016). Creado con BioRender.

**A. Clasificación general de los PAMs de acuerdo a su estructura secundaria**



**B. Modelos de mecanismo de acción de los PAMs a nivel de la membrana**



Si bien los PAMs presentan algunas limitaciones como la susceptibilidad a la degradación por proteasas y elevados costos de producción, existen estrategias para superar estos desafíos, como modificaciones estructurales y sistemas de administración innovadores (Giuliani *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2016). A pesar de que solo la Daptomicina está aprobada para uso clínico por la FDA, en 2019 habían 27 PAMs en estudios clínicos, sugiriendo un campo prometedor en la lucha contra infecciones bacterianas, especialmente aquellos activos contra bacterias resistentes como los péptidos hLF1-11, LTX-109 y Friulimicina B (Koo & Seo, 2019).

#### **1.4 Hemocianina como modelo para la obtención de PAMs**

La hemocianina (Hc) es una proteína transportadora de oxígeno que se encuentra principalmente en la hemolinfa de algunos moluscos y artrópodos (crustáceos, arácnidos). Sin embargo, su distribución en estos grupos es errática. Por ejemplo, se encuentra en grandes cantidades en el molusco gasterópodo del género *Helix*, pero no se encuentra en la especie de agua dulce *Planorbis* (Burmester, 2001; Chiumiento *et al.*, 2020).

La Hc ha sido empleada como transportadora para producir anticuerpos y como transportador-adyuvante en vacunas experimentales (Gesheva *et al.*, 2015). Así mismo, esta metaloproteína se ha utilizado en la producción de anticuerpos contra pequeñas moléculas de interés diagnóstico, incluyendo hormonas, drogas, antibióticos, y toxinas, que son acopladas químicamente (Gesheva *et al.*, 2015; Zhuang *et al.*, 2015). Estudios recientes han demostrado el potencial de la Hc de moluscos como agente antimicrobiano, antibiofilm, antifúngico,

anticancerígeno e inmunomodulador, con amplio margen de aplicaciones (Feng *et al.*, 2023; Jeyachandran *et al.*, 2023).

La mayoría de los PAMs maduros provienen del procesamiento intracelular de proteínas precursoras más grandes mediante modificaciones postraduccionales. Algunos estudios sugieren que las proteínas biológicamente activas como la hemocianina (Lee *et al.*, 2003) y la hemoglobina (Ullal *et al.*, 2008), pueden ser fuentes de PAMs. Los péptidos derivados de Hc con propiedades antimicrobianas se han registrado previamente en camarones (Monteiro *et al.*, 2020; Petit *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2019), cangrejos de río (Lee *et al.*, 2003) y arañas (Riciluca *et al.*, 2012). La revisión bibliográfica indica que hasta el 2015 se registraron los primeros PAMs derivados de hemocianina de moluscos (Zhuang *et al.*, 2015).

Algunos ejemplos de PAMs derivados de la Hc con actividad antifúngica incluyen la rondonina (secuencia: IIIQYEGHKH; masa molecular de 1.2 kDa) obtenido de la tarántula *Eurypelma californicum* y activo contra *Candida albicans* a una concentración de 16.75  $\mu$ M (Riciluca *et al.*, 2012) (Tabla 1). Otro ejemplo es el péptido alfa-helicoidal PvHCt, derivado del artrópodo *Litopenaeus vannamei*, que presenta actividad contra *Fusarium oxysporum* (Petit *et al.*, 2016) (Tabla 1). Por otro lado, el péptido LvHcL48 de 8.9 kDa derivado de *L. vannamei* demostró actividad contra virus que afectan a los camarones (Zhan *et al.*, 2019).

En 2020, Dolashki y colaboradores, reportaron tres péptidos en fracciones de la secreción mucosa del caracol terrestre *Cornu aspersum* que exhiben una notable homología con hemocianinas provenientes de caracoles *Helix aspersa*, *Helix pomatia* y *Helix lucorum* (Dolashki *et al.*, 2020) (Tabla 1). Los investigadores destacan que la comparación de las secuencias de estos péptidos con la base de datos CAMPSing revela una identidad superior al 70% con péptidos antimicrobianos conocidos. Se postula que procesos proteolíticos podrían estar relacionados con

la generación de estos péptidos en la secreción mucosa, y se observa que algunos de ellos contienen altos niveles de residuos de glicina, leucina y prolina, sugiriendo su relevancia para la actividad antimicrobiana (Dolashki *et al.*, 2020).

**Tabla 1**

*PAMs derivados de hemocianina con actividad antimicrobiana.* PAMs derivados de hemocianina con actividad antimicrobiana. PM: Peso molecular. pI: punto isoelectrico. GRAVY (*Grand Average of Hydropathicity Index*).

<b>Secuencia</b>	<b>PM (Da)</b>	<b>Carga neta</b>	<b>pI</b>	<b>GRAVY</b>	<b>Organismo</b>	<b>Acción</b>	<b>Referencia</b>
<b>DLTLNGLSPK</b>	1057.58	0	5.84	-0.300	<i>Helix</i> spp.	Antibacteriano (Gram positivo y Gram negativo)	(Dolashki <i>et al.</i> , 2020)
<b>SLEERDIQS</b>	1076.44	-2	4.14	-0.980	<i>Helix</i> spp.	Antibacteriano (Gram positivo y Gram negativo)	(Dolashki <i>et al.</i> , 2020)
<b>FHKSLPKLEN</b>	1326.64	+1	8.60	-1.227	<i>Helix</i> spp.	Antibacteriano (Gram positivo y Gram negativo)	(Dolashki <i>et al.</i> , 2020)

<b>DTFDYKKFGYRYDS</b>	6084.76	0	8.5	-0.81	<i>Haliotis</i>	Antibacteriano	(Zhuang <i>et al.</i> ,
<b>LELEGRSISRIDELIQ</b>					<i>tuberculata</i>	(Gram positivo y	2015)
<b>QRQEKDRTFAGFLL</b>						Gram negativo)	
<b>KGFGTSAS</b>							
<b>FKVQNQHGVVVKIF</b>	1945.2	+2	10.0	-0.569	<i>Pacifastacus</i>	Antibacteriano	(Lee <i>et al.</i> , 2003)
<b>HH</b>					<i>leniusculus</i>	(Gram positivo)	
<b>FEDLPNFGHIQVKVF</b>	2750	-2	6.16	-0.596	<i>Litopenaeus</i>	Antifúngico	(Petit <i>et al.</i> , 2016)
<b>NHGEHIIH</b>					<i>vannamei</i>		
<b>IIIQYEGHKKH</b>	1237.42	0	8.7	-0.55	<i>Eurypelma</i>	Antifúngico	(Riciluca <i>et al.</i> ,
					<i>californicum</i>		2012)

## 1.5 Diseño *in silico*, síntesis y caracterización fisicoquímica de PAMs

### 1.5.1 Diseño *in silico* de PAMs

Los avances en bioinformática han facilitado el desarrollo de simulaciones computacionales (*in silico*) en el estudio de PAMs (Fields *et al.*, 2020; Pandi *et al.*, 2022). Estas simulaciones basadas en análisis de estructura-actividad y acoplamiento molecular, permiten diseñar análogos de péptidos que posteriormente son evaluados mediante experimentación *in vitro* e *in vivo* (Chalongkulasak *et al.*, 2022; E-Kobon *et al.*, 2016; Tachapuripunya *et al.*, 2021). De este modo, el cribado *in silico*, seguido de validación experimental, emerge como un método eficaz para descubrir nuevos PAMs. Esta metodología ha demostrado ser exitosa en la identificación de péptidos con potencial antimicrobiano y antitumoral a partir de secreciones mucosas de moluscos (Chalongkulasak *et al.*, 2022; Dolashki *et al.*, 2020; E-Kobon *et al.*, 2016).

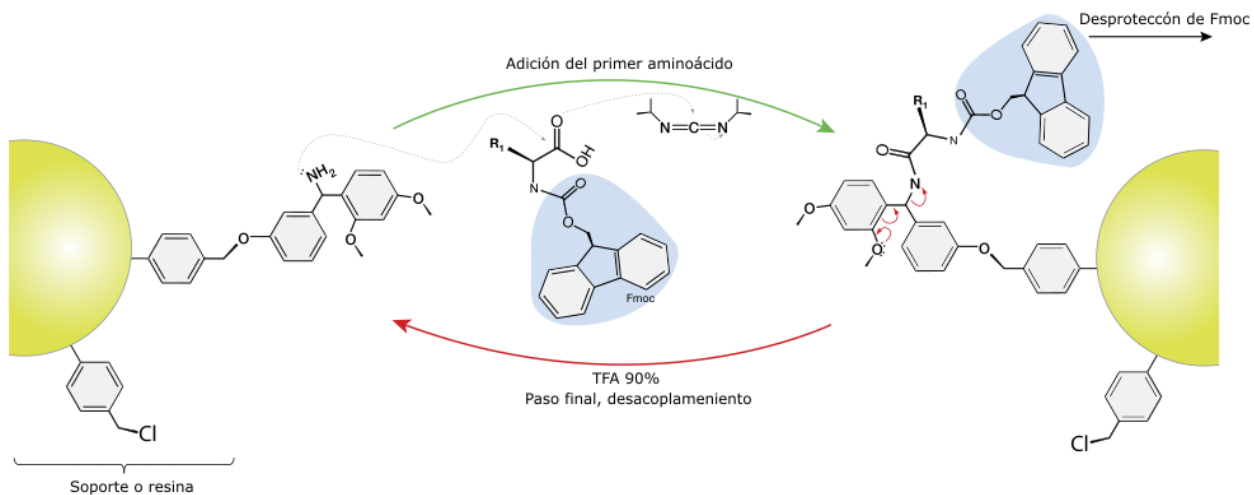
### 1.5.2 Síntesis y caracterización de PAMs

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) es en la actualidad el método predominante para obtener péptidos de hasta 50 aminoácidos. Desarrollado por Robert Merrifield en 1963, este enfoque permite sintetizar péptidos difíciles de expresar en bacterias, incorporar aminoácidos no proteicos, modificar esqueletos de péptidos y proteínas, y sintetizar proteínas a partir de D-aminoácidos. La SPPS se basa en el anclaje de un aminoácido al extremo C-terminal de un soporte polimérico inerte como la 4-metilbencilhidrilamina (MBHA). El crecimiento de la cadena implica la adición secuencial de aminoácidos desde el extremo C-terminal al N-terminal, utilizando

protectores como Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) y grupos como tert-butilo (tBu), tritilo (Trt), terc-butiloxicarbonilo (Boc) para evitar reacciones no deseadas. La liberación del péptido de la resina y la eliminación de los protectores se logran con ácido trifluoroacético (TFA), seguido de precipitación con éter frío y liofilización (Figura 4) (Merrifield, 1963).

#### Figura 4

*Esquema de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). TFA: ácido trifluoroacético. Fmoc: grupo protector de fluorenilmetoxicarbonilo. Adaptado de Dan Cojocari, Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto.*



La pureza de los péptidos sintetizados químicamente se evalúa mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), que utiliza gradientes de fase móvil con solventes polares como agua y acetonitrilo. La determinación del peso molecular se lleva a cabo mediante espectrometría de masas (MS), utilizando técnicas como MALDI o ESI, siendo ESI más

económico y adecuado para péptidos menores de 4000 Da. La estructura secundaria de un péptido puede modelarse mediante herramientas bioinformáticas como Pep-Fold o estimarse experimentalmente con dicróismo circular (DC). El análisis por DC ofrece información sobre la estructura secundaria del péptido, indicando la presencia de estructuras como  $\alpha$ -hélices o láminas- $\beta$ , o la falta de estructura definida, según los máximos y mínimos observados a diferentes longitudes de onda (Brahms & Brahms, 1980; Seeger Pfeiffer & Padrón, 2013).

## **1.6 Estudios previos complementarios a la presente tesis doctoral**

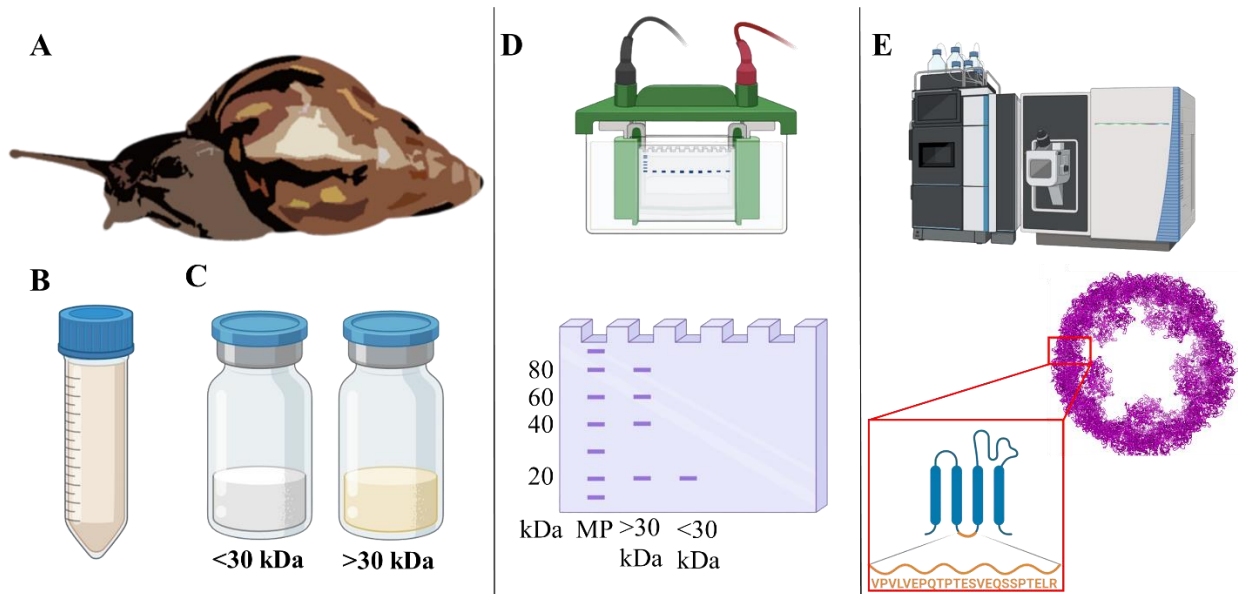
En un estudio previo realizado por la Línea de Parasitología Humana y Veterinaria del grupo GIEM de la UIS se encontró que la secreción mucosa de *A. fulica* del área metropolitana de Bucaramanga presentaba actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM) y Gram negativas como *Escherichia coli* enterohemorrágica (Pereira *et al.*, 2016).

### **1.6.1 Obtención péptidos de la secreción mucosa de *A. fulica***

En investigaciones complementarias a la presente tesis doctoral se identificaron 20 péptidos a partir de fracciones proteicas semipurificadas de la secreción mucosa de *A. fulica* con actividad antimicrobiana, cuyo cotejo con la base de datos UniProt reveló que hacen parte de la hemocianina (Suárez *et al.*, 2021) (Figura 5).

**Figura 5**

*Obtención de péptidos de la secreción mucosa de A. fulica.* A. Se colectaron ejemplares de *A. fulica* en tres focos del área metropolitana de Bucaramanga ubicados en vereda Acapulco del municipio de Girón y el barrio La Paz en Floridablanca. La secreción mucosa se obtuvo mediante estimulación directa del pie con corriente eléctrica (5–10V) a intervalos de 5-20s (Pereira *et al.*, 2016). B. Para homogenizar la secreción mucosa se estandarizó un método que utiliza solución tampón fosfato salino (PBS) e inhibidores de proteasas que permite recuperar la mayor cantidad de péptidos y proteínas (Suárez *et al.*, 2021). Se empleó precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación para separar los péptidos y proteínas. C. Se realizó fraccionamiento de la secreción mediante filtros de 30 kDa. Las dos fracciones obtenidas (<30 kDa y >30 kDa) fueron liofilizadas. D. Se realizó electroforesis SDS-PAGE a las fracciones obtenidas y se seleccionaron cuatro bandas de la fracción >30 kDa (20 kDa, 40 kDa, 60 kDa, 80 kDa) y una muestra de la fracción <30 kDa para digestión con tripsina y análisis por espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF). E. Se obtuvieron secuencias de 20 péptidos derivados de la proteína hemocianina (Suárez *et al.*, 2021).



El alineamiento con BLASTp de los péptidos identificados confirmó su identidad (100%) con Hc de caracoles terrestres *C. asperum*, *H. pomatia*, *H. locrum*, el caracol dulceacuícola *L. stagnalis*, y el gasterópodo marino *Aplysia californica*. En la Tabla 2 se presentan las secuencias de aminoácidos y el número de acceso de las proteínas asociadas. Por lo tanto, ante la presencia de Hc en la secreción mucosa, resulta interesante seguir estudiándola como un modelo para el diseño de nuevos PAMs.

**Tabla 2**

*Péptidos que hacen parte de la hemocianina identificados en fracciones semipurificadas de la secreción mucosa de A. fulica (Suárez et al., 2021).*

N°	Secuencia	Origen	ID UniProt
1	IYSRPADTFDYRN	Hemocyanin alphaD	A0A3G2VFQ5

		<i>(Cornu aspersum)</i>	
2	RLLTVQAENALRKH	Hemocyanin alphaD <i>(Cornu aspersum)</i>	A0A3G2VFQ5
3	RKPLQPFQDKT	Hemocyanin alphaD <i>(Cornu aspersum)</i>	A0A3G2VFQ5
4	RLHGIGVSADVRV	Hemocyanin alphaD <i>(Cornu aspersum)</i>	A0A3G2VFQ5
5	REMPWAYERL	Hemocyanin alphaD <i>(Cornu aspersum)</i>	A0A3G2VFQ5
6	RKPLQPFQDKK	Hemocyanin alphaD <i>(Helix pomatia)</i>	A0A3G2VHR9
7	RYSRPADTFDYRN	Hemocyanin 1 <i>(Lymnaea stagnalis)</i>	A0A3G2VM51
8	RAIDAFDYDRL	Hemocyanin 1 <i>(Lymnaea stagnalis)</i>	A0A3G2VM51
9	KYDVTNVFNKL	Hemocyanin 1 <i>(Lymnaea stagnalis)</i>	A0A3G2VM51
10	KEMPWAYERI	Hemocyanin 1 <i>(Lymnaea stagnalis)</i>	A0A3G2VM51
11	SGRVEFEHVDTERD	Hemocyanin alphaN <i>(Helix lucorum)</i>	G3FPE7
12	RYDVTNVFNKL	Hemocyanin alphaN <i>(Helix lucorum)</i>	G3FPE7
13	RLYVVQLEQALKEKG	Hemocyanin 1 <i>(Lymnaea stagnalis)</i>	A0A3G2VM51
14	DPLFLLHHSNVDRQ	Hemocyanin 1 <i>(Lymnaea stagnalis)</i>	A0A3G2VM51
15	KYSRPIDTFDYRN	Hemocyanin alphaD <i>(Cornu aspersum)</i>	A0A3G2VHN3
16	RLLTVQAENALRN	Hemocyanin alphaD	A0A3G2VHN3

		( <i>Cornu aspersum</i> )	
17	RIYIVVEDH	Hemocyanin alphaD	A0A3G2VHN3
		( <i>Cornu aspersum</i> )	
18	RAIDAFDYDRF	Hemocyanin 1	A0A3G9M8B7
		( <i>Aplysia californica</i> )	
19	RLLTVQAENALRR	Hemocyanin 1	A0A3G9M8B7
		( <i>Aplysia californica</i> )	
20	KVAGEDAVTTRD	Hemocyanin alphaD	A0A3G2VFQ5
		( <i>Cornu aspersum</i> )	

La hemocianina de moluscos es un decámero cilíndrico de aproximadamente 350-400 kDa. En términos generales, la Hc puede tener modificaciones postraduccionales en diferentes especies. Estas modificaciones pueden incluir glicosilación, fosforilación y otras alteraciones químicas que afectan la estructura y función de la proteína, incluyendo su actividad antimicrobiana (Feng *et al.*, 2023). Sin embargo, no se obtuvo información sobre posibles modificaciones en las cadenas laterales de los péptidos identificados.

El análisis por alineamiento múltiple de las secuencias de Hc de cuatro especies de gasterópodos terrestres indica que presentan identidades entre 62.2% y 93.81% (Apéndice A). Para ilustrar las regiones de la Hc donde se generan los péptidos identificados, se presenta el BLASTp del péptido 4 (posteriormente referido como AfH1 y 4388) y 4a (AfH2 y 4391) (Figura 6A). El péptido 4a corresponde a una región con identidad >80% respecto a la secuencia 4, lo cual se explicará más adelante. Adicionalmente, se muestra a manera de ejemplo un modelo de alineamiento de los péptidos 4 y 4a con la hemocianina del molusco *Todarodes pacificus* (PDB ID 4YD9) (Gai *et al.*, 2015) Figura 6B.

**Figura 6**

*Regiones de la Hc donde se generan los péptidos identificados.* A. BLASTp del péptido 4 con identidad del 100% con Hc de *H. pomatia* en la región 333-347. En la región 2829-2840 se encuentra una secuencia (4a) con >80% de identidad al péptido 4. B. Modelo de alineamiento de los péptidos 4 y 4a con Hc de *T. pacificus* (PDB ID 4YD9) (Gai *et al.*, 2015). Los alineamientos fueron realizados con PyMOL.

A

>4  
**FRLHGIGVSADVRVK**

>4a  
**FLLHGIGASADV**

**hemocyanin alphaD [Helix pomatia]**  
 Sequence ID: [AYO86686.1](#) Length: 3428 Number of Matches: 3

Range 1: 333 to 347 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
49.4 bits(109)	2e-05	15/15(100%)	15/15(100%)	0/15(0%)

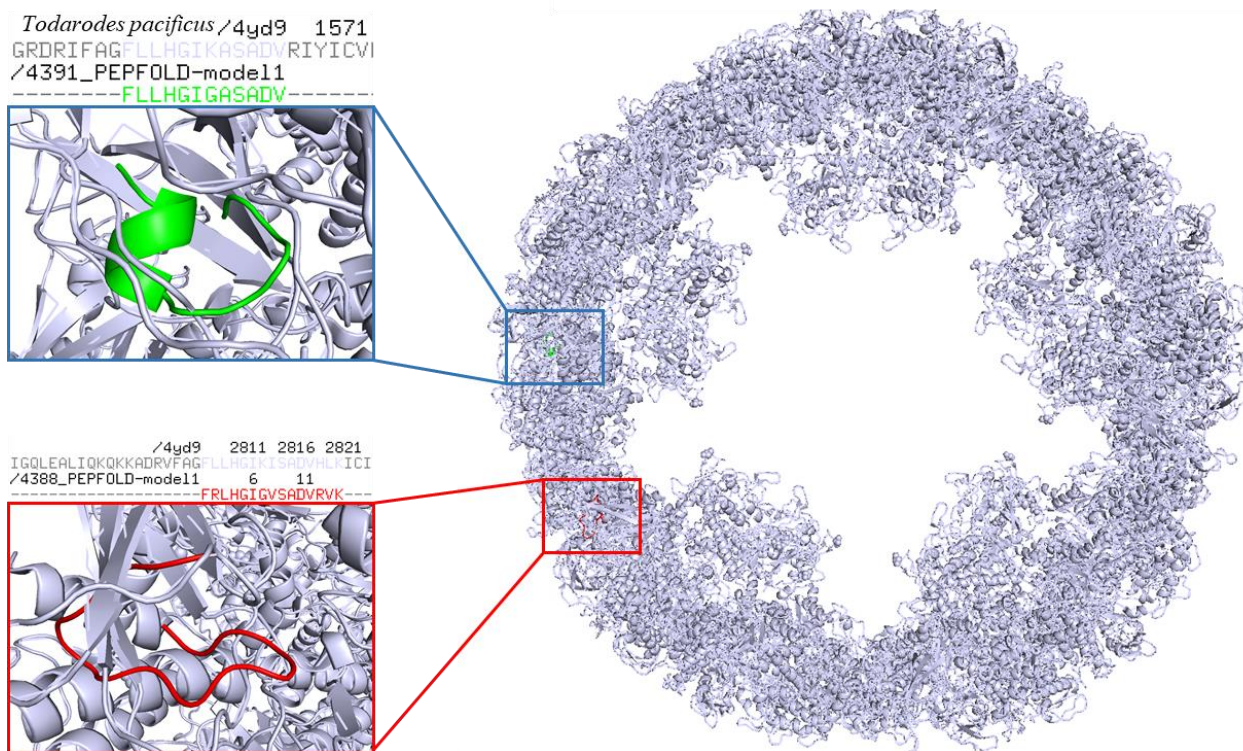
Query 1 FRLHGIGVSADVRVK 15  
 FRLHGIGVSADVRVK  
**Sbjct 333 FRLHGIGVSADVRVK 347**

Range 2: 2829 to 2840 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
29.5 bits(62)	209	10/12(83%)	10/12(83%)	0/12(0%)

Query 1 FRLHGIGVSADV 12  
 F L HGIG SADV  
**Sbjct 2829 FLLHGIGASADV 2840**

B



## 2 Pregunta de investigación

¿Es la hemocianina de *Achatina fulica* un posible modelo proteico para el diseño racional *in silico* de PAMs activos frente a *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM) y *Escherichia coli* O157:H7?

## 3 Hipótesis

El diseño racional *in silico* de péptidos derivados de la hemocianina de *A. fulica* proporcionan información valiosa para la síntesis de nuevos PAMs activos contra bacterias de importancia en salud pública, como cepas de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina y *E. coli* O157:H7 multirresistente.

## 4 Objetivo general

Desarrollar nuevos péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* con potencial actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM) y *Escherichia coli* O157:H7.

## 5 Objetivos específicos

- Obtener secuencias de péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* con potencial antimicrobiano empleando herramientas bioinformáticas.
- Sintetizar y caracterizar los péptidos derivados de la hemocianina diseñados *in silico*.
- Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados químicamente.

- Determinar la actividad citotóxica y hemolítica de los péptidos que tengan actividad antimicrobiana mediante experimentación *in vitro*.

## 6 Metodología

A continuación, se presenta la metodología para cada objetivo específico:

**Objetivo específico 1:** Obtener secuencias de péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* con potencial antimicrobiano empleando herramientas bioinformáticas

A partir de los 20 péptidos identificados en la secreción mucosa de *A. fulica* (ver Tabla 2) se empleó la estrategia de diseño racional *in silico* para obtener análogos con potencial actividad antimicrobiana. Para lograrlo, se utilizaron herramientas bioinformáticas tales como: BLASTp, Clustal Omega, y algoritmos de predicción de probabilidad de PAMs de tipo máquinas de vector-soporte (SVM- *Support-Vector Machines*) de la base de datos CAMP (*Collection of Anti-Microbial Peptides*) (<http://www.camp3.bicnirrh.res.in/>).

La base de datos CAMP está integrada con herramientas para análisis de secuencias (BLASTp y Clustal Omega), análisis de familias (CAMPSign), así como para predicción y diseño racional de PAMs. CAMP utiliza algoritmos propios de tipo SVM para generar sustituciones de residuos únicos en las secuencias seguidas de su predicción de ser PAM. El algoritmo SVM utiliza características fisicoquímicas, patrones secuenciales, estructuras tridimensionales, entre otros atributos relevantes de las moléculas analizadas para determinar la mayor probabilidad de actuar como PAM. La selección de estas características se basa en la capacidad del algoritmo para identificar patrones complejos y no lineales en los datos, permitiendo así la clasificación de las moléculas como posibles PAMs.

## 6.1 Análisis de secuencias

En primer lugar, se exploraron las regiones de la hemocianina donde se generan los péptidos identificados y mediante la herramienta BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) se buscaron otras regiones de la hemocianina con secuencias similares a las identificadas en la secreción. Esto se realizó con el objetivo de abarcar otras regiones de la hemocianina y ampliar el número de secuencias iniciales para el diseño racional de análogos.

Seguidamente, se realizó alineamiento múltiple mediante la herramienta Clustal Omega con el fin de identificar patrones en las secuencias. Estos patrones se alinearon con aquellos de las familias de PAMs registrados en la base datos CAMP utilizando la herramienta CAMPSign (<http://www.campsign.bicnirrh.res.in/>).

## 6.2 Diseño de análogos

Para calcular la probabilidad de que las secuencias identificadas sean PAMs se empleó el algoritmo SVM de la base de datos CAMP. Adicionalmente, se utilizó la herramienta de predicción de la base de datos DBAASP (*Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides*) (<http://dbaasp.org>) para predecir la actividad de los péptidos frente a *S. aureus* ATCC25923 y *E. coli* ATCC25922 (Pirtskhalava *et al.*, 2021).

La base de datos DBAASP utiliza un algoritmo predictivo de actividad contra especies microbianas específicas (PAASS), ofreciendo así la capacidad de buscar actividades de péptidos

por especie objetivo. La predicción de la actividad antibacteriana se basa en un algoritmo de aprendizaje automático que considera características físico-químicas como el momento hidrofóbico, la densidad de carga y el potencial dependiente de la profundidad (Pirtskhalava *et al.*, 2021; Vishnepolsky, 2022). Para este algoritmo, los péptidos activos se definen por una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) inferior a 25  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que los inactivos superan los 100  $\mu\text{g/mL}$ , con una longitud máxima de 30 aminoácidos (Vishnepolsky, 2022).

Posteriormente, se realizó un cribado de secuencias con base en el alineamiento múltiple con CLUSTAL Omega y la predicción de la base de datos CAMP. Se seleccionaron aquellas secuencias distintas entre sí con mayor probabilidad de ser PAM. Para esto se realizaron tres rondas de alineamiento, predicción y selección hasta obtener los diez mejores candidatos, es decir, aquellos representantes con diversidad de secuencias y mejor probabilidad de ser PAM.

Finalmente, se empleó la herramienta de diseño racional de la base de datos CAMP para determinar sustituciones de aminoácidos que potencialmente aumentan la actividad antimicrobiana de los péptidos. Con base en estas predicciones se diseñaron análogos de los péptidos identificados.

### **6.3 Determinación de propiedades fisicoquímicas y estructura secundaria**

Se utilizó la herramienta *Proparam Tools* de la base de datos UniProt (<https://web.expasy.org/protparam/>) para obtener información sobre las propiedades fisicoquímicas de los péptidos diseñados, tales como: peso molecular (Da), carga neta, punto isoeléctrico (pI), índice de hidrofobicidad GRAVY (*Grand Average of Hydropathicity Index*) e índice de inestabilidad.

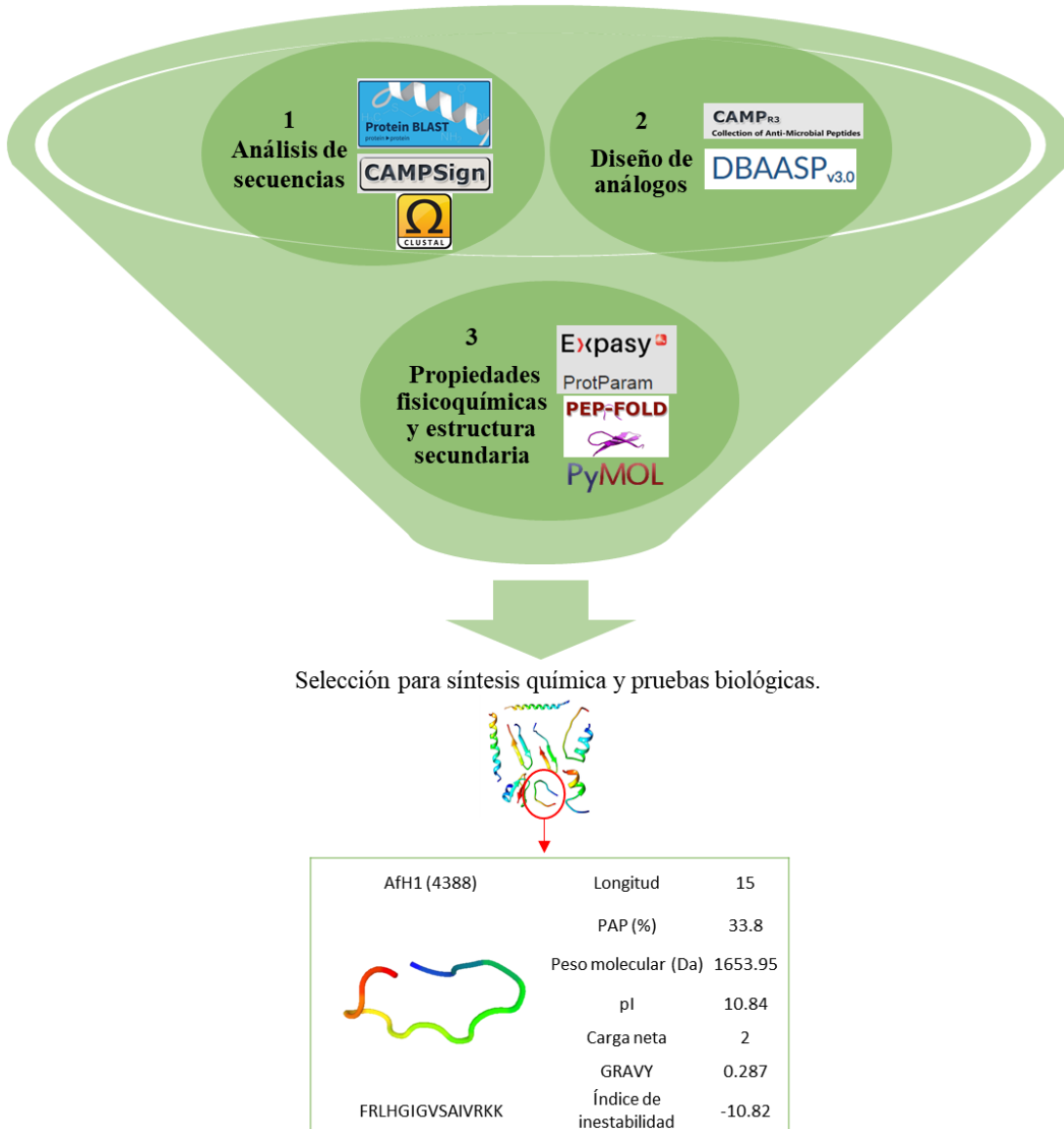
La carga neta se calcula mediante la relación entre el número total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys) y negativamente (Asp + Glu) (Godfrey *et al.*, 2005). La hidrofobicidad se determinó mediante el índice GRAVY que representa la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos dividida por la longitud de la secuencia. Valores de GRAVY positivos indican que el péptido es hidrofóbico mientras que los valores negativos significan que es hidrofílico (Godfrey *et al.*, 2005). Por su parte, el índice de inestabilidad desarrollado por Guruprasad y colaboradores, proporciona una estimación de la estabilidad del péptido en un tubo de ensayo; cuando este valor es menor que 40 se prevé como estable (Guruprasad *et al.*, 1990).

Para predecir las estructuras peptídicas a partir de las secuencias de aminoácido se empleó el servidor Pep-Fold (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) y el visualizador PyMOL.

Finalmente, se seleccionaron 20 péptidos para síntesis química y pruebas biológicas. Se determinó la identidad de los péptidos seleccionados con hemocianinas de gasterópodos terrestres mediante BLASTp. Del mismo modo, se usó la herramienta BLAST propia de la base de datos CAMP para determinar identidad con PAMs registrados en dicha base de datos. En la Figura 7 se resumen las herramientas bioinformáticas empleadas para el diseño racional *in silico* de PAMs.

**Figura 7**

*Herramientas bioinformáticas empleadas para el diseño racional in silico de PAMs.*



**Objetivo específico 2:** Sintetizar los péptidos derivados de la hemocianina diseñados *in silico*.

#### 6.4 Síntesis de péptidos

Se realizó SPFS secuencial por la estrategia Fmoc/tBu de acuerdo a los Procedimientos Operativos Estandarizados (POEs) del Laboratorio de Péptidos del Núcleo de Biotecnología Curauma (NBC) de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

Se empleó una resina Rink amida 4-MBHA (Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Alemania). Los agentes activantes fueron TBTU (*O*-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato), HBTU (2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato), HCTU (*O*-(1*H*-6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato), o DIC (N,N'-Diisopropilcarbodiimida) (Iris Biotech GmbH, Marktredwitz, Alemania). Además de Oxima para evitar racemización y N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) como base (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) (Guzmán *et al.*, 2020, 2021). Para la construcción de las bolsas se usaron láminas de malla de polipropileno (Referencia F7221030-72 – [www.lumiteinc.com](http://www.lumiteinc.com)). Se emplearon L-aminoácidos protegidos con Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonil), DIEA (N,N-diisopropiletilamina), TIS (triisopropilsilano), azul de bromofenol, DCM (diclorometano), DMF (N,N-dimetilformamida), IPA (2-propanol) y piperidina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Se usó el programa Acuapeptide Síntesis (<http://www.acuapeptide.cl/programas.html>) desarrollado por el Laboratorio de Péptidos del NBC para generar el archivo de síntesis simultánea de péptidos. El archivo contiene las secuencias a sintetizar, sus respectivas familias, número de

bolsa, número de residuos, entre otros datos (Guzmán *et al.*, 2021). A continuación, se describe el procedimiento de síntesis simultánea y se representa de manera esquemática en la Figura 8.

#### **6.4.1 Preparación de las “bolsas de té”**

Se imprimieron cuadrados de  $2.5 \times 2.5$  cm en la malla de polipropileno, posteriormente se sellaron y cortaron individualmente. Las bolsas se rellenaron con 40 mg de resina (0.74 mmol/g de sustitución y 100-200 mesh) para los péptidos sintetizados inicialmente, mientras que para los péptidos de scan de alanina se emplearon 20 mg de resina por bolsa (Guzmán *et al.*, 2021).

#### **6.4.2 Desprotección**

Las bolsas se agregaron en un solo recipiente de reacción y se adicionó piperidina al 20% en DMF hasta cubrir las. Se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 10 minutos. El procedimiento se realizó dos veces descartando las soluciones en cada paso. Posteriormente, la resina se lavó tres veces con DMF (1 min), una vez con IPA (1 min), una vez con azul de bromofenol (2 min) para monitorear el acople (azul indica presencia de aminas libres, amarillo-café indica ausencia de amina libre), dos veces con DMF (1 min), y dos veces con diclorometano (1min) (Guzmán *et al.*, 2021).

### 6.4.3 Acoples

El acoplamiento se realizó con 5:5:5:10 equivalentes de aminoácido protegido: activador: Oxima: DIPEA. Se realizó un primer acople utilizando botellas plásticas etiquetadas, y de cada aminoácido se agregó el volumen indicado en el archivo de síntesis. A continuación, se agregó el activador TBTU. Cada paso fue realizado por dos profesionales para garantizar la supervisión y doble chequeo en la preparación de los aminoácidos, tal como está estipulado en los POEs del Laboratorio de Péptidos del NBC (Guzmán *et al.*, 2021).

Se hizo la distribución de las bolsas en las botellas plásticas que contienen aminoácido y activador de manera horizontal en orden alfabético siguiendo las pautas de los POEs. Seguidamente, se introdujeron las bolsas en sus respectivos frascos, se agregó la base DIPEA, Oxima y se dejó en agitación por 2 horas (Guzmán *et al.*, 2021).

Se realizó un doble acople con un activador distinto al utilizado en el primer acople (HBTU), para asegurar el acoplamiento del aminoácido en la secuencia. En algunos casos fue necesario realizar un tercer acople con HCTU o DIC.

### 6.4.4 Clivaje

Finalizada la elongación del péptido, se realizó el procedimiento de clivaje con ácido trifluoroacético/agua/trihidroxipropilsilano (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS) (95:2.5:2.5) en tubos de 15 mL con el fin de desanclarlo de la resina y quitar todos los grupos protectores de las cadenas laterales. Una vez incorporada la solución de clivaje, se dejaron en agitación durante tres horas, luego se precipitó con 3 mL de éter frío. La resina queda en las bolsas y el péptido precipita. La aparición de un

sólido blanco lechoso correspondiente al péptido. Se centrifugó a 7000 rpm por 15 minutos a 4 °C lavando sucesivamente con éter. El sólido obtenido fue secado, disuelto en agua y finalmente liofilizado.

#### **6.4.5 Desalinización**

La desalinización de los péptidos se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando un gel Sephadex G10 como matriz en una columna cromatográfica. Después de disolver aproximadamente 10 mg de péptido en 700 µL de agua ultrapura y centrifugar, se introdujo el péptido disuelto en la columna y se eluyó con 2 mL de agua. Los péptidos eluidos se recolectaron y finalmente se liofilizaron utilizando un liofilizador Labconco FreeZone (Labconco Corporation, Kansas City, Estados Unidos).

#### **6.4.6 Purificación mediante extracción en fase sólida (SPE)**

Se utilizaron columnas Waters SepPak C-18 que contienen una fase sólida de gel de sílice C-18 que permite purificar péptidos entre 1000 y 6000 Da cuando se eluye con porcentajes ascendentes de acetonitrilo en agua. Las moléculas hidrofílicas eluyen a porcentajes bajos de acetonitrilo y las más hidrofóbicas eluyen con el incremento en el porcentaje de acetonitrilo. Con este procedimiento se separan péptidos de diferente hidrofobicidad, contaminantes del péptido de interés, y péptidos con grupos protectores que podrían haber quedado en la síntesis (Guzmán *et al.*, 2021).

Cada columna de 500 mg se activó con 2 mL de metanol (grado HPLC) por gravedad. Posteriormente, se retiró el metanol de la columna con 2 mL de agua ultra. Cada péptido se disolvió en menos de 1 mL de agua ultra pura y se pasó cuatro veces por la columna para asegurar su retención en la misma. Para la elución, se utilizó acetonitrilo (grado HPLC) acuoso en concentraciones de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 60% y 100%. Posteriormente, el acetonitrilo de cada una de las eluciones fue evaporado por centrifugación en un concentrador al vacío SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Asheville, Estados Unidos).

#### **6.4.7 Congelación y liofilización de péptidos**

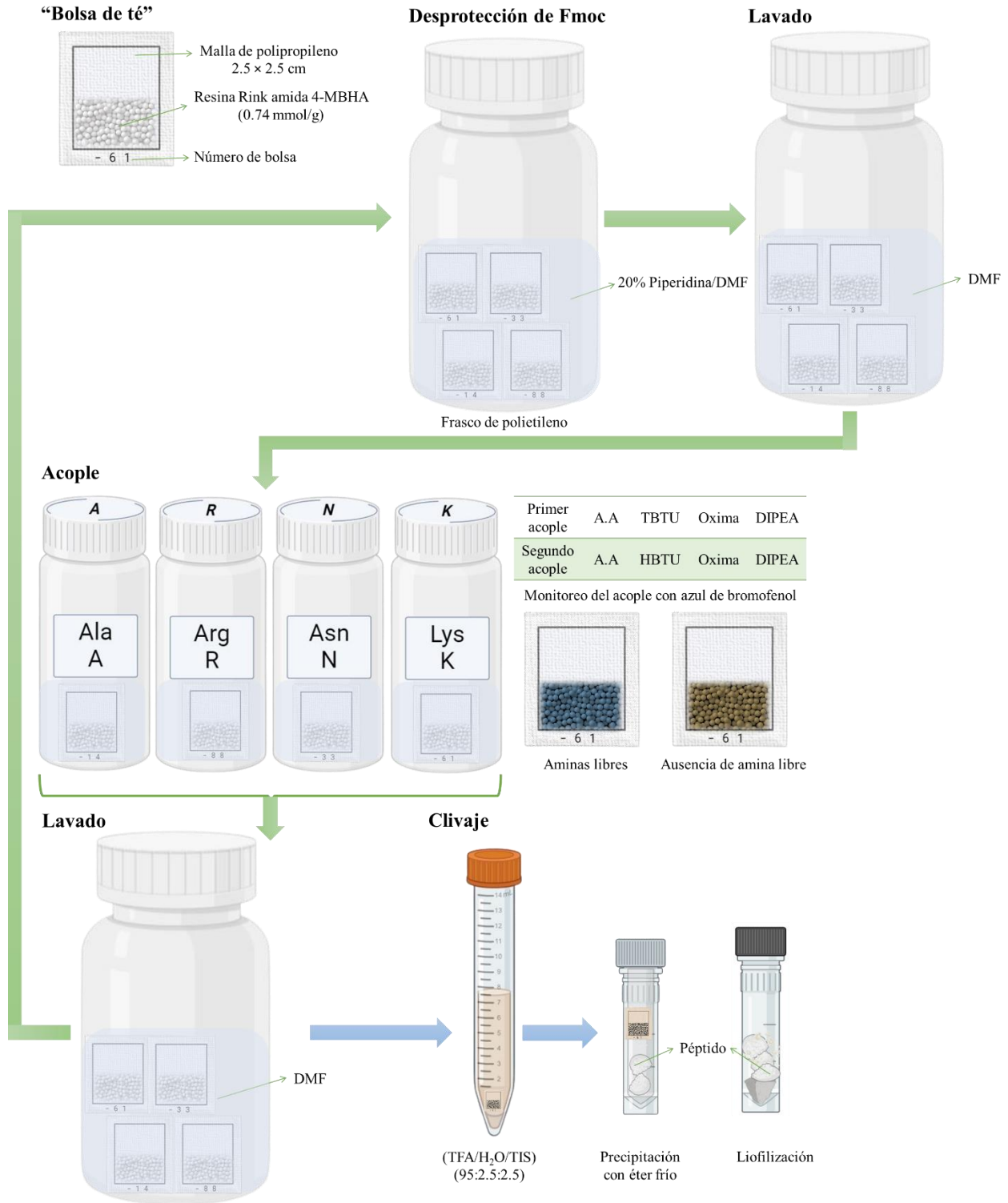
Los péptidos, una vez desalinizados y purificados, fueron congelados rápidamente utilizando nitrógeno líquido. Esta congelación rápida permite la formación de pequeños cristales de agua, los cuales no representan riesgo para la integridad del péptido, a diferencia de lo que podría ocurrir con una congelación lenta. Además, este proceso protege al péptido de posibles daños microbiológicos causados por bacterias u hongos. Posteriormente, los péptidos fueron liofilizados utilizando un Liofilizador Labconco FreeZone. (Labconco Corporation, Kansas City, Estados Unidos).

### **Figura 8**

*Metodología para síntesis de péptidos.* Las flechas verdes señalan el ciclo iterativo. Las flechas azules corresponden al paso final de clivaje. Adaptado de (Guzmán *et al.*, 2023). Creado con BioRender. Puede encontrar más información del procedimiento en el siguiente vídeo interactivo

de 360°: <http://ejbiotechnology.info/public/360view/2023/VTPCARDENAS1v1/index.html>.

(Guzmán *et al.*, 2023).



## 6.5 Caracterización físico-química de péptidos

### 6.5.1 *Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS)*

Se utilizó la técnica de LC-MS para determinar el peso molecular (PM) de los péptidos sintéticos y así comprobar su identidad. El equipo empleado fue un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de Masas LCMS-2020 Shimadzu, compuesto por: sistema binario de bombas LC-20AD Shimadzu; autosampler SIL-20A HT Shimadzu; módulo de comunicación CBM-20A Shimadzu; detector de arreglo de diodos SPD-M20A Shimadzu; horno de columna CTO-20AC; bomba de alto vacío Edwards E2M28; lámpara de deuterio Shimadzu; generador de nitrógeno Mistral LCMS V-1; software Lab Solutions v5.42 SP3 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón). El tipo de ionización empleado fue electrospray (ESI). La muestra se ionizó por aplicación de voltaje de 3-5kV y pasó por un nebulizador generando micro-gotas, las cuales se someten a temperaturas de 200-250°C. El solvente, al evaporarse, concentra los iones cargados hasta que ocurre una explosión coulombica por repulsión de cargas, y los iones ahora en estado libre entran por vacío al analizador de masas (cuadrupolo) y llegan al detector de masas. La señal que generan es intensidad de corriente y una misma muestra puede generar un espectro con varias señales si tiene grupos ácidos o básicos (sitios de protonación/deprotonación) múltiples. Cada señal representa una relación masa/carga ( $m/z$ ) en donde el peso molecular original está dividido por la carga (+1, +2, +3, -1, -2, -3, etc).

Se tomaron entre 0.1 – 0.5 mg de cada péptido sintético y se disolvieron en agua ultra pura a 1 mg/mL. Las muestras se corrieron según los parámetros establecidos por el Laboratorio de

Péptidos del NBC en sus POEs de la siguiente manera: la fase móvil fue ácido fórmico al 0.1% en agua (A) y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (B); la condición inicial de gradiente fue 100% de A cambiando linealmente a 100% de B en 12 min, y el volumen de inyección fue 10  $\mu$ L. La longitud de onda del detector de arreglo de diodos fue de 214 nm. Todos los espectros de masas se obtuvieron en el rango de  $m/z$  100 – 1900.

### **6.5.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC)**

Se realizó cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) para evaluar la pureza de los péptidos ya que esta técnica permite la separación de moléculas en solución con base a su hidrofobicidad. Para lograrlo, se utilizó una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. De esta forma, los péptidos polares eluyen primero que los no polares, dado que tienen un menor grado de interacción en comparación con los hidrofóbicos (no polares). El equipo empleado fue un HPLC JASCO (Jasco Corporation, Tokio, Japón) compuesto por: muestreador automático AS-2055 Plus; bomba cuaternaria PU-2089 Plus; detector UV-Visible UV-2075 Plus; interfase con capacidad para cuatro canales LC-Net II/ADC, columna Waters C-18 (tamaño de partícula 3.5  $\mu$ m y dimensiones 4.6 mm x 100 mm) como fase estacionaria. Las muestras fueron diluidas a razón de 1 mg/mL de péptido en agua ultra pura y corridas a un flujo de 1 mL/min con una fase móvil constituida por: (A) acetonitrilo (ACN) con ácido trifluoroacético (TFA) 0.05% (v/v), y (B) H<sub>2</sub>O con 0.05% (v/v) de (TFA). Se utilizó un método en gradiente de 0-70% (v/v) de ACN durante 8 minutos; volumen de inyección 100  $\mu$ L; la detección fue monitoreada a una longitud de onda de 214 nm.

### 6.5.3 Dicroísmo circular (DC)

El análisis por dicroísmo circular se llevó a cabo en un espectrómetro JASCO J-815 CD (Jasco Corporation, Japón) provisto con un dispositivo de control de temperatura Peltier Jasco CDF-426S/15 (Jasco Corporation, Japón). El espectro se obtuvo a 20 °C en un rango de longitud de onda entre 190-260 nm usando una celda rectangular con paso óptico de 0.1 mm. Cada espectro fue obtenido como un promedio de tres escáneres tomados a una velocidad de 20 nm/min, con un ancho de banda espectral de 1 nm. El perfil de DC fue registrado utilizando 200 µL de disolución acuosa del péptido a una concentración de 0.1 mM en 30% TFE (2,2,2-trifluoroetanol) para estabilizar la estructura del péptido favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno intramolecular. Los resultados fueron expresados como el grado de elipticidad según lo reportado por Brahms & Brahms (Brahms & Brahms, 1980).

### 6.6 Scan de alanina

El scan de alanina es un método que permite evaluar la importancia de cada aminoácido en la estructura y actividad biológica del péptido. En este método, se sustituyen sistemáticamente los aminoácidos del péptido por alanina y luego se evalúa el impacto de estas sustituciones en la estructura y función del péptido (Carvajal-Rondanelli *et al.*, 2018; Santos-Filho *et al.*, 2022). Se empleó la misma metodología para la síntesis, purificación y caracterización de los péptidos correspondientes al scan de alanina.

**Objetivo específico 3:** Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados químicamente.

## 6.7 Actividad antimicrobiana

Para determinar la actividad antimicrobiana de los péptidos frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli* se estimó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo de acuerdo al procedimiento estándar CLSI-M07-A11 (Patel *et al.*, 2015) teniendo en cuenta las consideraciones establecidas por Cruz y colaboradores (Cruz *et al.*, 2014).

Las cepas empleadas fueron: *S. aureus* CMPUJ015 (SARM) y *E. coli* CMPUJ (O157:H7) donadas por la Pontificia Universidad Javeriana de Colombia (institución certificada perteneciente a la Federación Mundial de Colección de Cultivos - *World Federation of Culture Collection*). *S. aureus* ATCC 25933 y *E. coli* ATCC 25922 fueron proporcionadas por la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 43888 fueron adquiridas comercialmente (Microbiologics, Saint Cloud, Estados Unidos).

Se eligieron las cepas Gram positivas *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* ATCC 25933 por ser estándares de referencia tanto en investigación como en otras áreas de la microbiología. *S. aureus* ATCC 43300 resistente a meticilina y oxacilina es portadora del *SCCmec* tipo II (cassette cromosómico estafilocócico). *S. aureus* ATCC 29213 sensible a meticilina es un aislado clínico que se utiliza como estándar de control de calidad en pruebas de laboratorio. *S. aureus* 25923 se emplea en el control de calidad para pruebas de difusión en disco CLSI. La cepa Gram negativa *E. coli* ATCC 43888 es serotipo O157:H7. *E. coli* ATCC 25922 se

emplea en el control de calidad para pruebas de difusión en disco CLSI. Todas las cepas son BSL2 (Nivel de Bioseguridad 2), por lo que se cultivaron y mantuvieron cumpliendo todas las medidas establecidas en la cuarta edición del Manual de Bioseguridad de la OMS (OMS, 2020).

Los medios de cultivo Luria Bertani (LB), Infusión Cerebro Corazón (BHI), peptona y agar bacteriológico fueron obtenidos de Oxoid (Hampshire, Reino Unido). Las microplacas estériles de polipropileno de 96 pozos de fondo plano con tapa fueron adquiridas de Biologix (Shandong, China). Todos los ensayos de actividad antimicrobiana fueron realizados empleando agua MilliQ de resistividad  $18.2 \Omega$  obtenida del equipo Smart2 Pure de Thermo Scientific (Helsinki, Finlandia).

En primer lugar, se hizo un cribado (*screening*) de la actividad antimicrobiana de los péptidos a una concentración de  $50 \mu\text{M}$ . La revisión bibliográfica indica que los PAMs antibacterianos presentan actividad inhibitoria en un rango entre  $0.5$  y  $50 \mu\text{M}$  (Cruz *et al.*, 2014; Kriswandini, 2014; Prada *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2013). Por lo tanto, se seleccionaron aquellos péptidos que tuvieron mejor actividad biológica a una concentración inferior a  $50 \mu\text{M}$ . Los péptidos seleccionados se evaluaron a concentraciones de  $5 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $20 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$ ,  $40 \mu\text{M}$  y  $50 \mu\text{M}$  con el fin de determinar la  $\text{CMI}_{50}$ . Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas para cada ensayo. La  $\text{CMI}_{50}$  fue la menor concentración de péptido que produjo una inhibición del 50% en el crecimiento de la bacteria. En segundo lugar, se realizó un *screening* a  $30 \mu\text{M}$  de la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos producto del scan de alanina de aquellos seleccionados en la primera etapa y se determinó la  $\text{CMI}_{50}$  de los que presentaron mejor actividad. El proceso se describe a continuación y se resumen en la Figura 9.

### **6.7.1 Reactivación de los microorganismos a evaluar**

Se realizó una reactivación de los microorganismos a evaluar consistente en un repique por agotamiento en agar de infusión cerebro corazón (BHI) y su incubación a 37 °C por 16-24 horas.

### **6.7.2 Inóculo**

El inóculo fue de  $5 \times 10^5$  UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro) a partir de una suspensión a 0.5 en la escala Mcfarland (densidad óptica entre 0.08 y 0.12) realizando una medición en lector de microplacas a 595 nm. Las lecturas se realizaron mediante un espectrofotómetro Multiskan SkyHigh Thermo Scientific (Waltham, Estados Unidos). Como medio de cultivo se emplearon caldo Mueller-Hinton (MH) para las cepas Gram positivas y Luria-Bertani (LB) para las Gram negativas (Cruz *et al.*, 2014).

### **6.7.3 Montaje de la microplaca**

Se prepararon soluciones de péptido a diferentes concentraciones iniciales en un volumen de 100  $\mu$ L. Estas se mezclaron en partes iguales con el inóculo obteniendo las concentraciones finales deseadas de 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 40  $\mu$ M y 50  $\mu$ M. Las microplacas se incubaron por 24 horas a 37 °C con agitación constante a 200 rpm. Se midió el crecimiento bacteriano en intervalos de una hora durante un período de 8 horas y una lectura a las 24 horas utilizando un espectrofotómetro Multiskan SkyHigh Thermo Scientific (Waltham, Estados Unidos) a una

longitud de onda de 595 nm. Se realizó control de crecimiento y se usó el péptido sintético 1951 (BTM-P1) como control de inhibición (Segura *et al.*, 2007). El péptido 1951 fue proporcionado por el Laboratorio de Síntesis de Péptidos del NBC de la PUCV. En la Figura 9 se resumen los pasos para la evaluación de actividad antimicrobiana.

#### 6.7.4 *Análisis de datos*

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

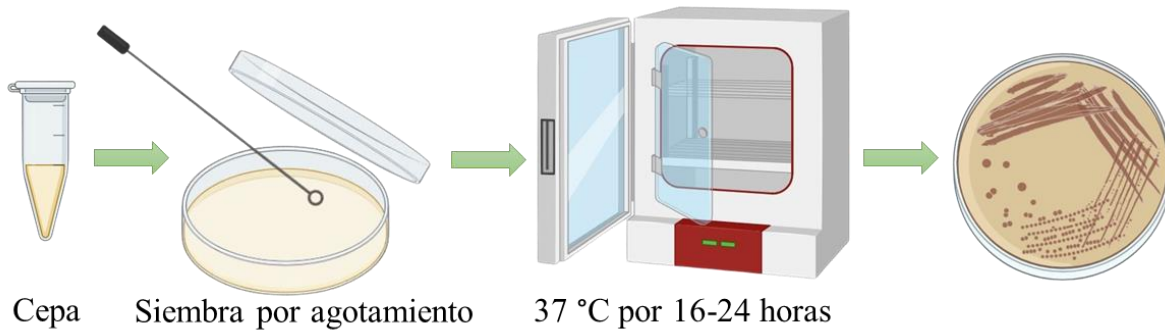
$$\% \text{ inhibición} = \frac{D.O_{595} \text{ control} - D.O_{595} \text{ muestra}}{D.O_{595} \text{ control} - D.O_{595} \text{ blanco}} \times 100$$

El control es de crecimiento y la muestra el inóculo con péptido. Para todos los experimentos se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas. Los resultados se expresaron como la media de tres valores  $\pm$  desviación estándar. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 8 (Dotmatics, Boston, Estados Unidos). Para determinar el nivel de significancia estadística se utilizó el análisis de varianza unidireccional (ANOVA).

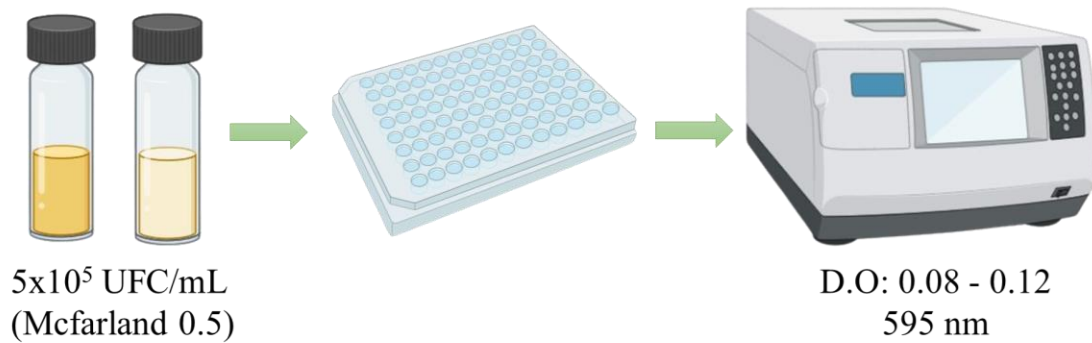
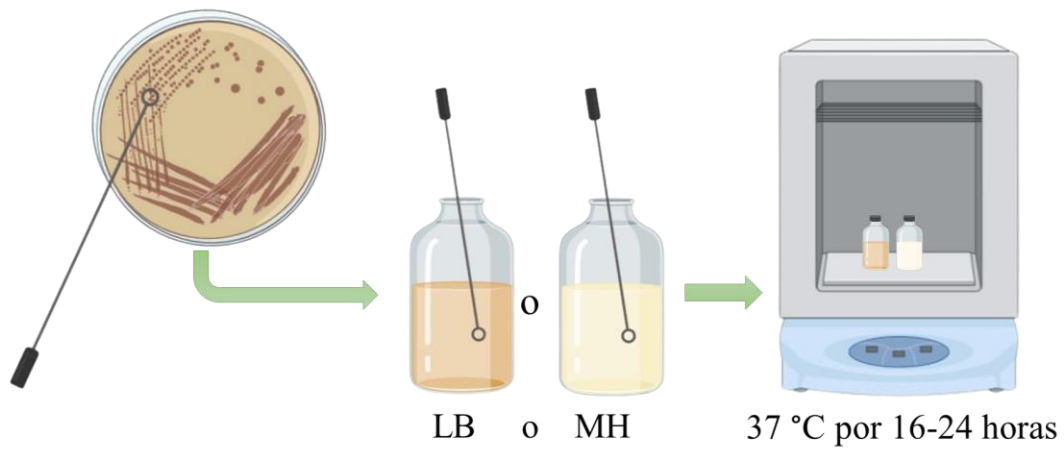
#### **Figura 9**

*Metodología para evaluación de actividad antimicrobiana.* MH: Mueller-Hinton. LB: Luria-Bertani. D.O: Densidad óptica. Creado con BioRender.





**Repique**

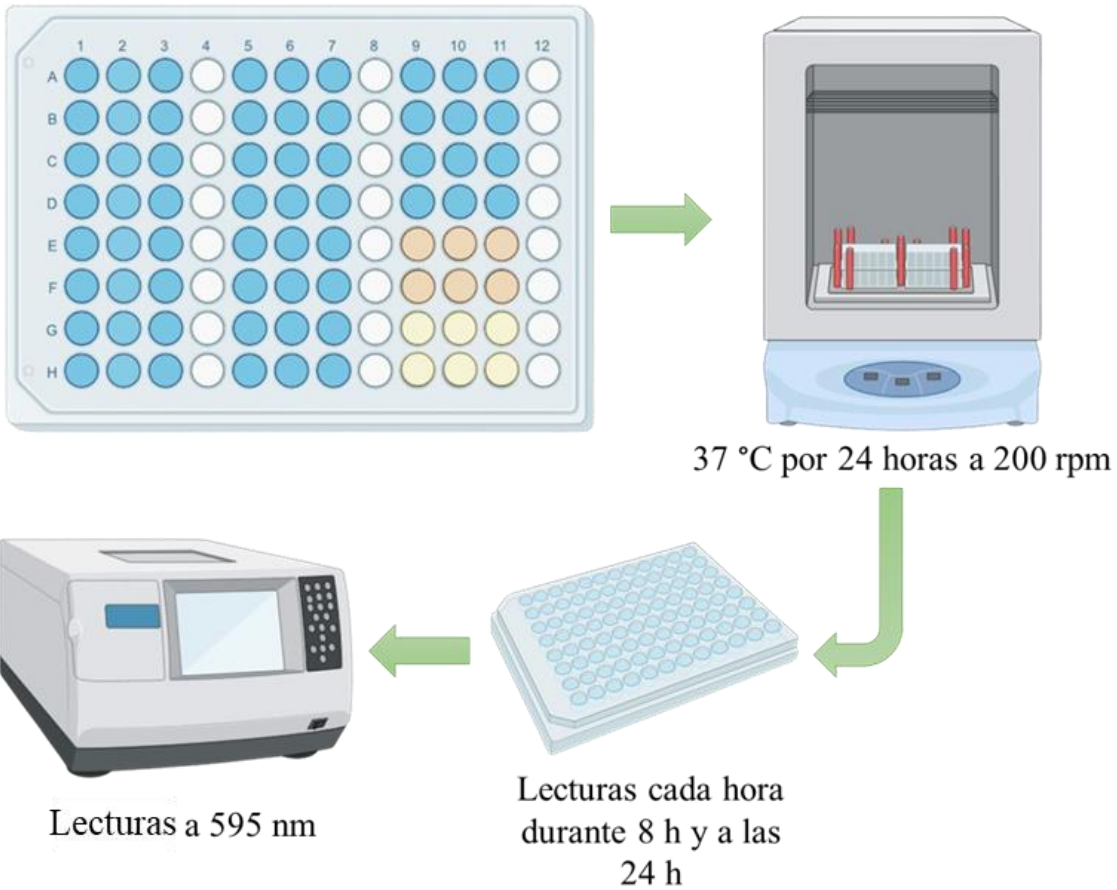


**Inóculo**



**Montaje de la microplaca**

-  Péptido: 100  $\mu$ L inóculo + 100  $\mu$ L péptido
-  Blanco: 100  $\mu$ L medio + 100  $\mu$ L péptido
-  Control crecimiento: 100  $\mu$ L inóculo + 100  $\mu$ L Agua peptonada 0,1%
-  Control medio: 100  $\mu$ L medio + 100  $\mu$ L Agua peptonada 0,1%



**Objetivo específico 4:** Determinar la actividad hemolítica y citotóxica de los péptidos que tengan actividad antimicrobiana mediante experimentación *in vitro*.

## 6.8 Actividad citotóxica

La viabilidad celular se determinó empleando el método colorimétrico de MTT (Sal de bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio) descrito por (Mosmann, 1983), en donde las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio (amarilla) formando cristales de formazan (violeta) solubles en dimetilsulfóxido (DMSO).

Las líneas celulares evaluadas fueron: Vero (ATCC CCL-81) y HaCat (ATCC CRL-4048) adquiridas comercialmente por el proveedor Microbiologics (Saint Cloud, Estados Unidos). Estas líneas celulares bien caracterizadas en la investigación biomédica también han sido empleadas para la evaluación del efecto de péptidos derivados de la hemoglobina de reptiles frente a células de mamíferos (Sosiangdi *et al.*, 2023).

El medio de cultivo DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) fue obtenido de Lonza Walkersville, Inc. (Maryland, Estados Unidos), enriquecido con 10% SBF (Fluido corporal simulado - *Simulated Body Fluid*) (Lonza Walkersville, Inc. Maryland, Estados Unidos) y mezcla de penicilina-estreptomicina 1X (PenStrep 1X) adquirido de Lonza Walkersville, Inc. Maryland, Estados Unidos). Las microplacas estériles de polipropileno de 96 pozos de fondo plano con tapa fueron adquiridas de la casa comercial Biologix (Shandong, China). Todos los ensayos fueron realizados empleando agua MilliQ de resistividad 18.2  $\Omega$  obtenida mediante el equipo Smart2 Pure de Thermo Scientific (Helsinki, Finlandia).

Se cultivaron células Vero y HaCat en placas de 96 pozos (5000 células/pozo que equivalen a una confluencia celular del 80%) con 200  $\mu$ L de medio DMEM suplementado con 10% SBF y PenStrep 1X y se incubaron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas para total adherencia. Luego, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 200  $\mu$ L de soluciones de péptido en medio DMEM a concentraciones de 6.25  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M por triplicado. Tras 48 horas de exposición se descartaron las soluciones y se añadió solución de MTT (500  $\mu$ g/mL en buffer PBS 1X), seguido de una incubación de 3 horas a 37 °C. Luego, se añadió DMSO para solubilizar los cristales formados y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Finalmente, a cada valor de absorbancia se restó el blanco (DMSO) y se calculó el porcentaje de viabilidad de acuerdo a la siguiente ecuación:

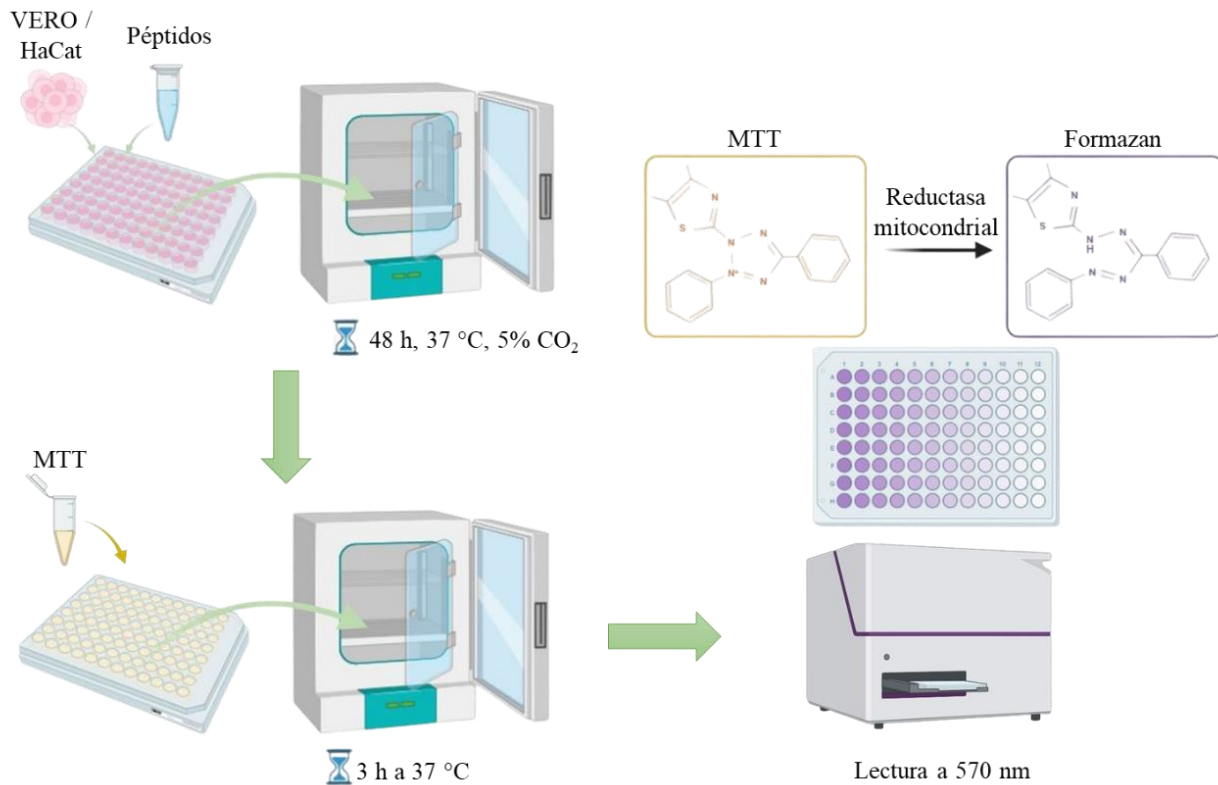
$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{D.O_{570} \text{ muestra}}{D.O_{570} \text{ control}} \times 100$$

Donde la muestra son las células con péptidos y el control son las células sin péptido. Los resultados para cada péptido se reportaron como Concentración Citotóxica (CC<sub>50</sub>), que indica la concentración a la que un compuesto es capaz de inhibir el crecimiento celular en un 50%.

El Índice de Selectividad (IS) fue calculado con base a la relación de la CC<sub>50</sub> y la Concentración Mínima Inhibitoria 50 (CMI<sub>50</sub>), esto es CC<sub>50</sub>/CMI<sub>50</sub>. El IS es una medida importante en la evaluación de la actividad biológica de un péptido. Un IS alto indica que el péptido tiene una alta actividad antibacteriana pero una baja toxicidad hacia las células de mamíferos. En la Figura 10 se muestra un esquema de la metodología para la evaluación de actividad citotóxica.

**Figura 10**

*Metodología para evaluación de actividad citotóxica.* MTT (Sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio). Creado con BioRender.



## 6.9 Actividad hemolítica

Se determinó la actividad hemolítica de los péptidos según el protocolo establecido por el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) (Cruz *et al.*, 2014; Prada *et al.*, 2016). Se obtuvieron eritrocitos humanos a partir de muestras de sangre donadas por el

Hemocentro de Santander. Las células se lavaron tres veces en tampón fosfato 1 mM a pH 7.0. Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ L de esta suspensión en tubos Eppendorf y 100  $\mu$ L de diluciones seriadas de los péptidos con concentraciones de 7.5  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M y 120  $\mu$ M. Después de una hora de incubación a 37 °C, los tubos se centrifugaron a 550 g durante 5 min, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 550 nm. Posteriormente, se adicionó Tritón X-100 al 0.1 % para conseguir una hemólisis total y se midió la absorbancia a 550 nm.

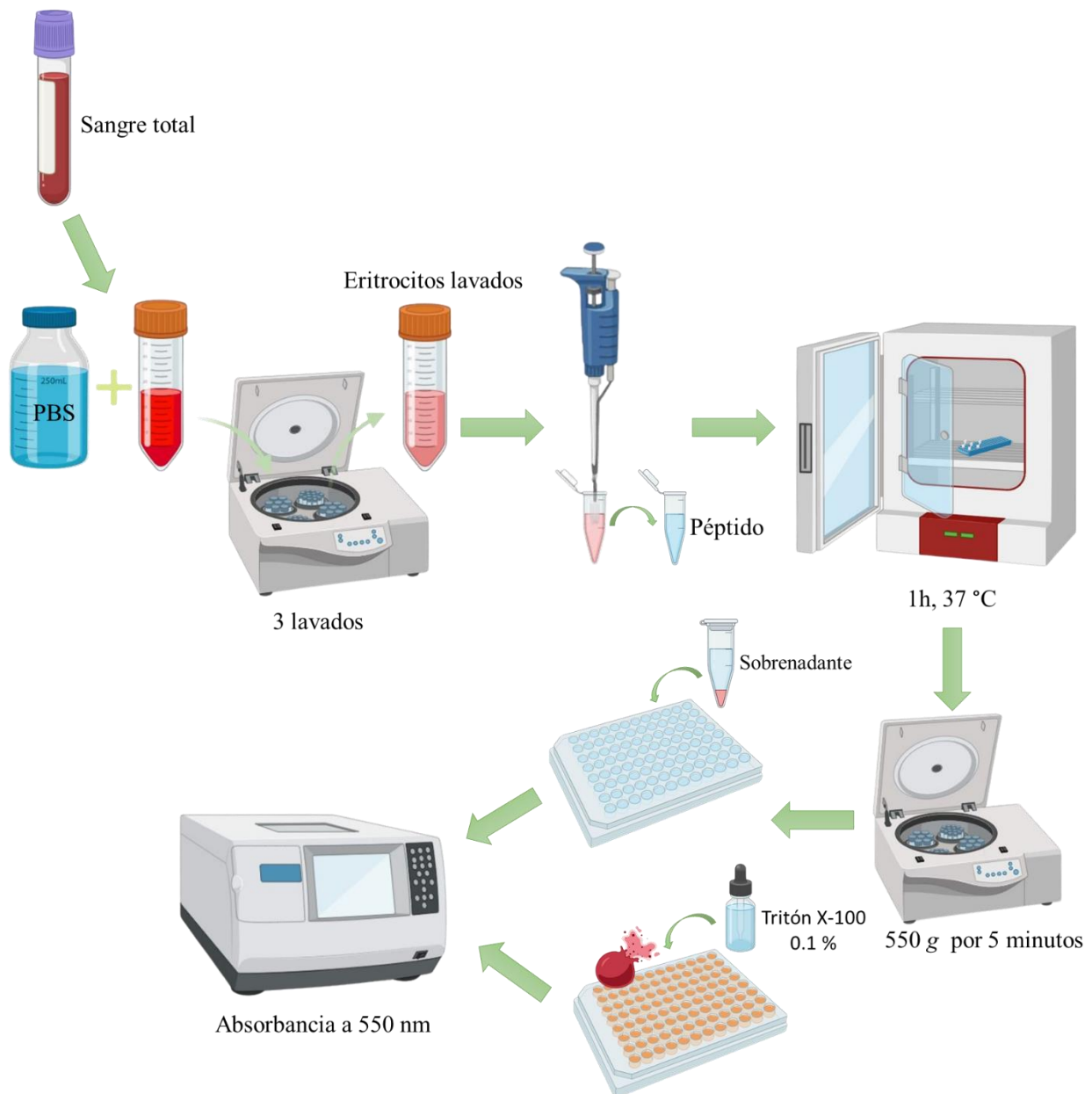
El porcentaje de hemólisis se obtuvo calculando la relación entre la absorbancia de las muestras incubadas con los péptidos y la absorbancia de la muestra luego de adicionar Tritón X-100 al 0.1 %, según la ecuación:

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{D.O_{550} \text{ muestra} - D.O_{550} \text{ blanco}}{D.O_{550} \text{ control} - D.O_{550} \text{ blanco}} \times 100$$

Donde el blanco es la absorbancia en ausencia completa de hemólisis y el control es la absorbancia de los eritrocitos lisados completamente en Tritón X-100 al 0.1 %. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. En la Figura 11 se muestra un esquema de la metodología para la evaluación de actividad hemolítica.

**Figura 11**

*Metodología para evaluación de actividad hemolítica. PBS: tampón fosfato 1 mM a pH 7.0.*



## 7 Resultados y discusión

**Objetivo específico 1:** Obtener secuencias de péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* con potencial antimicrobiano empleando herramientas bioinformáticas.

### 7.1 Análisis de secuencias

Se encontraron, mediante BLASTp, 21 regiones de la hemocianina de gasterópodos terrestres con identidad > 80% con los péptidos identificados de la secreción mucosa de *A. fulica* (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Regiones de la hemocianina de gasterópodos terrestres con identidad >80% con los péptidos identificados en la secreción mucosa de A. fulica.* En negrita se señalan las secuencias identificadas por espectrometría de masas. Sin negrita y de forma alfanumérica se muestran las secuencias de otras regiones de la hemocianina.

<b>N°</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Origen</b>	<b>Identidad (%)</b>
<b>1</b>	NIYSRPADTFDYRNN	Hemocyanin alphaD ( <i>Cornu aspersum</i> )	100
<b>2</b>	HRLLVQAENALRKH	Hemocyanin alphaD ( <i>Cornu aspersum</i> )	100
<b>2a</b>	HRLLVVQVEDALR		84

<b>2b</b>	HRLYTVQFEDALRRH		80
<b>3</b>	LMRKPLQPFQDKTLN	Hemocyanin alphaD ( <i>Cornu aspersum</i> )	100
<b>3a</b>	LRKPLPPF		87
<b>4</b>	FRLHGIGVSADVRVK	Hemocyanin alphaD ( <i>Cornu aspersum</i> )	100
<b>4a</b>	FLLHGIGASADV		83
<b>5</b>	GGEREMPWAYERLFK		100
<b>5a</b>	EMPWAFDRLYK		100
<b>5b</b>	EMEWSYDRLYK	Hemocyanin alphaD ( <i>Cornu aspersum</i> )	81
<b>5c</b>	GGELEMPFTFDRLYK		80
<b>5d</b>	PWAFDRLFK		100
<b>6</b>	LMRKPLQPFQDKKLN	Hemocyanin alphaD ( <i>Helix pomatia</i> )	100
<b>7</b>	HRYSRPADTFDYRNH		100
<b>7a</b>	SRPEDTFNYADH	Hemocyanin 1 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	83
<b>7b</b>	FDYRN		100
<b>8</b>	NSRAIDAFDYDRLNY		100
<b>8a</b>	NSRAIDAFDYDRFNY	Hemocyanin 1 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	93
<b>8b</b>	NSRAIDAFDYDRFNY		93
<b>9</b>	LFKYDVTNVFNKLN	Hemocyanin 1 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	100
<b>10</b>	GGEKEMPWAYERIMK		100
<b>10a</b>	GGPSEMPWAFDR	Hemocyanin 1 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	83
<b>10b</b>	EMPWAFDRLFK		81
<b>10c</b>	EMPWAFSR		87
<b>11</b>	SGRVEFEHVDTERDV	Hemocyanin alphaN ( <i>Helix lucorum</i> )	100

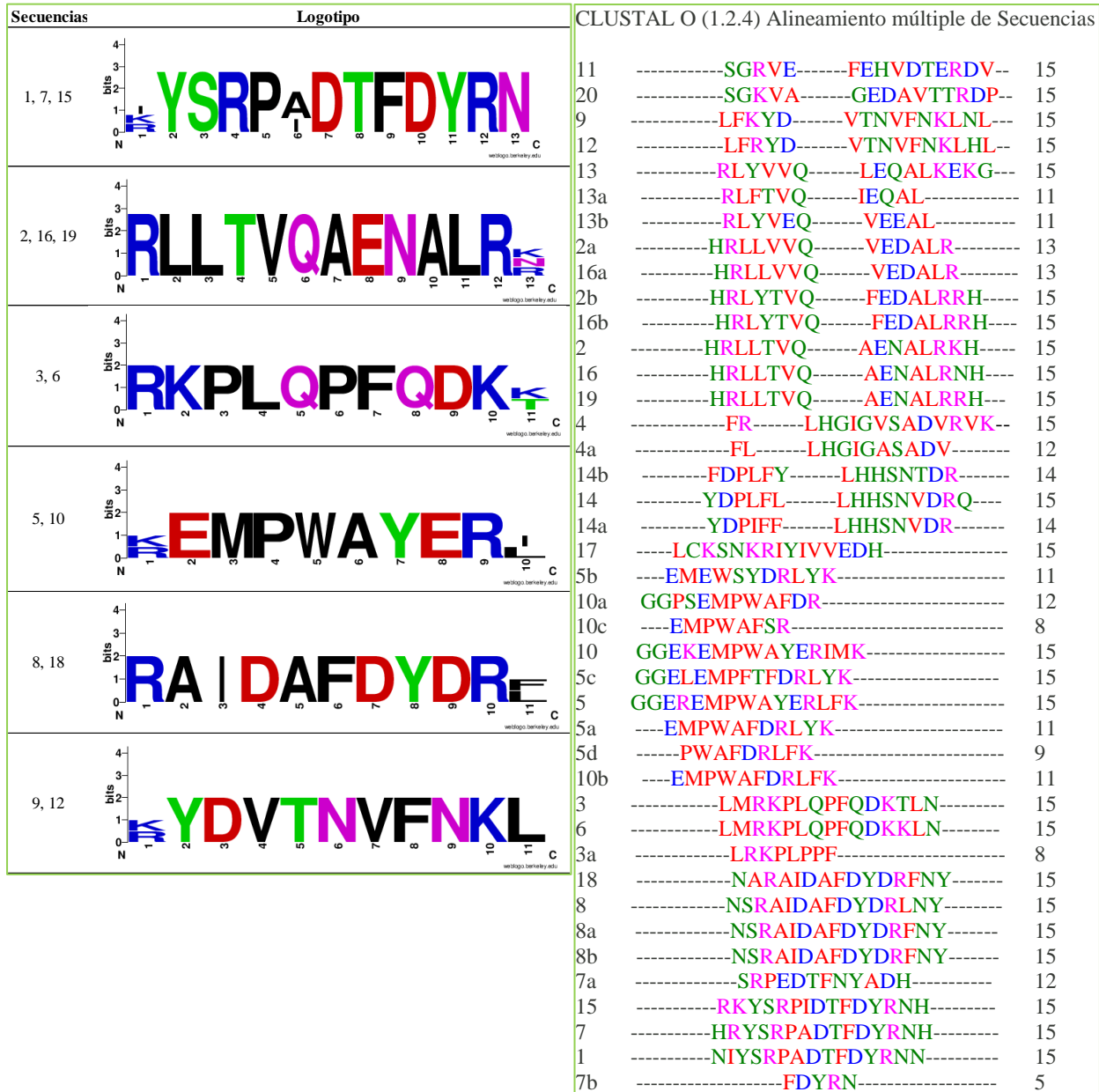
<b>12</b>	LFRYDVTNVFNKLHL	Hemocyanin alphaN ( <i>Helix lucorum</i> )	100
<b>13</b>	RLYVVQLEQALKEKG		100
<b>13a</b>	RLFTVQIEQAL	Hemocyanin 1 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	81
<b>13b</b>	RLYVEQVEEAL		81
<b>14</b>	YDPLFLLHHSNVDRQ		100
<b>14a</b>	YDPIFFLHHSNVDR	Hemocyanin 1 ( <i>Lymnaea stagnalis</i> )	85
<b>14b</b>	FDPLFYLLHHSNTDR		85
<b>15</b>	RKYSRPIDTFDYRNH	Hemocyanin alphaD ( <i>Cornu aspersum</i> )	100
<b>16</b>	HRLLTVQAENALRNH		100
<b>16a</b>	HRLLVVQVEDALR	Hemocyanin alphaD ( <i>Cornu aspersum</i> )	84
<b>16b</b>	HRLYTVQFEDALRRH		80
<b>17</b>	LCKSNKRIYIVVEDH	Hemocyanin alphaD ( <i>Cornu aspersum</i> )	100
<b>18</b>	NARAIDAFDYDRFNY	Hemocyanin 1 ( <i>Aplysia californica</i> )	100
<b>19</b>	HRLLTVQAENALRRH	Hemocyanin 1 ( <i>Aplysia californica</i> )	100
<b>20</b>	SGKVAGEDAVTTRDP	Hemocyanin alphaD ( <i>Cornu aspersum</i> )	100

El alineamiento con Clustal Omega junto con los logotipos de secuencia (<https://weblogo.berkeley.edu/>) permitieron identificar patrones en los péptidos (Figura 12). Los logotipos de secuencia son una representación gráfica del alineamiento múltiple. Cada logotipo consta de pilas de símbolos, una pila para cada posición en la secuencia. La altura total de la pila indica la conservación de la secuencia en esa posición, mientras que la altura de los símbolos dentro de la pila indica la frecuencia relativa de cada amino en esa posición. El alineamiento

mediante CAMPSing indicó que las secuencias no están relacionadas con las 45 familias de PAMs registradas en la base datos CAMP.

### **Figura 12**

*Alineamiento múltiple y logotipos de secuencia.* Alineamiento múltiple realizado con CLUSTAL Omega y logotipos con Weblogo (<https://weblogo.berkeley.edu/>).



## 7.2 Diseño de análogos

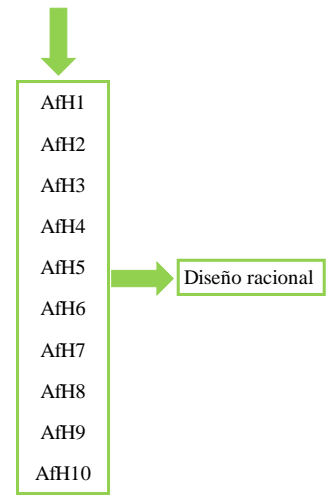
Con el fin de seleccionar diez secuencias para el diseño racional se hizo un proceso de selección con base en los resultados del alineamiento múltiple y la probabilidad de ser PAMs (PAP) por el algoritmo VSM de CAMP (Figura 13). En el primer filtro se seleccionaron 22

secuencias con mayor probabilidad de ser PAM, seguido de una nueva evaluación y alineamiento. En el segundo filtro se seleccionaron diez secuencias considerando tanto su PAP como la diversidad entre ellas.

### **Figura 13**

*Cribado de secuencias con base en el alineamiento múltiple y PAP.* En amarillo se resaltan las secuencias seleccionadas en cada ronda. Los péptidos seleccionados para diseño racional fueron nombrados como “AfH” (“*Achatina fulica* Hemocianina”) y un número consecutivo del 1 al 10. PAP: Probabilidad de ser PAM. Los diez péptidos seleccionados fueron aquellos que presentaron la mayor probabilidad de ser PAMs y que sus secuencias fueran distintas entre sí.

Alineamiento múltiple CLUSTAL O			Alineamiento múltiple CLUSTAL O			Alineamiento múltiple CLUSTAL O		
Seq. ID	Secuencia	PAP (%)	Seq. ID	Secuencia	PAP (%)	Seq. ID	Secuencia	PAP (%)
11	SGRVEFEHVDTERDV	0.6	9	LFKYDVTNVFNKLN	34.6	4	FRLHIGVSADVVRK	33.8
20	SGKVAGEDAVTRDP	2.5	12	LFRYDVTNVFNKLN	11.4	4a	FLLHGIGASADV	45.1
9	LFKYDVTNVFNKLN	34.6	2	HRLTVQAENALRKH	12.1	6	LMRKP-LQPFQDKLN	18.7
12	LFRYDVTNVFNKLN	11.4	19	HRLTVQAENALRRH	15.1	8	NSRAIDAFDYDRLNY	17.8
13	RLYVQLEQALKEKG	24.5	2a	HRLLVVQVEDALR	13.2	9	LFKYDVTNVFNKLN	34.6
13a	RLFTVQIEQAL	11.8	16a	HRLLVVQVEDALR	13.2	10	GGEKEMPWAYERIMK	77.5
13b	RLYVEQVEEAL	36.0	13	RLYVQLEQALKEKG	24.5	13	RLYVQLEQALKEKG	24.5
2a	HRLLVVQVEDALR	13.2	13b	RLYVEQVEEAL	36.0	15	RKYSRPIDTFDYRNH	25.7
16a	HRLLVVQVEDALR	13.2	3a	LR-KPLPF	46.9	17	LCKSNKRIYIVVEDH	23.6
2b	HRLYTVQFEDALRRH	6.9	6	LMR-KPLPFQDKLN	18.7	19	HRLTVQAENALRRH	15.1
16b	HRLYTVQFEDALRRH	6.9	8	NS-RAIDAFDYDRLNY	17.8			
2	HRLTVQAEANALRRH	12.1	18	NA-RAIDAFDYDRFNY	11.9			
16	HRLTVQAEANALRNH	8.4	7	HRYS-RPADTFDYRNH	4.4			
19	HRLTVQAEANALRRH	15.1	15	RKYS-RPIDTFDYRNH	25.7			
4	FLHIGIVSADVVRK	33.8	14a	YDPIFLHHSNVDR	11.1			
4a	FLHIGIASADV	45.1	4	FRLHIGIVSADVVRK	33.8			
14b	FDPLFYLHHSNTRD	5.3	4a	FLLHGIGASADV	45.1			
14	YDPLFLHHSNVDRQ	8.4	17	LCKSNKRIYIVVEDH	23.6			
14a	YDPIFFLHHSNVDR	11.1	5b	EMEWSYDRLYK	44.0			
17	LCKSNKRIYIVVEDH	23.6	5	GGEREMPWAYERLFK	33.6			
5b	EMEWSYDRLYK	44.0	10	GGEKEMPWAYERIMK	77.5			
10a	GGPEMPWAFDR	11.7	10c	EMPWAFSR	59.5			
10c	EMPWAFSR	59.5						
10	GGEKEMPWAYERIMK	77.5						
5c	GGELEMPFTDRLYK	10.1						
5	GGEREMPWAYERLFK	33.6						
5a	EMPWAFDRLYK	3.2						
5d	PWAFDRLFK	9.6						
10b	EMPWAFDRLFK	1.3						
3	LMRKLQPFQDKTLN	8.8						
6	LMRKLQPFQDKLN	18.7						
3a	LRKPLPF	46.9						
18	NARAIDAFDYDRFNY	11.9						
8	NSRAIDAFDYDRLNY	17.8						
8a	NSRAIDAFDYDRFNY	12.2						
8b	NSRAIDAFDYDRFNY	12.2						
7a	SRPEDTFNYADH	1.0						
15	RKYSRPIDTFDYRNH	26.7						
7	HRYSRPADTFDYRNH	4.4						
1	NIYSRPADTFDYRNN	2.7						
7b	FDYRN	0.0						



El alineamiento múltiple y PAP permitió reconocer características de las secuencias para compararlas y filtrarlas. La PAP del péptido 9 es tres veces mayor (34.6%) que la de péptido 12 (11.4%). La secuencia de estos péptidos difiere en dos residuos: 3K y 14N en el péptido 9, y 3R y 14H en el péptido 12. La lisina, arginina e histidina corresponden a aminoácidos con carga positiva, mientras que la asparagina es un aminoácido polar. La carga, polaridad y posición en la cadena son propiedades fisicoquímicas y estructurales que el algoritmo VSM tiene en cuenta al momento de calcular la PAP (Gawde *et al.*, 2022). Con base en esta predicción se seleccionó el péptido 9. Siguiendo este mismo criterio, entre los péptidos 2, 2a, 16a y 19 se seleccionó el 19; entre los péptidos 7, 8, 15 y 18 se seleccionaron el 8 y el 15 ya que presentaron la mayor PAP y son distintos

entre sí. El péptido 4a se seleccionó porque su longitud es mayor a 10 residuos y su PAP se acerca al 50 %.

Mediante la herramienta de diseño racional de la base de datos CAMP, se identificaron sustituciones que aumentan la probabilidad de un péptido de ser PAM. Para los diez péptidos seleccionados, el algoritmo determinó al menos una sustitución que aumenta la PAP (Figura 14).

#### **Figura 14**

*Diseño racional.* PAP: probabilidad de ser PAM. El Seq. ID. de los análogos diseñados incluye las sustituciones (posición y aminoácido) separadas por un guion.

Una sustitución			Dos y tres sustituciones			Análogos diseñados	
Seq. ID.	Pos.	PAP (%)	Seq. ID.	Pos	PAP (%)	Seq. ID.	PAP (%)
AFH1	11-I	84.2	AFH1-11I	14-K	93.1	AfH1-11I14K	93.1
AFH1	11-L	84.2	AFH1-11I	14-R	92.6	AFH1-2I11I14K	97.9
AFH1	11-V	82.1	AFH1-11I	4-N	92.5	AfH2-4K11K	97.6
AFH1	11-A	81.8	AFH1-11I	2-I	92.2	AfH3-2W11K	93.3
AFH2	11-K	93.8	AFH1-11I	13-I	92.2	AFH3-2I11W	91.6
AFH2	11-H	88.3	AFH2-11K	4-K	97.6	AFH3-2I5K11W	98.2
AFH2	11-F	87.7	AFH2-11K	7-K	97.5	AfH4-1L2D3D	98.0
AFH2	11-I	85.2	AFH2-11K	5-K	97.3	AfH5-4K5I	98.1
AFH2	11-G	83.7	AFH2-11K	8-K	96.9	AfH6-3G11M13M	100
AFH2	11-V	83.4	AFH2-11K	10-K	96.9	AfH6-3S13M	99.6
AFH2	11-N	83.3	AFH2-11K	3-K	96.0	AfH6-7G11M	99.3
AFH2	11-L	83.3	AFH2-11K	9-K	95.8	AfH6-3K13M	99.6
AFH2	11-A	83.3	AFH2-11K	6-K	95.5	AfH6-3S7M13M	100
AFH2	11-P	83.1	AFH3-11K	2-W	93.3	AfH7-1I8I13K	97.9
AFH2	11-S	83.0	AFH4-2D3D	1-L	98.0	AfH8-7Y11Y	99.5
AFH2	11-Q	82.0	AFH5-4K	5-I	98.1	AfH9-9D13I15I	97.1
AFH3	11-K	63.2	AFH6-11M13M	3-G	100	AfH10-5R8R	93.4
AFH3	11-I	61.8	AFH6-11M13M	3-K	100		
AFH3	11-W	60.8	AFH6-11M13M	5-K	100		
AFH4	3-D	75.8	AFH6-11M13M	5-M	100		
AFH4	3-I	62.4	AFH6-11M13M	7-R	100		
AFH4	2-D	62.2	AFH6-11M13M	7-K	100		
AFH5	4-K	88.5	AFH7-13K	8-I	89.4		
AFH5	4-I	87.5	AFH7-13K8I	1-I	97.9		
AFH5	4-L	84.6	AFH8-11Y	7-Y	99.5		
AFH5	4-V	83.2	AFH9-13I	15-I	87.7		
AFH5	4-G	81.8	AFH9-13I15I	9-D	97.1		
AFH6	11-M	98.6	AFH10-5R	8-R	98.2		
AFH6	11-K	98.2					
AFH6	13-M	98.1					
AFH6	10-K	97.6					
AFH6	9-K	97.4					
AFH6	3-K	96.7					
AFH6	10-M	96.6					
AFH6	7-M	96.0					
AFH6	3-S	95.7					
AFH6	8-M	95.6					
AFH6	9-R	95.6					
AFH6	8-K	94.6					
AFH6	5-M	94.3					
AFH6	5-K	92.5					
AFH6	12-M	92.1					
AFH6	7-G	82.7					
AFH6	7-F	82.3					
AFH7	13-K	60.5					
AFH7	13-R	60.2					
AFH8	11-Y	88.2					
AFH9	13-I	64.1					
AFH9	13-L	56.9					
AFH10	5-R	54.3					

Propiedades fisicoquímicas

La PAP de los diez péptidos seleccionados fue entre 15.1% y 77.5%. Sobre estas secuencias, se empleó la herramienta de diseño racional de la base de datos CAMP. En el caso del péptido AfH6 (PAP: 77.5%), el algoritmo detectó 78 sustituciones que aumentan la PAP en un rango entre 81.8% y 98.6% (Figura 13). Por ejemplo, la primera sustitución sugerida es reemplazar ácido glutámico (E) por metionina (M) en la posición 11, de esta manera, se aumenta la PAP a 98.6%. El ácido glutámico es un aminoácido con carga negativa, mientras que la metionina es de carácter hidrofóbico. Esta sustitución disminuye una carga negativa y aumenta la hidrofobicidad, lo cual está relacionado con una mayor probabilidad de ser PAM (Ortiz López, 2019).

De otro lado, para el péptido AfH10 (PAP: 15.1%), el algoritmo predijo una única sustitución de treonina (T) por arginina (R) en la posición 5, que aumenta la PAP a 54.3%. La treonina es un aminoácido polar, mientras que la arginina es un aminoácido con carga positiva, lo cual aumenta la carga neta del péptido. Para seleccionar las sustituciones se tuvieron en cuenta la PAP junto con las características de cada aminoácido, teniendo predilección por residuos catiónicos como lisina o arginina, ya que aumentan la carga neta del péptido, y esta es una característica deseable en los PAMs (Cruz *et al.*, 2014; Guzmán *et al.*, 2013; Ortiz López, 2019).

Con base en estas predicciones, se diseñaron análogos de los péptidos identificados. Se buscaron combinaciones de dos y tres sustituciones por péptido que aumentarían la PAP y que sus características fisicoquímicas fueran apropiadas para síntesis química. Por ejemplo, los péptidos AfH8 y AfH10, pese a tener una PAP > 98%, no se seleccionaron para síntesis química dado su alto índice de inestabilidad (75.92 para AfH8 y 86.04 para AfH10), ya que un valor mayor a 40 se considera inestable (Guruprasad *et al.*, 1990). El índice de inestabilidad de un péptido es una medida teórica de su estabilidad en solución acuosa basado en la proporción de aminoácidos alifáticos, grandes, pequeños, ácidos y básicos en su secuencia.

Los aminoácidos incorporados en los análogos fueron, por orden de frecuencia: isoleucina (I) (9), lisina (K) (8), metionina (M) (5), ácido aspártico (D) (3), serina (S) (1), glicina (G) (1), triptófano (W) (1) y leucina (L) (1). Los aminoácidos sustituidos fueron: ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), metionina (M), prolina (P), asparagina (N), serina (S), tirosina (Y), isoleucina (I), arginina (R), valina (V) e histidina (H). Además de su frecuencia de incorporación y sustitución, se tuvieron en cuenta características como carga, hidrofobicidad y efecto sobre la estructura secundaria, al momento de diseñar los análogos.

Por ejemplo, la diferencia entre el péptido nativo AfH1 y su análogo AfH1-11I14K consiste en la incorporación de I y K en lugar de D y V; mientras que para el análogo AFH1-2I11I14K se sustituyó R y V por I y K. La isoleucina es un aminoácido alifático de cadena ramificada de carácter hidrofóbico. Por su parte, la lisina posee una cadena lateral de cuatro carbonos que finaliza en un grupo amino. Esta característica le permite realizar interacciones hidrofílicas y electrostáticas con grupos o moléculas cargadas negativamente, como los componentes aniónicos de las membranas bacterianas (Carvajal-Rondanelli *et al.*, 2018). La inclusión de lisina e isoleucina también se realizó en el diseño de los análogos AfH2-4K11K, AFH3-2I5K11W, AfH5-4K5I y AfH7-1I8I13K.

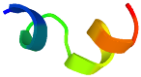



Se seleccionaron 20 péptidos (8 nativos y 12 análogos diseñados) y se realizó la determinación teórica de las propiedades fisicoquímicas y estructura secundaria.

### 7.3 Determinación de propiedades fisicoquímicas y estructura secundaria

El peso molecular, carga neta, punto isoelectrico, GRAVY e índice de inestabilidad, se determinaron mediante *Proparam Tools*. Se empleó la herramienta *Peptide solubility calculator* de Innovagen (<https://pepcalc.com/peptide-solubility-calculator.php>) para estimar la solubilidad de los péptidos en medio acuoso.


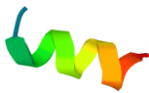


En la Tabla 4 se resumen los péptidos seleccionados y los análogos diseñados incluyendo sus propiedades fisicoquímicas y el modelo de estructura secundaria determinado por Pep-Fold.




AfH1-	4390	FILHGIGV	15	3	11.	1638.0	0.880	3.94	Alfa hélice	Poco	97.9	No
2I11I14		SAIVRKK			17	3				soluble		activo
<b>AfH2</b>	4391	FLLHGIG	12	-1	5.0	1199.3	1.200	-20.70	Alfa hélice	Poco	45.1	No
		ASADV			8	7				soluble		activo
AfH2-	4392	FLLKIGIG	12	2	10.	1203.4	1.108	-26.21	Alfa hélice	Poco	97.6	General
4K11K		ASAKV			00	9				soluble		
<b>AfH3</b>	4393	LMRKPL	15	3	10.	1856.2	-1.153	48.21	Random	Soluble	18.7	General
		QPFQDKK			29	6			coil			
		LN										





AfH6-	4403	GG <b>S</b> KEM	15	1	8.5	1835.2	-0.913	-1.33	Alfa hélice	Soluble	100	General
3S7M13		<b>M</b> WAYER			0	0						
M		<b>M</b> MK										
<b>AfH7</b>	4404	RLYVVQ	15	1	8.5	1774.0	-0.427	10.85	Alfa hélice	Soluble	24.5	No
		LEQALKE			0	9						activo
		KG										
AfH7-	4405	<b>I</b> LYVVQL	15	3	10.	1714.1	0.680	10.85	Alfa hélice	Poco	97.9	<i>S.</i>
1I8I13K		<b>I</b> QAL <b>K</b> <b>K</b> <b>K</b>			00	7				soluble		<i>aureus</i>
		G										ATCC2
												5923
<b>AfH9</b>	4406	LCKSNKR	15	1	8.1	1817.1	-0.293	54.03	Random	Soluble	23.6	General
		IYIVVED			8	4			coil			
		H										

---

AfH9-	4407	LCKSNKR	15	1	8.2	1729.1	0.607	41.19	Random	Soluble	97.1	General
9D13I15		IDIVVIDI			0	1			coil			
I												

---

La mayoría de los péptidos diseñados tienen carga neta positiva, lo cual facilita su capacidad para unirse a las membranas bacterianas, ya que las interacciones electrostáticas con las superficies aniónicas pueden ser más fuertes. Esta afinidad puede llevar a una mayor eficacia en la disrupción de la membrana y la lisis celular. Además, la carga positiva puede mejorar la solubilidad en agua de estos péptidos al favorecer su interacción con el solvente polar. Por otro lado, los péptidos con carga neta negativa o neutra, como AfH2, AfH4, AfH4-1L2D3D y AfH6, pueden tener mecanismos de acción diferentes, posiblemente afectando la interacción con las membranas o interfiriendo con procesos celulares vitales. Para facilitar estas interacciones, los péptidos aniónicos generalmente adoptan estructuras anfifílicas (Harris *et al.*, 2009).

El peso molecular osciló entre 1.2 kDa y 1.94 kDa. El punto isoeléctrico se encontró en el rango de 3.66 y 12.02. De acuerdo con el índice GRAVY, 9 péptidos son hidrofóbicos y 11 hidrofílicos (Godfrey *et al.*, 2005). Los péptidos AfH3, AfH3-2I5K11W, AfH4, AfH9 y AfH9-9D13I15I tienen un índice de inestabilidad mayor a 40 (los valores oscilaron entre 41.1 y 54), lo cual los clasifica como inestables *in vivo* según el criterio definido por Guruprasad y colaboradores (Guruprasad *et al.*, 1990). Sin embargo, este valor fue menor en comparación con los péptidos AfH8 y AfH10 (75.9 y 86 respectivamente), por lo que fueron seleccionados en su lugar.

En cuanto al modelo de estructura secundaria, 16 péptidos son estructurados con tendencia alfa-hélice. La diversidad de estructuras secundarias puede tener implicaciones importantes en términos de función y potenciales aplicaciones. Por ejemplo, las estructuras alfa-helicoidales pueden estar asociadas con la capacidad para interactuar con las membranas bacterianas. Por otro lado, los péptidos AfH1, AfH3, AfH9 y AfH9-9D13I15I no presentan estructura definida (*random coil*). Los péptidos no estructurados pueden adoptar múltiples formas en solución. Este tipo de estructura puede ser relevante para péptidos que exhiben flexibilidad y plasticidad conformacional

(Huang *et al.*, 2010). El modelo para el péptido AfH1 corresponde a un péptido no estructurado o *random coil*, mientras que el modelo para sus dos análogos (AfH1-11114K y AFH1-211114K) corresponde a péptidos estructurados de tipo alfa-helicoidales. De manera similar, el modelo del péptido AFH3 es de tipo no estructurado, mientras que su análogo AFH3-2I5K11W es de tipo alfa-helicoidal. Tanto el péptido AfH9 como su análogo AfH9-9D13I15I son de tipo no estructurado.

En los modelos *in silico* de los péptidos se utilizó C-terminal carboxi. La presencia de un grupo carboxilo confiere una carga negativa al extremo C-terminal, mientras que una amidación elimina esa carga. Esto puede afectar las interacciones electrostáticas y la solubilidad del péptido en diferentes entornos. Sin embargo, no se obtuvo información de los modelos con C-terminal amidado.

Finalmente, el alineamiento con BLASTp de los análogos diseñados confirmó que todos tienen porcentajes de identidad superiores al 80% con hemocianina de gasterópodos. Se empleó nuevamente la herramienta CAMPSing y no se encontró asociación entre los péptidos diseñados con aquellos patrones de las 45 familias de PAMs registradas en CAMP. Además, se utilizó la herramienta BLAST de CAMP para identificar similitudes con PAMs registrados en esta base de datos. Se encontró que el péptido AfH2-4K11K tiene identidad del 80% con el péptido Haliotisina, mientras que los péptidos AfH6, AfH6-3S13M y AfH6-3K13M tienen identidad del 56% con la defensina CAMPSQ1911. La Haliotisina es una región de la hemocianina altamente conservada entre los moluscos (Zhuang *et al.*, 2015) (Figura 15). Esta región ha sido empleada para el diseño de péptidos con actividad antimicrobiana frente a la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* y Gram negativa *Erwinia carotovora*, reportando valores de CMI < 10  $\mu$ M para ambos microorganismos (Zhuang *et al.*, 2015). De otro lado, la defensina CAMPSQ1911 (Beta-defensina 119) pertenece a la familia de las beta-defensinas presente en mamíferos (Pazgier *et al.*, 2006).

**Figura 15**

*Secuencia y estructura de Haliotisina y AfH2-4K11K.* A. Alineamiento entre Haliotisina y AfH2-4K11K. B. Vista estructural (superficie) de alineamiento entre Hc de *T. pacificus* (gris) (PDB ID 4YD9), Hc de *Megathura crenulata* (verde) (PDB: 4BED) y AFH2-4K11K (rojo) (Gai *et al.*, 2015; Zhuang *et al.*, 2015). La Haliotisina se resalta en azul y en rojo la región con similitud al péptido AfH2-4K11K. Alineamientos realizados con PyMOL demuestran que Haliotisina es una región conservada en la Hc de moluscos.

A

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

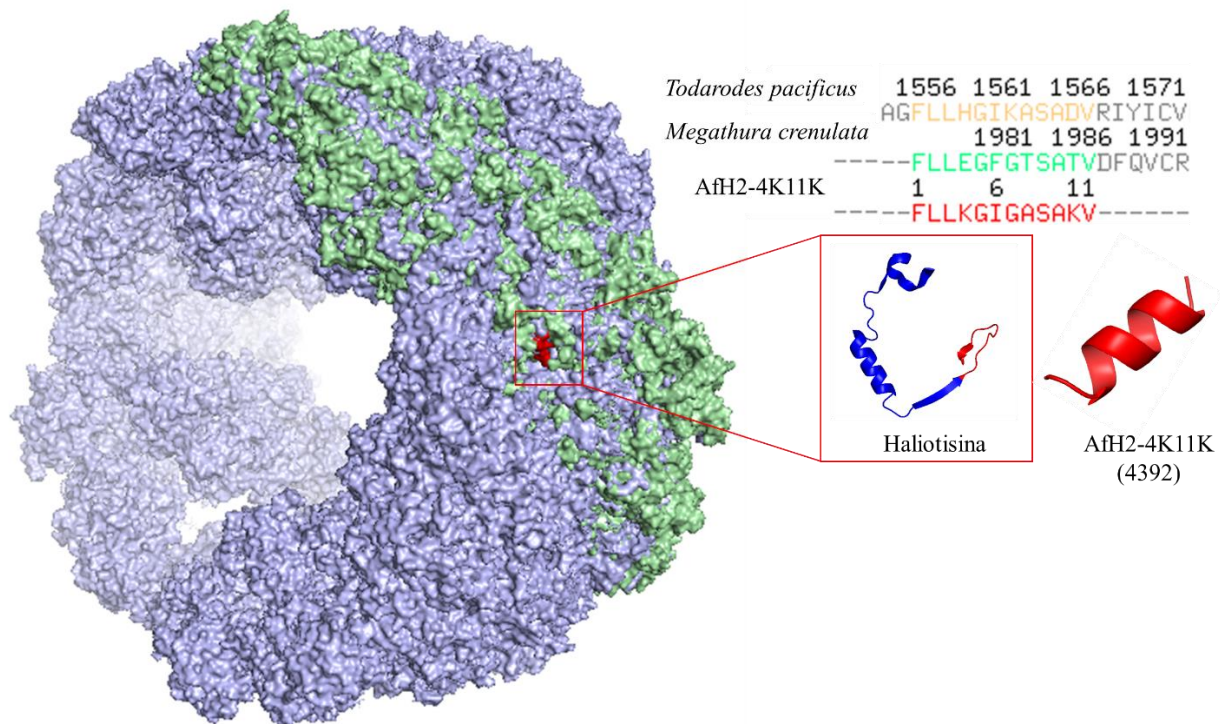
```

Haliotisin  DTFDYKKFGYRYDSLELEGRSISRIDELIQQRQEKDRTFAGFLLKGFSGTSAS-
           52

AfH4K11K   -----FLLKGIGASAKV
           12

                *****.*.***
    
```

B



En resumen, el análisis mediante BLASTp y alineamiento múltiple reveló 21 regiones de la hemocianina de gasterópodos terrestres con identidad >80% con los péptidos identificados en la secreción mucosa de *A. fulica*. A través de algoritmos predictivos y diseño racional, se generaron análogos y se seleccionaron 12 péptidos con potencial actividad antimicrobiana. Estos péptidos mostraron diversas propiedades y estructuras secundarias, predominando las alfa-hélices, que son favorables para la interacción con membranas bacterianas. La validación *in silico* confirmó su identidad con hemocianinas de gasterópodos y su potencial antimicrobiano, abriendo la posibilidad de diseñar nuevos PAMs a partir de la hemocianina de *A. fulica*. Estos hallazgos abren la puerta a la síntesis química y evaluación experimental de estos péptidos como nuevos agentes

antimicrobianos, destacando la relevancia de la bioinformática en el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas.

**Objetivo específico 2:** Sintetizar los péptidos derivados de la hemocianina diseñados *in silico*.

#### 7.4 Síntesis de péptidos

Inicialmente, se sintetizaron 20 péptidos: 8 nativos y 12 análogos diseñados *in silico* (Tabla 5). Luego, se sintetizaron otros cuatro análogos del péptido AfH5 (4397) y se realizó un scan de alanina de los péptidos AfH5 (4397), AfH5-4K5I (4398), AfH7-1I8I13K (4405) y AfH9 (4406) (Tabla 6).

**Tabla 5**

*Péptidos sintetizados inicialmente.*  $t_R$ : tiempo de retención. PM: peso molecular.  $[M+H]^+$ : Molécula ionizada ( $m/z$ ).  $R_T$ : rendimiento teórico. En negrita se resaltan los péptidos nativos. <sup>a</sup> Rendimiento teórico ajustado al 20%.

<b>Péptido</b>	<b>Código de síntesis</b>	<b>Secuencia</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>	<b>PM (Da)</b>	<b><math>[M+H]^+</math></b>	<b><math>R_T</math> <sup>a</sup> (mg)</b>
<b>AfH1</b>	4388	FRLHGIGVSADVRVK	5.6	1654.16	1655.16	9.8
AfH1- 1I1I4K	4389	FRLHGIGVSAIVRKK	5.4	1681.28	1682.28	10.0
AfH1- 2I1I1I4K	4390	FILHGIGVSAIVRKK	5.5	1638.26	1639.26	9.7
<b>AfH2</b>	4391	FLLHGIGASADV	6.3	1199.53	1200.53	7.1

AfH2- 4K11K	4392	FLLKGIGASAKV	6.0	1203.65	1204.65	7.1
<b>AfH3</b>	4393	LMRKPLQPFQDKKLN	5.3	1856.46	1857.46	11.0
AfH3- 2I5K11W	4394	LIRKKLQPFQWKKLN	5.5	1940.62	1941.62	10.9
<b>AfH4</b>	4395	NSRAIDAFDYDRLNY	6.0	1833.13	1834.13	10.9
AfH4- 1L2D3D	4396	LDDAIDAFDYDRLNY	6.5	1819.09	1820.09	10.8
<b>AfH5</b>	4397	LFKYDVTNVFNKLN	6.6	1828.34	1829.34	10.8
AfH5- 4K5I	4398	LFKKIVTNVFNKLN	6.6	1791.4	1792.40	10.6
<b>AfH6</b>	4399	GGEKEMPWAYERIMK	6.0	1825.35	1826.35	10.8
AfH6- 3S13M	4400	GGSKEMPWAYERMMK	6.0	1801.34	1802.34	10.7
AfH6- 7G11M	4401	GGEKEMGWAYMRIMK	6.3	1787.37	1788.37	10.6
AfH6- 3K13M	4402	GGKKEMPWAYERMMK	5.7	1842.44	1843.44	10.9
AfH6- 3S7M13M	4403	GGSKEMMWAYERMMK	6.2	1835.42	1836.42	10.9
<b>AfH7</b>	4404	RLYVVQLEQALKEKG	6.3	1774.3	1775.30	10.5
AfH7- 1I8I13K	4405	ILYVVQLIQALKKKK	7.1	1714.39	1715.39	10.1

<b>AfH9</b>	4406	LCKSNKRIYIVVEDH	7.1	1817.36	1818.36	10.8
AfH9- 9D13I15I	4407	LCKSNKRIDIVVIDI	7.0	1729.34	1730.34	10.2

El rendimiento teórico ( $R_T$ ) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$R_T = \text{Carga resina} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) \times \text{Cantidad de resina empleada (mg)} \times \text{Peso molecular del péptido} \left( \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)$$

La ecuación proporciona la cantidad de péptido que se obtendría si el rendimiento fuera del 100%. Sin embargo, la SPFS es un proceso multietapas donde el número de operaciones requeridas aumenta proporcionalmente con la longitud del péptido, lo cual resulta en una disminución exponencial del rendimiento global de la síntesis. Aun considerando un rendimiento promedio elevado del 90 % por aminoácido acoplado, el rendimiento global para un péptido de 15 residuos sería tan solo del 20.5% ( $0.9^{15}$ ) (Seeger Pfeiffer & Padrón, 2013). Por esta razón, el  $R_T$  se ajustó para estimar el rendimiento real de la síntesis. Por ejemplo, el péptido 4388 tiene un peso molecular de 1654.16 Da (1 Da es equivalente a 1 g/mol). La capacidad de carga (sustitución) de la resina empleada fue de 0.74 mmol/g, y se usaron 40 mg de resina. Así que, el rendimiento teórico sería:

$$0.74 \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \times 0.04 \text{ g} \times 1654.16 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 1 \frac{\text{mol}}{1000} \text{ mmol} \times 1000 \frac{\text{mg}}{1} \text{ g} = 48.9 \text{ mg}$$

Sin embargo, dado que el rendimiento real es aproximadamente 20%, se espera obtener aproximadamente 9.8 mg de péptido.

**Tabla 6**

Scan de alanina y análogos del péptido AfH5 (4397).  $t_R$ : tiempo de retención. PM: peso molecular.

$[M+H]^+$ : Molécula ionizada ( $m/z$ ).  $R_R$ : rendimiento real.  $R_P$ : rendimiento porcentual. Los péptidos 4752, 4753, 4754 y 4755 corresponden a otros análogos del péptido 4397.

Código de síntesis	Secuencia	$t_R$ (min)	PM (Da)	$[M+H]^+$	$R_R$ (mg)	$R_P$ (%)
4752	LRKYDVTNVFNKLNL	6.5	1837.35	1838.15	8.1	29.8
4753	LKKYDVTNVFNKLNL	6.2	1809.34	1810.14	8.9	33.2
4754	LFKYDVTNVRNKLNL	5.9	1837.35	1838.15	7.8	28.5
4755	LFKYDVTNVKNKLNL	5.8	1809.34	1810.14	8.3	30.9
4397	LFKYDVTNVFNKLNL	6.7	1828.34	1829.34	8.5	31.4
4685	AFKYDVTNVFNKLNL	6.6	1786.26	1787.26	7.5	28.2
4686	LAKYDVTNVFNKLNL	6.3	1752.24	1753.24	9.7	37.4
4687	LFAVDVTNVFNKLNL	7.1	1771.24	1772.24	6.2	23.7
4688	LFKADVVTNVFNKLNL	6.5	1736.24	1737.24	8.5	32.9
4689	LFKYAVTNVFNKLNL	6.7	1784.33	1785.33	8.8	33.1
4690	LFKYDATNVFNKLNL	6.5	1800.28	1801.28	8.4	31.5
4691	LFKYDVANVFNKLNL	6.8	1798.31	1799.31	6.1	23.0
4692	LFKYDVTAVFNKLNL	6.8	1785.31	1786.31	7.9	30.0
4693	LFKYDVTNAFNKLNL	6.4	1800.28	1801.28	7.5	28.2
4694	LFKYDVTNVANKLNL	6.1	1752.24	1753.24	9.9	38.3

<b>4695</b>	LFKYDVTNVFAKLNL	6.9	1785.31	1786.31	7.5	28.5
<b>4696</b>	LFKYDVTNVFNALNL	7.1	1771.24	1772.24	8.1	30.9
<b>4697</b>	LFKYDVTNVFNKANL	6.2	1786.26	1787.26	5.6	21.1
<b>4698</b>	LFKYDVTNVFNKLAL	6.7	1785.31	1786.31	11	41.6
<b>4699</b>	LFKYDVTNVFNKLNA	6.4	1786.26	1787.26	10.3	39.0
<b>4398</b>	LFKKIVTNVFNKLNL	6.5	1791.42	1792.42	8	30.2
<b>4700</b>	AFKKIVTNVFNKLNL	6.3	1749.34	1750.34	9	34.8
<b>4701</b>	LAKKIVTNVFNKLNL	6.3	1715.32	1716.32	13.2	52.0
<b>4702</b>	LFAKIVTNVFNKLNL	7.0	1734.32	1735.32	7	27.3
<b>4703</b>	LFKAIVTNVFNKLNL	7.0	1734.32	1735.32	9.2	35.8
<b>4704</b>	LFKKAVTNVFNKLNL	6.1	1749.33	1750.33	8.2	31.7
<b>4705</b>	LFKKIATNVFNKLNL	6.4	1763.36	1764.36	9.6	36.8
<b>4706</b>	LFKKIVANVFNKLNL	6.6	1761.39	1762.39	11.5	44.1
<b>4707</b>	LFKKIVTAVFNKLNL	6.7	1748.39	1749.39	9	34.8
<b>4708</b>	LFKKIVTNAFNKLNL	6.3	1763.36	1764.36	8	30.7
<b>4709</b>	LFKKIVTNVANKLNL	6.1	1715.32	1716.32	7	27.6
<b>4710</b>	LFKKIVTNVFAKLNL	6.2	1748.39	1749.39	12	46.4
<b>4711</b>	LFKKIVTNVFNALNL	7.0	1734.32	1735.32	11	42.9
<b>4712</b>	LFKKIVTNVFNKANL	6.1	1749.34	1750.34	7.3	28.2
<b>4713</b>	LFKKIVTNVFNKLAL	6.6	1748.39	1749.39	10	38.6
<b>4714</b>	LFKKIVTNVFNKLNA	6.3	1749.34	1750.34	7	27.0
<b>4405</b>	ILYVVQLIQALKKKKG	7.0	1714.39	1715.4	9.6	37.8
<b>4730</b>	ALYVVQLIQALKKKKG	6.9	1672.3	1673.3	7.9	31.9

4731	IAYVVQLIQALKKKKG	6.9	1672.31	1673.3	11	44.4
4732	ILAVVQLIQALKKKKG	7.0	1622.29	1623.3	7.3	30.4
4733	ILYAVQLIQALKKKKG	6.8	1686.33	1687.3	7.5	30.1
4734	ILYVAQLIQALKKKKG	6.9	1686.33	1687.3	6	24.0
4735	ILYVVALIQALKKKKG	7.1	1657.33	1658.3	4.5	18.3
4736	ILYVVQAIQALKKKKG	6.6	1672.31	1673.3	8.2	33.1
4737	ILYVVQLAQALKKKKG	6.5	1672.3	1673.3	9.3	37.6
4738	ILYVVQLIAALKKKKG	7.3	1657.33	1658.3	10	40.8
4739	ILYVVQLIQAAKKKG	6.5	1672.31	1673.3	8.8	35.6
4740	ILYVVQLIQALAKKG	7.6	1657.29	1658.3	10	40.8
4741	ILYVVQLIQALKAKG	7.4	1657.29	1658.3	8.6	35.1
4742	ILYVVQLIQALKKAG	7.5	1657.29	1658.3	8.1	33.0
4743	ILYVVQLIQALKKKA	7.3	1728.41	1729.4	11.2	43.8
4406	LCKSNKRIYIVVEDH	7.0	1817.36	1818.36	3.3	12.27
4715	ACKSNKRIYIVVEDH	7.0	1775.28	1776.28	9.2	35.02
4716	LAKSNKRIYIVVEDH	7.0	1785.29	1786.29	13	49.20
4717	LCASNKRIYIVVEDH	7.0	1760.26	1761.26	7.5	28.60
4718	LCKANKRIYIVVEDH	7.0	1801.36	1802.36	10	37.51
4719	LCKSAKRIYIVVEDH	7.0	1774.33	1775.33	12	45.70
4720	LCKSNARIYIVVEDH	7.0	1760.26	1761.26	7	26.87
4721	LCKSNKAIYIVVEDH	6.0	1732.25	1733.25	11	42.91
4722	LCKSNKRAYIVVEDH	6.0	1775.27	1776.27	4	15.22
4723	LCKSNKRIAIIVVEDH	6.7	1725.26	1726.26	9	35.25

<b>4724</b>	LCKSNKRIY <b>A</b> VVEDH	6.5	1775.27	1776.27	7.7	29.31
<b>4725</b>	LCKSNKRIY <b>I</b> AVEDH	6.6	1789.3	1790.30	6	22.66
<b>4726</b>	LCKSNKRIY <b>I</b> V <b>A</b> EDH	6.7	1789.3	1790.30	7.4	27.94
<b>4727</b>	LCKSNKRIY <b>I</b> V <b>V</b> <b>A</b> DH	7.0	1759.32	1760.32	5.7	21.89
<b>4728</b>	LCKSNKRIY <b>I</b> V <b>V</b> E <b>A</b> H	7.2	1773.35	1774.35	10	38.10
<b>4729</b>	LCKSNKRIY <b>I</b> V <b>V</b> E <b>D</b> <b>A</b>	6.7	1751.29	1752.29	10	38.58

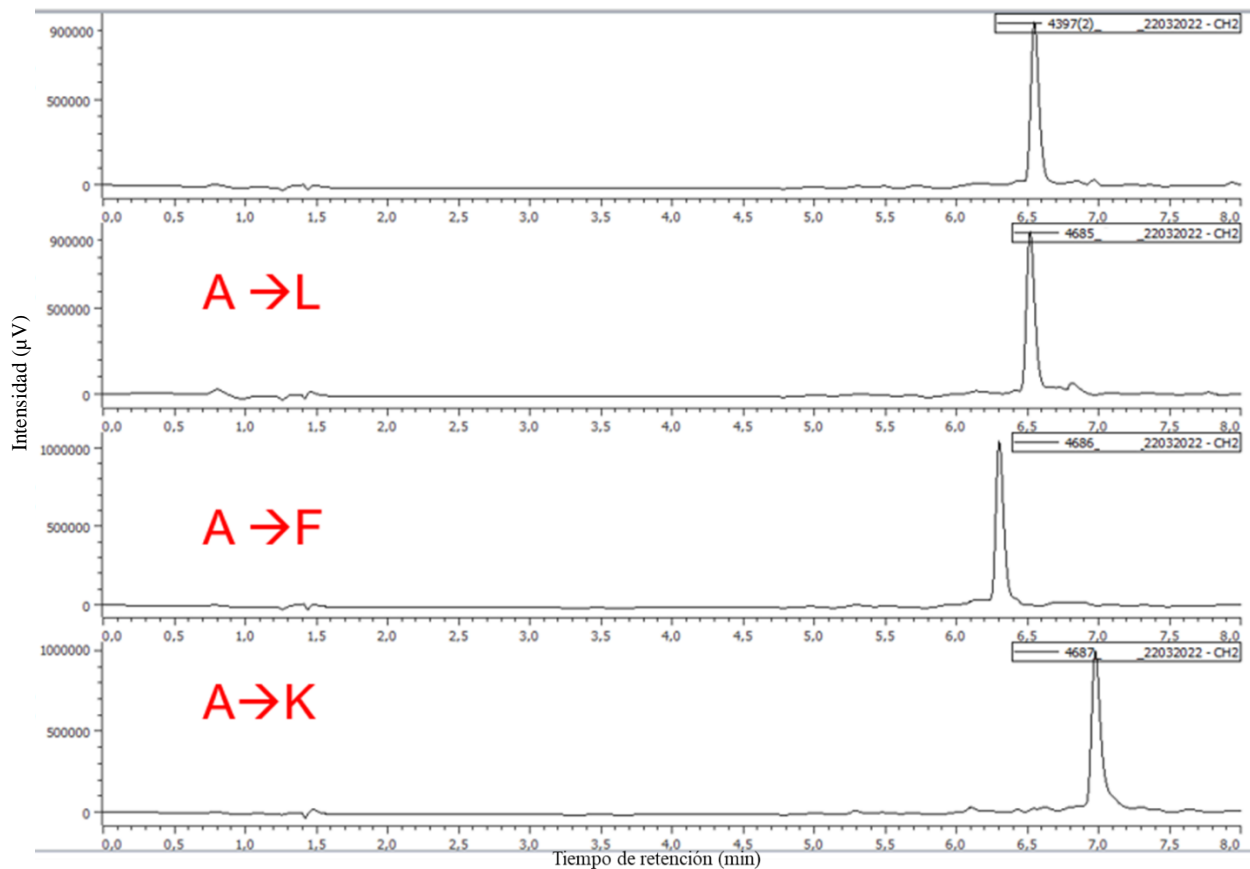
El rendimiento real es la cantidad de péptido obtenido y el rendimiento porcentual es la proporción entre el rendimiento real y el rendimiento teórico (sin ajustar) multiplicada por 100. En el scan de alanina, se obtuvo un rendimiento promedio de 27.8%, con valores que oscilaron entre 12.3% y 52% (Tabla 6). Esto indica que la eficiencia de la síntesis de un péptido es sensible a cambios específicos en su secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, la sustitución de F por A en el péptido 4701, resultó en un rendimiento mayor (52%) al péptido nativo 4398 (30.2%). De otro lado, péptido nativo 4406 tuvo menor rendimiento (12.27%) en comparación con sus análogos de scan de alanina, donde el mayor rendimiento (49.2%) se obtuvo al sustituir C por A en el péptido 4716. Esta información puede ser valiosa para la optimización de la síntesis relacionada con la variabilidad de aminoácidos.

Los péptidos se obtuvieron con un alto nivel de pureza, como se puede evidenciar en los cromatogramas de HPLC, ya que se observa un pico único correspondiente al péptido de interés (Apéndice B). Como ejemplo, en la Figura 16 se presenta el cromatograma del péptido 4397 y sus primeros tres análogos de scan de alanina, antes de la desalinización con Sephadex G10.

**Figura 16**

*Cromatogramas de HPLC del péptido 4397 y sus primeros tres análogos del scan de alanina.*

Secuencias de arriba hacia abajo: 4397: LFKYDVTNVFNKLNL, 4685: AFKYDVTNVFNKLNL, 4686: LAKYDVTNVFNKLNL, 4687: LFAKYDVTNVFNKLNL.

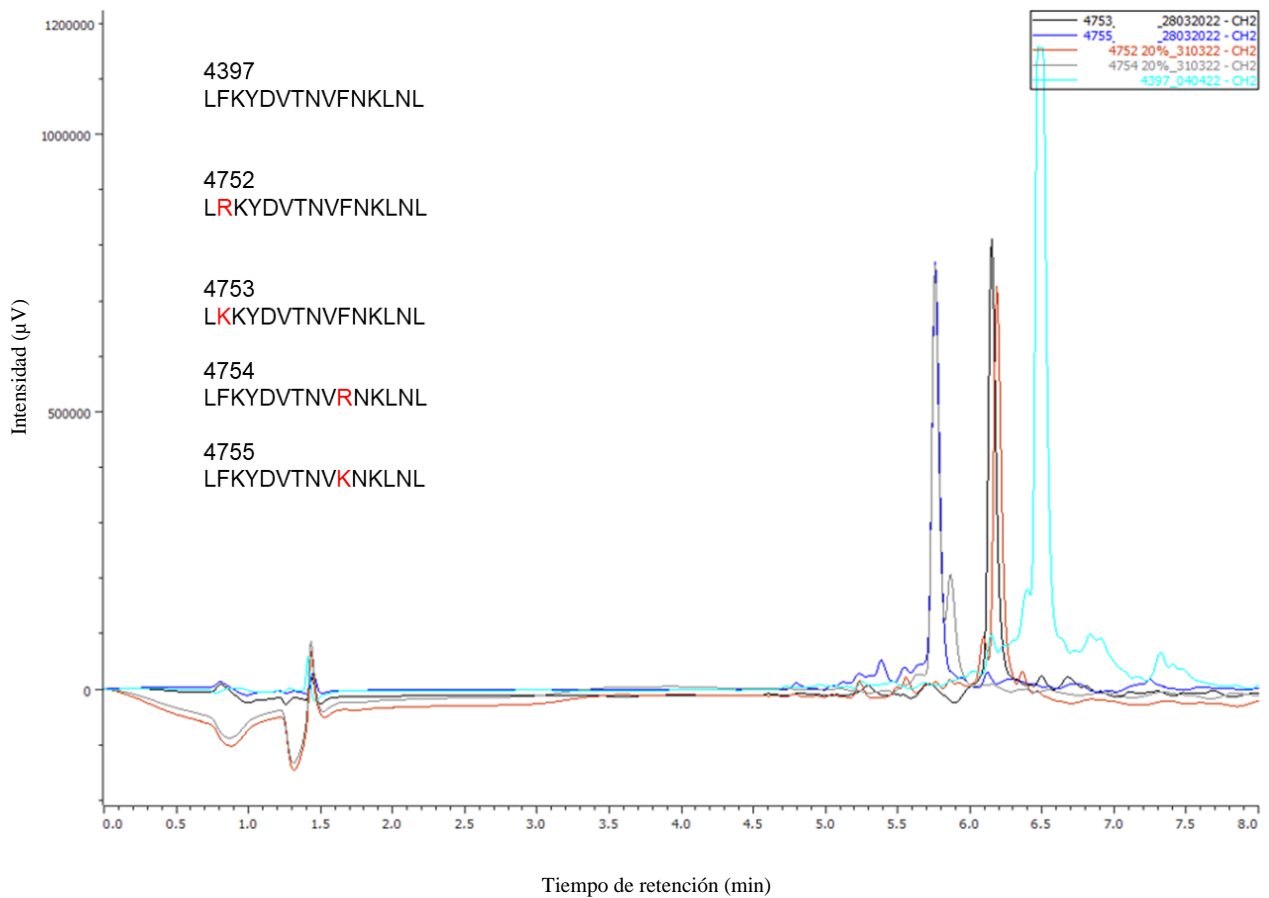


Al comparar los tiempos de retención del péptido 4397 con sus análogos 4752, 4753, 4754 y 4755, se observó que los análogos que contenían lisina o arginina presentan una reducción en los tiempos de retención debido a la disminución en la hidrofobicidad del péptido, ya que estos residuos favorecen interacciones electrostáticas con la fase estacionaria hidrofóbica (Columna C-18), donde los compuestos más hidrofílicos tienden a eluir más rápido, mientras que los

compuestos más hidrofóbicos se retienen por más tiempo (Figura 17) (Seeger Pfeiffer & Padrón, 2013). Además, los péptidos 4752 y 4753, que contienen residuos de arginina y lisina en la posición 2, mostraron mayores tiempos de retención en comparación con los péptidos 4754 y 4755, que tienen estos residuos en la posición 10. Esto sugiere que la ubicación de los residuos de lisina y arginina afecta la interacción de los péptidos con la columna.

**Figura 17**

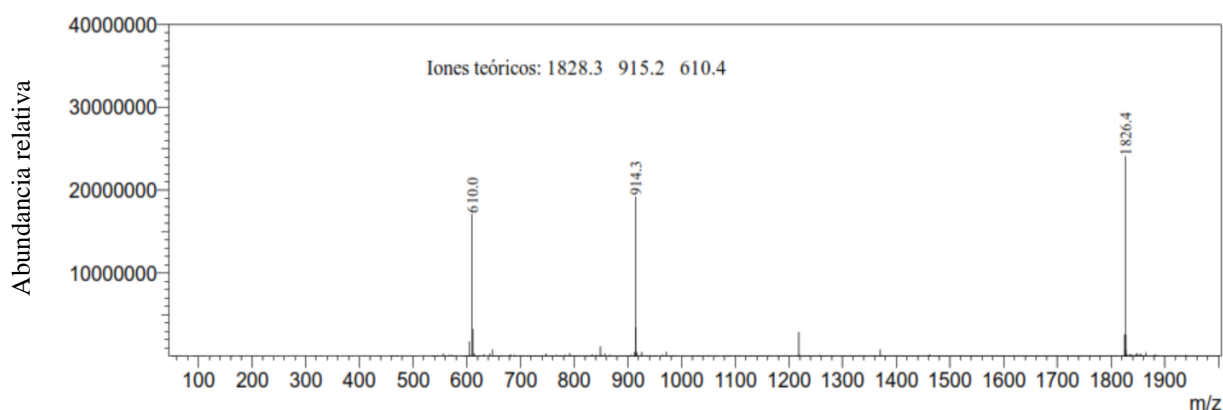
*Cromatogramas de HPLC de los péptidos 4397, 4752, 4753, 4754 y 4755.*



Los análisis por espectrometría de masas permitieron confirmar la secuencia primaria de los péptidos sintetizados, ya que la relación masa/carga ( $m/z$ ) y los iones moleculares obtenidos experimentalmente son acordes a la masa molecular y los iones moleculares calculados teóricamente (Apéndice B). Como ejemplo, en la Figura 18 se presenta el espectro de masas del péptido 4397, mediante el cual se confirma la secuencia primaria del péptido sintetizado.

### Figura 18

*Espectro de masas del péptido 4397.* Los iones teóricos corresponden a la relación masa/carga de los aductos  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$  y  $[M+3H]^{3+}$ .



El análisis mediante DC para los péptidos 4397, 4398, 4405, 4406, 4735, 4738, 4743 y los análogos de scan de alanina del péptido 4397 sugiere que, a excepción del péptido 4406, la estructura secundaria es de tipo alfa-hélice (Figura 19). Los péptidos presentan un pico de mayor elipticidad molar alrededor de los 195 nm y dos mínimos a 208 nm y 222 nm, característicos de una estructura alfa-hélice (Guzmán *et al.*, 2023). Las diferencias en la elipticidad molar pueden

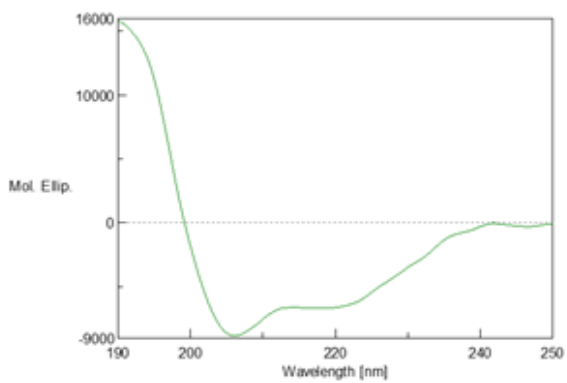
surgir de una combinación de factores estructurales, químicos y ambientales que afectan las propiedades ópticas de los péptidos. Estas diferencias pueden indicar cambios conformacionales o transiciones entre diferentes estructuras secundarias. Esto se puede evidenciar al comparar los espectros de DC del péptido 4405 y sus análogos 3735, 3738 y 4743 (Figura 19B), donde se observan diferencias tanto en la elipticidad molar como en la proporción de estructuras secundarias determinadas por el algoritmo de deconvolución Contin del programa CDpro.

### **Figura 19**

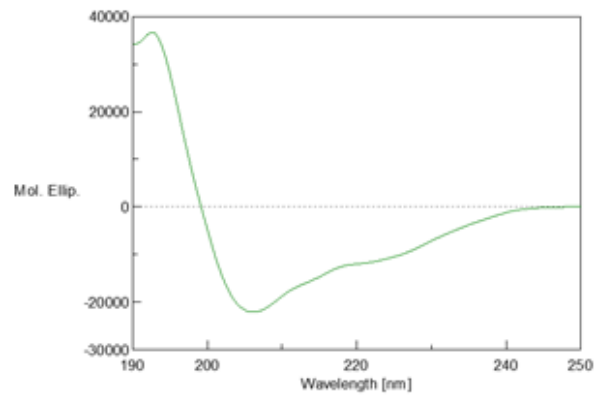
*Espectros de DC.* Se determinó el espectro de DC en presencia de TFE/H<sub>2</sub>O 30 % (v/v). A. Espectros de DC de los péptidos 4397, 4398 y 4406. B. Espectros de DC de los péptidos 4405, 4735, 4738 y 4743. El porcentaje de hélice se determinó mediante el programa CDpro usando el algoritmo Contin y la base datos SP37A. C. Espectros de DC de los análogos de scan de alanina del péptido 4397.

A

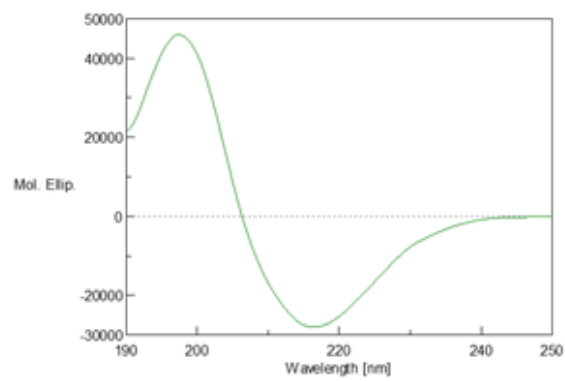
4397

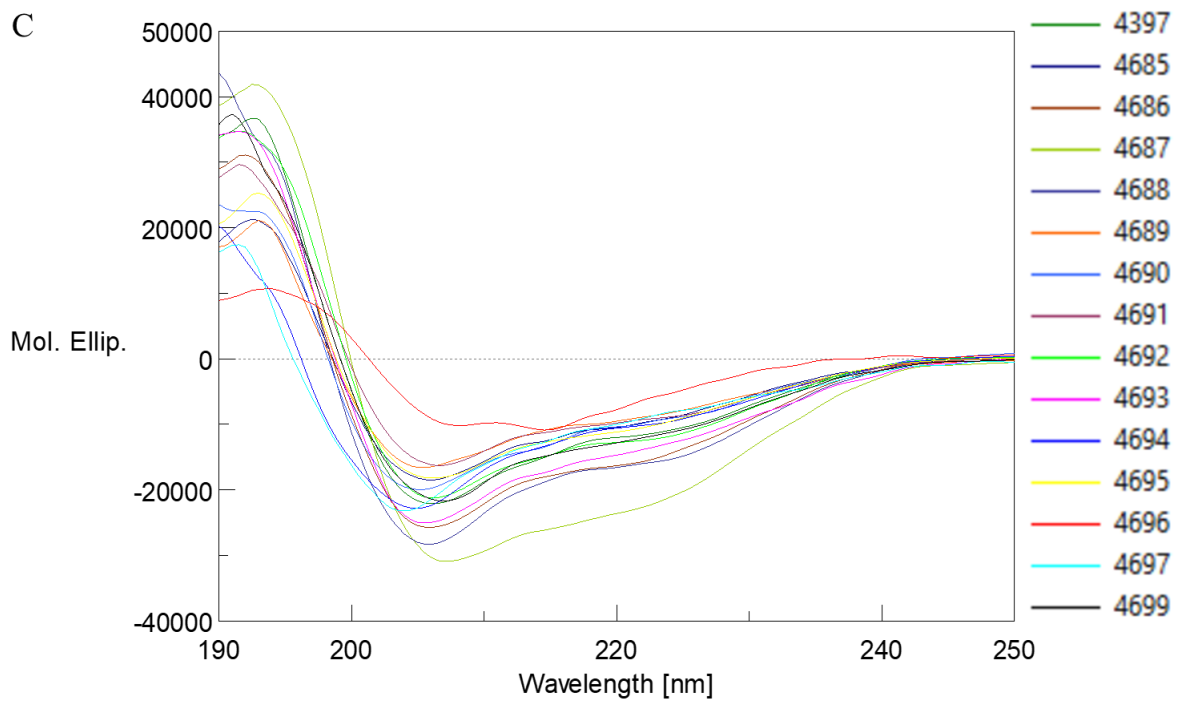
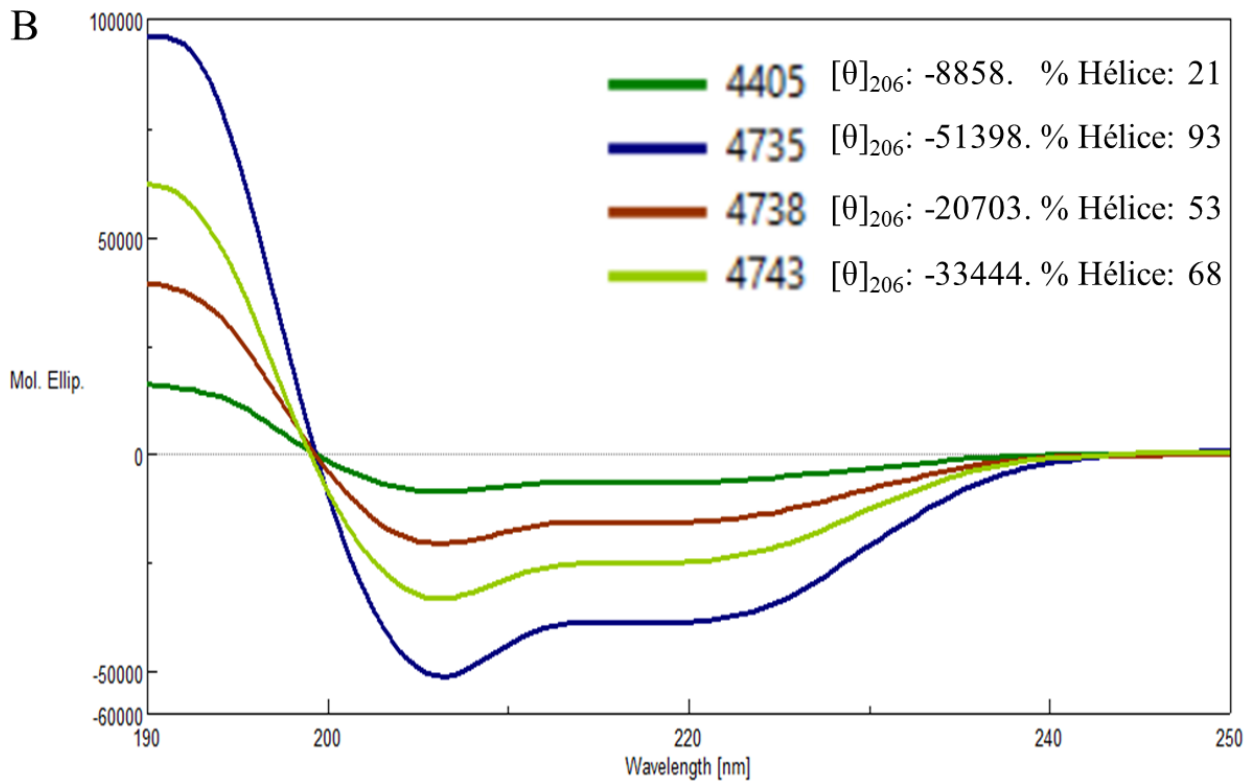


4398



4406





Las estructuras secundarias determinadas por DC coinciden con los modelos predichos por PepFold. Por ejemplo, para el péptido 4406 la mayor elipticidad molar se registró a los 197 nm y la menor a los 216 nm (Figura 19A). Este tipo de espectro se asocia a las estructuras de hoja beta, lo cual guarda relación con los modelos de PepFold, si bien la principal estructura modelada para este péptido es de tipo *random coil*. El espectro típico de una estructura *random coil* se caracteriza por un pico de menor elipticidad molar alrededor de 200 nm y otro de menor intensidad sobre los 220-230 nm, que puede ser positivo o negativo (Carvajal-Rondanelli *et al.*, 2018).

En general, un péptido con alto contenido de hélice alfa sugiere una estructura helicoidal más estable y bien definida. Las hélices alfa son conocidas por su estabilidad debido al patrón regular de puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno del grupo carbonilo de un aminoácido y el átomo de hidrógeno del grupo amino de otro aminoácido situado a cuatro aminoácidos de distancia en la cadena. Por lo tanto, un mayor contenido de hélice alfa en los péptidos 4735, 4738 y 4743, respecto al 4405, podría indicar una mayor estabilidad en los análogos (Figura 19B). De otro lado, la parte del péptido que no está estructurado sugiere que puede carecer de una conformación estable y bien definida. Las regiones no estructuradas suelen ser flexibles y dinámicas, lo que puede resultar ventajoso en las interacciones con otras moléculas, pero también puede indicar una menor estabilidad por sí sola.

En conclusión, la estabilidad de un péptido probablemente esté influenciada por el equilibrio entre sus diferentes elementos de la estructura secundaria. Un mayor contenido de estructuras estables como hélices alfa combinado con cierta flexibilidad proporcionada por giros y regiones no estructuradas, puede contribuir a la estabilidad general del péptido. Sin embargo, al evaluar la estabilidad de los péptidos, es esencial considerar otros factores como la concentración de sales, los efectos de los disolventes, y las interacciones con otras moléculas.

Finalmente, la síntesis a través de la metodología propuesta fue exitosa, logrando obtener todos los péptidos con un alto nivel de pureza y un rendimiento entre 12.3% y 52%. Estos resultados subrayan la viabilidad de la estrategia empleada para la síntesis de péptidos con potencial antimicrobiano.

**Objetivo específico 3:** Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de los péptidos obtenidos mediante síntesis química.

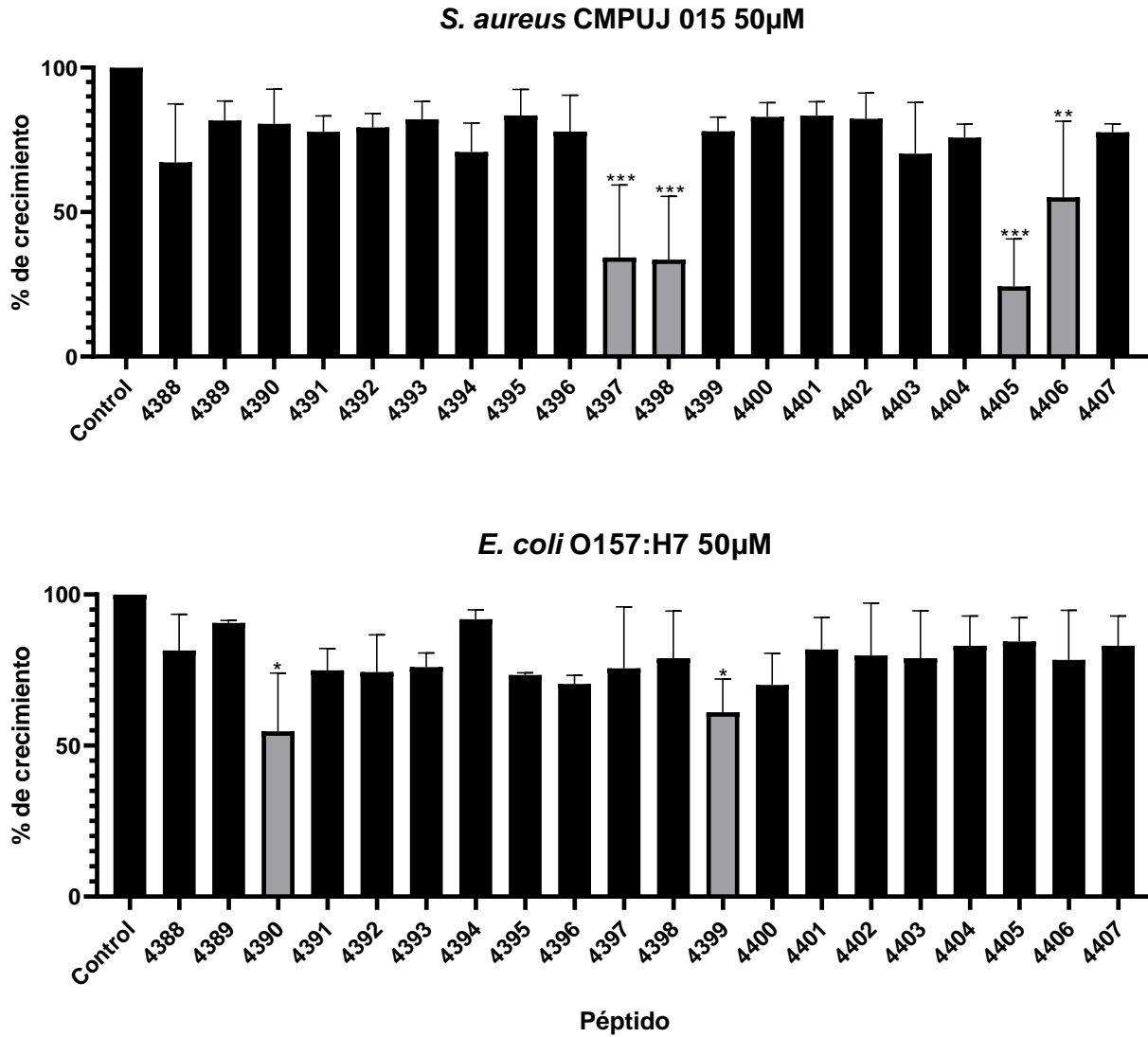
## 7.5 Actividad antimicrobiana

Todos los péptidos mostraron algún grado de actividad frente a las cepas evaluadas en una concentración igual o inferior a 50  $\mu\text{M}$  (Figura 20). Los péptidos 4397, 4398, 4405 y 4406 tuvieron mayor actividad inhibitoria sobre *S. aureus* CMPUJ015, mientras que los péptidos 4390 y 4399 tuvieron mejor actividad frente a *E. coli* O157:H7. El péptido 4397 presentó la menor CMI<sub>50</sub> (20  $\mu\text{M}$ ) frente a cepas de *S. aureus* (Tabla 7).

### Figura 20

*Cribado (screening) de actividad antimicrobiana a 50  $\mu\text{M}$  frente a *S. aureus* CMPUJ015 y *E. coli* O157:H7. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados son la media de tres valores  $\pm$  desviación estándar. Control de crecimiento. ANOVA de una vía realizado con GraphPad Prism.*

\*\*\*:  $p < 0.0001$ . \*\*:  $p < 0.005$ . \*:  $p < 0.05$ .



**Tabla 7**

*CM*<sub>50</sub> de los péptidos 4397, 4398, 4405 y 4406 frente a *S. aureus* CMPUJ015 y *S. aureus* ATCC 29213. Los datos que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Código de síntesis	CMI <sub>50</sub> (μM)	
	<i>S. aureus</i> CMPUJ015	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
4397	20	20
4398	30	30
4405	30	30
4406	>50	>50

El análogo 4398 se diseñó a partir de la sustitución de Y por K y D por I en la secuencia del péptido nativo 4397, con lo cual se logró aumentar su carga, GRAVY y PAP (Tabla 4). Además, el modelo de PepFold y los resultados de DC sugieren una estructura más helicoidal, y, por lo tanto, más estable (Figura 18A). El índice de inestabilidad también es menor. Estos cambios en la distribución de cargas, anfipaticidad, y estructura, redundan en una mayor profundidad, momento hidrofóbico y menor ángulo de inclinación del péptido 4398 en la membrana, como lo indican los modelos de posicionamiento en la membrana interna de bacterias Gram positivas obtenido mediante el programa PPM ([https://opm.phar.umich.edu/ppm\\_server3\\_cgopm](https://opm.phar.umich.edu/ppm_server3_cgopm)) (Figura 21A).

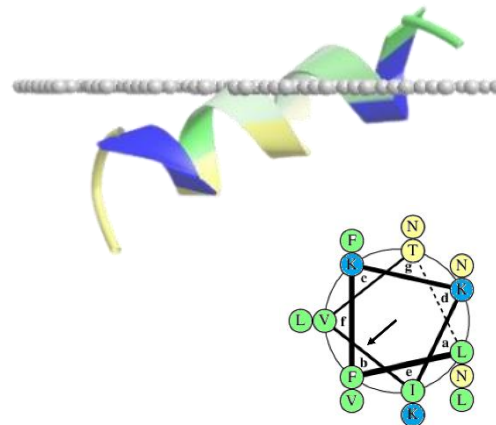
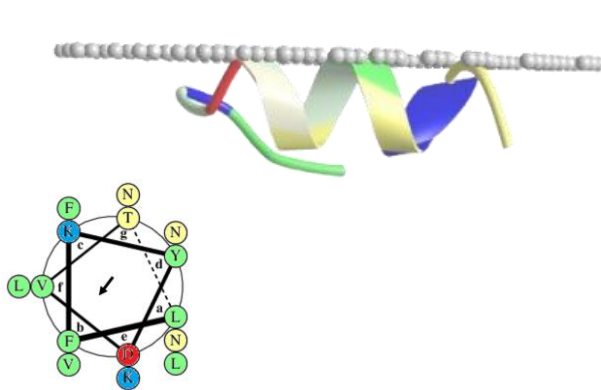
### Figura 21

*Propiedades fisicoquímicas de los péptidos 4397 y 4398.* A: Se utilizaron las estructuras predichas por PepFold para modelar el posicionamiento de los péptidos en la membrana interna de bacterias Gram positivas utilizando el servidor PPM. Los colores en la secuencia, diagrama de cintas y rueda helical indican los residuos por hidrofobicidad: Polar, hidrofóbico, carga positiva, carga negativa.

B: Mapas de potencial de hidrofobicidad molecular (MHP) correspondientes a la parte helicoidal de los péptidos. El eje X indica el ángulo de rotación alrededor del eje de la hélice, y el eje Y es la distancia a lo largo del eje de la hélice. Los valores de MHP se dan en unidades log P de octanol/agua y están codificados por colores según la escala que se muestra encima del panel izquierdo. Se indican las posiciones de los átomos de C $\alpha$  de cada aminoácido con una cruz. Los residuos 4Y, 5D, 4K, 5I se señalan en círculos rojos. Los mapas se generaron con el programa PLATINUM (Pyrkov *et al.*, 2009). C: Superficie electrostática obtenida con el complemento APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) de PyMOL. El color rojo indica el potencial negativo y el azul el potencial positivo. Las regiones blancas corresponden a potenciales neutros.

A      **4397:** LFKYDVTNVFNKLNL

**4398:** LFKKIVTNVFNKLNL



Profundidad/Espesor :  $3.0 \pm 0.9$   
hidrofóbico (Å)

Profundidad/Espesor :  $6.5 \pm 2.2$   
hidrofóbico (Å)

GRAVY : 0.107

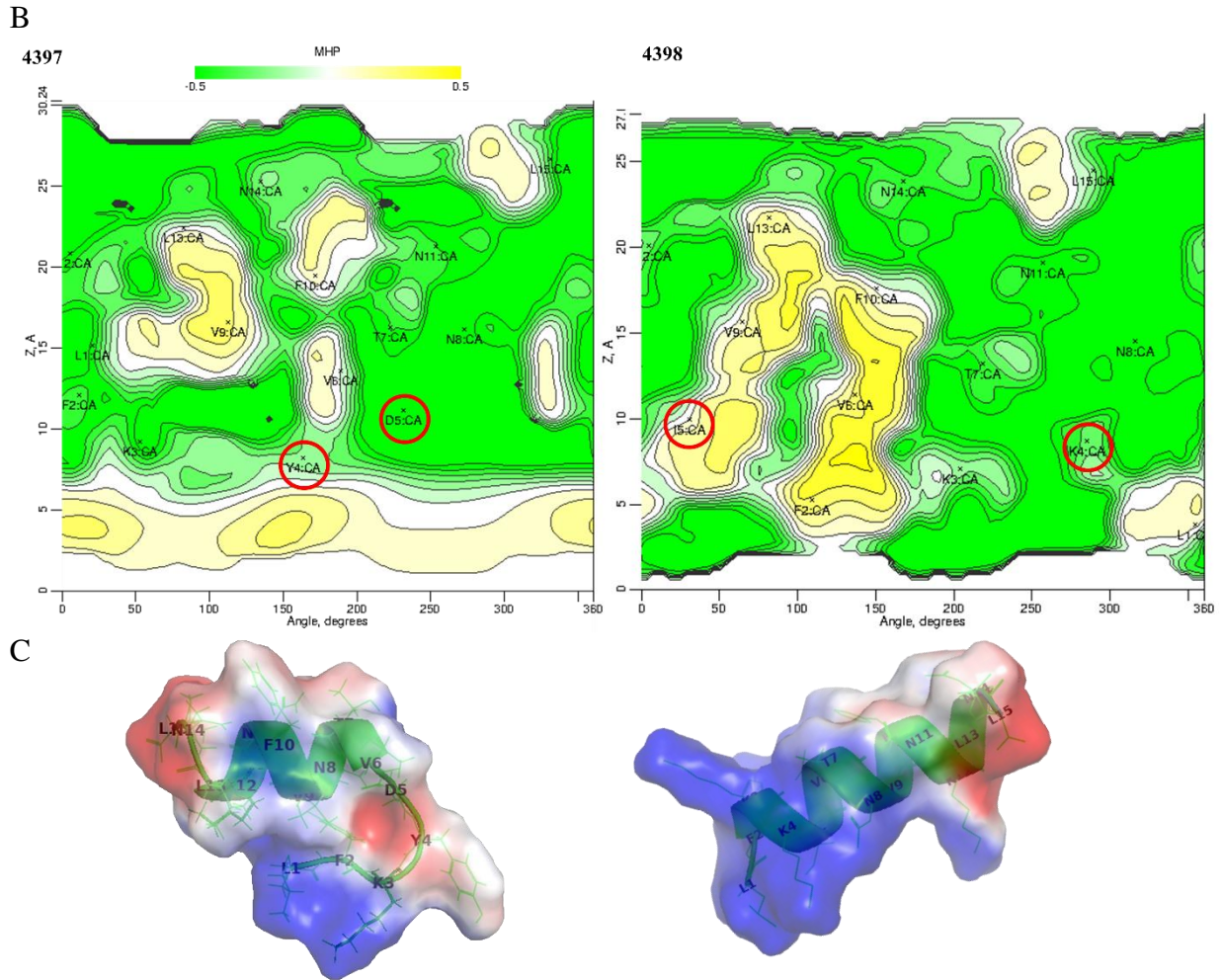
GRAVY : 0.467

Momento hidrofóbico ( $\mu\text{H}$ ) : 0.261

Momento hidrofóbico ( $\mu\text{H}$ ) : 0.473

Ángulo de inclinación ( $^\circ$ ) :  $85 \pm 13$

Ángulo de inclinación ( $^\circ$ ) :  $68 \pm 7$



La magnitud del momento hidrofóbico ( $\mu\text{H}$ ) es proporcional a la longitud del vector que se proyecta como una flecha desde el centro de la rueda helical, cuya longitud y dirección dependen de la hidrofobicidad y la ubicación de las cadenas laterales a lo largo del eje de la hélice (Figura 21A). Un mayor  $\mu\text{H}$  en el péptido 4398 indica que la hélice es más anfipática perpendicular a su eje. Además, los mapas de potencial de hidrofobicidad molecular (MHP) muestran cómo las sustituciones Y4K y D5I cambian la distribución de regiones hidrofóbicas en la superficie helicoidal de los péptidos (Dubovskii *et al.*, 2018; Pyrkov *et al.*, 2009) (Figura 21B). Algo similar ocurre con la superficie electrostática (Figura 21C). Sin embargo, estos cambios no alteraron la

actividad antimicrobiana, ya que el péptido 4398 se comportó de manera similar al péptido nativo 4397, tanto frente a *S. aureus* CMPUJ015 (inhibición de 65.73% y 66.47%, respectivamente), como frente a *E. coli* O157:H7 (inhibición de 6.1% y 5.1%, respectivamente). Por lo tanto, en este caso, una mayor carga e hidrofobicidad del análogo diseñado *in silico*, no incidió positivamente en la actividad antibacteriana en las cepas evaluadas. Se destaca que la actividad antimicrobiana de un péptido no solo está determinada por la presencia de aminoácidos específicos, sino también por su secuencia y estructura tridimensional. Del mismo modo, el contexto biológico es influyente, ya que algunos péptidos pueden disminuir su actividad antimicrobiana cuando son disueltos en diferentes medios, especialmente aquellos con altas concentraciones de sales o en suero (Ortiz López, 2019).

El ángulo de inclinación es un parámetro relevante para la actividad antimicrobiana y el mecanismo de acción, ya que afecta la capacidad del péptido para interactuar, insertarse, y desestabilizar las membranas bacterianas (Lomize *et al.*, 2022; Németh *et al.*, 2022; Stephani *et al.*, 2024). Por ejemplo, simulaciones de dinámica molecular revelaron que el péptido antimicrobiano melitina (obtenido de *Apis mellifera*) ancla su extremo C-terminal helicoidal y cargado positivamente en las cabezas hidrofílicas del lípido A del lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas, y su extremo N-terminal flexible interactúa con los grupos fosfato, facilitando su penetración en la membrana. La melitina sufre cambios conformacionales, acompañados de una reorientación y translocación en la superficie de la membrana, revelando que la inserción del péptido en la membrana externa afecta su permeabilidad y capacitancia, pero no altera la estructura de la bicapa de la membrana (Stephani *et al.*, 2024).

Lo anterior subraya la utilidad de las simulaciones de dinámica molecular en el estudio del mecanismo de acción de los PAMs. Estas simulaciones pueden proporcionar información valiosa

para comprender las diferencias en la actividad biológica de los PAMs evaluados frente a cepas Gram positivas y Gram negativas, ya que, debido a las dificultades experimentales para fabricar modelos de membranas celulares microbianas, la mayoría de los estudios sobre la acción de los PAMs se han realizado en bicapas de fosfolípidos, que solo se asemejan remotamente a las membranas celulares bacterianas (Stephani *et al.*, 2024).

En contraste, el análogo 4405, que exhibió una actividad inhibitoria tres veces superior contra *S. aureus* CMPUJ015 en comparación con el péptido nativo 4404, presenta mayor carga e hidrofobicidad. La sustitución R1I resta una carga positiva y aumenta la hidrofobicidad, mientras que los cambios E8I y E13K disminuyen las cargas negativas y aumentan la hidrofobicidad. El mapa de MHP (Figura 22) revela una mayor distribución de las regiones hidrofóbicas en la superficie helicoidal del análogo 4405 inducida por los residuos de I, lo cual se considera que promueve una mayor interacción del péptido con la región hidrofóbica de los fosfolípidos en la membrana de *S. aureus*, contribuyendo así a su actividad antimicrobiana.

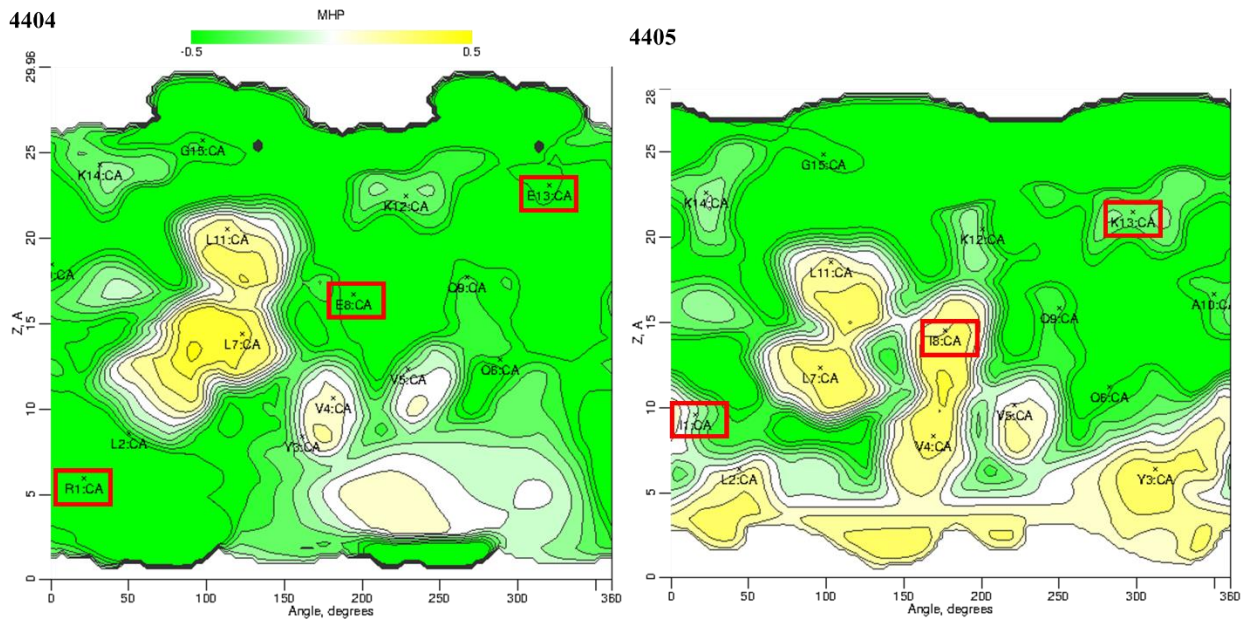
Aunque en la estructura del péptido 4405 son determinantes para su propiedad hidrófoba tres residuos de L y dos de I, la ubicación de leucina en la región helicoidal podría redundar en mayor actividad hemolítica. Por ejemplo, para el péptido Oxt 4a (derivado del veneno de la araña *Lachesana tarabaevi*), se descubrió que, tanto la actividad antimicrobiana como hemolítica, dependen de la presencia de cuatro residuos de L en la región helicoidal, ya que al sustituir estos residuos de L por K, ambas actividades se pierden (Dubovskii *et al.*, 2018).

Asimismo, se considera que la presencia de tres residuos de K consecutivos en el análogo 4405, aporta a la mayor actividad antimicrobiana, ya que, como señalan otros estudios, la menor flexibilidad de los residuos de lisina, contribuye a una mayor interacción con las membranas celulares bacterianas al reducir su capacidad de translocación (Carvajal-Rondanelli *et al.*, 2016;

Guzmán *et al.*, 2013). La interacción de las cadenas laterales de K con las cabezas polares de los fosfolípidos en la membrana bacteriana implica una fuerte interacción electrostática, lo que facilita su penetración en el núcleo de la membrana bacteriana. La orientación de K en la conformación del péptido también se ha identificado como un factor crucial para una interacción óptima con los lípidos de la membrana (Carvajal-Rondanelli *et al.*, 2016; Guzmán *et al.*, 2013). Como resultado, la mayor actividad antimicrobiana del análogo 4405, probablemente esté relacionada con una interacción más estable y prolongada con la membrana bacteriana.

## **Figura 22**

*Potencial de hidrofobicidad molecular (MHP) de los péptidos 4404 y 4405.* Los valores de MHP se dan en unidades log P de octanol/agua y están codificados por colores según la escala que se muestra encima del panel izquierdo. Se indican las posiciones de los átomos de Ca de cada aminoácido con una cruz. En rojo se señalan los residuos 1, 8 y 13. Los mapas se generaron con el programa PLATINUM.



De otro lado, si bien el péptido 4390 obtuvo un porcentaje de inhibición de 37.59% frente a *E. coli* O157:H7, ninguno alcanzó una  $CMI_{50}$  menor o igual a  $50 \mu\text{M}$  para esta cepa. Anteriormente, se creía que los péptidos activos frente a bacterias Gram positivas solían tener una carga neta positiva y una estructura más rígida, mientras que los péptidos activos frente a bacterias Gram negativas tenían una carga neta negativa y una estructura más flexible (Brtz-Oesterhelt & Sass, 2010; Hancock & Sahl, 2006; Y. Li *et al.*, 2012; Pasupuleti *et al.*, 2012). Sin embargo, estudios más recientes muestran que los péptidos catiónicos, en particular los homopéptidos de lisina, son activos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Carvajal-Rondanelli *et al.*, 2016). Actualmente, los modelos y estudios empíricos demuestran que los péptidos con carga positiva son activos frente a bacterias Gram negativas, por el hecho de que la membrana externa de esas bacterias tienen abundancia de fosfolípidos con carga negativa, además del LPS, que pueden interactuar con los aminoácidos con carga positiva (Gong *et al.*, 2023).

Además de la interacción directa con las membranas bacterianas, los péptidos también pueden asociarse con otros componentes del medio de cultivo, como soluciones tampón, proteínas y ácidos nucleicos bacterianos, o pueden adsorberse en la superficie de las microplacas (Gong *et al.*, 2023). Varias variables pueden influir en la eficacia de los péptidos antimicrobianos, como la salinidad del medio y la presencia de alteraciones en la membrana externa de la cepa bacteriana, lo que podría explicar los bajos niveles de inhibición observados en general.

## 7.6 Análogos del péptido 4397 y scan de alanina

La optimización de la acción de los PAMs, y el estudio del mecanismo de actividad antibacteriana, generalmente se logra reemplazando residuos clave, por ejemplo, R por K o viceversa. Estos aminoácidos catiónicos están implicados en el aumento de la carga positiva, la disminución de la toxicidad, y la reducción de la CMI (Carvajal-Rondanelli *et al.*, 2016). Por este motivo, los análogos 4752, 4753, 4754 y 4755, se diseñaron a partir de la sustitución de F por K o R en la secuencia del péptido nativo 4397. Dado que la fenilalanina es un aminoácido aromático, apolar y neutro, se esperaba que estas modificaciones aumentaran la carga neta del péptido y, por ende, su interacción electrostática con la membrana celular bacteriana, lo cual podría potenciar su actividad biológica. Sin embargo, esto no sucedió (Tabla 8). Esto refuerza que la actividad del péptido 4397 depende de otros factores estructurales y de su hidrofobicidad, más que de su carga neta.

En términos generales, los resultados del scan de alanina revelaron aquellos residuos importantes para la actividad biológica de los péptidos. Por ejemplo, la sustitución N11A en el

péptido 4397, disminuyó significativamente su actividad antimicrobiana, demostrando ser particularmente importante (Tabla 8). Se propone que la asparagina juega un rol clave en la anfipaticidad de la hélice, contribuyendo así a su actividad antimicrobiana. Algunos estudios señalan que la asparagina, al formar puentes de hidrógeno con otros aminoácidos en la cadena peptídica, puede afectar la estructura y la carga neta del péptido, y, por lo tanto, influir en la actividad antimicrobiana (L. Liu *et al.*, 2013; W.-P. Liu *et al.*, 2015).

Por otro lado, la sustitución N5A en el péptido 4719 (análogo del 4406), fue la única que no disminuyó su actividad antimicrobiana, lo que sugiere que la alanina y la asparagina pueden tener diferentes efectos dependiendo del contexto estructural y químico en el que se encuentren. Ambas pueden interactuar con la membrana celular bacteriana a través de interacciones hidrofóbicas, aunque es importante destacar que las funciones específicas de cada aminoácido pueden variar ampliamente dependiendo del péptido específico y la bacteria contra la que está dirigida.

En cuanto al péptido 4405, la sustitución G15A en el análogo 4743, podría tener impacto en su actividad antimicrobiana, al influir en su estabilidad estructural. La glicina tiene como grupo R un átomo de hidrógeno, lo que le confiere una alta capacidad de solubilidad en agua. En contraste, la alanina presenta un grupo metilo en su grupo R, haciéndola más hidrofóbica (Chen *et al.*, 2005, 2007). Esta diferencia es relevante, ya que el grupo metilo de la alanina puede favorecer la formación de interacciones hidrofóbicas intramoleculares, lo que potencialmente aumenta la rigidez del péptido y, por ende, contribuye a su actividad antimicrobiana (Bhattacharjya & Ramamoorthy, 2009).

La leucina también reveló ser un residuo importante para la actividad del péptido 4405, ya que la sustitución L7A en el análogo 4736 disminuyó su actividad antimicrobiana (Tabla 8). La

leucina es un aminoácido hidrofóbico y alifático que tiene una cadena lateral más larga que la alanina. Esto significa que la leucina puede tener un mayor efecto hidrofóbico en la interacción con la bicapa lipídica de la membrana celular bacteriana (Carvajal-Rondanelli *et al.*, 2018; Santos-Filho *et al.*, 2022). Además, la leucina puede ser más flexible en la conformación estructural del péptido, y permitir una mejor adaptación a la membrana bacteriana (L. Liu *et al.*, 2013). Algunos estudios sugieren que la sustitución de aminoácidos polares por leucina puede aumentar la actividad antimicrobiana debido a una mayor interacción hidrofóbica con la bicapa lipídica de la membrana celular bacteriana. Además, se ha reportado que la presencia de múltiples leucinas en un péptido puede aumentar su capacidad para formar estructuras alfa helicoidales, que pueden ser importantes para la interacción con la membrana bacteriana (L. Liu *et al.*, 2013).

**Tabla 8**

*Actividad antimicrobiana a 30 μM frente a S. aureus ATCC43300.* A→: residuo sustituido por alanina. CP: control positivo. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados son la media de tres valores ± desviación estándar. ANOVA de una vía realizado con GraphPad Prism. \*\*\*:  $p < 0.0001$ . \*\*:  $p < 0.005$ . \*:  $p < 0.05$ .

Código de síntesis	A →	Inhibición (%)		Código de síntesis	A →	Inhibición (%)	
		7h	22h			7h	22h
4397	-	65.7 (±7.3)	8.9 (±2.3)	4398	-	57 (±2.7)	14.9 (±2.2)
4685	L	27.3 (±16.7) *	17.5 (±5.9)	4700	L	33.7 (±8.2)	4.5 (±0.9)
4686	F	41.2 (±5.7)	23.1 (±0.8)	4701	F	34.7 (±2.2)	18.7 (±3.2)

4687	K	49.7 ( $\pm$ 19.2)	30.8 ( $\pm$ 2.3)	4702	K	47 ( $\pm$ 2.5)	15 ( $\pm$ 1.2)
4688	Y	34.2 ( $\pm$ 5.3)	17.4 ( $\pm$ 2.3)	4703	K	43.4 ( $\pm$ 5.9)	23.6 ( $\pm$ 7.6)
4689	D	41.5 ( $\pm$ 12.6)	20.7 ( $\pm$ 2.2)	4704	I	41.4 ( $\pm$ 9.5)	26.1 ( $\pm$ 2.2)
4690	V	43.8 ( $\pm$ 16.5)	17.7 ( $\pm$ 5.2)	4705	V	50.9 ( $\pm$ 11.0)	26 ( $\pm$ 5.1)
4691	T	49.2 ( $\pm$ 0.4)	28.9 ( $\pm$ 2.3)	4706	T	36.4 ( $\pm$ 2.3) *	21.3 ( $\pm$ 0.5)
4692	N	41 ( $\pm$ 4.6)	9.1 ( $\pm$ 5.5)	4707	N	57.8 ( $\pm$ 3.4)	14.6 ( $\pm$ 1.7)
4693	V	30.7 ( $\pm$ 8.2)	33.8 ( $\pm$ 0.1) *	4708	V	27.8 ( $\pm$ 8.8) *	14.6 ( $\pm$ 0.5)
4694	F	39.7 ( $\pm$ 10.9)	26 ( $\pm$ 3.0)	4709	F	46.8 ( $\pm$ 2.1)	31.3 ( $\pm$ 13.4)
4695	N	16.5 ( $\pm$ 2.3) *	18.3 ( $\pm$ 5.5)	4710	N	45.4 ( $\pm$ 24.7) *	32.9 ( $\pm$ 18.6)
4696	K	35 ( $\pm$ 1.4)	23.4 ( $\pm$ 8.6)	4711	K	34.9 ( $\pm$ 2.5) *	21.8 ( $\pm$ 9.1)
4697	L	35.2 ( $\pm$ 0.5)	21.1 ( $\pm$ 7.5)	4712	L	59 ( $\pm$ 6.3)	21.6 ( $\pm$ 11.3)
4698	N	24 ( $\pm$ 17.7)	21.1 ( $\pm$ 0.4)	4713	N	49.8 ( $\pm$ 6.3)	23.8 ( $\pm$ 9.7)
4699	L	29.3 ( $\pm$ 11.5) *	12.8 ( $\pm$ 0.3)	4714	L	43 ( $\pm$ 2.3)	24 ( $\pm$ 11.1)
4752	-	32.5 ( $\pm$ 7.3)	25.8 ( $\pm$ 7.6)	<b>4406</b>	-	44.9 ( $\pm$ 11.0)	36 ( $\pm$ 2.1)
4753	-	22.9 ( $\pm$ 16.1)	16.9 ( $\pm$ 2.7)	4715	L	27.5 ( $\pm$ 9.9)	30.6 ( $\pm$ 7.7)
4754	-	25.3 ( $\pm$ 20.3)	35.8 ( $\pm$ 9.6)	4716	C	32.7 ( $\pm$ 3.0)	28.8 ( $\pm$ 8.0)
4755	-	37.8 ( $\pm$ 25.6)	26.7 ( $\pm$ 7.2)	4717	K	32.9 ( $\pm$ 5.6)	28.7 ( $\pm$ 3.1)
<b>4405</b>	-	63.4( $\pm$ 3.1)	35.9 ( $\pm$ 11.6)	4718	S	28.9 ( $\pm$ 7.2) *	25.8 ( $\pm$ 0.1)
4730	I	55.3 ( $\pm$ 13.3)	33.5 ( $\pm$ 2.8)	4719	N	48.3 ( $\pm$ 20.7)	54.5 ( $\pm$ 2.3) *

4731	L	48.4 (±8.0)	25.8 (±3.3)	4720	K	35.5 (±3.1)	27.5 (±1.5)
4732	Y	58.2 (±11.5)	21 (±2.3)	4721	R	35 (±1.2)	30 (±10.8)
4733	V	44.7 (±7.9)	41.2 (±2.2)	4722	I	30.7 (±2.8)	34.9 (±7.9)
4734	V	55.9 (±32.3) *	26.2 (±5.6)	4723	Y	35.8 (±4.1)	43.7 (±20.9)
4735	Q	87.5 (±17.6) **	98.8 (±0.9) ***	4724	I	26.7 (±10.1) *	30.8 (±8.2)
4736	L	28.3 (±20.3) *	30.7 (±8.6)	4725	V	28.2 (±10.2) *	30.7 (±7.1)
4737	I	45.9 (±3.6)	33.8 (±4.4)	4726	V	25.2 (±10.1) *	24.3 (±1.2)
4738	Q	92.7 (±2.0) **	99.8 (±0.1) ***	4727	E	34.4 (±2.2)	23.7 (±1.9)
4739	A	35.1 (±8.9)	31.7 (±8.8)	4728	D	36.7 (±4.4)	12.6 (±2.0)
4740	K	53 (±0.2) *	19.6 (±11.1)	4729	H	40.9 (±1.6)	24.9 (±8.9)
4741	K	44.7 (±1.1) *	44.7 (±2.1) *	<b>1951</b>	-	90.7 (±0.2)	97.9 (±2.0)
4742	K	34.3 (±11.0)	5.9 (±3.4) *	<b>(CP)</b>			
4743	G	78.3 (±21.4) **	34.1 (±3.8)				

### 7.7 Análogos 4735 y 4738

Los resultados más interesantes se encuentran en los análogos 4735 y 4738, que corresponden a cambios de Q por A en las posiciones 6 y 9 del péptido 4405 (Tabla 8). Estas sustituciones aumentaron significativamente la actividad antimicrobiana y redujeron la CMI<sub>50</sub> (Tabla 9). La alanina ha demostrado ser importante en la actividad antimicrobiana de otros péptidos antimicrobianos como las defensinas (Chen *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que la sustitución de aminoácidos hidrofóbicos por alanina en el péptido magainina-2, aumenta su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Hirano *et al.*, 2021).

**Tabla 9**

CMI<sub>50</sub> de los péptidos 4405, 4735 y 4738 frente a *S. aureus* ATCC 43300. Los datos que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

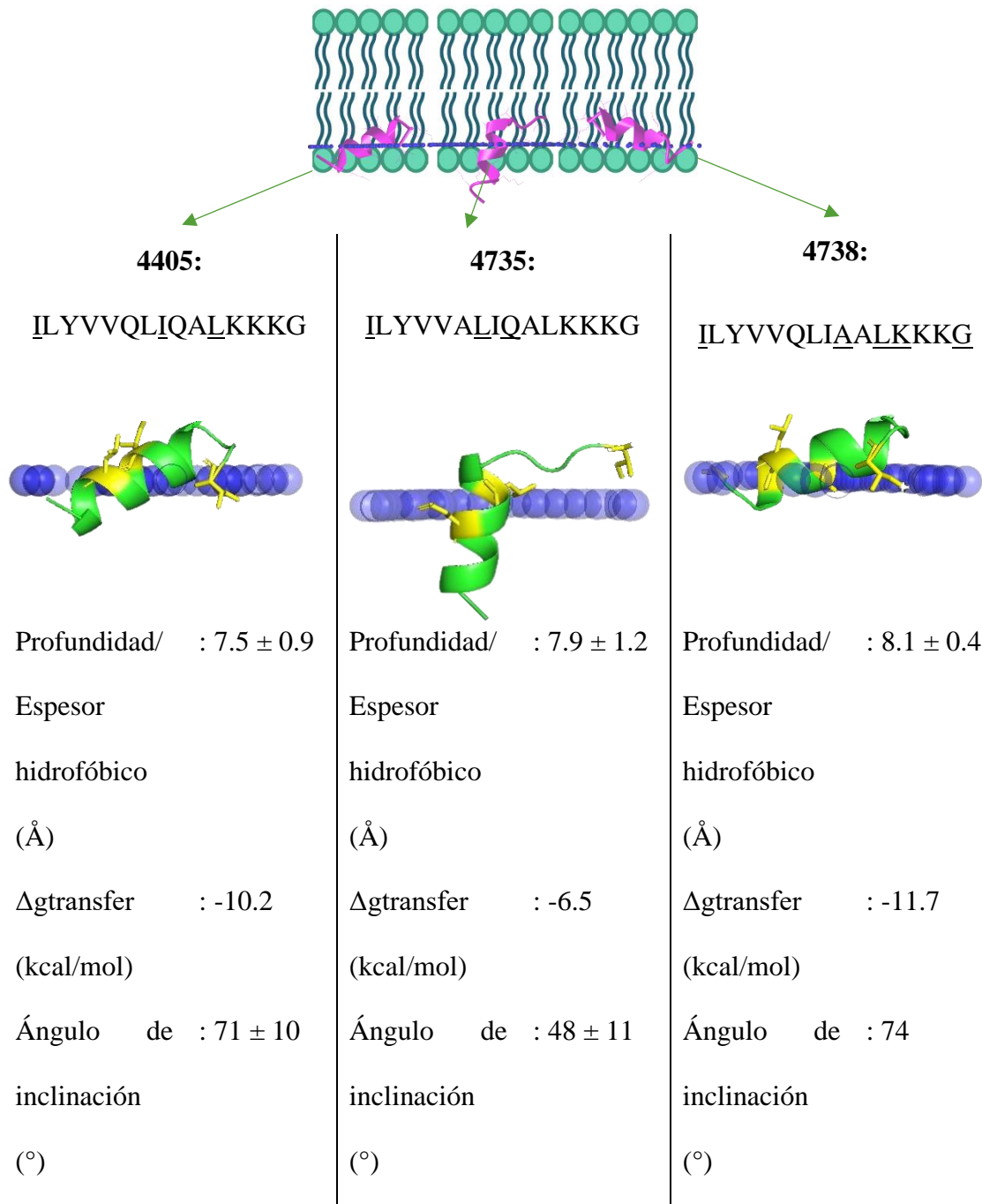
Péptido	Secuencia	CMI <sub>50</sub> (µM)	
		8 h	22 h
4405	ILYVVQLIQALKKKKG	30	30
4735	ILYVV <b>A</b> LIQALKKKKG	15	7.5
4738	ILYVVQLI <b>A</b> ALKKKKG	30	15

Para indagar cómo las sustituciones de Q por A en el péptido 4405 pueden influir en la actividad antimicrobiana, se realizó un modelo de posicionamiento de los péptidos en la membrana interna de bacterias Gram positivas utilizando el programa PPM

([https://opm.phar.umich.edu/ppm\\_server3\\_cgopm](https://opm.phar.umich.edu/ppm_server3_cgopm)) (Figura 23). A partir de este modelo, se discute cómo la anfipaticidad puede aportar a la actividad antibacteriana.

### **Figura 23**

*Modelo de posicionamiento de los péptidos 4405, 4735 y 4738 en la membrana de bacterias Gram positivas.* Los residuos embebidos en la cola hidrofóbica de los fosfolípidos se subrayan en la secuencia peptídica y se resaltan en amarillo en el modelo. Se utilizaron las estructuras predichas por PepFold para modelar el posicionamiento de los péptidos en la membrana interna de bacterias Gram positivas utilizando el servidor PPM. El origen de las coordenadas corresponde al centro de la bicapa lipídica. Las posiciones de los átomos DUMMY (esferas azules) corresponden a los límites de la membrana al nivel de los grupos carbonilo lipídico. La profundidad de penetración en la membrana o espesor hidrofóbico indica la profundidad de penetración máxima de los átomos de los péptidos en el núcleo de hidrocarburos lipídicos. El ángulo de inclinación se calcula entre la membrana normal (eje Z) y el eje del péptido. El eje del péptido se calcula como la suma de los vectores de segmentos de la estructura secundaria. La energía de transferencia calculada corresponde a la energía de unión de los péptidos a la bicapa lipídica (Pogozheva *et al.*, 2013).

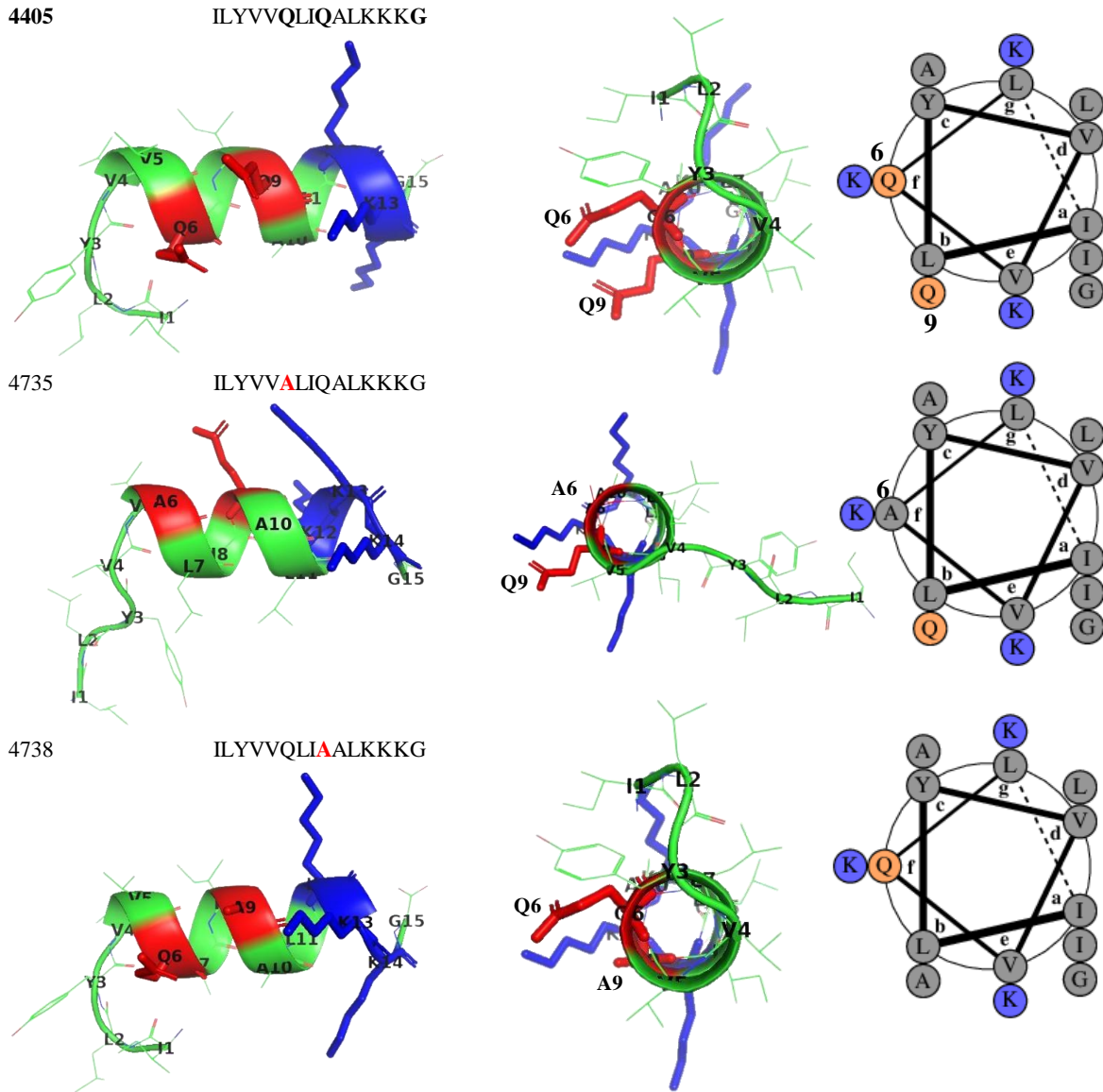


Los péptidos se orientan de modo que los residuos de lisina terminales apuntan hacia las cabezas de los fosfolípidos. La sustitución Q6A en el péptido 4735, le otorga mayor flexibilidad a la región no helicoidal del péptido, permitiendo, posiblemente, una mayor interacción con las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos. Los valores negativos del cambio en la energía libre de

transferencia ( $\Delta g_{transfer}$ ) indican que la transferencia desde un medio acuoso a la membrana bacteriana es favorable, es decir, que el péptido tiene una tendencia a insertarse en la membrana. En la Figura 24 se ofrece una representación esquemática de los modelos de estructura secundaria, resaltando las cadenas laterales de los residuos de glutamina y lisina.

### **Figura 24**

*Estructura secundaria de los péptidos 4405, 4735 y 4738. En rojo se señalan las sustituciones de Q por A. En azul se resaltan los residuos de K. Modelos realizados con PepFold y diagrama de rueda helical elaborado con DrawCoil 1.0. <https://grigoryanlab.org/drawcoil/>*



La sustitución de Q por A en los análogos 4735 y 4738 resultó en un aumento del índice GRAVY y en una mayor profundidad de penetración en la membrana en comparación al péptido 4405. Sin embargo, no se observaron grandes diferencias en la magnitud del momento hidrofóbico determinado mediante el programa HeliQuest (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) (Figura 25).

En estudios recientes, se ha observado que los péptidos con una alta proporción de arginina tienden a aumentar la penetración celular, lo que se correlaciona con un mayor momento hidrofóbico. Sin embargo, esta característica no necesariamente conduce a una mayor actividad antimicrobiana (Ohgita *et al.*, 2019; Takechi-Haraya *et al.*, 2022). De hecho, se ha reportado que el aumento de la anfipaticidad de los péptidos alfa-helicoidales ricos en arginina no siempre mejora la capacidad de penetración celular, pero si puede aumentar la citotoxicidad relacionada con la integridad de la membrana (Takechi-Haraya *et al.*, 2022). De todas formas, se destaca que existe una correlación entre el nivel de perturbación necesario en la membrana para facilitar la penetración directa del péptido, y su momento hidrofóbico.

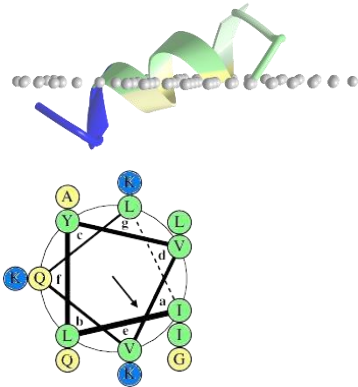
### Figura 25

*Propiedades fisicoquímicas de los péptidos 4405, 4735 y 4738.* A: Se utilizaron las estructuras predichas por PepFold para modelar el posicionamiento de los péptidos en la membrana interna de bacterias Gram positivas utilizando el servidor PPM. Los colores en la secuencia, diagrama de cintas y rueda helical indican los residuos por hidrofobicidad: Polar, hidrofóbico, carga positiva, según la escala de Wimley-White (Wimley & White, 1996). B: Mapas de potencial de hidrofobicidad molecular (MHP), correspondientes a la parte helicoidal de los péptidos. Los valores de MHP se dan en unidades log P de octanol/agua y están codificados por colores según la escala que se muestra encima del panel izquierdo. Se indican las posiciones de los átomos de C $\alpha$  de cada aminoácido con una cruz. En rojo se señalan los residuos 6 y 9. Los mapas se generaron con el programa PLATINUM. C: Superficie electrostática obtenida con el complemento APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) de PyMOL. El color rojo indica el potencial negativo y el azul el potencial positivo. Las regiones blancas corresponden a potenciales neutros.

A

4405:

ILYVVQLIQALKKKG



Profundidad/ :  $7.5 \pm 0.9$

Espesor

hidrofóbico

(Å)

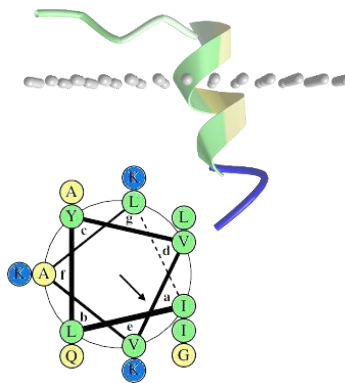
GRAVY : 0.680

Momento : 0.332

hidrofóbico

4735:

ILYVVALIQALKKKG



Profundidad/ :  $7.9 \pm 1.2$

Espesor

hidrofóbico

(Å)

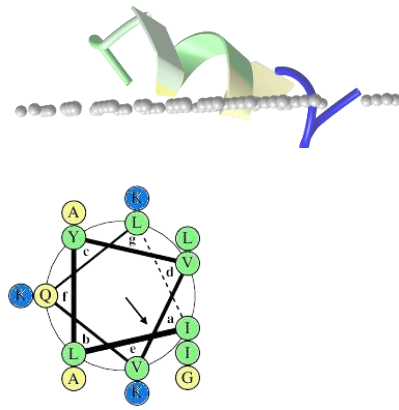
GRAVY : 1.033

Momento : 0.297

hidrofóbico

4738:

ILYVVQLIAALKKKG



Profundidad/ :  $8.1 \pm 0.4$

Espesor

hidrofóbico

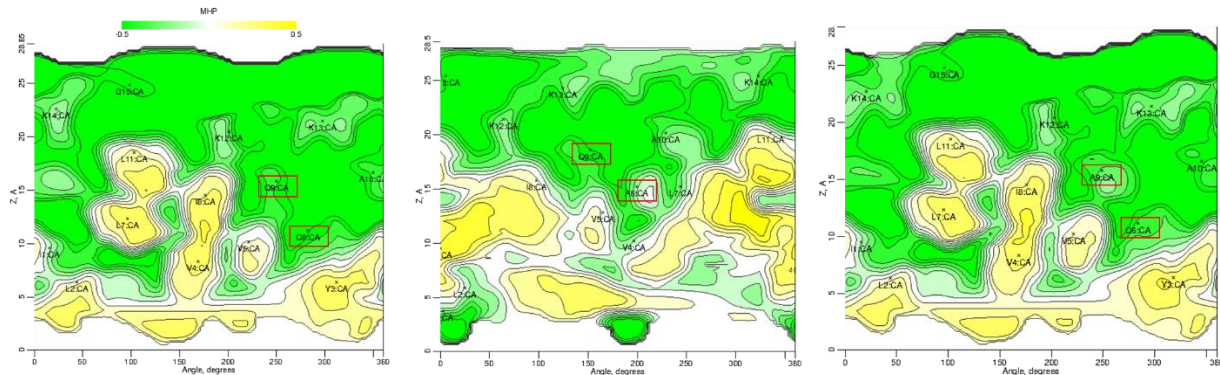
(Å)

GRAVY : 1.033

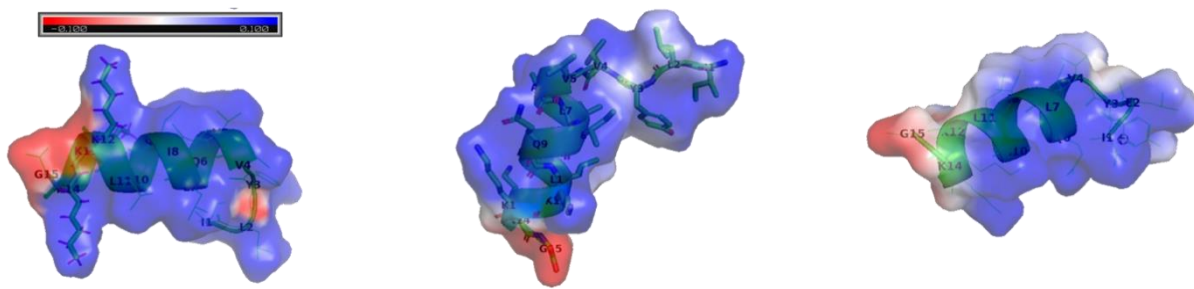
Momento : 0.312

hidrofóbico

B



C



En el modelo se observa que los residuos hidrofóbicos de la hélice anfipática se orientan hacia las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos, mientras que los residuos de A y Q se orientan hacia las cabezas polares de los fosfolípidos. Sin embargo, la magnitud del momento hidrofóbico no sugiere una separación clara entre las caras polares y apolares. La escala de hidrofobicidad de residuos totales de Wimley-White incluye las contribuciones de los enlaces peptídicos y las cadenas laterales a la energía libre de transferencia ( $\Delta G_X^{\text{residuo}}$ ). La magnitud de  $\Delta G_X^{\text{residuo}}$  en la escala interfacial para la alanina es  $0.17 \pm 0.06$  kcal/mol y para la glutamina es  $0.58 \pm 0.08$  kcal/mol. Cuanto más positivo sea el valor de  $\Delta G_X^{\text{residuo}}$ , más hidrofóbicos serán los aminoácidos ubicados en esa región del péptido (Wimley & White, 1996).

Después de la fuerza electrostática, la hidrofobicidad es la segunda fuerza que impulsa el péptido hacia la membrana, y le permite insertarse en su núcleo hidrofóbico (Lima *et al.*, 2021). El momento hidrofóbico es la capacidad del péptido de cambiar de una cara polar a una cara hidrofóbica en el momento de insertarse en la membrana. En la revisión de Lima *et. al* 2021, se analiza un estudio en el que la disminución del momento hidrofóbico del péptido sintético Hp1404-T1 ( $\mu H=0.699$ ), redujo significativamente su actividad antimicrobiana en comparación con Hp1404-T1e ( $\mu H=0.831$ ). En este estudio, se discute que el aumento de la hidrofobicidad de la cara apolar de un péptido anfipático alfa-helicoidal mejora la actividad antimicrobiana. Como ejemplo, menciona el péptido HP (2-20, AKKVFKRLEKLFISKIQNDK) derivado del extremo N-terminal de la proteína ribosomal L1 (RPL1) de *Helicobacter pylori*. En el estudio citado, la sustitución de Q y N por dos residuos de W, en las posiciones 17 y 19 de HP, mejoró la hidrofobicidad y condujo a un aumento en la actividad antimicrobiana, sin alteración en la actividad hemolítica. Por el contrario, la reducción de la hidrofobicidad, al sustituir L y F por S, en las posiciones 12 y 13 de HP, disminuyó la actividad antimicrobiana en comparación con HP. Por lo tanto, la hidrofobicidad de los péptidos es crítica para su actividad antimicrobiana, y puede ser uno de los parámetros determinantes para la interacción de los péptidos con las bicapas lipídicas de la membrana celular (Lima *et al.*, 2021).

Con base en lo anterior, se puede concluir que, aunque están correlacionados, no hubo acción dirigida entre la hidrofobicidad y el momento hidrofóbico para el péptido 4405 y sus análogos 4735 y 4738. Lo que se sabe es que ambos son fundamentales para la inserción de los péptidos en la membrana bacteriana. Como se indicó anteriormente, el potencial electrostático es útil en la atracción primaria del péptido a la membrana. Después de eso, todo el proceso está impulsado por la hidrofobicidad y el momento hidrofóbico. La hidrofobicidad es importante para

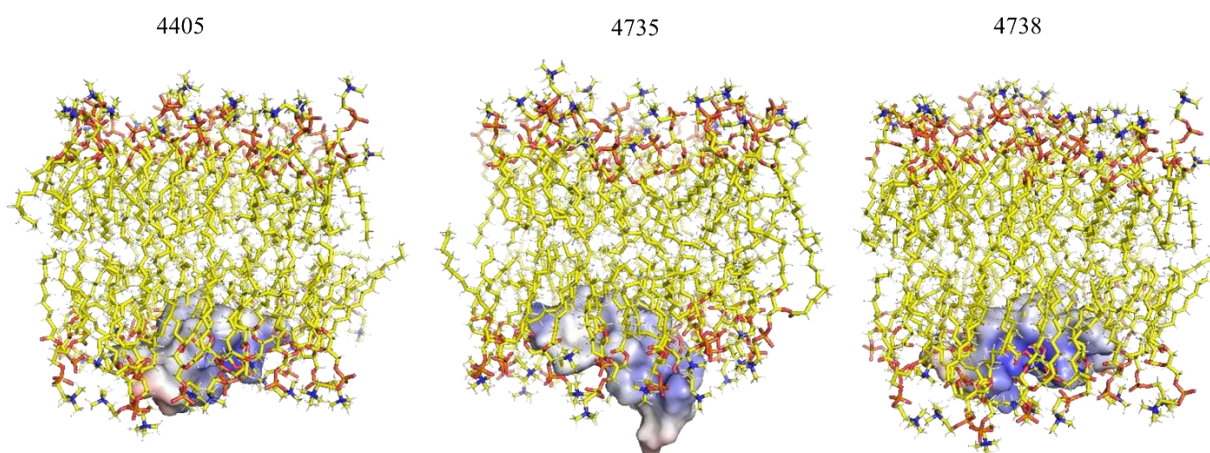
que los péptidos interactúen con la porción hidrofóbica de los lípidos en el núcleo hidrofóbico de la membrana.

Ahora bien, además de los mecanismos de acción a nivel de membrana, recientes estudios han demostrado que muchos PAMs se dirigen a componentes y funciones celulares esenciales, resultando en la muerte bacteriana (Erdem Büyükkiraz & Kesmen, 2022). Estos PAMs primero se trasladan a la membrana celular sin perturbarla, y luego inhiben procesos celulares críticos al interactuar con objetivos intracelulares. Se han descrito mecanismos como la inhibición de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, y la degradación de enzimas y proteínas. Por ejemplo, péptidos ricos en prolina (caracterizados por su alto contenido de residuos de prolina y arginina) como la batenecina 7 (Bac7) de bovinos y Tur1A de delfines (*Tursiops truncatus*), ejercen un efecto inhibitorio al interactuar con el ribosoma e inhiben la traducción al bloquear la transición de la fase de iniciación a la de elongación (Mardirossian *et al.*, 2018).

Recientemente, se han introducido enfoques computacionales para comprender los efectos de las modificaciones estructurales en las propiedades fisicoquímicas, la estabilidad y la actividad de los PAMs. Estos enfoques también ayudan a comprender mejor el mecanismo de acción, y a predecir sus actividades. En este sentido, se proyectó el posicionamiento de los péptidos 4405, 4735 y 4738 sobre membranas de 1,2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DLPC), lo que permite previsualizar las interacciones entre los péptidos y la membrana (Figura 26). Esto puede servir como base para futuros estudios de dinámica molecular, los cuales pueden proporcionar información útil para dilucidar el mecanismo de acción. Del mismo modo, imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal, son necesarias para analizar y validar las predicciones *in silico*.

**Figura 26**

Visualización de las propiedades electrostáticas de los péptidos 4405, 4735 y 4738, proyectadas sobre bicapas lipídicas de DLPC. El modelo fue generado con PyMOL, mediante el complemento APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*). El color rojo en la superficie de los péptidos indica el potencial negativo, el azul el potencial positivo y las regiones blancas corresponden a potenciales neutros.



En relación a la CMI, los resultados obtenidos son comparables con otros estudios que emplean la metodología de microdilución en caldo (Carvajal-Rondanelli *et al.*, 2016; Okella *et al.*, 2021; Ortiz López, 2019; Prada *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2023; Zhong *et al.*, 2013). Para evaluar mejor la CMI de los péptidos, es necesario realizar ensayos que consideren distintas variables, especialmente las concentraciones de sales, ya que algunos péptidos incrementan su actividad en determinadas condiciones y con aditivos específicos (Mercer *et al.*, 2020). Por ejemplo, la daptomicina requiere concentraciones fisiológicas de calcio (50 mg/L) en el medio, de lo contrario, los valores de CMI pueden ser hasta 32 veces mayores (Campeau *et al.*, 2018). Por tal motivo, CLSI recomienda complementar el medio MH con  $\text{Ca}^{2+}$  (Patel *et al.*, 2015). Otro

ejemplo, son los antibióticos lipoglicopéptidos, como oritavancina, dalbavancina y teicoplanina, que pueden unirse al material plástico de laboratorio (Ross *et al.*, 2014). Por consiguiente, CLSI recomienda agregar polisorbato 80 (Tween 80) al 0,002 % (v/v) al medio MH para evitar dicha unión (Patel *et al.*, 2015). Además, hay que tener en cuenta los factores relacionados con la cepa a evaluar. Por ejemplo, cuando se prueba la sensibilidad de fenotipos SARM (resistencia a la oxacilina) CLSI recomienda complementar los medios con un 2 % (p/v) de NaCl para mejorar la expresión de la resistencia mediada por *mecA*, y reducir los falsos negativos, que aumentan con un 5 % (p/v) de NaCl. Además, sugiere incubar las muestras a 33–35 °C, ya que a temperaturas superiores puede no detectarse la resistencia mediada por *mecA* (Patel *et al.*, 2015). Por lo tanto, como es viable realizar ajustes específicos en los métodos estándar para diferentes antimicrobianos, debería ser posible también para los PAMs en desarrollo preclínico. Además, los criterios de valoración para los PAMs no necesariamente deben equivaler a una inhibición completa del crecimiento, pero cualquier desviación de los protocolos estándar requerirá una justificación y validación rigurosas (Mercer *et al.*, 2020).

**Objetivo específico 4:** Evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica y hemolítica de los péptidos con mayor actividad antimicrobiana.

## 7.8 Actividad citotóxica

En términos generales, los péptidos evaluados no presentaron efectos sobre la viabilidad de las células HaCat y Vero, aún en concentraciones mayores a la CMI<sub>50</sub> (Tabla 10). La CC<sub>50</sub> es >50 µM en todos los casos. Por lo tanto, la proyección del IS para el péptido 4735 es >6.6 (50/7.5) y para el péptido 4738 es >3.3 (50/15), lo que sugiere una mayor selectividad hacia las membranas bacterianas que sobre las membranas de las células de los mamíferos.

**Tabla 10**

*Actividad citotóxica sobre células HaCat y Vero.* Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados son la media de tres valores ± desviación estándar.

Código de síntesis	Porcentaje de viabilidad celular							
	Concentración µM							
	[50]		[25]		[12.5]		[6.25]	
	HaCat	Vero	HaCat	Vero	HaCat	Vero	HaCat	Vero
4397	85.2	86.9	86.5	83.9	78.3	80.3	88.2	87.3
	(± 4.7)	(± 5.6)	(± 0.3)	(± 4.6)	(± 3.8)	(± 1.4)	(± 3.7)	(± 1.2)
4398	72.3	79.2	79.5	86.6	82.3	86.8	93.4	92.0

	(± 1.8)	(± 0.7)	(± 1.4)	(± 9.2)	(± 4.6)	(± 4.5)	(± 7.8)	(± 9.5)
<b>4405</b>	82.1	100	74.6	93.0	85.8	97.8	87.2	98.7
	(± 3.7)	(± 0.0)	(± 2.4)	(± 2.1)	(± 1.8)	(± 2.0)	(± 1.8)	(± 1.7)
<b>4735</b>	76.8	99.1	86.4	98.0	84.7	86.8	85.4	88.5
	(± 3.9)	(± 1.5)	(± 1.3)	(± 3.4)	(± 2.9)	(± 3.9)	(± 2.0)	(± 3.8)
<b>4738</b>	92.7	100	94.4	99.9	88.5	93.2	88.0	89.2
	(± 5.8)	(± 0.0)	(± 3.4)	(± 0.3)	(± 1.7)	(± 6.0)	(± 4.2)	(± 9.5)

Un IS alto indica que el péptido tiene una alta actividad antimicrobiana, pero una baja toxicidad hacia las células del huésped (Sosiangdi *et al.*, 2023). El IS depende del tipo de microorganismo y de la célula que se están evaluando. Por ejemplo, el péptido *alligatorin*, obtenido de un reptil, tiene un IS de 128, lo que indica una alta selectividad contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas evaluadas, pero una baja toxicidad hacia las células A549 (ATCC CCL-185), que son células epiteliales de carcinoma pulmonar humano (Barksdale *et al.*, 2016).

Las células Vero y HaCat son líneas celulares comunes y bien caracterizadas en la investigación biomédica, que ofrecen ventajas para la evaluación de la actividad citotóxica de péptidos antimicrobianos, tales como su disponibilidad, rápido crecimiento y sensibilidad a cambios celulares inducidos por PAMs. (Juretić *et al.*, 2009; Lai & Gallo, 2009). Además, estas células tienen características representativas de células epiteliales, lo que las hace útiles para la evaluación de la toxicidad en células epiteliales. Esto es relevante en el estudio de PAMs activos frente a *S. aureus*, cuya locación es predominantemente en piel (Lai & Gallo, 2009).

Aunque las células Vero y HaCat se utilizan a menudo para evaluar la actividad citotóxica de PAMs, hay algunas diferencias importantes entre ellas como modelos celulares, siendo la principal su origen, ya que HaCat son células epiteliales humanas derivadas de un carcinoma de piel, mientras que las células Vero son células epiteliales de riñón de mono verde africano. Además, las células Vero y HaCat pueden diferir en su respuesta a diferentes PAMs debido a las diferencias en su origen y características celulares. Por ejemplo, las células Vero son más susceptibles a la infección viral y se utilizan a menudo como un modelo para estudiar virus, mientras que las células HaCat se utilizan comúnmente como un modelo para estudiar el cáncer de piel (E-Kobon *et al.*, 2016; Liscano *et al.*, 2021).

Aunque ambas líneas celulares son útiles para la evaluación de la actividad citotóxica de PAMs, se deben seleccionar las células adecuadas dependiendo del péptido específico y del objetivo de la investigación. En este sentido, dado que los péptidos evaluados tuvieron mejor actividad frente a cepas de *S. aureus*, además de las células HaCat y Vero, también se podría evaluar su efecto sobre fibroblastos dérmicos humanos, células epiteliales pulmonares (A549), células epiteliales de la vejiga (T24), o hepatocitos humanos (HepG2), ya que ofrecen una buena representación de los tejidos que pueden ser afectados por *S. aureus*, y son útiles para evaluar la seguridad de los PAMs.

Por otro lado, algunos péptidos antimicrobianos de moluscos pueden ser citotóxicos para células humanas, incluidas las tumorales. Por ejemplo, el péptido dermaseptina B2, aislado de la piel del sapo *Phyllomedusa bicolor*, ha demostrado ser citotóxico en células de cáncer de pulmón, colon y próstata, así como en células normales de la piel y del tejido conectivo (Van Zoggel *et al.*, 2012). Otro péptido, la escina 1b aislada de la babosa de mar *Acanthopleura japonica*, también ha

demostrado tener actividad citotóxica en células de cáncer de pulmón y de hígado (Kenny *et al.*, 2021).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la citotoxicidad de los PAMs puede variar según la estructura y la concentración del péptido, así como el tipo de célula evaluada. Además, algunos estudios han encontrado que la citotoxicidad de los PAMs derivados de moluscos puede ser menor que la de los PAMs sintéticos o derivados de otros organismos (Kenny *et al.*, 2021; H. Li *et al.*, 2011). En cuanto a los resultados obtenidos en la presente investigación, si bien no se observaron diferencias en la viabilidad en cuanto a la concentración máxima y mínima evaluada, en algunos casos se encontró una disminución del 10%-15% en la viabilidad. Sin embargo, la disminución en la viabilidad celular es solo una medida preliminar y no es un indicador suficiente para determinar la seguridad de un agente terapéutico (Pfalzgraff *et al.*, 2018).

Otros estudios sugieren que los PAMs pueden tener efectos citotóxicos a concentraciones inferiores a 10  $\mu\text{M}$ , mientras que otros han encontrado que son citotóxicos a concentraciones tan altas como 100  $\mu\text{M}$  (E-Kobon *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2017; Zaky *et al.*, 2022). Además, la presencia de ciertos grupos de aminoácidos en la estructura del péptido, puede influir en su actividad citotóxica. Por ejemplo, la presencia de aminoácidos con carga positiva, como la arginina y la lisina, puede aumentar la citotoxicidad de algunos PAMs (Koo & Seo, 2019; Wang *et al.*, 2016). Por otro lado, la presencia de aminoácidos hidrofóbicos, como la leucina y la fenilalanina, puede disminuir la citotoxicidad de algunos péptidos (Koo & Seo, 2019). Otro factor que puede influir en la citotoxicidad de los PAMs, es su modo de acción. Los péptidos que actúan mediante la formación de poros en la membrana celular pueden ser más citotóxicos que aquellos que matan las células mediante la interacción con componentes celulares específicos, como el ADN (Koo & Seo, 2019).

Si bien algunos estudios sugieren que los péptidos antimicrobianos pueden tener efectos antitumorales, la evidencia aún no es concluyente (Lu *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2009, 2016). Los péptidos antimicrobianos pueden interactuar con las membranas celulares de las células tumorales de manera similar a como interactúan con las membranas celulares de los microorganismos, lo que puede provocar la muerte de las células tumorales (Lu *et al.*, 2022).

Además, algunos estudios han sugerido que los péptidos antimicrobianos pueden tener efectos inmunomoduladores y antiangiogénicos, lo que podría contribuir a su actividad antitumoral (Chan *et al.*, 2011; Otero González *et al.*, 2010; Téllez & Castaño, 2010). Por ejemplo, para el péptido LL-37, se ha demostrado que induce la apoptosis de las células tumorales y la inhibición de la angiogénesis en modelos de células de cáncer de mama y de pulmón (Lu *et al.*, 2022). Sin embargo, es importante destacar que la investigación sobre los efectos antitumorales de los PAMs está en sus primeras etapas, por lo que se necesitan más estudios para comprender mejor su potencial terapéutico en esta área (Aghazadeh *et al.*, 2019).

En contraste con la actividad antitumoral, la investigación sobre la actividad antibacteriana de los PAMs ha sido mayor. Los PAMs han demostrado una notable eficacia contra una amplia gama de bacterias patógenas, lo que subraya su potencial como alternativas a los antibióticos tradicionales. Aunque algunos PAMs también muestran citotoxicidad en células humanas, incluidas las tumorales, sus propiedades antibacterianas están mejor establecidas y caracterizadas.

## 7.9 Actividad hemolítica

Los péptidos analizados mostraron una actividad hemolítica inferior al 40% a una concentración de 60  $\mu\text{M}$  (Tabla 11). Además, la actividad hemolítica se evaluó a 120  $\mu\text{M}$ , con el fin de determinar la  $\text{CC}_{50}$ . Sin embargo, solo se logró causar una hemólisis mayor al 50% en los péptidos 4397 y 4738 (Tabla 11). Por lo tanto, se considera que los péptidos 4397 y 4738, podrían tener una actividad hemolítica significativa a concentraciones más altas, mientras que los demás péptidos muestran un perfil de seguridad mayor en términos de hemólisis.

**Tabla 11**

*Actividad hemolítica.* Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados son la media de tres valores  $\pm$  desviación estándar. Como control positivo (CP) se utilizó una suspensión de eritrocitos y Tritón® X-100 al 1 % (v/v).

Péptido	Porcentaje de hemólisis				
	Concentración $\mu\text{M}$				
	[120]	[60]	[30]	[15]	[7.5]
<b>4397</b>	98.6 ( $\pm$ 0.79)	34.5 ( $\pm$ 0.42)	5.2 ( $\pm$ 0.10)	2.2 ( $\pm$ 0.29)	2.3 ( $\pm$ 0.02)
<b>4398</b>	39.3 ( $\pm$ 15.38)	0.0 ( $\pm$ 0.14)	2.3 ( $\pm$ 0.10)	2.7 ( $\pm$ 0.65)	2.1 ( $\pm$ 0.06)
<b>4405</b>	30.9 ( $\pm$ 3.25)	7.4 ( $\pm$ 0.74)	2.2 ( $\pm$ 0.13)	2.3 ( $\pm$ 0.33)	2.5 ( $\pm$ 0.28)
<b>4735</b>	24.4 ( $\pm$ 1.79)	2.8 ( $\pm$ 2.11)	2.3 ( $\pm$ 0.08)	2.8 ( $\pm$ 0.57)	2.4 ( $\pm$ 0.02)
<b>4738</b>	74.7 ( $\pm$ 9.17)	6.5 ( $\pm$ 0.57)	2.2 ( $\pm$ 0.05)	2.4 ( $\pm$ 0.08)	2.3 ( $\pm$ 0.24)
<b>CP</b>	100	100	100	100	100

## 8 Conclusiones

- El diseño racional *in silico* de péptidos derivados de la hemocianina de *A. fulica* demostró ser una estrategia adecuada para el desarrollo de nuevos PAMs activos contra bacterias de relevancia en salud pública, ya que se logró identificar y optimizar secuencias peptídicas permitiendo seleccionar péptidos con propiedades específicas para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM).
- Los péptidos 4735 y 4738 exhibieron una destacada actividad inhibitoria frente a cepas de SARM, con una CMI de 7.5 y 15  $\mu$ M, y un IS positivo, alineándose con los valores reportados en la literatura. Estos resultados indican su capacidad para competir con otros PAMs conocidos, tanto en eficacia contra bacterias resistentes, como en su perfil de seguridad, lo que justifica su exploración y optimización para posibles aplicaciones terapéuticas.
- La síntesis de péptidos a través de la metodología propuesta fue exitosa, logrando obtener todos los péptidos con un alto nivel de pureza y un rendimiento entre 12.3% y 52%. Estos resultados subrayan la viabilidad de la estrategia empleada para la síntesis de péptidos con potencial antimicrobiano.
- El mecanismo de acción de los péptidos 4735 y 4738 podría ser a nivel de la membrana bacteriana, como sugieren los modelos *in silico*. Sin embargo, es crucial continuar investigando los péptidos mediante enfoques computacionales y experimentales para comprender sus mecanismos de acción y optimizar su eficacia. Este avance contribuirá significativamente al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para enfrentar el problema de la resistencia antimicrobiana.

## 9 Divulgación

### Publicaciones científicas:

- Suárez, L.; Pereira, A.; Hidalgo, W.; Uribe, N. Antibacterial, Antibiofilm and Anti-Virulence Activity of Biactive Fractions from Mucus Secretion of Giant African Snail *Achatina fulica* against *Staphylococcus aureus* Strains. *Antibiotics* 2021, *10*, 1548. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121548>
- Pereira, A.; Suárez, L.; Roman., T.; Guzmán, F.; Rincón-Orozco, B.; Sierra, L.; Hidalgo, W. *Achatina fulica* Haemocyanin-Derived Peptides as Novel Antimicrobial Agents. *Biorxiv*. 2023, <https://doi.org/10.1101/2023.08.15.553437>
- Pereira, A.E; Suárez, L.; Roman., T.; Guzmán, F.; Rincón-Orozco, B.; Sierra, L.; Hidalgo, W. *Achatina fulica* Haemocyanin-Derived Peptides as Novel Antimicrobial Agents. *Biochimie*. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.12.007>

### Participación en eventos académicos:

- Pereira, A.; Suárez, L.; Roman., T.; Guzmán, F.; Rincón-Orozco, B.; Sierra, L.; Hidalgo, W. Evaluación de la actividad antibacteriana de nuevos péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* resistentes a antibióticos convencionales. III Encuentro Internacional de Ciencias de la Salud y I Congreso Internacional Vida, Salud y Bienestar. (2022). Bucaramanga-Colombia.
- Pereira, A. Evaluación de nuevos péptidos derivados de la hemocianina de *Achatina fulica* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* resistentes a los antibióticos

convencionales. IV Workshop de “Péptidos terapéuticos para bioaplicaciones”. (2022). Coquimbo, Chile. (Virtual).

- Pereira, A.; Suárez, Hidalgo, W. Novel antimicrobial peptides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* derived from *Achatina fulica* hemocyanin. FEMS (2023). Hamburgo, Alemania.

**Referencias Bibliográficas**

- Adikwu, M. U. (2005). Evaluation of snail mucin motifs as rectal absorption enhancer for insulin in non-diabetic rat models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(9), 1801–1804.
- Aghazadeh, H., Memariani, H., Ranjbar, R., & Pooshang Bagheri, K. (2019). The activity and action mechanism of novel short selective LL-37-derived anticancer peptides against clinical isolates of *Escherichia coli*. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(1), 75–83. <https://doi.org/10.1111/CBDD.13381>
- AMB. (2020). Caracol Africano. *Área Metropolitana de Bucaramanga*. <https://www.amb.gov.co/caracol-africano/>
- Amézquita-López, B. A., Quiñones, B., Soto-Beltrán, M., Lee, B. G., Yambao, J. C., Lugo-Melchor, O. Y., & Chaidez, C. (2016). Antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and Non-O157 recovered from domestic farm animals in rural communities in Northwestern Mexico. <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0100-5>
- APD3. (2023). *APD3-Antimicrobial Peptide Database*. <https://aps.unmc.edu/>
- Balandin, S. V., & Ovchinnikova, T. V. (2016). Antimicrobial peptides of invertebrates. Part 2. biological functions and mechanisms of action. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 42(4), 343–360. <https://doi.org/10.1134/S106816201604004X>
- Barksdale, S. M., Hrifko, E. J., Chung, E. M. C., & Van Hoek, M. L. (2016). Peptides from American alligator plasma are antimicrobial against multi-drug resistant bacterial pathogens including *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0799-z>

- Bhattacharjya, S., & Ramamoorthy, A. (2009). Multifunctional host defense peptides: Functional and mechanistic insights from NMR structures of potent antimicrobial peptides. *FEBS Journal*, 276(22), 6465–6473. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2009.07357.X>
- Brahms, S., & Brahms, J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *Journal of Molecular Biology*, 138(2), 149–178. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90282-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90282-X)
- Brtz-Oesterhelt, H., & Sass, P. (2010). Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. In *Future Microbiology* (Vol. 5, Issue 10, pp. 1553–1579). <https://doi.org/10.2217/fmb.10.119>
- Burmester, T. (2001). Molecular Evolution of the Arthropod Hemocyanin Superfamily. *Mol. Biol. Evol.*, 18(2), 184–195. <https://academic.oup.com/mbe/article/18/2/184/1079272>
- Campeau, S. A., Schuetz, A. N., Kohner, P., Arias, C. A., Hemarajata, P., Bard, J. D., & Humphries, R. M. (2018). Variability of daptomycin MIC values for *Enterococcus faecium* when measured by reference broth microdilution and gradient diffusion tests. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(9), 2. <https://doi.org/10.1128/AAC.00745-18>
- Carvajal-Rondanelli, P., Aróstica, M., Álvarez, C. A., Ojeda, C., Albericio, F., Aguilar, L. F., Marshall, S. H., & Guzmán, F. (2018). Understanding the antimicrobial properties/activity of an 11-residue Lys homopeptide by alanine and proline scan. *Amino Acids*, 50(5), 557–568. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2542-6>
- Carvajal-Rondanelli, P., Aróstica, M., Marshall, S. H., Albericio, F., Álvarez, C. A., Ojeda, C., Aguilar, L. F., & Guzmán, F. (2016). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-negative bacteria. *Amino Acids*, 48(6), 1445–1456. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2198-z>

- CDC. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*, 1–113. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Chalongkulasak, S., E-Kobon, T., & Chumnanpuen, P. (2022). Prediction of Antibacterial Peptides against *Propionibacterium acnes* from the Peptidomes of *Achatina fulica* Mucus Fractions. *Molecules*, 27(7), 1–9. <https://doi.org/10.3390/molecules27072290>
- Chan, L. Y., Gunasekera, S., Henriques, S. T., Worth, N. F., Le, S. J., Clark, R. J., Campbell, J. H., Craik, D. J., & Daly, N. L. (2011). Engineering pro-angiogenic peptides using stable, disulfide-rich cyclic scaffolds. *Blood*, 118(25), 6709–6717. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-359141>
- Chen, Y., Guarnieri, M. T., Vasil, A. I., Vasil, M. L., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2007). Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1398–1406. <https://doi.org/10.1128/AAC.00925-06>
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2005). Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12316–12329. <https://doi.org/10.1074/JBC.M413406200>
- Chiumiento, I. R., 1, Ituarte, S., Sun, J., Qiu, J. W., Heras, H., & Sebastián Dreonid, M. (2020). Hemocyanin of the caenogastropod *Pomacea canaliculata* exhibits evolutionary differences among gastropod clades. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228325>
- Cilia, G., & Fratini, F. (2018). Antimicrobial properties of terrestrial snail and slug mucus. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 15(3). <https://doi.org/10.1515/jcim-2017-0168>

- Cottrell, J. M., Henderson, I. F., & Wright, D. J. (1994). Studies on the glycosaminoglycan component of trail mucus from the terrestrial slug, *Arion ater* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *107*(2), 285–296.
- Cruz, J., Ortiz, C., Guzman, F., Cardenas, C., Fernandez-Lafuente, R., & Torres, R. (2014). Design and activity of novel lactoferrampin analogues against O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Biopolymers*, *101*(4), 319–328. <https://doi.org/10.1002/bip.22360>
- Daud, N. S., Akbar, A. J., Nurhikma, E., & Karmilah, K. (2018). Formulation of Snail Slime (*Achatina fulica*) Anti-Acne Emulgel using Tween 80-Span 80 as Emulsifying and HPMC as Gelling Agent. *Borneo Journal of Pharmacy*, *1*(2), 64–67.
- Diarra, S. S., Kant, R., Tanhimana, J., & Lela, P. (2015). Utilisation of Giant African snail (*Achatina fulica*) meal as protein source for laying hens. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics*, *116*(1), 85–90.
- Dietl, T., & Tschesche, H. (1974). Amino acid sequence of snail inhibitor K and correlation of structure and specificity. In *Proteinase Inhibitors* (pp. 254–264). Springer.
- Dietl, T., & Tschesche, H. (1975). Trypsin-kallikrein isoinhibitor K (type Kunitz) from snails (*Helix pomatia*). Purification and characterization. *European Journal of Biochemistry*, *58*(2), 453–460. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb02392.x>
- Dolashki, A., Velkova, L., Daskalova, E., Zheleva, N., Topalova, Y., Atanasov, V., Voelter, W., & Dolashka, P. (2020). Antimicrobial Activities of Different Fractions from Mucus of the Garden Snail *Cornu aspersum*. *Biomedicines*, *8*(9), 315. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090315>

- Dubovskii, P. V., Ignatova, A. A., Volynsky, P. E., Ivanov, I. A., Zhmak, M. N., Feofanov, A. V., & Efremov, R. G. (2018). Improving therapeutic potential of antibacterial spider venom peptides: coarse-grain molecular dynamics guided approach. *Future Medicinal Chemistry*, *10*(19), 2309–2322. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0170>
- E-Kobon, T., Thongararm, P., Roytrakul, S., Meesuk, L., Chumnanpuen, P., Teerasak, E., Thongararm, P., Roytrakul, S., Meesuk, L., Chumnanpuen, P., E-Kobon, T., Thongararm, P., Roytrakul, S., Meesuk, L., & Chumnanpuen, P. (2016). Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *14*, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.11.005>
- Erdem Büyükkiraz, M., & Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(3), 1573–1596. <https://doi.org/10.1111/JAM.15314>
- Feng, Q., Aweya, J. J., Huang, Y.-Q., Zhang, P., Wang, F., Yao, D.-F., Zheng, Z.-H., Li, E.-M., & Zhang, Y.-L. (2023). Dephosphorylation of T517 on Hemocyanin Is Required for Antibacterial Activity in *Penaeus vannamei*. *The Journal of Immunology*, *210*(9), 1396–1407. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200598>
- Fields, F. R., Freed, S. D., Carothers, K. E., Hamid, M. N., Hammers, D. E., Ross, J. N., Kalwajtys, V. R., Gonzalez, A. J., Hildreth, A. D., Friedberg, I., Lee, S. W., Hamid, N., Hammers, D. E., Ross, J. N., Kalwajtys, V. R., Gonzalez, A. J., Hildreth, A. D., Friedberg, I., & Lee, S. W. (2020). Novel antimicrobial peptide discovery using machine learning and biophysical selection of minimal bacteriocin domains. *Drug Development Research*, *81*(1), 43–51. <https://doi.org/10.1002/ddr.21601>

- Gai, Z., Matsuno, A., Kato, K., Kato, S., Khan, M. R. I., Shimizu, T., Yoshioka, T., Kato, Y., Kishimura, H., Kanno, G., Miyabe, Y., Terada, T., Tanaka, Y., & Yao, M. (2015). Crystal Structure of the 3.8-MDa Respiratory Supermolecule Hemocyanin at 3.0 Å Resolution. *Structure*, 23(12), 2204–2212. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.008>
- García, M. G., Rodríguez, A., Alba, A., Vázquez, A. A., Vicente, F. E. M., Pérez-Erviti, J., Spellerberg, B., Stenger, S., Grieshaber, M., Conzelmann, C., Münch, J., Raber, H., Kubiczek, D., Rosenau, F., Wiese, S., Ständker, L., & Otero-González, A. (2020). New antibacterial peptides from the freshwater mollusk *Pomacea poeyana* (Pilsbry, 1927). *Biomolecules*, 10(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/biom10111473>
- Gawde, U., Chakraborty, S., Wagh, F. H., Barai, R. S., Khandekar, A., Indraguru, R., Shirsat, T., & Idicula-Thomas, S. (2022). CAMPR4: a database of natural and synthetic antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac933>
- Gesheva, V., Chausheva, S., Stefanova, N., Mihaylova, N., Doumanova, L., Idakieva, K., & Tchorbanov, A. (2015). *Helix pomatia* hemocyanin - A novel bio-adjuvant for viral and bacterial antigens. *International Immunopharmacology*, 26(1), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.011>
- Ghosh, A. K., Hirasawa, N., Lee, Y. S., Kim, Y. S., Shin, K. H., Ryu, N., & Ohuchi, K. (2010). Inhibition by acharan sulphate of angiogenesis in experimental inflammation models. *British Journal of Pharmacology*, 137(4), 441–448. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704905>
- Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. F. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *CEJB*, 2(1), 2007–2008. <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>

- Godfrey, W. L., Rudd, C. J., Iyer, S., & Recktenwald, D. (2005). The Proteomics Protocols Handbook. In *The Proteomics Protocols Handbook*. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:067>
- Gong, H., Hu, X., Zhang, L., Fa, K., Liao, M., Liu, H., Fragneto, G., Campana, M., & Lu, J. R. (2023). How do antimicrobial peptides disrupt the lipopolysaccharide membrane leaflet of Gram-negative bacteria? *Journal of Colloid and Interface Science*, *637*, 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.01.051>
- Greistorfer, S., Klepal, W., Cyran, N., Gugumuck, A., Rudoll, L., Suppan, J., & von Byern, J. (2017). Snail mucus – glandular origin and composition in *Helix pomatia*. *Zoology*, *122*, 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.05.001>
- Guruprasad, K., Reddy, B. V. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, *4*(2), 155–161. <https://doi.org/10.1093/protein/4.2.155>
- Guzmán, F., Aróstica, M., Román, T., Beltrán, D., Gauna, A., Albericio, F., & Cárdenas, C. (2023). Peptides, solid-phase synthesis and characterization: Tailor-made methodologies. *Electronic Journal of Biotechnology*, *64*, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2023.01.005>
- Guzmán, F., Gauna, A., Luna, O., Román, T., Álvarez, C., Albericio, F., & Cárdenas, C. (2020). The tea-bag protocol for comparison of Fmoc removal reagents in solid-phase peptide synthesis. *Amino Acids*, *52*(8), 1201–1205. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02883-8>
- Guzmán, F., Gauna, A., Roman, T., Luna, O., Álvarez, C., Pareja-Barrueto, C., Mercado, L., Albericio, F., & Cárdenas, C. (2021). Tea bags for fmoc solid-phase peptide synthesis: An example of circular economy. *Molecules*, *26*(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26165035>

- Guzmán, F., Marshall, S., Ojeda, C., Albericio, F., & Carvajal-Rondanelli, P. (2013). Inhibitory effect of short cationic homopeptides against Gram-positive bacteria. *Journal of Peptide Science*, *19*(12), 792–800. <https://doi.org/10.1002/psc.2578>
- Hancock, R. E. W., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. In *Nature Biotechnology* (Vol. 24, Issue 12, pp. 1551–1557). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>
- Harris, F., Dennison, S. R., & Phoenix, D. A. (2009). Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein and Peptide Science*, *10*(6), 585–606.
- Hirano, M., Saito, C., Yokoo, H., Goto, C., Kawano, R., Misawa, T., & Demizu, Y. (2021). Development of antimicrobial stapled peptides based on magainin 2 sequence. *Molecules*, *26*(2). <https://doi.org/10.3390/molecules26020444>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11, p. 582779). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Huang, Y., Huang, J., & Chen, Y. (2010). Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein and Cell*, *1*(2), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0004-3>
- Iguchi, S. M. M., Aikawa, T., & Matsumoto, J. J. (1982). Antibacterial activity of snail mucus mucin. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, *72*(3), 571–574. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90123-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90123-2)

- Jeyachandran, S., Chellapandian, H., Park, K., & Kwak, I. S. (2023). Exploring the Antimicrobial Potential and Biofilm Inhibitory Properties of Hemocyanin from *Hemifusus pugilinus* (Born, 1778). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 10–13. <https://doi.org/10.3390/ijms241411494>
- Joo, H. S., Fu, C. I., & Otto, M. (2016). Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0292>
- Juretić, D., Vukičević, D., Ilić, N., Antcheva, N., & Tossi, A. (2009). Computational design of highly selective antimicrobial peptides. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(12), 2873–2882. <https://doi.org/10.1021/ci900327a>
- Kantawong, F., Thaweenan, P., Mungkala, S., Tamang, S., Manaphan, R., Wanachantararak, P., E-KOBON, T., & Chumnanpuen, P. (2016). Mucus of *Achatina fulica* stimulates mineralization and inflammatory response in dental pulp cells. *Turkish Journal of Biology*, 40(2), 353–359.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 3. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kenechukwu, F. C., Ibezim, E. C., Attama, A. A., Momoh, M. A., Ogbonna, J. D. N., Nnamani, P. O., Chime, S. A., Umeyor, C. E., & Uronnachi, E. M. (2013). Preliminary spectroscopic characterization of PEGylated mucin, a novel polymeric drug delivery system. *African Journal of Biotechnology*, 12(47), 6661–6671.
- Kenny, H. A., Hart, P. C., Kordylewicz, K., Lal, M., Shen, M., Kara, B., Chen, Y. J., Grassl, N., Alharbi, Y., Pattnaik, B. R., Watters, K. M., Patankar, M. S., Ferrer, M., & Lengyel, E. (2021). The natural

product  $\beta$ -escin targets cancer and stromal cells of the tumor microenvironment to inhibit ovarian cancer metastasis. *Cancers*, 13(16). <https://doi.org/10.3390/cancers13163931>

Koo, H. B., & Seo, J. (2019). Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Peptide Science*, 111(5). <https://doi.org/10.1002/pep2.24122>

Kostadinova, N., Voynikov, Y., Dolashki, A., Krumova, E., Abrashev, R., Kowalewski, D., Stevanovic, S., Velkova, L., Velikova, R., & Dolashka, P. (2018). Antioxidative screening of fractions from the mucus of garden snail *Cornu aspersum*. *Bulgarian Chemical Communications*, 50, 176–183.

Kriswandini, I. L. (2014). Antimicrobial proteins of Snail mucus (*Achatina fulica*) against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 47(1), 31–36.

Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30(3), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.003>

Lazzaro, B. P., Zasloff, M., & Rolff, J. (2020). Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science*, 368(6490). <https://doi.org/10.1126/science.aau5480>

Lee, S. Y., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2003). Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 7927–7933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209239200>

Li, H., Parisi, M. G., Parrinello, N., Cammarata, M., & Roch, P. (2011). Molluscan antimicrobial peptides, a review from activity-based evidences to computer-assisted sequences. *Invertebrate Survival Journal*, 8(1), 85–97.

- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, *37*(2), 207–215. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2012.07.001>
- Lima, P. G., Oliveira, J. T. A., Amaral, J. L., Freitas, C. D. T., & Souza, P. F. N. (2021). Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. *Life Sciences*, *278*(December 2020), 119647. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119647>
- Liscano, Y., Medina, L., Oñate-garza, J., Fanny, G., Pickholz, M., & Delgado, J. P. (2021). *In Silico* Selection and Evaluation of Pugnins with Antibacterial and Anticancer Activity Using Skin Transcriptome of Treefrog ( *Boana pugnax* ). *Pharmaceutics*, *13*(578), 32. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040578>
- Liu, L., Fang, Y., & Wu, J. (2013). Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1828*(11), 2479–2486. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2013.06.017>
- Liu, W.-P., Chen, Y.-H., Ming, X., & Kong, Y. (2015). Design and Synthesis of a Novel Cationic Peptide with Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Activity. <https://doi.org/10.1155/2015/578764>
- Lomize, A. L., Todd, S. C., & Pogozheva, I. D. (2022). Spatial arrangement of proteins in planar and curved membranes by PPM 3.0. *Protein Science*, *31*(1), 209–220. <https://doi.org/10.1002/pro.4219>
- Lu, F., Zhu, Y., Zhang, G., & Liu, Z. (2022). Renovation as innovation: Repurposing human antibacterial peptide LL-37 for cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, *13*(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.944147>

- Luo, Y. Y. S. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides : Antimicrobial , Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. 22(11401). <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>
- Mardirossian, M., Pérébasquine, N., Benincasa, M., Gambato, S., Hofmann, S., Huter, P., Müller, C., Hilpert, K., Innis, C. A., Tossi, A., & Wilson, D. N. (2018). The Dolphin Proline-Rich Antimicrobial Peptide Tur1A Inhibits Protein Synthesis by Targeting the Bacterial Ribosome. *Cell Chemical Biology*, 25(5), 530-539.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.02.004>
- Martin, N. O., Nishiuchi, Y., Jonathan Baell, J., Franco, O. L., Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., & Santos, N. C. (2017). Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in Chemistry / Www.Frontiersin.Org*, 5(5). <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00005>
- MAVDT, R. de C. (2011). Resolución 654 de 2011 “Por la cual se corrige la Resolución No. 0848 del 23 de mayo de 2008 y se adoptan las medidas que deben seguir las autoridades ambientales, para la prevención, control y manejo de la especie Caracol Gigante Africano (*Achatina fulica*) Ministerio De Ambiente, Vivienda Y Desarrollo Territorial, 654, 9.
- Mercer, D. K., Torres, M. D. T., Duay, S. S., Lovie, E., Simpson, L., von Köckritz-Blickwede, M., de la Fuente-Nunez, C., O’Neil, D. A., & Angeles-Boza, A. M. (2020). Antimicrobial Susceptibility Testing of Antimicrobial Peptides to Better Predict Efficacy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(July), 1–34. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00326>
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>
- Miethke, M., Pieroni, M., Weber, T., Brönstrup, M., Hammann, P., Halby, L., Arimondo, P. B., Glaser, P., Aigle, B., Bode, H. B., Moreira, R., Li, Y., Luzhetskyy, A., Medema, M. H., Pernodet, J. L., Stadler, M., Tormo, J. R., Genilloud, O., Truman, A. W., Müller, R. (2021). Towards the

sustainable discovery and development of new antibiotics. In *Nature Reviews Chemistry* (Vol. 5, Issue 10, pp. 726–749). Springer US. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>

Ministerio de Ambiente, V. y D. T. (2008). *Resolución 848 del 9 de mayo de 2008*. [https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion\\_minambientevt\\_0848\\_2008.htm#1](https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_minambientevt_0848_2008.htm#1)

MinSalud, M. de S. y P. social. (2018). Plan nacional contra la resistencia a los antimicrobianos. In *Ministerio de Salud y Protección Social* (p. 43). [https://www.minsal.cl/plan-nacional-contra-la-resistencia-a-los-antimicrobianos/%0Ahttps://diprece.minsal.cl/wrdprss\\_minsal/wp-content/uploads/2017/08/Plan-Nacional-contra-la-resistencia-a-los-antimicrobianos.pdf%0Ahttps://diprece.minsal.cl/wrdprss\\_minsal](https://www.minsal.cl/plan-nacional-contra-la-resistencia-a-los-antimicrobianos/%0Ahttps://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2017/08/Plan-Nacional-contra-la-resistencia-a-los-antimicrobianos.pdf%0Ahttps://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal)

Monteiro, M. L., Lima, D. B., Menezes, R. R. P. P. B. de, Sampaio, T. L., Silva, B. P., Serra Nunes, J. V., Cavalcanti, M. M., Morlighem, J. E., & Martins, A. M. C. (2020). Antichagasic effect of hemocyanin derived from antimicrobial peptides of *Penaeus monodon* shrimp. *Experimental Parasitology*, 215, 107930. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107930>

Moreno, C., González, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.*, 69(2), 185–192. <https://doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., Naghavi, M. (2022).

- Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Neill, J. O. ' (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. December.
- Németh, L. J., Martinek, T. A., & Jójárt, B. (2022). Tilted State Population of Antimicrobial Peptide PGLa Is Coupled to the Transmembrane Potential. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 62(20), 4963–4969. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00667>
- Noothuan, N., Apitanyasai, K., Panha, S., & Tassanakajon, A. (2021). Snail mucus from the mantle and foot of two land snails, *Lissachatina fulica* and *Hemiplecta distincta*, exhibits different protein profile and biological activity. *BMC Research Notes*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05557-0>
- Obaidat, M. M., & Stringer, A. P. (2019). Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 on dairy cattle farms in Jordan. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16461>
- Obara, K., Otsuka-Fuchino, H., Sattayasai, N., Nonomura, Y., Tsuchiya, T., & Tamiya, T. (1992). Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina fulica* Ferussac. *European Journal of Biochemistry*, 209(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17254.x>
- Ogawa, M., Nakamura, S., Atsuchi, T., Tamiya, T., Tsuchiya, T., & Nakai, S. (1999). Macromolecular antimicrobial glycoprotein, achacin, expressed in a methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Letters*, 448(1), 41–44. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00327-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00327-0)

- Ohgita, T., Takechi-Haraya, Y., Nadai, R., Kotani, M., Tamura, Y., Nishikiori, K., Nishitsuji, K., Uchimura, K., Hasegawa, K., Sakai-Kato, K., Akaji, K., & Saito, H. (2019). A novel amphipathic cell-penetrating peptide based on the N-terminal glycosaminoglycan binding region of human apolipoprotein E. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1861(3), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.12.010>
- Okella, H., Ikiriza, H., Ochwo, S., Ajayi, C. O., Ndekezi, C., Nkamwesiga, J., Kaggwa, B., Aber, J., Mtewa, A. G., Koffi, T. K., Odongo, S., Vertommen, D., Kato, C. D., & Ogwang, P. E. (2021). Identification of Antimicrobial Peptides Isolated From the Skin Mucus of African Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Frontiers in Microbiology*, 12(December). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.794631>
- OMS. (2014). Antimicrobial resistance, Global Report on Surveillance. In *Organización Mundial de la Salud*. Organización Mundial de la Salud.
- OMS. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Organización Mundial de La Salud; Organización Mundial de la Salud.
- OMS. (2020). Laboratory biosafety manual, 4th edition. In *World Health Organization*. <https://doi.org/10.37774/9789275724170>
- OMS. (2022). Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022. In *γ787* (Issue 8.5.2017).
- OMS. (2024). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. In *Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health*

*importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance.*

Ortiz López, C. (2019). Design, synthesis, characterization and in vitro evaluation of antimicrobial peptides against pathogenic bacteria resistant to antibiotics. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(169), 614–627. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.864>

Otero González, A. J., Magalhães, B. S., Garcia-Villarino, M., López-Abarrategui, C., Sousa, D. A., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2010). Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *The FASEB Journal*, 24(5), 1320–1334. <https://doi.org/10.1096/fj.09-143388>

Pandi, A., Adam, D., Zare, A., Trinh, V. T., Schaefer, S. L., & Wiegand, M. (2022). Cell-free biosynthesis combined with deep learning accelerates de novo-development of antimicrobial peptides. *BioRxiv*, 0–25. <https://doi.org/10.1101/2022.11.19.517184>

Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. [Http://Dx.Doi.Org/10.3109/07388551.2011.594423](http://Dx.Doi.Org/10.3109/07388551.2011.594423), 32(2), 143–171. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>

Patel, J. ., Cockerill, R. ., Bradford, A. ., Eliopoulos, M. ., Hindler, A. ., Jenkins, G. ., Lewis, S. ., Limbago, B., & Zimmer, L. (2015). M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)*, 35(2). <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1334-3>

Pazgier, M., Hoover, D. M., Yang, D., Lu, W., & Lubkowski, J. (2006). Human  $\beta$ -defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(11), 1294–1313. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5540-2>

- Pereira, A. E., Rey, A., López, J. P., Castro, J. P., & Uribe, N. (2016). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of mucus of *Achatina fulica*. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 48(2), 188–195.
- Petit, V. W., Rolland, J. L., Blond, A., Cazevieille, C., Djediat, C., Peduzzi, J., Goulard, C., Bachère, E., Dupont, J., Destoumieux-Garzón, D., & Rebuffat, S. (2016). A hemocyanin-derived antimicrobial peptide from the *Penaeid shrimp* adopts an alpha-helical structure that specifically permeabilizes fungal membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(3), 557–568. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.12.010>
- Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., & Weindl, G. (2018). Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in Pharmacology*, 9(MAR), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00281>
- Pirtskhalava, M., Amstrong, A. A., Grigolava, M., Chubinidze, M., Alimbarashvili, E., Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., & Tartakovsky, M. (2021). DBAASP v3: Database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D288–D297. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>
- Pogozheva, I. D., Tristram-Nagle, S., Mosberg, H. I., & Lomize, A. L. (2013). Structural adaptations of proteins to different biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(11), 2592–2608. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.023>
- Prada, Y. A., Guzmán, F., Rondón, P., Escobar, P., Ortíz, C., Sierra, D. A., Torres, R., & Mejía-Ospino, E. (2016). A New Synthetic Peptide with *In vitro* Antibacterial Potential Against *Escherichia coli* O157:H7 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(3), 134–140. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9219-9>

- Pyrkov, T. V., Chugunov, A. O., Krylov, N. A., Nolde, D. E., & Efremov, R. G. (2009). PLATINUM: A web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes. *Bioinformatics*, 25(9), 1201–1202. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp111>
- Raut, S. K., & Barker, G. M. (2002). *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as pests in tropical agriculture. In G. M. Barker (Ed.), *Molluscs as crop pests* (pp. 55–114). CABI Publishing, Wallingford. <https://doi.org/10.1079/9780851993201.0055>
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: Premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Riciluca, K. C. T., Sayegh, R. S. R., Melo, R. L., & Silva, P. I. (2012). Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Results in Immunology*, 2, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.rinim.2012.03.001>
- Rodriguez, A., Martell-huguet, E. M., Gonz, M., Alp, D., Alba, A., Vazquez, A. A., Grieshober, M., Spellerberg, B., Stenger, S., Münch, J., Kissmann, A., Rosenau, F., Wessjohann, L. A., Wiese, S., Ständker, L., & Otero-gonzalez, A. J. (2023). Identification and Characterization of Three New Antimicrobial Peptides from the Marine Mollusk *Nerita versicolor* (Gmelin, 1791). *Int. J. Mol. Sci*, 24(3852), 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms24043852>
- Ross, J. E., Mendes, R. E., & Jones, R. N. (2014). Quality control MIC ranges used for telavancin with application of a revised CLSI reference broth microdilution method. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9), 3399–3401. <https://doi.org/10.1128/JCM.01210-14>

- Santos-Filho, N. A., Righetto, G. M., Pereira, M. R., Piccoli, J. P., Almeida, L. M. T., Leal, T. C., Camargo, I. L. B. C., & Cilli, E. M. (2022). Effect of C-terminal and N-terminal dimerization and alanine scanning on antibacterial activity of the analogs of the peptide p-BthTX-I. *Peptide Science*, *114*(2). <https://doi.org/10.1002/pep2.24243>
- Schroeder, C. M., Zhao, C., Debroy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D. G., Wagner, D. D., Mcdermott, P. F., Walker, R. D., & Meng, J. (2002). Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. *Applied And Environmental Microbiology*, *68*(2), 576–581. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.576-581.2002>
- Seeger Pfeiffer, M., & Padrón, G. (2013). *Genómica Funcional: Fundamentos y Aplicaciones*.
- Segura, C., Guzmán, F., Salazar, L. M., Patarroyo, M. E., Orduz, S., & Lemeshko, V. (2007). BTM-P1 polycationic peptide biological activity and 3D-dimensional structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *353*(4), 908–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.113>
- Sosiangdi, S., Taemaitree, L., Tankrathok, A., Daduang, S., Boonlue, S., Klaynongsruang, S., & Jangpromma, N. (2023). Rational design and characterization of cell-selective antimicrobial peptides based on a bioactive peptide from *Crocodylus siamensis* hemoglobin. *Scientific Reports*, *13*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43274-9>
- Stephani, J. C., Gerhards, L., Khairalla, B., Solov'yov, I. A., & Brand, I. (2024). How do Antimicrobial Peptides Interact with the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria? Role of Lipopolysaccharides in Peptide Binding, Anchoring, and Penetration. *ACS Infectious Diseases*, *10*(2), 763–778. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00673>

- Suárez, L., Pereira, A., Hidalgo, W., & Uribe, N. (2021). Antibacterial, antibiofilm and anti-virulence activity of bioactive fractions from mucus secretion of giant african snail *Achatina fulica* against *Staphylococcus aureus* strains. *Antibiotics*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121548>
- Tachapuripunya, V., Sittiruk, R., Pramote, C., & Teerasak, E. (2021). Unveiling Putative Functions of Mucus Proteins and Their Tryptic Peptides in Seven Gastropod Species Using Comparative. *Molecules*.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, *12*(3), 217–226.
- Takechi-Haraya, Y., Ohgita, T., Kotani, M., Kono, H., Saito, C., Tamagaki-Asahina, H., Nishitsuji, K., Uchimura, K., Sato, T., Kawano, R., Sakai-Kato, K., Izutsu, K. ichi, & Saito, H. (2022). Effect of hydrophobic moment on membrane interaction and cell penetration of apolipoprotein E-derived arginine-rich amphipathic  $\alpha$ -helical peptides. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08876-9>
- Taylor, K., Barran, P. E., & Dorin, J. R. (2008). Structure-activity relationships in  $\beta$ -defensin peptides. *Biopolymers*, *90*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/bip.20900>
- Télez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos Antimicrobial peptides. *IUNICS*, *14*(1), 55–67. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

- Topalova, Y., Belouhova, M., Velkova, L., Dolashki, A., Zheleva, N., Daskalova, E., Kaynarov, D., Voelter, W., & Dolashka, P. (2022). Effect and Mechanisms of Antibacterial Peptide Fraction from Mucus of *C. aspersum* against *Escherichia coli* NBIMCC 8785. *Biomedicines*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030672>
- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Issue 4, pp. 203–218). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
- Ullal, A. J., Wayne Litaker, R., & Noga, E. J. (2008). Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque). *Developmental and Comparative Immunology*, *32*(11), 1301–1312. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.04.005>
- Van Zoggel, H., Carpentier, G., Santos, D., Hamma-Kourbali, Y., Courty, J., Amiche, M., Delbé, J., & Khachigian, L. M. (2012). Antitumor and Angiostatic Activities of the Antimicrobial Peptide *Dermaseptin B2*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044351>
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Omling, U. R., Dobrindt, U., Cantón, R., Cantón, C., Giske, C. G., Naas, T., Carattoli, A., Martínez-Medina, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodríguez-Bã No, J., Baquero, F., & Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, *005*(4), 437–463. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>
- Vishnepolsky, B. (2022). Comparative analysis of machine learning algorithms on the microbial strain-specific AMP prediction. *23*(June), 1–11.

- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2009). APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 933–937. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn823>
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Wang, G., Zietz, C. M., Mudgapalli, A., Wang, S., & Wang, Z. (2022). The evolution of the antimicrobial peptide database over 18 years: Milestones and new features. *Protein Science*, 31(1), 92–106. <https://doi.org/10.1002/pro.4185>
- Wimley, W. C., & White, S. H. (1996). Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature Structural Biology*, 3(10), 842–848. <https://doi.org/10.1038/nsb1096-842>
- Zaky, A. A., Simal-Gandara, J., Eun, J. B., Shim, J. H., & Abd El-Aty, A. M. (2022). Bioactivities, Applications, Safety, and Health Benefits of Bioactive Peptides From Food and By-Products: A Review. *Frontiers in Nutrition*, 8(January), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.815640>
- Zhan, S., Aweya, J. J., Wang, F., Yao, D., Zhong, M., Chen, J., Li, S., & Zhang, Y. (2019). *Litopenaeus vannamei* attenuates white spot syndrome virus replication by specific antiviral peptides generated from hemocyanin. In *Developmental and Comparative Immunology* (Vol. 91). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.10.005>
- Zhong, J., Wang, W., Yang, X., Yan, X., & Liu, R. (2013). A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of *Achatina fulica*. *Peptides*, 39(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.001>

Zhuang, J., Coates, C. J., Zhu, H., Zhu, P., Wu, Z., & Xie, L. (2015). Identification of candidate antimicrobial peptides derived from abalone hemocyanin. *Developmental and Comparative Immunology*, 49(1), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.008>

## **Apéndices**

**Los apéndices están disponibles en el Repositorio Institucional**

Apéndice A. Alineamiento múltiple de las secuencias de Hc de gasterópodos terrestres

Apéndice B. Cromatogramas de HPLC y espectros de masas