

1

**SÍNTESIS DE NUEVOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS BIOCONJUGADOS
CON NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs) CON POTENCIAL ANTIBIÓTICO
FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA (SARM)**

Qca. YULY ANDREA PRADA VARGAS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

**SÍNTESIS DE NUEVOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS BIOCONJUGADOS
CON NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs) CON POTENCIAL ANTIBIÓTICO
FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA (SARM)**

Qca. YULY ANDREA PRADA VARGAS

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Química

**DIRECTOR
ENRIQUE MEJÍA OSPINO, Ph.D**

**Co-DIRECTOR
RODRIGO TORRES SÁEZ, Ph,D**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014**

**“Los sueños de un hombre son un
índice de su grandeza”**

-Sadoc Rabinwitz

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Mejía Ospino por su guía incondicional en el desarrollo de este proyecto y por su confianza en mi para emprender nuevos retos.

Al Dr. Rodrigo Torres por todos sus aportes para culminar satisfactoriamente este trabajo de investigación, por el conocimiento transmitido y su sentido del humor.

A la Dra. Claudia Ortiz por su confianza y apoyo incondicional, por sus consejos y correcciones oportunas en aspectos académicos y de la vida.

Al Dr. Rafael Cabanzo y el Dr. Fernando Martínez por su tiempo y disposición en la evaluación de este trabajo.

Al Dr. Álvaro Somoza y el Dr. Alfonso Latorre del Instituto Madrileño de Estudios Avanzados (IMDEA-Nanociencia) por la acogida en su laboratorio, por sus aportes en la formación de sistemas nanoestructurados de oro y por todo optimismo durante mi estancia.

A mis padres: Israel y Mariela, por su amor y ser la fortaleza de mis propósitos y metas emprendidas.

A mis compañeros de síntesis peptídica, especialmente a Marlon Cáceres y Alba López; logramos superar los obstáculos metodológicos,

A mis compañeros y amigos: Erika Lizarazo por su incondicionalidad, Viviana Meléndez, Verónica Chaparro, Nazzoly Rueda, Johanna Gómez, Keyla Ortiz, Zayda Fonseca, Sandra Valcárcel, Jennifer Ruiz, Daissy Paredes, Jhon Artunduaga, Francly Camacho y muchos que se me escapan...por su amistad, buenos deseos y por los momentos de esparcimiento☺.

Muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	20
1.1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAM)	20
1.1.1. Mecanismos de acción de los PAM	21
1.1.2. Síntesis de péptidos antimicrobianos.....	23
1.2. NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs).....	26
1.2.1. Propiedades fisicoquímicas y biológicas de AuNPs.....	27
1.3. FUNCIONALIZACIÓN DE AuNPs.....	30
1.4. MICROORGANISMOS MULTIRESISTENTES (MMR).....	31
1.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	31
1.4.2. <i>Escherichia coli</i>	33
2. MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1. MATERIALES	34
2.2. MÉTODOS.....	35
2.2.1. Diseño bioinformático de PAM.....	35
2.2.2. Síntesis química de PAM.....	36
2.2.3. Purificación de péptidos sintéticos	39
2.2.4. Caracterización de los PAM.....	40
2.2.5. Síntesis de nanoestructuras de oro	41
2.2.6. Conjugación de los PAM's a las AuNCs	42
2.2.7. Caracterización de sistemas nanoestructurados	44
2.2.8. Determinación de la CMI y la CMB de los péptidos sintéticos y de los sistemas conjugados AuNCs@Péptido	45
3. RESULTADOS y análisis	47
3.1. DISEÑO BIOINFORMATICO Y SINTÉSIS DE PAM.....	47

3.2. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PAM SINTÉTICOS	50
3.2.1. Determinación de pureza por cromatografía líquida	50
3.2.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF	51
3.2.3. Dicroísmo circular	53
3.3. SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE nanopartículas de oro.....	56
3.4. FUNCIONALIZACIÓN DE LOS AuNCs CON LOS PAM SINTETIZADOS.....	60
3.4.1. Caracterización de los sistemas AuNCs@Péptido	63
3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS Y DE AuNCs@pÉPTIDO	66
3.5.1. Actividad antimicrobiana de péptidos sintéticos.....	66
3.5.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de sistemas conjugados AuNCs@Péptido.....	75
4. CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	84
Anexos.....	88

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de péptidos antimicrobianos. A) el péptido que en solución acuosa tiene una conformación lineal, adopta una estructura hélice al contacto con la membrana. B) la atracción electrostática entre el péptido y la membrana hace que estos adopten una posición perpendicular provocando la inserción del péptido. C) acumulación de péptido en la cara externa de la membrana provoca el colapso de esta.	22
Figura 2. Esquema de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). (Pérez, 20079)	25
Figura 3. Representación del potencial zeta de una AuNP con su zona interior de iones Au^{2+} fuertemente atraído y la zona exterior de iones negativos absorbidos. (Guerrero, 2008).....	28
Figura 4. Mecanismos de reacciones activación y acople con DCC y HOBT.....	37
Figura 5. Mecanismo de desprotección del grupo FMoc.	38
Figura 6. Montaje de micro-extracción en fase sólida.	39
Figura 7. Esquema del proceso de reducción de Au^{3+} en presencia de BSA (Xie, 2009)	41
Figura 8. A) SPDP. B) EMCS	42
Figura 9. Reacciones involucradas en la conjugación de péptidos con residuo de cisteína en el extremo n-terminal o c-terminal a AuNCs empleando SPDP como <i>crosslinker</i>	42
Figura 10. Reacciones involucradas en la conjugación de péptidos sin residuo de cisteína en el extremo n-terminal o c-terminal a AuNCs empleando EMCS como <i>crosslinker</i>	43
Figura 11. Desalinización en columna NAP-25 de AuNCs linkeados con SPDP y EMCS.....	43
Figura 12. Visualización por PyMol del modelamiento de la estructura secundaria de los PAM diseñados. A) Péptido base Y1. B) Péptido análogo Y2A. C) Péptido Análogo Y3A. D) Péptido base Y4. E) Péptido análogo Y5A. F) Péptido base Y6. G) Péptido análogo Y7A. H) Péptido análogo Y8A.	50
Figura 13. Espectros de MS-MALDI-TOF de los PAM sintetizados.....	53

Figura 14. Modelo de la estructura secundaria α -hélice de PAM en medio micelar de SDS.....	54
Figura 15. Perfil de DC de PAM sintéticos.....	55
Figura 16. Formación de AuNCs por acción de la BSA a 37°C. A) Coloración amarilla al inicio de la reacción. B) Cambio de color a café intenso al culminar la reducción de iones Au^{3+}	57
Figura 17. A) Espectro UV-VIS de AuNCs. B) Fluorescencia de AuNC a 340 nm.	58
Figura 18. Análisis por DLS del tamaño hidrodinámico de AuNCs a partir BSA .	58
Figura 19. Potencial Zeta de los AuNCs a partir de BSA.	59
Figura 20. Esquema de reacción del SPDP con los grupos amino primarios de la BSA en los sistemas AuNCs.	60
Figura 21. Esquema de reacción del EMCS con los grupos amino primarios de la BSA en los sistemas AuNCs.	61
Figura 22. A) Esquema de conjugación de un péptido con residuo de cisteína en extremo terminal a sistemas de AuNCs usando SPDP como <i>crosslinker</i> B) Esquema de conjugación de un péptido sin residuos de cisteína en los extremos terminales a sistemas de AuNCs usando EMCS como <i>crosslinker</i>	62
Figura 23. Sistemas AuNCs@Péptido irradiados con una longitud de onda de 343 nm. A) AuNCs-EMCS@Y4. B) AuNCs-SPDP@Y7A. C) AuNCs-SPDP@Y8A....	64
Figura 24. Cinéticas de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> O157:H7 frente a los péptidos sintéticos.....	67
Figura 25. Cinéticas de crecimiento de la cepa SARM frente a los péptidos sintéticos.	69
Figura 26. Ensayo bactericida del péptido Y4 frente A) SARM. B) <i>E. coli</i> O157:H7	71
Figura 27. Inhibición del crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> O157:H7 en presencia de los péptidos sintéticos.	71
Figura 28. Inhibición del crecimiento bacteriano de SARM en presencia de los péptidos sintéticos.....	72

Figura 29. Cinéticas de crecimiento de la cepa *E. coli* O157:H7 en presencia de los péptidos conjugados a AuNCs..... 76

Figura 30. Cinéticas de crecimiento de la cepa SARM en presencia de los péptidos conjugados a AuNCs. 77

Figura 31. Inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli* O157:H7 en presencia de los AuNCs@Péptido..... 79

Figura 32. Inhibición del crecimiento bacteriano de SARM en presencia de los AuNCs@Péptido. 80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Dominios conservados en el alineamiento múltiple.....	47
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de PAM diseñados.	49
Tabla 3. Masa del ión molecular obtenido del análisis por MALDI-TOF.	52
Tabla 4. Tamaño hidrodinámico promedio y potencial zeta de sistemas nanoestructurados.....	64
Tabla 5. CMI y CMB para cada péptido sintético frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	72
Tabla 6. CMI y CMB para cada péptido sintético frente a SARM.....	73
Tabla 7. Comparación de las CMI y CMB de los péptidos sintéticos y de los productos de la conjugación a las AuNCs frente a <i>E. coli</i> O157:H7.....	79
Tabla 8. Comparación de las CMI y CMB de los péptidos sintéticos y de los productos de la conjugación a las AuNCs frente a SARM.	80

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Alineamiento múltiple en ClustalW de los péptidos base con secuencias de proteínas que presentan identidad mayor al 80%	89
Anexo B. Curva de calibración por HPLC de BSA Cuantificación de la pureza de PAM's sintéticos.	90
Anexo C. Determinación de la pureza de los pam por HPLC. A) Péptido Y1 elución en SPE Sepak C-18 con agua. B) Péptido análogo Y2 elución en SPE Sepak C-18 con 20% acetonitrilo. C) Péptido análogo Y3 elución en SPE Sepak C-18 con 30% acetonitrilo. D) Péptido Y4 elución en SPE Sepak C-18 con 50% acetonitrilo. E) Péptido análogo Y5. F) Péptido Y6 elución en SPE Sepak C-18 con 70% acetonitrilo. G) Péptido análogo Y7 elución en SPE Sepak C-18 con 20% acetonitrilo. H) Péptido análogo Y8 elución en SPE Sepak C-18 con 70% acetonitrilo.	91
Anexo D. EspectroMALDI-TOF de péptido patrón de calibración. Vapreotide [C ₅₇ H ₇₀ N ₁₂ O ₉ S ₂]. Pm = 1131,37 Da.	93
Anexo E. Espectro de fluorescencia de AuNCs vinculados a los diferentes <i>crosslinkers</i> . Longitud de onda de excitación de 343 nm.	94
Anexo F. Espectro UV-Vis. Monitoreo de la reacción de conjugación del péptido y8a a los AuNCs-SPDP.	95
Anexo G. Tamaño hidrodinámico y potencial zeta. A) AuNCs-SPDP. B) AuNCs-EMCS. C) AuNCs-EMCS@Y4. D) AuNCs-SPDP@Y7A. E) AuNCs-SPDP@Y8A	96
Anexo H. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 y SARM frente a los péptidos Y1, Y2A y Y3A.	97
Anexo I. Cinética de crecimiento de <i>E.coli</i> O157:H7 y SARM frente a los AuNCs.	99

DIVULGACIÓN DEL PROYECTO

TRABAJOS INTERNACIONALES PRESENTADOS DEL PROYECTO

1. **PRADA-VARGAS, Y.A. MEJIA-OSPINO, E. CACERES, M. ORTIZ, C. TORRES, R. “IN SITU FUNCTIONALIZATION OF GOLD NANOPARTICLES WITH A NEW SYNTHETIC PEPTIDE WITH ANTIMICROBIAL POTENTIAL AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus*”.** 44th IUPAC World Chemistry Congress, 11-16 Agosto 2013. Istanbul-Turquía. Ponencia Poster.
2. **PRADA-VARGAS, Y.A. MEJIA-OSPINO, E. TORRES, R. ORTIZ, C. CABANZO, R. “SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON POTENCIAL ANTIMICROBIANO FRENTE A *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM)”**, VII Congreso Internacional de Materiales. 29-31 Octubre 2013. Medellín-Colombia. Ponencia Oral.

ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN

Instituto Madrileño de Estudios Avanzados (IMDEA-Nanociencia). Madrid-España. Laboratorio de Nanobiotecnología: Modificación de oligonucleótidos y nanopartículas para aplicaciones biomédicas. Bajo la tutoría de **Álvaro Somoza, Ph.D.** Abril-Junio de 2014.

RESUMEN

TITULO: SÍNTESIS DE NUEVOS PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS BIOCONJUGADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs) CON POTENCIAL ANTIBIÓTICO FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM).

AUTOR: PRADA VARGAS, Yuly A.

PALABRAS CLAVE: Nanopartículas de oro, péptidos antimicrobianos, funcionalización, *E. coli* O157:H7, SARM.

DESCRIPCIÓN

Se diseñaron 8 nuevas secuencias peptídicas con potencial antimicrobiano empleando herramientas bioinformáticas. Los péptidos fueron sintetizados por síntesis en fase sólida con la estrategia FMoc, usando DCC y DIPEA como activadores del grupo carboxilo y piperidina al 25% para desprotección del grupo FMoc. Las secuencias de interés fueron confirmadas por espectrometría de masas por el método de desorción/ionización asistida por una matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). La estructura secundaria fue determinada por dicroísmo circular (DC) un medio micelar de SDS. Los péptidos Y4, Y7A y Y8A exhibieron mayor actividad antibiótica frente a las cepas *E. coli* O157:H7 y SARM con CMI_{50} inferior a $10\mu M$ y el péptido Y4 fue bactericida con una CMB igual a $70\mu M$ frente a SARM. Estos péptidos fueron conjugados a nanoclusters de oro (AuNCs) con un tamaño hidrodinámico promedio de 2,11 nm sintetizadas previamente empleando BSA como agente reductor y $HAuCl_4$ como precursor de las AuNCs. La conjugación se realizó empleando dos crosslinkers: i) el SPDP que permitió enlazar los péptidos Y7A y Y8A a los sistemas AuNCs@BSA. ii) el EMCS para unir el péptido Y4. Se obtuvieron sistemas nanoestructurado con un tamaño hidrodinámico máximo de $5,91\text{ nm}\pm 0,7$. Los productos de la conjugación superaron notablemente la actividad antimicrobiana exhibida por los péptidos individuales

* Tesis de Maestría

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencia, Escuela de Química. Director: MEJIA, E. Co-director: TORRES, R.

ABSTRACT

TITLE: SYNTHESIS OF NEW ANTIMICROBIAL PEPTIDE BIOCONJUGATES WITH GOLD NANOPARTICLES (AuNPS) WITH POTENTIAL ANTIBIOTIC AGAINST *Escherichia coli* O157: H7 AND *Staphylococcus aureus* METHICILLIN-RESISTANT (MRSA)*.

AUTHOR: PRADA VARGAS, Yuly A.

KEYWORDS: Nanoparticles of gold, antimicrobial peptides, functionalization, *E. coli* O157: H7, MRSA.

DESCRIPTION

Eight new antimicrobial peptide sequences were designed using bioinformatics tools. The peptides were synthesized by solid phase synthesis with Fmoc strategy, using DCC and DIPEA as activators of the carboxyl group and 25% piperidine for Fmoc group deprotection. The sequences of interest were confirmed by mass spectrometry by the method of desorption / ionization matrix assisted with Analyzer time of flight (MALDI-TOF). The secondary structure was determined by circular dichroism (CD) in SDS micellar solution. The peptides (Y4, Y7A and Y8A) exhibited greater antibiotic activity against *E. coli* O157: H7 and MRSA with MIC₅₀ less than 10 μ M and Y4 was bactericidal peptide with BMC equal to 70 μ M against MRSA. These peptides were conjugated to gold nanoclusters (AuNCs) with an average hydrodynamic size of 2.11 nm previously synthesized using BSA as reducing agent and as a precursor HAuCl₄ AuNCs. The conjugation process was performed using two crosslinkers: i) SPDP for enabling Y8A and Y7A peptides to AuNC@ BSA systems. ii) The EMCS to bind the Y4 peptide. The nanostructured systems had a maximum hydrodynamic size of 5,91 nm \pm 0,7. The conjugation products exhibited significantly antimicrobial activity in compared to individual peptides.

* Master Thesis

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencia, Escuela de Química. Research Advisor: MEJIA, E., TORRES, R.

INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (PAM's) constituyen un grupo de biomoléculas presentes en todos los sistemas vivos como una línea de defensa innata frente a microorganismos patógenos y que adicionalmente participan en procesos de respuesta inflamatoria y cicatrización.

De su actividad antibiótica se puede mencionar que los péptidos son moléculas multifuncionales y pueden actuar por diferentes mecanismos de acción ya sea la interacción directa con la membrana celular, la inhibición en la síntesis de proteínas y replicación del ADN y la modificación del potencial de membrana teniendo como resultado un efecto bacteriostático o bactericida.

El espectro de acción de los PAM's es amplio, presentando actividad antimicrobiana, anti-fúngica, anti-parasitaria, anti-viral e incluso antitumoral; lo sorprendente de estas biomoléculas no es solo que puedan ser encontrados en diferentes organismos vivos sino que además presentan una estructura y composición química variada como resultado de procesos evolutivos en la duplicación y supresión selectiva de secuencias genéticas de acuerdo con la interacción de las especies con su ambiente y de su relación con patógenos específicos. Siendo el contacto entre estos patógenos y los individuos la principal causa de enfermedades infecciosas que según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) afectan la salud humana incrementando la morbilidad y mortalidad especialmente en niños de 0-5 años, adultos mayores entre 70-90 años y en individuos inmuno-suprimidos. Dentro de este grupo de agentes infecciosos, virulentos y altamente resistentes se encuentran cepas de *Escherichia coli* como lo es la *E. coli* O175:H7 quizás una de la más perjudiciales causante del síndrome urémico hemolítico (SUH); *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) que produce afecciones cutáneas, cuyo principal vector de contagio se encuentra en clínicas y hospitales en pacientes con heridas abiertas y en fase de post operatorio.

Dado el avance tecnológico y la convergencia de diferentes ciencias como la bioquímica, química farmacéutica, microbiología y la nanobiotecnología, el estudio de los PAM's es imprescindible siendo una alternativa eficaz en aplicaciones biomédicas frente al uso de antibióticos convencionales ya que tienen mayor compatibilidad con los sistemas vivos, presentan baja toxicidad, son altamente específicos y pueden ser degradados fácilmente evitando su acumulación en los tejidos.

La investigación de los PAM's parte desde el diseño secuencial, metodologías que brinden mayores rendimientos en la síntesis química así como el estudio de sus propiedades fisicoquímicas las cuales les confieren diferentes mecanismo de acción frente a diferentes microorganismos. Adicionalmente, la nanotecnología ha brindado la posibilidad de incluir estos principios activos en diferentes sistemas nanoestructurados como lo son: nanopartículas metálica, poliméricas, liposomas y dendrímeros, entre otros; estos sistemas a escala nanométrica presentan propiedades optoelectrónicas, fisicoquímicas y biológicas sorprendentes dando lugar a nuevos materiales con aplicaciones aún más innovadoras como sistemas de transporte, vectorización y liberación controlada de fármacos, terapia fotoelectrónica, marcadores moleculares de reconocimiento celular y diagnóstico por imágenes, entre otras.

El presente trabajo presenta los resultados obtenidos en el diseño y síntesis de nuevos péptidos con actividad antibiótica frente a cepas Gram-negativas y Gram-positivas como *E. coli* O157:H7 y *SARM* respectivamente; los nuevos péptidos fueron diseñados mediante herramientas bio-informáticas satisfaciendo parámetros fisicoquímicos inherentes a su actividad antimicrobiana. Las secuencias diseñadas fueron sintetizadas empleando el método de síntesis en fase sólida (SFS) en medio ácido usando la estrategia FMoc propuesta por *Merrifield*. Una vez obtenidos los péptidos, fueron purificados por cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); y caracterizados por espectrometría de masas (EM) por la técnica de ionización/desorción asistida por matriz con analizador de

tiempo de vuelo (MALDI-TOF-TOF), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF) y dicroísmos circular (DC). Finalmente se realizó la conjugación de estos péptidos a nanopartículas de oro (AuNPs) usando un crosslinker. Los sistemas nanoestructurados fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas como fluorescencias y UV-Vis, adicionalmente se realizaron medidas del potencial zeta (ζ) para conocer la estabilización de dichos sistemas. Finalmente, tanto los péptidos sintéticos como los nanosistemas producto de la conjugación fueron probados frente a las cepas *E. coli* O157:H7 y SARM empleando el método de micro dilución en caldo por mediciones de densidad óptica en un espectrofotómetro de microplacas de ELISA.

1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAM)

Todas las especies poseen un sistema de defensa especializado y adaptado para la supervivencia en el ambiente en el que se desarrollan, y los PAM son un grupo de biomoléculas que conforman dicho sistema inmunológico innato; son producidas por diferentes tejidos y tipos celulares. Algunos de estos péptidos son producidos consecutivamente mientras que otros son consecuencia de las citoquinas proinflamatorias y agentes exógenos; pueden manifestarse en procesos de cicatrización contribuyendo a la eliminación de infecciones y la reparación de tejidos (Oppenheim, 2003; Elsbach, 2003). Los PAM's son secuencias peptídicas en un rango entre 10-50 residuos de aminoácidos, caracterizados por cadenas laterales hidrofílicas e hidrofóbicas que en medio acuoso tienden a doblarse adoptando estructuras secundarias de baja energía ya sean de tipo α -hélice o β -plegada, dando lugar a un comportamiento anfipático (Hancock, 2006).

Los péptidos antimicrobianos presentan ciertas características fisicoquímicas y evolutivas, la mayoría de ellos tiene un carácter catiónico a pH fisiológico con una carga neta entre +2 y +9, presentando un alto contenido de lisina y arginina en relación a residuos negativamente cargados como el ácido aspártico o glutámico [Hancock, 2001; Stark, 2002]. Su comportamiento anfipático le da la capacidad de interactuar con la membrana de las bacterias, por lo que mayoritariamente tiene aproximadamente una proporción mayor o igual al 30% de residuos hidrófobos (Scott, 2000; Blondelle, 1992).

Actualmente, existen cerca de 7438 secuencias de péptidos antimicrobianos entre nativos y sintéticos según reportes de la base de datos *CAMP: Collection of Anti-Microbial Peptides* (Sitio Web: <http://www.camp.bicnirrh.res.in/>).

1.1.1. Mecanismos de acción de los PAM

Los mecanismos de acción de estos agentes antimicrobianos son bastante diversos y están relacionados directamente a sus interacciones moleculares y naturaleza anfipática. Estos mecanismos de acción son un factor importante en la respuesta resistente de los microorganismos. Dentro de los mecanismos que han sido descritos se mencionan los siguientes:

INTERACCIONES CON LA MEMBRANA: En principio, la interacción de los péptidos con la membrana bacteriana es resultado de la atracción electrostática entre los grupos polianiónicos de las paredes, bien sea por los ácido teicóicos y lipoteicóicos de las Gram-positivas y con los lipopolisacáridos presentes en las Gram-negativas. Producto de esta interacción se generan áreas de inestabilidad en la membrana externa permitiendo la translocación del péptido; una vez ubicado en la membrana el péptido puede modificar su conformación y causar daños en la membrana o al interior (Dubovskii, 2008; Kristiansen, 2005; Montaña, 2002).

MECANISMO DE BARRIL: Luego de interactuar con la membrana, los péptidos se reorientan formando un vallado (empalizado-cercado-barrera) con su cadenas hidrofóbicas encarando las zonas hidrófobas de la membrana, mientras las cadenas polares crean un poro hidrofílico irregular y de tamaño variable, causando la pérdida de presión osmótica y variación del potencial de membrana (Hetru, 2002; Rodríguez, 2005).

MECANISMO FORMA ANULAR: Este mecanismo tiene lugar cuando el péptido alcanza una concentración suficiente hace que los lípidos de la membrana bacteriana se doblen formando un canal por interacción al extremo más hidrófobo del péptido (Yang, 2001).

MECANISMO DE ALFOMBRA: La acción de los péptidos puede estar ligada también a la formación de una densa capa de péptido insertada sobre una cara externa de la membrana, esta alfombra es capaz de debilitar la membrana y causar el colapso. En este tipo de mecanismo tiene lugar la muerte celular por

perdida del citoplasma, este tipo de mecanismo se ha encontrado en el laticín extraído de la araña *Lachesana taravaebi* (Park, 1998).

MECANISMO DE AGREGADO: Al igual que un detergente, el péptido a una concentración suficiente se reorienta permitiendo la formación de estructuras micelares que se extienden en la bicapa formando un complejo péptido lipídico. Estos agregado se distribuyen de forma aleatoria formando canales a través de los cuales se liberan iones, causando la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático o por la desintegración espontanea de la membrana lo cual conlleva a la internalización de los péptidos afectando otros blancos celulares (Hancock, 2006; Yang, 2001; Rapaport, 1992).

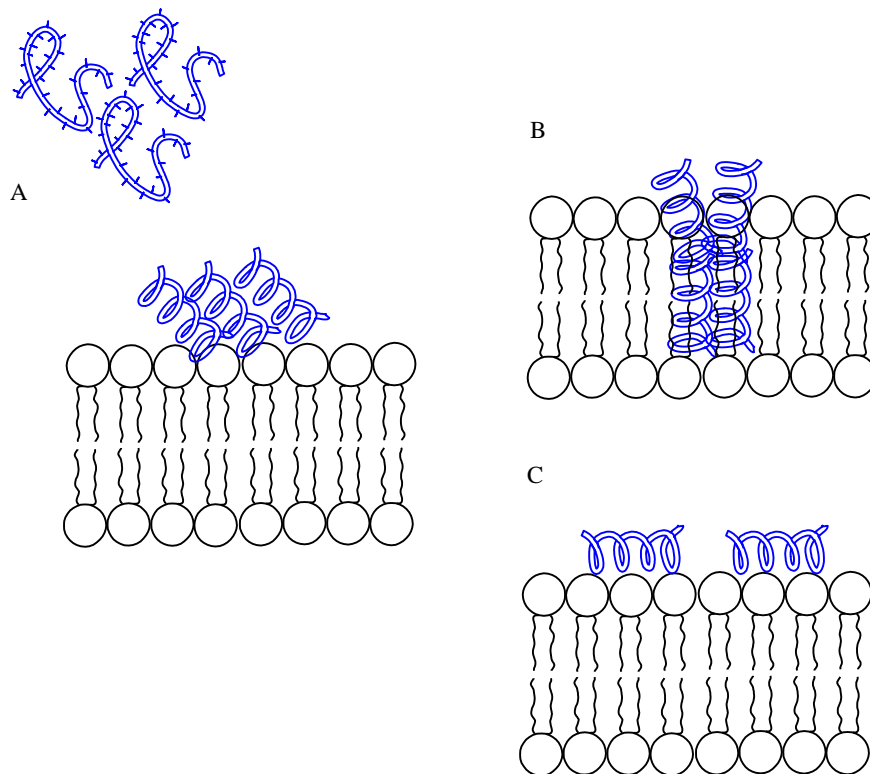


Figura 1. Mecanismo de péptidos antimicrobianos. **A)** el péptido que en solución acuosa tiene una conformación lineal, adopta una estructura hélice al contacto con la membrana. **B)** la atracción electrostática entre el péptido y la membrana hace que estos adopten una posición perpendicular provocando la inserción del péptido. **C)** acumulación de péptido en la cara externa de la membrana provoca el colapso de esta.

MECANISMOS DE ACCIÓN SOBRE ÁCIDOS NUCLEICOS Y SÍNTESIS DE PROTEÍNAS: En los últimos años se han logrado identificar mecanismos de acción bacteriana que actúan específicamente sobre blancos internos, como es el caso de péptidos que logran traspasar y permeabilizarse a través de la membrana logrando unirse al ADN mediante motivos de unión relacionados con las histonas; también pueden unirse a otras proteínas y enzimas como la ARN-polimerasa logrando inhibir el crecimiento bacteriano mediante la interacción con los ácidos nucleicos (Park, 1998; Friedrich, 2001; Marchand, 2006).

1.1.2. Síntesis de péptidos antimicrobianos

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) es en la actualidad uno de los métodos más sencillos y eficientes para obtener secuencias peptídicas de hasta 50 aminoácidos, disminuyendo el rendimiento en la medida que aumenta el número de residuos. Esta metodología descrita inicialmente por Merrifield se basa en el anclaje de un aminoácido desde su extremo C-terminal a los sitios activos de un soporte polimérico inerte al medio de reacción (Merrifield, 1997). Dentro de los soportes o resinas más comunes se encuentran la 4-metilbencilhidrilamina (MBHA) y la hidroximetilfenilacetamidometil (PAM). El crecimiento de la cadena se lleva a cabo adicionando uno a uno los aminoácidos correspondientes. La elongación de la cadena tiene lugar desde el extremo C-terminal al N-terminal, siendo la adición del siguiente aminoácido sobre el grupo α -amino del residuo previamente enlazado (Williams, 1997). Los aminoácidos se encuentran debidamente protegidos en sus cadenas laterales para asegurar la formación del enlace peptídico evitando posibles productos secundarios.

Esta síntesis cuenta con dos estrategias diferentes, una de ellas emplea el tertbutoxi-carbonil y benzil (Boc/Bzl) como protectores de grupo α -amino y de cadenas laterales respectivamente. Y en la segunda se usan los grupos: 9-fluorometoxicarbonil (FMoc) como grupo protector del α -amino y terc-butil (tBu)

como protector de cadenas laterales. En ambos casos el grupo protector del α -amino se elimina antes de unir el siguiente aminoácido. La estrategia Boc/Bzl se lleva a cabo en medio ácido mientras que la FMoc/tBu se realiza en medio básico (Andreu, 1994; Navarrete, 2007).

Para la formación del enlace peptídico se requiere la previa activación del grupo α -carboxilo que se adicionara a la cadena, distinguiéndose así diferentes aditivos para el acoplamiento como la N,N-diciclohexilcarbodimida (DCC) que es quizás el agente activador más empleado, seguido del N,N-diisopropilamina (DIPEA).

Por otra parte, se distinguen otros grupos de reactivos que son adicionados durante el acoplamiento, generalmente benzotriazoles como: el tetrafluoroborato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), hexafluorofosfato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) y el 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HoAT), que se usan para evitar la racemización y acelerar la reacción al convertir al carboxilato formado una especie altamente reactiva (Jones, 2002; Albericio, 1997).

Una vez concluida la síntesis del péptido de interés se procede a desanclar el péptido desde la resina y a eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales; esto se lleva a cabo en un mismo paso realizando una hidrólisis ácida. Para el caso de la estrategia FMoc/tBu se emplea ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de triisopropilsilano (TIS) y 1,2-etanoditiol (EDT). Estos dos últimos reactivos se conocen como *scavengers* y cumplen la función de captar las especies generadas en la desprotección, generalmente carbocationes que eventualmente pueden reaccionar con las cadenas laterales ya desprotegidas (Applied Biosystem Bulletin 1998).

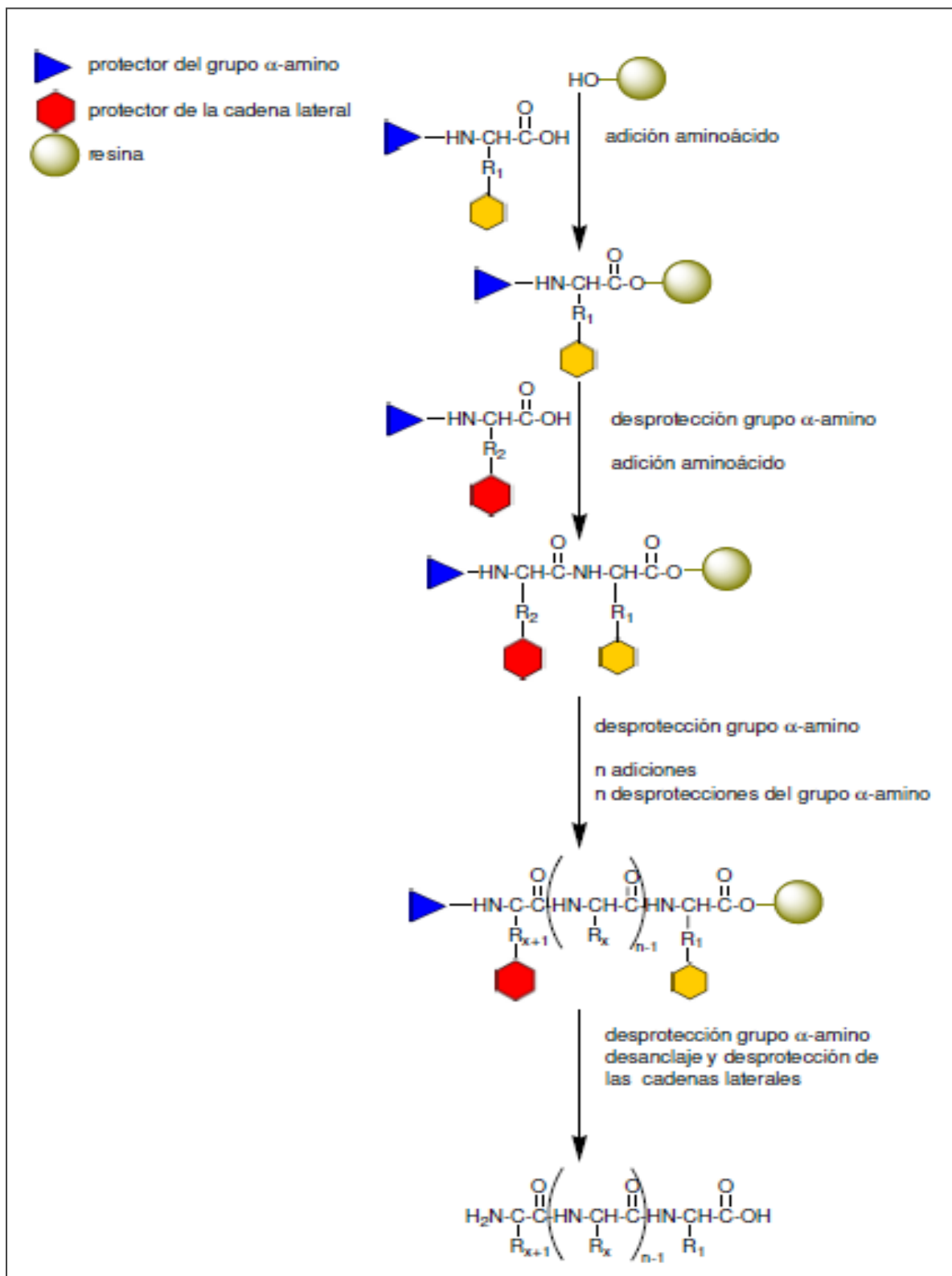


Figura 2. Esquema de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). (Pérez, 20079)

1.2. **NANOPARTÍCULAS DE ORO (AuNPs)**

Existe un gran número de investigaciones en las cuales se emplean nanopartículas conjugadas a moléculas con actividad farmacológica para mejorar su permeabilidad y difusión a través de la membrana celular, evitando la degradación proteolítica y disminuyendo su posible toxicidad asociada. Una alternativa novedosa presentada actualmente hace referencia al uso de nanopartículas de oro (AuNPs) con un tamaño menor a 5 nm, en sistemas biológicos, logrando mayor biocompatibilidad; ya desde siglos se conoce las bondades terapéuticas del oro y sus derivados para tratar la artritis reumatoide y afecciones bacterianas como la causada por el bacilo de *Koch* (Bhattacharya, 2008; Al-Qadi, 2012).

Recientes estudios asocian a las AuNPs actividad antitumoral y fotocatalítica convirtiéndose así en alternativas eficientes para combatir células cancerígenas y en terapias contra la enfermedad de Alzheimer. Las AuNPs también presentan actividad antimicrobiana y su empleo como bactericida ha sido bien acogido por la comunidad científica debido a su baja toxicidad, ya que en sus mecanismos de acción no se contempla la formación de especies reactivas de oxígeno (ROX) como sí lo hacen las nanopartículas de plata bien conocidas por su alto potencial antimicrobiano (Gienlen, 2005; Shukla, 2005; Connor, 2005).

Es así como la conjugación de péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, cadenas de ADN y otros sustratos a nanopartículas de oro se han convertido en una herramienta eficaz para el diagnóstico de enfermedades y el tratamiento de infecciones bacterianas (Yan, 2012; Yuyun, 2010). Recientemente se han investigado sistemas novedosos y multifuncionales que se basan en nanocluster de oro (AuNCs) los cuales son partículas con tamaños subnanométrico (≤ 1 nm) con propiedades óptoelectrónicas tamaño-dependientes donde desaparece la banda plasmónica de resonancia y aparecen propiedades de fluorescencia y luminiscencia. Este tipo de sistemas han sido obtenidos empleando como agentes reductores proteínas de alto peso molecular como la albumina de suero bovino (BSA); los residuo de aminoácidos como cisteína, tirosina y triptófano llevan a

cabo la reducción de iones Au^{3+} a Au^0 , adicionalmente la BSA provee de estabilidad a los AuNCs (Hoffman, 2014; Liu, 2013; Xie, 2009).

1.2.1. Propiedades fisicoquímicas y biológicas de AuNPs

TAMAÑO: De acuerdo con la definición utilizada por la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), una nanopartícula es una partícula cuyo tamaño se mide en nanómetros, a menudo restringida a diámetros entre 1 a 100 nm. Las nanopartículas pueden formar sistemas coloidales al estar dispersas en un solvente ya que su tamaño tan reducido hace que la interface entre el sólido de la nanopartícula y el medio sea grande (Duffus, 2007).

CARGA: En general las partículas dispersas en un sistema acuoso adquieren una carga superficial. En el caso de las AuNP, ésta medida conocida como potencial zeta, se encuentra dada por los átomos de oro no reducidos que se ubican superficialmente en la nanopartícula, y por la adsorción de los iones negativos que circundan en la fase dispersante. Esta carga intrínseca de la partícula más los iones fijos adsorbidos conforman lo que se conoce como la doble capa eléctrica. El espesor de esta doble capa es, lo que se conoce en la teoría clásica como la longitud de *Debye*, las cargas que quedan por dentro de esta longitud no ejercen fuerza efectiva, por eso se habla de apantallamiento. Las cargas superficiales modifican la distribución de los iones presentes, lo que da origen a una zona alrededor de la partícula que es eléctricamente diferente al medio de la suspensión. El potencial zeta (ζ) se mide en milivoltios (mV) y su magnitud se correlaciona con una buena estabilidad coloidal; las partículas con un alto potencial zeta, ya sea positivo o negativo, se repelerán unas con otras. Los valores reportados para AuNP en medio acuoso que varían entre $\zeta < -30 \text{ mV}$ ó $\zeta > +30 \text{ mV}$ son considerados óptimos (Olmedo, 2007; Malvern Instruments, 2004).

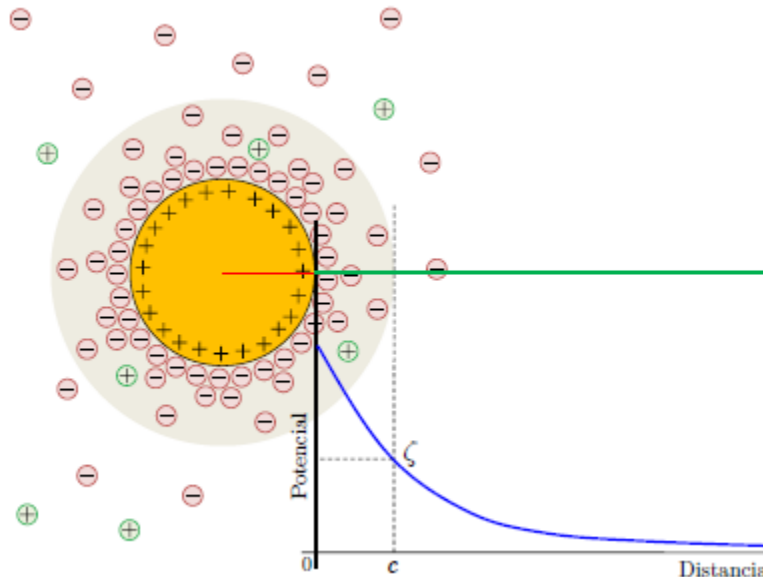


Figura 3. Representación del potencial zeta de una AuNP con su zona interior de iones Au^{2+} fuertemente atraído y la zona exterior de iones negativos adsorbidos. (Guerrero, 2008).

Esta tendencia de los sistemas coloidales ha sido descrita en la teoría clásica llamada “DLVO” por las iniciales de sus descubridores (Derjaguin, Landau, Verweert y Overbeek); la cual plantea que la estabilidad de los coloides depende de la energía potencial total, U_{DLVO} , que está dada en primer lugar por las fuerzas de repulsión electrostática, en segundo lugar por las fuerzas atractivas de Van der Waals y finalmente por la energía potencial derivada del solvente que está relacionada estrechamente con su constante dieléctrica; sin embargo ésta última contribución es depreciable para la mayoría de sistemas; esta teoría predice sustancialmente la estabilidad de los coloides cuando se trata de NP en sistemas estabilizados por cargas electrostáticas (Levine, 1996).

RESONANCIA DEL PLASMÓN SUPERFICIAL: El color visible que se percibe de las suspensiones coloidales, depende del tamaño de las nanopartículas, y es debido a lo que se conoce como “plasmón de superficie”, definido como los *quantum*, producto de las oscilaciones de cargas superficiales originada por un campo eléctrico externo. El fenómeno del plasmón se observa tanto en películas

ultra delgadas como en nanopartículas y se relaciona estrechamente con el área superficial (Aroca, 2006). El primero en hacer una descripción teórica del plasmón de superficie en las nanopartículas fue *Mie*, quien predijo para las NP, la absorción y dispersión en la longitud visible como suma de las oscilaciones magnéticas y eléctricas. El máximo de absorción del plasmón para las AuNP en el desarrollo experimental se ubica en un rango entre 520-540 nm, esta longitud de onda corresponde al color verde, y es la luz que las NP absorben. La luz que se transmite hace que el coloide se vea de un color rubí muy llamativo. Cuando las AuNP se agregan, ese máximo de absorbancia se desplaza hacia longitudes de onda más largas, es decir tiene lugar un comportamiento batocrómico; es por esta razón que el plasmón de superficie es de vital importancia para la caracterización de nanopartículas por análisis en el ultravioleta visible (Mie, 1908).

ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA: Debido al área superficial y carga de las nanopartículas metálicas estas pueden interaccionar fácilmente con la membrana celular de diferentes microorganismos y células humanas, por su tamaño tan pequeño presentan alta capacidad de difusión y permeabilización; esto las convierte en materiales de interés para la nanobiotecnología (Tokeer, 2013; Connor, 2005).

Dentro de los mecanismos de acción estudiados para las AuNPs de acuerdo con la actividad antimicrobiana exhibida se encuentra en primera instancia la interacción electrostática como la densidad electrónica de grupos funcionales negativos presentes en los componentes principales de la pared bacteriana como los ácidos teicóicos y peptidoglicanos en el caso de bacterias Gram-positivas, y polisacáridos en el caso de las Gram-negativas (Mahandra, 2008). Las AuNPs también pueden unirse a proteínas transmembrana por medio de uniones Au-S, con los grupos sulfuro de la cisteína presente en dichas proteínas, esta unión puede modificar el potencial de membrana afectando el flujo iónico de la célula. Las AuNPs con un tamaño inferior a 10 nm pueden permeabilizarse con facilidad a través de la pared o atravesar canales iónicos si tienen la carga adecuada, al

alcanzar el interior pueden unirse a diferentes proteínas llevándolas a la inhibición y al llegar al núcleo pueden unirse al ADN afectando directamente la transcripción y replicación (Giljohann, 2010).

1.3. FUNCIONALIZACIÓN DE AuNPs

Las propiedades fisicoquímicas exhibidas por las nanopartículas metálicas como el área y carga superficial, les confieren la capacidad de absorber diferentes moléculas con grupos donadores de electrones como: tiolatos, aminas, ácidos carboxílicos y alcoholes. La modificación superficial de las nanopartículas da lugar a la creación de nuevos materiales con propiedades físicas y bioquímicas únicas y novedosas (Leonid, 2013).

Particularmente, las AuNPs tienen mayor afinidad por los átomos de azufre presentes en dichos ligandos; cuando el enlace es Au-S se hace a través de un enlace tipo σ , el azufre es donador de densidad electrónica y el átomo de oro es el aceptor, pero cuando el enlace que tiene lugar es de tipo π los electrones del metal están parcialmente deslocalizados en los orbitales moleculares formados entre los orbitales "d" llenos del metal y el orbital "d" vacío del azufre. El proceso de conjugación además de conferir especificidad y funcionalidad a las nanopartículas también ejerce un efecto de estabilización (Dorota, 2011; Laurence, 2008).

En la última década se han reportado un gran número de investigaciones acerca de las ventajas en bioquímica y medicina del uso de nanoestructuras conformadas por las AuNPs conjugadas a moléculas biológicamente activas como fármacos, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos. Estos sistemas a escala nanométrica permiten mayor selectividad en la entrega de principios activos a lugares específicos de las células; su capacidad de permeabilización, biocompatibilidad y estabilidad brinda la posibilidad de ser empleados en terapia médica para combatir diferentes patógenos como células cancerígenas y microorganismos multiresistentes (Lin, 2012; Brown, 2010; Kun-Chan, 2004).

Es así, como actualmente diferentes agentes antimicrobianos son anclados a las superficie de las AuNPs, entre ellos péptidos y proteínas cuya conformación estructural y espacial confiere funcionalidad y afinidad por determinadas células microbianas, dicha afinidad estará determinada por la presencia de aminoácidos cargados positivamente que faciliten la interacción entre membrana bacteriana compuesta de ácidos teicóicos y peptidoglicano en el caso de las Gram-positivas y lipopolisacáridos y peptidoglicano en las Gram-negativas. La funcionalización de AuNPs también mejora el transporte y distribución del péptido al interior de las bacterias ya que el área superficial de la AuNP permite fijar un elevado número de moléculas de péptido las cuales se mueven como una sola unidad (Svarovsky, 2011; Shu, 2010).

1.4. MICROORGANISMOS MULTIRESISTENTES (MMR)

Aunque no exista una definición aceptada de “bacterias multiresistentes”, el concepto es aceptable cuando se hace referencias a microorganismos que: a) exhiban resistencia a una o más familias de antibióticos de uso habitual, b) su tratamiento suponga una alta dificultad clínica y c) la posibilidad de brotes epidémicos sea latente (Rodríguez, 2004).

En los últimos años las enfermedades infecciosas causadas por estos patógenos ha crecido significativamente; según un informe de la *Organización Mundial de la Salud (OMS)* son una de las principales causas de muerte con cerca de 13 millones de defunciones al año en todo el mundo.

1.4.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva, como todo su género se caracteriza por ser inmóviles y no producir esporas. A diferencia de las demás especies, *S. aureus* produce una enzima coagulasa, que permite a la bacteria coagular el plasma sanguíneo al convertir el fibrinógeno en fibrina. Esta bacteria también produce otras proteínas de superficie, las cuales media su adherencia al

huésped por enlaces específicos al colágeno, elastina y fibronectina. Su pared celular está compuesta por casi un 60% de peptidoglicano proporcionando forma y estabilidad al microorganismo. El 40% restante corresponde a ácidos teicóicos, los cuales se unen covalentemente al péptdoglicano y lípidos de la membrana celular. Son microorganismo altamente resistentes al calor y la desecación, sobreviviendo aún en ambiente fuertemente salinos (7,5% NaCl) (Pahissa, 2009).

S. aureus forma parte de la flora normal microbiana de los seres humanos, siendo portadora permanente cerca del 20% de la población mundial. Esta bacteria puede colonizar áreas como la piel, fosas nasales y el tracto gastrointestinal; cuando la barrera mecánica se rompe pueden ingresar a tejidos más profundos y producir la infección. Los pacientes con infecciones de *S. aureus* suelen infectarse por la misma cepa presente en las fosas nasales o por la transmisión entre individuos tanto a nivel hospitalario (nosocomial) como en la comunidad. Es causal de infecciones a nivel de la piel y tejidos blandos en forma de celulitis, forúnculos o abscesos, también presentarse casos de fascitis necrosante y bacteriemia (artritis, osteomielitis y abscesos en el pulmón) (Castillo, 2011; Mensa, 2008).

A lo largo de los años *S. aureus* ha desarrollado múltiples mecanismos de resistencia a los antimicrobianos y aunque actualmente su resistencia a la meticilina constituye el principal problema terapéutico, se han descrito otros aislados de *S. aureus* resistentes a otros antibióticos empleados en el tratamiento contra infección estafilocócica. El desarrollo de resistencia es un proceso complejo y dinámico (Boucher, 2008; Hddadin, 2002).

En los años 40's la mayoría de cepas de *S. aureus* eran sensibles a la penicilina G, sin embargo el microorganismo rápidamente empezó a producir una betalactamasa que inactivaba las penicilinas y las aminopenicilinas, esto llevo al desarrollo de nuevas penicilinas sintéticas inmunes al efecto de resistencia como la meticilina. Pero en 1961, mismo año de su lanzamiento aparecieron las cepas de *S. aureus* meticilino resistente (SARM) (Nafziger, 1989). Una de las características de SARM es su resistencia a otras familias de antibióticos como la

gentamicina, cloranfenicol, aminoglucósidos, tetraciclinas, lincosaminas, micrólidos y las fluoroquinolonas; este hecho ya llevado al uso excesivo de la vancomicina (glicopéptido), trayendo como consecuencia la aparición de cepas con sensibilidad disminuida a este fármaco. No obstante, SARM aún es sensible a antimicrobianos de última generación como al trimetropin, sulfametoxazol, quinupristina, dalfopristina, y al linezolid. Por tanto, la prevalencia y la rápida diseminación de SARM ha difuminado las fronteras entre su adquisición nosocomial o en la comunidad, creando la necesidad del diagnóstico inmediato y de nuevas estrategias terapéuticas (Hiramatsu, 2001).

1.4.2. *Escherichia coli*

Es una bacteria Gram-negativa del genero *Enterobacteriaceae*, comúnmente presente en el intestino de los mamíferos cumpliendo funciones metabólicas, sin embargo algunas cepas pueden ser patógenas y altamente virulentas como es el caso del serotipo *E. coli O157:H7*, a la cual se le atribuyen la mayoría de brotes de diarrea en países subdesarrollados y es causante del síndrome urémico hemolítico (SUH) por ser productora de la enterotóxina y causante de grandes brotes de colitis hemorrágica (Nielsen, 2006). El SUH se caracteriza principalmente por el daño renal agudo y la anemia hemolítica. La habilidad patogénica de esta cepa radica en la segregación de toxinas que dañan el endotelio vascular y por la producción de proteínas adhesinas como la intimina, la cual confiere a la bacteria la capacidad de adherirse a las células epiteliales (Martínez, 2004).

Numerosos estudios en diferentes países han demostrado que la principal vía de transmisión de esta bacteria tiene lugar con el consumo de alimentos contaminados con heces que han sido deficientemente lavados y cocinados. La infección por *E. coli O157:H7* ocurre en todos los grupos de edades, pero la incidencia más alta se presenta en niños menores de 5 años y adultos mayores, alcanzando altos índices de morbilidad y mortalidad, ya que no existe un tratamiento específico frente a este patógeno, sino terapia de soporte para las complicaciones derivadas como la anemia y la falla renal (Domínguez, 2010; Caprioli, 2005).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

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

Los medios de cultivo Luria-Bertani y Muller-Hilton, así como el agar fueron obtenidos de OXIOI. Los disolventes grado HPLC como el acetonitrilo y metanol fueron adquiridos en Merck. El diclorometano e isopropanol grado analítico fueron obtenidos en Merck. El ácido cloroaúrico ($\text{HAuCl}_4 \geq 99\%$), el citrato de sodio y la albumina de suero bovino fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Los *crosslinker* empleados en la conjugación de marca Sigma-Aldrich fueron suministrados por el IMDEA-Nanociencia.

Las cepas bacterianas de *E. coli* O157:H7 fueron donadas por la Universidad Pontificia Javeriana de Colombia. *S. aureus* metilcilino resistente fue adquirida desde el Laboratorio de Bacteriología de la UIS.

Todas las reacciones y ensayos de actividad antimicrobiana fueron realizados empleando agua MilliQ de resistividad 18,2 Ω adquirida en el Laboratorio de Instrumentación Química UIS.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Diseño bioinformático de PAM

El diseño de nuevos péptidos con potencial antimicrobiano se realizó mediante el uso de las máquinas de soporte vectorial (SVM, por sus siglas en inglés) utilizando el modelo denominado Relación Cuantitativa entre Estructura-Actividad (QSAR, por sus siglas en inglés), para realizar el reconocimiento de patrones y crear algoritmos que permitieron identificar la actividad antibacteriana (Camacho, 2013; Van-Jenssen, 2008; Davor, 2011).

A partir del uso de otras herramientas como las bases de datos en línea y de acceso libre como son *National Center for biotechnology information* (NCBI) cuyo sitio en internet es: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, y la base *Collection of Anti-Microbial Peptides*. Se establecieron los valores correspondientes para las propiedades adicionales como hidrofobicidad, índice alifático, carga eléctrica total, punto isoeléctrico, peso molecular, entre otras (Wang, 2002, Thomas, 2010).

Las secuencias peptídicas fueron alineadas contra diferentes proteínas homólogas, todas publicadas en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Las secuencias fueron alineadas usando la herramienta BLASTP y el método de alineamiento múltiple de secuencia Clustal W con el fin de obtener residuos conservados en los nuevos péptidos diseñados y a su vez poder cambiar aminoácidos de la secuencia del péptido para dar origen a péptidos análogos también con propiedades antimicrobianas.

Mediante el análisis descrito anteriormente se lograron diseñar 8 secuencias con potencial actividad antimicrobiana. Adicionalmente, se empleó el programa PEP-FOLD (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) y el visualizador Pymol para modelar y elucidar la estructura secundaria de cada péptido respectivamente (Nielsen, 2010; Maupetit, 2009).

2.2.2. Síntesis química de PAM

Los péptidos se obtuvieron mediante síntesis química en fase sólida (SPPS de sus siglas en inglés), empleando la estrategia Fmoc en bolsas de polipropileno, para realizar la construcción del péptido desde su extremo C-terminal fue empleada una resina Rink amida 4MBHA (capacidad: 0.63 mmol/gramo). Las bolsas con 100 mg de resina fueron marcadas y selladas. Los aminoácidos correspondientes en cada secuencia fueron acoplados con N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) como agente activador y O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) como agente anti-racémico (7 equivalentes DIPEA /5 equivalentes TBTU) para acoples de menos de 3 horas y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) junto con el 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) para los acoples de 12 horas (Merrifield, 1997; Kent, 1979). El indicador azul de bromofenol (1% en DMF) se añadió a la solución al finalizar cada etapa de acoplamiento para verificar de forma cualitativa la eficiencia de los acoples en la reacción. La desprotección del grupo Fmoc se llevó a cabo con piperidina al 20% en DMF en dos lavados de 10 minutos cada uno (Novabiochem, 2007).

Finalizada la elongación del péptido se realizó el procedimiento de clivaje con el fin de soltar el péptido desde la resina usada como soporte en la síntesis. Los péptidos fueron clivados de la resina con Ácido Trifluoroacético/ agua/ Trihidroxipropilsilano (TFA/H₂O/TIS) (95:2.5:2.5), posteriormente se dejaron en agitación durante 3 horas, luego la resina fue filtrada y por último se precipitó la solución filtrada con 5mL éter frío. La aparición de un sólido blanco lechoso correspondiente al péptido deseado fue centrifugado a 7000 rpm a 4°C durante 15 minutos (Applied Biosystems, 1998). En las **figuras 4** y **5** se presentan los diferentes mecanismos de acción para las reacciones de acoplamiento y desprotección del grupo Fmoc en la metodología SPPS

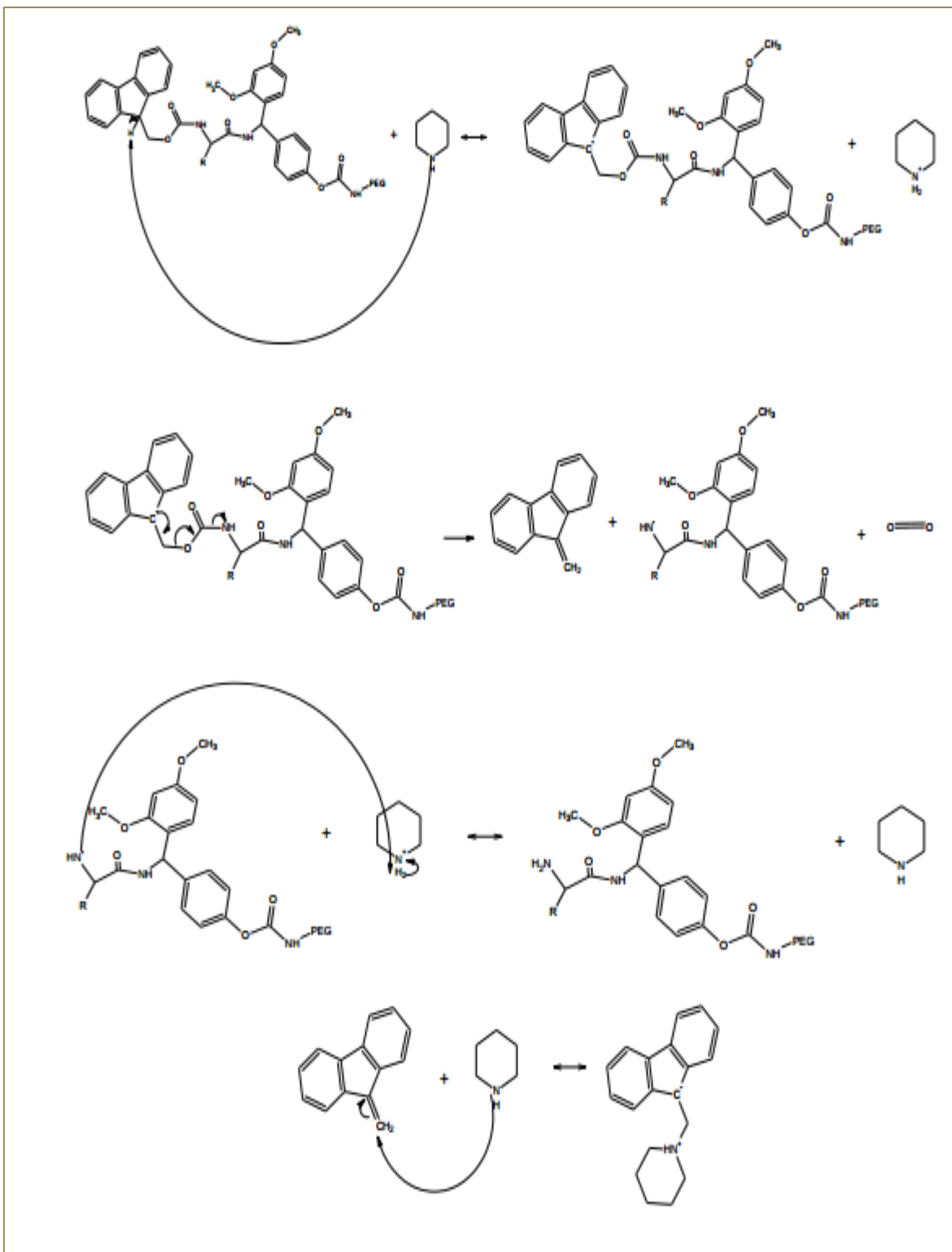


Figura 5. Mecanismo de desprotección del grupo FMoc.

2.2.3. Purificación de péptidos sintéticos

2.2.3.1. Desalinización

Los péptidos fueron desalinizados empleando una columna pasteur previamente cargada con lana de vidrio y el gel Sephadex G10 o Sephadex G15 de acuerdo con el peso molecular de cada péptido. La columna fue equilibrada con agua Tipo I durante 30 minutos. Aproximadamente 2mg/mL de péptido fueron eluidos con 2 mL de agua y posteriormente recolectados a la salida de la columna.

2.2.3.2. Microextracción en fase sólida

Esta técnica preparativa consistió en la elución de los péptidos de acuerdo a su hidrofobicidad (afinidad) empleando una microcolumna Sepack C-18 usando como eluyente una mezcla ACN/H₂O con un flujo aproximado de 1mL/min (**Figura 6**). Los porcentajes de la mezcla trabajados fueron 10%, 20%,30%,50%,70% y 100%.

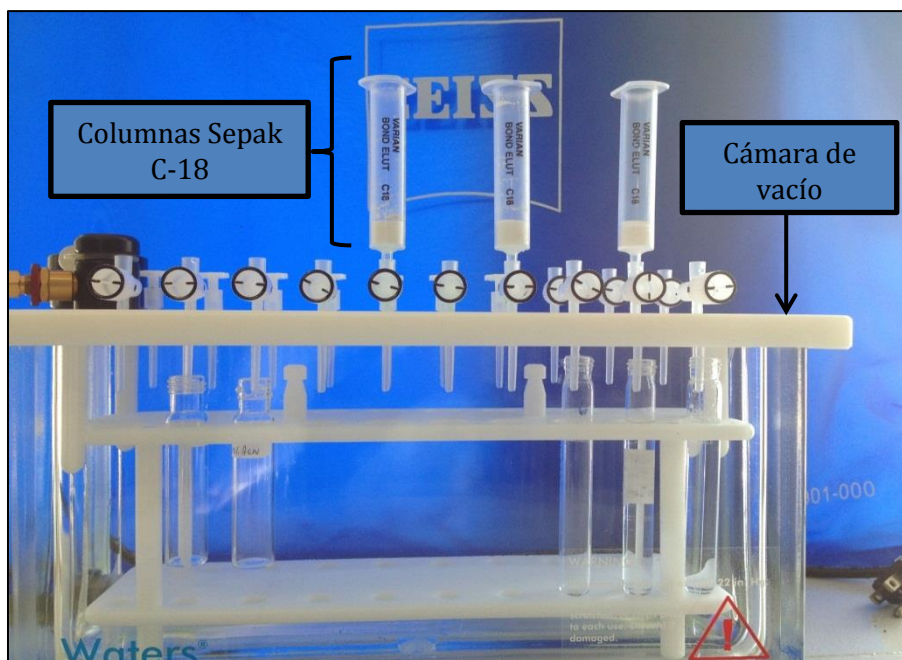


Figura 6. Montaje de micro-extracción en fase sólida.

2.2.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución

Los péptidos sintéticos fueron purificados en una columna preparativa Vydac C-18 (250mm X 10mm) en fase reversa RP-HPLC con una fase móvil constituida por: (A) H₂O con 0.01% de Ácido Trifluoroacético (TFA) y (B) acetonitrilo (ACN) con 0.01% TFA. Se utilizó un método isocrático 70:30 de ACN-TFA y H₂O-TFA respectivamente durante 15 minutos; volumen de inyección 40µL; detección UV a 220 nm. Los resultados obtenidos permitieron analizar el grado de pureza de cada uno de los péptidos sintéticos.

2.2.4. Caracterización de los PAM

2.2.4.1. Espectrometría de masa

Los espectros de masas se registraron utilizando un espectrómetro MALDI TOF/TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics). Los ensayos se llevaron a cabo por el modo de desorción/ionización láser asistida por una matriz (MALDI) con detector de tiempo de vuelo (TOF) en modo reflectrón.

La matriz fue preparada con solución saturada de 1mg/mL de HCCA en una mezcla de ACN:H₂O (50:50) y 0.01% TFA. En este caso, 1µL de cada péptido fue dispuesta en medio de una doble capa de matriz de 1µL, cada capa sobre cada spot del target y se dejaron secar para finalmente ser analizadas.

2.2.4.2. Dicroísmo circular

El análisis por dicroísmo circular se llevó a cabo a temperatura ambiente en celdas lavadas con nitrógeno y usando un espectropolarímetro *Jasco J-815* del *Instituto Madrileño de Estudios Avanzados (IMDEA-Nanociencia)*. El espectro se tomó en un intervalo de longitud de onda entre 190-300 nm usando una celda rectangular con paso óptico de 0,1mm. 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 tomado a 200 µL de disolución acuosa del péptido a una concentración de 0.1 mM en: a) H₂O y b) disolución SDS 4 mM. Los resultados fueron expresados como el grado de elipticidad.

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

l = longitud del paso óptico

c = concentración del péptido

n = número de residuos aminoácidos

2.2.5. Síntesis de nanoestructuras de oro

Las nanopartículas de oro se sintetizaron siguiendo el protocolo propuesto por Xie (Xie, 2009). 5 mL de una solución HAuCl_4 10mM fue adicionada a una solución de BSA 50mg/mL a 37°C, bajo agitación vigorosa y atmosfera de argón. Dos minutos más tarde se adicionó 0,25 mL de NaOH 1M. La reacción de reducción se prolongó por 14 horas. La coloración de la solución se tornó de amarillo pálido a marrón intenso. El exceso de sal fue removido por centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos empleando filtros amicón de 30KDa.

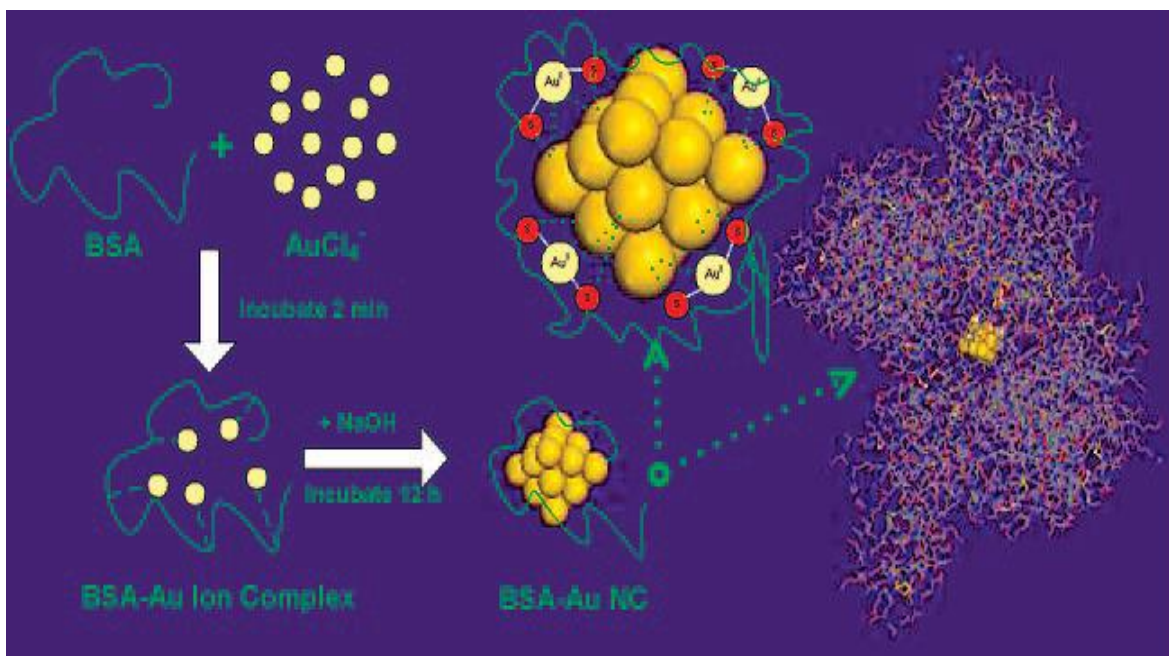


Figura 7. Esquema del proceso de reducción de Au^{3+} en presencia de BSA (Xie, 2009)

2.2.6. Conjugación de los PAM's a las AuNCs

La conjugación de los PAM a AuNCs se realizó empleando dos tipos de crosslinker. El N-hidroxysuccinimida 3-(2-piridilditiol) propanilo (SPDP) y el N-hidroxysuccinimida 6-(maleimido) hexannilo (EMCS) [Dorota, 2010; Arudra, 2008].

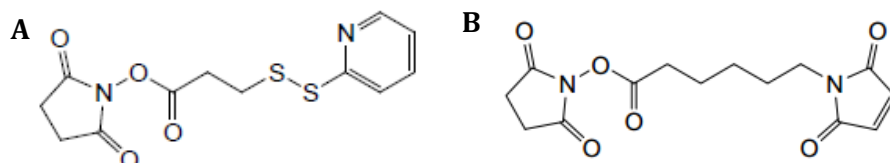
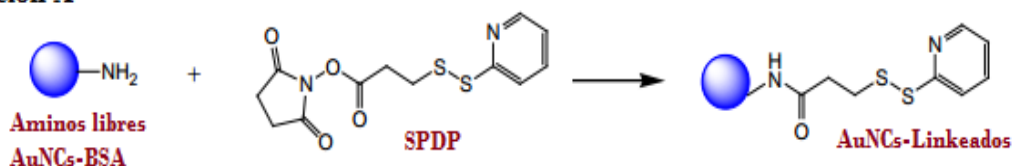


Figura 8. A) SPDP. B) EMCS

Los péptidos antimicrobianos sintetizados que presentaron actividad antimicrobiana significativa con CIM_{50} menores a $10 \mu M$ con cada una de las cepas de estudio fueron conjugados a los AuNCs. Se siguió el procedimiento ilustrado en la **figura 9** para los péptidos con residuo de cisteína en el extremo N-terminal o C-terminal y el procedimiento de la **figura 10** para los péptidos sin residuos de cisteína libres.

Reacción A



Reacción B



Figura 9. Reacciones involucradas en la conjugación de péptidos con residuo de cisteína en el extremo n-terminal o c-terminal a AuNCs empleando SPDP como *crosslinker* [Protein Cross-linker Handbook,2013]

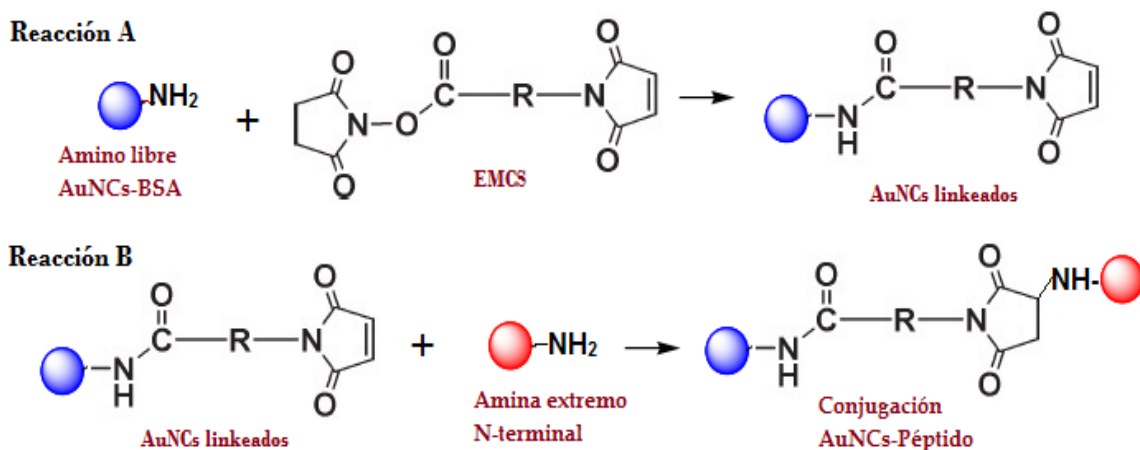


Figura 10. Reacciones involucradas en la conjugación de péptidos sin residuo de cisteína en el extremo n-terminal o c-terminal a AuNCs empleando EMCS como *crosslinker* [Protein Cross-linker Handbook, 2013.]

Para vincular los sistemas de AuNCs a cada uno de los *crosslinker* se tomaron 2,0 mL de AuNCs a los cuales se adicionaron 140 μ L de *crosslinker* en concentración 7 mM en DMF y 500 μ L de NaOH 1mM. (Kalkhof, 2008). La reacción transcurrió durante 12 horas con agitación constante y temperatura ambiente. El exceso de sal y agentes sin reaccionar fueron eliminados empleando una columna de exclusión de tamaño NAP-25 con capacidad máxima de 2,5 mL.

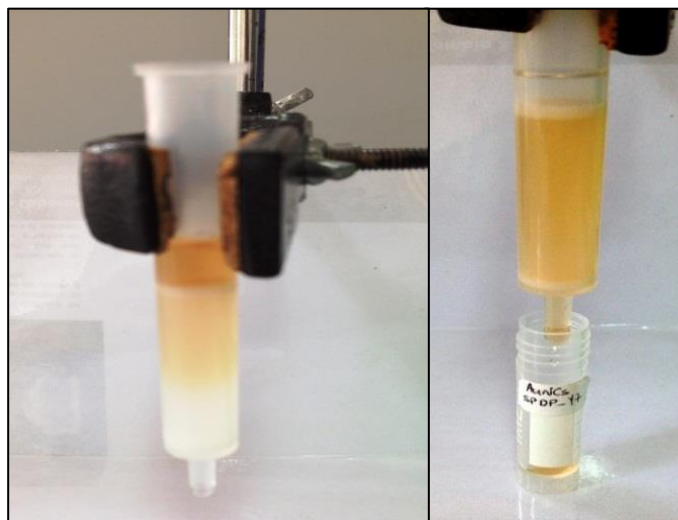


Figura 11. Desalinización en columna NAP-25 de AuNCs linkeados con SPDP y EMCS

Los péptidos antimicrobianos fueron conjugados a este sistema AuNCs-SPDP por adición de 20 μ L de solución de péptido 1mM a 1,88 mL de AuNCs-SPDP. Las mismas proporciones y volúmenes de adición fueron empleados para la conjugación a los AuNCs-EMCS. La reacción se mantuvo durante 18 horas con agitación de 200 rpm a temperatura ambiente. Los productos AuNCs@Péptido fueron purificados por centrifugación en filtros amicon de 3KDa a 12.000 rpm durante 15 minutos. El péptido no unido fue removido con 3 lavados sucesivos con 200 μ L de agua Tipo I, bajo las mismas condiciones. La concentración de péptido conjugado a los nanosistemas de oro fue calculada por HPLC, como la diferencia entre el número de moles del sobrenadante recogido en el proceso de purificación, y el número de moles de partida al inicio de la reacción de conjugación (Cruz, 2010).

2.2.7. Caracterización de sistemas nanoestructurados

Tanto las AuNCs y los sistemas conjugados AuNCs@Péptido fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas y ópticas, así como por la determinación del potencial zeta.

2.2.7.1. Ultravioleta visible

Las AuNCs fueron analizadas en un espectrómetro UV Perkin Elmer en un rango espectral de 300-800 nm empleando cubetas de polipropileno de 1 mL de volumen y un paso óptico de 1 cm.

2.2.7.2. Dispersión dinámica de la luz

Los AuNCs fueron caracterizados por la técnica óptica de dispersión dinámica de la luz (DLS), para conocer el tamaño hidrodinámico de los sistemas coloidales preparados. Los productos de la funcionalización AuNCs@Péptido también fueron analizados por esta técnica para verificar el tamaño de los nuevos sistemas nanoestructurados. El equipo empleado para este análisis fue un Mastersizer 2000 (Malvern) del Laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad

Industrial de Santander operado en un ángulo de incidencia de 90° en modo dual a una temperatura de 26°C. Para estos análisis se emplearon cubetas de polipropileno 1 mL de volumen.

2.2.7.3. Potencial zeta

Se agregó 600µL de AuNCs y los sistemas conjugados AuNCs@Péptido en una celda de potencial. El equipo empleado para realizar estos análisis fue el descrito en el numeral anterior (2.2.7.1).

2.2.8. Determinación de la CMI y la CMB de los péptidos sintéticos y de los sistemas conjugados AuNCs@Péptido

Para determinar el efecto antimicrobiano de los péptidos sintéticos y de los productos de la conjugación AuNCs@Péptido, se empleó el método de micro dilución en caldo.

Inicialmente, se preparó un preinóculo de *E. coli* O157:H7 y SARM empleando como medios de cultivo Luria-Bertani y Muller-Hilton respectivamente. El preinóculo se dejó en incubación durante 12 horas a 37°C y agitación a 200 rpm. La cinética de crecimiento se realizó adicionando 100 µL de cada una de las bacterias a microplacas de ELISA de 96 pozos que previamente contenían diluciones conocidas de los péptidos en estudio (5, 10 ,25 ,50 ,70 y 100 µM), de las AuNCs (1.0, 2.5, 5.0, 7.0 y 10 µg/mL) y de los sistemas conjugados AuNPs@Péptido (1.0, 5.0, 10, 20 y 40 µM). Las medidas de densidad óptica fueron realizadas en un espectrofotómetro lector de microplacas de ELISA marca Biorad-Imarck a 595 nm cada hora durante 8 horas.

La CMI fue determinada como la mínima concentración necesaria de agente antimicrobiano para causar inhibición en el crecimiento bacteriano. Las CMI consideradas fueron: CMI₅₀, CMI₉₀ y CMI₉₉ que corresponden la inhibición de crecimiento en un 50%, 90% y 99% respectivamente.

Concluida la cinética de crecimiento, se tomó una alícuota de 100 μL de aquellas concentraciones de péptido, AuNPs y AuNPs@Peptido que mostraron una inhibición mayor o igual al 50% y fueron re-suspendidos en 900 μL en un medio líquido de infusión cerebro corazón (BHI) e incubado durante 24 horas a 37°C. Finalmente, se tomaron 2 μL de cada tubo *ependorf* y se colocaron en una caja Petri que contenía un medio sólido Agar-BHI dejando en incubación durante 12 horas con el fin de conocer si las concentraciones evaluadas tendrían un efecto bactericida. La CMB fue interpretada como la mínima concentración a la cual se inhibe el crecimiento a un 100% comparado con un control positivo.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. DISEÑO BIOINFORMÁTICO Y SINTÉSIS DE PAM

Se obtuvieron 3 secuencias base usando el software DEPRAMS [Rondon, P. et al., 2014]. Se realizó un Blast de estas secuencias en la base de datos CAMP para determinar la familia de proteínas y polipeptidos reportados con actividad antibiótica que presentaron una identidad superior al 80%. Los resultados del Blast y el alineamiento múltiple realizado en el Clustal W son presentados a continuación en la **Tabla 1** y los arboles filogenéticos para cada péptido base son mostrados en el **Anexo A**.

Tabla 1. Dominios conservados en el alineamiento múltiple.

Nombre	Secuencia base	Familia y/o Agrupación cercana
Y1	CAGKKAGLFSILKGVGK	Esculentinas
Y4	SFIKRSCLKIKSLVLIK	Proteínas de reconocimiento de péptidoglicano
Y6	CGIYRSLKLIKSLVLIK	Metaloproteínas

Verde: Aminoácido conservado; **Azul:** Aminoácido con propiedades fisicoquímicas similares; **Rojo:** Aminoácidos que difieren drásticamente de sus propiedades fisicoquímicas.

Como resultado del alineamiento múltiple se obtuvieron los residuos aminoácidos conservados que se relacionan a la función biológica que se mantiene a lo largo de la evolución con mínimas variaciones. Las secuencias base de modo general no presentaron aminoácidos conservados a excepción del péptido Y4, que mostró en el alineamiento mayor identidad por secuencias de proteínas que participan en el reconocimiento de péptidoglicano (Marieke, 2004; Vogel, 2002), el cual es un polímero formador de la pared bacteriana en bacterias Gram-positivas. Estas proteínas denominadas como PGlyRPs generan una respuesta del sistema inmune (Zenhom, 2011)

Para el caso de péptido Y1 se observó la prevalencia de residuos aminoácidos similares a los presentes en la familia de péptidos antimicrobiano de esculentinas que son proteínas aisladas de la rana esculenta (Gamberi, 2007).

El análisis bioinformático de la secuencia Y6 arrojó residuos conservados respecto al alineamiento múltiple. La distancia más corta en el árbol filogenético fue respecto a un grupo de metaloproteínas que participan en la respuesta inmune.

Estas secuencias base fueron modificadas sistemáticamente con el fin de mejorar la actividad antimicrobiana y obtener péptidos análogos. Las variaciones realizadas incluyeron solo aquellos residuos aminoácidos que en el alineamiento múltiple (Clustal W) con otros polipéptidos y proteínas de la base de datos CAMP no fueron conservados.

Los péptidos análogos fueron resultado de las siguientes variaciones: **i)** En todos los péptidos se aumentó el contenido de lisina (K). **ii)** La secuencia base Y1 se modificó la posición del residuo de cisteína (C) dando origen a los análogos Y2A y Y3A; se cambió glicina por treonina para dar origen a Y2A, **iii)** en Y1 se sustituyó serina por lisina, alanina por isoleucina y glicina por treonina para dar el análogo Y3A. **iv)** Para la secuencia Y4 se cambió los tres residuos de serina por fenilalanina, valina y treonina, y se reemplazó lisina por histidina estas modificaciones dieron por resultado el análogo Y5A. **v)** El péptido Y6 fue modificado para dar origen al análogo Y7A cambiando los aminoácido de glicina por alanina, isoleucina por leucina, tirosina por lisina y serina por treonina; el análogo Y8A fue resultado de suprimir en la secuencia Y6 un aminoácido y de cambiar arginina por leucina, serina por alanina, leucina por lisina, arginina por lisina, leucina por valina, valina por lisina, isoleucina por glicina y lisina por fenilalanina.

Las modificaciones que incluyeron la adición de residuos de lisina, arginina e histidina aumentaron la carga positiva del péptido, la inclusión de aminoácidos como alanina, glicina, isoleucina y leucina, permitieron aumentar el carácter

hidrófobo del péptido elevando su comportamiento anfipático al entrar en contacto con la membrana bacteriana (Zenhom, 2012). La eliminación de un residuo de los 17 aminoácidos para dar lugar a uno de solo 16 residuos permitió reducir el volumen ocupado por el péptido y así aumentar su probabilidad para ser antimicrobiano.

Las propiedades fisicoquímicas como carga neta, hidropatía, volumen, peso molecular, número de residuos y probabilidad de ser péptido antimicrobiano (predicción realizada por la CAMP) de las secuencias base como sus análogos son presentados en la **Tabla 2**. Los resultados del modelamiento de la estructura secundaria arrojaron péptidos con tendencia a conformación α -hélice como se muestra en la **Figura 12**.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de PAM diseñados.

<i>Secuencia peptídica</i>	<i>% PAM</i>	<i>PM . Da</i>	μ^a	<i>Carga^b</i>	<i>Volumen</i> Å^3	<i>N° AA</i>
Secuencia Base Y1. CAGKKAGLFSILKGVGK	98,9	1677,07	0,42	+4	2029	17
Análogo Y2A. KATKKCGLFSILKGVGK	96,9	1777.33	0,07	+ 5	2151	17
Análogo Y3A. TICKKSGVFKILKGVGK	98,0	1806.39	0,25	+5	2185	17
Secuencia Base Y4. SFIKRSLKLIKSLVLIK	98,1	1986.67	0,78	+ 5	2403	17
Análogo Y5A. FGIKRVLHLIKTLTIK	99,9	1993.68	0,85	+4	2412	17
Secuencia Base Y6. CGIYRSLKLIKSLVLIK	96,0	1947.51	0,94	+4	2356	17
Análogo Y7A. CALKLTAKRLVRKIGF	92,6	1945.5	0,19	+6	2330	17
Análogo Y8A. CALKLAKIKRLVKIGF	99,5	1801,51	0,91	+5	2179	16

^a Hidropatía; ^b Carga calculada a pH 7.0

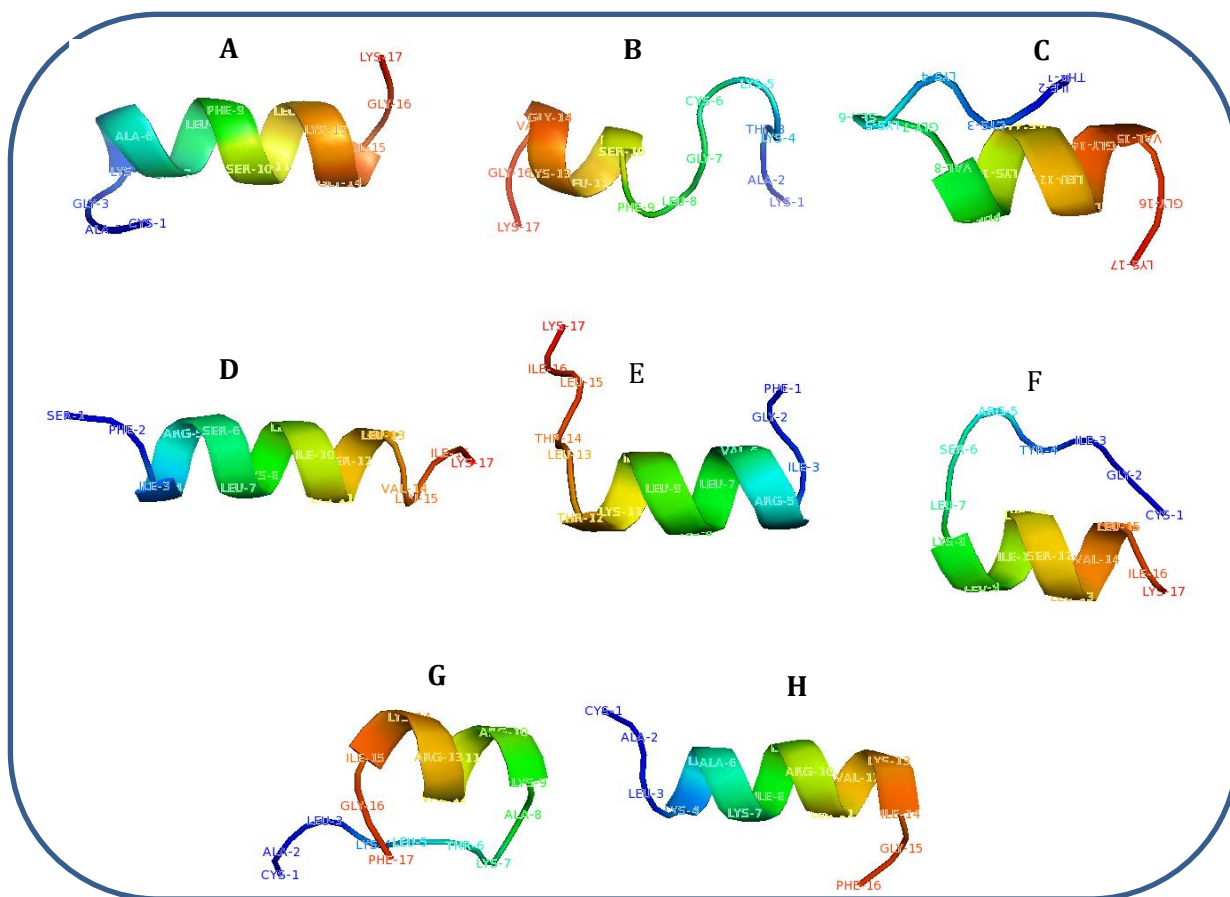


Figura 12. Visualización por PyMol del modelamiento de la estructura secundaria de los PAM diseñados. **A)** Péptido base Y1. **B)** Péptido análogo Y2A. **C)** Péptido Análogo Y3A. **D)** Péptido base Y4. **E)** Péptido análogo Y5A. **F)** Péptido base Y6. **G)** Péptido análogo Y7A. **H)** Péptido análogo Y8A.

3.2. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PAM SINTÉTICOS

3.2.1. Determinación de pureza por cromatografía líquida

Concluida la síntesis en fase sólida de los péptidos y su purificación en columnas Sepak C-18 a diferentes gradientes se determinó su pureza por RP-HPLC con una curva de calibración con BSA (**Anexo B**), obteniéndose en todos los cromatogramas un pico cromatográfico definido, presentando una pureza entre

89-98% excepto el péptido Y5A; este presentó tres picos que coeluyeron en un tiempo de 1,88 minutos, lo cual evidencia una pureza inferior al 50% (**Anexo C**).

Todos los picos obtenidos se recolectaron y se analizaron por MS-MALDI-TOF para confirmar el péptido de interés. Estos análisis son discutidos a continuación.

3.2.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Todos los péptidos sintetizados tanto los péptidos base como los análogos mostraron fidelidad en su secuencia primaria mediante los análisis por MS-MALDI-TOF. Para este análisis se empleó como patrón de calibración externa el péptido sintético acetato de vapreotide de masa molecular 1131,6 Da; su espectro de masas característico es mostrado en el **anexo D**.

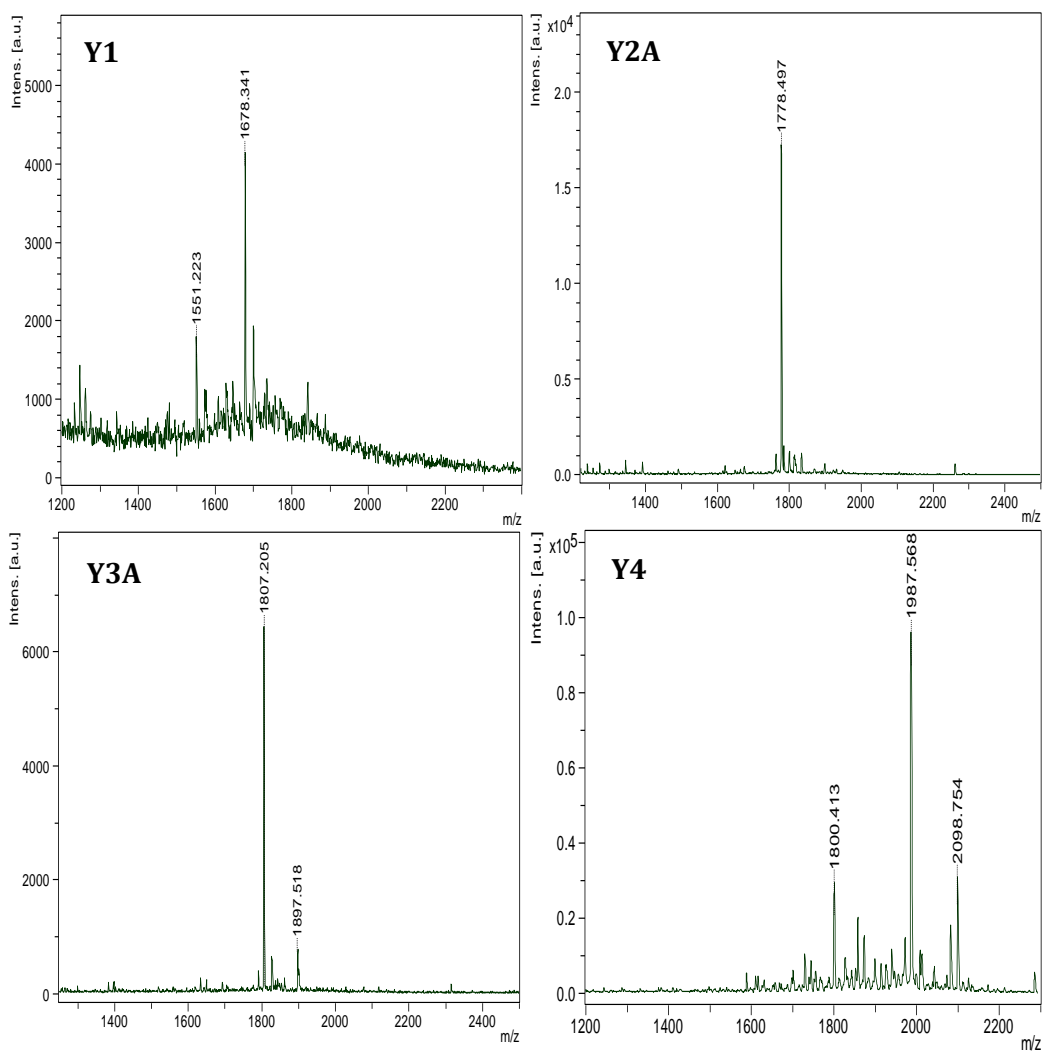
El espectro de masas obtenido para el péptido Y5A demostró la síntesis deficiente de su secuencia, ya que se observaron 3 picos intensos adicionales al pico del ion molecular que pueden ser atribuidos a deleciones significativas en la construcción de Y5A. Los espectros recolectados para los demás péptidos presentaron picos con relaciones m/z tanto por debajo como por encima de la masa molecular del péptido las cuales corresponden a aductos positivos que se forman en el proceso de ionización por la interacción con la matriz, sales y metales presentes, sin embargo estas señales son minoritarias en relación a la intensidad del pico del ión molecular del péptido de interés.

Los resultados obtenidos son mostrados en la **figura 13**, donde se observa que la m/z obtenida experimentalmente es acorde a la masa molecular obtenida teóricamente con una diferencia de masa (Δm) inferior a $\pm 1,0$ como puede ser corroborado en la **tabla 3**.

Tabla 3. Masa del ión molecular obtenido del análisis por MALDI-TOF.

Nombre	Masa teórica Da [M+H]	Masa experimental [M+H]	Δm
Y1	1677,066	1678,341	0,27
Y2A	1778,33	1778,497	0,17
Y3A	1807.39	1807.205	0,19
Y4	1987.67	1987.568	0,10
Y5A	1994.68	1994,663	0,02
Y6	1948.51	1948,774	0,26
Y7A	1946.5	1946,530	0,03
Y8A	1802,51	1802,662	0,15

M: Masa ion molecular; **H:** Masa de un protón



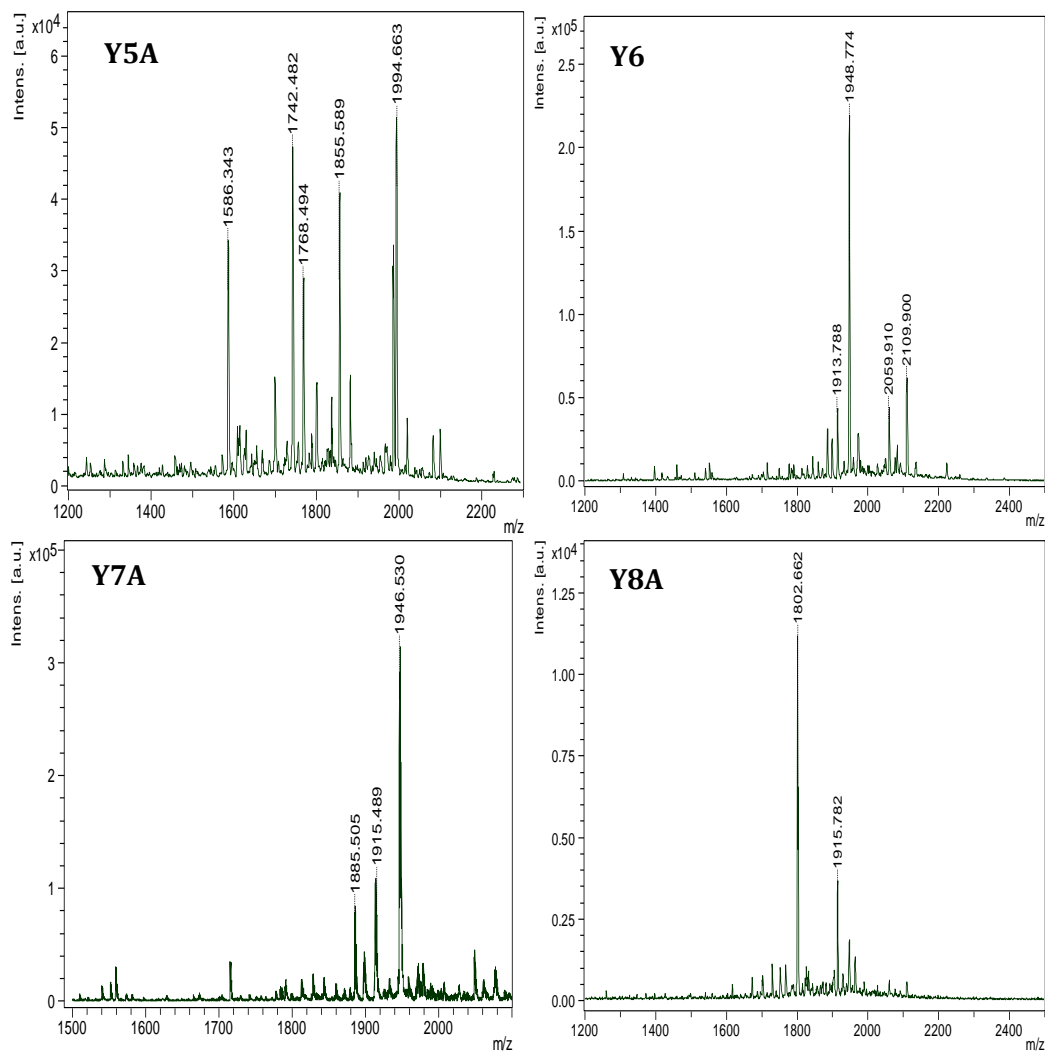


Figura 13. Espectros de MS-MALDI-TOF de los PAM sintetizados.

3.2.3. Dicroísmo circular

Para determinar la estructura secundaria de los PAM se registró el espectro de DC de los péptidos sintetizados a una concentración 0,1 mM, tanto en medio acuoso como en una solución de SDS 4mM.

La interacción de los PAM con las micelas del SDS, permitió la inducción y estabilización de la conformación α -helice en todos los caso, la hélice fue entonces estabilizada por interacciones intramoleculares entre los hidrógeno de cadenas

laterales y los grupos amida del esqueleto peptídico como se ilustra en la **figura 14** (Bijan, 2009; Wang, 199). Los péptidos se pliegan en una conformación helicoidal debido a su carácter anfipático, el cual se evidencia cuando el medio mimetiza el ambiente hidrofóbico de la membrana bacteriana (Pandurangan, 2013).

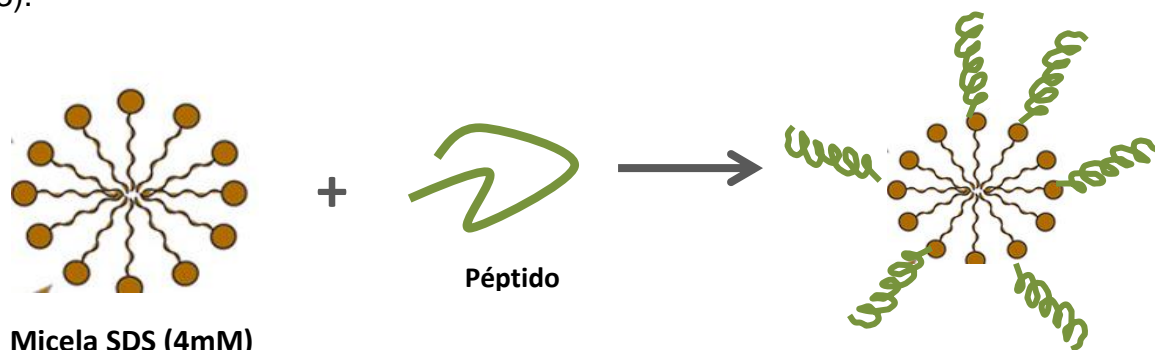


Figura 14. Modelo de la estructura secundaria α -hélice de PAM en medio micelar de SDS.

En la **figura 15** se observa el comportamiento óptico adoptado por cada uno de los péptidos en dos ambientes químicos diferentes siendo más activos aquellos que adopten estructura secundaria definida. El péptido Y5A no fue analizado por DC, ya que el perfil puede ser atribuido a las diferentes deleciones presentes del péptido.

De este modo, los PAM en solución acuosa adoptaron una conformación desordenada. La polaridad del agua evita las interacciones intramoleculares de los hidrogeno al inducir la formación de puentes de hidrogeno con el agua.

Como puede observarse en la **figura 15**, los perfiles de dicroísmo circular de cada uno de los péptidos sintetizados disueltos en H_2O presentan una banda positiva entre 200-212 nm, debido a las transiciones ($n \rightarrow \pi^*$) y una negativa alrededor de 195 nm para las transiciones ($\pi \rightarrow \pi^*$), este perfil es característico de una conformación desordenada e indefinida.

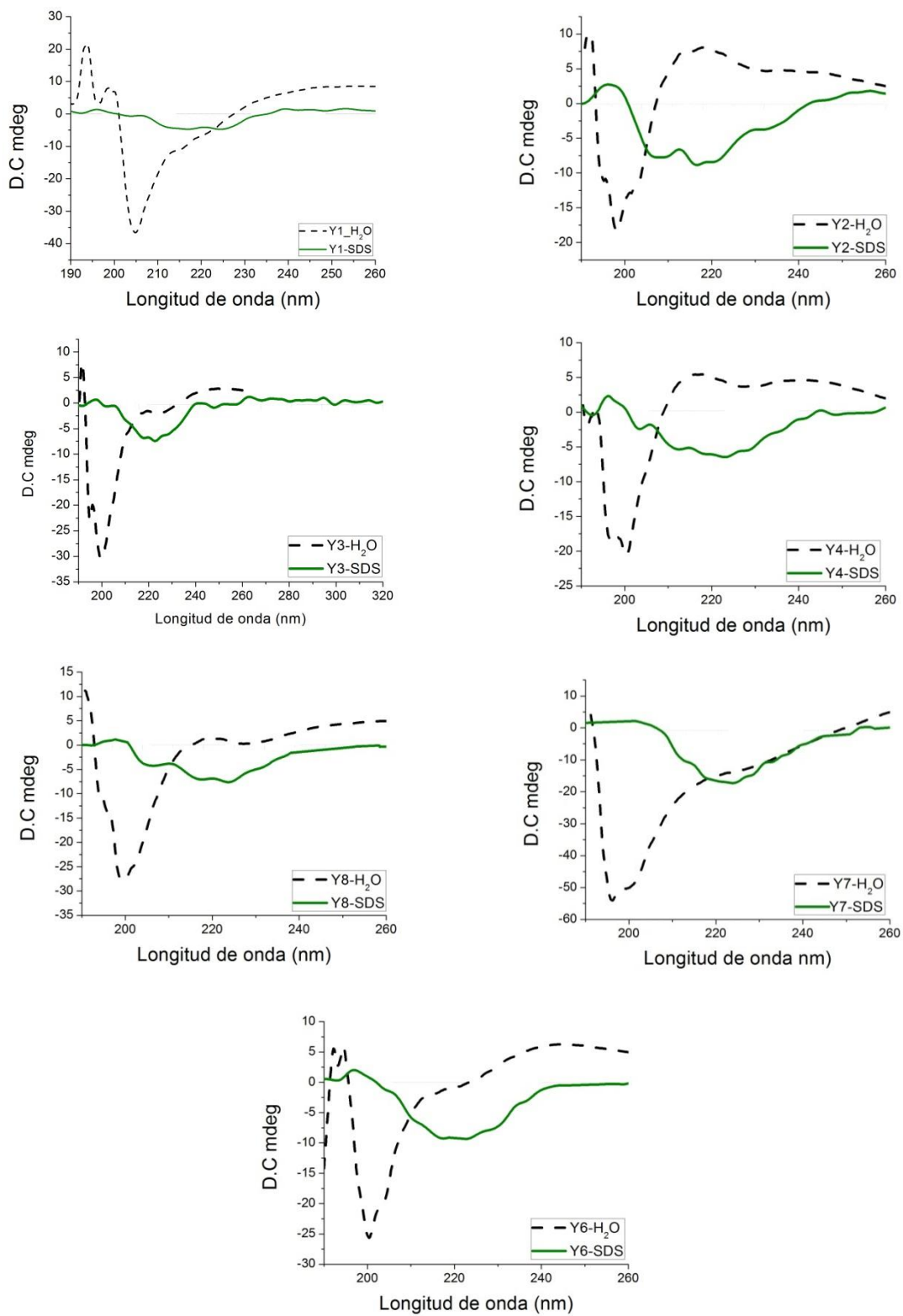


Figura 15. Perfil de DC de PAM sintéticos

Para los perfiles obtenidos en SDS se evidenció la presencia de una banda positiva alrededor de 190 nm correspondiente a transiciones ($\pi \rightarrow \pi^*$) perpendicular y otra negativa a 208 nm también resultado de un transición ($\pi \rightarrow \pi^*$) paralela, esta última es fácilmente diferenciable en los perfiles de los péptidos Y2A, Y4 y Y6. Para los demás péptidos se presenta como un hombro sobresaliente al lado izquierdo de la banda también positiva correspondiente a transiciones ($n \rightarrow \pi^*$) a 222 nm (Bijan, R. 2009). Estas características en los espectros de dicroísmo circular revelan la tendencia de los péptidos por adoptar una conformación de α -hélice conforme al modelamiento realizado en el programa disponible en la web PEP-FOLD anteriormente ilustrado en la **figura 12**.

3.3. SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

Se obtuvo nanopartículas de oro por el método descrito por Xie y colaboradores que anteriormente fue descrito en el **ítem 4.2.5**. Debido a que estas nanopartículas poseen un tamaño subnanométrico y presentan propiedades de fluorescencia y luminiscencia. Adicionalmente, el fenómeno de resonancia plasmónica está presente como en todos los materiales ultradelgados y de escala nanométrica, sin embargo presenta baja intensidad en el espectro UV-Vis ya que estas nanopartículas se encuentran protegidas por la BSA como se observa en el espectro de absorbancia en el rango visible de la **figura 17**.

A pH \sim 12,0 la BSA tiene la habilidad de atrapar iones Au^{3+} en sus bolsas hidrofóbicas y posteriormente reducirlos a Au^0 . Inicialmente la solución amarilla intensa se tornó café intenso al cabo de 18 horas evidenciando la formación de AuNC como se muestra en la **figura 16**.

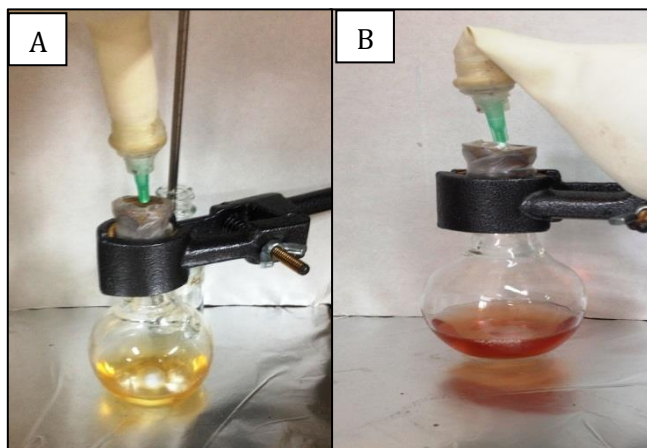


Figura 16. Formación de AuNCs por acción de la BSA a 37°C. **A)** Coloración amarilla al inicio de la reacción. **B)** Cambio de color a café intenso al culminar la reducción de iones Au^{3+}

Concluidos los lavados con H_2O Tipo I empleando filtros Amicon de 10 KDa, se realizó su caracterización fisicoquímica usando espectroscopía UV-Vis para verificar la banda de resonancia plasmónica de oro alrededor de 540 nm para AuNPs. Como se observa en el espectro UV-Vis de la **figura 17**, existe un levantamiento leve por encima de la línea base en la región de 540-600 nm, este comportamiento es debido a la absorción óptica de los AuNCs que al estar estabilizados por interacciones Au-S con los grupos tiol de los residuos de cisteína en la BSA, exhiben baja intensidad en el espectro de absorción (Zhang, 2012).

Estos sistemas nanoestructurados presentan propiedades fluorescentes con una longitud de onda de excitación en 343 nm y emisión en el rojo a 619 nm atribuidas a las AuNCs (**Anexo E**).

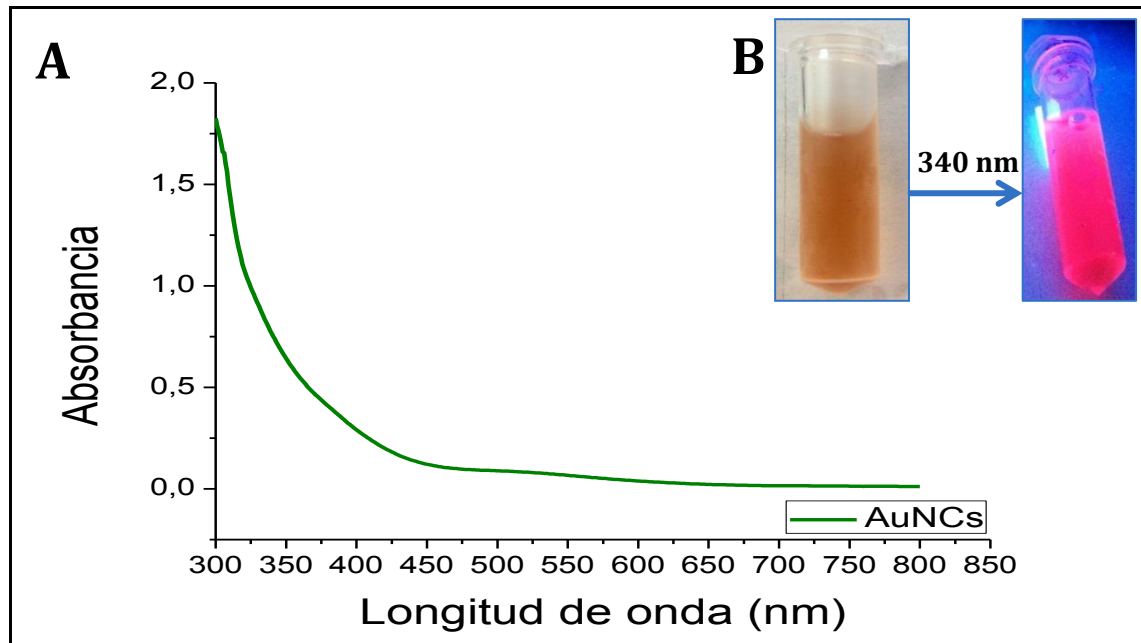


Figura 17. A) Espectro UV-VIS de AuNCs. **B)** AuNC irradiados con una longitud de 343 nm.

El tamaño de los AuNCs se midió por la técnica óptica DLS registrando un tamaño hidrodinámico promedio de $2,13 \text{ nm} \pm 0,71$ de diámetro (**figura 18**). Adicionalmente fue medido el potencial zeta de estos sistemas nanoestructurados, el cual registró un valor de -42 mV (**figura 19**).

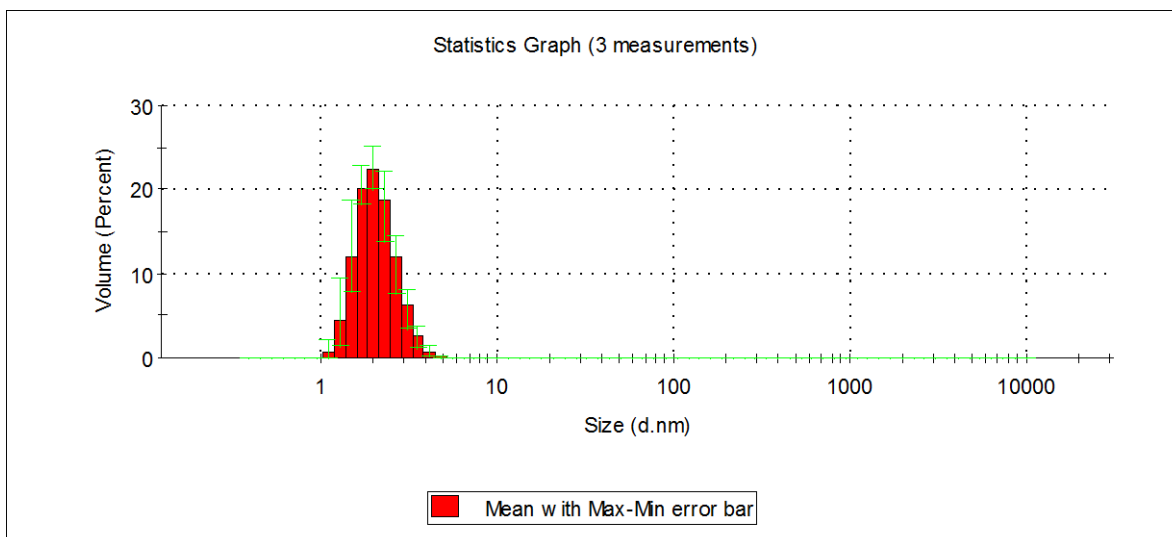


Figura 18. Análisis por DLS del tamaño hidrodinámico de AuNCs a partir BSA

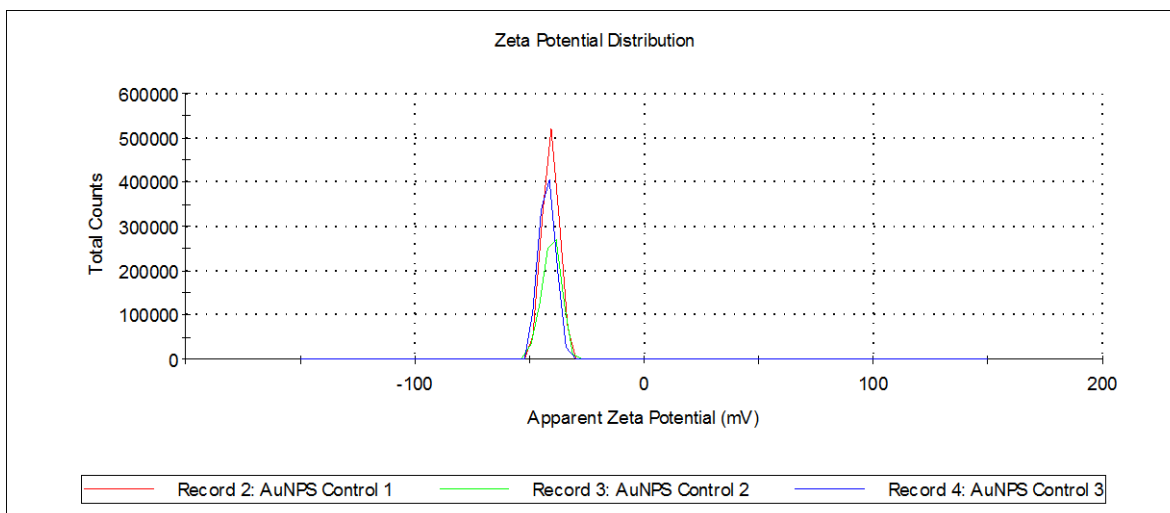


Figura 19. Potencial Zeta de los AuNCs a partir de BSA.

Los sistemas de AuNCs formados con la BSA mostraron alta estabilidad, la cual no solo está asociada en este caso al potencial zeta con un valor negativo significativamente alto (-42mV) y se relaciona directamente a la abundancia de especies de BSA cargadas negativamente a pH ~ 7,2, valor por encima del punto isoeléctrico (pH~ 4,7) de la proteína; otro factor importante al cual se atribuye que estos sistemas nanoestructurados no se agregan pese a la interacciones intermoleculares causadas por los puentes disulfuro en la proteína globular.

Estos sistemas ejercen entre sí una mutua protección, ya que los núcleos de oro formados con unos cuantos átomos de oro son estabilizados por los grupos -SH de al menos unos 35 residuos cisteína disponibles por monómero de BSA, formando enlaces Au-S y así evitar la unión del conglomerados de la proteína y/o los fenómenos de agregación por fuerzas de atracción de Van der Waals entre los clusters de oro (Zhang, 2013; Chuang, 2012).

3.4. FUNCIONALIZACIÓN DE LOS AuNCs CON LOS PAM SINTETIZADOS

Para realizar la funcionalización de los AuNCs se empleó el SPDP como *crosslinker*, el cual permitió la unión específica de cada péptido a los nanosistemas de oro sintetizados. Los péptidos conjugados fueron Y4, Y7A y Y8A, los cuales en los ensayos *in vitro* de actividad antimicrobiana frente a las cepas de estudio presentaron una CMI_{50} inferior a 25 μM , estos resultados son discutidos en el siguiente ítem (4.5).

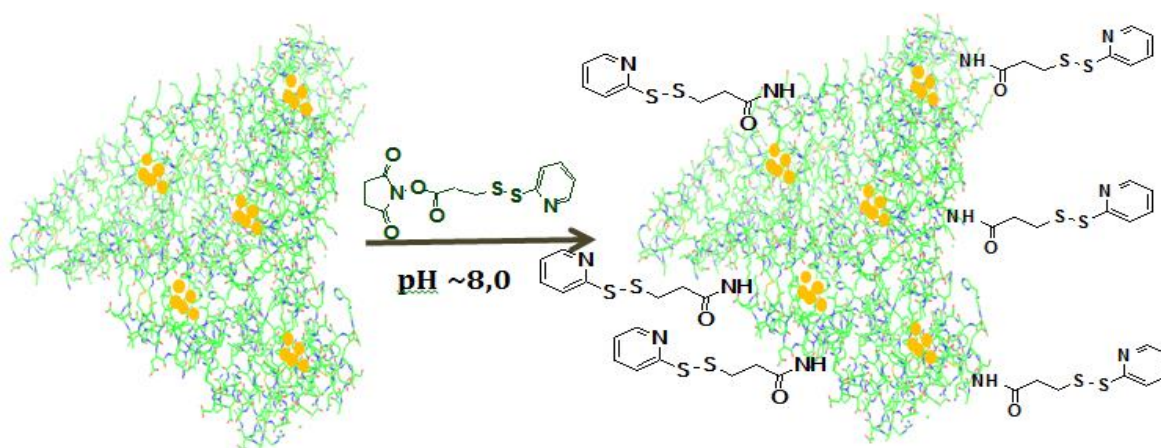


Figura 20. Esquema de reacción del SPDP con los grupos amino primarios de la BSA en los sistemas AuNCs.

La BSA contiene 59 aminas primarias de las cuales 35 se encuentran disponibles en la superficie de la molécula siendo reactivas frente a esteres. La reacción para unir el SPDP a la BSA que protege los AuNCs fue llevada a cabo a $pH \sim 7,0$ debido a que a este pH la BSA presenta mayor proporción de especies desprotonadas en su grupos amino favoreciendo su carácter nucleofílico para que la reacción con el grupo N-hidroxisuccinimida presente en el SPDP tenga lugar. Principalmente este reacciona con aminas primarias y secundarias tales como los extremos N-terminal de péptidos y proteínas, y con el grupo amino de cadena lateral de la lisina, para

formar enlaces amida e imida altamente estables como puede observarse en el esquema de la **figura 20** (Kalkhof, 2008; Heffernn, 2009).

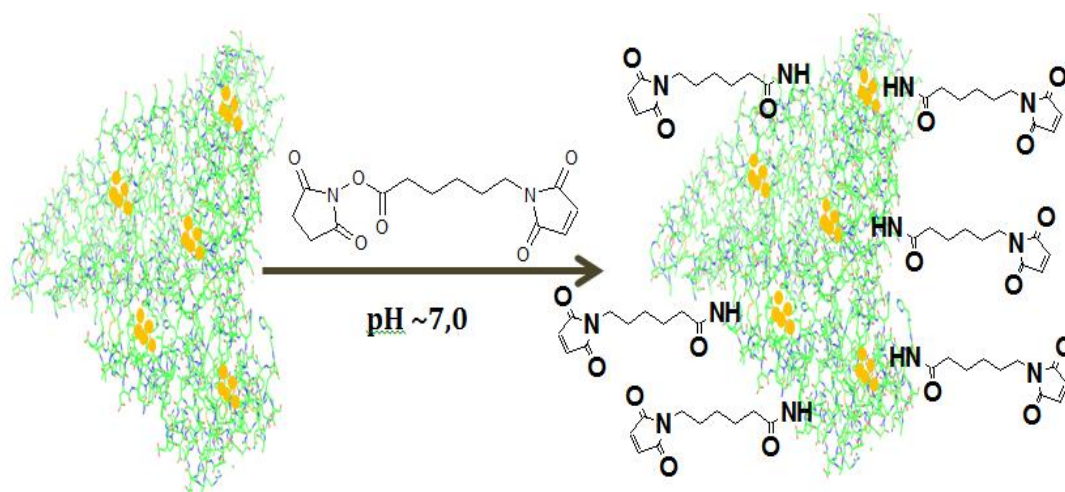


Figura 21. Esquema de reacción del EMCS con los grupos amino primarios de la BSA en los sistemas AuNCs.

Al igual que el SPDP, el EMCS posee un grupo N-hidroxisuccinimida que reacciona con los grupos amino libres presentes en la BSA formando el enlace amida anteriormente descrito a un pH~7,0 (**figura 21**). El grupo maleimida presente en este agente permite la unión covalente a aminas primarias de otras moléculas, como lo es el extremo N-terminal de péptidos que no tienen residuos de cisteína en alguno de los extremos de la secuencia a un pH~8,5. Pese a que el EMCS también reacciona con facilidad con grupos sulfhídrido a un pH entre 6,5 y 7,5 a una velocidad 100 veces mayor que con los grupos amina, para este trabajo solo se empleó con el fin de conjugar péptidos carentes de grupos tiol libres. Siendo el SPDP preferido en múltiples aplicaciones biológicas ya que el enlace de vinculación es un enlace disulfuro fácilmente reducible dando versatilidad y reversibilidad a sistemas de transportador y entrega de fármacos (Heffernan, 2009).

Posteriormente, la heterofuncionalidad tanto del SPDP como del EMCS permitió conjugar los péptidos sintéticos al grupo ditiopiridil y maleimida respectivamente.

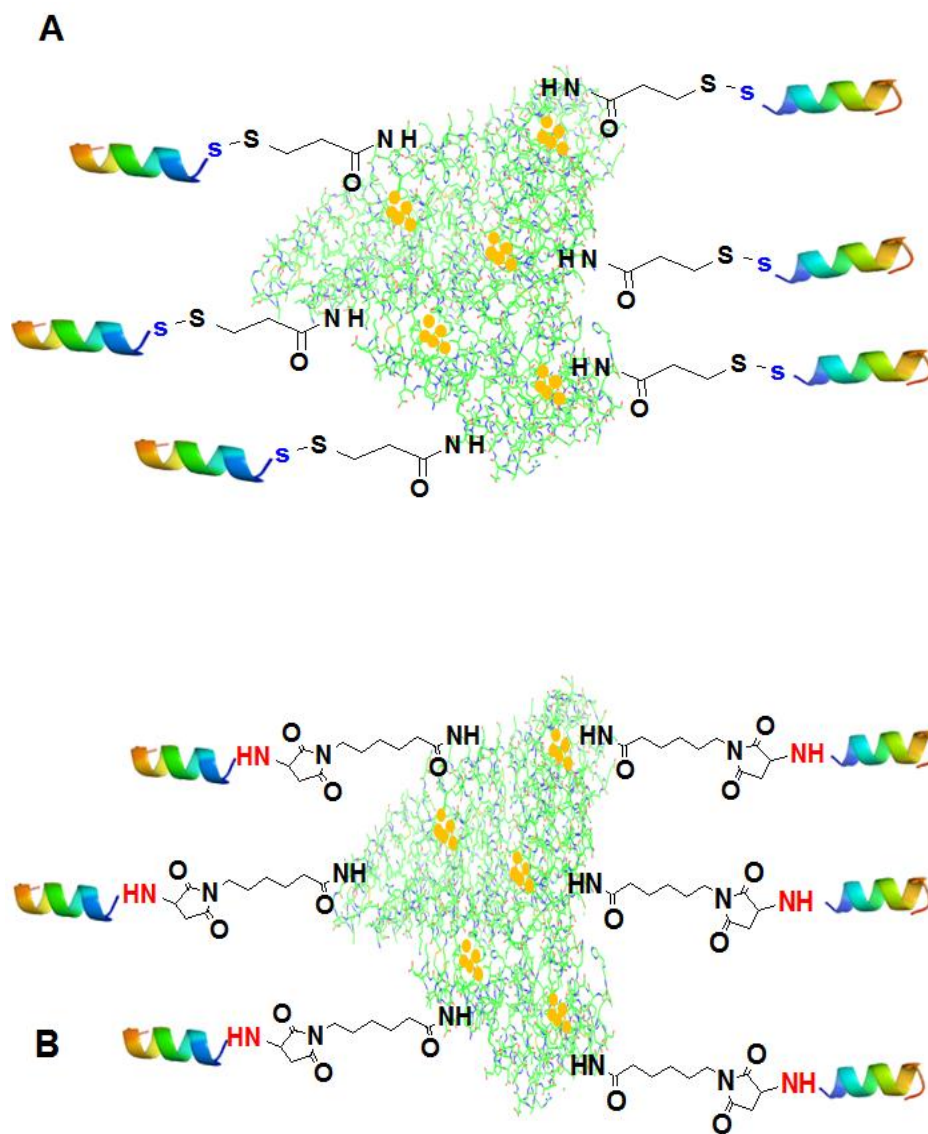


FIGURA 22. A) Esquema de conjugación de un péptido con residuo de cisteína en extremo terminal a sistemas de AuNCs usando SPDP como *crosslinker* b) Esquema de conjugación de un péptido sin residuos de cisteína en los extremos terminales a sistemas de AuNCs usando EMCS como *crosslinker*.

Los péptidos Y7A y Y8A, se unieron al linker SPDP por un enlace disulfuro reducible entre el sulfhídrido libre de la cadena lateral del residuo cisteína en el extremo N-terminal y el grupo 2-piriditiol del linker (**figura 22**) (Humphrie, 1994; Riener, 2003). En la formación de este enlace se liberó 2-tiopiridina como grupo saliente, el cual fue monitoreado por la técnica de Ultravioleta Visible a una longitud de onda de 343 nm para verificar la efectividad de la reacción de conjugación como se muestra en el **anexo F**.

Por otra parte el péptido Y4 fue vinculado al sistema nanoestructurado empleando el EMCS. La reacción consistió en una adición 1,4 del grupo amino-terminal del péptido a la forma dipolar del grupo maleimida del EMCS dando lugar a un equilibrio ceto-enol (Sharpless, 1966).

3.4.1. Caracterización de los sistemas AuNCs@Péptido

Concluidos los lavados y eliminación de especies que no reaccionaron en el proceso de vinculación del *crosslinker* a los AuNCs. Se registró el tamaño hidrodinámico por DLS y se midió el potencial zeta de tanto AuNCs linkeados, como los productos de la conjugación AuNCs@Péptido mostrado en la **figura 23**.

Estos resultados son presentados en la **tabla 4**. Los histogramas correspondientes al tamaño y potencial zeta están contenidos en el **anexos G**. Las propiedades de fluorescencia no fueron afectadas por el proceso de conjugación como se observa en el **anexo E**.

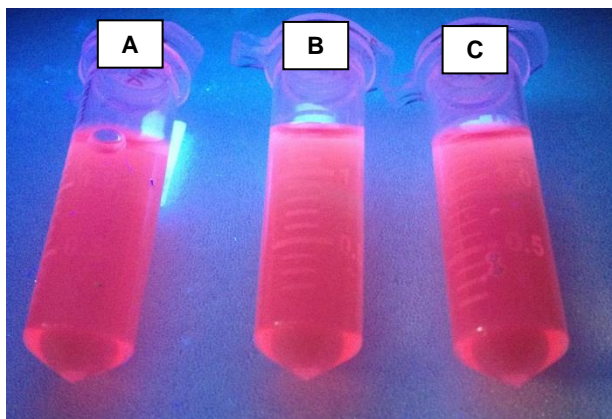


Figura 23. Sistemas AuNCs@Péptido irradiados con una longitud de onda de 343 nm. A) AuNCs-EMCS@Y4. B) AuNCs-SPDP@Y7A. C) AuNCs-SPDP@Y8A.

Tabla 4. Tamaño hidrodinámico promedio y potencial zeta de sistemas nanoestructurados.

Sistema	Tamaño (d, nm)	Potencial zeta (mV)
AuNCs	2,13±0,71	-42,0
AuNCs-SPDP	5,13±0,61	-30,9
AuNCs-EMCS	2,81±0,49	-26,7
AuNCs-EMCS@Y4	5,91±0,74	-17,7
AuNCs-SPDP@Y7A	2,03±0,77	-8,18
AuNCs-SPDP@Y8A	2,11±0,72	-10,1

A un pH~ 7,2 las moléculas de BSA en estos sistemas AuNCs se encuentra mayoritariamente con carga negativa (-42mV), posterior a la reacción de vinculación al *crosslinker*, esta carga sigue siendo negativa (-30,9mV) pero de magnitud menor, esto debido a que la reacción por la cual se vincula el *crosslinker* involucra la formación de enlaces amida entre el grupo N-succinimida del SPDP y EMCS con los grupos amino disponible en la BSA, estos grupos fuertemente nucleofílicos, ceden su carga electrónica en el enlace amida formado. La conjugación de los péptidos catiónicos a los sistemas de AuNCs unidos tanto al SPDP como EMCS modifican drásticamente el potencial zeta llevándolo hacia valores más positivos en todos los casos, esto puede ser un indicio de la conjugación eficiente en la superficie de la BSA que protege los AuNCs. El producto de conjugación AuNCs-SPDP@Y7A presentó el potencial zeta menos

negativo (-8,18mV), esta observación es congruente ya que el péptido Y7A posee la carga neta más positiva (+6). Los sistemas AuNCs-EMCS@Y4 y AuNCs-SPDP@Y8A mostraron potenciales negativos más altos, -17,7mV y -10,1mV respectivamente, esto debido a que la carga neta (+5) de ambos péptidos es menor a la del péptido Y7A.

En cuanto al tamaño hidrodinámico se observó que los AuNCs unidos al *crosslinker* aumentaron de tamaño respecto al tamaño de los AuNCs. Tanto el SPDP como el EMCS poseen una longitud 6,8Å y 9,4Å respectivamente, la vinculación de esos *crosslinker* a la BSA causa el aumento en el tamaño hidrodinámico. Sin embargo al conjugar los péptidos a cada uno de los AuNCs linkeados no se observa una tendencia al aumento en el tamaño hidrodinámico para los sistemas AuNCs-SPDP@Y7A y AuNCs-SPDP@Y8A, lo cual puede estar asociado a interacciones moleculares del péptido con la BSA, al volumen del cada péptido conjugado y a la conformación y despliegue adoptado por el péptido al estar vinculado al sistema de AuNCs-*Linker*. Los péptidos Y7A y Y8A son los péptidos con menor volumen, por lo tanto el tamaño hidrodinámico no aumentó significativamente en estas conjugaciones. Por el contrario, el sistema AuNCs-EMCS@Y4 presentó un tamaño hidrodinámico mayor al sistema AuNCs-EMCS, y consecuentemente es el péptido con mayor volumen. Sin embargo, se requiere realizar estudios de conformación espacial por técnicas como resonancia magnética nuclear para corroborar el tipo de interacciones de la los péptidos conjugados y la disposición espacial adoptada.

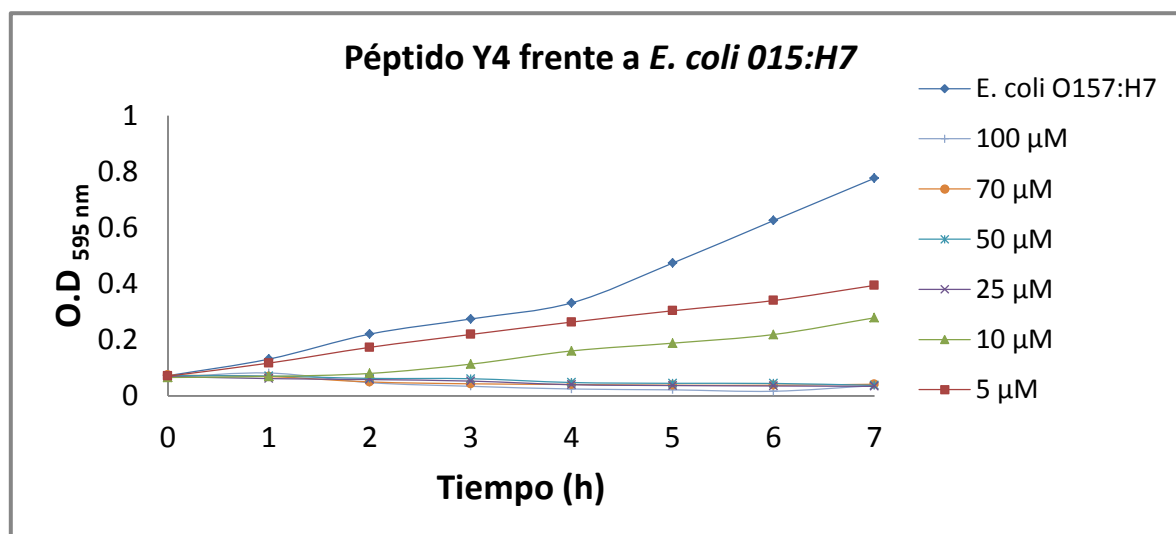
Finalmente, la concentración de péptido en los sistemas AuNCs-*Linker*-Péptido fue determinada por HPLC empleando una curva de calibración de BSA (**Anexo B**), calculando la concentración de péptido residual en los sobrenadantes al finalizar el procedimiento de lavado posterior a la reacción de conjugación de cada péptido.

3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PÉPTIDOS Y DE AuNCs@PÉPTIDO

La actividad antimicrobiana tanto de los péptidos sintéticos como de los sistemas nanoestructurados producto de la conjugación, AuNCs@Péptido fue evaluada empleando el método de microdilución en caldo en un espectrofotómetro para microplacas de ELISA, la densidad óptica fue registrada a 595 nm.

3.5.1. Actividad antimicrobiana de péptidos sintéticos

En la **figura 24** y **figura 25**, se presentan las gráficas de la cinética de crecimiento para cada una de las cepas de estudio en presencia de los PAM's sintéticos Y4, Y6, Y7A y Y8A, los cuales exhibieron un efecto significativo en la inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7 y SARM con CIM₅₀ inferior a 25µM. Los péptidos Y1, Y2A y Y3A no presentaron actividad antimicrobiana frente a las estudiadas, las cinéticas de crecimiento de estos péptidos son mostradas en el **anexo H**.



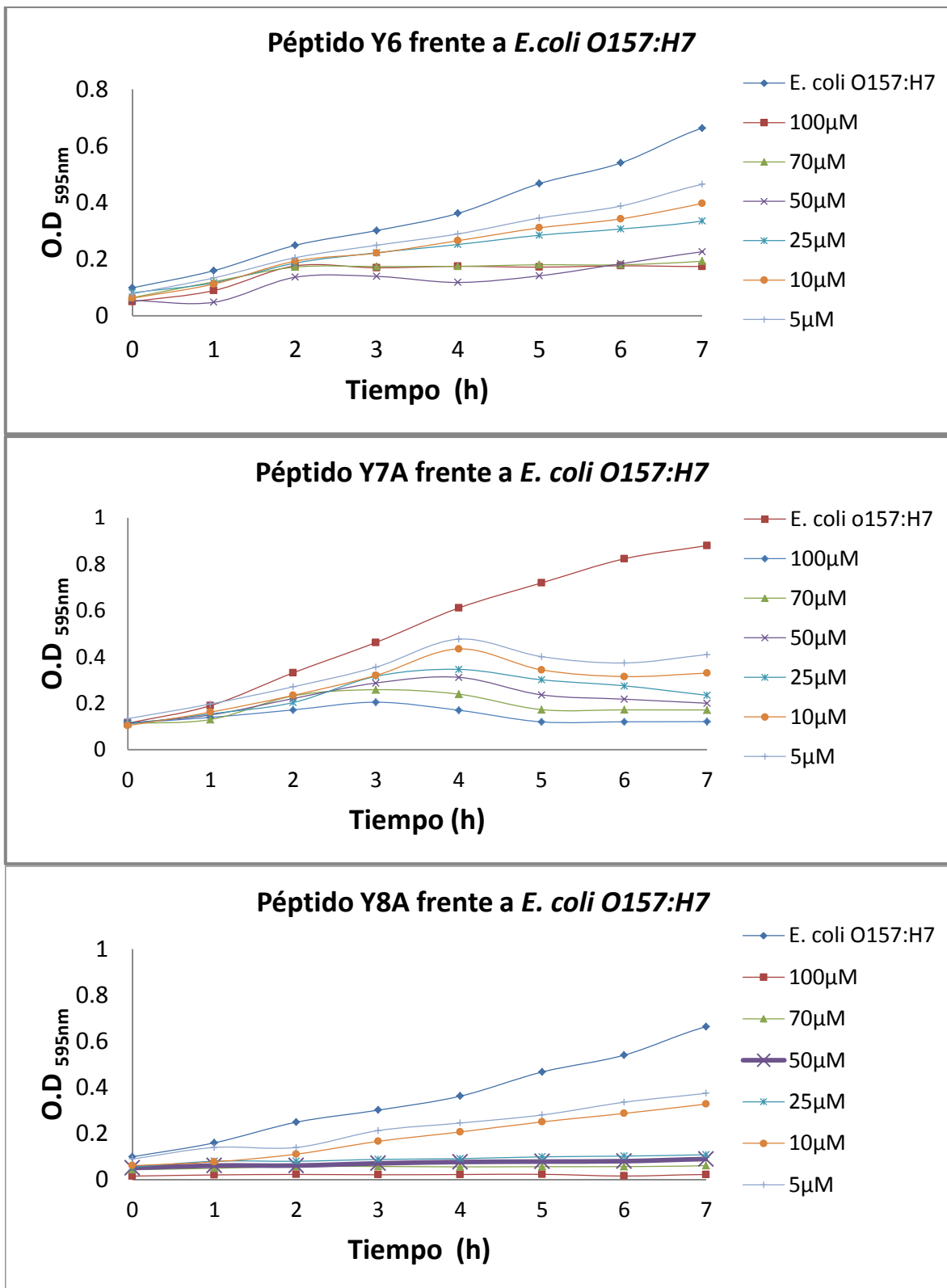
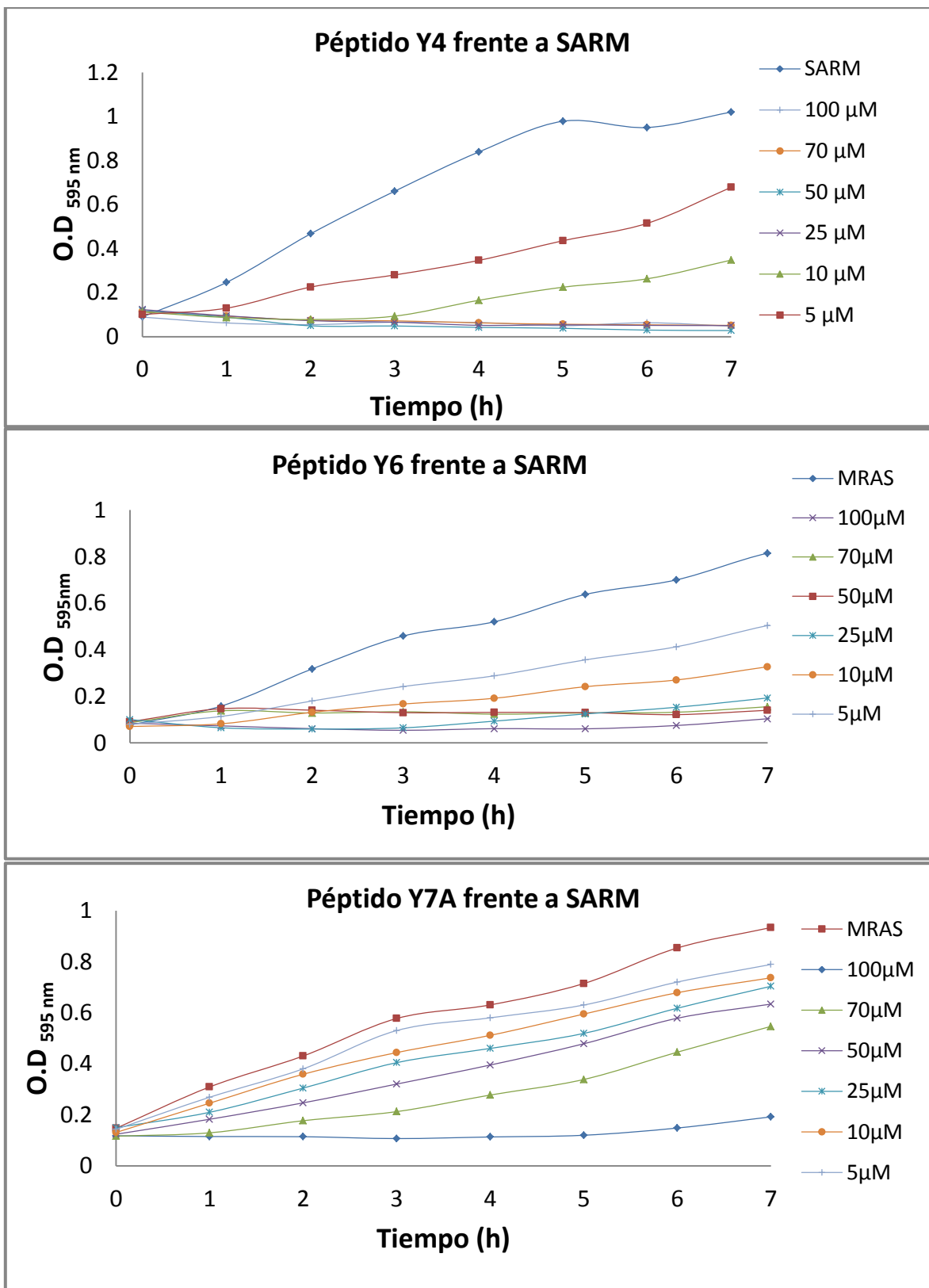


Figura 24. Cinéticas de crecimiento de la cepa *E. coli* O157:H7 frente a los péptidos sintéticos.



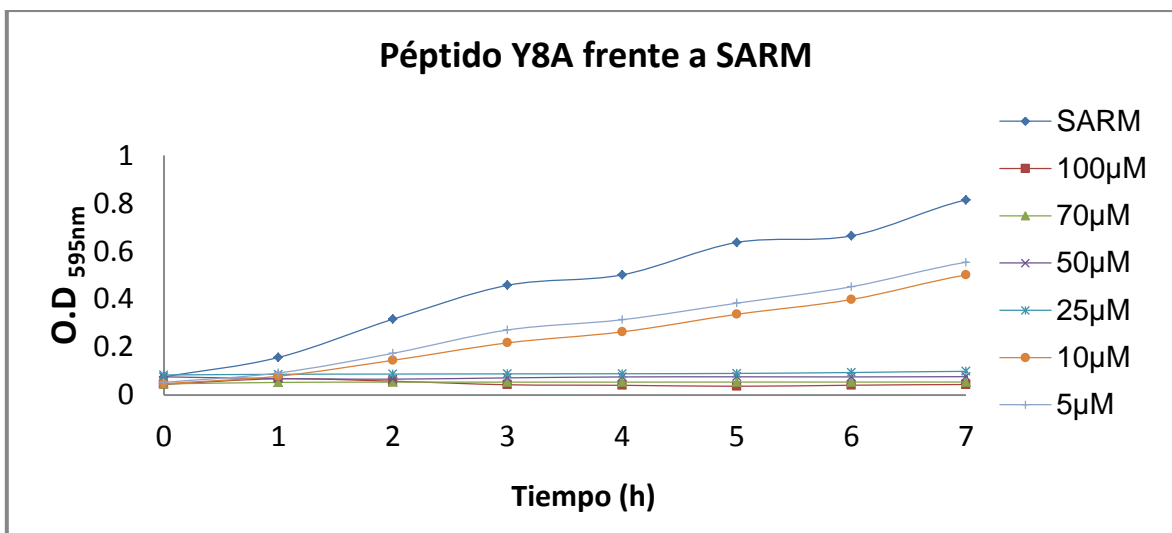


Figura 25. Cinéticas de crecimiento de la cepa SARM frente a los péptidos sintéticos.

Las cinéticas de crecimiento se construyeron por medición de la densidad óptica a 595 nm durante 8 horas de incubación, midiendo la turbidez cada hora. Las mediciones se realizaron por triplicado en microplacas de ELISA. El control negativo de crecimiento fue el caldo nutritivo en ausencia de bacteria y el control positivo fue la bacteria en ausencia de agente antimicrobiano.

Como se observa en la **figura 24** y **figura 25**, se pueden identificar tres etapas diferenciadas en el crecimiento bacteriano. La primera fase o fase de latencia en la que las células crecen y se preparan para la división celular, esta fase transcurre en las primeras tres horas; como se observa en cada una de las gráficas construidas para *E. coli* O157:H7 la presencia de péptido alarga el tiempo que las bacterias están en esta fase. Esto evidencia la eficiencia y rapidez con que actúan los péptidos antimicrobianos. Para el caso de SARM, se observó este mismo comportamiento excepto para el péptido Y7A y para el péptido Y4 a una concentración de 5µM. La fase siguiente se conoce como fase logarítmica, y es aquella en la cual se dividen doblando su población de modo creciente y constante. Para la cepa *E. coli* en presencia los péptidos Y4, Y6 y Y8A a concentraciones superiores a 25µM esta fase se encuentra ausente evidenciando que la acción del péptido interrumpe el crecimiento y duplicación normal de la

bacteria. En el caso del péptido Y7A a la hora cuatro se observó el crecimiento máximo de la bacteria seguido del decaimiento.

En SARM, la acción antibiótica de estos péptidos es similar. El péptido Y4 es altamente eficiente a una concentración superior a 5 μM , la cual inhibe cerca del 50% del crecimiento de la bacteria. Los péptidos Y6 y Y8A a concentraciones superiores a 25 μM lograron inhibir el crecimiento en más del 90%.

Se observó una fase estacionaria al cabo de las cinco horas de modo general, en la cual algunas células mueren mientras otras crecen y se dividen, lo cual no representa un aumento significativo en el número de organismos. No se observó la fase de muerte celular, la cual está dada por la disminución del crecimiento y división mientras la muerte de los microorganismos ocurre rápidamente y por tanto una caída de los valores de densidad óptica; de este comportamiento se puede aseverar que los péptidos evaluados ejercen un efecto bacteriostático y no bactericida. Esto fue corroborado tomando 100 μL de los pozos de concentraciones que mostraron mayor inhibición y resuspendido en 900 μL de medio enriquecido BHI y posterior incubación por 12 horas a 37°C. La densidad óptica fue medida y se observó que para los péptidos Y6, Y7A y Y8A bacteria había crecido registrando valores de absorbancia superiores a 0,2 por lo cual no fue necesario sembrar en Agar sólido a diferencia del péptido Y4 que a concentraciones de 100 μM y 70 μM registraron un valor de absorbancia de 0,05.

Se logró establecer una CMB igual a 70 μM frente a SARM del péptido Y4, siendo el único agente antimicrobiano de los PAM sintetizados con efecto bactericida en el rango de concentraciones evaluadas (5 μM a 100 μM) como se observa en la **figura 26**.

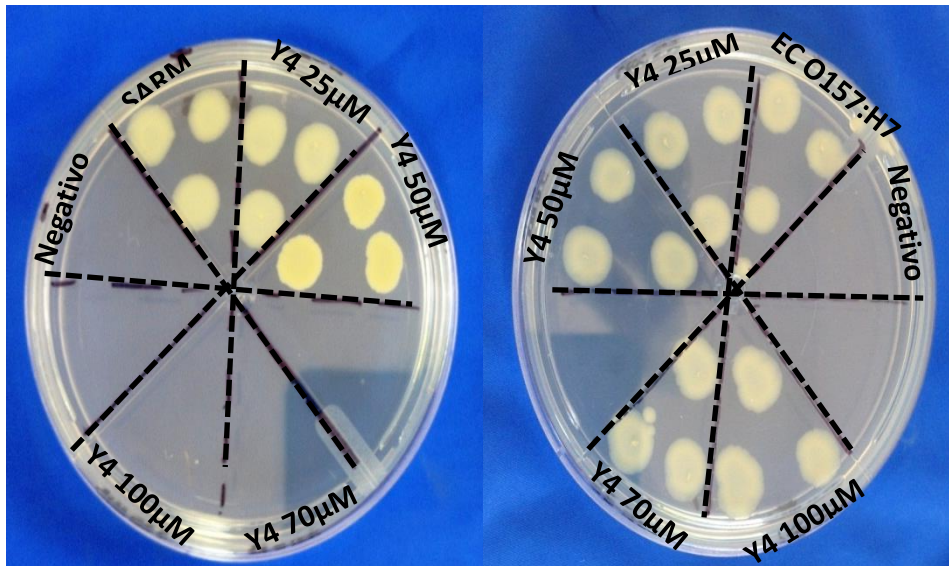


Figura 26. Ensayo bactericida del péptido Y4 frente **A)** SARM. **B)** *E. coli* O157:H7

A partir de las cinéticas de crecimiento se construyeron las gráficas de Porcentaje de inhibición Vs Concentración de Péptido para cada cepa bacteriana estudiada (**figura 26 y figura 27**). Se determinaron la CMI₅₀, CMI₉₀ y CMI₉₉ por interpolación y la CMB resultado del ensayo bactericida. En la **tabla 5 y tabla 6** se presenta los resultados obtenidos.

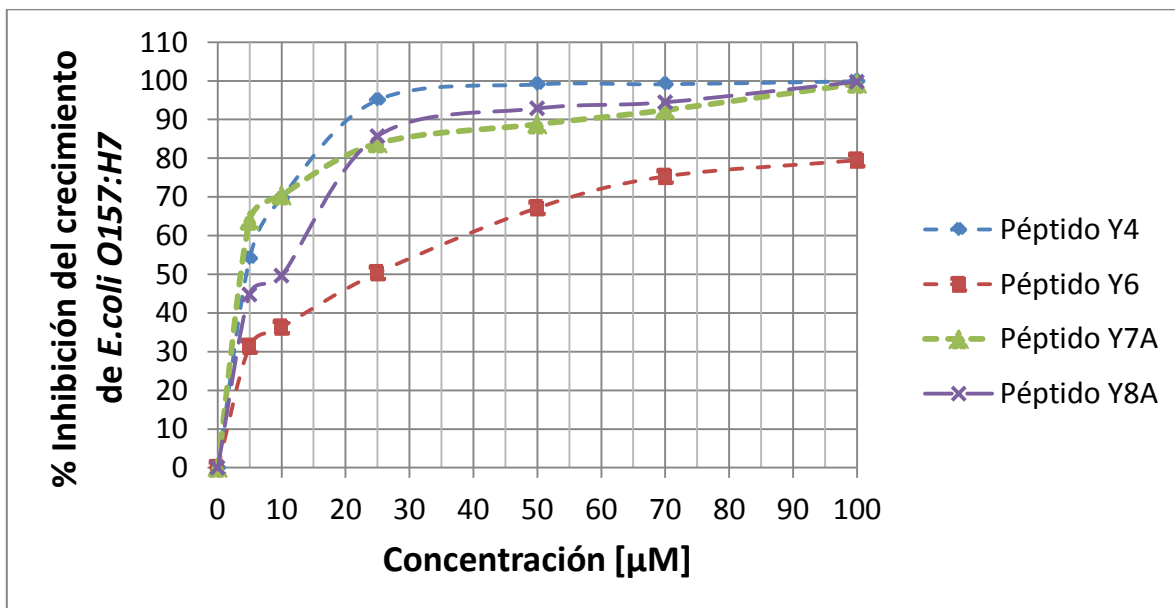


Figura 27. Inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli* O157:H7 en presencia de los péptidos sintéticos.

Tabla 5. CMI y CMB para cada péptido sintético frente a *E. coli* O157:H7.

Péptido	CMI ₅₀ ±DS	CMI ₉₀ ±DS	CMI ₉₉ ±DS	CMB
Y4	4,5 µM±0,02	20 µM±0,01	50 µM±0,02	>100 µM
Y6	25 µM±0,01	>100 µM	>>100 µM	ND
Y7A	3,5 µM±0,02	60 µM±0,04	100 µM±0,01	>100 µM
Y8A	10 µM±0,03	34 µM±0,01	100 µM±0,01	>100 µM

DS: Desviación Estándar. **ND:** No determinada en el rango evaluado

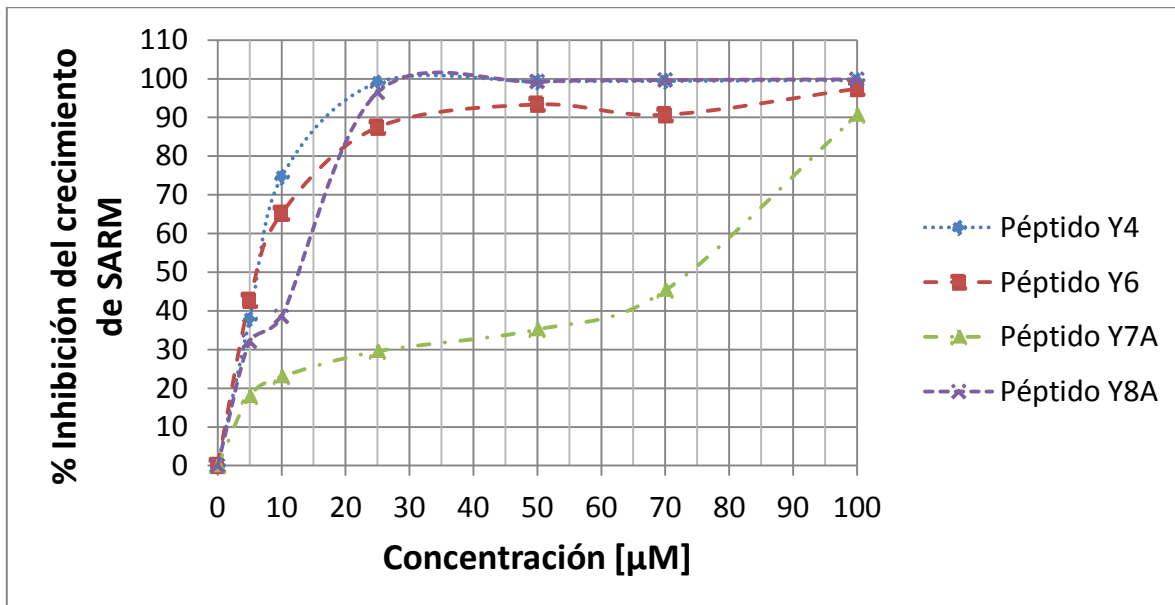


Figura 28. Inhibición del crecimiento bacteriano de SARM en presencia de los péptidos sintéticos.

Tabla 6. CMI y CMB para cada péptido sintético frente a SARM.

Péptido	CMI₅₀±DS	CMI₉₀±DS	CMI₉₉±DS	CMB
Y4	6,5 µM±0,02	18 µM±0,01	25µM±0,02	70 µM
Y6	6,6 µM±0,03	30 µM±0,02	>100 µM	NP
Y7A	74 µM±0,1	100 µM±0,02	>100 µM	NP
Y8A	12,5µM±0,04	22 µM±0,01	30 µM±0,02	>100 µM

DS: Desviación Estándar. **NP:** No presente en el rango evaluado

De las gráficas % Inhibición Vs Concentración de péptido para ambas bacterias, se puede inferir que el péptido con mayor actividad antimicrobiana es Y4. Este péptido sintético alcanza una inhibición del 50% a una concentración de 4,5 µM frente a *E. coli* y 6,5 µM frente a SARM, y alcanza CMI₉₀ ≤ 20 µM en ambos casos. Esta CMI₅₀ se encuentra dentro del rango de concentraciones terapéuticas empleadas actualmente para el tratamiento de infecciones causadas por SARM (Ortega, 2008). Pese a mostrar un efecto inhibitorio similar en ambas bacterias, este péptido resultó ser bactericida en SARM a una concentración de 70 µM. Este comportamiento denota cierta especificidad del péptido por una bacteria en particular. En el análisis bioinformático se evidenció que la secuencia Y4 presentaba una alta homología por un grupo de proteínas de reconocimiento de peptidoglicano, componente mayoritario de la pared bacteriana de SARM; este hecho estaría relacionado con la afinidad exhibida por esta cepa. Adicionalmente, el péptido Y8A mostró un efecto inhibitorio sostenido frente a SARM, con una CMI₅₀ 12,5 µM alcanzando la CMI₉₀ con solo 22 µM. Tanto Y4 como Y8A poseen una carga neta (+5) resultado de su alto contenido de lisina y arginina. La carga positiva en los péptidos facilita la interacción electrostática con los grupos negativos presentes en la pared de Gram-positivos y en la membrana de Gram-negativos como lo son los ácidos teicoicos y lipopolisácaridos respectivamente.

El péptido Y7A presento la CIM₅₀ más baja, siendo 3,5 µM frente a *E. coli* O157:H7. Este péptido posee la carga neta positiva más alta (+6). La presencia de lipopolisácaridos y de fosfolípidos en la membrana de *E. coli* hacen que esta tenga mayor densidad de carga negativa facilitando la atracción eléctrica con las moléculas de péptido asegurando su inserción en la membrana (Lesmes, 2009). La presencia del residuo de fenilalanina en el extremo C-terminal permite que la densidad electrónica del anillo aromático interrumpa las interacciones hidrofóbicas de la bicapas lipídicas al insertarse a través de las largas cadenas carbonadas de los lípidos (Su, 2009).

Como se mencionó de manera anticipada en el numeral 4.4, los péptidos escogidos para ser conjugados a los AuNCs fueron Y4, Y7A y Y8A. La elección de estos péptido se dio con base en sus propiedades fisicoquímicas y a la actividad antimicrobiana exhibida frente a cada microorganismo. Pese a que Y6 mostró efectividad como agente antimicrobiano con una CMI₅₀ igual a 6,6 µM para SARM y 25 µM para *E. coli*, las CMI₉₀ y CMI₉₉ fueron mayores o iguales a 100µM. Adicionalmente, Y6 posee una carga neta de (+4), la más baja de todos los péptidos diseñados y dado que esta carga influye significativamente en el potencial zeta de los productos AuNCs@Péptido, de formarse un sistemas AuNCs-SPDP@Y6, se esperaría un potencial zeta negativo de magnitud significativamente alta lo cual disminuiría las probabilidades de interactuar de manera electrostática con la membrana también cargada negativamente de las bacterias.

3.5.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de sistemas conjugados AuNCs@Péptido

Para los ensayos de actividad antimicrobiana de los sistemas nanoestructurados AuNCs-EMCs@Y4, AuNCs-SPDP@Y7A y AuNCs-SPDP@Y8A se partió de una concentración de péptido conjugado igual a 40 μM , la cual fue calculada por HPLC como se describió anteriormente. Las cinéticas de crecimiento fueron construidas de la misma manera que las del cada péptido individual frente a las bacterias de estudio. Las concentraciones evaluadas en este ensayo estuvieron en un rango de 1 a 40 μM . Los dos tipos de AuNCs linkeados (con SPDP y EMCS) no exhibieron actividad antimicrobiana frente a estas cepa como se evidencia en el **anexo I**; debido al potencial zeta altamente negativo (**Tabla 4**) de estos sistemas el acercamiento a la pared o membrana bacteriana está interrumpido por efecto de repulsión de cargas. Ya se ha mencionado que la carga positiva o la presencia de grupos aceptores de electrones en los agentes antimicrobianos aseguran dicha interacción.

A continuación en la **figura 29** y **figura 30** se presenta la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 y SARM en presencia de los productos de la conjugación AuNCs-SPDP@Péptido y AuNCs-EMCS@Péptido respectivamente.

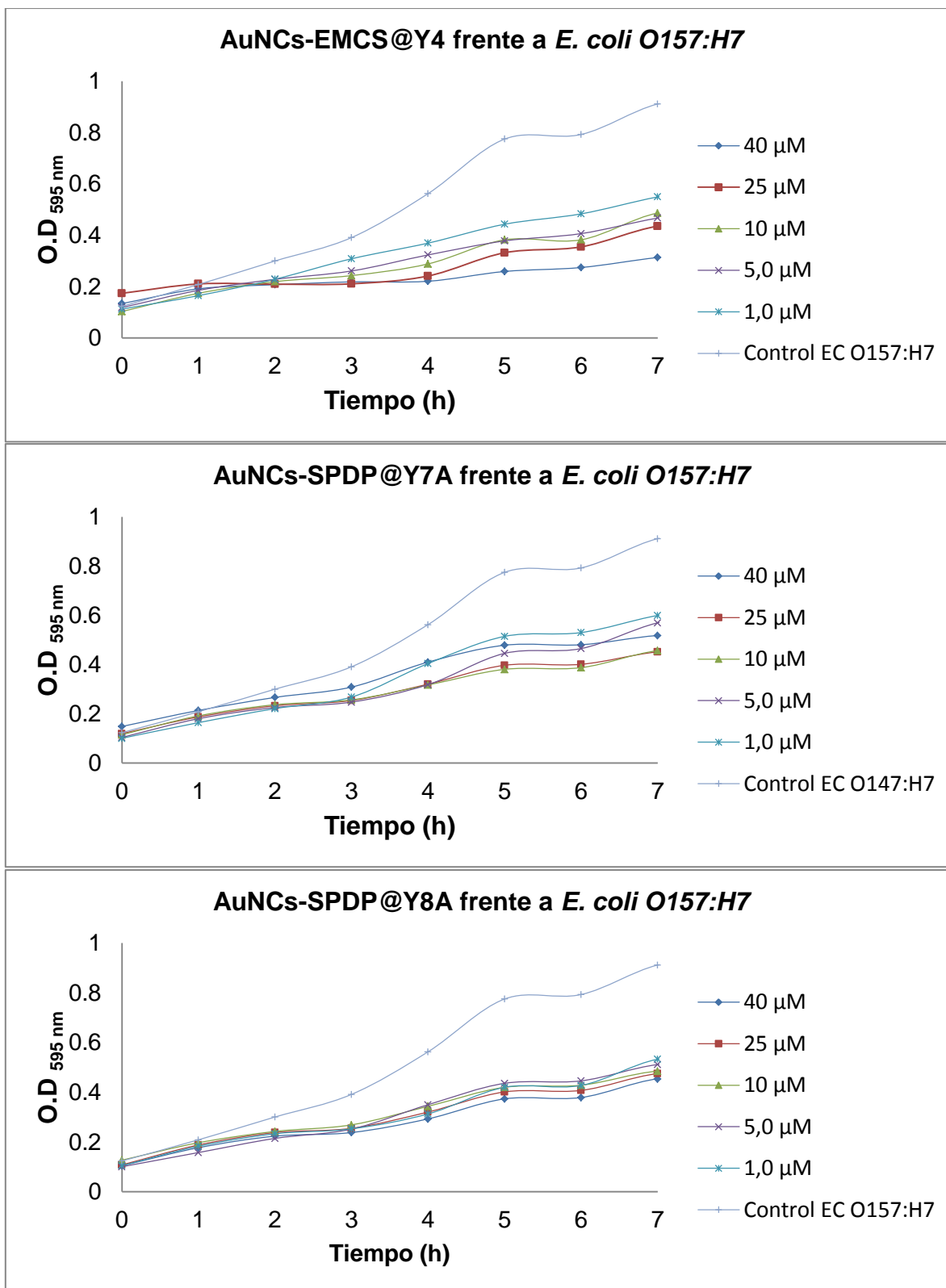


Figura 29. Cinéticas de crecimiento de la cepa *E. coli* O157:H7 en presencia de los péptidos conjugados a AuNCs.

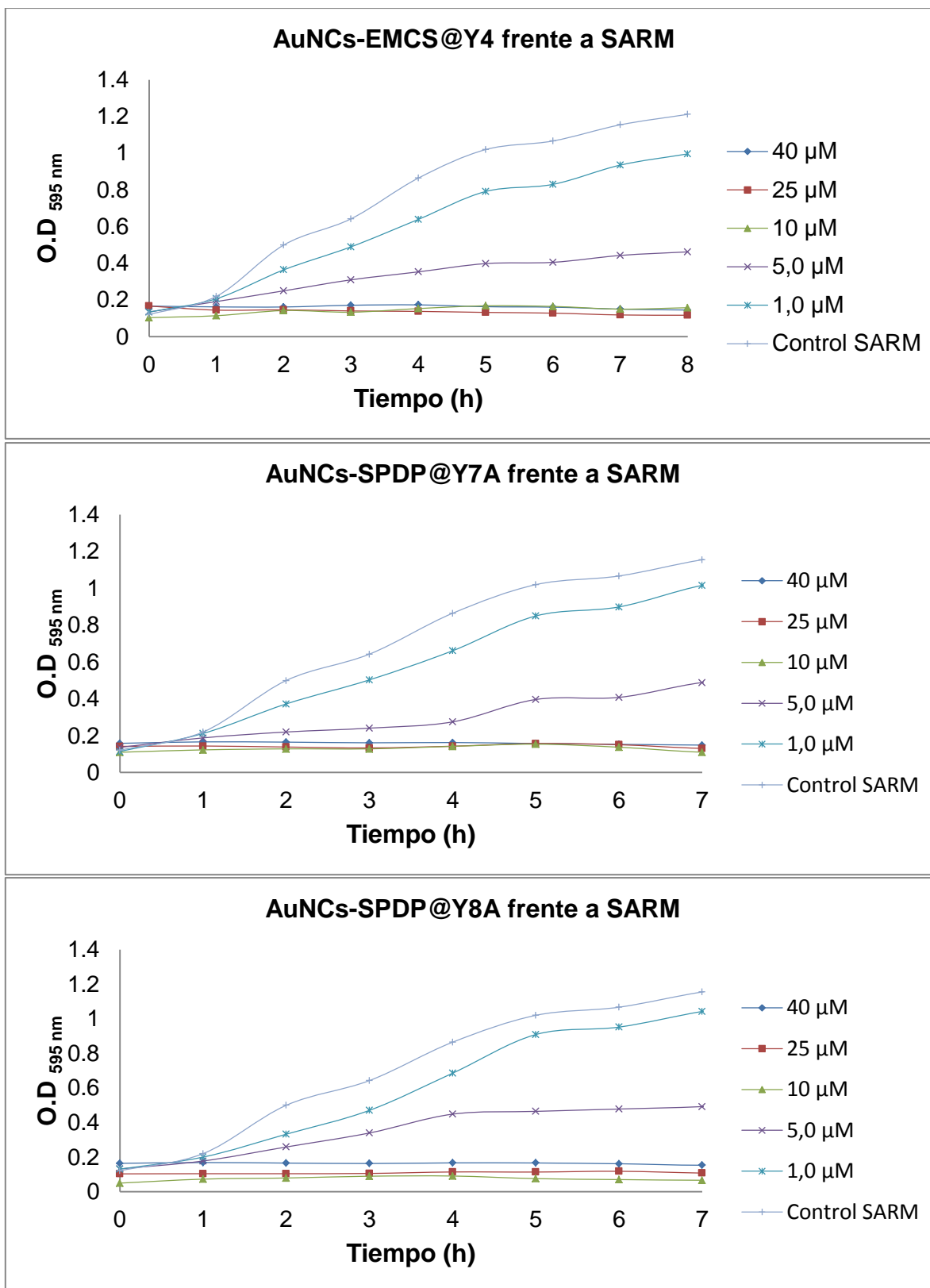


Figura 30. Cinéticas de crecimiento de la cepa SARM en presencia de los péptidos conjugados a AuNCs.

De las **figuras 29 y 30**, se observó que los sistemas de AuNCs-*Linker*@Péptido conjugado exhibieron menor inhibición en el crecimiento de *E. coli* O157:H7 comparado con la respuesta y sensibilidad de SARM a estas nanoestructuras. Este comportamiento puede estar relacionado con el mecanismo de acción de los péptidos individualmente. La vinculación del péptido al sistema de AuNCs por unión a un linker, con lleva a la formación de sistema más específicos en cuanto a la disposición espacial y orientación que el péptido adopte en estos sistemas nanoestructurados. En todos los casos los péptidos están unidos al linker de los AuNCs por su extremo N-terminal, ya sea por un enlace disulfuro reducible entre el residuo cisteína de Y7A y Y8A y el SPDP o por un enlace covalente amina entre el α -amino de la serina N-terminal de Y4. Se ha observado que el extremo N-terminal participa en la inserción del péptido en la membrana bacteriana y posterior translocación del péptido al interior de la célula bacteriana, de ser este el mecanismo que ejercen estos péptido o alguno de ellos frente a *E. coli* O157:H7 se presume entonces que la vinculación del péptido a los AuNCs por el extremo N-terminal dará como resultado una disminución significativa en la actividad comparada con la actividad del péptido individual. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para elucidar el mecanismo de acción de cada péptido y de esta manera definir el sitio de unión a sistemas transportadores como los AuNCs desarrollados en este trabajo.

Un hecho considerable que se evidenció en la **figura 30**, es que este tipo de sistemas AuNCs-*Linker*@Péptido mostraron mayor efecto en el porcentaje de inhibición a concentraciones menores que cuando fue evaluado cada péptido individual. Se observa que con una concentración máxima de 5 μ M para los tres sistemas se alcanza a inhibir más del 50% del crecimiento de SARM. Para precisar los valores de las CIM₅₀, CIM₉₀ y CIM₉₉ se construyeron las gráficas de Porcentaje de Inhibición Vs Concentración de AuNCs-*Linker*@Péptido (**figura 31 y figura 32**) respecto a cada cepa bacteriana. Los valores de concentración interpolados gráficamente son mostrados en la **tabla 7 y tabla 8** en los que también se incluyeron los obtenidos en la evaluación de los péptidos individuales a modo de comparación.

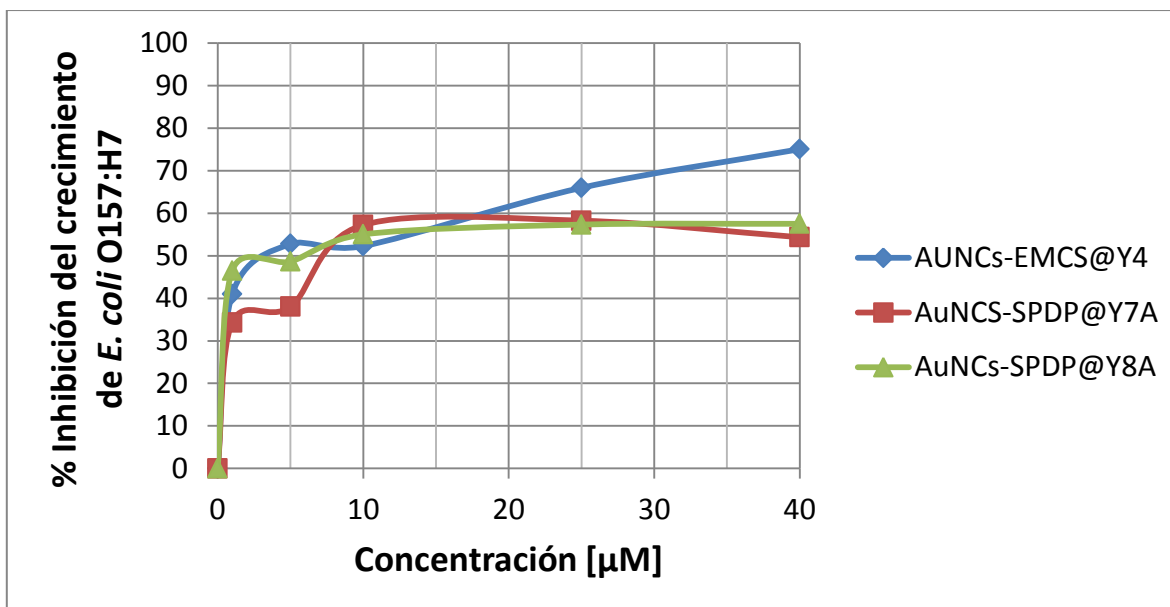


Figura 31. Inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli* O157:H7 en presencia de los AuNCs@Péptido.

Tabla 7. Comparación de las CMI y CMB de los péptidos sintéticos y de los productos de la conjugación a las AuNCs frente a *E. coli* O157:H7.

Agente antimicrobiano	CMI ₅₀ ±DS	CMI ₉₀ ±DS	CMI ₉₉ ±DS	CMB
Y4	4,5 μM±0,02	20 μM±0,01	50 μM±0,02	>100 μM
AUNCs-EMCS@Y4	3,0 μM±0,04	>40 μM	NP	NP
Y7A	3,5 μM±0,02	60 μM±0,04	100 μM±0,01	>100 μM
AUNCs-SPDP@Y7A	7,5 μM±0,03	>40μM	NP	NP
Y8A	10 μM±0,03	34 μM±0,01	100 μM±0,01	>100 μM
AUNCs-SPDP@Y8A	3,0 μM±0,02	>40μM	NP	NP

DS: Desviación Estándar. **NP:** No presente en el rango evaluado

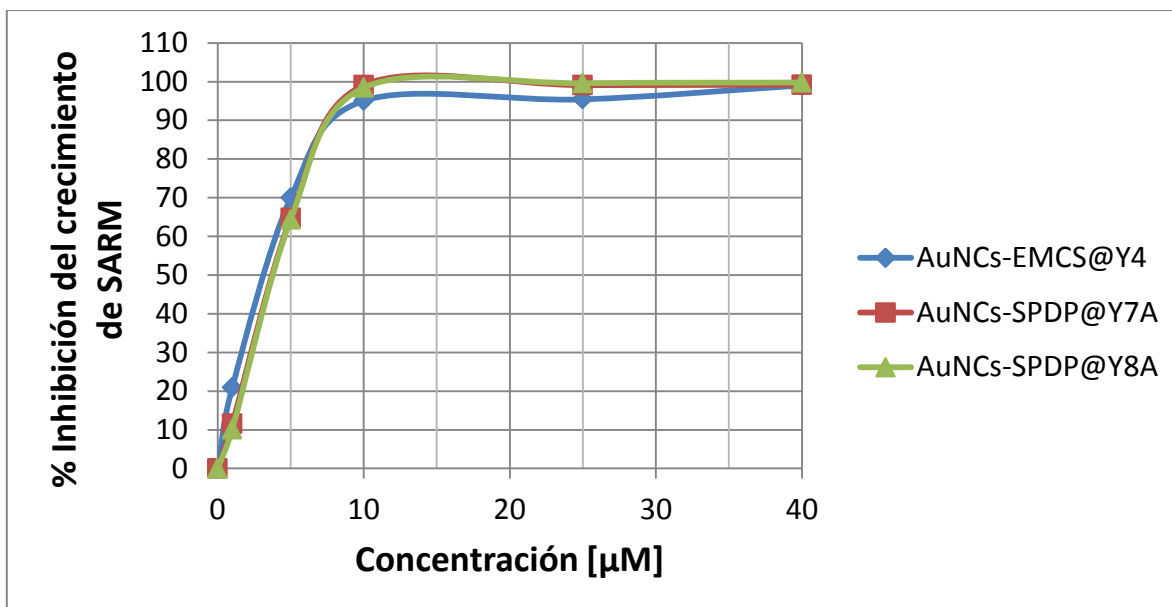


Figura 32. Inhibición del crecimiento bacteriano de SARM en presencia de los AuNCs@Péptido.

Tabla 8. Comparación de las CMI y CMB de los péptidos sintéticos y de los productos de la conjugación a las AuNCs frente a SARM.

Agente antimicrobiano	CMI ₅₀ ±DS	CMI ₉₀ ±DS	CMI ₉₉ ±DS	CMB
Y4	6,5 μM±0,02	18 μM±0,01	25 μM±0,02	70 μM
AuNCs-EMCS@Y4	3,0 μM±0,01	8,0 μM±0,02	40 μM±0,01	>40 μM
Y7A	74 μM±0,01	100 μM±0,02	>100 μM	NP
AuNCs-SPDP@Y7A	4,7 μM±0,02	7,5 μM±0,02	10 μM±0,01	>40 μM
Y8A	12,5μM±0,04	22 μM±0,01	30 μM±0,02	>100 μM
AuNCs-SPDP@Y8A	4,8 μM±0,01	7,5 μM±0,02	10 μM±0,02	>40 μM

DS: Desviación Estándar. **NP:** No presente en el rango evaluado

La conjugación de los péptidos Y4 y Y8A a los AuNCs dio como resultado la disminución de la CIM₅₀ 1,5 veces para Y4 y 3,3 veces para Y8A cuando fueron evaluados individualmente contra *E. coli* O157:H7. En la cepa SARM, los sistemas conjugados AuNCs-EMCS@Y4, AuNCs-SPDP@Y7A y AuNCs-SPDP@Y8A disminuyeron drásticamente no solo las CMI₅₀, también la CMI₉₀ y CMI₉₉ y en ningún caso se presentó un efecto bactericida como es observado en la **tabla 8**.

De forma general, este tipo de sistemas nanoestructurados mejoran la biodisponibilidad del péptido activo ya que mayor número de moléculas pueden ser fijadas en la superficie de los AuNCs y focalizadas a un blanco específico, como es la pared bacteriana. Los AuNCs se comportaron como vehículos de transporte efectivos, sin embargo el efecto inhibitorio en el crecimiento de la bacteria depende principalmente del mecanismo de acción del péptido individual. Puede inferirse que cuando el mecanismo de acción se da solo a nivel de la membrana ya sea por acumulación, disrupción y degradación de los componentes de la pared bastaría con sostener y concentrar el mayor número de moléculas de péptido en la vecindad de la bacteria, sin embargo cuando el mecanismo de acción del péptido involucra la inserción y posterior translocación hacia el interior, se requieren sistemas de AuNCs que permitan la liberación del péptido de forma controlada. Los AuNCs sin estar conjugados al péptido no exhibieron actividad antibiótica frente a las cepas, luego no puede asegurarse que exista un efecto sinérgico debido a la conjugación con agentes antimicrobianos, sin embargo podría ocurrir que como la carga superficial altamente negativa de los AuNCs no permite su acercamiento por repulsión de carga con la membrana bacteriana pero al modificarse el potencial zeta de los AuNCs por efecto de la conjugación a péptidos catiónicos disminuya la repulsión y los clusters de oro ejerzan algún mecanismo ya sea de internalización en la célula bacteriana, pues bien la BSA que estabiliza los AuNCs aunque no posee actividad antimicrobiana significativa frente a estas cepas podría eventualmente participar de interacciones hidrofóbicas o interacciones de puentes de hidrogeno con las proteínas transmembrana de las células una vez deteriorada la pared celular de las bacterias Gram-positivas por la

acción de los péptidos conjugados. De este modo, tendría lugar un efecto sinérgico que a simple vista no es notorio, es necesario establecer mecanismo de acción y elucidar si existen daños en la pared o membrana bacteriana en cada caso. Es importante mencionar que dentro de las propiedades de los sistemas AuNCs@Péptido formados se presentan fenómenos de fluorescencia atribuidos a los cluster de oro estabilizados en la BSA con una longitud de onda de excitación a 343 nm y emisión a 619 nm. Para futuros estudios se aprovechará estas propiedades para realizar ensayos de microscopia confocal y así elucidar las interacciones que tienen lugar entre estos sistemas nanoestructurados y las bacterias e indagar los mecanismos de acción involucrados en el actividad antibiótica de estos agentes.

4. CONCLUSIONES

Se logró diseñar mediante herramientas bioinformáticas ocho nuevas secuencias peptídicas con potencial antimicrobiano, las cuales se sintetizaron por la metodología de síntesis en fase sólida con estrategia del grupo Fmoc con una pureza superior al 89%.

La determinación de la estructura secundaria confirmó la habilidad de los nuevos péptidos para adoptar una conformación de α -hélices en un medio mimético a la membrana bacteriana, relacionado directamente con el potencial antimicrobiano mostrado por cuatro de los péptidos diseñados que exhibieron actividad antibiótica frente a las cepas *E. coli* O157:H y SARM. Los péptidos Y4, Y7A y Y8A presentaron una CMI₅₀ frente a *E. coli* O157:H7 inferior 10 μ M.

Para SARM la CMI₅₀ de Y4, Y6 y Y8A fue de 6,5 μ M, 6,6 μ M y 12,5 μ M respectivamente.

Se obtuvieron sistemas nanoestructurados de oro por reducción con BSA con un tamaño hidrodinámico igual a Los sistemas nanoestructurados AuNC@Péptido superaron la actividad antimicrobiana de los péptidos individuales. Siento mayor el efecto antibiótico en la cepa de SARM que en *E. coli* O157:H7.

La conjugación de Y7A mejoró la CMI₅₀ de 74 μ M a 4,7 μ M, y la CIM₉₉>100 μ M a 10 μ M frente a SARM.

El empleo del SPDP y EMCS como *crosslinkers* en la conjugación permitió fijar las moléculas de péptido de forma específica a los sistemas de AuNCs, induciendo a los péptidos adoptar una disposición espacial definida.

BIBLIOGRAFÍA

- Albercio, F. and Carpino, L. Coupling reagents and activation. *Methods in Enzymology*. Vol. 289, (1997); p. 104-126.
- Al-qadi, S And Remuñán C. Nanopartículas metálicas: Oro. Monografía del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Santiago de Compostela. (2012); p. 233-248.
- Andreu, D. Albericio, F. Solé, N. Munson, M. Ferrer, M. Barany, G. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 35, Peptide Synthesis Protocols (M.W. Pennington and B.W. Dunn, eds.), Humana Press. (1994).
- Aroca, R. The interaction of light with nanoscopic metal particles and molecules on smooth reflecting surfaces. *Surface-enhanced vibrational spectroscopy*. John Wiley & Sons. (2006); p. 35-71.
- Bartczak, D. and Kanaras, A. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling., *Langmuir* Vol. 27 (2011), p. 10119–10123.
- Bhattacharya, R. and Mukherjee, P. Biological properties of «naked» metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivey Reviews*. Vol. 60, (2008); p. 1289-1306.
- Bijan, R. and Gill, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. *Chem Biol Drug Des.*, Vol. 74 (2009), p. 101–120.
- Blondelle, S. and Houghten, R. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochemistry*. Vol. 50, (1992); p. 12688–12694.
- Boucher, H. and Corey, G. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. Vol. 1, No. 46, (2008); p. 344-349.
- Brown, S. Nativo, P. Smith, J. Stirling, D. Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 132, (2010); p. 4678–4684.
- Caprioli, A. Morabito, S. Brugere, H. Oswald, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res*. Vol. 36, (2005); p. 289–311.

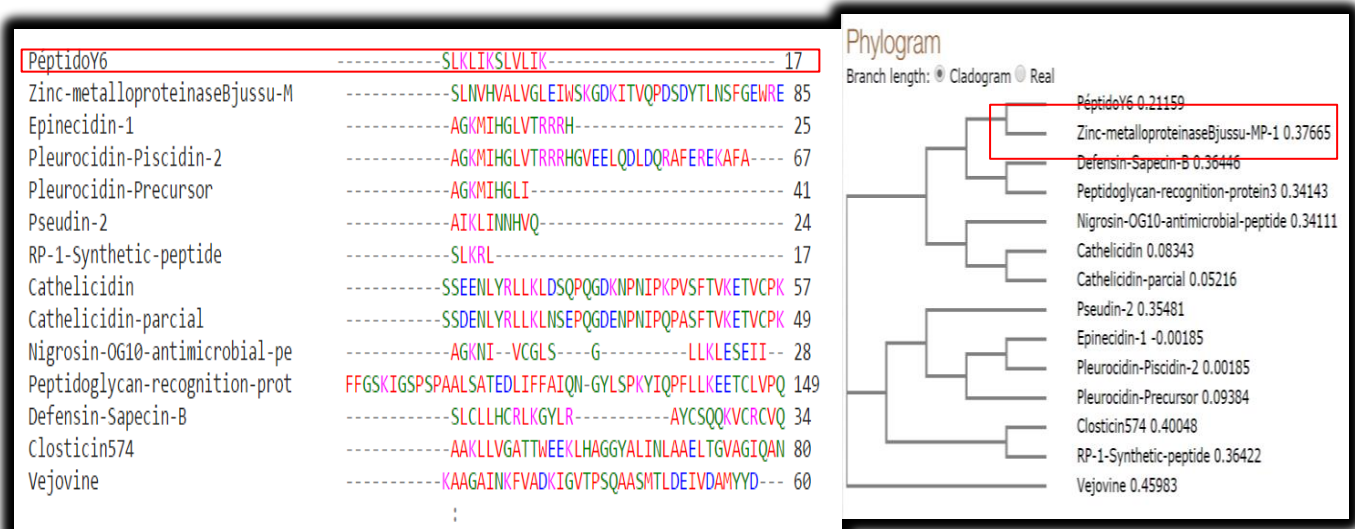
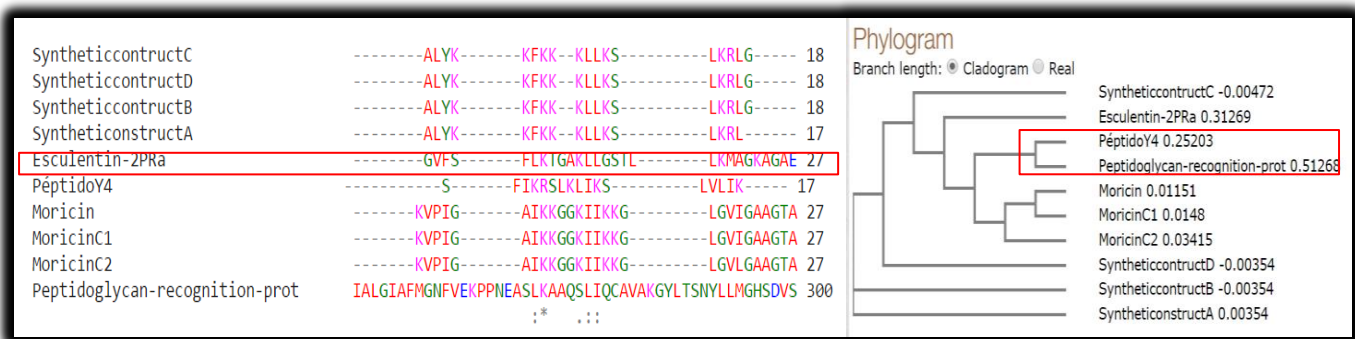
- Castillo, J. Leal, A. Álvarez, C. Cortés, J. Henríquez, E. Buitrago, G. Sánchez, R. Bacteriemia por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en la unidad de cuidados intensivos: Revisión de los estudios de pronóstico. *Infectio.*, Vol. 15 (1), (2011) ,p. 25-32.
- Connor, E. Mwamuka, J. Gole, A. Murphy, C. Wyatt, M. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. Vol. 1, No. 3, (2005); p. 325-327.
- Cruz, L. Rueda, F. Targeting nanosystems to human DCs via Fc receptor as an effective strategy to deliver antigen for immunotherapy. *Molecular pharmaceutics.*, Vol. 8 (2010), p. 104–116.
- Davor, j. Vukivevic, D. Petrov, d. Novkovic, M. Bojovic, V. Lucic, B. Ilic, N. Tossi, A. Knowledge-based computational methods for identifying or designing novel, non-homologous antimicrobial peptides. *Eur Biophys J.*, Vol 20 (2011), p. 371–385.
- Dominguez, V. Montes, S. Mora, B. Racini, M. Tovar, C. Detección de agentes infecciosos asociados a Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) en la población infantil de la ciudad de Montería. *Revista Medicina.*, Vol. 9 (2), (2010), p. 10-13.
- Dorota, B. and Antonios G. Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. *Langmuir*. Vol. 27, (2011); p. 10119–10123.
- Dubovskii, P. Volynsky, P. Polyansky, A. Karpunin, D. Chupin, V. Efremov, R. and Three-dimensional structure/ hydrophobicity of laticins specifies their mode of membrane activity. *Biochemistry*. Vol. 47, (2008); p. 3525-3533.
- Duffus JH., Nordberg M., Templeton DM., “IUPAC Glossary of terms used in toxicology. 2^{da} edition (2007). Disponible desde: <http://www.iupac.org/publications/pac/2007/pdf/7907x1153.pdf>
- Elsbach, P. What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses?. *J Clin Invest*. Vol. 111, N°. 11, (2003); p. 1643-5.
- Friedrich, C. Rozek, A. Patrzykat, A. Hancock, R. Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. *The Journal of Biological chemistry.*, Vol. 276 (26), (2000), p. 24015–24022.

- Gamberi, T. Cavalieri, D. Magherini, F. Mangoni, M. De-Filippo, C. Borro, M. Gentile, G. Simmaco, M. Modesti, A. An integrated analysis of the effects of Esculentin 1–21 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta.*, Vol. 1774 (2007), p. 688–700.
- Gielen, M. and Tiekink, E. Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: The use of metals in medicine. John Wiley and Sons (2005).
- Giljohann, A, Seferos, D. Daniel, W. Massich, M. Patel P. Mirkin, C. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed* . Vol. 49, No 19. (2010); p. 3280-3294.
- Haddadin, A. Fappiano, S. Lipsett, P. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgrad Med J.*, Vol. 78 (2002), p, 385–392.
- Hancock R, Sahl H. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* Vol. 24, (2006); p. 1551-1557.
- Hancock R. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.* Vol. 1, (2001); p. 156-164
- Heffernan, M and Murthy, N. Disulfide-Crosslinked polyion micelles for delivery of protein therapeutics. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 37 (2009), p. 1993–2002.
- Hetru, C. and Bullet, D. Antimicrobial peptides from insects. En: *Molecular mechanisms of immune response in insects*. Hulkmark PTBaD; p. 40-66.
- Hiramatsu, K. Cui, L. Kuroda, M. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* Vol. 9, (2001); p. 486-493.
- Hofmann, C. Essner, M. Baker, G. GA, Baker, S. Protein-templated gold nanoclusters sequestered within sol-gel thin films for the selective and ratiometric luminescence recognition of Hg^{2+} . *Nanoscale.*, Vol. 6 (10), (2014), p. 5425-5431.
- Humphrie, M. Conjugation of synthetic peptides to carrier proteins for cell adhesion studies. *Journal of Tissue Culture Methods.*, Vol. 16 (1994), p. 239-242.
- Jenssen, V, FJELL, C. CHERKASOV, D. HANCOC, R. QSAR modeling and computer-aided design of antimicrobial peptides. *J. Pept. Sci.*, Vol 12 (2008), p. 110–114.
- Jones, J. *Aminoacids and Peptide Synthesis*. 2^a Edición. Oxford Science Publications. Great Britain. (2002); p. 13-24, 43-52.

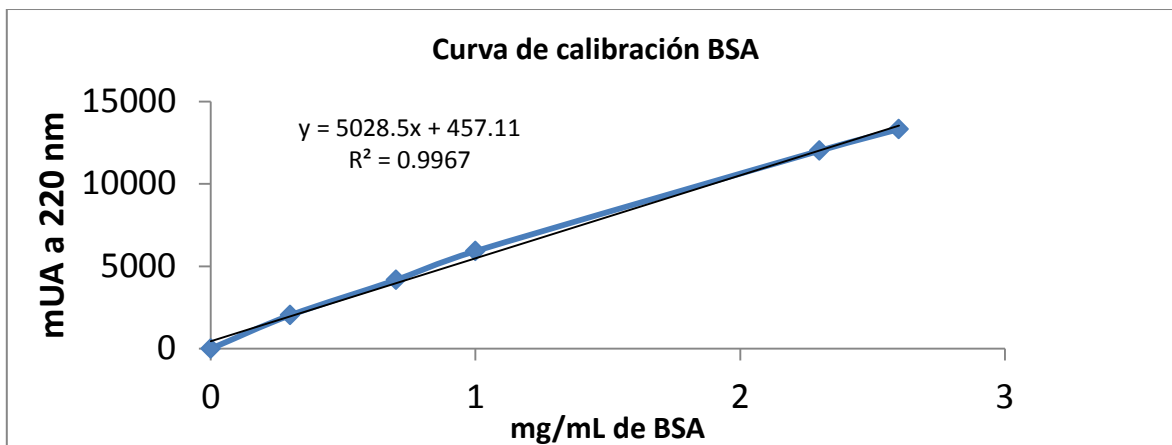
- Kalkhof, S. and Sinz, A. Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.*, Vol. 392 (2008), p. 305-312.
- Kristiansen, P. Fimland, G. Mantzilas, D. Nissen, J. Sstructure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.*, Vol. 280 (24), (2005), p. 22945–22950.
- Kun-Chan, H. Pei-Jane T. Ya-Shiuan, L. Yu-Chie, C. Using biofunctionalized nanoparticles to probe pathogenic bacteria. *Anal. Chem.* Vol. 76, (2004); p. 7162-7168.
- Laurence, D. Denis, G. Comes, M. Fernig, D. Robust Ligand Shells for Biological Applications of Gold Nanoparticles. *Langmuir.* Vol. 24, (2008); p. 13572-13580.
- Leonid, V. and Eugene R. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews.* Vol. 65, (2013); p. 663–676.
- Levine, I. Química de superficies. En: *Fisicoquímica.* Vol. 1. 4^a edición. Madrid. McGraw-Hill. (1996); p. 379–405.
- Lin, C. Chuang, W. Huang, Z. Kang, S. Chang, C. Chen, C. Li, J. Wang, H. Kung, F. Shen, J. Chan, W. Yeh, C. Lai, W. Chang, W. Rapid transformation of protein-caged nanomaterials into microbubbles as bimodal imaging agents. *ACSNano.*,

ANEXOS

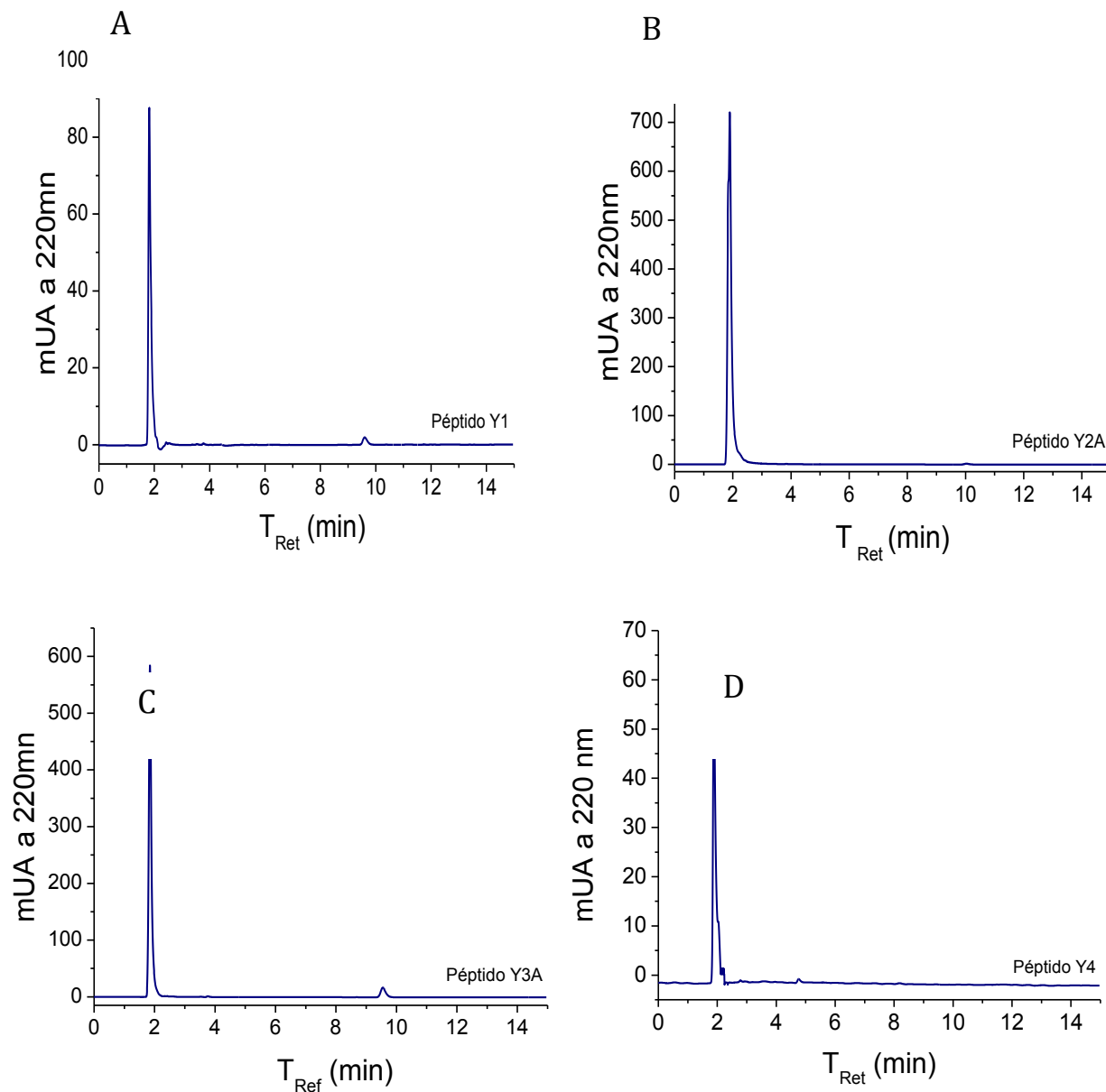
ANEXO A. Alineamiento multiple en ClustalW de los péptidos base con secuencias de proteínas que presentan identidad mayor al 80%

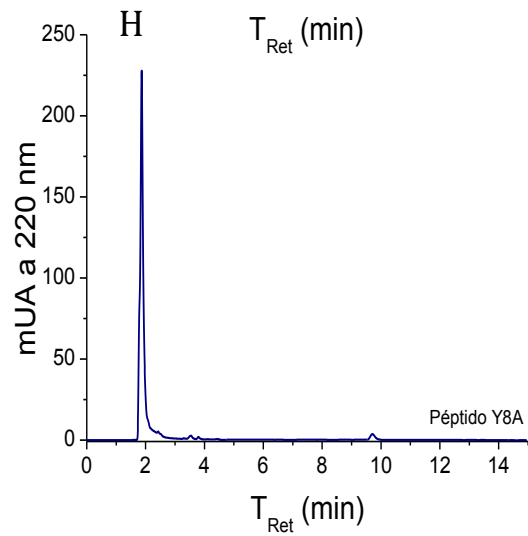
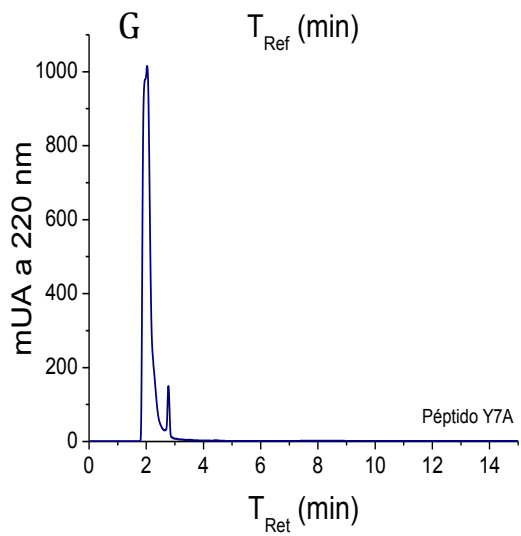
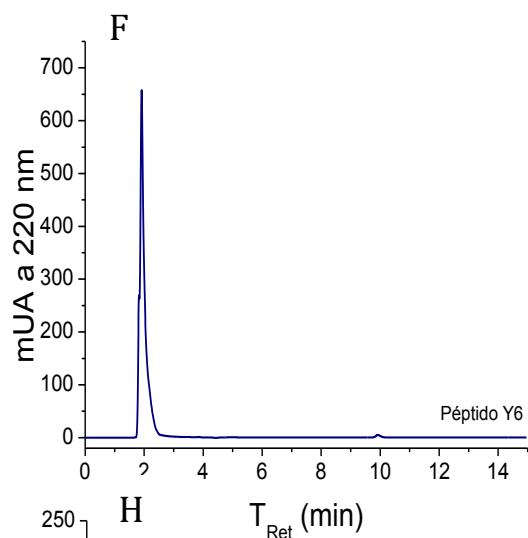
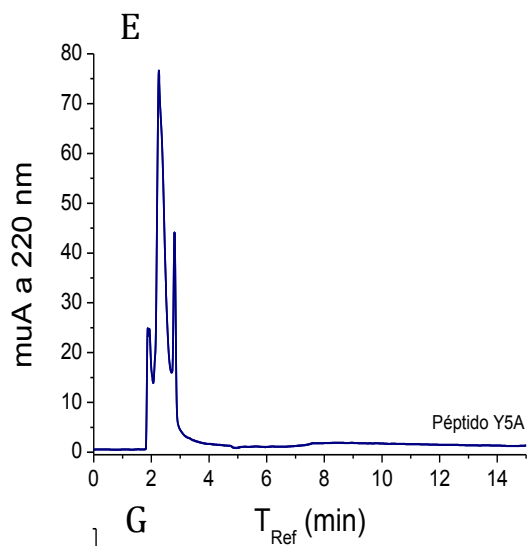


ANEXO B. Curva de calibración por HPLC de BSA. Cuantificación de la pureza de PAM's sintéticos.

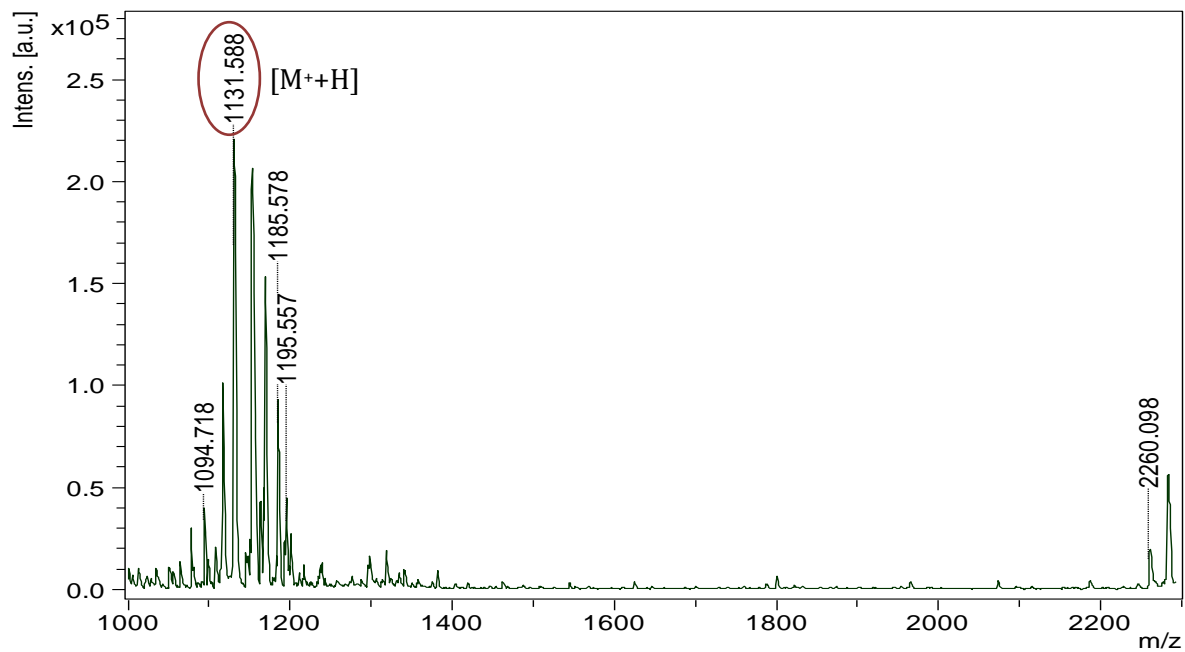


Anexo C. Determinación de la pureza de los pam por HPLC. A) Péptido Y1 elución en SPE Sepak C-18 con agua. B) Péptido análogo Y2 elución en SPE Sepak C-18 con 20% acetonitrilo. C) Péptido análogo Y3 elución en SPE Sepak C-18 con 30% acetonitrilo. D) Péptido Y4 elución en SPE Sepak C-18 con 50% acetonitrilo. E) Péptido análogo Y5. F) Péptido Y6 elución en SPE Sepak C-18 con 70% acetonitrilo. G) Péptido análogo Y7 elución en SPE Sepak C-18 con 20% acetonitrilo. H) Péptido análogo Y8 elución en SPE Sepak C-18 con 70% acetonitrilo.

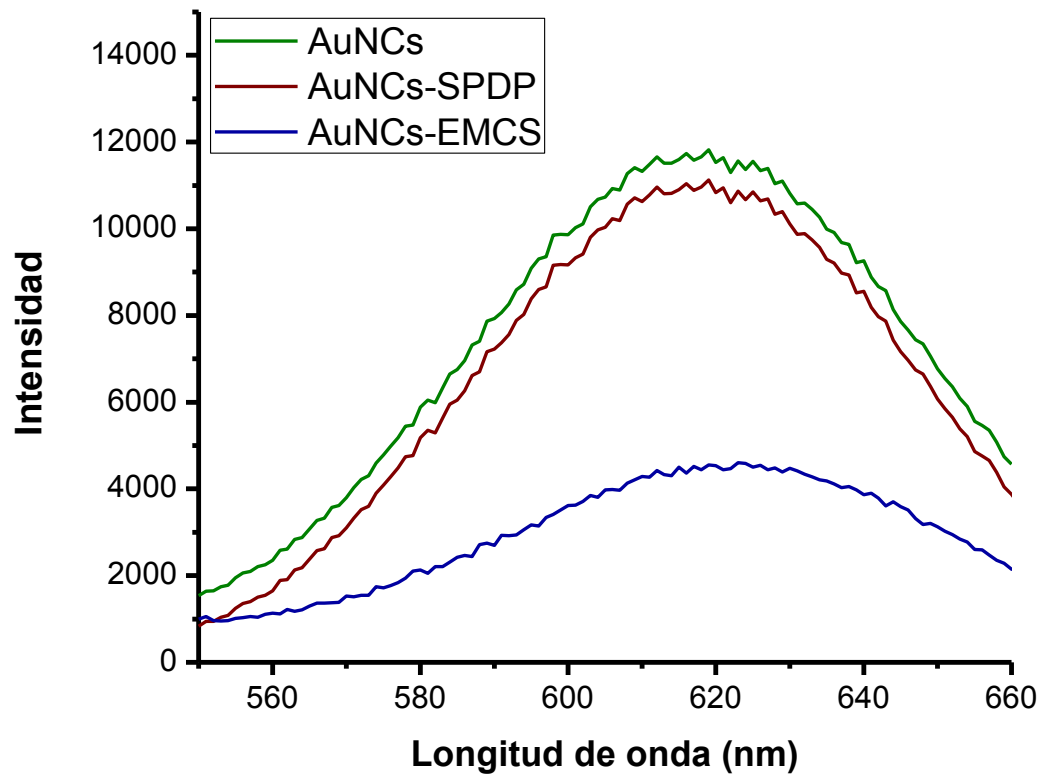




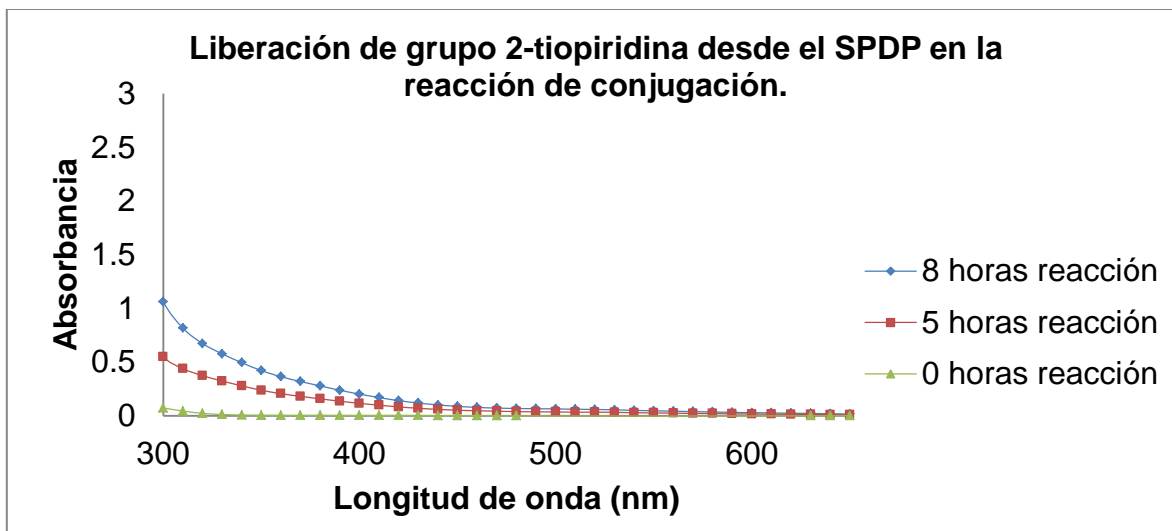
Anexo D. EspectroMALDI-TOF de péptido patrón de calibración.
Vapreotide [C₅₇H₇₀N₁₂O₉S₂]. Pm = 1131,37 Da.



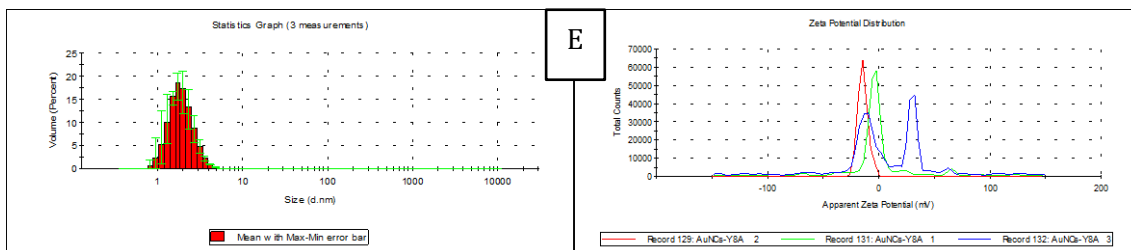
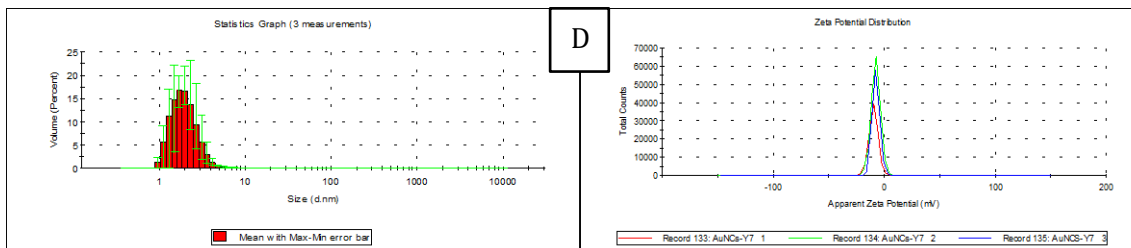
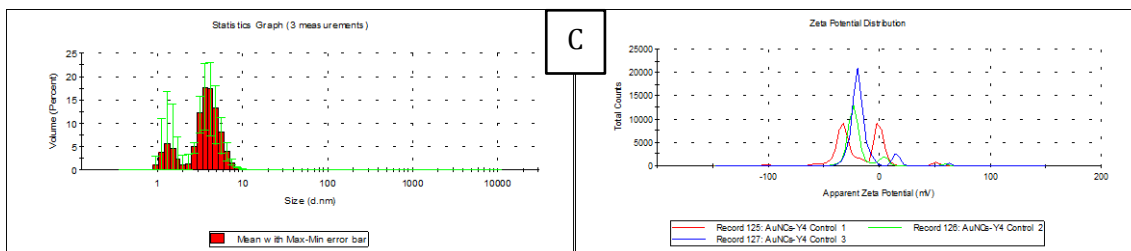
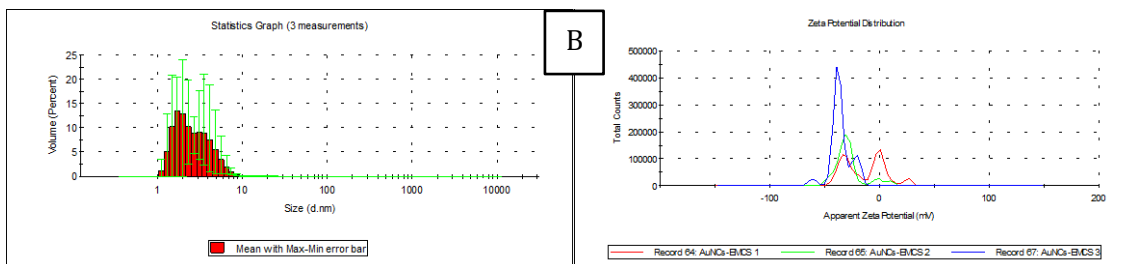
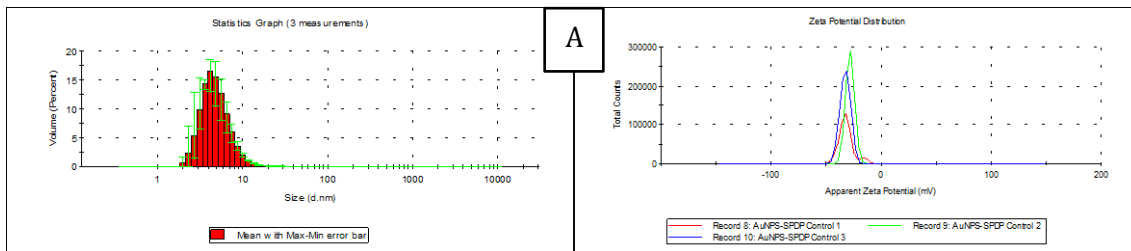
Anexo E. Espectro de fluorescencia de AuNCs vinculados a los diferentes *crosslinkers*. Longitud de onda de excitación de 343 nm.



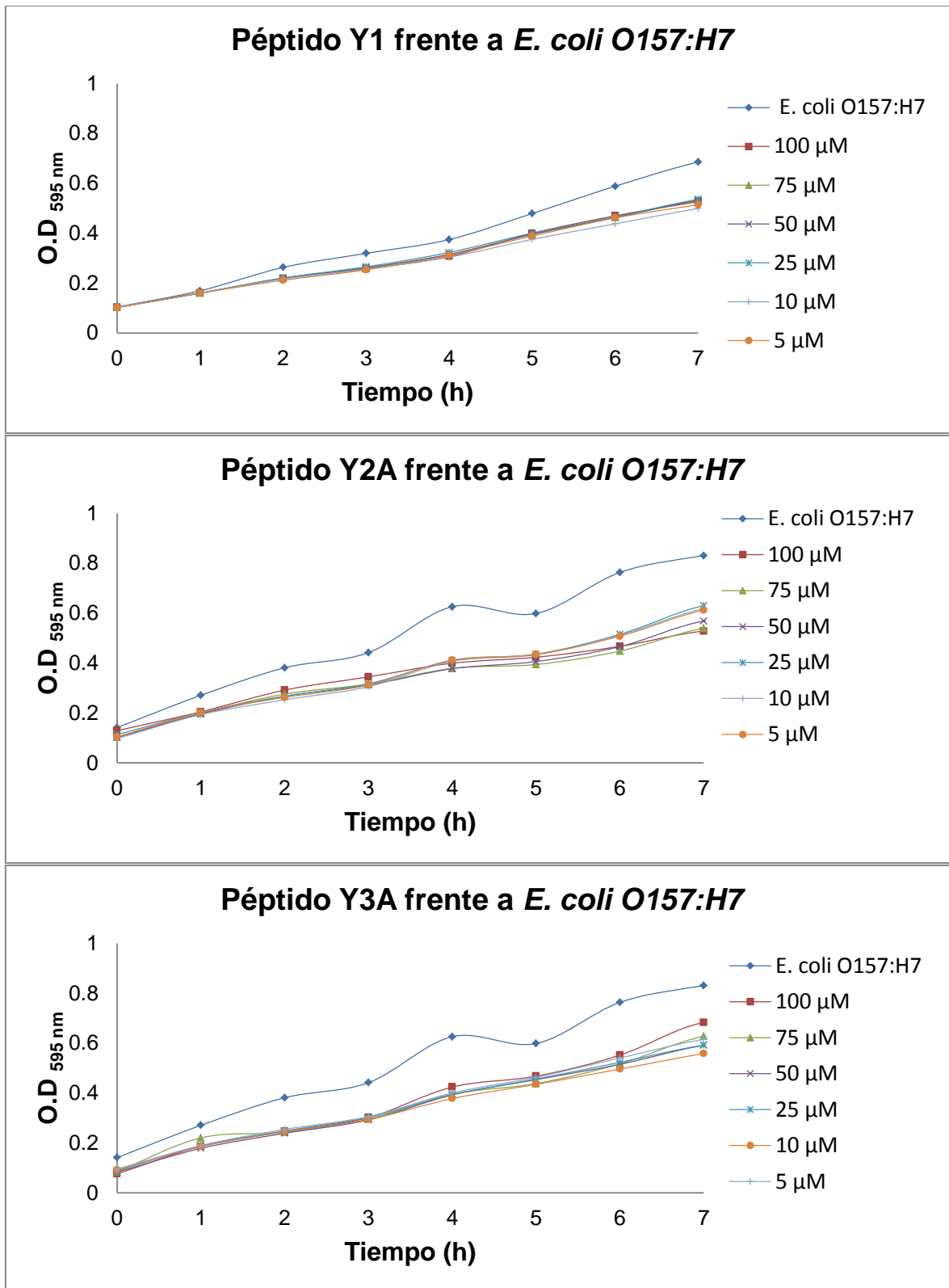
Anexo F. Espectro UV-Vis. Monitoreo de la reacción de conjugación del péptido y8a a los AuNCs-SPDP.

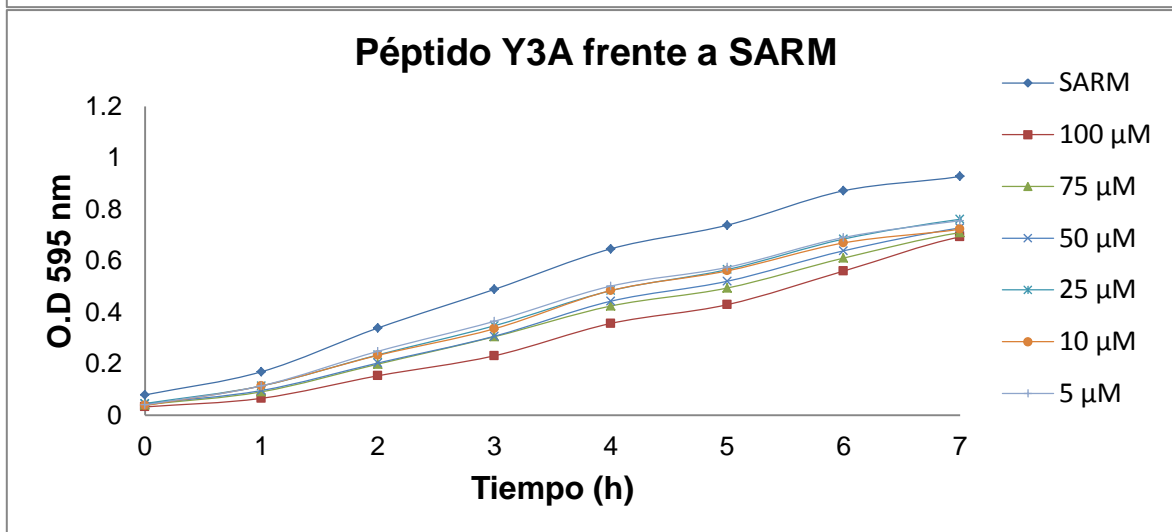
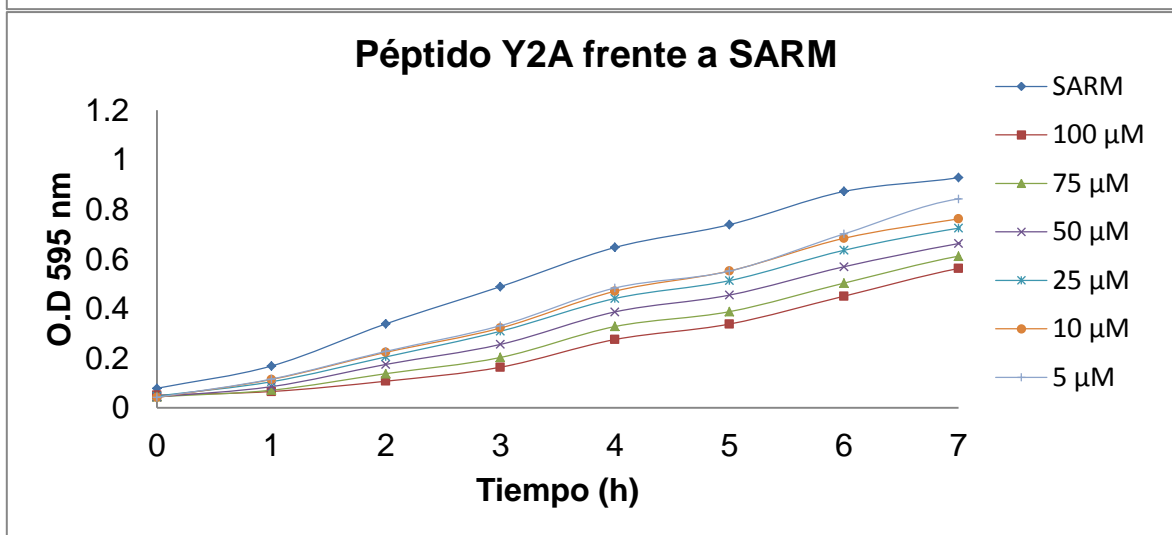
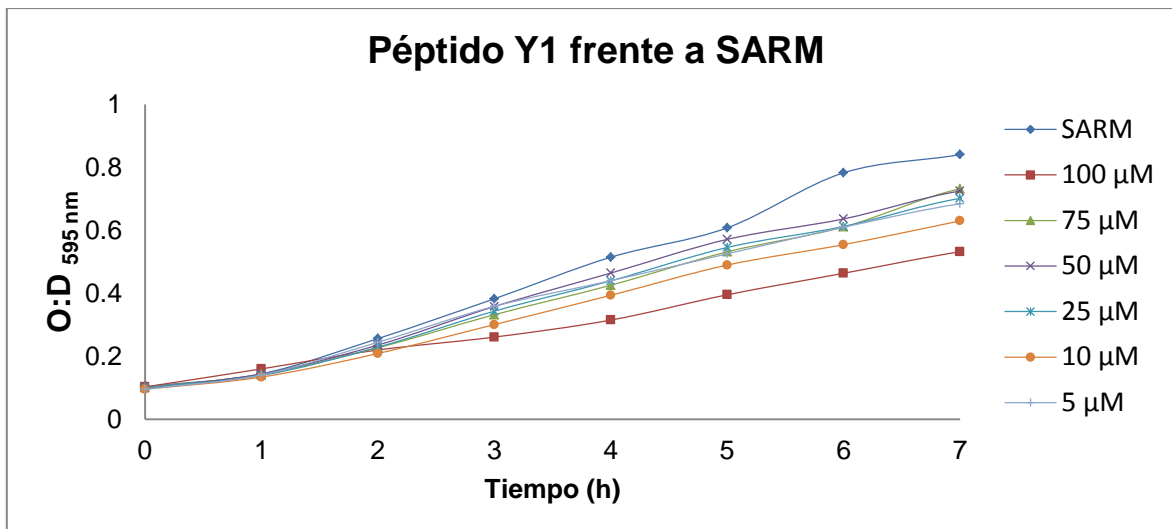


Anexo G. Tamaño hidrodinámico y potencial zeta. **A)** AuNCs-SPDP. **B)** AuNCs-EMCS. **C)** AuNCs-EMCS@Y4. **D)** AuNCs-SPDP@Y7A. **E)** AuNCs-SPDP@Y8A



Anexo H. Cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 y SARM frente a los péptidos Y1, Y2A Y Y3A.





Anexo I. Cinética de crecimiento de *E.coli* O157:H7 y SARM frente a los AuNCs.

