

Especificidad y posible mecanismo de acción del péptido antimicrobiano GAM019 y sus análogos GAM020, GAM022 y GAM026 contra bacterias Gram positivas y Gram negativas

Stefania Correa Duarte

Trabajo de grado para optar por el título de Bióloga

Director

Mauricio Urquiza Martínez

Doctor en Ciencias Químicas

Codirectora

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Doctora en Ciencias Bioquímicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

A mis papitos Elizabeth y Amaury por su apoyo, palabras de aliento y amor incondicional

A mi tía Luz Dary, quien es mi segunda mamá por todo por su apoyo brindado

A mis hermanas Nathaly y María, que siempre me acompañaron en momentos de angustia

A mi amiga Yenny, por todos los consejos brindados

Los quiero mucho

Stefania Correa Duarte

Agradecimientos

Al Dr. Mauricio Urquiza por todo su apoyo y conocimiento brindado.

A la Dra. Stelia Méndez por su confianza, paciencia, guía y contribución para realizar este trabajo.

A la Dra. Claudia Ortiz por su confianza y apoyo durante este proceso.

A todos mis compañeros del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, en especial a Yenny, Yuliany, Lady, Marlon y Jennifer por sus enseñanzas y amistad brindada.

A los profesores de la Escuela de Biología por cada uno de sus aportes a mi formación académica y científica.

A todas las personas que me apoyaron

¡Muchas gracias!

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	10
1. Objetivos.....	12
1.1. Objetivo general.....	12
1.2. Objetivos específicos.....	12
2. Marco teórico.....	12
2.1. Péptidos antimicrobianos (PAMs).....	13
2.2. Mecanismos de acción.....	14
2.2.1. Blancos intracelulares.....	15
3. Materiales y métodos	15
3.1. Cepas bacterianas y líneas celulares.....	15
3.2. Péptidos.....	16
3.3. Reactivos.....	17
3.4. Modelación estructural de los péptidos.....	17
3.5. Ensayos de actividad antimicrobiana.....	17
3.6. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida.....	18
3.7. Actividad hemolítica.....	19
3.8. Citotoxicidad en células eucariotas.....	19
3.9. Respiración de células bacterianas.....	20
3.10. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	20
3.11. Enzimas antioxidantes.....	21
3.11.1. Actividad catalasa.....	21
3.11.2. Actividad Superóxido Dismutasa (SOD).....	21
3.12. Caracterización de la morfología bacteriana.....	21
3.13. Análisis estadísticos.....	22
4. Resultados.....	22
4.1. Predicción de la estructura peptídica.....	24
4.2. Ensayos de actividad antimicrobiana.....	26
4.3. Actividad hemolítica y Actividad citotóxica.....	29
4.4. Consumo de oxígeno.....	31

4.5. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	32
4.6. Enzimas antioxidantes.....	33
4.6.1. Actividad catalasa.....	33
4.6.2. Actividad Superóxido Dismutasa (SOD).....	34
4.7. Caracterización de la morfología bacteriana.....	35
5. Discusión	36
6. Conclusión	40
Referencias bibliográficas.....	41

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de los péptidos	24
Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano (% $\pm$ SD).....	27
Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida(CMB).....	28

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 Mecanismos de acción de los PAMs.....	14
Figura 2 Estructura primaria de los péptidos.....	17
Figura 3 Resultado de modelamiento 3D peptídico.....	25
Figura 4 Actividad hemolítica.....	30
Figura 5 Citotoxicidad sobre la línea celular HepaRG.....	31
Figura 6 Consumo de oxígeno bacteriano bajo tratamiento con GAM019	32
Figura 7 Efecto del GAM019 sobre la generación de especies reactivas de oxígeno	33
Figura 8 Efecto de GAM019 en la CMI sobre la actividad catalasa	34
Figura 9 Efecto de GAM019 en la CMI sobre SOD.....	35
Figura 10 Micrografías Electrónicas de Barrido (SEM) de <i>E. coli</i> ATCC 25922 y <i>S. aureus</i> ATCC 9213.....	36

Resumen

Título: Especificidad y posible mecanismo de acción del péptido antimicrobiano GAM019 y sus análogos GAM020, GAM022 y GAM026 contra bacterias Gram positivas y Gram negativas *

Autora: Stefania Correa Duarte **

Palabras claves: Péptidos antimicrobianos (PAMS), Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB), Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), Actividad Catalasa (CAT), Actividad Superóxido Dismutasa (SOD).

Descripción: Actualmente, los efectos secundarios derivados del uso de antibióticos y la creciente resistencia bacteriana se han convertido en uno de los mayores retos para la salud. Los péptidos antimicrobianos (PAMS) son pequeñas moléculas catiónicas que hacen parte de la solución a este reto; Son generadas por el sistema inmune innato de gran variedad de organismos vivos que abarcan todos los órdenes de vida. Exhiben un amplio espectro de acción, especificidad y distintas conformaciones estructurales lo cual les facilita unirse e interactuar con las membranas celulares bacterianas generando daño interno y en su morfología. En este trabajo se evaluó la actividad y la selectividad o especificidad de cuatro PAMS sintéticos GAM019, GAM020, GAM022 y GAM026, los cuales tienen una corta cadena de 17 aminoácidos (a excepción de GAM026, el cual posee 25 aminoácidos) en su estructura primaria. Se realizaron cambios en la posición de algunos aminoácidos con el fin de variar la estabilidad de su estructura secundaria alfa hélice y evaluar el efecto en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se encontró que estos péptidos actúan en ambos grupos de bacterias y presentaron baja actividad citotóxica en línea celular HepaRG y baja actividad hemolítica en glóbulos rojos. El péptido GAM019 exhibió mayor potencial antibacteriano, con Concentración Mínima Inhibitoria de 15.1 y 26.9 μM para *Staphylococcus aureus* ATCC 9123 y *Escherichia coli* ATCC 95222, respectivamente. También se encontró que GAM019 genera cambios en la morfología bacteriana, afecta la respiración bacteriana y promueven la formación de Especies Reactivas de Oxígeno. Estos resultados sugieren que la estructura de alfa hélice es clave para la actividad antimicrobiana que presentan los péptidos. GAM019 es el péptido con mayor porcentaje de helicidad y a su vez quien presentó actividad antimicrobiana significativa a diferencia de los otros péptidos. Lo anterior, convierte a GAM019 en un buen candidato para ser usado como un antimicrobiano de amplio espectro.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología Director: Dr. Mauricio Urquiza Martínez. Codirectora: Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez.

Abstract

Title: Specificity and possible mechanism of action of the antimicrobial peptide GAM019 and its analogues GAM020, GAM022 and GAM026 against Gram positive and Gram-negative bacteria*

Author: Stefania Correa Duarte **

Keywords: Antimicrobial peptides (PAMS), Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (CMB), Reactive Oxygen Species (ROS), Catalase activity (CAT), Superoxide Dismutase Activity (SOD).

Description: Currently, the side effects derived from the use of antibiotics and the growing bacterial resistance have become one of the greatest challenges for health.

Antimicrobial peptides (PAMs) are small cationic molecules that are part of the solution to this challenge; They are generated by the innate immune system of a great variety of living organisms that cover all orders of life. They exhibit a wide spectrum of action, specificity, and different structural conformations, which makes it easier for them to join and interact with bacterial cell membranes, generating internal damage and in their morphology.

In this work, the activity and selectivity or specificity of four synthetic PAMs GAM019, GAM020, GAM022 and GAM026, which have a short chain of 17 amino acids (with the exception of GAM026, which has 25 amino acids) in their primary structure, were evaluated. Changes were made in the position of some amino acids in order to vary the stability of their alpha helix secondary structure and to evaluate the effect on Gram positive and Gram-negative bacteria. These peptides were found to act on both groups of bacteria and showed low cytotoxic activity in HepaRG cell line and low hemolytic activity in red blood cells. The GAM019 peptide exhibited the highest antibacterial potential, with a Minimum Inhibitory Concentration of 15.1 and 26.9 μM for *Staphylococcus aureus* ATCC 9123 and *Escherichia coli* ATCC 95222, respectively. It was also found that GAM019 generates changes in bacterial morphology, affects bacterial respiration and promotes the formation of Reactive Oxygen Species. These results suggest that the alpha helix structure is key to the antimicrobial activity of peptides. GAM019 is the peptide with the highest percentage of helicity and, in turn, the one that presented significant antimicrobial activity unlike the other peptides. This makes GAM019 a good candidate for use as a broad-spectrum antimicrobial.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología Director: Dr. Mauricio Urquiza Martínez. Codirectora: Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez.

Introducción

En los últimos años, la rápida propagación de infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos convencionales se ha convertido en un gran problema para la salud pública (Alós, 2015). La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro de Control y prevención de Enfermedades (CDC), han reportado que las infecciones generadas por bacterias resistentes son amenaza clínica mundial y hacen parte de una de las principales causas de mortalidad en diferentes partes del mundo (CDC, 2011; Woolhouse *et al.*, 2016; World Health Organization, 2017).

Bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* causan infecciones en el sistema nervioso central, neumonía e infecciones en el tracto urinario (Vanegas, 2017). Más del 60% de todos los *Staphylococcus aureus* aislados reportados en las unidades de cuidados intensivos de los hospitales han exhibido resistencia a antibióticos existentes como las penicilinas y a otros antimicrobianos β -lactámicos (Rodríguez-Rojas, 2013). Bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o bacterias del género *Salmonella* (Kousouli, 2019; de Frutos *et al.*, 2019; Adu-gyamfi, 2019; Tabak *et al.*, 2019; Tangail, 2020), producen enfermedades peligrosas como la meningitis, originando altas tasas de mortalidad en diferentes partes del mundo. También han exhibido resistencia a múltiples fármacos como fluoroquinolonas o ciprofloxacina. Dado el continuo incremento de bacterias resistentes a los antibióticos convencionales, es necesario que se realicen mejoras en las terapias actuales y se identifiquen nuevas moléculas con acción antibiótica potente. Los péptidos antimicrobianos (PAMs), son moléculas pequeñas que se destacan por generar mínima resistencia en patógenos en comparación con los antibióticos comunes y poseen actividad de amplio espectro (Yeaman, 2003). Son sintetizados por gran variedad de organismos vivos, son considerados parte de la inmunidad innata de los huéspedes

(Linde *et al.*, 2009), exhiben gran actividad antimicrobiana frente a una amplia gama de microorganismos (Andreu, 1985; Linde, 2009; Zasloff, 2019) y pueden contener estructuras secundarias de todo tipo: Hélices, hojas β , regiones extendidas y de bucle (Wang, 2010).

Se ha demostrado que los PAMs de carácter catiónico poseen la capacidad de permeabilizar las paredes y las membranas bacterianas, debido a la interacción facilitada por el potencial eléctrico generado por los fosfolípidos aniónicos expuestos en la superficie (Texeira, 2012; Sohlenkamp, 2015). Por otra parte, el modo en que actúan los PAMs para inducir muerte celular se encuentra asociado a diferentes eventos como daños en la estructura externa del microorganismo, blancos intracelulares como proteínas, lípidos y ADN (Marcos & Gandía, 2009; Teixeira *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2014) y también mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) generando estrés oxidativo en las bacterias (Kohanski *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2019).

En la búsqueda de encontrar nuevos péptidos con actividad antimicrobiana, en este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de cuatro nuevos péptidos análogos a GIBIM-P5 (Cruz *et al.*, 2017). GAM019, GAM020, GAM022 y GAM026, son péptidos que tienen una corta cadena de 17 aminoácidos (a excepción de GAM026, el cual posee 25 aminoácidos) en su estructura primaria. Se realizaron cambios en la posición de algunos aminoácidos con el fin de variar la estabilidad de su estructura secundaria alfa hélice. En este trabajo se presenta la actividad antimicrobiana de los cuatro péptidos en cepas Gram positivas y Gram negativas y un posible mecanismo de acción del péptido que mejor presente actividad frente a estas bacterias.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

- Determinar la selectividad o especificidad de cuatro péptidos con potencial antimicrobiano en bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas.

1.2. Objetivos específicos

- Identificar la selectividad del péptido GAM019 y sus análogos GAM020, GAM022 y GAM026 en cepas Gram positivas y Gram negativas.
- Evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida *in vitro* del péptido GAM019 y sus análogos GAM020, GAM022 y GAM026 en cepas Gram positivas y Gram negativas.
- Evaluar citotoxicidad y actividad hemolítica *in vitro* sobre células eucariotas del péptido GAM019 y sus análogos GAM020, GAM022 y GAM026.
- Determinar el posible mecanismo de acción del péptido antimicrobiano que presente inhibición >90% en las cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

2. Marco teórico

Las bacterias son microorganismos unicelulares que cuentan con una membrana celular que posee una bicapa lipídica que rodea por completo la célula. Aquí los lípidos son la base estructural

fundamental y permiten que esta funcione como una gran barrera de permeabilidad. Son el principal blanco de acción de los PAMs, en donde la interacción péptido membrana es facilitada por el potencial eléctrico generado por los lípidos aniónicos expuestos en la superficie de la membrana y el carácter catiónico de los PAMs (Teixeira *et al.*, 2012). De acuerdo con las diferencias químicas y estructurales que existen en la pared celular, las bacterias se clasifican en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas. Las diferencias en la composición de la membrana podrían explicar la efectividad de los PAMs frente a estas. Las bacterias Gram negativas poseen dos membranas; una externa la cual es una bicapa lipídica, que está compuesta por fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS), ácido lipoteicoico (LTA) y adicionalmente, una membrana citoplasmática rodeada de una pared celular compuesta de peptidoglicano, la cual tiene en común con las bacterias grampositivas siendo más gruesa en ellas. Además, en las bacterias grampositivas la pared celular está compuesta por ácidos teicoicos y su principal componente lipídico es el fosfatidilglicerol (PG) (Malanovic & Lohner, 2016).

2.1. Péptidos antimicrobianos (PAMs)

Los PAMs son oligopéptidos sintetizados por el sistema inmune de organismos vivos que abarcan todos los órdenes de vida. (Linde *et al.*, 2009; Galdiero *et al.*, 2015). Se caracterizan por tener bajo peso molecular (<10 kDa), una corta cadena de aminoácidos (aa), presentar carga neta catiónica, contar con diferentes conformaciones secundarias, poseer estructuras anfipáticas y baja aptitud para generar resistencia. Además, muestran actividad de amplio espectro, lo que los hace eficaces frente a diferentes grupos de bacterias Gram positivas y Gram negativas, parásitos, hongos y células cancerígenas (Li *et al.*, 2012; Zhang & Gallo, 2016).

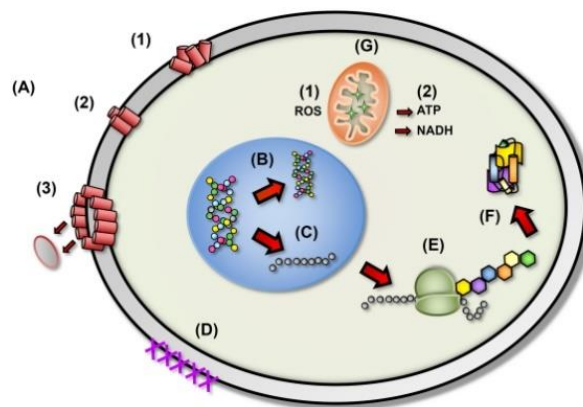
Con base en su estructura secundaria, los PAMs se agrupan en β -laminados, α -helicoidales, loops y péptidos extendidos (Epand & Vogel, 1999). Se han realizado estudios que relacionan la actividad de los PAMs con respecto a su estructura secundaria (Andrä *et al.*, 2008; Povey *et al.*, 2008).

2.2. Mecanismos de acción

El carácter anfipático que poseen algunos péptidos hace que sea de mayor facilidad la inserción por atracción electrostática en las superficies de las paredes polianiónicas y membranas fosfolipídicas de los microorganismos (Hale & Hancock, 2007). Se han propuesto modelos que explican los mecanismos de disrupción en las membranas celulares. Estos modelos son: Modelo de ruptura por barril, poro toroidal, alfombra, canal agregado y mecanismo de dianas intracelulares (Brogden, 2005; Hale & Hancock, 2007; Nicolas, 2009; Raheem & Straus, 2019) (Figura 1).

Figura 1

Mecanismos de acción de los PAMs. (A) Disrupción de la membrana celular: (1) Modelo toroidal, (2) Modelo ruptura por barril, y (3) Modelo alfombra. (B) Inhibición de la síntesis de ADN. (C) Bloqueo de la síntesis de ARN. (D) Inhibición de las enzimas usadas para unir las proteínas estructurales de la pared celular. (E) Inhibición de la función ribosomal y la síntesis de proteínas. (F) Bloqueo de chaperonas necesarias para el plegamiento adecuado de las proteínas. (G) Dirigido a las mitocondrias: (1) inhibición de la respiración celular e inducción de formación de ROS y (2) alteración de la integridad de la membrana celular mitocondrial y flujo de salida de ATP y NADH (Peters *et al.*, 2010).



El modelo ruptura por barril se caracteriza por la unión de péptidos a la membrana en forma de barril en donde la parte hidrofóbica del péptido se une con la región del núcleo del lípido y la parte hidrofílica constituye la región interna del poro generando salida del material intracelular del microorganismo. Por otra parte, el modelo por poro toroidal, los péptidos se insertan en las capas de lípidos generando un poro el cual conllevará a la muerte del microorganismo. Asimismo, el modelo de alfombra se caracteriza porque los péptidos se agrupan en la superficie orientándose de forma paralela hacia la membrana debido a la atracción que se genera entre estos y los fosfolípidos de membrana formando micelas que conllevan a la desintegración de la membrana (Hale & Hancock, 2007; Raheem & Straus, 2019).

2.2.1. Blancos intracelulares

Se ha propuesto que los PAMs pueden afectar blancos intracelulares como la síntesis de proteínas o de ADN (afectando procesos de transcripción y replicación). También podrían afectar la respiración celular e inducir de la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y generar la inactivación de importantes procesos metabólicos (Scocchi *et al.*, 2016).

3. Materiales y métodos

3.1. Cepas bacterianas y líneas celulares

Staphylococcus aureus ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron adquiridas comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. aureus* Resistente a la Meticilina, *E. coli* O157:H7, *Bacillus cereus* y aislados clínicos de *E. coli* CMPUJ033 y CPUJ034 fueron

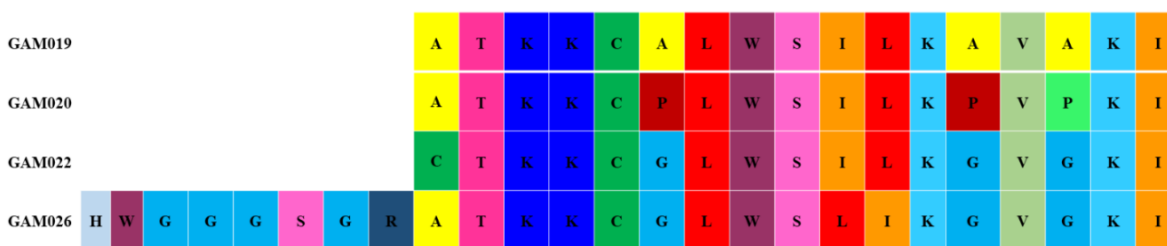
adquiridas del cepario de microorganismos de la Universidad Pontifica Javeriana (UPJ). Estas cepas se mantuvieron a -70°C en glicerol al 10%. La línea celular de hepatocitos humanos HepaRGTM fue adquirida comercialmente de GIBCo.

3.2. Péptidos

Los péptidos GAM019, GAM020, GAM022 y GAM026 fueron sintetizados, purificados y caracterizados por el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander, por la Química Yenny Paola Bautista para su trabajo de grado. Su estructura primaria se presenta en la figura 2. Los péptidos se sintetizaron mediante síntesis química utilizando la estrategia F-MOC siguiendo a Houghten (1985) para la síntesis de múltiples péptidos. El porcentaje de pureza fue mayor al 90% y se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en un cromatógrafo modelo Agilent 1100 usando una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 ($4.6 \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) y fases móviles de acetonitrilo y agua tipo I, ambas con 0.1 % TFA.

Para facilitar el entendimiento de las diferencias de la estructura primaria de los péptidos a continuación se presenta un código de colores, en donde se evidencia las diferencias de la estructura primaria de los péptidos analizados (Figura 2).

Estructura primaria de los péptidos



Los medios de cultivo Luria Bertani (LB), Mueller Hinton (MH), Infusión-Cerebro-Corazón (BHI) e isopropanol fueron adquiridos de Merck Millipore. El medio para cultivo celular William's, Glutamax, solución de 50% glutaraldehído grado I, Diacetato de 2',7'-Diclorofluoresceína DCFH-DA, Metosulfato de fenazina (PMS) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El Suero fetal bovino (SFB) libre de micoplasma fue adquirido de Lab G&M.

La modelación de la estructura de cada uno de los péptidos se realizó mediante el servidor en línea I-TASSER (Yang J *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017) y visualizados en Chimera (Pettersen EF *et al.* 2004).

3.5. Ensayos de actividad antimicrobiana

Todos los ensayos se realizaron a partir de un inóculo estandarizado en el que una única colonia de una placa de agar BHI fue cultivada en medio LB o MH (según correspondiera) durante 12 h a 37 °C con agitación constante a 200 rpm. Posteriormente, se realizó dilución en medio para ajustar la suspensión bacteriana a $\approx 5 \times 10^4$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de acuerdo con la escala de McFarland (DO_{595nm} 0.07-0.1).

3.6. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por medio del método de microdilución en caldo, mediante cinética de crecimiento basado en el protocolo del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) con algunas modificaciones (CLSI, 2012) (Cruz, 2017). Brevemente, se inocularon colonias individuales de bacterias en medio LB o MH según correspondiera y se cultivaron durante toda la noche a 37 °C. Se evaluaron por triplicado diferentes concentraciones de péptido 2-30 μ M a 37 °C durante 8 h, mediante lecturas de DO a 595 nm utilizando un lector de absorbancia de microplacas iMark (Bio-Rad Laboratories, EE. UU.). La CMI₉₉ corresponde a la dosis que inhibió el 99% del crecimiento de la población bacteriana.

Después de seguir la cinética del crecimiento y con la finalidad de determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB), se tomó una alícuota de 100 μ L de cada pozo en donde la DO fue alrededor de 0.02 después del tratamiento con los péptidos y se incubaron en 900 μ L de medio BHI en microtubos a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10 μ L de cada tubo y se sembraron en placas de agar BHI dejando en incubación toda la noche a 37 °C. La CMB fue la concentración de péptido que no produjo crecimiento de UFC.

3.7. Actividad hemolítica

La actividad hemolítica de los péptidos sobre los eritrocitos humanos se determinó siguiendo el método de Reed y Yalkowsky (1987) con algunas modificaciones. Los eritrocitos se lavaron y se resuspendieron con PBS 1X pH;7.2 y se usaron al 1 % v / v. Se incubaron 100 µL de los eritrocitos con cuatro concentraciones diferentes de los péptidos, 16 µM a 128 µM, en una microplaca de 96 pocillos durante 4 h a 37 °C. La absorbancia del sobrenadante se midió a 550 nm usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific. Los eritrocitos en 1X PBS se usaron como control negativo (0% de hemólisis) y los eritrocitos tratados con 0.5% de Tritón X-100 se usaron como control positivo (100% hemólisis).

El porcentaje de hemólisis se calculó de la siguiente forma:

$$\%_{hemólisis} = \frac{(A_s - A_0)}{(A_{100} - A_0)} \times 100$$

Donde A_s es absorbancia de la muestra, A_{100} es absorbancia del control del positivo y A_0 es absorbancia del control negativo.

3.8. Citotoxicidad en células eucariotas

La citotoxicidad se determinó mediante la incubación con rojo neutro (Repetto, 2008). Las células HepaRG se cultivaron en Medio Williams suplementado con Glutamax, SFB al 10 % y estreptomicina 100 µg/mL a 37 °C bajo atmosfera de 5% de CO₂. 2×10^4 células/pozo se sembraron en una microplaca de 96 pocillos y se incubaron durante aproximadamente 24 h. Pasado este tiempo, las células se trataron con cada péptido en concentraciones entre 16-128 µM, durante 24 horas. Posteriormente, se añadieron 10 µL de rojo neutro por pocillo y se incubaron en las

mismas condiciones durante 2 h. Finalmente, las células se lavaron tres veces con PBS, y se lisaron con una solución acuosa compuesta de 50% etanol y 1% ácido acético. La absorbancia del sobrenadante se midió a 540 nm en un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO de Thermo Scientific. Las células sin tratamiento se usaron como control negativo (100% viabilidad).

3.9. Respiración de células bacterianas

El consumo de oxígeno se determinó siguiendo a Vesga *et al.*, (2014) con algunas modificaciones utilizando un electrodo de tipo Clark conectado a un sistema Oxygraph Plus (Hansatech Instruments Ltd., Inglaterra), en una cámara con camisa de agua controlada por termostato cerrado de 1.3 mL con 60% de agitación magnética. Los triplicados de los cultivos bacterianos se incubaron durante 1 h a 37 °C en condiciones de aireación antes del ensayo. El consumo de oxígeno bacteriano se midió directamente en la suspensión de caldo a 37 °C durante aproximadamente 10 min. El tratamiento con el péptido con menor MIC, se realizó 2 min después de que comenzara la medición. Los resultados fueron expresados en nmol de O₂ consumido/min.

3.10. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS) se determinaron siguiendo el método de Min *et al.* (2011) con mínimas modificaciones con base en la conversión oxidativa del Diacetato de 2',7'-Diclorofluoresceína (DCFH-DA) a diclorofluoresceína fluorescente (DCF) en la reacción con radicales hidroxilo o peróxido de hidrógeno. Brevemente, se incubaron bacterias en fase exponencial con DCFH-DA 50 µM a 37 °C durante 30 min en la oscuridad. Posteriormente, las bacterias se lavaron tres veces con 1x PBS (pH 7.2). La intensidad de la señal fluorescente de DCF

se detectó mediante cinética de crecimiento durante 120 min a 37 °C en un lector de microplaca Híbrido Multi-Modal Synergy H1 de BioTek a una longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 535 nm. Las bacterias fueron tratadas con el péptido con menor MIC y H₂O₂ 1.6 mM (control positivo).

3.11. Enzimas antioxidantes

3.11.1. Actividad catalasa

La actividad catalasa fue seguida mediante una disminución en la absorbancia a 240 nm según lo propuesto por Aebi (1984). El sistema de reacción estaba constituido por 50 mM tampón fosfato (pH 7.0) y 49.8 µg / ml de proteína. La reacción se inició mediante la adición de 10 mM H₂O₂ y se monitoreó durante 5 min. Los resultados se expresaron con relación con control y se calcularon considerando el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ (39.4 M⁻¹ cm⁻¹).

3.11.2. Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)

La actividad SOD fue evaluada según el método propuesto por Nishikimi *et al.*, (1972) con algunas modificaciones. El sistema de reacción se mantuvo a temperatura ambiente y consistió en 10 mM TRIS-HCl (pH 8.0), 340 µM NADH, 7.2 µM NBT, 30 µM PMS y una cantidad de proteína bacteriana suficiente para inhibir la reducción de NBT en un 50%. La reacción se inició mediante la adición de NADH y se controló a 560 nm durante 2 min. Los resultados se expresaron como porcentajes en relación con el control.

3.12. Caracterización de la morfología bacteriana

El efecto del tratamiento del péptido en la CMI en la morfología bacteriana se evaluó por microscopia electrónica de barrido (SEM). Se cultivaron las bacterias hasta fase exponencial a 37 °C y fueron tratadas con el péptido GAM019. Seguido a esto, las bacterias en suspensión fueron fijadas en una lámina cubre objetos con glutaraldehído 2,5% durante 2 h. Además, se realizó deshidratación con una serie graduada de isopropanol (15, 50, 75 y 100%) durante 5 min (Alves, 2010). Finalmente, cada lámina fue analizada en un Microscopio Electrónico de Barrido FEG (Field Emission Gun) QUANTA FEG 650.

3.13. Análisis estadísticos

Todos los resultados se presentan como promedios de valores derivados de tres experimentos independientes, utilizando triplicado de cada experimento. Las barras de error representan $\pm$ desviación estándar de la media. La significancia estadística de las diferencias entre las muestras y los respectivos controles se determinó mediante Análisis de Varianza (ANOVA); los valores se consideraron significativos cuando $P < 0.05$.

4. Resultados

En la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana que ayuden a combatir microorganismos resistentes a antibióticos, en el grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología se diseñaron cuatro péptidos (Tabla 1) con base en GIBIM-P5 (ATKKCGLFSILKGVGKI), reportado previamente en la literatura (Cruz *et al.*, 2017). La síntesis y caracterización de estos péptidos estuvo a cargo de la Química Yenny Paola Bautista para su

trabajo de investigación de pregrado para obtener el título de Química (2018). A continuación, se describen los cambios estructurales que se hicieron, con el fin de estudiar la relación de la estructura secundaria de alfa hélice de los péptidos con su actividad antimicrobiana.

GIBIM-P5 presenta 17 aminoácidos y una estructura secundaria de alfa hélice con contenido helicoidal del 23% (Cruz *et al.*, 2017). GAM019 posee una estructura alfa hélice más definida y estable al realizar cambios del aminoácido Gly por Ala y de Phe por Trp. A partir de este péptido, se crearon tres péptidos análogos a los cuales se les realizaron cambios en la posición de algunos aminoácidos obteniendo variaciones en su estructura secundaria.

En GAM020 se cambiaron Ala por Pro en los aminoácidos seis, trece y quince. Estos cambios inducen rigidez en la estructura disminuyendo la estabilidad que ayuda a la formación de la alfa hélice (Suh *et al.*, 1999; Vermeer *et al.*, 2012).

En GAM022, se cambió Ala por Cys y GAM026 contiene en la parte inicial de la estructura una corta cadena de 8 aminoácidos como lo son Gly, His, Trp, Ala y Ser, los cuales hacen parte de una toxina polipéptido llamada Colicinas, las cuales son producidas por algunas bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y especies de *Salmonella* y son liberadas al medio para reducir la competencia por otras bacterias (Lazdunski *et al.*, 1998; Cascales *et al.*, 2007). La caracterización fisicoquímica de los péptidos se encuentra registrada en la Tabla 1.

Tabla 1*Caracterización fisicoquímica de los péptidos*

Péptido	Secuencia	Numero de aminoácidos	Peso molecular	Carga neta a pH 7.0	Punto Isoeléctrico (PI)	Índice de inestabilidad	Promedio de hidropática (GRAVY)
GIMBIM- P5*	ATKKCGLFSILKGVGKI	17	1763.22	4	10.4	-4.23	0.56
GAM019	ATKKCALWSILKAVAKI	17	1844.34	4	11	24.68	0.73
GAM020	ATKKCPLWSILKPVPKI	17	1922.45	4	10.6	54.24	0.13
GAM022	CTKKCGLWSILKGVGKI	17	1834.32	4	10.2	28.88	0.38
GAM026	HWGGGSGRATKKCGLWSLIKGVGKI	25	2597.09	4	11	6.6	0.204

* Base de diseño de péptidos (Cruz et al., 2018)

4.1. Predicción de la estructura peptídica

Con el fin de visualizar la estructura del péptido GAM019 y sus análogos, se realizó el modelamiento de cada uno de los péptidos. Los resultados mostraron que todos los péptidos presentan estructura de alfa hélice anfipática a diferencia de GAM020, en el cual se introdujeron prolina para evitar la formación de la alfa hélice.

Figura 3

Resultado de modelamiento 3D peptídico. A) GAM019, B) GAM020, C) GAM022 y C) GAM026. Las imágenes fueron generadas por el servidor I-TASSER (J Yang et al. 2015; C Zhang et al. 2017).

A**B**

C



D



4.2. Ensayos de actividad antimicrobiana

Con el fin de determinar la especificidad de péptido GAM019 y sus análogos, se usaron 5 cepas Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 y aislados clínicos de *Escherichia coli* CMPUJ033 y CMPUJ034) y 5 cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* Resistente a la Meticilina y *Bacillus cereus*).

Los resultados mostraron que todos los péptidos a una concentración de 50 μ M poseen actividad antibacteriana frente ambos grupos de bacterias (Tabla 2). El péptido GAM019 fue el más activo presentando porcentajes de inhibición >80 % contra todas las cepas evaluadas. Sin embargo,

GAM022 y GAM026; poseen porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano >50 % en cepas como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus saprophyticus* y aislado clínico de *Escherichia coli* CMPUJ033. No obstante, en cepas como *Escherichia coli* O157:H7 GAM020, GAM022 y GAM026 presentan inhibición del crecimiento <50 % (Tabla 1). Los resultados obtenidos, muestran que la estructura secundaria tipo alfa hélice de los péptidos juegan un papel importante en la actividad frente a las bacterias. Esto se puede evidenciar, al comparar la actividad que tienen todos los péptidos que poseen esta estructura (GAM019, GAM022 y GAM026) con quien no la posee como es el caso de GAM020 (Bautista, 2018).

Teniendo en cuenta los resultados de actividad antimicrobiana el péptido GAM019 se presenta como un péptido de amplio espectro, los siguientes ensayos se realizaron en solo dos bacterias una Gram negativa y una Gram positiva (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*). Estas bacterias se escogieron teniendo en cuenta que hacen parte de la lista de la OMS como patógenos que requieren con urgencia nuevos tratamientos antibióticos (World Health Organization, 2017).

Al analizar la concentración mínima inhibitoria (CMI₉₉), se obtuvo que GAM019 posee una CMI₉₉ de 28.6 µM para *Escherichia coli* ATCC 25922 y 15.1 µM frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Los péptidos análogos GAM020, GAM022 y GAM026 presentaron una CMI₉₉ > 40 µM frente ambas cepas (Tabla 3). Por otra parte, la CMB de GAM019 para *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 30 µM y 16 µM para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Sin embargo, para los péptidos análogos GAM020, GAM022 y GAM026 CMB >100 µM.

Tabla 2

Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano (% ± SD)

	Péptidos			
Microorganismos	GAM019	GAM020	GAM022	GAM026
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 ± 0.08	42.29 ± 0.03	39.54 ± 0.06	100 ± 0.004
<i>Escherichia coli</i> O157H7	98.97 ± 0.02	47.68 ± 0.02	24.51 ± 0.02	39.49 ± 0.04
SARM	95.52 ± 0.02	34.85 ± 0.03	42.93 ± 0.002	63.12 ± 0.02
CMPUJ033	100 ± 0.007	35.19 ± 0.007	99.68 ± 0.004	92.41 ± 0.01
CMPUJ034	98.56 ± 0.03	31.17 ± 0.03	7.15 ± 0.03	100 ± 0.005
<i>Escherichia coli</i> ATCC 23922	100 ± 0.01	30.49 ± 0.02	100 ± 0.09	26.31 ± 0.04
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	100 ± 0.03	17.66 ± 0.004	25.64 ± 0.003	79.61 ± 0.006
<i>Staphylococcus saprofiticus</i>	92.85 ± 0.008	63.33 ± 0.06	100 ± 0.006	100 ± 0.02
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100 ± 0.005	13.99 ± 0.02	2.8 ± 0.005	100 ± 0.02
<i>Bacillus cereus</i>	97.23 ± 0.08	31.5 ± 0.005	100 ± 0.008	100 ± 0.003

Tabla 3

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Péptido	<i>Escherichia coli</i> ATCC 23922		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	
	CMI ₉₉ (µM)	CMB (µM)	CMI ₉₉ (µM)	CMB (µM)
GAM019	28.61	30	15.11	16

GAM020	144.44	>100	238.06	>100
GAM022	109.74	>100	67.94	>100
GAM026	45.70	>100	58.93	>100

4.3. Actividad hemolítica y Actividad citotóxica

Con el fin de determinar el grado de citotoxicidad *in vitro* de cada uno de los péptidos, se usaron células eucariotas y eritrocitos. El grado de citotoxicidad, se midió mediante ensayos de actividad hemolítica y actividad citotóxica *in vitro*.

La figura 3 muestra que a una concentración de 128 μM , los péptidos no exhiben actividad hemolítica significativa. GAM019 generó 26% de hemólisis en los eritrocitos, GAM020 1.8%, GAM022 9.7% y GAM026 de 34%. Sin embargo, en concentraciones de 16 μM , la hemólisis generada por todos los péptidos fue < 5% en comparación con 0.5% de Triton-X100 (control positivo) el cual generó 100% de hemólisis.

Por otra parte, el porcentaje de citotoxicidad de los péptidos a concentración de 128 μM en la línea celular HepaRG fue de 60.52% para GAM019 (siendo esta concentración 4 veces mayor que CMI para *E. coli* y 8 veces mayor para la CMI de *S. aureus*), 6.14% para GAM020, 55.84% para GAM022, 59.06% para GAM026. Aun a una concentración de 64 μM , el grado de citotoxicidad no es significativamente alto.

El GAM020 quien no posee una estructura de alfa hélice anfipática definida, genera baja actividad hemolítica y citotóxica a diferencia de los otros péptidos (Bautista, 2018).

En general, el efecto hemolítico o citotóxico dependía de la dosis del péptido; y las concentraciones a las cuales estos péptidos presentaron efecto citotóxico fueron significativamente más altas que la CMI contra las cepas bacterianas estudiadas.

Figura 4

*Actividad hemolítica. Actividad hemolítica. Eritrocitos al 1% en PBS 1x pH 7.2, fueron incubados con los péptidos en concentraciones de 16 hasta 128 μ M. El control de hemólisis fue 1% de tritón X-100. El 100% corresponde a 0.125 ± 0.01 abs. * Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en comparación con el control.*

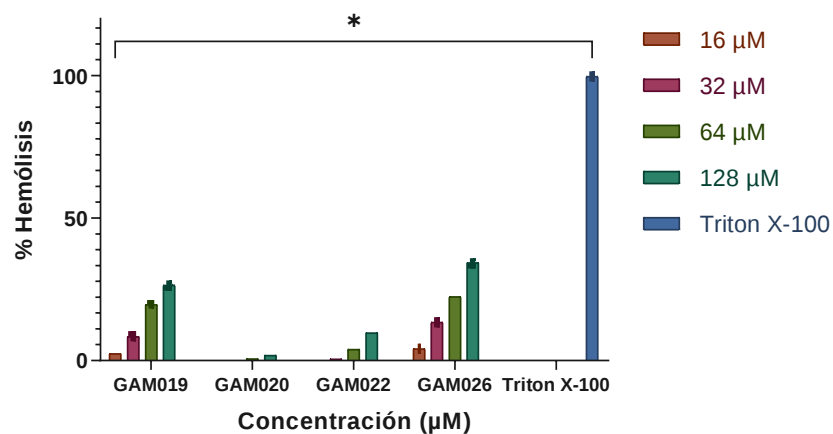
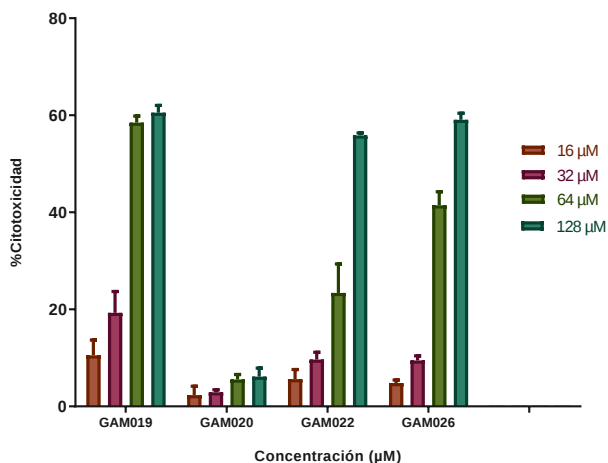


Figura 5

Citotoxicidad sobre la línea celular HepaRG. Las células fueron incubadas con los péptidos en concentraciones de 16 hasta 128 μM . El control de citotoxicidad fueron células sin tratamiento. $P < 0.05$ en comparación con el control.



Por otra parte, considerando los resultados de CMI y CMB obtenidos para los péptidos y con el fin de evaluar su efecto sobre el metabolismo bacteriano se decidió continuar este estudio solo con GAM019 usando la CMI encontrada para cada cepa.

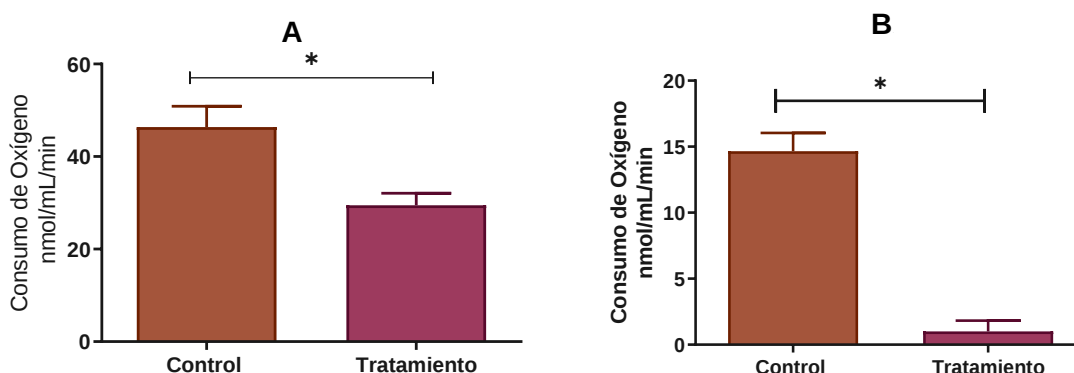
4.4. Consumo de oxígeno

Se determinó la capacidad respiratoria de las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en presencia del péptido GAM019 con el fin de establecer si el péptido afecta la capacidad metabólica de las bacterias. Se observó que la velocidad de respiración de *Escherichia coli* ATCC 25922 antes del tratamiento es de 46.3 nmol /mL /min y después del tratamiento con GAM109 es de 29.5 nmol /mL /min (Figura 6). Se encontró que para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 la velocidad de respiración en ausencia de tratamiento es de 14.7 nmol /mL /min y después del tratamiento 1.0 nmol /mL /min (Figura 5B).

Las dos cepas bacterias disminuyen su capacidad de respiración celular (63.6% en *E. coli* ATCC y 6.9% en *S. aureus*) en presencia de GAM019. Esto podría sugerir que el metabolismo y en particular la cadena respiratoria está siendo afectada por el péptido y esto podría verse reflejado en la capacidad para producir ATP de estas cepas (Wenzel *et al.*, 2014).

Figura 6

Consumo de oxígeno bacteriano *bajo tratamiento con GAM019*. A. Tasa de consumo de oxígeno de la respiración de, CMI *E. coli* ATCC 25922 antes y después tratamiento con GAM019 en la CMI. B. Tasa de consumo de oxígeno de la respiración de *S. aureus* ATCC 9213 antes y después tratamiento con GAM019 en la. * $P < 0.05$ frente al tratamiento.



4.5. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

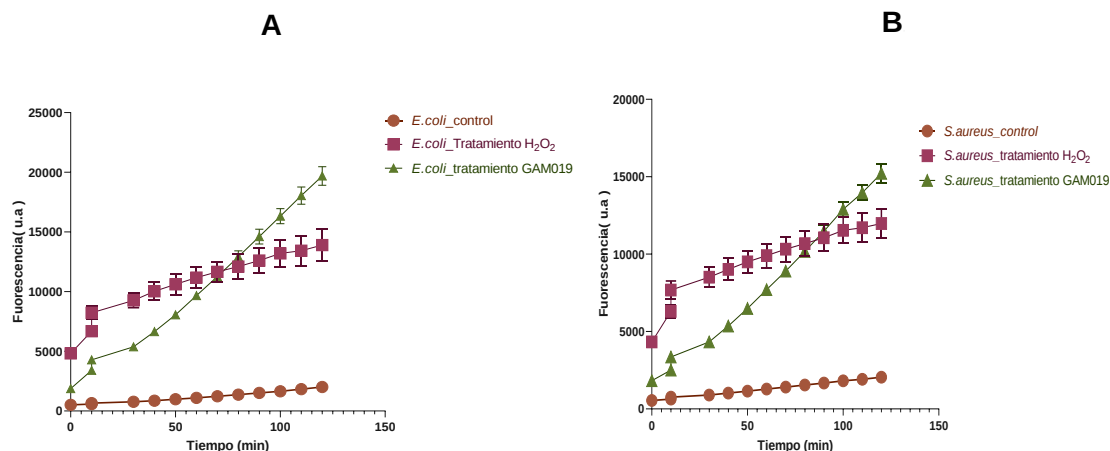
Teniendo en cuenta que muchos de los fármacos que inhiben la cadena respiratoria también inducen estrés oxidativo (Van Acker *et al.*, 2016) se evaluó la capacidad del péptido GAM019 de generar especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre dos enzimas antioxidantes.

La capacidad de generación de ROS se analizó usando DCFH-DA. Para ello se cuantificaron los niveles de ROS generadas en las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus*

ATCC 29213 antes y después del tratamiento con GAM109 a la CMI. En la Figura 6, se puede observar que los niveles de ROS registrados fueron mayores en *Escherichia coli* ATCC 25922 a diferencia de registrados en *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, en contraste con el control positivo (H_2O_2 1.6 Mm).

Figura 7

Efecto del GAM019 sobre la generación de especies reactivas de oxígeno. A. *E. coli* ATCC 25922 fue tratada $28.61 \mu M$ y B. *S. aureus* ATCC 29213 a $16 \mu M$. Las bacterias se precargaron con sustrato DCFH-DA y se leyó la fluorescencia de DCF en los períodos de tiempo indicados usando H_2O_2 (1.6 mM) como control positivo. Los resultados representan la media $\pm$ SD del porcentaje de fluorescencia con respecto al control de tres experimentos independientes, cada uno por triplicado. Existen diferencias significativas entre los controles $p < 0.05$.



4.6. Enzimas antioxidantes

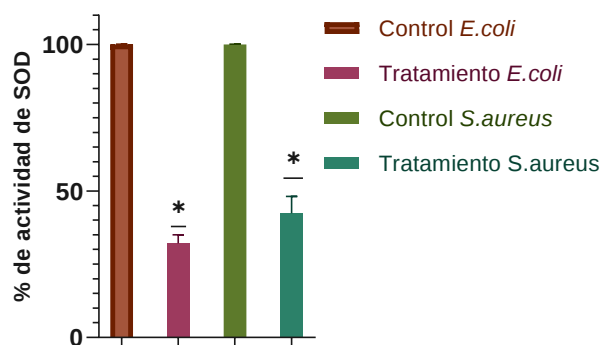
4.6.1. Actividad catalasa

Con el fin de determinar el efecto que tiene GAM019 de la actividad de la enzima catalasa, se monitoreó la descomposición de H_2O_2 en O_2 y H_2O por medio de lecturas de absorbancia a 240 nm. GAM019 en CMI inhibe la actividad catalasa de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

La disminución de esta actividad enzimática sugiere un efecto inhibitor con porcentajes de 32.14 % para *E. coli* a 28.61 μM y de 42.37 % para *S. aureus* a 16 μM concentración (Figura 8). Es decir, evita la reducción de moléculas de H_2O_2 induciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Figura 8

*Efecto de GAM019 en la CMI sobre la actividad catalasa. * Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control ($P < 0.05$).*



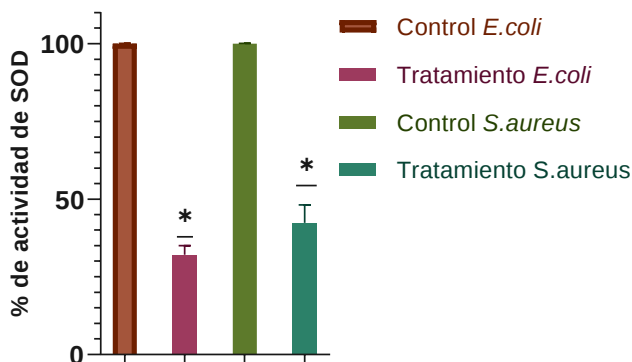
4.6.2. Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)

Con el fin de determinar el efecto que tiene GAM019 en la actividad de SOD, se monitoreó la producción de O_2^- . GAM019 a la concentración CMI en *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Los resultados muestran inhibición de SOD con porcentajes de 39.26 % para *E. coli* a 28.61 μM y de 24.31 % para *S. aureus* a 16 μM concentración (Figura 8). Es decir, la inducción de SOD es

mínima y existe un aumento considerable O_2^- ; la cual es una de las moléculas responsables de la generación de estrés oxidativo.

Figura 9 Efecto de GAM019 en la CMI sobre SOD. * *Diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control ($P < 0.05$).*

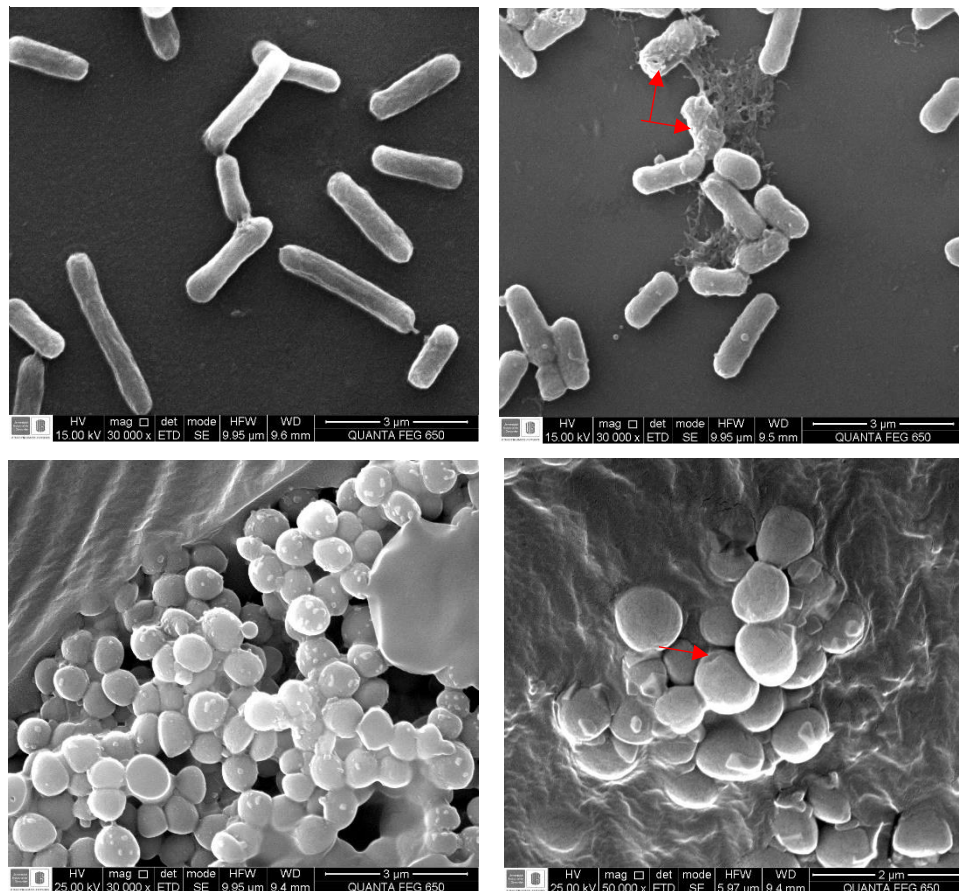


4.7. Caracterización de la morfología bacteriana

Con el fin de visualizar alteraciones o cambios en la morfología de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, se obtuvieron micrografías electrónicas. Las micrografías obtenidas indican que existen diferencias antes y después de usar GAM019 para ambos casos. Cada control refleja una superficie sin poros visibles o rupturas (Figura 10A – 10C). No obstante, al realizar tratamiento con GAM019 se logra observar en la Figura 10B y 10D, pequeñas alteraciones morfológicas sobre la envoltura celular. Estos tipos de alteración podrían estar relacionadas con el mecanismo por el cual ingresa el péptido a la célula.

Figura 10

Micrografías Electrónicas de Barrido (SEM) de E. coli ATCC 25922 y S. aureus ATCC 9213. A) Micrografía SEM de E. coli ATCC 25922 sin tratamiento B) E. coli ATCC 25922 después de 40 min de incubación con GAM019 en la CMI; C) S. aureus ATCC 9213 sin tratamiento; D) S. aureus ATCC 9213 después de 40 min de incubación con GAM019 en la CMI. Barra de escala 2- 3 μm .



5. Discusión

En la búsqueda de nuevos antibióticos, aquí se analizaron cuatro péptidos, tres con estructura alfa hélice y uno al que se le introdujeron prolinas para evitar la formación de la estructura secundaria de hélice alfa. La estructura secundaria hélice alfa anfipática de los PAMs, es una característica

importante que determina en algunos casos la actividad que estos poseen y les permiten insertarse o unirse en las membranas bacterianas indicando distintos mecanismos de acción (Hallock, 2002; Sato, 2006; Jang, 2012; Li, 2012; Mai, 2015).

GAM019 y sus análogos GAM020, GAM022 y GAM026 son nuevos péptidos antimicrobianos, con una corta cadena de aminoácidos. GAM019, GAM022 y GAM026 poseen estructura de α -hélice definida y estable a diferencia de GAM020, quien no posee este tipo de estructura estable (Figura 2). Lo anterior, se evidencio en estudios de Dicroísmo Circular (DC) realizados por Bautista (2018).

Los resultados de la prueba de actividad antibacteriana (tabla 3) mostraron que existe una relación entre la estructura secundaria de los péptidos y su potencial antibacteriano al ser más activo GAM019 quién posee una estructura estable y definida de alfa hélice (Bautista, 2018). En consecuencia, se encontraron diferencias significativas en la actividad antimicrobiana de GAM019, presentó una menor CMI₉₉ de 28.61 y 15.11 μ M para *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 9213, mientras que los análogos como GAM022 o GAM026 presentaron mayor CMI en ambas cepas (Tabla 3), esto podría estar relacionado con la menor estabilidad de la hélice en los dos últimos péptidos. GAM020 presentó una CMI de 144.44 μ M y 238.06 μ M para *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 9213, respectivamente.

La relación existente entre la actividad del péptido y su estructura secundaria de alfa hélice, ha sido reportada en la literatura para diversos péptidos en donde se evidencia que la actividad antimicrobiana es mayor cuando se tiene este tipo de estructura (Suh *et al.*, 1999; Jang *et al.*, 2012; Vermeer *et al.*, 2012; Migliolo *et al.*, 2016).

Por otra parte, la mayoría de PAMs activos, tienen altos índices de citotoxicidad en células eucariotas; factor determinante para definir su uso en aplicaciones clínicas. En este trabajo, GAM019, GAM020, GAM022 y GAM026 indujeron un bajo porcentaje de hemólisis en eritrocitos humanos y baja citotoxicidad en la línea celular HepaRG no fue significativo en las CMI determinada para péptido (Figura 4 y 5).

Ahora, al analizar la morfología celular de las bacterias tratadas con GAM019 en la CMI después de 40 min de exposición, se observa poco daño en la morfología bacteriana de *E. coli* ATCC 25922. Sin embargo, existen deformaciones en la superficie de la bacteria que se asemejan a pequeños poros en la superficie de *S. aureus* ATCC 9213(figura 10). Estos cambios se encuentran relacionados con los diferentes mecanismos de acción de los PAMs, en donde los péptidos pueden interactuar con la pared o membrana bacteriana y causar cambios en su estructura morfológica hasta ocasionar lisis celular que desencadena muerte bacteriana (Alves *et al.*, 2010).

Por otra parte, existen mecanismos de acción complementarios al daño morfológico propuestos para los péptidos. Estos mecanismos implican inhibición de la respiración celular e inducción en la formación de ROS (H_2O_2 , O_2^-) (Sharp & Secombes, 1993; Subramanian *et al.*, 2014). Altos niveles de ROS generan estrés oxidativo y resultan claves para determinar los efectos letales de los PAMS, debido a que conllevan a daño sobre macromoléculas como lípidos causando peroxidación o mutaciones en el ADN (Hardie, 2011; Kashmiri & Mankar, 2014; Ortiz de Orué Lucana *et al.*, 2012) .

Diferentes ROS tienen diferentes grados de reactividad hacia estos componentes celulares, y la disponibilidad de hierro en forma de Fe^{2+} se considera fundamental debido al papel del hierro en la reacción de Fenton (Mittler, 2017) que impulsa la formación de radicales hidroxilo. Además,

las respuestas celulares a ROS implican la acción de enzimas como la catalasa y SOD responsables de la dismutación de O_2 y la catálisis de H_2O_2 , respectivamente. Lo anterior, se encuentra asociado en diversos organismos con la supervivencia a factores que generen estrés (Martins *et al.*, 2011; Gravina, 2017; Ajiboye *et al.*, 2016).

Los resultados en la figura 8, muestra que existen diferencias significativas en la actividad de la enzima CAT con respecto al control en *E. coli* y *S. aureus*. Lo anterior sugiere que existe una reducción de H_2O_2 , lo que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto se puede considerar, como posibles respuestas bacterianas para desintoxicar los niveles elevados de ROS que están siendo producidos por la actividad del bactericida de GAM019 como se puede observar en la figura 7. Actualmente, existe en la literatura varias moléculas con actividad antibacteriana que reportan generación de ROS como mecanismo de acción (Ortiz de Orué Lucana, 2012; Kohanski, 2007).

Por otra parte, GAM019 además de inducir en la formación de ROS, también redujo la capacidad de consumo de oxígeno significativamente ($P < 0.05$) en las dos cepas evaluadas con respecto a los controles (Figura 6). Probablemente induciendo desequilibrio homeostático de la energética bacteriana generando un impacto considerable en el metabolismo (Hardie, 2011). Es decir, existe anulación de la actividad de la cadena respiratoria que posteriormente redujo la síntesis de ATP y consecutivamente la biosíntesis de macromoléculas (Wenzel *et al.*, 2014; Omardien *et al.*, 2016).

En conclusión, se logra mejorar la actividad GIBIM-P5 con los cambios estructurales realizados en GAM019. La actividad antibacteriana que poseen los péptidos se encuentra relacionada con la estabilidad de la estructura secundaria alfa hélice que estos posean. GAM019, GAM022 y GAM026 presentan actividad antimicrobiana; Sin embargo, GAM019 es más efectivo sobre

bacterias Gram positivas y Gram negativas. Asimismo, GAM019 y sus análogos no presentan citotoxicidad en eritrocitos humanos y la línea celular HepaRG significativa.

6. Conclusión

GAM020, GAM022 y GAM026 presentan actividad antimicrobiana frente a las bacterias evaluadas, no obstante, esta no es significativa en comparación con la actividad que presenta GAM019. GAM020, quien no posee estructura tipo alfa hélice, obtuvo una menor actividad antimicrobiana frente a las bacterias evaluadas.

GAM019 es un péptido de amplio espectro ya que presenta actividad antimicrobiana significativa tanto en bacterias Gram negativas y Gram positivas. En *E. coli* ATCC 25922, GAM019 induce disminución en la respiración celular, aumento en la generación de ROS e inhibición de la actividad enzimática de la catalasa, sugiriendo que su mecanismo de acción está relacionado con alteraciones metabólicas y estrés oxidativo. Por otro lado, GAM019 induce en *S. aureus* ATCC 9213 presenta los mismos efectos descritos para *E. coli*, y además inhibe la actividad de SOD y posiblemente induce la formación de poros en la membrana bacteriana., induciendo daño físico, metabólico y estrés oxidativo.

Referencias bibliográficas

- Adu-gyamfi, R., Hoosain, F., & Chetty, S. (2019). *Salmonella Typhi* – a Quiet Bacteria with a Loud Message : An ICU Case Report. *Multidisciplinary Journal of Anesthesiology and Intensive Care Medicine*, 3(2), 129–132.
- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121–126.
- Ajiboye, T. O., Aliyu, M., Isiaka, I., Haliru, F. Z., Ibitoye, O. B., Uwazie, J. N., ... Mohammed, A. O. (2016). Contribution of reactive oxygen species to (+)-catechin-mediated bacterial lethality. *Chemico-Biological Interactions*, 258, 276–287.
- Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699.
- Alves, C. S., Melo, M. N., Franquelim, H. G., Ferre, R., Planas, M., Feliu, L., ... Castanho, M. A. R. B. (2010a). *Escherichia coli* Cell Surface Perturbation and Disruption Induced by Antimicrobial Peptides BP100 and pepR *. *The Journal Of Biological Chemistry*, 285(36), 27536–27544.
- Andrä, J., Jakovkin, I., Grötzinger, J., Hecht, O., Krasnosdembskaya, A. D., Goldmann, T., ... Leippe, M. (2008). Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin. *Biochemical Journal*, 410(1), 113–122.
- Andreu, D., Steiner, H., & Boman, H. G. (1985). N-Terminal Analogues of Cecropin A: Synthesis, Antibacterial Activity, and Conformational Properties. *Biochemistry*, 24(7), 1683–1688.
- Bautista, Y. (2018). Effect of the amphipatic α -helix structure and the cysteine redox state of

GIBIM-P5 analogues on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Universidad Industrial de Santander, 1-39.

Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nat Rev Microbiol* 3, 238–250.

Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., & Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, 71(1), 158–229.

CDC drugresistance History of antibiotics. (2011).

CLSI document M07-A09. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ; Approved standard — (Vol. 32).

Cruz, J., Flórez, J., Torres, R., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., & Ortiz, C. C. (2017). Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*, 28(13).

de Frutos, M., Medina, R., Aragón, R., López-Urrutia, L., González-Sagrado, M., Ramos, C., Domínguez-Gil, M., Garcinuño, S., Viñuela, L., & Eiros, J. M. (2019). Episodios de salmonelosis no tifoidea en pacientes adultos del Área Valladolid Oeste en 2017: Evaluación de la idoneidad de la petición del cultivo microbiológico y del tratamiento pautado [Episodes of nontyphoidal salmonellosis in adult patients of the Valladolid West Area in 2017: Evaluation of the suitability of the microbiological culture request and the prescribed

- treatment]. *Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 32(3), 224–231.
- Epand, R. M., & Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1–2), 11–28.
- Galdiero, S., Falanga, A., Berisio, R., Grieco, P., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Antimicrobial Peptides as an Opportunity Against Bacterial Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 22(14), 1665–1677.
- Gravina, F., Dobrzanski, T., Olchanheski, L. R., Galvão, C. W., Reche, P. M., Pileggi, S. A., Azevedo, R. A., Sadowsky, M. J., & Pileggi, M. (2017). Metabolic Interference of sod gene mutations on catalase activity in *Escherichia coli* exposed to Gramoxone® (paraquat) herbicide. *Ecotoxicology and environmental safety*, 139, 89–96.
- Hale, J. D. F., & Hancock, R. E. W. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*.
- Hallock, K. J., Lee, D. K., Omnaas, J., Mosberg, H. I., & Ramamoorthy, A. (2002). Membrane composition determines Pardaxin's mechanism of lipid bilayer disruption. *Biophysical Journal*, 83(2), 1004–1013.
- Hardie, D. G. (2011). AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes and Development*, 25(18), 1895–1908.
- Houghten, R. A. (1985). General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(15), 5131–5135

- Hong, Y., Zeng, J., Wang, X., Drlica, K., & Zhao, X. (2019). Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(20), 10064–10071.
- Jang, S. A., Kim, H., Lee, J. Y., Shin, J. R., Kim, D. J., Cho, J. H., & Kim, S. C. (2012). Mechanism of action and specificity of antimicrobial peptides designed based on buforin IIb. *Peptides*, 34(2), 283–289.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423–435.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*, 130(5), 797–810.
- Kousouli, E., Zarkotou, O., Polimeri, K., Themeli-Digalaki, K., & Pournaras, S. (2019). Impact of bloodstream infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative pathogens on ICU costs, mortality and length of stay. *Infection Prevention in Practice*, 1(2), 100020.
- Lazdunski, C. J., Bouveret, E., Rigal, A., Journet, L., Lloubès, R., & Bénédicti, H. (1998). Colicin import into Escherichia coli cells. *Journal of Bacteriology*, 180(19), 4993–5002.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2), 207–215.
- Linde, A., Wachter, B., Höner, O. P., Dib, L., Ross, C., Tamayo, A. R., ... Melgarejo, T. (2009). Natural history of innate host defense peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1(2), 97–112.

- Mai, X. T., Huang, J., Tan, J., Huang, Y., & Chen, Y. (2015). Effects and mechanisms of the secondary structure on the antimicrobial activity and specificity of antimicrobial peptides. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, 21(7), 561–568.
- Malanovic, N., & Lohner, K. (2016). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(5), 936–946.
- Marcos, J. F., & Gandía, M. (2009). Antimicrobial peptides: to membranes and beyond. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 4(6), 659–671.
- Martins, P. F., Carvalho, G., Gratão, P. L., Dourado, M. N., Pileggi, M., Araújo, W. L., & Azevedo, R. A. (2011). Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. *Process Biochemistry*, 46(5), 1186–1195.
- Migliolo, L., Felício, M. R., Cardoso, M. H., Silva, O. N., Xavier, M. E., Nolasco, D. O., ... Franco, O. L. (2016). Biochimica et Biophysica Acta Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa -MAP2. *BBA - Biomembranes*, 1858(7), 1488–1498.
- Min, L., He, S., Chen, Q., Peng, F., Peng, H., & Xie, M. (2011). Comparative proteomic analysis of cellular response of human airway epithelial cells (A549) to benzo(a)pyrene. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 21(5), 374–382.
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19.
- Nicolas, P. (2009). Multifunctional host defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial

- peptides. *FEBS Journal*, 276(22), 6483–6496.
- Nishikimi, M., Appaji Rao, N., & Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849–854.
- Ouardien, S., Brul, S., & Zaat, S. A. (2016). Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 111.
- Ortiz de Orué Lucana, D., Wedderhoff, I., & Groves, M. R. (2012). ROS-Mediated Signalling in Bacteria: Zinc-Containing Cys-X-X-Cys Redox Centres and Iron-Based Oxidative Stress. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 1–9.
- Peters, B. M., Shirtliff, M. E., & Jabra-Rizk, M. A. (2010). Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, 6(10), 4–7.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *a* <. 2004;25(13):1605-1612.
- Povey, J. F., Howard, M. J., Williamson, R. A., & Smales, C. M. (2008). The effect of peptide glycation on local secondary structure. *Journal of Structural Biology*, 161(2), 151–161.
- Raheem, N., & Straus, S. K. (2019). Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Frontiers in Microbiology*, 10(December), 1–14.
- Reed, K. W., & Yalkowsky, S. H. (1987). Lysis of human red blood cells in the presence of various cosolvents. III. The relationship between hemolytic potential and structure. *Journal of Parenteral Science and Technology*, 41(1), 37–39.

- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131.
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., & Blázquez, J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 293–297.
- Sato, H., & Feix, J. B. (2006). Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), 1245–1256.
- Scocchi, M., Mardirossian, M., Runti, G., & Benincasa, M. (2016). Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16, 76–88.
- Sharp, G. J. E., & Secombes, C. J. (1993). The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*.
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2015). Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 133–159.
- Subramanian, M., Goswami, M., Chakraborty, S., & Jawali, N. (2014). Resveratrol induced inhibition of *Escherichia coli* proceeds via membrane oxidation and independent of diffusible reactive oxygen species generation. *Redox Biology*, 2(1), 865–872.
- Suh, J. Y., Lee, Y. T., Park, C. B., Lee, K. H., Kim, S. C., & Choi, B. S. (1999). Structural and functional implications of a proline residue in the antimicrobial peptide gaegurin. *European*

Journal of Biochemistry, 266(2), 665–674.

Tabak, Y. P., Merchant, S., Ye, G., Vankeepuram, L., Gupta, V., Kurtz, S. G., & Puzniak, L. A. (2019). Incremental clinical and economic burden of suspected respiratory infections due to multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Journal of Hospital Infection*, 103(2), 134–141.

Tangail, P., Rahman, M., Ahmed, P., Kar, A., & Sakib, N. (2020). Potential of Enterotoxigenic and Enteropathogenic. *Genetic Engineering & Biotechnology News (GEN)*, XX(Xx), 1–6.

Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149–177.

Van Acker, H., Gielis, J., Acke, M., Cools, F., Cos, P., & Coenye, T. (2016). The role of reactive oxygen species in antibiotic-induced cell death in *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *PLoS ONE*, 11(7), 1–20.

Vanegas Múnera, J. M., Ocampo Ríos, A. M., Urrego, D. M., & Jiménez Quiceno, J. N. (2017). In vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from skin and soft tissue infections to vancomycin, daptomycin, linezolid and tedizolid. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21(5), 493–499.

Vermeer, L. S., Lan, Y., Abbate, V., Ruh, E., Bui, T. T., Wilkinson, L. J., ... Mason, A. J. (2012). Conformational flexibility determines selectivity and antibacterial, antiparasitic, and anticancer potency of cationic α -helical peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34120–34133.

Vesga, L. C., Bueno, Y., Stashenko, E. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2014). Efeito do óleo

essencial de Eucalyptus citriodora sobre o metabolismo energético mitocondrial. *Revista Colombiana de Quimica*, 43(2), 10–17.

Wenzel, M., Chiriac, A. I., Otto, A., Zweytick, D., May, C., Schumacher, C., ... Bandow, J. E. (2014). Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 1409–1418

Woolhouse, M., Waugh, C., Perry, M. R., & Nair, H. (2016). Global disease burden due to antibiotic resistance - State of the evidence. *Journal of Global Health*, 6(1), 1–5.

World Health Organization. (2017). *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis*.

Retrieved from https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf?ua=1

Yang, Y Zhang. Servidor I-TASSER: nuevo desarrollo para la estructura de proteínas y predicciones de funciones, *Nucleic Acids Research*, 43: W174-W181, 2015.

Yeaman, M. R. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55.

Zasloff, M. (2019). Antimicrobial peptides of multicellular organisms: My perspective. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1117(January), 3–6.

Zhang C, Freddolino PL, Zhang Y. COFACTOR: Mejora la predicción de la función de la proteína al combinar la estructura, la secuencia y la información de interacción proteína-proteína.(2017).*Nucleic Acids Research*, 45: W291-W299

Zhang, L. J., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14–R19.

Zhu, X., Dong, N., Wang, Z., Ma, Z., Zhang, L., Ma, Q., & Shan, A. (2014). Acta Biomaterialia
Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell
selectivity. *Acta Biomaterialia*, 10(1), 244–257.