



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN “*in vitro*” DE ANÁLOGOS DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD COMO COMPUESTOS ANTITUBERCULOSOS

SANDRA MILENA CHINGATÉ LÓPEZ

Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Maestría en Ciencias Bioquímica

Línea de investigación: Interacción Hospedero-Patógeno

Bogotá, Colombia

2012

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN “*in vitro*” DE ANÁLOGOS DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD COMO COMPUESTOS ANTITUBERCULOSOS

SANDRA MILENA CHINGATÉ LÓPEZ

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Bioquímica

Directora:

Dr.Sc., Luz Mary Salazar Pulido

Línea de Investigación:

Interacción Hospedero-Patógeno

Grupo de Investigación:

Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias

Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Maestría en Ciencias Bioquímica

Línea de investigación: Interacción Hospedero-Patógeno

Bogotá, Colombia

2012

***A mi hijo Sebastián,
Porque eres el motivo de mi vida y
el motor que me impulsa todos los
días a seguir adelante.***

Agradecimientos

A Dios por bendecirme y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida, por rodearme de personas maravillosas que me han dado su mano y llenarme de fortaleza en mi caminar.

A mi familia porque son mi soporte y ayuda para seguir adelante con todos mis proyectos de vida.

A Panayiotis Nicola por su apoyo incondicional que ha llenado de nuevas fuerzas mi vida, por creer en mí y brindarme todo su amor.

A la Universidad Nacional de Colombia, porque me ha brindado todo su apoyo para lograr mis metas a nivel académico; a todos los profesores por su dedicación.

A la profesora Luz Mary Salazar Pulido, directora de mi trabajo de tesis de maestría, por su apoyo incondicional, instrucción, motivación y confianza en todo el desarrollo de mi maestría.

Al profesor Carlos Yesid Soto, director del grupo de investigación BBMM por su apoyo y motivación.

A Lorena Novoa, Carlos Ayala y Andrés León, por toda su colaboración y enseñanza en los ensayos de CMI y actividad ATPasa; además por su amistad incondicional que me lleno de alegría día tras día en el laboratorio.

A mis compañeros del grupo de investigación Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias (BBMM) por su compañía y amistad.

A la Doctora Fanny Guzmán Quimbayo de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Chile, por sus enseñanzas y consejos sobre síntesis de péptidos.

A la división de investigación sede Bogotá (DIB) por el proyecto aprobado 13592, CONVOCATORIA: "PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO, INNOVACIÓN Y CREACIÓN ARTÍSTICA DE LA DIB" - SEGUNDO CORTE. Modalidad 3.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), en especial a la Doctora Magnolia Vanegas por permitirme desarrollar la purificación y caracterización de los péptidos.

A la Doctora Gabriela Delgado Murcia directora del Grupo de Inmunotoxicología (Departamento de Farmacia) y al Doctor José Julián Pérez, por su colaboración en la realización de los ensayos de actividad hemolítica de los péptidos.

A la profesora Zuly Rivera, por la colaboración con los reactivos en la parte inicial de la síntesis y sus consejos en la síntesis química en fase sólida.

Finalmente, a todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron para la realización de esta investigación, quedo infinitamente agradecida

Resumen

En este estudio, se utilizaron herramientas de la bioinformática para diseñar *in silico* secuencias análogas de los péptidos antimicrobianos LL37, Bombinina, Protamina, Dermacidina 1L, Maximina 1, CAP 18, SMAP 29, PMAP 36 y Cecropina B, mostrando mejor estructura helicoidal y actividad antibacteriana en comparación con las secuencias nativas derivadas (péptidos de 15 residuos, denominados A). Los péptidos derivados y análogos (denominados B) se sintetizaron usando la estrategia de Fmoc, se purificaron por RP-HPLC y se caracterizaron por MALDI-TOF y dicroísmo circular. El ensayo *in vitro* de la viabilidad de las células de *M. smegmatis* mc²155, el péptido análogo de CAP 18-B muestra una concentración mínima inhibitoria 10 veces menor al péptido CAP 18-A. Los péptidos diseñados mostraron hemólisis menor al 10% e inhibición significativa de la actividad de la ATPasa basal. Los resultados obtenidos sugieren que los péptidos diseñados pueden interferir con la viabilidad de micobacterias y tienen potencial aplicación antituberculosa.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, tuberculosis, catelicidinas, actividad ATPasa.

Abstract

In this study, the “*in silico*” design with bioinformatics tools of analogous sequences of the antimicrobial peptides LL37, Bombinin, Protamine, Dermacidin 1L, Maximin 1, CAP 18, SMAP 29, PMAP 36 and Cecropin B, displayed improved helical structure and antibacterial activity in comparison with derived native sequences. Analogues and derived peptides were synthesized using Fmoc strategy, purified by RP-HPLC and characterized by MALDI-TOF and circular dichroism. The *in vitro* cell viability assay of *M. smegmatis* mc²155, an analogous peptide CAP 18-B displayed a minimal inhibitory concentration 10-fold lower than that showed for the native peptide. In addition, the designed analogous peptides showed human erythrocytes hemolysis lesser than 10% and significant inhibition of the basal ATPase activity of mycobacterial plasma membrane vesicles, the results obtained suggest that the designed peptides can interfere with the mycobacterial viability and have potential antituberculous application.

Keywords: Antimicrobial peptides, tuberculosis, cathelicidins, ATPase activity

Contenido

	Pág.
Resumen	6
Lista de figuras	10
Lista de Tablas	11
Lista de Abreviaturas	12
INTRODUCCIÓN	133
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	16
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	20
4.1. Tuberculosis y compuestos antituberculosos	20
4.2. Péptidos antimicrobianos	22
4.2.1. Clasificación	25
4.2.1.1. Péptidos aniónicos	25
4.2.1.2. Péptidos catiónicos	25
4.2.1.3. Péptidos catiónicos ricos en ciertos aminoácidos	26
4.2.1.4. Péptidos aniónicos y catiónicos ricos en cisteína	26
4.2.2. Mecanismos de acción antimicrobiana	26
4.2.2.1. Modelo de carpeta.....	28
4.2.2.2. Modelo de barril.....	28
4.2.2.3. Modelo de poro toroidal	28
4.2.3. Mecanismo de resistencia bacteriana	28
4.2.4. Diseño de péptidos antimicrobianos	29
4.2.5. Generación de ATP y los mecanismos de defensa.....	31

4.3. Síntesis de péptidos por la estrategia Fmoc	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Diseño “ <i>In silico</i> ” de los análogos de péptidos antimicrobianos	34
5.2. Síntesis de péptidos en fase sólida por la estrategia F-moc	35
5.3. Dicroísmo circular	37
5.4. Selección de cepas y cultivo de micobacterias	37
5.5. Ensayo de viabilidad con resazurina.....	37
5.6. Determinación de la actividad hemolítica	38
5.7. Aislamiento de membrana celular de micobacteria	39
5.8. Determinación de la actividad ATPasa basal de membrana celular de micobacterias, por medición del fosfato inorgánico liberado	39
5.9. Efecto de los péptidos sintetizados en la actividad ATPasa basal por medición de fósforo inorgánico (Método modificado de Fiske & Subbarow).....	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	831
6.1. Diseño “ <i>In silico</i> ” de análogos de péptidos antimicrobianos.....	832
6.2. Síntesis de péptidos y caracterización	51
6.3. Dicroísmo Circular	69
6.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los péptidos antimicrobianos mediante el ensayo con resazurina	74
6.5. Determinación de la actividad hemolítica de los péptidos en estudio.....	77
6.6. Determinación de la actividad ATPasa basal en membrana celular de <i>M. Smegmatis</i> <i>mc</i> ² 155 y el efecto de los péptidos sintetizados	79
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	83
7.1. Conclusiones.....	83
7.2. Recomendaciones.....	84
8. ANEXOS.....	85
8.1. PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO INORGÁNICO MEDIANTE EL MÉTODO DE FISKE & SUBBAROW MODIFICADO	85
BIBLIOGRAFÍA.....	87

Lista de figuras

	pág.
Figura 1: Incidencia de la tuberculosis para el año 2011	20
Figura 2: Estructura terciaria de algunos PAM representativos: A) LL-37 en micelas de SDS, B) protegrina 1 vesículas lipídicas de POPC, C) α -defensina 4 en buffer HEPES, D) indolicina en micelas de SDS	23
Figura 3: Esquematación de los mecanismos de los PAM para la desestabilización de la membrana	27
Figura 4: Esquema de síntesis en fase sólida.	33
Figura 5: Resultados de la predicción bioinformática de las secuencias peptídicas: LL37, bombinina, protamina, dermacidina 1L, maximina 1, CAP 18, SMAP 29, PMAP 36 y Cecropina B	46
Figura 6: Composición porcentual de aminoácidos en los péptidos sintetizados.	54
Figura 7: Cromatogramas HPLC-RP de los péptidos sintetizados.	57
Figura 8: Espectrometría de masas de los péptidos sintetizados.	60
Figura 9: Espectros de dicroísmo circular para los péptidos en estudio	70
Figura 10: Ensayo de viabilidad con resazurina en presencia de los péptidos en estudio sobre <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 de los péptidos Cecropina B-A, LL37-B, Protamina-B, PMAP36-A, PMAP36-B, CAP 18-B, Maximina-A y Maximina-B	75

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Predicción Bioinformática del caracter antibacterial de los péptidos antimicrobianos.....	42
Tabla 2: Secuencias peptídicas sintetizadas por la metodología F-moc y caracterización del peso molecular por espectrometría de masas MALDI-TOF	52
Tabla 3: Tiempo de retención en la cromatografía HPLC-RP de los péptidos en estudio y porcentaje de rendimiento de la reacción de síntesis en fase sólida por la metodología Fmoc.....	56
Tabla 4: Valores de concentración mínima inhibitoria para los péptidos LL37-A, LL37-B, Bombinina-A, Bombinina-B, Protamina-A, Protamina-B, Dermacidina1L-A, Dermacidina 1L-B, Maximina1-A, Maximina 1-B, CAP 18-A, CAP 18-B, SMAP 29-A, SMAP 29-B, PMAP 36-A, PMAP 36-B, Cecropina B-A y Cecropina B-B mediante el test de viabilidad celular con resazurina sobre <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	76
Tabla 5: Actividad hemolítica de los péptidos.....	78
Tabla 6: Determinación de la actividad ATPasa basal en la membrana celular de <i>M. Smegmatis</i> mc ² 155 y el efecto de los péptidos sintetizados en concentración 83,3µM	80
Tabla 7: Resumen de los resultados obtenidos de concentración mínima inhibitoria, actividad hemolítica e inhibición de la actividad ATPasa para los péptidos sintetizados.	82

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
BCG	Bacilo Calmette Guérin
DHB	2,5-ácido dihidrobenzoico
DC	Dicroísmo Circular
ETB	Etambutol
G	Gravedades
INH	Isoniazida
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MDR-TB	Tuberculosis multidrogorresistente
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAM	Péptidos antimicrobianos
PG-1	Protegrina-1
PZA	Pirazinamida
RIF	Rifampicina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SIDA	Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida
TB	Tuberculosis
VIH	Virus de Inmuno-deficiencia Humana
XDR-TB	Tuberculosis extremadamente multidrogorresistente

Introducción

La tuberculosis (TB) es una infección bacteriana crónica, se estima que anualmente produce 1.3 millones de muertes en el mundo [1,2], es causada por el bacilo alcohol resistente *Mycobacterium tuberculosis* y se transmite por el aerosol de un individuo enfermo cuando tose, habla o estornuda; cuando ingresan al individuo sano, los bacilos se ubican en los alveolos pulmonares, donde son fagocitados por macrófagos y controlados por el sistema inmune del hospedero, para dar lugar a la formación de granulomas dentro de los cuales la bacteria puede permanecer muchos años en estado de latencia (células viables en dormancia). Cuando se presente alguna deficiencia en el sistema inmune del hospedero, las bacterias podrán escapar de los granulomas y causar la enfermedad [1,2]; esta enfermedad ha aumentado de forma dramática por la coinfección con VIH, ya que debilita el sistema inmunitario, por el surgimiento de TB multirresistente (MDR-TB) y extremadamente resistente (XDR-TB). El control de la TB se complica aún más debido a que cerca de dos mil millones de personas se encuentran infectadas en forma latente [2,3], de ellas, el 10% desarrollará la enfermedad en algún momento de la vida, generalmente aquellas con deficiencias inmunes (muy jóvenes o mayores, malnutridos, coinfectados, o con estrés), y el 90% restante permanecerá asintomático, convirtiéndose en un reservorio permanente del patógeno, facilitando la transmisión de la enfermedad [3].

El nivel de resistencia que presentan las micobacterias depende de factores fisiológicos como el estado de aerobiosis o anaerobiosis, factores genéticos como la adquisición horizontal de genes de resistencia, mutaciones, etc. que constituyen la denominada resistencia adquirida; y finalmente la resistencia intrínseca, innata, o natural [4]. Dado que la pared celular de las micobacterias es rica en lípidos la hace hidrofóbica, lo cual reduce su permeabilidad a los medicamentos contra la tuberculosis y se considera que esta es una de las razones principales de la resistencia a fármacos antituberculosos [5,6]. Debido al surgimiento de cepas MDR y XDR, la búsqueda de nuevos compuestos antibióticos es una alternativa para el control de la multirresistencia de las micobacterias a los antituberculosos tradicionales [7]. Existe una necesidad urgente por el desarrollo de nuevas moléculas que puedan disminuir el problema de resistencia al tratamiento farmacológico, que exhiban un mecanismo de acción que reduzca el riesgo de desarrollar dicha resistencia. Los péptidos antimicrobianos (PAM) han mostrado, durante las últimas décadas, que presentan actividad contra diferentes patógenos, mediante un modo de

acción que en la mayoría de los casos implica la interacción electrostática con la membrana, induciendo la formación de poros y posterior pérdida de los componentes citoplasmáticos, lo que conlleva a la muerte celular; debido a estas características muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana y bajo potencial de inducción de resistencia de los patógenos [8-10]. La mayoría de los péptidos antimicrobianos tienen de 5 a 60 residuos de aminoácidos y estructura secundaria de α -hélice, hoja β o extendida; están ampliamente distribuidos en plantas, insectos y vertebrados [10], y, constituyen componentes evolutivamente conservados del sistema inmune no específicos en la respuesta frente a la invasión de microorganismos patógenos [11-12].

Estas moléculas presentan diferentes características estructurales y fisicoquímicas para su actividad antimicrobiana [13-17]; son generalmente moléculas catiónicas, que permiten un cierto grado de selectividad por los fosfolípidos de la membrana bacteriana [18-22], debido a su carácter aniónico y se ha observado que la optimización de parámetros en la molécula, como la carga, anfipaticidad y estructura secundaria, permiten mayor selectividad por las células del huésped bacteriano y disminuir la citotoxicidad en las células del hospedero [22,23].

En la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de patógenos resistentes a los antibióticos convencionales, dos hechos han permitido adelantos importantes, en primera instancia el desarrollo de la base de datos APD2 (antimicrobial peptide database) [24], la cual contiene 1662 entradas, entre los cuales se encuentran péptidos con actividad antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena y antiviral, donde se ha observado en general la aparición de los aminoácidos como alanina, glicina, cisteína y lisina en la mayoría de estos péptidos [24]; y en segunda instancia, la aparición de la herramienta de predicción antiBP Server [25], la cual desarrolló algoritmos para la predicción de péptidos antibacteriales, utilizando la base de datos APD2, donde se encontró que aproximadamente el 60% de los péptidos antibióticos presentan quince residuos de aminoácidos. El predictor mapea la estructura primaria y la divide en fragmentos con esta longitud de aminoácidos, de esta forma podemos predecir las regiones con mayor actividad presentes en la estructura primaria de un péptido nativo. Con esta herramienta bioinformática y otras de predicción de estructura secundaria, podemos hacer modificaciones estructurales en péptidos que presenten actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*, mejorando sus características de estructura secundaria, carga catiónica neta y predicción de actividad antibacteriana.

En el presente trabajo se hizo el diseño "*In silico*" de péptidos antimicrobianos cortos y análogos de los péptidos nativos LL37, bombinina, protamina, dermacidina 1L, maximina 1, CAP 18, SMAP 29, PMAP 36 y Cecropina B, la síntesis química por la estrategia Fmoc y la evaluación de su posible utilidad como compuestos antimicobacterianos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa producida por micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (*M. hominis*, *M. bovis*, *M. africanum*), es un bacilo ácido-alcohol resistente y su transmisión es vía aérea [1]. Se estima que cerca de dos mil millones de personas se encuentran infectadas en forma latente, de ellas, solo el 10% desarrollará la enfermedad en algún momento de la vida, el otro 90% permanecerá asintomático, convirtiéndose en un reservorio permanente [2, 3].

El tratamiento de infecciones por micobacterias consiste en una combinación de fármacos que si se utiliza de forma correcta puede erradicar la enfermedad, son usados de manera continua por varios meses a años. La exposición a largo plazo a concentraciones subóptimas de agentes antimicobacterianos facilita la selección de mutantes resistentes. Por lo tanto, la larga duración del tratamiento antituberculoso ha sido una de las causas de la aparición de cepas resistentes debido a que los pacientes lo abandonan cuando notan cierta mejoría [4, 5].

La aparición de cepas de *M. tuberculosis* multi resistentes a las drogas usadas constituye un problema de salud pública mundial. Dado que la pared celular de las micobacterias rica en los lípidos la hace hidrofóbica, lo cual reduce su permeabilidad a los medicamentos contra la tuberculosis [6,7].

La búsqueda de nuevos compuestos antibióticos es una alternativa para el control de la multirresistencia de las micobacterias a los antituberculosos tradicionales. Existen unos compuestos llamados péptidos antimicrobianos, los cuales constituyen un mecanismo de defensa innata, que presentan actividad antimicrobiana, que han sido poco estudiado en las micobacterias. En la actualidad solo se conoce que algunas defensinas de origen linfocítico en combinación con isoniazida, tienen un efecto microbicida sobre *M. tuberculosis* [8], también se han estudiado diferentes péptidos antimicrobianos de diversos orígenes contra este bacilo y han generado una respuesta positiva.

La correlación de características estructurales que permiten una mejor interacción con la membrana del bacilo se puede utilizar como herramienta para el diseño de nuevos

agentes antimicobacterianos análogos de péptidos antibióticos y es una alternativa interesante para el desarrollo de nuevos compuestos antituberculosos.

2.HIPÓTESIS

Los péptidos antimicrobianos han sido poco estudiados en el tratamiento de la tuberculosis, algunos estudios han utilizado péptidos nativos como la Cecropina B y LL37 entre otros, o han combinado péptidos con medicamentos de primera línea como la isoniazida. En trabajos realizados en nuestro grupo de investigación se encontró que haciendo modificaciones de aminoácidos en péptidos antimicrobianos es posible aumentar su capacidad antimicobacteriana cuando ésta es baja o moderada, y que en ocasiones dichos péptidos modificados bloquean o alteran la actividad ATPasa de la membrana plasmática, la que es fundamental para la viabilidad de la micobacteria.

Para este trabajo postula que mediante el uso de herramientas bioinformáticas de predicción de actividad antibacteriana y la modificación de la estructura primaria de los péptidos encontrados, mejorando su estructura helicoidal y carga, se abrirá un nuevo campo en la obtención de nuevos compuestos antituberculosos.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicobacteriana de péptidos cortos (blanco) de LL37, Bombinina, Protamina, Dermacidina 1L, Maximina 1, CAP 18, SMAP 29, PMAP 36 y Cecropina B y de análogos de estos, determinando “*in vitro*” la capacidad antibiótica frente a micobacterias como alternativa en el diseño de nuevas drogas.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar por métodos bioinformáticos los fragmentos de 15 aminoácidos (péptidos blanco) que presenten el mejor carácter antibacteriano y estructura helicoidal de los péptidos antimicrobianos LL37, Bombinina, Protamina, Dermacidina 1L, Maximina 1, CAP 18, SMAP 29, PMAP 36 y Cecropina B.
- Diseñar péptidos modificados de péptidos blanco por métodos bioinformáticos, mejorando características de estructura helicoidal, carácter antibacterial y carga con posible mejor actividad antimicobacteriana.
- Evaluar la actividad bactericida de los péptidos antimicrobianos sintetizados sobre *M. smegmatis* mc²155 por ensayos de viabilidad con resazurina.
- Determinar la capacidad de los péptidos antimicrobianos sintetizados para interferir con la actividad ATPasa micobacteriana, mediante el ensayo modificado de Fiske & Subbarow.
- Determinar la actividad hemolítica de los péptidos sintetizados, como criterio para considerar su uso en humanos como moléculas antituberculosas.

4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1. TUBERCULOSIS Y COMPUESTOS ANTITUBERCULOSOS

La TB es una enfermedad infectocontagiosa granulomatosa producida por *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo alcohol resistente, generalmente se localiza en el pulmón pero puede afectar otros órganos; se transmite de persona a persona por el aerosol de un individuo enfermo cuando tose, habla o estornuda; cuando los bacilos ingresan se ubican en los alveolos pulmonares, donde son fagocitados por macrófagos, lo cual da lugar a la formación de los granulomas, así la *Mycobacteria* permanecerá en estado de latencia hasta que el hospedero presente una deficiencia en el sistema inmune, donde las bacterias podrán escapar de los macrófagos y continuar con la infección del individuo [1, 2, 8].

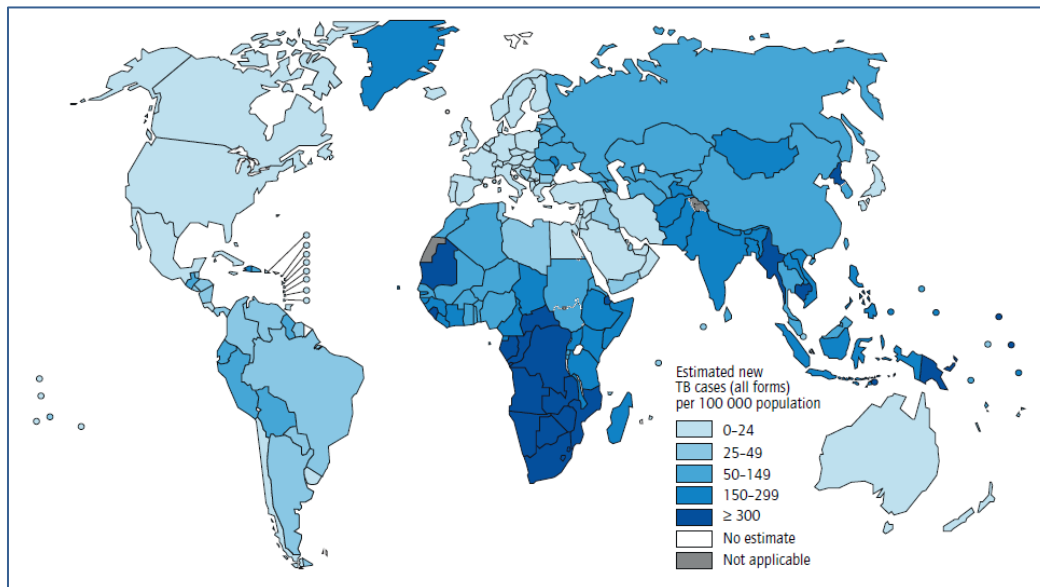


Figura 1. Incidencia global de la Tuberculosis en el año 2011[2]

En el año 2011 la Organización Mundial de la Salud estimó 8,7 casos de incidencia de TB a nivel global, lo que equivale a 125 casos por cada 100000 habitantes (figura 1), la mayoría de los casos ocurrieron en Asia (59%) y África (26%); en menor porcentaje se

presentaron casos en la Región este del Mediterraneo (7,7%), la región Europea (4,3%) y la región de las Américas (3%) [2].

El tratamiento contra TB es eficaz y de larga duración, consiste en la combinación de varios fármacos; el esquema terapéutico recomendado por la OMS incluye isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (ETB) y pirazinamida (PZA) [9].

La isoniacida (INH), es el fármaco más utilizado de la primera línea contra tuberculosis. Este medicamento inhibe la síntesis de ácidos micólicos necesarios en la formación de la pared celular; *M. tuberculosis* es altamente susceptible a INH ([MIC] 0.02–0.2 µg/ml), sólo es activo contra el bacilo tuberculoso que se está replicando y es inactivo en las cepas donde el bacilo no se replica o se encuentra en condiciones anaerobias [9].

La rifampicina (RIF) es un complejo semisintético derivado de la rifamicina, activo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, es un antibiótico producido por *Streptomyces mediterranei*. Los organismos susceptibles se inhiben con menos de 1µg/mL, pero las mutantes resistentes en poblaciones microbianas existen en una frecuencia aproximada de una en 10⁶. La RIF se une fuertemente a la subunidad β de la RNA polimerasa de las bacterias y no del humano inhibiendo la síntesis del RNA [10].

El etambutol (ETB) es un compuesto sintético, hidrosoluble, termoestable y se obtiene como la sal de dihidroclorhidrato; es un antibiótico de primera línea contra TB. Las cepas susceptibles de *M. tuberculosis* y otras micobacterias a ETB, son inhibidas *in vitro* a una concentración de 1 a 5 µg/mL y es activo contra las bacterias en crecimiento e inactivo en los bacilos sin replicación. El ETB inhibe la síntesis de arabinogalactanos, un componente esencial de la pared celular micobacteriana, ya que inhibe la polimerización de arabinanos e induce la acumulación de D-arabinofuranosil-P-decaprenol un intermediario en la biosíntesis de arabinanos e incrementa la actividad de los fármacos lipofílicos como la que cruzan la pared celular principalmente en dominios lipídicos de esta estructura. ETB tiene como blanco la enzima arabinosil transferasa la cual interviene en la biosíntesis de arabinogalactano [11,12].

La pirazinamida (PZA) es un pariente de la nicotinamida, estable y ligeramente hidrosoluble. A pH neutro es inactiva *in vitro*, pero a pH de 5 destruye a bacilos tuberculosos y a algunas micobacterias, en concentraciones de 20 µg/mL; el fármaco es entra en los macrófagos y genera la muerte celular a los bacilos en un medio ácido. La

PZA es activado por la pirazinamidasa codificada por el gen *pncA*, el cual lo convierte en el ácido pirazinoico que baja el pH intracelular e inactiva una sintetasa de ácidos grasos vital para el bacilo [7].

4.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

La resistencia a antibióticos se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más críticos en todo el mundo. Se estima que el 70% de las bacterias patógenas son resistentes al menos a un antibiótico, además, muchas cepas son multi resistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) a los antibióticos convencionales [13,14]; así que, existe una necesidad urgente por el desarrollo de nuevas moléculas que puedan disminuir el problema de resistencia al tratamiento farmacológico de patógenos que exhiban un mecanismo de acción que reduzcan el riesgo de desarrollar dicha resistencia. Durante las últimas décadas los péptidos antimicrobianos (PAM) han mostrado que presentan actividad contra diferentes patógenos, mediante un modo de acción en la mayoría de los casos implica la interacción electrostática con la membrana, induciendo la formación de poros y posterior pérdida de los componentes citoplasmáticos, lo que conlleva a la muerte celular; debido a estas características muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana y bajo potencial de inducción de resistencia de los patógenos [15, 16].

La mayoría de los péptidos antimicrobianos tienen de 5 a 60 residuos de aminoácidos y estructura secundaria de α -hélice, hoja β o extendida (Figura 2); estas moléculas están ampliamente distribuidas en plantas, insectos y vertebrados [17], constituyen componentes evolutivamente conservados del sistema inmune, no específicos en la respuesta frente a la invasión de microorganismos patógenos [17, 18].

Se ha demostrado con algunos PAM que presentan actividad inmunoreguladora, ya que permiten la producción de citoquinas, inducción de quimiotaxis y la activación de células inmunes, generando una inmunidad adaptativa [18].

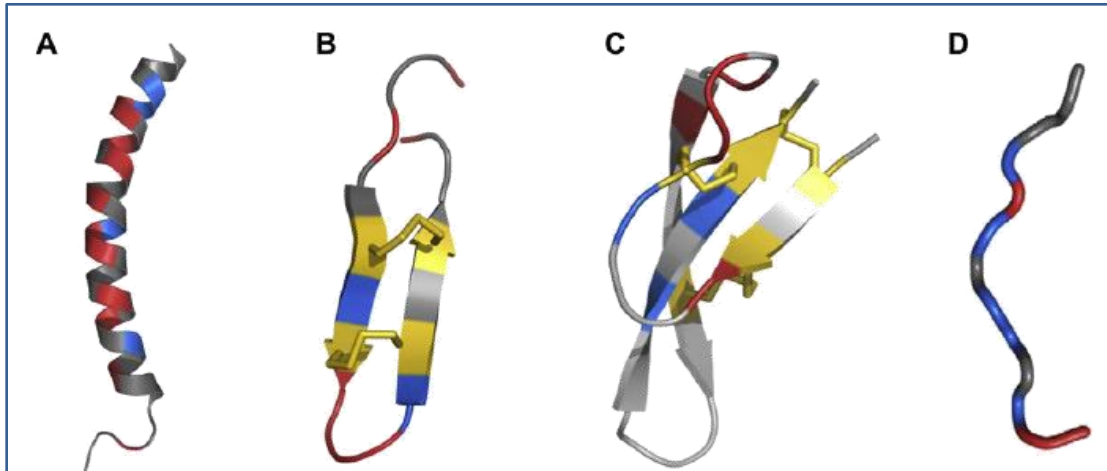


Figura 2. Estructura terciaria de algunos PAM representativos: A) LL-37 en micelas de SDS, B) protegrina 1 en vesículas lipídicas de POPC, C) α -defensina 4 en buffer HEPES, D) indolicina en micelas de SDS [26]

Estas moléculas presentan para su acción diferentes características estructurales y fisicoquímicas, que permiten un cierto grado de selectividad por los fosfolípidos de la membrana bacteriana debido a su carácter aniónico [19-21]; sin embargo, se ha observado que la correcta optimización de parámetros de la molécula como la anfipaticidad, estructura secundaria y carga, conllevan a una selectividad mayor por las células del huésped y a disminuir la citotoxicidad en las células del hospedero [22].

En las últimas décadas se han descrito diversos péptidos con actividad antimicrobiana. Los péptidos descritos más recientemente son sintetizados como péptidos naturales en los ribosomas y los pueden producir todas las formas de vida (incluyendo las bacterias) como moléculas de defensa. Existe una gran variedad de genes que codifican péptidos antimicrobianos producidos por una multitud de organismos vivos como parte de sus mecanismos de defensa naturales. Los péptidos producidos por células eucariotas pueden presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, antiviral o antitumoral. Las especies de insectos, animales y plantas que son seleccionados por un medio ambiente hostil y son capaces de convivir y sobrevivir donde un ser humano no podría, eventualmente podrían poseer un "sistema inmune" o de defensa que les proporciona esta posibilidad de supervivencia. Si buscamos, localizamos e identificamos estas características biológicas de selección de dichas especies, podremos llegar a

encontrar nuevas y efectivas soluciones que permitan incorporarse a los mecanismos de supervivencia y bienestar del hombre [22].

En la década de los 60s Kiss y Michl [27], observaron la presencia de un péptido con actividad antimicrobiana y hemolítica en las secreciones de la piel del sapo de panza amarilla, *Bombina variegata*, y se le denominó bombinina, con una secuencia de aminoácidos: GIGALSAKGALKGLAKGLAQHFAN [27]. En 1972 se descubrió la melitina en el veneno de las abejas [28]. Posteriormente, el grupo del Dr. Hans G. Boman en el Karolinska Institut de Estocolmo demostró la presencia de péptidos antibióticos inducibles en la hemolinfa de lepidópteros [29].

En 1974 se encontró la protamina en los espermatozoides de algunos peces, este péptido no posee el carácter anfipático necesario para la formación de poros o canales en la membrana, sin embargo, se ha evidenciado que puede alterar algunos procesos asociados a membrana; contiene 21 argininas en su secuencia de 32 residuos de aminoácidos : PRRRRSSSRPVRRRRRPRVSRRRRRRGGRRRR [30].

Se han encontrado numerosos péptidos en diferentes especies y se sabe que tanto plantas como animales comparten un mecanismo de defensa efectivo frente a los patógenos invasores. Se han descrito en insectos, crustáceos, anfibios, mamíferos y plantas [27-32], además de bacterias, hongos [33] y virus. En determinadas circunstancias, ante un proceso inflamatorio o infeccioso, aumenta la presencia de péptidos antibióticos en diferentes animales y también en los humanos [34-35].

Muchos péptidos antimicrobianos comparten un diseño común como un tamaño pequeño, catiónicos y de naturaleza anfipática. Según estas características se han descrito dos grupos de PAM en mamíferos, corresponden a defensinas y catelicidinas [34-36]

Las catelicidinas son un grupo de péptidos antimicrobianos encontrados en muchas especies de mamíferos; se han descrito en diferentes especies como PR-39 en cerdos [35, 36], LL-37 en humanos [37,38], PMAP 36 en cerdos y SMAP 29 en ovejas [39], entre otros. Estas catelicidinas son multifuncionales y tienen una clara importancia para la respuesta inmune del hospedero.

LL37, es el único péptido antimicrobiano en la familia de las catelicidinas, se origina a partir de un precursor de 18 kD denominada hCAP-18, la cual existe en los gránulos de los neutrófilos y es secretada por células epiteliales, monocitos, linfocitos T y células cebadas cuando estas células se encuentran en presencia de moléculas asociadas a patógenos. La quimiotaxis es otra actividad que se conoce de LL-37, principalmente sobre neutrófilos y linfocitos CD4+. Presenta la siguiente estructura primaria: LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES [40,41].

Las defensinas son péptidos pequeños que se han relacionado con la fagocitosis independiente de oxígeno. En este fenómeno también intervienen proteínas bactericidas que aumentan la permeabilidad y la catepsina G. Estos péptidos se aislaron y sus secuencias se reportaron en los años 80. Todas las defensinas se componen de 29- 34 residuos de aminoácidos, poseen tres puentes disulfuro intramoleculares y son de carácter catiónico. La estructura tridimensional de las defensinas se ha identificado por difracción de rayos-X y RMN [42,43]. Las defensinas actúan sobre una gran variedad de bacterias, usualmente mejor sobre Gram-positivas, así como también sobre hongos. Estos péptidos son en algún grado citotóxicos sobre las células eucarióticas normales. Sin embargo esto no parece causar problema alguno, pues las defensinas no se liberan sino que permanecen secuestradas en los gránulos de los neutrófilos. Estos péptidos son sintetizados como pre-pro-proteínas de 93-95 residuos conteniendo una copia de defensina [43,44]

4.2.1. Clasificación

4.2.1.1. Péptidos aniónicos

Son moléculas ricas en los aminoácidos ácido glutámico y ácido aspártico, presentan un peso molecular entre 721,6–823,8 Dalton, son producidos principalmente por extractos surfactantes, fluidos de lavados bronquioalveolares y células epiteliales del tracto respiratorio, requieren Zn^{+2} como cofactor. Se han observado en ovejas, ganado vacuno y en humanos; presentan un amplio espectro de actividad microbicida contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [16, 45].

4.2.1.2. Péptidos Catiónicos

Estos péptidos contienen aproximadamente menos de 40 residuos de aminoácidos. Se han descrito 290 péptidos catiónicos, estos son ricos en los aminoácidos lisina y arginina,

los que le confieren su carácter catiónico; no presentan en su secuencia residuos de cisteína y generalmente prefieren una conformación espacial de α -hélice en medios que contienen lípido A, vesículas de fosfolípidos y micelas; sin embargo, en medios acuosos o con sales presentan una estructura no definida.

En este grupo se encuentra LL-37 de humanos, cecropina y melitina de insectos, magainina y bombinina de anfibios, entre otros [16, 45].

4.2.1.3. Péptidos catiónicos ricos en ciertos aminoácidos

Se conocen aproximadamente 44, no presentan residuos de cisteína, más se observa que ciertos aminoácidos se encuentran en mayor proporción que otros; presentan una estructura α -hélice y algunas veces extendida; como ejemplo se encuentran, el PR-39 y abeacina de abejas ricos en prolina, la indolicina de ganado vacuno rico en triptófano [16, 45].

4.2.1.4. Péptidos aniónicos y catiónicos ricos en cisteína

Se encuentran aproximadamente 380, los cuales al presentar cisteínas en su secuencia pueden dar lugar a la conformación estructural de hoja β , lo que le genera estabilidad por los puentes disulfuro que se forman. En este grupo se incluyen las protegrinas de los cerdos, las defensinas (α , β ,) en los neutrófilos de humanos [16, 45].

Existen también algunos péptidos antimicrobianos que hacen parte de la estructura de proteínas más grandes y que pueden clasificarse dependiendo de sus características estructurales en uno de los subgrupos anteriores; por ejemplo: la lactoferrina de la lactoferrina, dominios antimicrobianos de la ovoalbúmina, lisozima y α -lactoalbúmina [45]

4.2.2. Mecanismos de acción antimicrobiana

El mecanismo de acción principal de los péptidos antimicrobianos se basa en la formación de canales iónicos en las membranas lipídicas. La irrupción física de la membrana bacteriana inicia con la unión electrostática entre el péptido y las moléculas aniónicas presentes en la membrana como fosfato de los lipopolisacáridos de bacterias Gram-negativas, o ácidos lipoteicoicos presentes en la superficie de bacterias Gram-positivas, estabilizado por las uniones hidrofóbicas con la región lipídica [46], permitiendo de esta manera, la inserción del PAM en la membrana microbiana (Figura 3), que finalmente permite la pérdida de la homeóstasis celular, salida del contenido intracelular e inhibición

de la respiración [26]. Este proceso de inserción en la membrana bacteriana es dependiente de la concentración del PAM; a bajas concentraciones, éstas moléculas se orientan paralelamente con respecto a las uniones electrostáticas a la bicapa lipídica, posteriormente, al aumentar la concentración del péptido, se propicia la inserción perpendicular formando poros transmembrales [47-49].

A diferencia de la membrana bacteriana, las células eucariotas son ricas en fosfolípidos neutros y colesterol, lo cual no le permite la interacción electrostática necesaria como se observa en bacterias; sin embargo, otros parámetros estructurales como la hidrofobicidad le confieren inespecificidad al PAM, y, por lo tanto, carácter citotóxico en el hospedero [26,50].

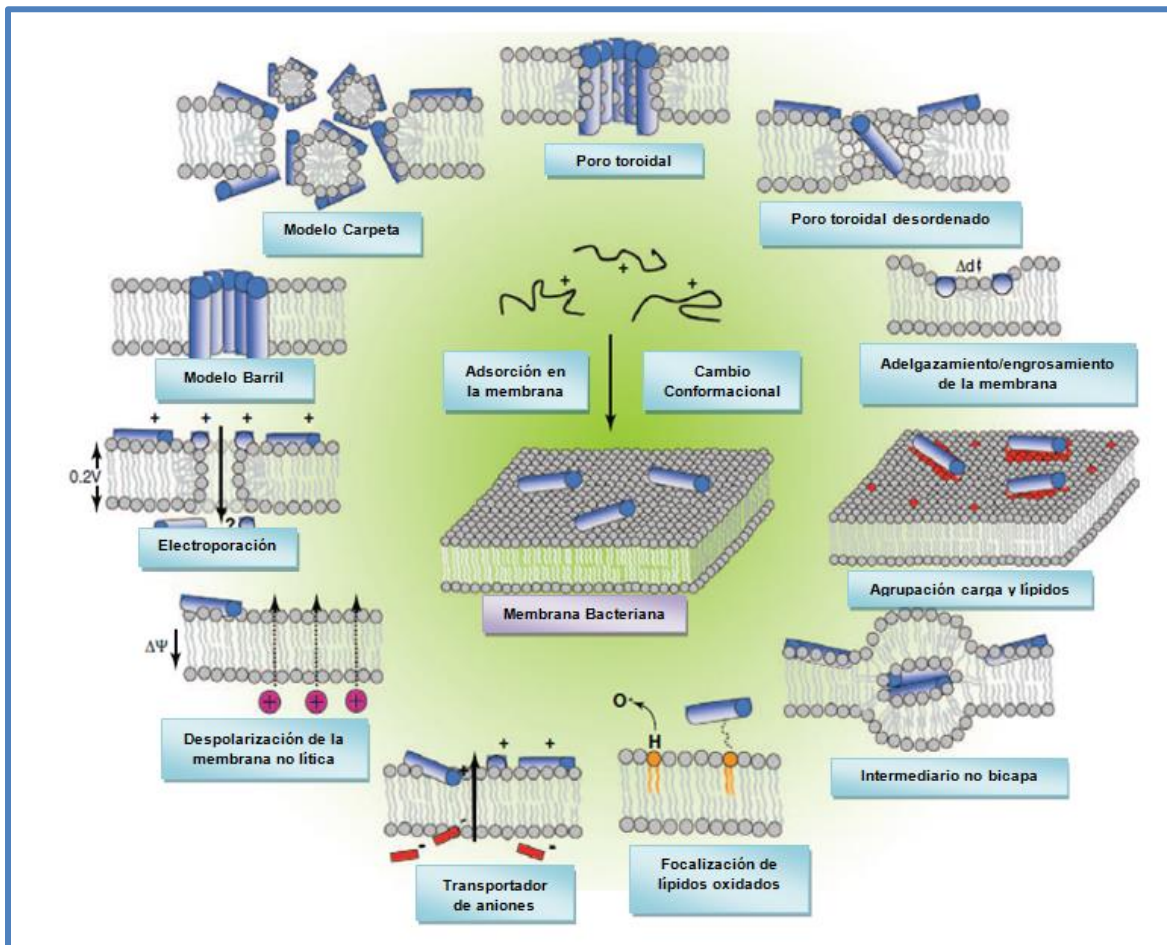


Figura 3. Esquematización de los mecanismos de los PAM para la desestabilización de la membrana [51]

Se han descrito diferentes modelos teóricos que permiten comprender la interacción PAM-bicapa lipídica y posterior formación de poros:

4.2.2.1. Modelo carpeta

Los péptidos unidos se agregan y se insertan en la bicapa de modo que las regiones hidrofóbicas de los péptidos se alinean con la región del core lipídico de la membrana, dejando las regiones hidrofílicas hacia el lumen central. Se forma así un poro transmembranal muy similar a un barril sin fondo cuyas paredes son los péptidos helicoidales [16, 51]

4.2.2.2. Modelo de barril

En este modelo las regiones hidrofóbicas de los péptidos se alinean con la región lipídica de la membrana, dejando las regiones hidrofílicas hacia el lumen central. La formación de estos poros genera la pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana. La alameticona forma poros transmembranales entre 3 a 11 hélices paralelas con diámetros entre aproximadamente 1,8 y 4,0 nm respectivamente [16, 51].

4.2.2.3. Modelo de poro toroidal

En el modelo de poro toroidal, los PAM se unen a la bicapa lipídica induciendo la formación de monocapa, los cuales se van curvando a través del lípido formando canales, en los cuales se van a unir la parte catiónica a los grupos polares aniónicos (Figura 3). La magainina induce poros toroidales de 3,0-5,0 nm [16, 51].

Algunos PAM no requieren la formación de poros transmembranales para ejercer su acción microbicida, estos son capaces de atravesar la bicapa lipídica y ejercer su acción sobre blancos intracelulares; tal es el caso de la Buforina II que se une al DNA inhibiendo su síntesis, el HNP-1 inhibe la síntesis de proteínas; en general, algunos PAM presentan mecanismos que inhiben procesos metabólicos celulares [16, 51].

4.2.3. Mecanismos de resistencia bacteriana

Los patógenos pueden presentar diferentes mecanismos para impedir la unión del PAM a la membrana plasmática, mediante la modificación de algunos componentes de la pared celular o de la membrana, entre otros. Se pueden presentar algunas modificaciones en el lipopolisacárido para disminuir su interacción con los PAM [51].

El alto contenido en proteasas en *Proteus* y *Serratia* es causa de su baja susceptibilidad a los PAM. La modificación en el lípido A aumentando la hidrofobicidad, retarda o no permite la inserción de los péptidos antimicrobianos y la formación de poros [16].

La alteración en la carga neta de la superficie bacteriana; por ejemplo, *S. aureus* transporta D-alanina y L-Lisina del citoplasma a la superficie del ácido teicoico para reducir la carga negativa introduciendo el grupo amino [16].

4.2.4. Diseño de péptidos antimicrobianos

Se ha demostrado que existe una relación estrecha entre la estructura y la actividad microbicida y citotóxica de los PAM, que incluyen parámetros como cationicidad, anfipaticidad, hidrofobicidad, estructura secundaria y secuencia de aminoácidos.

La correlación entre los parámetros y el cambio en alguno de ellos permiten el diseño de PAM análogos con un incremento potencial de su actividad [26].

La interacción entre los PAM y la membrana bacteriana se ve favorecida por el aumento en la carga positiva del péptido que se encuentra entre +2 y +9, la cual es uno de los factores críticos para incrementar su actividad antibacteriana; sin embargo, el aumento excesivo en carga puede generar citotoxicidad al hospedero y se pierde la selectividad por las células bacterianas; también, se puede afectar la anfipaticidad y la estructura secundaria, disminuyendo así su potencial microbicida [26, 52].

La anfipaticidad en un péptido antimicrobiano es cuando presenta una zona donde se encuentran los aminoácidos polares (hidrofilicos) y en otra zona los aminoácidos hidrofóbicos, esto determina en gran parte la actividad antimicrobiana y citotóxica.

Esta conformación es necesaria para la unión electrostática inicial entre la región polar del péptido con los fosfolípidos, seguido por la atracción hidrofóbica que le permite la inserción en la bicapa lipídica e interactúa con las cadenas acílicas de los fosfolípidos; sin embargo, el incremento en de la anfipaticidad muestra un incremento en la actividad hemolítica y antibacteriana [26,52].

La hidrofobicidad es otro factor importante que define la potencia antimicrobiana y la selectividad celular. Un estudio de más de 150 PAM naturales reveló que los residuos hidrofóbicos representan por lo general 40-60% de todos los aminoácidos

y que la carga catiónica no está necesariamente inversamente relacionada con la hidrofobicidad. Además, reduce la especificidad de la membrana al tiempo que favorece las interacciones con los fosfolípidos bipolares, por lo tanto aumenta la toxicidad y la actividad hemolítica no deseada en las células eucariotas [26].

La mayoría de los PAM α -helicoidales presentan estructuras desordenadas en soluciones acuosas, pero asumen una conformación helicoidal en la interacción con la bicapa lipídica de la membrana bacteriana.

La inducción a estructura α -helicoidal y hoja β del péptido aumenta la actividad antimicrobiana [53].

Los PAM helicoidales presentan generalmente una glicina en el medio que le sirve para mejorar la flexibilidad estructural y disminuir la toxicidad de la célula hospedera en varios casos [23].

En la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de patógenos resistentes a los antibióticos convencionales, se desarrolló la base de datos APD2 [24], la cual contiene 1662 entradas, entre las cuales se encuentran péptidos con actividad antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena y antivirales, donde se ha observado en general la aparición de los aminoácidos como alanina, glicina y lisina en la mayoría de estos péptidos [24]; y la herramienta de predicción antiBP [25], la cual desarrolló algoritmos para la predicción de péptidos antimicrobianos, basándose en la base de datos APD2, donde se encontró que aproximadamente el 60% de los péptidos antibióticos presentan quince residuos de aminoácidos, entonces, el predictor mapea la estructura primaria y la divide en fragmentos con esta longitud de aminoácidos, de esta forma podemos predecir los segmentos con mayor actividad presentes en la estructura primaria de un péptido nativo; además, el servidor (ca.expasy.org/tools) nos permite utilizar programas para determinar la estructura secundaria de los péptidos cortos y análogos; a partir de estas herramientas bioinformáticas podemos hacer modificaciones estructurales en péptidos que presenten actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*, mejorando sus características de estructura secundaria, radio molecular, carga catiónica neta y predicción de actividad antibacteriana.

Otra importante modificación que hace resistentes a los péptidos antimicrobianos del ataque de proteasas es el uso de D-aminoácidos [54, 55], el cual es un cambio estructural a comprobar en los análogos diseñados de los péptidos que han presentado actividad antimicrobiana en el presente estudio.

4.2.5. Generación de ATP y los mecanismos de defensa

El grado de respuesta de un patógeno a los diferentes ambientes en que se encuentra durante el proceso de infección puede ser medido mediante su capacidad de generar ATP a partir de la membrana plasmática.

Los patógenos invasivos, una vez que han sido fagocitados por los macrófagos, se encuentran formando parte del fagosoma cuyo pH disminuye por acción de la ATPasa vacuolar del hospedero. La exposición a medios ácidos, en la gran mayoría de las bacterias Gram-positivas, como las micobacterias, provoca por una parte la disminución del pH citoplasmático lo cual induce una pérdida de actividad de las enzimas glicolíticas relativamente sensibles a medios ácidos (disminuyendo la capacidad de generar ATP), y por otra parte, daños a la membrana celular y a macromoléculas como ADN y proteínas. De tal manera que su supervivencia dependerá de los mecanismos de resistencia que pueda activar en medios de pH ácido [56].

Una característica común observada en los péptidos antimicrobianos de acción en las membranas celulares es su capacidad de alterar la integridad de la membrana o llevar a la formación de poros. La apertura que se ocasiona en la bicapa lipídica conduce al colapso de los gradientes electroquímicos transmembrana y por lo tanto se lleva a la muerte celular dirigida por la acción de estos péptidos. Dado que la acción de los péptidos antimicrobianos sobre la membrana conlleva a una alteración del potencial, la cual es requerida por la ATP sintasa para la generación de ATP, el cual podría indirectamente afectar la actividad de esta enzima, siendo así un blanco diferente del mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. La enzima ATP sintasa de las micobacterias se ha reportado en estudios recientes como un nuevo blanco terapéutico del compuesto R207910 (Diarylquinolona) utilizado en el esquema de tratamiento de la TB [57]. Muchos PAM poseen un efecto pronunciado en el metabolismo energético celular, sugiriendo que exhiben su actividad citotóxica al alterar el gradiente electroquímico a través de la membrana traducida en energía [58].

El complejo F_1F_0 -ATPasa, juega un papel fundamental en el mecanismo de resistencia a medios ácidos en bacterias Gram-positivas. Este complejo lleva a cabo un transporte activo de protones (H^+) hacia el medio extracelular permitiendo regular el pH intracelular,

el cual Santos y colaboradores demostraron que su actividad ATPasa es inhibida por el péptido modificado MIAP [58].

4.3. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS POR LA ESTRATEGIA Fmoc

La obtención de los péptidos, se hizo mediante la síntesis de péptidos en fase sólida [59], se basa en la unión del aminoácido desde su extremo carboxiterminal (C-terminal) a un soporte insoluble y la posterior elongación secuencial, aminoácido tras aminoácido de la cadena peptídica. El crecimiento de la cadena peptídica tiene lugar siempre por el extremo carboxilo de los aminoácidos, los cuales tienen el extremo α -amino y las cadenas laterales protegidas. Existen dos estrategias distintas para la síntesis de péptidos en fase sólida, la estrategia Boc/Bzl y la estrategia Fmoc/tBu [60]. La estrategia Boc/Bzl utiliza el grupo tert-butoxicarbonil (Boc) como protector de los de los grupos α -amino y grupos del tipo Benzil como protector de las cadenas laterales de los aminoácidos. La estrategia Fmoc/tBu emplea el grupo 9-fluorometoxicarbonil (Fmoc) como protector temporal del grupo α -amino y grupos del tipo tert-butil (tBu) para proteger las cadenas laterales; esto se realiza para evitar, polimerizaciones o reacciones no deseadas entre las cadenas laterales. La estrategia de elección para el desarrollo de este trabajo fue Fmoc/tBu, debido a las condiciones químicas que se utilizan.

Los péptidos se sintetizan sobre un soporte polimérico insoluble (también conocido como resina), que está funcionalizado con un conector o un brazo al que se une el primer aminoácido. Este brazo o linker variará dependiendo del tipo de funcionalización que se desee obtener en el péptido final (carboxilo, amida, aldehído, etc.)

Posteriormente se realiza el acople del primer aminoácido; en este paso, se debe considerar que para que la formación del enlace peptídico sea eficiente y se minimicen los procesos de racemización es necesario una buena activación del grupo α -carboxilo entrante para lo cual se utiliza carbodiimida. La reacción transcurre por un ataque nucleofílico de la carbodiimida al protón de grupo carboxilo del aminoácido, lo que le permite la interacción con el carboxilo del aminoácido, formando un éster simple, el cual en presencia del reactivo HOBt es susceptible de otro ataque nucleofílico para formar un éster modificado que tiene como ventaja ser menos reactivo que el éster simple,

minimizando así el riesgo de racemización. El éster modificado también es susceptible del ataque por parte del grupo nucleófilo de la resina, lo que le permite que se de la unión con ella. Las reacciones de acople se monitorean por medio del ensayo de Nihidrina, que consiste en una reacción colorimétrica que permite determinar si existen grupos aminos primarios libres en el extremo N-terminal de la cadena peptídica en crecimiento [59].

El ácido trifluoroacético es utilizado en el desanclaje de la cadena peptídica de la resina y los grupos protectores de las cadenas laterales. En estas condiciones, el protector de la cadena lateral produce carbocationes los cuales pueden reaccionar con las cadenas laterales de los aminoácidos ricos en electrones (Cys, Met, Tyr, Thr, Ser, Trp), dando lugar a subproductos no deseados. Para minimizar este fenómeno, se añade secuestrantes de carbocationes, los cuales reaccionan rápidamente con los carbocationes, evitando reacciones no deseadas [61].

En la figura 4 se esquematiza los pasos generales de síntesis en fase sólida, donde el primer aminoácido se une mediante enlace covalente al brazo funcionalizado de la resina, luego mediante n ciclos se forma la cadena peptídica de interés.

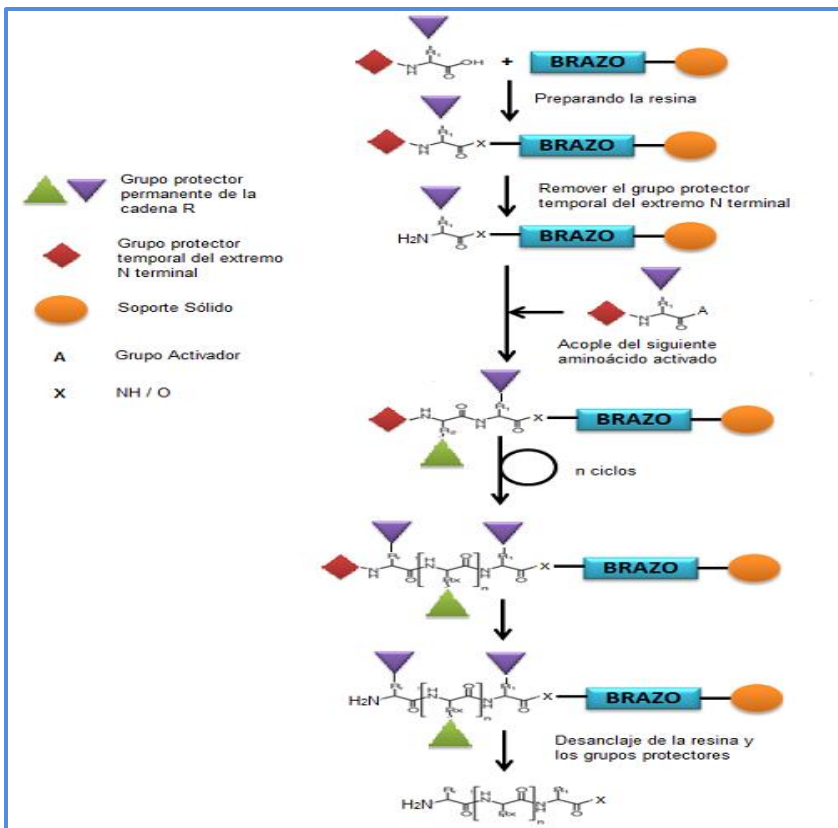


Figura.4. Esquema de síntesis en fase sólida

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño “*In silico*” de los análogos de péptidos antimicrobianos

Utilizando herramientas bioinformáticas, se diseñaron y analizaron secuencias análogas de los péptidos con actividad moderada antimicobacteriana o péptidos antibacteriales reconocidos (LL37, bombinina, protamina, dermacidina 1L, maximina 1, CAP 18, SMAP 29, PMAP 36 y Cecropina B).

Para hacer esto se utilizó el método de predicción antiBP <http://www.imtech.res.in/raghava/antibp/submit.html> y la base de datos APD (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), se buscaron secuencias de 15 aminoácidos en la secuencia de los péptidos con el mejor carácter antibacterial, con carga positiva y estructura alfa-hélice para garantizar la interacción con la membrana. Luego se mejoraron las características de los péptidos como compuestos antimicrobianos con el mismo análisis pero modificando la estructura primaria de las secuencias seleccionadas en estos péptidos hasta lograr aumentar sus características antibacteriales; la predicción de la estructura secundaria se determinó con el programa PSSpred (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/PSSpred>), estructura primaria y peso molecular se determinó con la herramienta <http://web.expasy.org/protparam/>.

Para explicar mejor aún la metodología del diseño se anota lo siguiente: mediante el mapeo de las estructuras primarias nativas de los péptidos antimicrobianos en segmentos de 15 residuos de aminoácidos se encontraron las regiones que por predicción tuvieron mejor actividad antibacteriana a los cuales se les denominó péptidos cortos; posteriormente se generaron análogos de estos péptidos cortos haciendo cambios de aminoácidos y volviendo a hacer uso de la herramienta de predicción con cada aminoácido cambiado recorriendo toda la secuencia del péptido hasta lograr mejorar la característica de estructura helicoidal anfipática necesaria para la interacción con la membrana celular de las micobacterias, apoyándose en la predicción de cada análogo se generó un grupo de péptidos análogos para determinar su potencialidad como compuestos antituberculosos.

5.2. Síntesis de péptidos en fase sólida por la estrategia F-moc

Inicialmente se definió como péptidos blanco los fragmentos de 15 aminoácidos derivados de los péptidos antimicrobianos estudiados y como péptidos análogos los diseñados con nuestra metodología. Para la síntesis de los péptidos blanco y análogos se utilizó la metodología de síntesis en fase sólida Fmoc [61] usando como soporte sólido 200mg de la resina Rink amida con una sustitución de 0,52 mmol/g; como disolventes se utilizaron diclorometano (DCM), isopropanol (IPA), N,N'-dimetilformamida (DMF) y como activadores de la reacción de acople 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). De acuerdo con esta metodología de síntesis se emplearon L- α - aminoácidos como grupo protector 9-fluorenilmetoxicarboxilo de la función α -amino terminal y en la desprotección de este grupo se utilizó piperidina en DMF 25%. El protector de la cadena lateral para la Lisina (K) usada es el tertbutoxicarbonilo (Boc), para otros aminoácidos es el grupo tertbutilo (tBu), y algunos no poseen protección en su cadena lateral cuando su reactividad es nula como el caso de la Alanina. Para iniciar la síntesis la resina Rink amida tiene el grupo Fmoc como protector, por lo tanto, es desprotegida con Piperidina 25% en DMF durante 15 minutos (2 veces), luego la resina-péptido se lava con DMF (5 x 1 min), IPA (2 x 1 min) y DCM (2 x 1 min); se adiciona el aminoácido previamente activado con N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en DMF, con agitación constante durante 15 min. Esta solución es filtrada para eliminar el residuo insoluble y se adiciona a la resina. La mezcla de reacción se deja en agitación constante por 24 h a temperatura ambiente y se hacen lavados con DMF (2 x 1 min), 2-propanol (IPA) (2 x 1 min) y diclorometano (DCM) (2 x 1 min). Esta reacción es monitoreada por medio del ensayo de Ninhidrina, el cual consiste en una reacción colorimétrica que permite determinar si existen grupos aminos primarios libres en el extremo N-terminal de la cadena peptídica en crecimiento hasta ensayo negativo, o se repite la reacción de acople; en el caso que la reacción de coloración amarilla, es decir, resultado negativo, lo cual nos indica que la reacción de síntesis se completó, es decir, se puede continuar con el siguiente aminoácido. Al finalizar la síntesis se usó una solución de ácido trifluoroacético (TFA) 95%, triisopropilsilano (TIS) 2,5% y agua 2,5% para liberar el péptido de la resina y se extrae con éter. En los casos en los cuales no finalizaba la reacción de acople, se repitieron acoples mediante activación del

aminoácido con TBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronium tetrafluoroborato) y DIEA (N,N-Diisopropiletilamina) con un tiempo de reacción de 1,5 horas.

Purificación y Caracterización

Los péptidos se analizaron por medio de HPLC en fase reversa, en una columna RP 18 marca Waters (cromatógrafo L7400 LaChrom Merck Hitachi), en la que se eluyen 10,00 μ L de muestra en un gradiente A/B de 0 a 70% B (A: Agua desionizada TFA 0,05%, B: acetonitrilo TFA 0,05%) en 45 minutos, con flujo de solvente utilizado de 1,0 mL/min a temperatura ambiente. A partir de la primera corrida en la columna analítica se determinaron los tiempos de retención de los péptidos crudos, posteriormente se hizo la purificación en columnas Sepak C-18 con 40 μ g del péptido (de acuerdo al tamaño de la columna) se eluyen según el porcentaje de acetonitrilo determinado en la columna HPLC-RP analítica, se hace un estimativo de los porcentajes y el gradiente de elución se hace manualmente.

La determinación del peso molecular se hace a partir de espectrometría de masas MALDI-TOF (con ionización por desorción de láser asistida por una matriz y analizador de tiempo de vuelo) es una técnica que ha sido desarrollada con el fin de determinar el peso molecular (PM) promedio de los péptidos. La determinación del PM de los péptidos sintetizados se hace por aplicación de pulsos de 3 ns, con un láser de N₂ a 337 nm sobre la mezcla sólida péptido-matriz (DHB). El voltaje de aceleración fue de +17.5 kV, y el voltaje del reflector fue 20 kV. El espectro se obtiene sumando 20 pulsos de láser para lograr condiciones comparables.

Preparación de la muestra para Espectrometría de Masas (EM): se prepara una solución saturada de matriz, para lo cual se pesa 70 mg de matriz DHB, se le adiciona 1.5 mL de agua:acetonitrilo (2:1) y 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA). Aparte se pesa aproximadamente 0.2 mg de péptido y se disuelve en 1 mL de agua desionizada; luego se mezclan 18 μ L de solución de matriz y 2 μ L de péptido, obteniendo una relación molar aproximada de matriz:analito (10000:1). De esta mezcla se toman 2 μ L y se aplica sobre uno de los pozos de un disco portamuestra y se seca al aire.

5.3. Dicroísmo Circular

Los péptidos se analizan en un espectropolarímetro, calibrado con ácido d-10-camforsulfónico, con corrección de la línea base y análisis de resultados mediante un programa de JASCO. El equipo está provisto de un accesorio portacubetas con termostato conectado a un baño refrigerante Neslab a 22 °C; se utilizan celdas de cuarzo cilíndricas (Hellma) de 0,01 cm de paso de luz. Las condiciones para la toma del espectro en el equipo son: corrimientos de 0.2 nm, ancho de banda 1 nm, respuesta 2 s, sensibilidad estándar, rango de 160-290 nm, el barrido de 20 nm/min, previo al registro se hacen tres acumulaciones del espectro. Se prepara una solución de la muestra a 2mM y se usa a 200 μ M, las muestras se trabajan en agua, solución acuosa al 30% de TFE y se registra el espectro para cada péptido. Se realiza una corrección de la línea base por sustracción del espectro del solvente y suavizado del espectro [62].

5.4. Selección de cepas y cultivo de micobacterias

Para la evaluación de los péptidos antimicrobianos se utilizó la cepa saprofita de crecimiento rápido *M. smegmatis* mc²155. Las micobacterias se cultivan con agitación en medio LB a 37°C hasta un OD₆₀₀: 0,4-0,5 durante 4-6 días. Los residuos de cultivo se inactivan en autoclave (121°C, 1.5 atm).

5.5. Ensayo de Viabilidad con Resazurina

Este ensayo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realiza en una microplaca, en la cual se dispone de 4,8 μ L del péptido modificado de concentración de 50 μ g/mL, luego se van haciendo diluciones seriadas a la mitad en cada pozo, posteriormente se mezclan con 100 μ L de una dilución 1:100 de cultivo de *M. smegmatis* mc²155 en fase logarítmica OD₆₀₀: 0,4-0,5. Para el pozo de control positivo se utiliza 1,0 μ L de kanamicina y el control negativo con medio de cultivo y suspensión bacteriana. La placa se incuba a 37°C por 4 días, luego se agregan 30 μ L del colorante resazurina 5mg/mL se incuba por 24 horas. Una coloración azul a rosa indica crecimiento bacteriano. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración más baja del péptido en la cual se aprecia cambio de color. Estas determinaciones se hacen por triplicado [63].

5.6. Determinación de la actividad hemolítica

Para la determinación de la actividad hemolítica de los péptidos antimicrobianos se sembraron en cajas de 96 pozos fondo en U (Corning, USA), 0,1 mL de suspensión de eritrocitos humanos de donantes sanos grupo O Rh positivo por pozo, a una concentración de 2% de su hematocrito final en Solución Salina al 0.9% (Baxter, Colombia). Se evaluaron por duplicado ocho concentraciones distintas de cada péptido en solución salina realizando diluciones seriadas a partir de 50µg/mL. Fueron incluidos pozos controles con iguales diluciones de Insulina como péptido control no relacionado sin actividad hemolítica documentada, Kanamicina como molécula de naturaleza no peptídica y fármaco de referencia en el manejo de la tuberculosis, Eritrocitos no expuestos a péptido en Solución Salina correspondiente al 0% de hemólisis, y Eritrocitos en Agua Destilada Estéril como control del 100% de hemólisis. Luego de la incubación a 37°C con CO₂ al 5% durante 2 horas, las cajas fueron centrifugadas a 3500 r.p.m. y los sobrenadantes fueron recolectados para la determinación de la concentración de hemoglobina mediante su lectura a 540nm en un Espectrofotómetro digital en el Laboratorio – del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Los datos fueron exportados a Microsoft Excell 2000 para su procesamiento y posteriormente analizados mediante el programa GraphPad Prism 5.0 Trial Version ® (La Jolla, CA, USA) para la determinación de la concentración hemolítica media (CH₅₀) la cual corresponde a la concentración del péptido que ocasionó la hemólisis del 50% de los eritrocitos en suspensión [64].

Hematíes

Los glóbulos rojos fueron obtenidos de un donante sano con hemoclasificación O Rh positivo teniendo en cuenta la regulación respecto a la donación de muestras con propósitos de investigación dadas por el Ministerio de Salud y Protección Social de la República de Colombia (Resolución No. 008430 1993, Octubre 4 de 1993). Los eritrocitos fueron separados mediante la centrifugación de sangre completa y posteriormente suspendidos en Solución Salina estéril al 0,9% (Baxter, Colombia) para su uso posterior en los ensayos de Hemólisis.

5.7. Aislamiento de membrana celular de micobacteria

El aislamiento de la membrana de *M. smegmatis* mc²155 se basó en el método modificado por Santos y colaboradores [60]. La micobacteria crecida hasta fase exponencial en medio LB, a partir de un cultivo de 1,8 L, se centrifugó a 4000 Xg durante 10 min a 4°C; el sedimento formado por las bacterias se lava en solución de lisis y homogenización (Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1,0 mM; y Fluoruro de fenilmetil-sulfonio (PMSF) 0,3 mM); en solución tamponada MOPS-Tris 10 mM; pH 7,4.

El pellet se añade en tubos de plástico de tapa rosca con empaque de seguridad de 2 ml, conteniendo 500 µl de perlas de vidrio de 0,1 mm de diámetro. A continuación las células se someten a 8 pulsos de 50s en un desintegrador celular mecánico (Mini BeadBeater-16, Biospec products). La suspensión de la ruptura celular es centrifugada a 7000Xg durante 30 min a 4°C.

El sobrenadante se separa para realizar la extracción de la membrana. Este se deposita en un tubo y se completa a volumen con buffer de lisis, posterior ultracentrifugación 25000 Xg por 30min a 4°C, luego se separa el sobrenadante y se separa por ultracentrifugación a 100000g por 90min a 4°C, se obtienen las membranas en el sedimento formado y se resuspenden en 500µL de solución de resuspensión (sacarosa 248mM en solución amortiguadora MOPS-Tris 10 mM pH 7,2) se alícuota y se almacena a -80°C hasta su uso.

La determinación de la concentración de proteína de membrana se hace por el método de Bradford-Zor-Selinger empleando albúmina de suero bovino (BSA) fracción V como patrón

5.8. Determinación de la actividad ATPasa basal de membrana celular de micobacterias, por medición del Fosfato inorgánico liberado

La metodología seguida fue la descrita por Cariani y colaboradores [65], en la cual se modifica el método de Método Fiske & Subbarow, incorporando citrato de bismuto para estabilizar los complejos de molibdeno formados (Anexo 1: Preparación de reactivos)

CURVA DE CALIBRACIÓN

Se varia la cantidad de fósforo inorgánico (Pi) entre 0-10 nmol por pozo. Se coloca de 0-10 µL de la solución patrón PI 1 y se completa a volumen a 50 µL en cada pozo.

REACCIÓN DE COLORACIÓN

Luego de mezclar bien, agregar a cada pozo 100 µL de Solución II-P recién preparada. Incubar en hielo 10 minutos. Agregar 150 µL de Solución III-P. Incubar a 37°C 10 minutos. Leer absorbancia a 690 nm.

5.9. Efecto de los péptidos sintetizados en la actividad ATPasa basal por medición de fósforo inorgánico (Método modificado de Fiske & Subbarow)

Se usó el procedimiento (5.8) de Cariani y colaboradores [65], para evaluar el efecto de los péptidos sintetizados en la actividad ATPasa basal, siguiendo la reacción de coloración de Fiske & Subbarow en una placa de Elisa de 96 pozos y determinando valores de absorbancia a 690 nm en un iMark™ Microplate Absorbance Reader (BioRad).

Brevemente, a cada pozo de reacción se añadieron 100µL del péptido a ensayar en una concentración final de 83,30µM (LL37-A, LL37-B, bombinina-A, bombinina-B, protamina-A, protamina-B, dermacidina 1L-A, dermacidina 1L-B, maximina 1-A, maximina 1-B, CAP 18-A, CAP 18-B, SMAP 29-A, SMAP 29-B, PMAP 36-A, PMAP36-B, Cecropina B-A y Cecropina B-B). La reacción se realizó en un volumen final de 50µL, usando 37,8µg de proteína de membrana de *M. Smegmatis mc²155* (extraída según procedimiento 5.7), buffer MOPS pH 7,4 10 mM, MgCl₂ 30 mM y finalmente sal disódica de ATP 82,6mM para iniciar la reacción enzimática. Transcurridos 30 minutos de reacción a 37°C la reacción se detuvo agregando las soluciones de coloración así: 100 µL de Solución II-P recién preparada, incubación en hielo por 10 min; 150µL de solución III-P; incubación a 37°C por 10 min y finalmente lectura de absorbancia a 690 nm.

Una reacción similar en ausencia de péptido se realizó para determinar la actividad ATPasa basal en ausencia de inhibición. Finalmente, en cada caso se realizó un blanco de reacción reemplazando el ATP por agua desionizada.

6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Diseño “*In silico*” de análogos de péptidos antimicrobianos

El diseño “*In silico*” de análogos de péptidos antibacteriales se realizó usando el servidor AntiBP en esta base fueron analizados 1662 péptidos antibacteriales, 187 bacteriocinas (toxinas proteicas sintetizadas por bacterias con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias similares o de cepas cercanas) y 293 péptidos antimicrobianos de plantas no antibacteriales obtenidos de la base de datos APD2 para el desarrollo de tres diferentes algoritmos matemáticos basados en el uso de patrones binarios de las secuencias peptídicas; la metodología utilizada para la predicción corresponde al algoritmo SVM (máquina de vectores de soporte o máquinas de soporte vectorial), ya que presenta los valores de precisión, sensibilidad y especificidad más altos, por ende generándonos la mejor predicción antibacterial de las secuencias estudiadas.

El programa determina un puntaje antibacterial para una secuencia peptídica determinada; a partir de la secuencia peptídica nativa de cada uno de los péptidos seleccionados para este estudio: LL37, bombinina, protamina, dermacidina 1L, maximina 1, CAP 18, SMAP 29, PMAP 36 y Cecropina B; se realiza un mapeo de la secuencia en los dos sentidos desde el extremo amino terminal y desde el extremo carboxilo terminal para considerar todos los posibles fragmentos de 15 residuos, permitiendo determinar por predicción bioinformática la región con mayor actividad antibacterial. Esta predicción antibacterial presenta un valor máximo de 5 y sólo los valores positivos presentarán actividad.

En la tabla 1 se encuentran los resultados de los péptidos cortos (blancos) de 15 residuos derivados de la secuencia de cada péptido analizado, recorriendo toda la secuencia de los péptidos nativos en cada caso, de todos los posibles se eligió aquella secuencia que presentó el mayor valor antibacterial con el programa de predicción (se omitieron las secuencias con valores negativos), en la tabla 1, se presenta también la carga del péptido en cada caso determinada por método predictivo de estructura primaria con la secuencia del péptido.

Tabla 1. Predicción Bioinformática del carácter antibacterial de los péptidos antimicrobianos

Péptido	Estructura primaria	Valor antibacterial	Carga neta
LL37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR NLVPRTES	N.A	11
	FRKSKEKIGKEFKRI	2,108	7
	GDFFRKSKEKIGKEF	1,789	5
	FFRKSKEKIGKEFKR	1,640	6
	DFFRKSKEKIGKEFK	1,412	6
	LLGDFFRKSKEKIGK	1,065	5
	KEKIGKEFKRIVQRI	0,790	6
	RIVQRIKDFLRNLVP	0,743	4
	IGKEFKRIVQRIKDF	0,673	5
	LGDFFRKSKEKIGKE	0,636	5
	IVQRIKDFLRNLVPR	0,519	4
	KSKEKIGKEFKRIVQ	0,207	5
	RIKDFLRNLVPRTES	0,056	4
	RKSKEKIGKEFKRIV	0,036	7
Bombinina	GIGALSAKGALKGLAKGLAQHFAN	N.A	3
	GALSAKGALKGLAKG	1,101	3
	GIGALSAKGALKGLA	1,000	2
	ALSAKGALKGLAKGL	0,705	3
	SAKGALKGLAKGLAQ	0,638	3
	GALKGLAKGLAQHFA	0,437	2
	AKGALKGLAKGLAQH	0,327	3
	ALKGLAKGLAQHFAN	0,103	2
Protamina	PRRRRSSSRPVRRRRRPRVSRRRRRR GGRRRR	N.A	21
	RVSRRRRRRGGRRRR	2,265	11
	RRPRVSRRRRRRGGRR	1,599	10
	SRPVRRRRRPRVSRR	1,288	9
	RRRRRPRVSRRRRRR	1,174	12
	PRVSRRRRRRGGRRRR	1,119	10
	RRRPRVSRRRRRRGG	0,893	10
	RRRRSSSRPVRRRRRR	0,863	10
	VRRRRRPRVSRRRRRR	0,785	11
	RRSSSRPVRRRRRRPR	0,591	9
	RRRRRPRVSRRRRRRG	0,557	11
	RSSSRPVRRRRRRPRV	0,377	8

	RPVRRRRRPRVSRRR	0,285	10
	RRRSSSRPVRRRRRP	0,274	9
	RPRVSRRRRRRGGRR	0,163	10
	SSSRPVRRRRRPRVS	0,157	7
	PVRRRRRPRVSRRRR	0,149	10
	PRRRRSSSRPVRRRR	0,140	9
Dermacidina 1L	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVE DLESVGKGAVHDVKDVLDSVL	N.A	-1
	GLDGAKKAVGGLGKL	1,980	2
	GAKKAVGGLGKLGKD	0,992	2
	SSLLEKGLDGAKKAV	0,951	1
	DLESVGKGAVHDVKD	0,630	-2
	KGLDGAKKAVGGLGK	0,368	3
	AKKAVGGLGKLGKDA	0,330	2
	DGAKKAVGGLGKLGK	0,328	3
	SLLEKGLDGAKKAVG	0,082	1
CAP 18	GLRKRLRKFRNKIKEKLLKIGQKIQGLLP KLAPRTDY	N.A	12
	RNKIKEKLLKIGQKI	2,674	6
	GLRKRLRKFRNKIKE	2,149	7
	LRKFRNKIKEKLLKI	1,709	7
	FRNKIKEKLLKIGQK	1,674	6
	KIKEKLLKIGQKIQQ	1,645	5
	IGQKIQGLLPKLAPR	1,217	3
	RLRKFRNKIKEKLLK	1,158	8
	KFRNKIKEKLLKIGQ	0,994	6
	KRLRKFRNKIKEKLLK	0,904	8
	LRKRLRKFRNKIKEK	0,899	8
	RKFRNKIKEKLLKIG	0,709	7
	NKIKEKLLKIGQKIQ	0,549	5
	KLKIGQKIQGLLPK	0,499	5
KIGQKIQGLLPKLAP	0,116	3	
SMAP 29	RGLRRLGRKIAHGVKKYGPTVLRRIIRIAG	N.A	9
	GLRRLGRKIAHGVKK	2,242	6
	RLGRKIAHGVKKYGP	1,828	5
	RRLGRKIAHGVKKYG	1,455	6
	RGLRRLGRKIAHGVK	1,356	6
	IAHGVKKYGPTVLRRI	1,147	3
	GRKIAHGVKKYGPTV	0,859	4
	GVKKYGPTVLRRIIRI	0,759	4
	LRRRLGRKIAHGVKKY	0,676	6
	RKIAHGVKKYGPTVL	0,070	4

P MAP 36	GRFRRLRKKTRKRLKKIGKVLKWIPPIVG SIPLGCC	N.A	13
	GRFRRLRKKTRKRLK	3,357	10
	FRRLRKKTRKRLKKI	2,438	10
	RLRKKTRKRLKKIGK	2,343	10
	KTRKRLKKIGKVLKW	1,635	8
	RRLRKKTRKRLKKIG	1,553	10
	RKKTRKRLKKIGKVL	1,402	9
	RFRLRKKTRKRLKK	1,354	11
	LRKKTRKRLKKIGKV	1,273	9
	KKTRKRLKKIGKVLK	1,146	9
	TRKRLKKIGKVLKWI	1,091	7
	KIGKVLKWIPPIVGS	0,737	3
	RLKKIGKVLKWIPPI	0,705	5
	KRLKKIGKVLKWIPP	0,588	6
	RKRLKKIGKVLKWIP	0,147	7
Maximina 1	GIGTKILGGVKTALKGALKELASTYAN	N.A	3
	GIGTKILGGVKTALK	1,455	3
	GVKTALKGALKELAS	1,054	2
	GTKILGGVKTALKGA	0,882	3
	ILGGVKTALKGALKE	0,580	2
	ALGALKELASTYAN	0,386	1
	KILGGVKTALKGALK	0,174	4
	GGVKTALKGALKELA	0,027	2
Cecropina B	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVL GEAKAL	N.A	7
	RNIRNGIVKAGPAIA	1,454	3
	KVFKKIEKMGRNIRN	0,943	5
	GRNIRNGIVKAGPAI	0,840	3
	VFKKIEKMGRNIRNG	0,755	4
	GIVKAGPAIAVLGEA	0,498	0
	KWKVFKKIEKMGRNI	0,437	5
	KIEKMGRNIRNGIVK	0,304	4
	WKVFKKIEKMGRNIR	0,273	5
	KMGRNIRNGIVKAGP	0,238	4
	RNGIVKAGPAIAVLG	0,097	2
	IEKMGRNIRNGIVKA	0,017	3

*N.A: no aplica

Otro parámetro importante para el diseño racional de péptidos antibacteriales es la tendencia a formar estructuras secundarias helicoidales; se analizaron las secuencias con el servidor PSSpred (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/PSSpred>), el cual es un

consenso de 7 predictores basados en redes neuronales con diferentes parámetros y perfil de datos, para la predicción de la estructura secundaria.

Se determinó la estructura secundaria de las secuencias que presentaron los mejores valores antibacteriales, en algunos casos no se tomó la secuencia de mayor puntaje antibacterial sino la siguiente debido a que presentan mejor predicción de estructura helicoidal, es importante recordar que el predictor asume que la molécula se encuentra en el vacío, es decir, solo tendrá en cuenta las posibles interacciones en el péptido.

El diseño "*In silico*" del péptido análogo se realizó teniendo en cuenta cambios en la estructura primaria de la secuencia elegida, a partir de las cuales se hicieron cambios de aminoácidos puntuales en la estructura primaria, para aumentar la carga positiva del péptido con lisina o arginina, en algunos casos dependiendo de la posición en la secuencia se utilizaron aminoácidos como glicina y leucina entre otros, los cuales permiten un mejor valor antibacterial; un tercer parámetro a optimizar es la anfipaticidad de la secuencia, es decir, que contenga regiones con carga positiva (aminoácidos catiónicos) y regiones apolares (aminoácidos hidrofóbicos), para permitir una mejor interacción entre el péptido y la membrana celular micobacteriana, donde la región catiónica inicia la interacción electrostática con los fosfolípidos presentes los cuales poseen carga negativa, posteriormente, se puede dar la inserción en la bicapa lipídica dada por la interacción entre los lípidos y los aminoácidos hidrofóbicos del péptido antimicrobiano, esto puede conducir a lesiones fatales en la micobacteria; se verificaron las características de estructura primaria con el programa protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>); el diseño anfipático logrado en las moléculas análogas se puede observar en la representación de rueda helicoidal ó helicoidal Wheel. A partir de la optimización de estos parámetros se obtuvieron secuencias análogas que puedan presentar mejor actividad antibacteriana contra micobacterias.

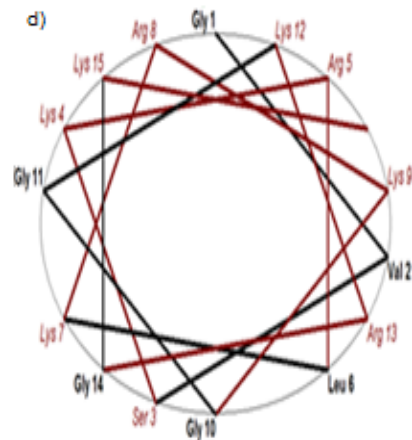
En la figura 5 se encuentran los resultados de predicción bioinformática: estructura secundaria, valor antibacterial y representación de helicoidal Wheel de la secuencia análoga diseñada (en rojo los aminoácidos con carga positiva, en negro los aminoácidos hidrofóbicos) de las secuencias primarias nativas y mejor secuencia encontrada.

Protamina

a) PRRRRSSSRPVRRRRRRPRVSRRRRRRGGRRRR
CHHHCCCCCHHHHHCCCHHHHHHHHHCCCCC

b) RVSRRRRRRGGRRRR (2,265) **Protamina-A**
CCHHHHHHHCCCCC

c) GVS**KRLKRKGGKRGK** (3,781) **Protamina-B**
CCHHHHHHHCCCCC



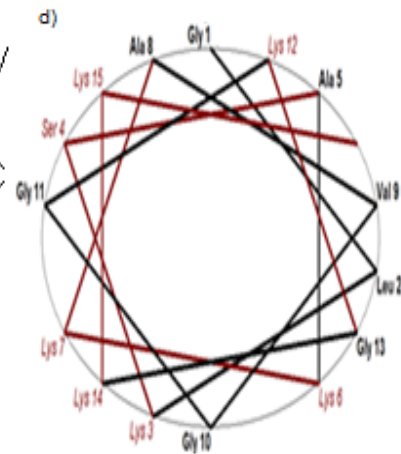
Dermacidina 1L

a) SSLLKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGGKAV
HDVKDVLDSVL

CHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHCCC
CCCCHHHHHHHHCC

b) GLDGAKKAVGGLGKL (1,980) **Dermacidina 1L-A**
CCCHHHHHHHCCCCC

c) GL**KS**AKKAVGG**KGK**K (3,567) **Dermacidina 1L-B**
CCCHHHHHHHCCCCC

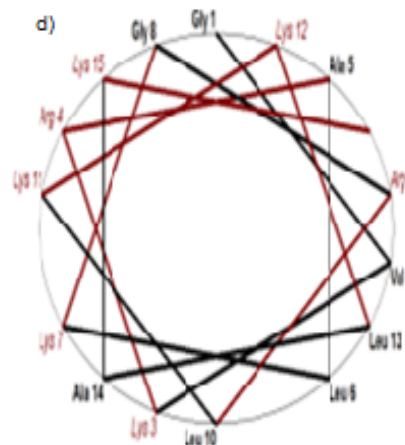


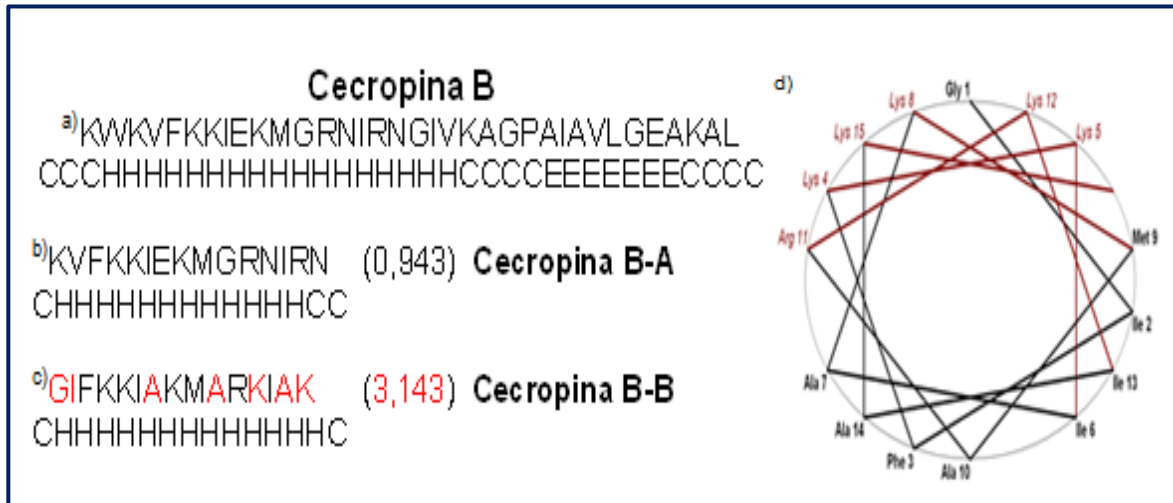
Maximina 1

a) GIGTKILGGVKTALKGALKELASTYAN
CCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCC

b) GVKTALKGALKELAS (1,054) **Maximina 1-A**
CCCHHHHHHHHHHHHCC

c) GVK**R**ALKG**R**LK**K**LAK (3,028) **Maximina 1-B**
CHHHHHHHHHHHHHHCC





El péptido LL37 es un péptido de 37 aminoácidos, recorriendo la secuencia se encontró el fragmento con mejor valor antibacterial, características estructurales y de carga en este péptido, un segmento de 15 residuos, con un valor antibacterial de 2,108, una predicción helicoidal y carga +5, el cual se denominó LL37-A, se diseñó hasta convertirlo en un péptido con predicción antibacterial de 3,120 (LL37-B) y carga +8, manteniendo la estructura helicoidal y la característica de anfipaticidad observada en la rueda helicoidal donde se aprecia en rojo la cara hidrofílica y en negro la cara hidrofóbica de la posible hélice.

El péptido bombinina presenta una estructura primaria de 24 aminoácidos, luego del análisis de la estructura se encontró la secuencia de 15 aminoácidos con el mayor valor antibacterial, características estructurales y carga +3, el péptido denominado bombinina-A con un valor antibacterial de 1,101, el cual se diseñó hasta aumentar su carga a +7 y una predicción antibacterial de 2,715, mejorando la estructura helicoidal y la anfipaticidad del péptido, en la cual se aprecia en rojo la parte positiva y en negro la parte hidrofóbica.

El péptido protamina presenta una secuencia de 32 aminoácidos, en el cual después de ser analizado se encontró el fragmento de 15 aminoácidos con las mejores características de valor antibacterial, estructura helicoidal y carga +11, el cual se denominó Protamina-A, con un valor antibacterial de 2,265, el cual fue mejorado aumentando su hidrofobicidad manteniendo su estructura helicoidal, con un valor antibacterial de 3,781 y carga +8 denominado Protamina-B; en la representación de rueda helicoidal se aprecia en rojo la cara de carga positiva y en negro la cara hidrofóbica del péptido.

El péptido dermacidina 1L presenta una estructura compuesta por 47 aminoácidos, la cual se analizó y se obtuvo el fragmento de 15 aminoácidos con mejor valor antibacterial y estructura secundaria, el cual corresponde a dermacidina 1L-A, su valor antibacterial fue 1,980 y carga +2; a partir de los cambios en su estructura primaria se obtuvo el péptido mejorado dermacidina 1L-B con un valor antibacterial de 3,567, el cual mantiene la característica de estructura helicoidal y con una carga de +6; en la representación de rueda helicoidal se aprecia en negro la zona hidrofóbica y en rojo la zona hidrofílica del péptido mejorado.

El péptido maximina 1 presenta una longitud de 27 aminoácidos, a partir del análisis de su estructura se encontró el fragmento de 15 aminoácidos que presenta las mejores características de valor antibacterial y estructura helicoidal, el cual corresponde a maximina 1-A, con un valor antibacterial de 1,054 y carga +2; a partir de los cambios realizados a este péptido mejorando su valor antibacterial hasta 3,028, con carga +7 y una hélice casi perfecta por predicción bioinformática, denominado maximina 1-B; en la representación de rueda helicoidal se aprecia en rojo los aminoácidos hidrofílicos y en negro los aminoácidos hidrofóbicos.

El péptido CAP 18 presenta una longitud de 37 aminoácidos, el cual se analizó y se encontró el fragmento de 15 aminoácidos con mejor valor antibacterial y estructura helicoidal, denominado CAP 18-A, con un valor antibacterial de 2,674 y carga +6 ; este péptido se mejoró haciendo cambios en su estructura primaria, el cual corresponde a CAP 18-B, con un valor antibacterial de 3,502, con carga +8, la representación rueda helicoidal muestra en rojo la zona hidrofílica y en negro la zona hidrofóbica del péptido CAP 18-B.

El péptido SMAP 29, tiene una secuencia primaria de 29 aminoácidos, el cual después de ser analizado se encontró el segmento de 15 aminoácidos que presenta el mejor valor antibacterial y estructura helicoidal; denominado SMAP 29-A con un valor antibacterial de 2,242 y carga +6, haciendo cambios en su estructura primaria se mejoró y corresponde al péptido SMAP 29-B , con un valor antibacterial de 3,061, manteniendo su estructura helicoidal y con una carga de +8, la representación de rueda helicoidal muestra en rojo la cara hidrofílica y en negro la cara hidrofóbica.

El péptido PMAP 36, tiene una longitud de 36 aminoácidos, luego de ser analizado se encontró el fragmento de 15 aminoácidos con las mejores características de valor

antibacterial y estructura helicoidal, el cual corresponde a PMAP 36-A, con un valor antibacterial de 3,357 y carga +10; haciendo cambios en su estructura primaria se mejoró sus características, el cual corresponde a PMAP 36-B, con un valor antibacterial de 3,376, estructura helicoidal y carga +9; la representación de rueda helicoidal muestra en rojo la zona hidrofílica y en negro la zona hidrofóbica.

El péptido Cecropina B presenta una longitud de 35 aminoácidos, fue analizado y se encontró el segmento de 15 aminoácidos que presenta las mejores características de valor antibacterial y estructura helicoidal; denominado Cecropina B-A; con un valor antibacterial de 0,943 y carga +5; a partir de los cambios realizados en la estructura primaria se obtuvo el péptido Cecropina B-B, con un valor antibacterial de 3,143, estructura helicoidal mejorada y carga +6; en la representación de rueda helicoidal se aprecia en rojo la zona hidrofílica y en negro la zona hidrofóbica.

Características similares de valor antibacterial, carga y estructura helicoidal en mayor o menor grado se buscaron en todos los péptidos diseñados. Con esto tratamos de obtener moléculas que tuvieran las características de péptidos antimicrobianos que puedan presentar una buena actividad contra el agente patógeno.

6.2. Síntesis de péptidos y caracterización

La síntesis química se hizo en fase sólida por la metodología Fmoc, la cual consiste en la elongación de la cadena peptídica por la adición sucesiva de los aminoácidos unidos por la formación del enlace amida entre el grupo carboxilo del aminoácido subsecuente y el grupo amino del aminoácido previamente unido a la matriz sólida, hasta obtener la cadena de la longitud deseada. En la síntesis se hizo difícil el acople entre aminoácidos con cadenas laterales grandes seguidos y se requirió de un segundo o tercer acople, en algunos casos fue necesario usar como activador TBTU (O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium tetrafluoroborato) y estos agentes convierte los grupos N protectores en su correspondiente OBt ester; también es necesario una amina terciaria DIPEA (Diisopropiletilamida), el cual permite la formación de carboxilatos de los grupos N protectores de los aminoácidos que reaccionan con los reactivo de acople.

En general, las secuencias que presentaban arginina seguida de lisina o lisina-lisina, requirieron varios ciclos de acople.

Las secuencias sintetizadas se encuentran resumidas en la tabla 2 con su valor de carga y la comparación del peso molecular esperado y obtenido después de la síntesis. El péptido corto denominado **Blanco**, corresponde a la epítotope de 15 residuos de aminoácidos con mayor valor antibacterial luego del mapeo realizado por el servidor AntiBP y con estructura helicoidal; el péptido **Análogo** corresponde a la secuencia final mejorada por diseño del péptido blanco.

Tabla 2. Secuencias peptídicas sintetizadas por la metodología F-moc y caracterización del peso molecular por espectrometría de masas MALDI-TOF

PÉPTIDO	PÉPTIDO	SECUENCIA	CARGA	*P.M (Da)	P.M (Da)
LL37	LL37-A (Blanco)	FRKSKEKIGKEFKRI	+5	1894,5	1894,50
	LL37-B (Análogo)	GRKSAKKIGKRAKRI	+8	1697,3	1696,24
Bombinina	Bombinina-A (Blanco)	GALSAKGALKGLAKG	+3	1341,8	1363,15
	Bombinina-B (Análogo)	GLKSAKKALKRLAKK	+7	1640,3	1639,81
Protamina	Protamina-A (Blanco)	RVSRRRRRRGGRRRR	+11	2036,6	2036,71
	Protamina-B (Análogo)	GVSKRLKRKGGKRGK	+8	1655,2	1654,92
Dermacidina 1L	Dermacidina 1L-A (Blanco)	GLDGAKKAVGGLGKL	+2	1383,9	1383,49
	Dermacidina 1L-B (Análogo)	GLKSAKKAVGGKGGK	+6	1457,0	1456,68
Maximina 1	Maximina 1-A (Blanco)	GVKTALKGALKELAS	+2	1486,0	1485,68
	Maximina 1-B (Análogo)	GVKRALKGRLKKLAK	+7	1666,3	1665,63

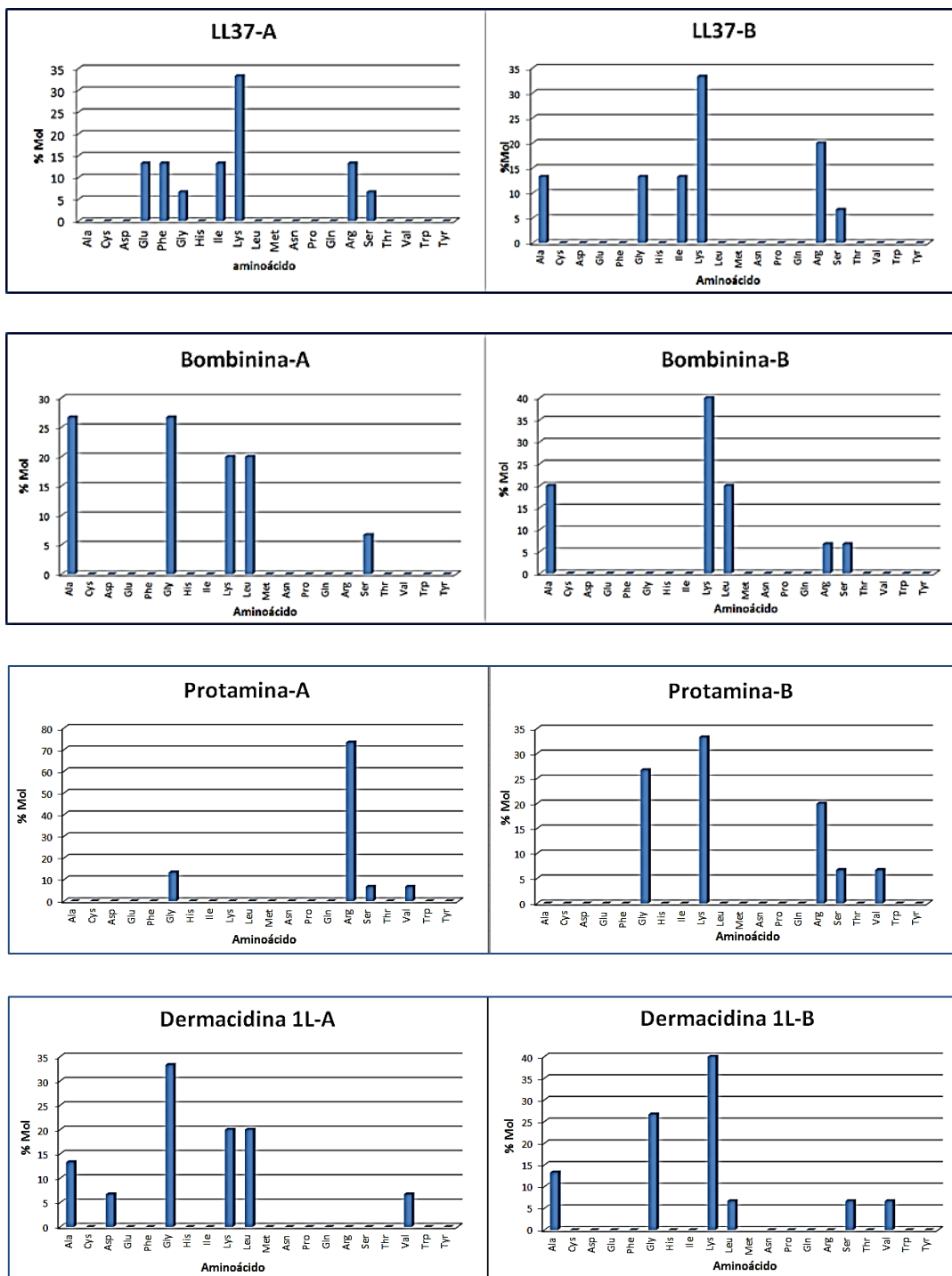
CAP 18	CAP 18-A (Blanco)	RNKIKEKLLKKIGQKI	+6	1824,5	1825,06
	CAP 18-B (Análogo)	GRKIKLKLKKIGQKK	+8	1766,5	1767,21
SMAP 29	SMAP 29-A (Blanco)	GLRRLGRKIAHGVKK	+6	1689,3	1688,89
	SMAP 29-B (Análogo)	GLKRLKRKIKHGVKK	+8	1789,5	1790,02
PMAP 36	PMAP 36-A (Blanco)	GRFRRLRKKTRKRLK	+10	1999,7	1999,40
	PMAP 36-B (Análogo)	GRGRRLRKKARKGLK	+9	1780,4	1779,89
Cecropina B	Cecropina B-A (Blanco)	KVFKKIEKMGRNIRN	+5	1861,4	1861,01
	Cecropina B-B (Análogo)	GIFKKIARKMARKIAK	+6	1703,4	1702,50

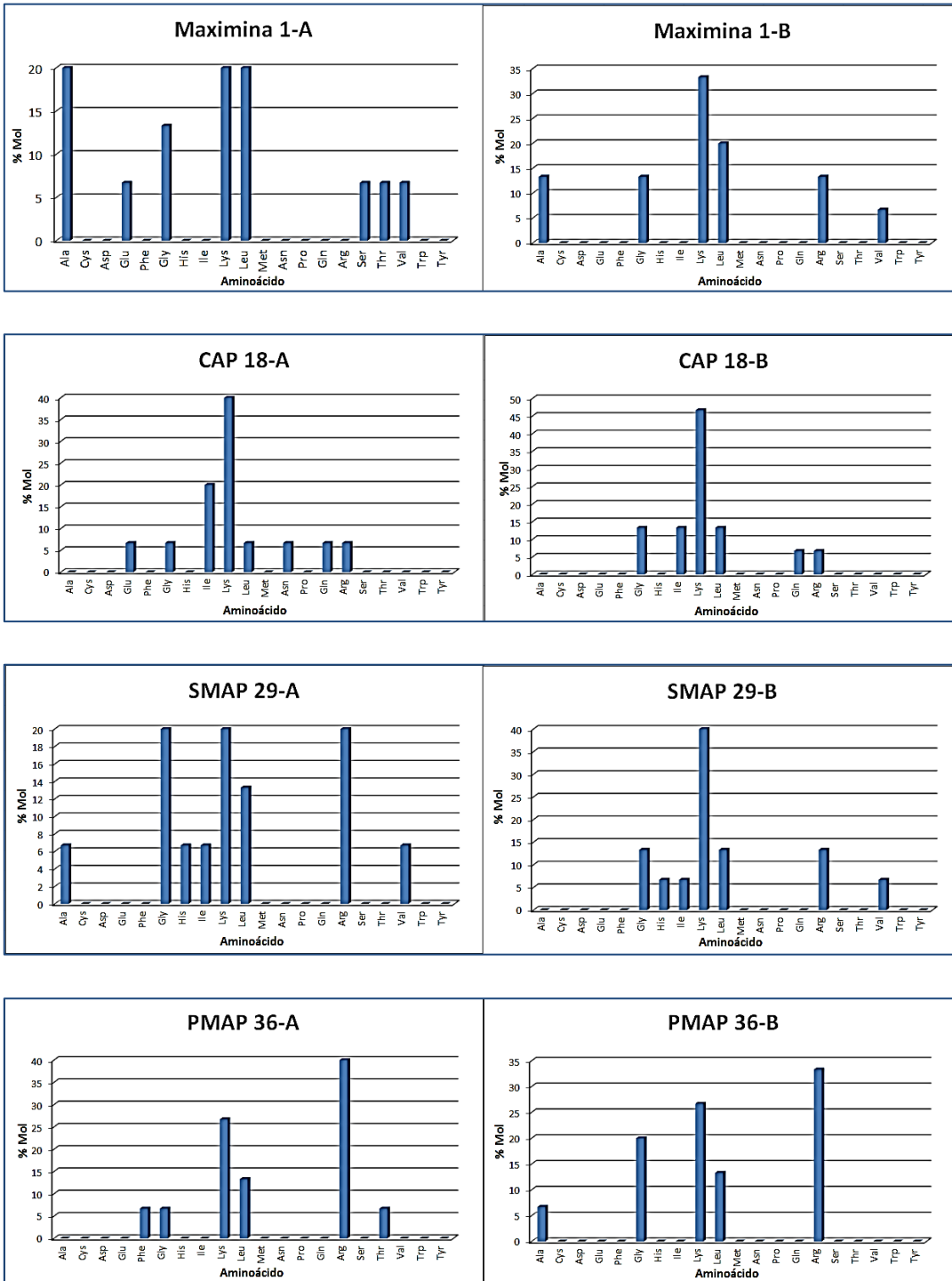
*PM determinado con protparam: <http://web.expasy.org/protparam/>

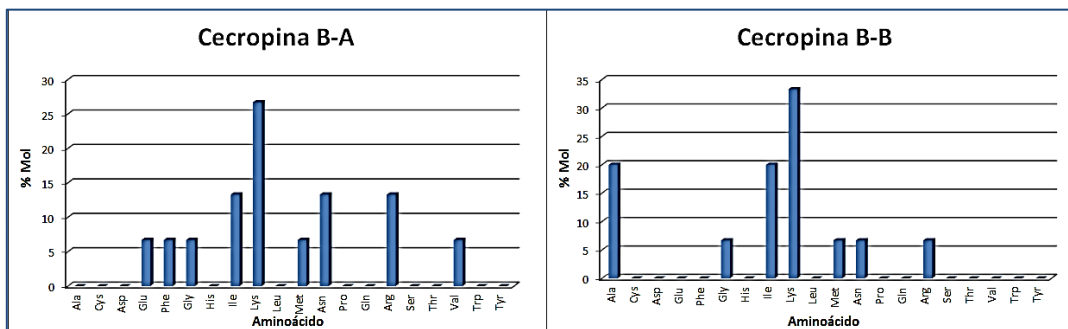
Fuente: programa protparam en: <http://web.expasy.org/protparam/> .

En la figura 6, se observa la composición porcentual de aminoácidos de los péptidos blancos y análogos sintetizados; en general la lisina es el aminoácido que se presenta con mayor frecuencia, seguido de arginina, glicina, leucina, isoleucina y alanina, los cuales son los aminoácidos presentes en PAMs; los aminoácidos catiónicos lisina y arginina permiten la interacción electrostática con los fosfolípidos de la membrana bacteriana; al igual que los aminoácidos glicina, leucina, isoleucina y alanina, son buenos formadores de estructuras α -hélice y le dan hidrofobicidad a los péptidos, la cual le permitirá la interacción hidrofóbica con los lípidos de la membrana celular. La terminación A corresponde al péptido blanco y B al péptido análogo (mejorado)

Figura 6. Composición porcentual de aminoácidos en los péptidos sintetizados.







El rendimiento de la reacción de síntesis se determinó teniendo en cuenta la cantidad de péptido crudo obtenido con respecto a la cantidad de péptido purificado; en general, estuvo entre un 20-32% (datos tabla 3), a pesar que puede parecer un rendimiento bajo fue suficiente para lograr los objetivos del trabajo. En el paso de extracción del péptido con éter frío al final de la síntesis se hizo esta operación dos veces, esto es definitivo para la cantidad de péptido obtenido, lo cual disminuyó el rendimiento de la síntesis, no se pudo repetir más veces por el costo y gasto de reactivo en la síntesis de tantos péptidos.

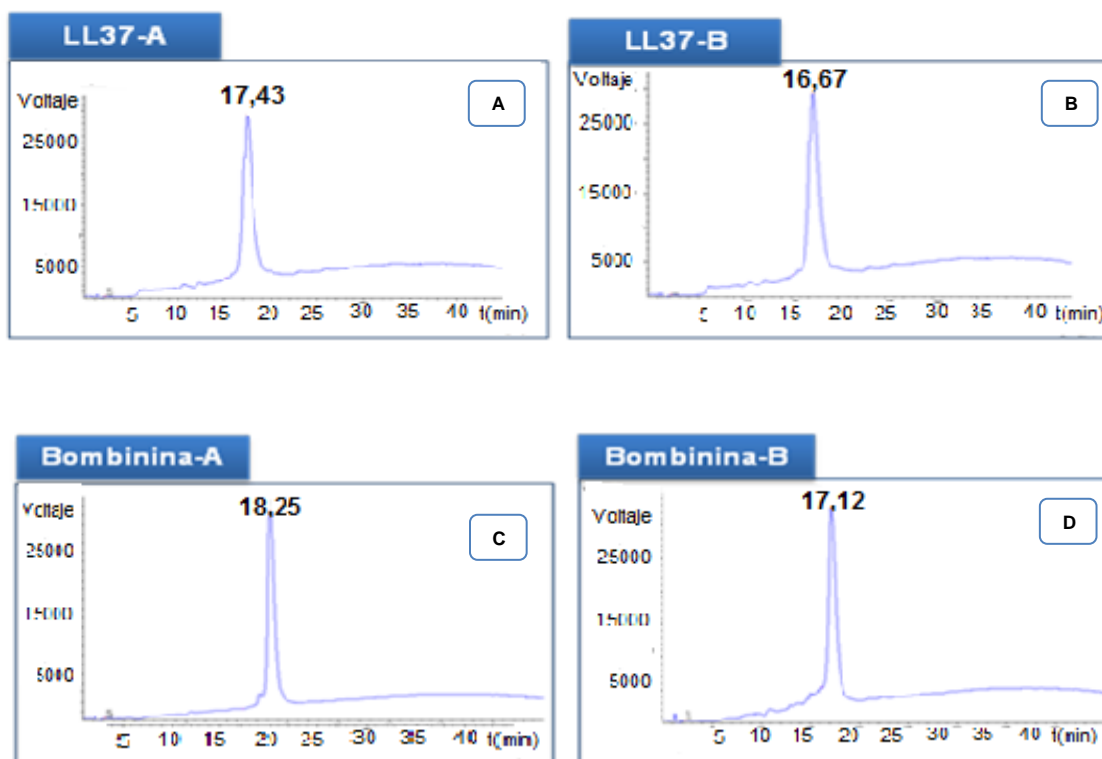
Tabla 3. Tiempo de retención en la cromatografía HPLC-RP de los péptidos en estudio y porcentaje de rendimiento de la reacción de síntesis en fase sólida por la metodología Fmoc.

PÉPTIDO	Tiempo de retención (min)	% Rendimiento
LL37-A	17,43	20,36
LL37-B	16,67	22,45
Bombinina-A	18,25	27,01
Bombinina-B	17,12	25,34
Protamina-A	18,04	18,90
Protamina-B	13,22	23,42
Dermacidina 1L-A	18,59	30,78
Dermacidina 1L-B	11,25	29,67
Maximina 1-A	23,09	28,56
Maximina 1-B	17,44	25,89
CAP 18-A	18,72	32,87
CAP 18-B	17,66	31,45
SMAP 29-A	12,91	27,51
SMAP 29-B	18,03	28,09
PMAP 36-A	13,00	24,67
PMAP 36-B	16,66	26,87
Cecropina B-A	22,64	30,07
Cecropina B-B	18,22	28,83

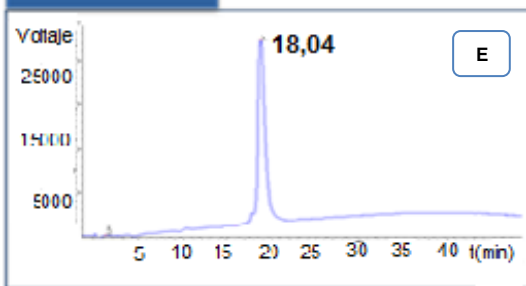
Algo todavía más importante que pudo incidir en el rendimiento, es que la síntesis de péptidos es una reacción de varios pasos y el rendimiento de cada ciclo de acople depende mucho de la secuencia, el acople de aminoácidos como lisina y arginina se hace cada vez más difícil al crecer la secuencia debido al impedimento estérico, a la baja accesibilidad a las cadenas peptídicas en crecimiento por el tamaño; siendo estos los aminoácidos que más se presentan en todas las secuencias en estudio como se observa en la figura 6. Se hace necesario repetir los acoplos y en los procesos de lavado intermedios se puede ir perdiendo producto y se baja el rendimiento.

La caracterización y purificación de los péptidos sintetizados se hizo mediante HPLC-RP en una columna C-18 y columnas Sepak C-18 en la tabla 3 se registran los tiempos de retención y en la figura 7 se aprecian los cromatogramas donde se aprecia la presencia de un solo pico principal para cada péptido, después del proceso de purificación. Se podría decir que la pureza es suficiente del 95% para realizar los ensayos biológicos correspondientes.

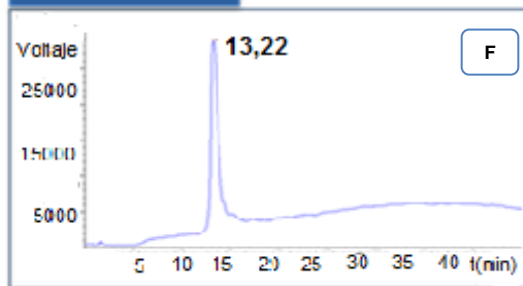
Figura 7. Cromatogramas HPLC-RP de los péptidos sintetizados



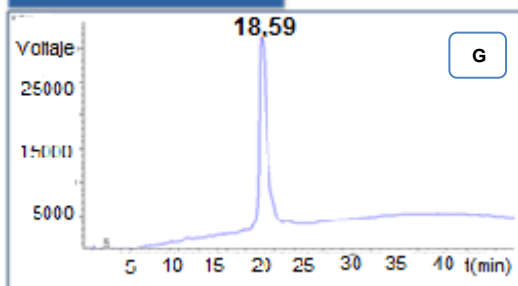
Protamina-A



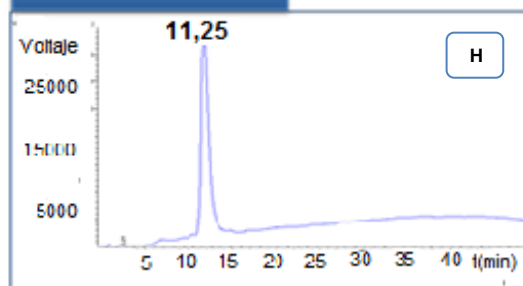
Protamina-B



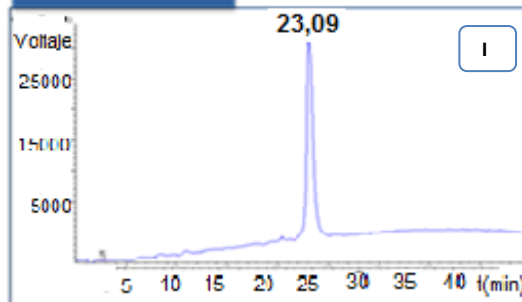
Dermacidina 1L-A



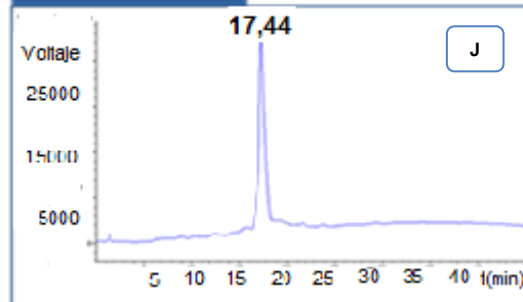
Dermacidina 1L-B



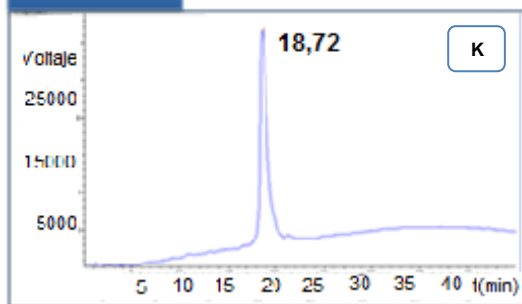
Maximina 1-A



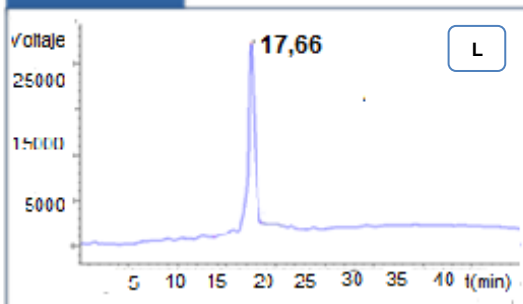
Maximina 1-B

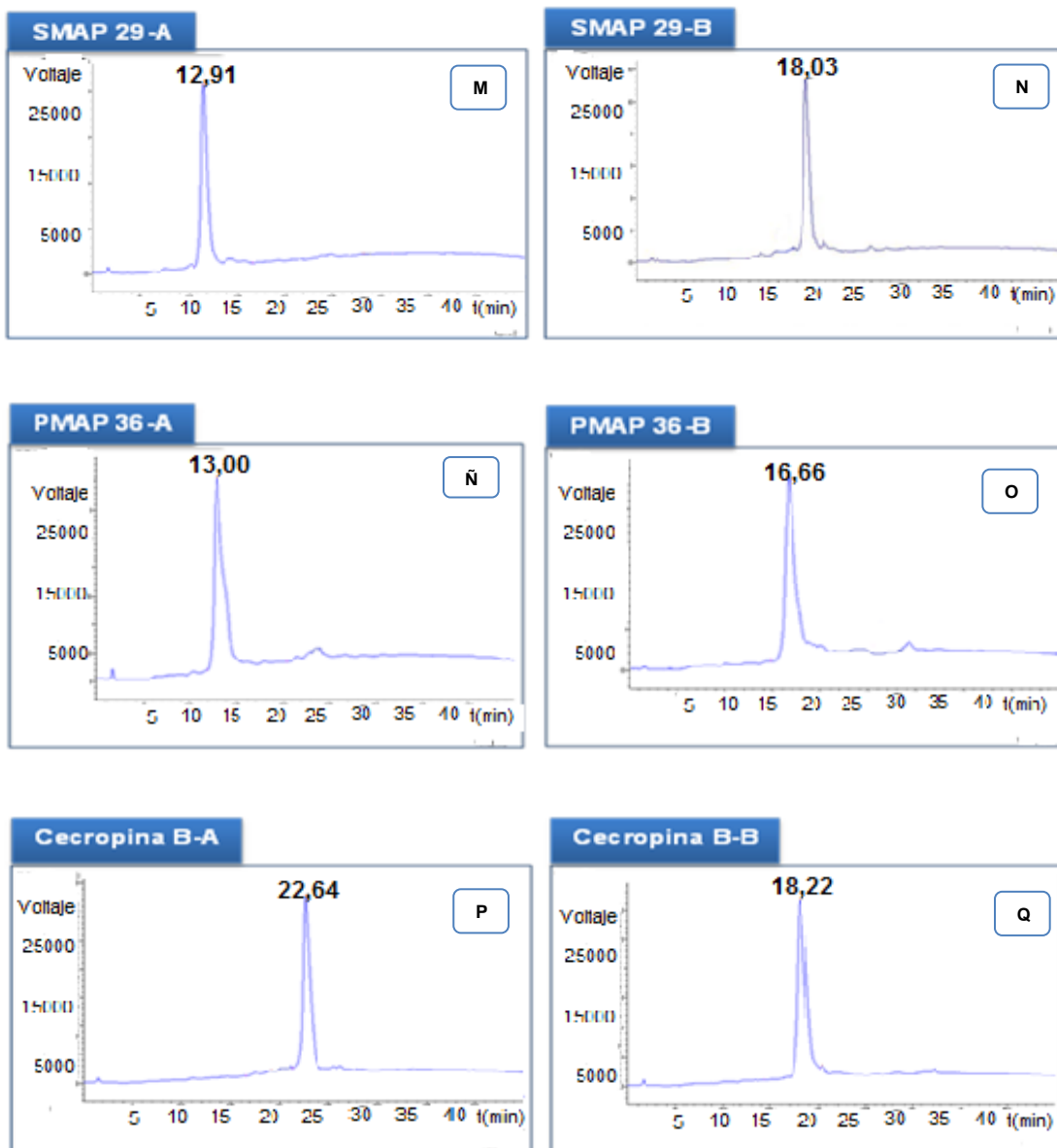


CAP 18-A



CAP 18-B



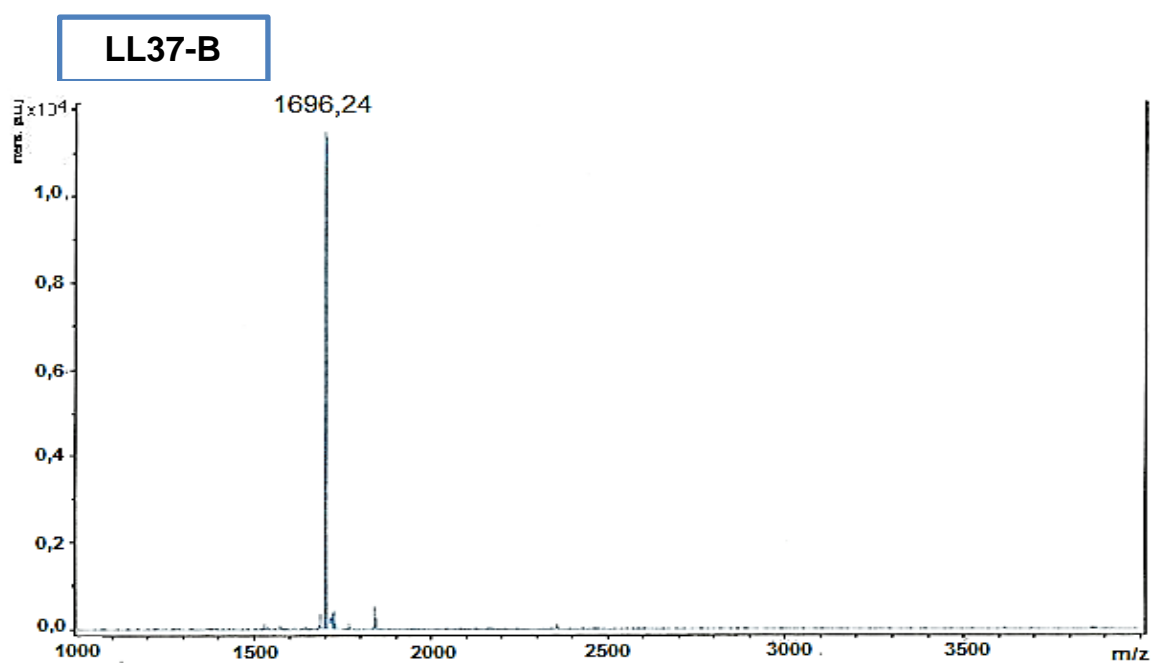
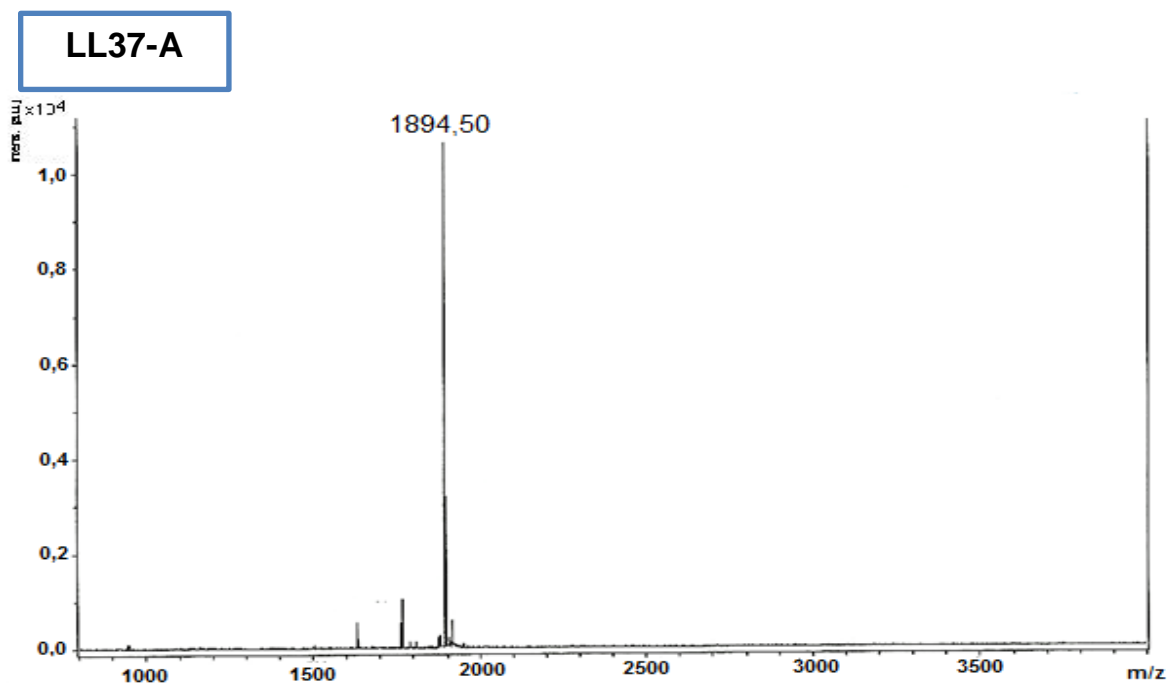


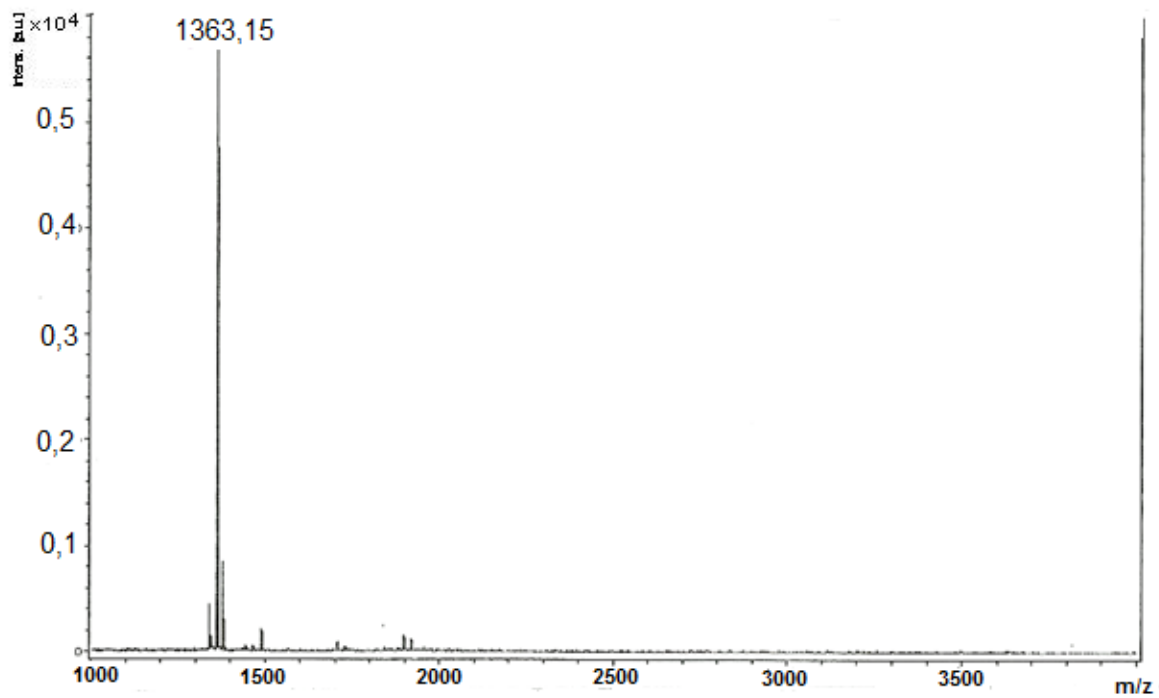
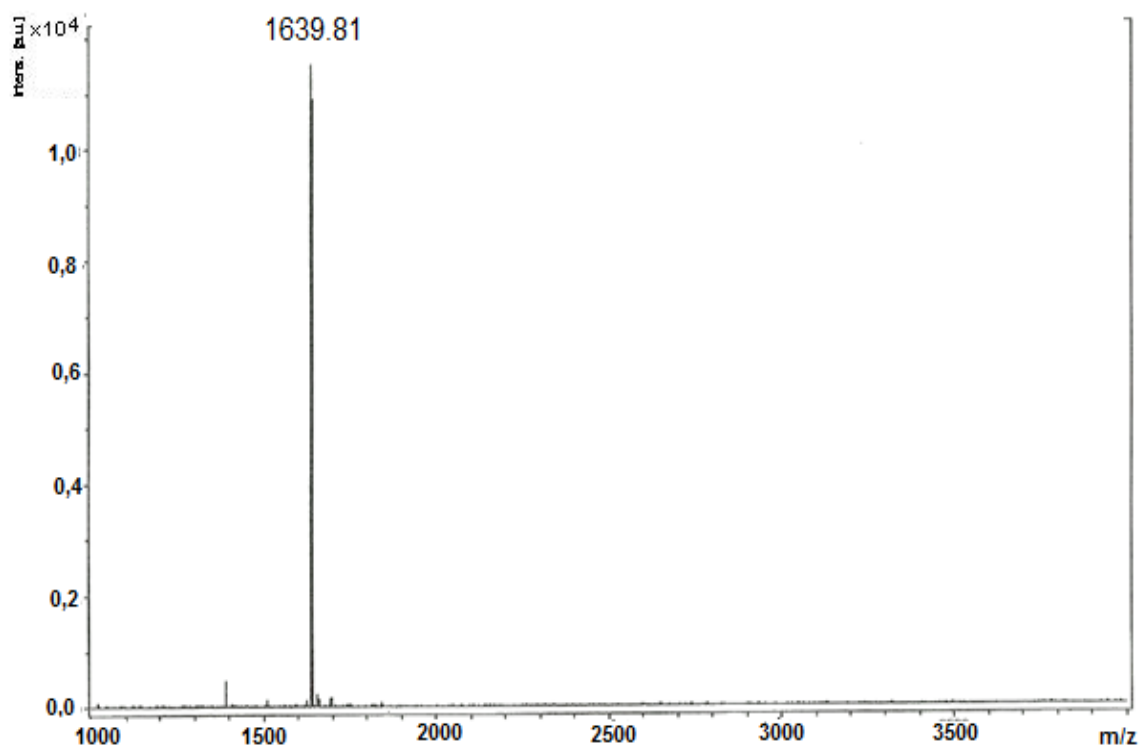
El resultado de la cromatografía se correlaciona con la caracterización del peso molecular mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en la cual se aprecia que los péptidos tienen un valor de peso molecular experimental que se ajustan con los valores calculados como se aprecia en la tabla 2 donde también aparecen características de carga de cada secuencia.

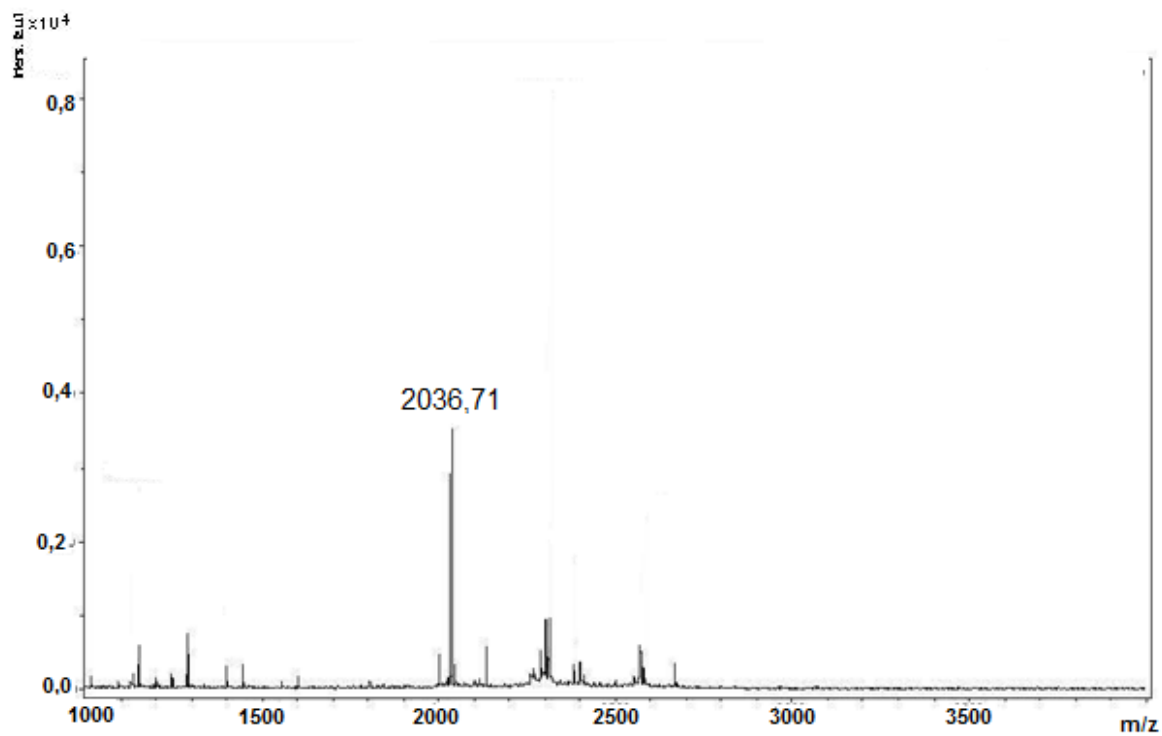
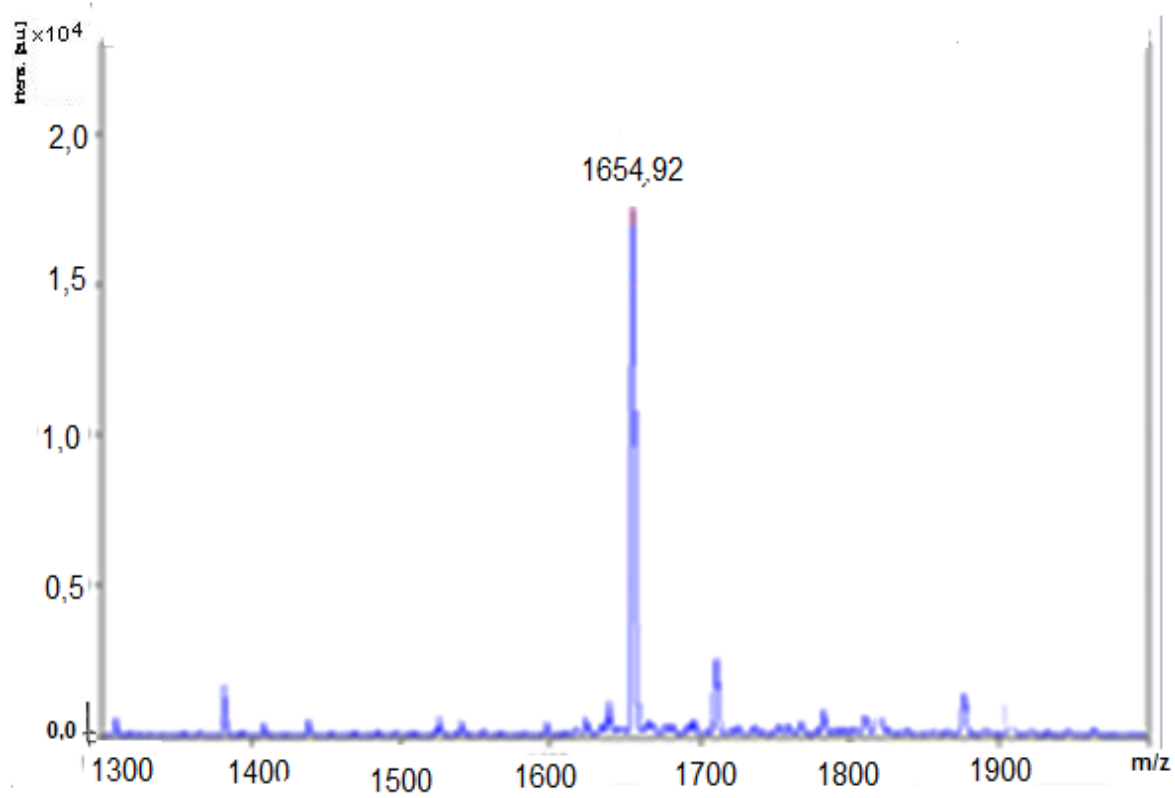
En la figura 8, se encuentran los espectros de masas de todos los péptidos del estudio, cabe resaltar que en todos los casos se obtuvo el peso molecular esperado, para el péptido Bombinina-A se obtuvo un pico del peso molecular más 23 unidades

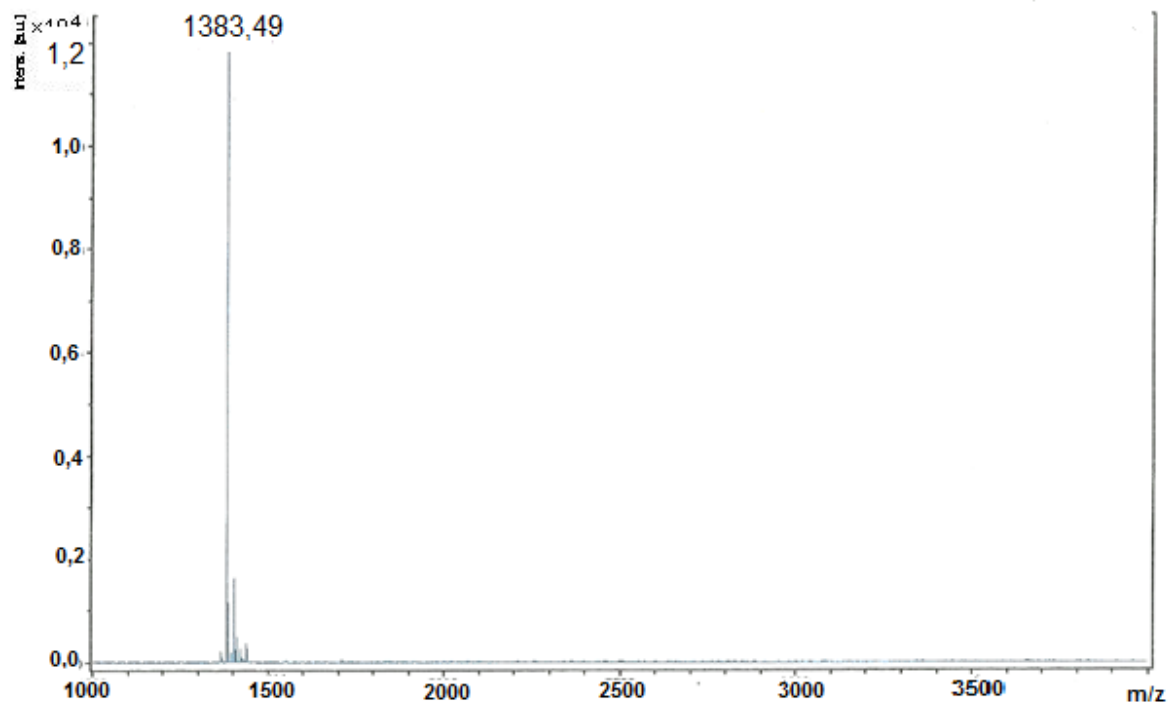
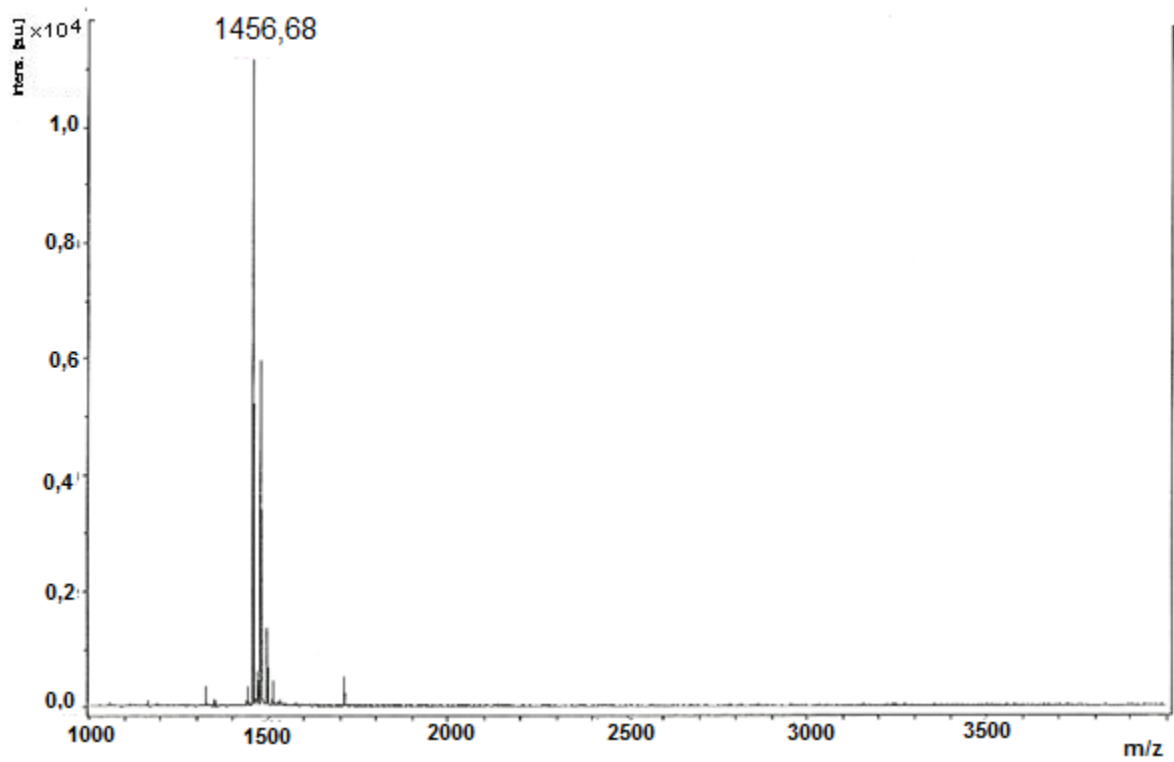
correspondientes al ion sodio, el cual se encuentra en el ambiente y es usual que se encuentre unido a la especie del ion molecular en espectrometría de masas, al igual puede encontrarse la pérdida o ganancia de un protón hidrógeno debido a la ionización.

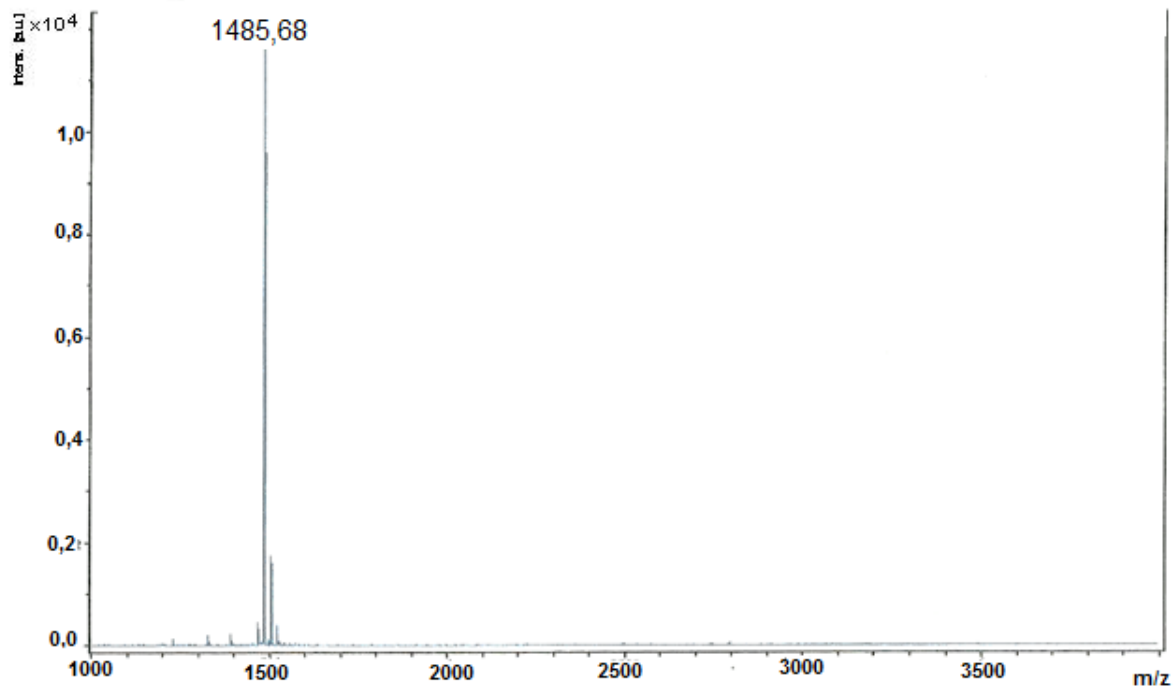
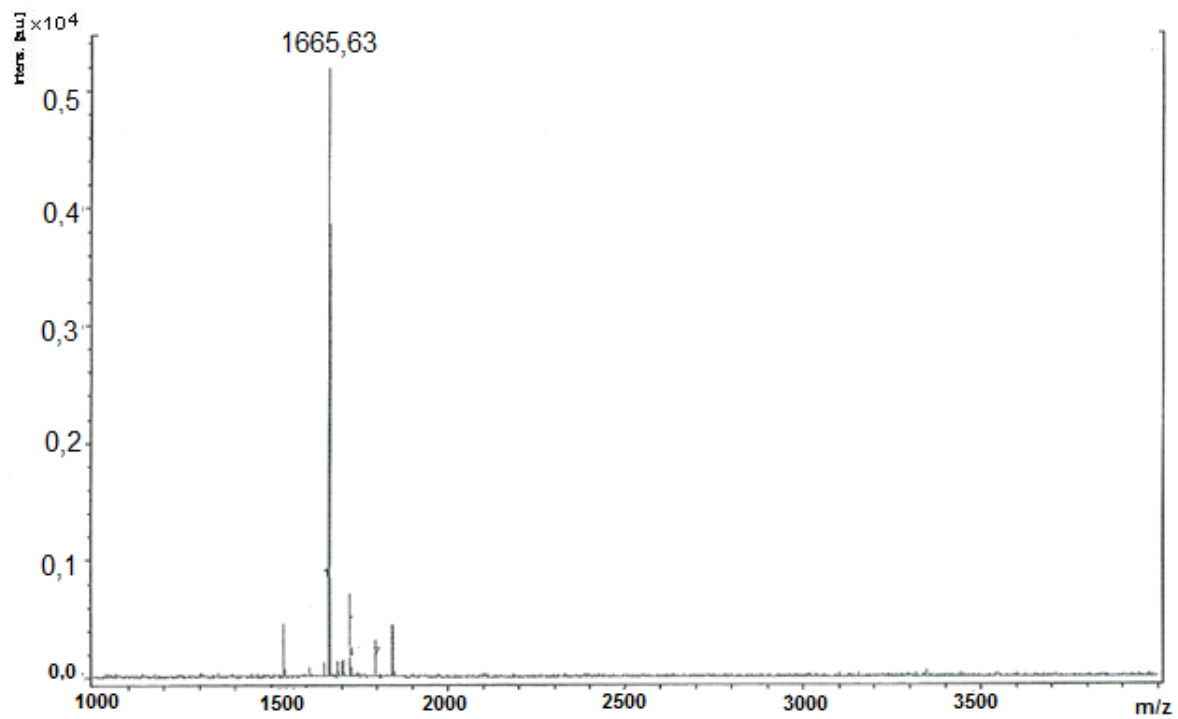
Figura 8. Espectrometría de masas de los péptidos sintetizados

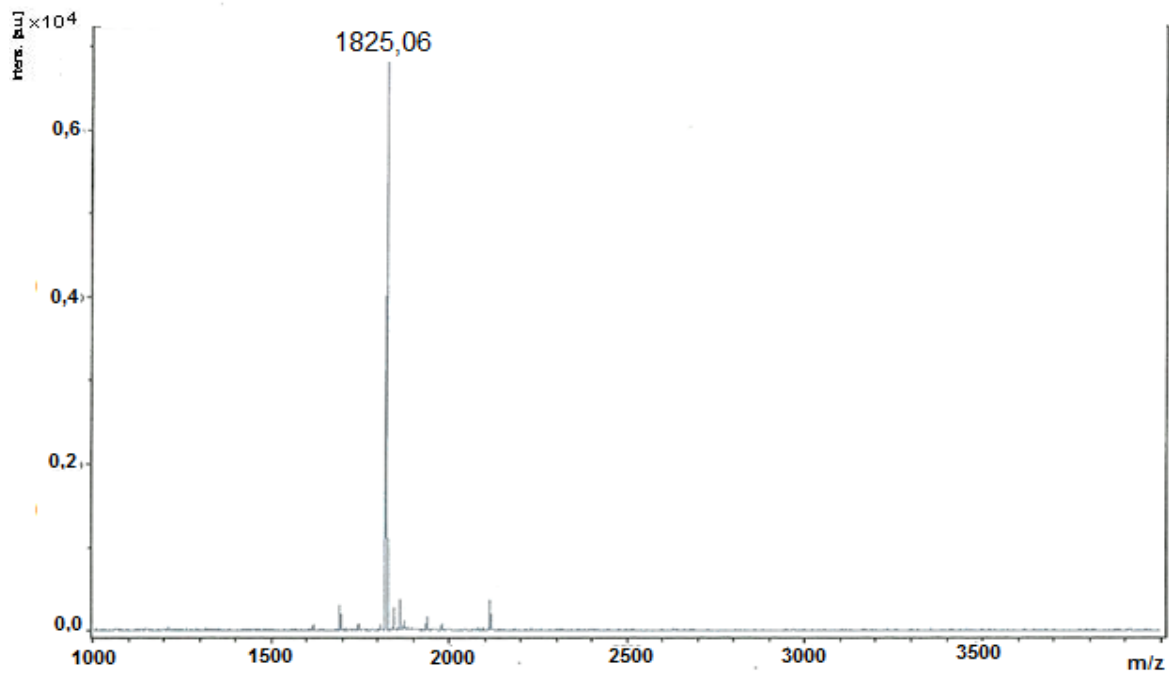
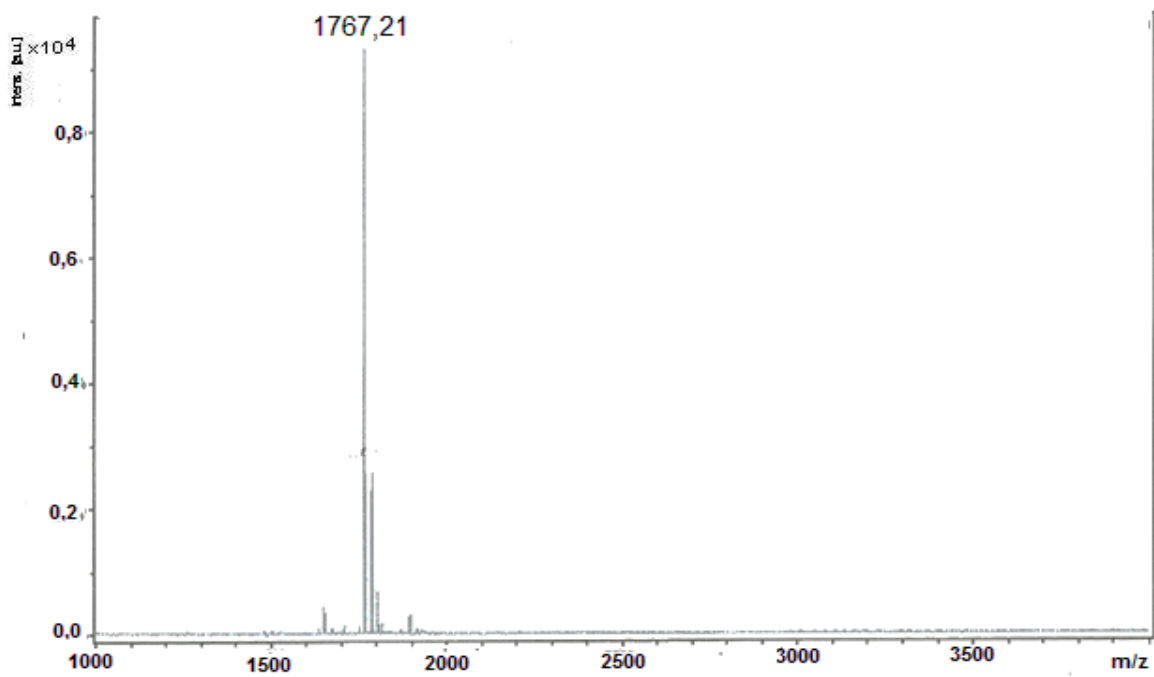


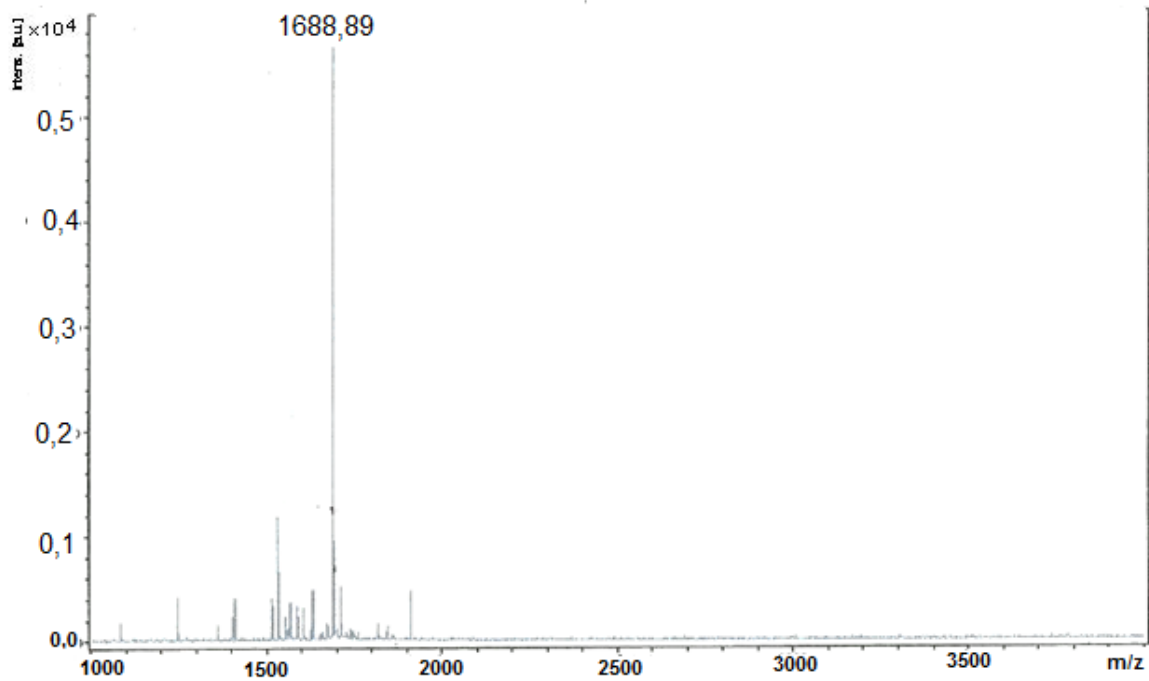
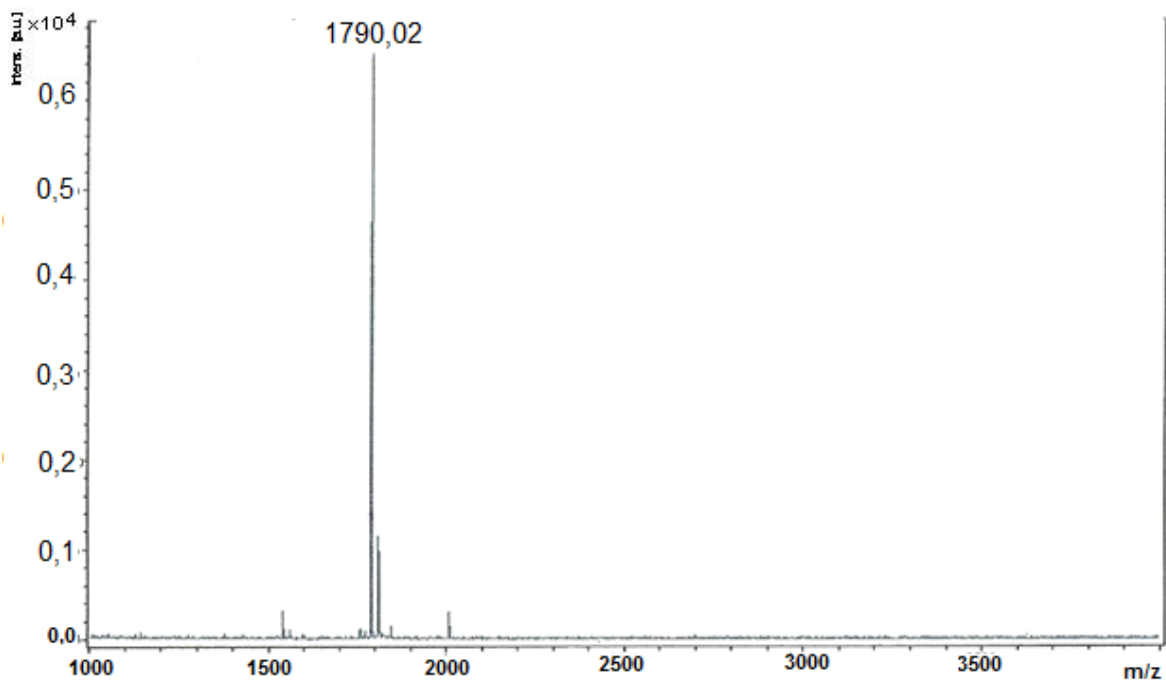
Bombinina-A**Bombinina-B**

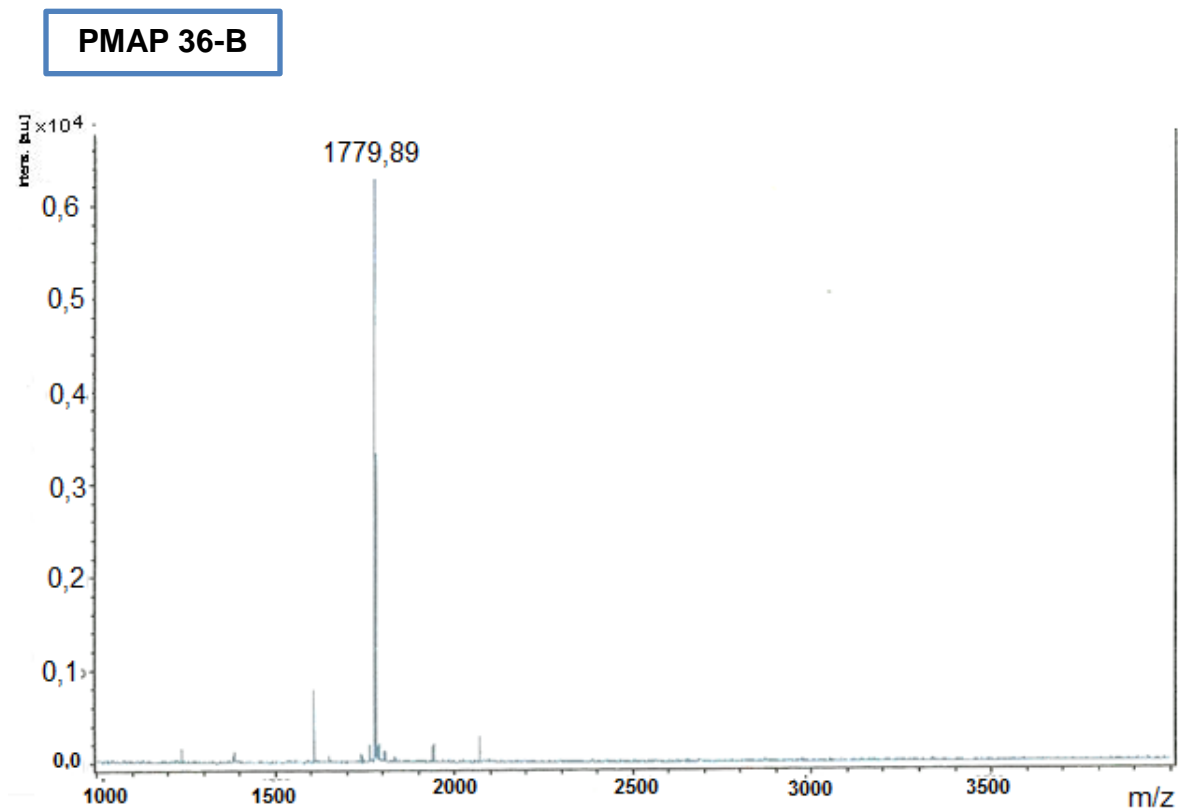
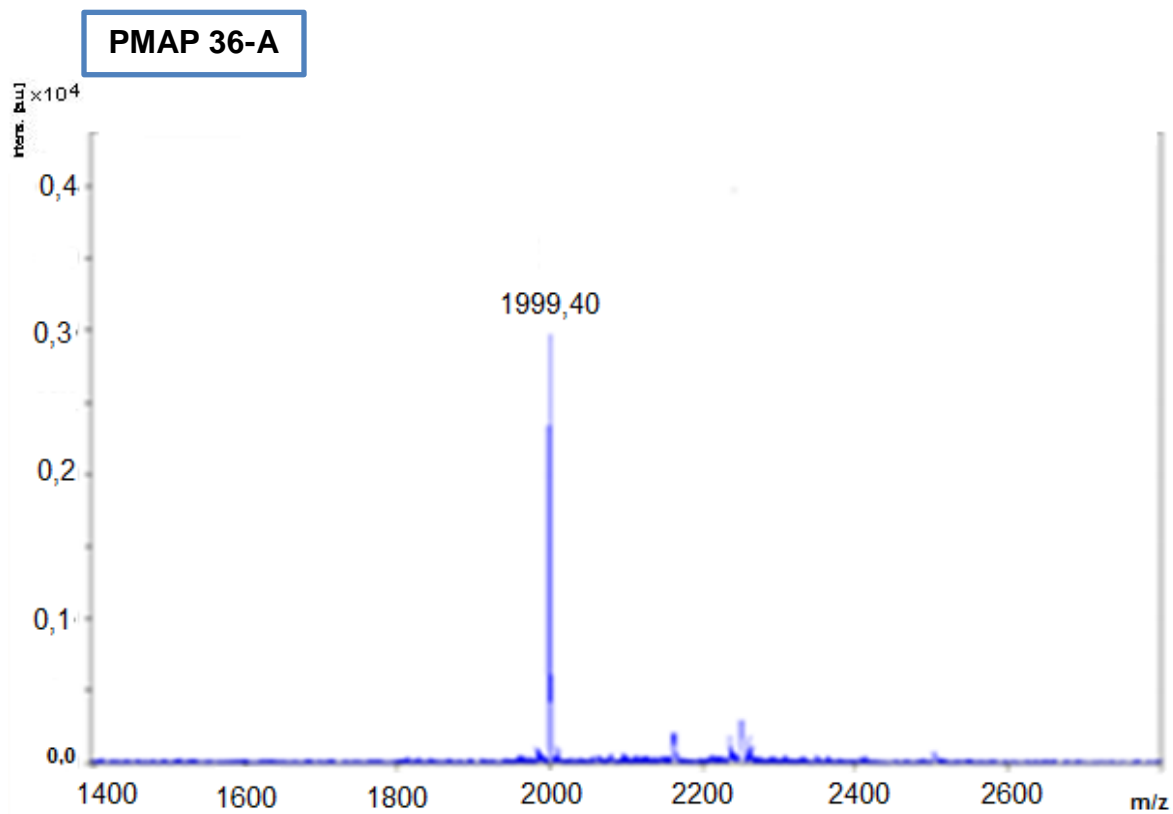
Protamina-A**Protamina-B**

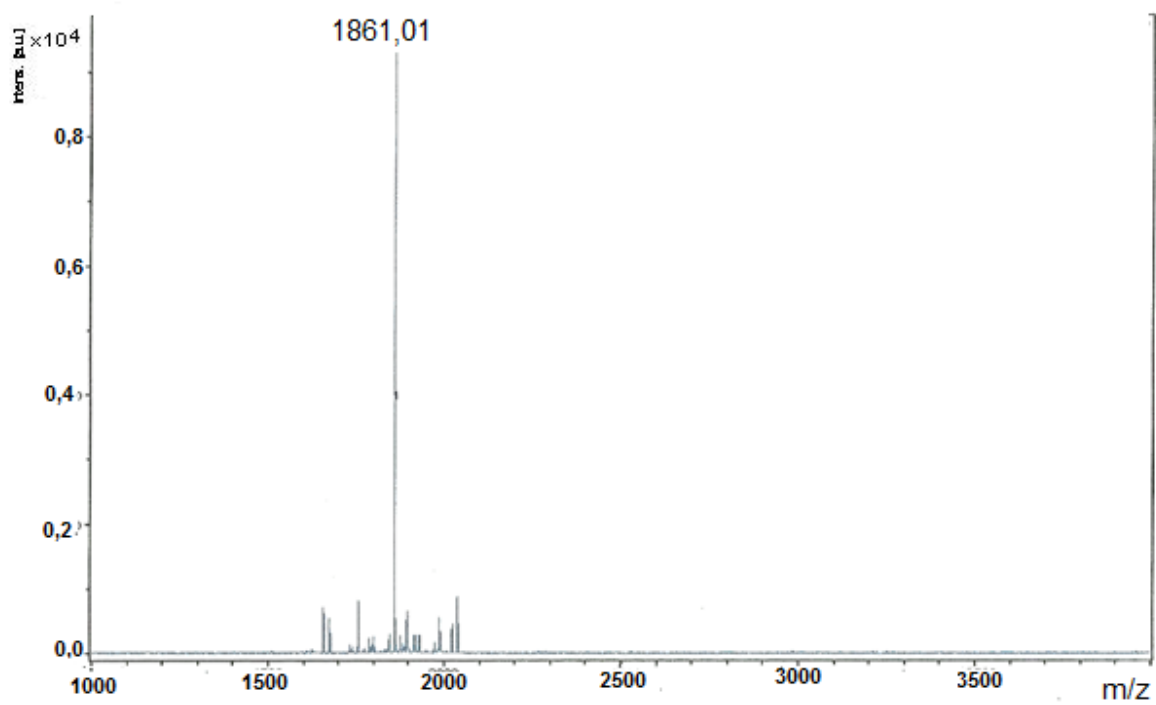
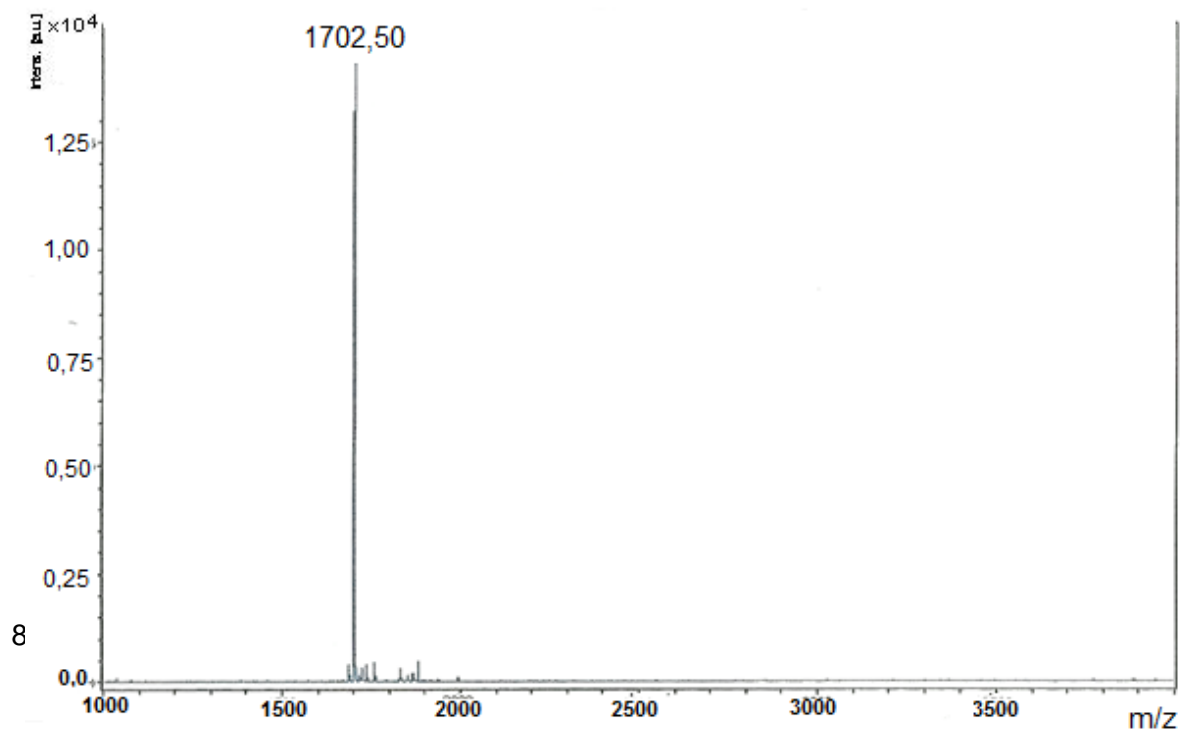
Dermacidina 1L-A**Dermacidina 1L-B**

Maximina 1-A**Maximina 1-B**

CAP 18-A**CAP 18-B**

SMAP 29-A**SMAP 29-B**



Cecropina B-A**Cecropina B-B**

6.3. Dicroísmo Circular

La determinación de estructura por DC, se utilizó como una técnica rápida para evaluar el perfil de estructura secundaria de los péptidos sintetizados.

Los espectros de dicroísmo circular de los péptidos se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos, se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la molécula.

Los péptidos sintetizados se colocaron en solución con TFE 30% en agua para tratar de simular un entorno más parecido al fisiológico al interactuar el péptido con la membrana, los resultados se observan en la figura 9, la figura A de cada péptido corresponde al fragmento corto de 15 aminoácidos que presenta mejores características de valor antibacterial y estructura helicoidal y la figura B al péptido diseñado mejorado haciendo cambios en la estructura primaria del fragmento.

En el espectro de DC del péptido Maximina 1-A (Figura 9) se aprecia el máximo de 193 nm (transición π - π^* positiva, con Θ 190869) y los mínimos de 208 nm (transición π - π^* negativa con Θ -155805) y 222 nm (transición n - π^* con Θ -109927) correspondiente a una estructura helicoidal.

En el espectro de DC del péptido CAP 18-A (Figura 9) se aprecia el máximo de 193 nm (transición π - π^* positiva, con Θ 75063,5) y los mínimos de 208 nm (transición π - π^* negativa con Θ -89031) y 222 nm (transición n - π^* con Θ -57182) correspondiente a una estructura helicoidal.

En el espectro de DC del péptido SMAP 29-B (Figura 9) se aprecia el máximo de 193 nm (transición π - π^* positiva, con Θ entre 24682,6) y los mínimos de 208 nm (transición π - π^*

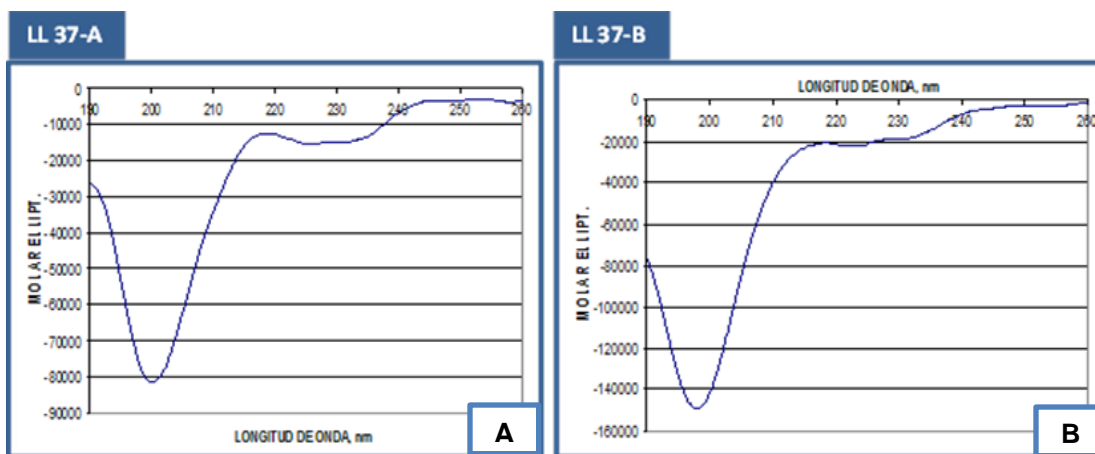
negativa con Θ -77925,7) y 222 nm (transición $n-\pi^*$ con Θ -49213,8) correspondiente a una estructura helicoidal.

En el espectro de DC del péptido Cecropina B-B (Figura 9) se aprecia el máximo de 193 nm (transición $\pi-\pi^*$ positiva, con Θ 77767) y los mínimos de 208 nm (transición $\pi-\pi^*$ negativa con Θ -65896,2) y 222 nm (transición $n-\pi^*$ con Θ -45781,5) correspondientes a una estructura helicoidal.

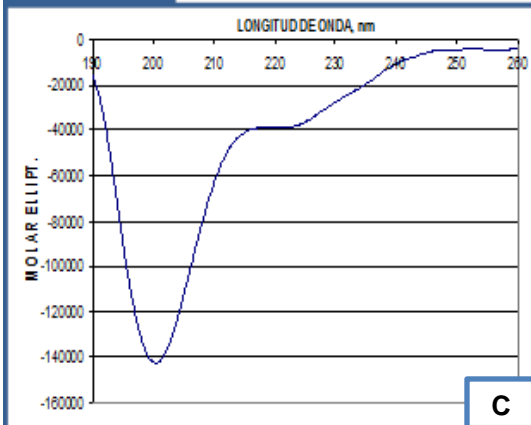
En los péptidos LL37-A, LL37-B, Protamina-A, Protamina-B, Dermacidina 1L-B y PMAP 36-A, (Figura 9) se aprecia un máximo con baja Elipticidad y un mínimo en 222 nm, con una Elipticidad cercana a cero, lo cual indica una estructura poco definida sin ser totalmente al azar, en este espectro no se puede asegurar que tenga una estructura definida.

Respecto al análogo SMAP 29-B comparándolo con el péptido blanco SMAP 29-A (Figura 9) donde el cambio en los residuos (R_3 por K, G_6 por K y A_{10} por K) parecen influir en la estructura, ya que muestran en el espectro DC la estructura correspondiente α -hélice, probablemente debido a que la lisina tienen mayor propensividad a formar este tipo de estructuras, se ven mejor los picos correspondientes a una hélice, sin tener valores altos de elipticidad. Se observa el mismo patrón de estructura en el péptido análogo Cecropina B-B.

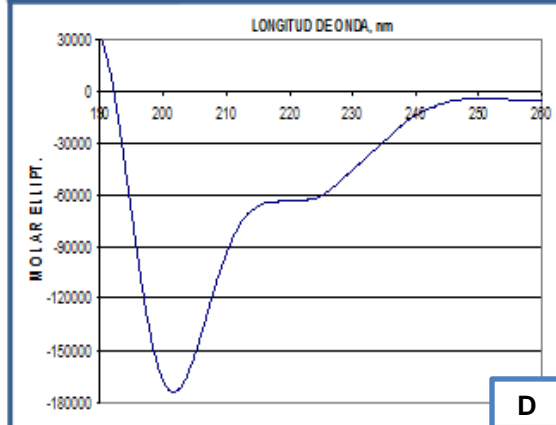
Figura 9. Espectros de dicroísmo circular para los péptidos en estudio



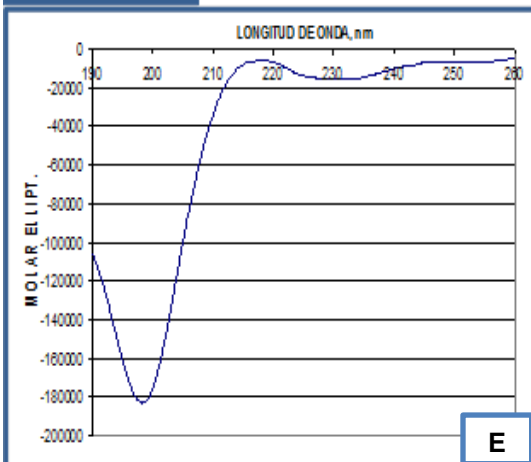
Bombinina-A



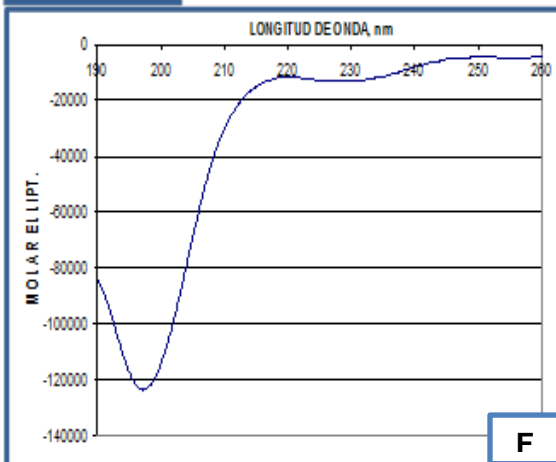
Bombinina-B



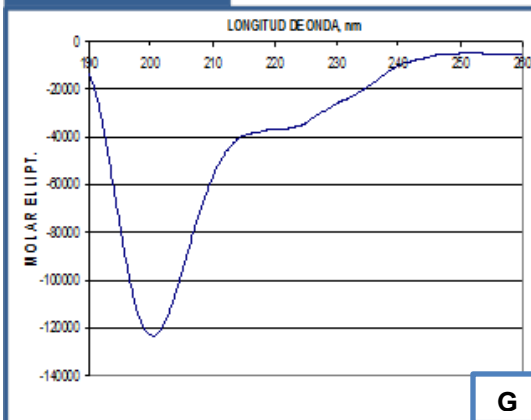
Protamina-A



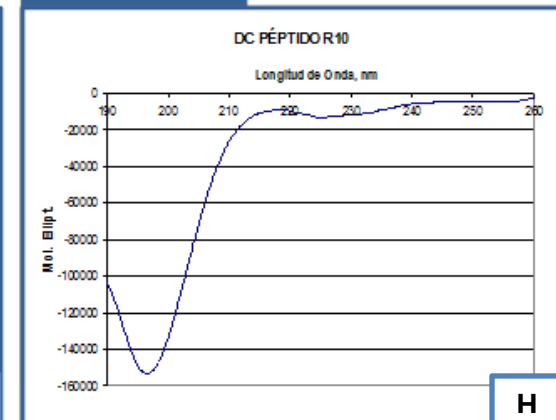
Protamina-B



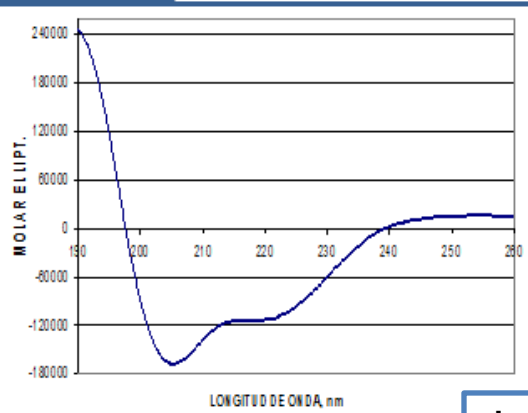
Dermacina 1L-A



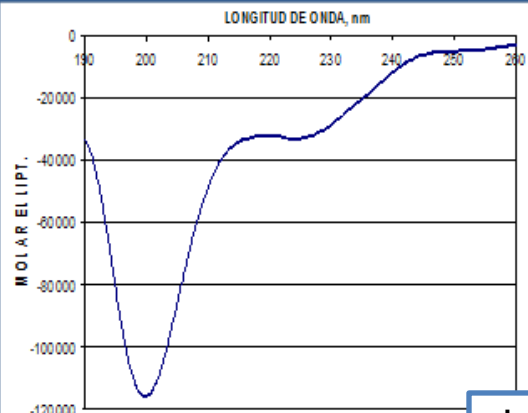
Dermacina 1L-B



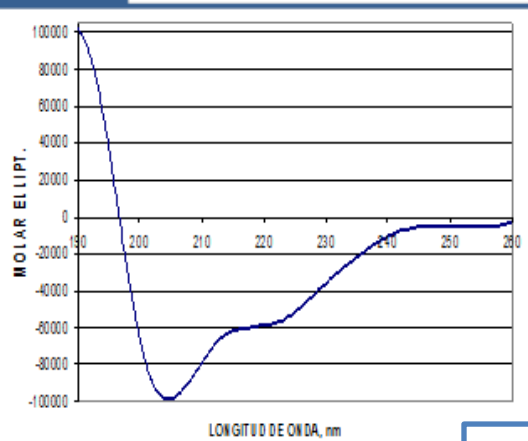
Maximina 1-A



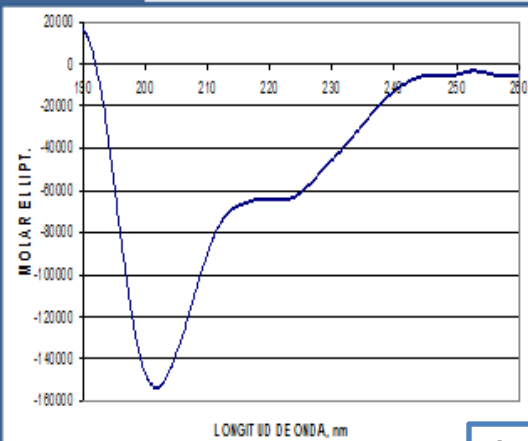
Maximina 1-B



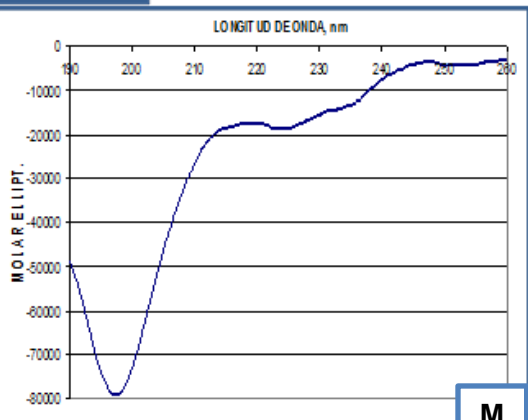
CAP 18-A



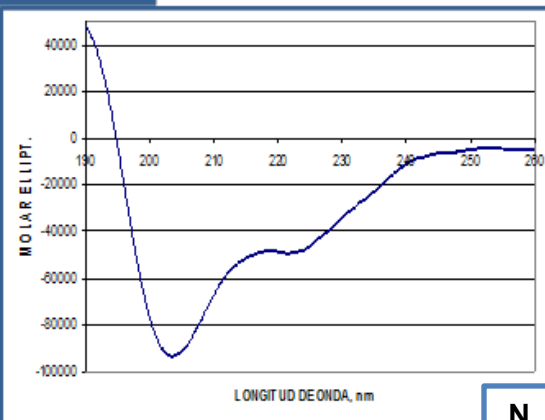
CAP 18-B

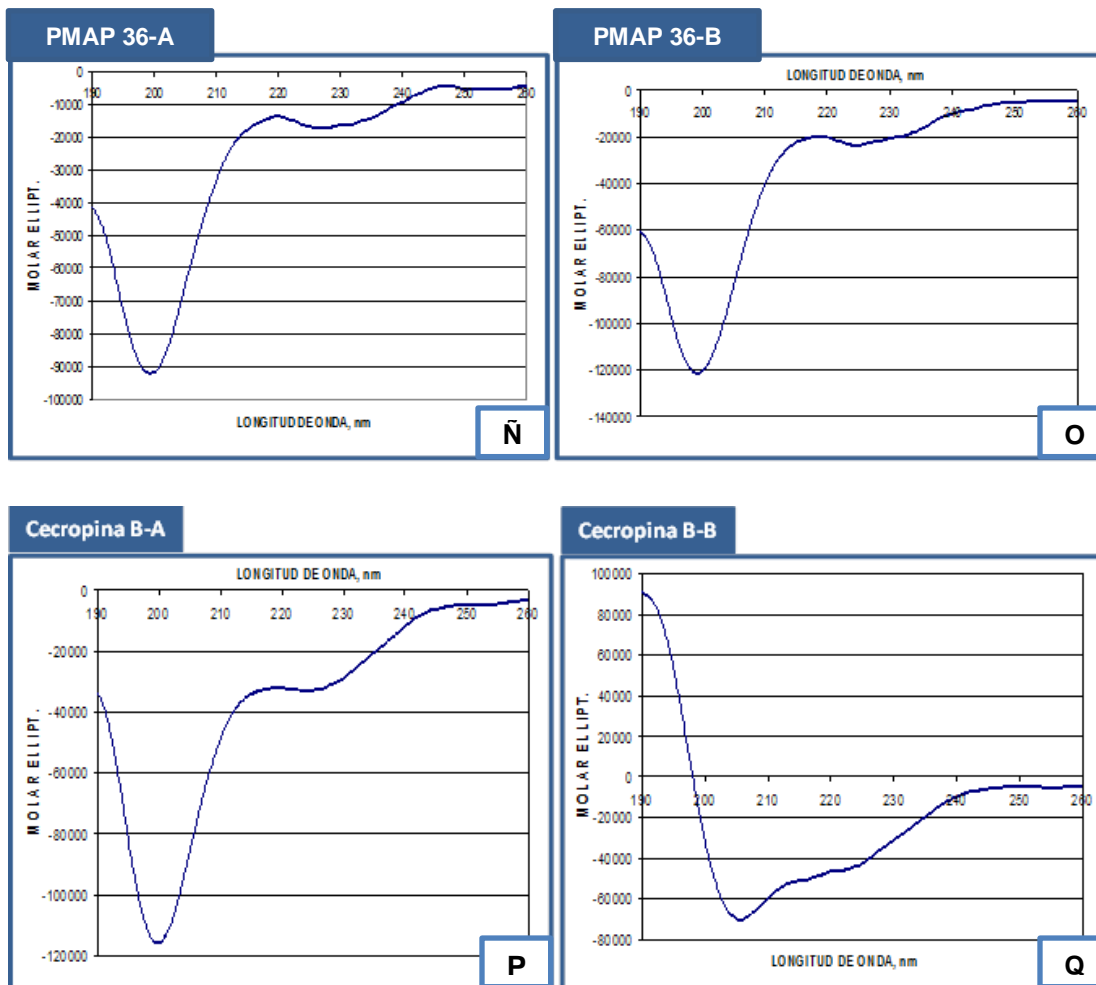


SMAP 29-A



SMAP 29-B





Al comparar los resultados obtenidos en dicroísmo circular con respecto a la predicción de estructura secundaria mediante el servidor PSSpred, los resultados fueron diferentes debido a que la estructura secundaria depende del medio en que se encuentre la molécula, en el dicroísmo circular los péptidos se encontraban en TFE 30% y la predicción bioinformática tiene en cuenta las posibles interacciones de la molécula en el vacío.

6.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el ensayo con resazurina

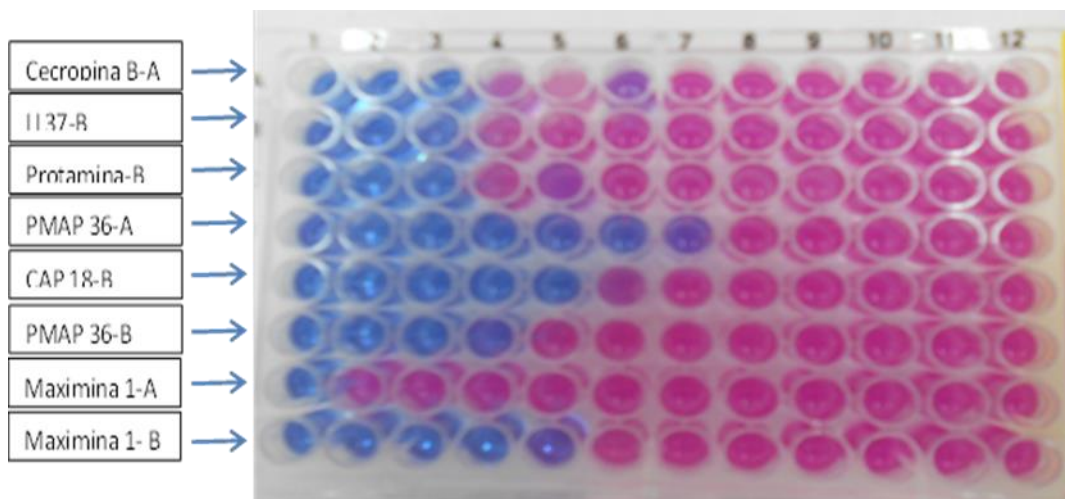
En este ensayo se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los péptidos sintetizados sobre *M. smegmatis mc²155*, una micobacteria ambiental no patógena de crecimiento rápido, mediante el test de viabilidad celular con resazurina; este compuesto (en color azul, no fluorescente) es reducido a resofurina (color rosado, altamente fluorescente), por oxidoreductasas que se encuentran en las células viables. La resofurina es excretada al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o la citotoxicidad de sustancias sobre células de las micobacterias. Este ensayo se realizó por triplicado para cada péptido sintetizado, los resultados se relacionan en la tabla 4.

En la figura 10 se observa la actividad antimicobacteriana de los péptidos Cecropina B-A, LL37-B, Protamina-B, PMAP 36-A, PMAP 36-B, CAP 18-B, Maximina-A y Maximina-B (Un ensayo preliminar con los primeros péptidos obtenidos durante la síntesis); en el pozo 1 se utiliza el control negativo Kanamicina (25 µg/mL), esta reacción nos permite corroborar una coloración azul que corresponde a muerte celular; en el pozo 12 no se utiliza antibiótico y corresponde al control positivo (células vivas); en este ensayo se obtuvo para el péptido Maximina 1-B el mejor resultado de inhibición en 3 órdenes de magnitud con respecto a Maximina 1-A que presenta un CMI mayor a 1200 µg/mL posiblemente debido a interacción del péptido con la membrana del parásito que puede tener relación con el diseño "*In silico*" del péptido en el que se aumentó la carga de +2 a +7, lo cual favorece la interacción electrostática con los fosfolípidos de la bicapa de la membrana micobacteriana, además de la estructura secundaria de α -hélice, la cual aumenta la probabilidad de formación de poros o canales en dicha membrana que conlleva finalmente a la lisis bacteriana.

En el diseño "*In silico*" se pretendió determinar si la carga o la estructura secundaria permitía una mejor actividad antibacteriana, donde se obtuvo que el péptido PMAP 36-A presenta una concentración mínima inhibitoria de 37,5 µg/mL, teniendo en cuenta que presenta carga +10 y al disminuir la carga a +9 en el péptido PMAP 36-B pero con mejor predicción de estructura secundaria no presenta mejor actividad, esto significa que a pesar de aumentar la predicción de la actividad, predominan las características de carga y

estructura secundaria, es decir, en el diseño se mantuvo la misma estructura secundaria, a pesar de los cambios en aminoácidos puntuales para aumentar su valor antibacterial.

Figura 10. Ensayo de viabilidad con resazurina en presencia de los péptidos en estudio sobre *M. smegmatis* mc²155 de los péptidos Cecropina B-A, LL37-B, Protamina-B, PMAP 36-A, PMAP 36-B, CAP 18-B, Maximina-A y Maximina-B



Actividad de los PAMs frente a *M. smegmatis* mc²155 determinada con resazurina. Cecropina B-A; LL37-B; Protamina-B; PMAP 36-A; CAP 18-B; PMAP 36-B; Maximina 1-A; Maximina 1- B detectado en un estudio previo por el ensayo con resazurina. Diluciones seriadas (1200 – 2,3 µg/mL) de los péptidos (pozo 2-11), kanamicina 25 µg/mL (pozo 1) y sin antibiótico (pozo 12)

La figura 10 nos muestra un ejemplo del viraje en la coloración de la resazurina debida a la acción antimicobacteriana de algunos de los péptidos del presente estudio,

Algunos péptidos requirieron mayor concentración inicial, por ejemplo, los péptidos LL37--A, Bombinina-A, Dermacidina 1L-A ,SMAP 29-A y SMAP 29-B, tuvieron una concentración inicial en el pozo 2 de 9600 µg/mL desde donde se hicieron las diluciones seriadas correspondientes, determinándose las concentraciones mínimas inhibitorias de 2400 µg/mL en los péptidos nombrados, a excepción de SMAP 29-A del cual no se determinó la CMI, sólo podemos afirmar que corresponde a un valor mayo a 2400 µg/mL.

La concentración inicial para el péptido CAP 18-A fue de 6000 µg/mL, a partir del cual se hicieron las diluciones seriadas correspondientes, donde se determinó la concentración mínima inhibitoria de 1500 µg/mL.

Los demás péptidos tuvieron una concentración inicial de 1200 µg/mL, a partir de la cual se hicieron las diluciones seriadas correspondientes. Los resultados obtenidos de los triplicados se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de concentración mínima inhibitoria para los péptidos LL37-A, LL37-B, Bombinina-A, Bombinina-B, Protamina-A, Protamina-B, Dermacidina 1L-A, Dermacidina 1L-B, Maximina 1-A, Maximina 1-B, CAP 18-A, CAP 18-B, SMAP 29-A, SMAP 29-B, PMAP 36-A, PMAP 36-B, Cecropina B-A y Cecropina B-B mediante el test de viabilidad celular con resazurina sobre *M. smegmatis* mc²155.

Péptido	CMI (µg/mL) <i>M. smegmatis</i> mc ² 155
LL37-A	2400
LL37-B	600
Bombinina-A	2400
Bombinina-B	600
Protamina-A	600
Protamina-B	600
Dermacidina 1L-A	2400
Dermacidina 1L-B	1200
Maximina 1-A	2400
Maximina 1-B	150
CAP 18-A	1500
CAP 18-B	150
SMAP 29-A	<2400
SMAP 29-B	2400
PMAP 36-A	37,5
PMAP 36-B	300
Cecropina B-A	600
Cecropina B-B	150

En la tabla 4 se observan los valores de mínima concentración inhibitoria (CMI) sobre *M. smegmatis* mc²155, donde se puede evidenciar que los péptidos análogos presentan menor CMI, lo cual sugiere que el diseño racional de péptidos permite obtener moléculas con mejor actividad antimicrobacteriana; en algunos casos se observan varias magnitudes de diferencia entre el péptido blanco y el péptido análogo. Cabe resaltar que PMAP 36-A presenta la menor CMI de 37,5 µg/mL, seguido por los péptidos Maximina 1-B, CAP 18-B y Cecropina B-B con CMI de 150 µg/m; PMAP 36-B con CMI de 300 µg/mL; los demás péptidos presentaron concentraciones mayores a 300 µg/m. Los péptidos SMAP 29-A y

SMAP 29-B presentaron los mayores valores en CMI, correspondiente a 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el péptido mejorado.

En general, los péptidos mejorados LL37-B, protamina-B, dermacidina 1L-B, maximina 1-B, CAP 18-B, SMAP 29-B y Cecropina B-B presentaron un valor de CMI menor comparado con el fragmento correspondiente; en todos los casos en la posición uno estuvo presente la glicina, la cual según el trabajo de Lata y colaboradores ⁽⁵⁵⁾ facilita la interacción entre el péptido y la bacteria en el N terminal; así mismo, la presencia de lisina en el C terminal de los péptidos modificados facilita la interacción entre el péptido, la membrana y la formación de poros en la bicapa lipídica ⁽⁵⁵⁾, por lo tanto, estos cambios fueron importantes en el mejoramiento de la estructura primaria de los fragmentos de 15 aminoácidos que presentaron mejores características de valor antibacteriano y estructura helicoidal después de analizar la secuencia de cada péptido antibacteriano de nuestro estudio.

6.5. Determinación de la actividad hemolítica de los péptidos en estudio

En general se encontró una muy baja actividad hemolítica por parte de los péptidos a las concentraciones evaluadas, los resultados para los péptidos sintetizados se relacionan en la tabla 5. Los porcentajes de hemólisis no superaron en la mayoría de los casos el 10%. Siendo las excepciones, los péptidos CAP 18-A, Maximina 1-B y dermacidina 1L-B. Ninguno de los péptidos presentó una concentración hemolítica en la cual el 50% de los glóbulos rojos se vieran afectados. Estos valores de concentración hemolítica fueron inferiores a la máxima concentración empleada en el ensayo de manera que las CH_{50} (concentración hemolítica donde el 50% de las células se ven afectadas) fueron calculadas mediante análisis estadístico realizado por el software. En estas condiciones, las CH_{50} calculadas más bajas en orden creciente fueron las de los péptidos CAP 18-A, Maximina 1-B, PMAP 36-B, Protamina-A y PMAP 36-A con CH_{50} entre 212 y 333 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los péptidos LL37-A, Dermacidina 1L-B y CAP 18-B presentaron una menor actividad hemolítica media con CH_{50} entre 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los demás péptidos presentaron porcentajes de hemólisis cercanos al 1% a la concentración empleada y sus concentraciones hemolíticas medias calculadas superaron ampliamente las concentraciones empleadas en el ensayo Insulina y kanamicina empleados como

controles peptídico no relacionado y tratamiento de referencia contra tuberculosis respectivamente, no presentaron actividad hemolítica a la concentración empleada y su CH_{50} fue calculada mediante el software descrito. Es necesario aclarar que el cálculo de la CH_{50} a partir de análisis estadístico aporta resultados con intervalos de confianza amplios cuando la CH_{50} supera muy ampliamente la concentración máxima del péptido empleada.

Tabla 5. Actividad hemolítica de los péptidos. Se presentan las concentraciones hemolíticas medias (CH_{50}) de los péptidos evaluados calculadas a partir del programa GraphPad Prism 5.0 Trial Version (La Joya Software CA, USA) y los máximos porcentajes de hemólisis (%) en comparación con la actividad hemolítica de un péptido control no relacionado y un antimicrobiano de referencia para el tratamiento de Tuberculosis.

Péptido	CH_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de hemólisis (%)
LL37-A	847,7	4,04
LL37-B	4735	1,10
Bombinina-A	4317	1,10
Bombinina-B	2285	2,38
Protamina-A	320,1	3,30
Protamina-B	1252	1,46
Dermacidina 1L-A	2630	2,02
Dermacidina 1L-B	389,4	11,37
Maximina 1-A	2368	2,01
Maximina 1-B	271,6	20,00
CAP 18-A	212,6	24,77
CAP 18-B	506,3	4,04
SMAP 29-A	1144	3,30
SMAP 29-B	1914	2,20
PMAP 36-A	333,4	4,77
PMAP 36-B	280,4	7,34
Cecropina B-A	5057	0,92
Cecropina B-B	1305	2,93
Insulina	5097	1691
Kanamicina	1,83	1,83

Comparando estos valores con el trabajo de Siano y colaboradores ⁽⁶⁶⁾, donde se encontró que la actividad hemolítica para péptidos sintéticos de Granulisina evaluados contra *M. tuberculosis* no superó el 30% de hemólisis, se puede observar que la actividad hemolítica de los péptidos en estudio presentan valores más bajos, por lo tanto, menor daño a los eritrocitos.

6.6. Determinación de la actividad ATPasa basal en membranas celulares de *M. smegmatis* mc²155 y el efecto de los péptidos sintetizados

La membrana plasmática fue extraída de *M. smegmatis* mc²155 cepa silvestre, una micobacteria saprófita de crecimiento rápido usada como modelo para el estudio de las micobacterias. El método de centrifugación diferencial permitió obtener 7,339 mg de proteína de membrana extraída a partir de 1800 mL de cultivo micobacteriano crecido a una OD₆₀₀ de 0,4. La proteína de membrana plasmática se obtuvo en una concentración de 3669,9 µg/mL.

La actividad ATPasa basal se calculó a partir de los resultados obtenidos en tres ensayos independientes. La actividad enzimática se definió como las nanomoles de Pi liberado por minuto de reacción por miligramo de proteína de membrana. En la tabla 6 se observan los resultados de inhibición obtenidos para cada uno de los péptidos ensayados. Los porcentajes de actividad fueron calculados suponiendo que la actividad ATPasa basal en ausencia de péptidos es el 100%.

Como se observa en la tabla 6, no siempre la modificación de los péptidos condujo a un mejoramiento en su capacidad para inhibir la actividad ATPasa basal micobacteriana, lo que era de esperarse ya que durante el diseño de los péptidos modificados se buscó mejorar su actividad antimicrobiana en general, lo que no está directamente relacionado con su capacidad para inhibir las bombas ATPasas. Por ejemplo, se observa que los péptidos modificados SMAP 29-B y LL37-B son los únicos en los que si potencial para inhibir la actividad ATPasa basal aumenta luego del proceso de modificación, al compararlos con sus contrapartes sin modificar (SMAP 29-A y LL37-A). De hecho el péptido LL37-B es el que exhibe mejor capacidad inhibitoria de la actividad ATPasa basal micobacteriana, siendo capaz de disminuir dicha actividad hasta en un 50%.

A diferencia de lo anterior, en la mayoría de los casos (Bombinina-B, Protamina-B, Dermacidina 1L-B, Maximina 1-B y PAMP 36-B) se observa que el proceso de modificación de estos péptidos conlleva a una disminución en su capacidad de inhibir la actividad ATPasa basal micobacteriana, lo que no resulta preocupante ya que como se ve en la tabla 7 exhiben otros comportamientos deseables en un péptido antimicrobiano.

Tabla 6. Determinación de la actividad ATPasa basal en la membrana celular de *M. smegmatis* mc²155 y el efecto de los péptidos sintetizados en concentración 83,3µM

Péptido	Actividad ATPasa (nmol Pi.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	% actividad ATPasa respecto a la Basal sin Inhibición	% Inhibición de la actividad ATPasa
Basal	1,46 ± 0,14	100,0	0,0
LL37-A	1,31 ± 0,03	89,9	10,1
LL37-B	0,72 ± 0,08	49,4	50,6
Bombinina-A	1,16 ± 0,08	79,7	20,3
Bombinina-B	1,57 ± 0,12	100,0	0,0
Protamina-A	1,01 ± 0,06	69,6	30,4
Protamina-B	1,43 ± 0,09	98,0	2,0
Dermacidina 1L-A	1,10 ± 0,09	75,4	24,6
Dermacidina 1L-B	1,30 ± 0,10	89,4	10,6
Maximina 1-A	1,10 ± 0,05	75,6	24,4
Maximina 1-B	1,31 ± 0,09	90,3	9,7
CAP 18-A	1,60 ± 0,08	100,0	0,0
CAP 18-B	1,40 ± 0,11	96,0	4,0
SMAP 29-A	1,42 ± 0,07	97,5	2,5
SMAP 29-B	1,26 ± 0,11	86,3	13,7
PMAP 36-A	1,06 ± 0,14	73,1	26,9
PMAP 36-B	1,19 ± 0,25	81,5	18,5
Cecropina B-A	1,55 ± 0,33	100,0	0,0
Cecropina B-B	1,50 ± 0,35	100,0	0,0

También se puede observar en la tabla anterior que la actividad encontrada en presencia de los péptidos Bombinina-B, CAP 18-A, Cecropina B-A y Cecropina B-B fue mayor a la actividad basal, esto es debido a que el ensayo se hizo con vesículas de la membrana plasmática, las cuales al constituirse después del tratamiento de separación por ultracentrifugación, algunas pueden contener mayor cantidad de enzimas ATPasas.

En general, se observó que los péptidos con mejor actividad inhibitoria de enzimas ATPasas fueron (en orden decreciente, con un % de inhibición superior al 20%): LL37-B, Protamina-A, PMAP 36-A, Dermacidina 1L-A, Maximina 1-A y Bombinina-A, lo que sugiere que parte de la actividad antimicrobiana de estos péptidos depende de la inhibición de algunas enzimas ATPasas, las cuales son fundamentales para la viabilidad

de cualquier célula ya que llevan a cabo procesos cruciales para el funcionamiento celular entre los que se puede mencionar el pliegue de proteínas, el transporte intracelular, la degradación de proteínas, la iniciación del proceso de replicación del DNA, la reparación de DNA y el transporte de sustancias a través de membranas ⁽⁶⁷⁾

Finalmente, se encontró que los péptidos Bombinina-B, Protamina-B, Maximina 1-B, CAP 18-B, SMAP 29-A, Cecropina B-A y Cecropina B-B exhiben porcentajes de inhibición de la actividad ATPasa basal inferiores al 10%, lo que sugiere que su diana terapéutica en las micobacterias no son las enzimas ATPasas.

En resumen, no hay un consenso general de los péptidos ensayados en que tengan como diana terapéutica a las ATPasas micobacterianas, tanto los modificados como aquellos sin modificar, pero esto no significa que su potencial como fármacos sea discutible, ya que como se observa en la tabla 7 la modificación de los péptidos permitió obtener valores de MIC mucho más bajos, lo que sugiere que a pesar de su capacidad de inhibición de la actividad ATPasa no cambió mucho su potencial antimicobacteriano sí mejoró gracias al diseño bioinformático de las secuencias análogas.

En la tabla 7 se resumen los resultados obtenidos, donde podemos concluir que los péptidos que presentaron mejores resultados fueron PMAP 36-A, PMAP 36-B, CAP 18-B, LL37-B, Cecropina B-B, Protamina-B, maximina 1-B y Bombinina-B; estos péptidos presentan una CMI menor a 600 µg/mL, porcentaje de hemólisis menor al 10% a excepción de la secuencia correspondiente a Maximina 1-B; en algunos casos se observa un alto porcentaje de inhibición de la actividad ATPasa como es el caso del péptido LL37-B o sin efecto alguno en la actividad ATPasa como el caso de Cecropina B-B; por lo tanto, un efecto combinado entre la disrupción de la membrana de la micobacteria y la inhibición de la actividad ATPasa no puede descartarse. Estas secuencias han generado un grupo de biomoléculas para continuar con su estudio en investigaciones posteriores como compuestos antituberculosos.

Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos de concentración mínima inhibitoria, actividad hemolítica e inhibición de la actividad ATPasa para los péptidos sintetizados.

Péptido	CMI ($\mu\text{g/mL}$) <i>M. smegmatis</i> mc²155	Porcentaje de hemólisis (%)	% Inhibición de la actividad ATPasa
LL37-A	2400	4,04	10,1
LL37-B	600	1,10	50,6
Bombinina-A	2400	1,10	20,3
Bombinina-B	600	2,38	0,0
Protamina-A	600	3,30	30,4
Protamina-B	600	1,46	2,0
Dermacidina 1L-A	2400	2,02	24,6
Dermacidina 1L-B	1200	11,37	10,6
Maximina 1-A	2400	2,01	24,4
Maximina 1-B	150	20,00	9,7
CAP 18-A	1500	24,77	0,0
CAP 18-B	150	4,04	4,0
SMAP 29-A	<2400	3,30	2,5
SMAP 29-B	2400	2,20	13,7
PMAP 36-A	37,5	4,77	26,9
PMAP 36-B	300	7,34	18,5
Cecropina B-A	600	0,92	0,0
Cecropina B-B	150	2,93	0,0

Es importante resaltar la característica de alta hidrofobicidad que presenta la membrana celular de la micobacteria y la formación de agregados, lo cual la hace altamente hidrofóbica por el alto contenido de ácidos micólicos, sin embargo, haciendo los cambios a nivel de estructura primaria de los fragmentos peptídicos de estudio permitió aumentar la actividad antimicobacteriana y con una actividad hemolítica baja.

En general, se pudo determinar que el diseño de péptidos haciendo cambios en su estructura primaria para mejorar características como la estructura helicoidal, valor antibacterial y carga, permite el desarrollo de nuevas estrategias para diseñar péptidos antimicrobianos como compuestos antituberculosos.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

- Los péptidos mejorados LL37-B, Bombinina-B, Dermacidina 1L-B, Maximina 1-B, CAP 18-B, SMAP 29-B, PMAP 36-B y Cecropina B-B presentan menor concentración inhibitoria frente a *M. smegmatis* mc²155 con referencia a los péptidos blancos.
- Los péptidos LL37-A, LL37-B, Bombinina-A, Bombinina-B, Protamina-A, Protamina-B, Dermacidina 1L-A, Maximina 1-A, CAP 18-B, SMAP 29-A, SMAP 29-B, PMAP 36-A, PMAP 36-B, Cecropina B-A y Cecropina B-B mostraron una actividad hemolítica menor al 10%, excepto los péptidos dermacidina 1L-B, maximina 1-B y CAP 18-A con actividad hemolítica de 11,37%, 20,00% y 24,77% respectivamente.
- La actividad ATPasa basal de la membrana celular de *M. smegmatis* mc²155 fue inhibida por la mayoría de los péptidos sintetizados, siendo LL37-B el péptido que exhibe el mayor porcentaje de inhibición de la actividad ATPasa basal con un 50%.
- La estrategia de diseño “*In silico*” muestra un mejoramiento en la actividad antimicobacteriana, ya que en la mayoría de los casos los péptidos análogos presentaron una menor MIC, siendo los péptidos que presentaron mejores resultados (orden decreciente MIC \leq 600 μ g/mL) LL37-B, Bombinina-B, Protamina-B, PMAP 36-B, Maximina 1-B, CAP 18-B, Cecropina B-B y PMAP 36-A; lo cual nos muestra que puede ser utilizado como herramienta para el desarrollo de nuevos péptidos antimicobacterianos.

7.2. Recomendaciones

- Realizar ensayos de citotoxicidad de los péptidos sintetizados en células eucariotas, ya que nos permite identificar si los péptidos pueden producir daño a las células del hospedero, por lo cual no se podrían utilizar.
- Determinar el blanco intracelular de las moléculas del presente estudio, mediante microscopía fluorescente que nos permite observar a que zona se une el péptido y ejerce su acción antimicobacteriana.
- Hacer medidas de electrofisiología para determinar si hay interrupción del gradiente electrónico en la membrana celular, para así determinar si los péptidos tienen como blanco la membrana celular de la micobacteria y genera la formación de poros en la membrana.
- Utilizar aminoácidos D en la síntesis de las secuencias que presentaron mejores resultados. De esta forma al ingresar el péptido en la célula no sea degradado por proteasas y así aumentar su potencial como compuesto antimicobacteriano.
- Hacer estudios de RMN para la determinación de la estructura secundaria de los péptidos sintetizados.
- Hacer estudios de nanoencapsulación de los péptidos antimicrobianos que exhibieron mejores resultados que permitan ser utilizados como compuestos antituberculosos.

8. Anexos

8.1. ANEXO 1: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO INORGÁNICO MEDIANTE EL MÉTODO DE FISKE & SUBBAROW MODIFICADO [65]

Todas las soluciones deben ser preparadas en agua desionizada y fresca, en material libre de fósforo (material de vidrio tratado con ácido nítrico fumante y agua desionizada o material fungible nuevo).

SOLUCIÓN I-P: MOLIBDATO DE AMONIO AL 10% P/V (25 mL)

Pesar 2,5 g de molibdato de amonio R. A. y disolverlos en agua con ayuda de vórtex. Llevar a 25 mL y almacenar en la nevera en frasco transparente (solución estable por largos periodos de tiempo).

ÁCIDO CLORHÍDRICO 1 M (100 mL)

A 50 mL de agua desionizada agregar 8,3 mL de HCl al 37% (fumante). Llevar a 100 mL con agua.

SOLUCIÓN II-P: ÁCIDO ASCÓRBICO 3%/ HCl 0,5 M/ MOLIBDATO DE AMONIO 0,5%/ SDS 3% (10 mL)

Pesar 0,3 g de ácido ascórbico y disolver en 3,5 mL de agua. Agregar 5 mL de HCl 1 M y enfriar a 0°C. Adicionar 0,5 mL de solución I-P y 1,5 mL de SDS al 20% con agitación constante durante las adiciones. La solución debe ser amarilla o verde claro, no azul. No es posible almacenar esta solución, es estable por unas pocas horas si se conserva sobre hielo.

SOLUCIÓN III-P: CITRATO DE BISMUTO/CITRATO DE SODIO AL 3,5% P/V (25 mL)

Poner 25 mL de HCl 1 M en agitación magnética, agregar al ácido 0,875g de citrato de bismuto R.A., una vez disuelto, agregar 0,875 g de citrato trisódico R. A., continuar la agitación hasta obtener una solución traslúcida. Almacenar en frasco oscuro.

SDS AL 20% P/V (10 mL)

Pesar 2 g de SDS libre de fosforo, disolver completamente (calentando suavemente) y llevar a 10 mL con agua desionizada.

SOLUCIÓN PATRÓN DE Pi 1 MM (10 mL)

Pesar 0,068 g de KH_2PO_4 y disolver en 50 mL de agua desionizada (usar balón aforado). Hacer una dilución 1 a 10 usando la solución anterior. Usar el mismo día. Hacer una dilución nueva cada vez que se requiera una nueva curva de calibración.

Bibliografía

1. Donoghue, H. D. (2009). Human tuberculosis--an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 11(14-15), 1156–62.
2. WHO Report 2012/Global Tuberculosis control. The Global Plan to Stop TBC, 2006–2015. Geneva, Stop TBC Partnership and World Health Organization (WHO/HTM/ STB/2012.6).
3. WHO Report 2010/Global report on surveillance and response. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). World Health Organization (WHO/HTM/ TB/2010.3).
4. Nathan, C., Gold, B., Lin, G., Stegman, M., Pedro, L., Carvalho, S. De, Vandal, O., et al. (2008). A philosophy of anti-infectives as a guide in the search for new drugs for tuberculosis. *Nature Medicine*.
5. Morbidoni, H., De la Iglesia, A. (2006). Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos, 97–109.
6. Zhang, Y., & Yew, W. W. (2009). STATE OF THE ART Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 13(11), 1320–1330.
7. Sheen, P., Ferrer, P., Gilman, R. H., López-Llano, J., Fuentes, P., Valencia, E., & Zimic, M. J. (2009). Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 89(2), 109–13
8. Fattorini, L., Gennaro, R., Zanetti, M., Tan, D., Brunori, L., Giannoni, F., Pardini, M., et al. (2004). In vitro activity of protegrin-1 and beta-defensin-1, alone and in combination with isoniazid, against *Mycobacterium tuberculosis*. *Peptides*, 25(7), 1075–7.
9. Kant, S., Maurya, A. K., Kushwaha, R. a S., Nag, V. L., & Prasad, R. (2010). Multi-drug resistant tuberculosis: an iatrogenic problem. *Bioscience trends*, 4(2), 48–55.
10. Coll, P. (2003). Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 299–307.
11. Aristoff, P. a, Garcia, G. a, Kirchhoff, P. D., & Hollis Showalter, H. D. (2010). Rifamycins--obstacles and opportunities. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 90(2), 94–118.
12. Ahmad, S., & Mokaddas, E. (2009). Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Respiratory medicine*, 103(12), 1777–90.
13. Steinstraesser, L., Kraneburg, U., Jacobsen, F., & Al-Benna, S. (2011). Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology*, 216(3), 322–33.
14. Leontiadou, H., Mark, A. E., & Marrink, S. J. (2006). Antimicrobial peptides in action. *Journal of the American Chemical Society*, 128(37), 12156–61.
15. Epand, R. F., Maloy, W. L., Ramamoorthy, A., & Epand, R. M. (2010). Probing the “charge cluster mechanism” in amphipathic helicoidal cationic antimicrobial peptides. *Biochemistry*, 49(19), 4076–84.
16. Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50.

17. Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O., & Terán, L. M. (2010). Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 135(1), 1–11.
18. Vaara, M. (2009). New approaches in peptide antibiotics. *Current opinion in pharmacology*, 9(5), 571–6.
19. Hancock, R. E. W., & Sahl, H.G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), 1551–7.
20. Won, H.-S., Kang, S.-J., & Lee, B.-J. (2009). Action mechanism and structural requirements of the antimicrobial peptides, gaegurins. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(8), 1620–9.
21. Almeida, P. F., & Pokorny, A. (2009). Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: from kinetics to thermodynamics. *Biochemistry*, 48(34), 8083–93.
22. Chou, H.-T., Wen, H.-W., Kuo, T.-Y., Lin, C.-C., & Chen, W.-J. (2010). Interaction of cationic antimicrobial peptides with phospholipid vesicles and their antibacterial activity. *Peptides*, 31(10), 1811–20.
23. Rivas, L. (2011). Péptidos antibióticos eucarióticos : ¿una nueva alternativa en clínica ? *Gene*, 21(7), 358–365.
24. Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), D933–7.
25. Lata, S., Sharma, B. K., & Raghava, G. P. S. (2007). Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC bioinformatics*, 8, 263.
26. Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O., & Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*, 92(9), 1236–41.
27. Kiss, G., & Michl, H. (1962). On the venomous skin secretion of the orange speckled frog *Bombina variegata*. *Toxicon*. 1: 33-39.
28. Habermann, E. (1972) Bee and wasp venoms. *Science*. 177: 314-322
29. Hultmark, D., Steioner, H., Rasmuson, T., & Boman, H.G. (1980). Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from haemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*. 106 :7-16
30. Aspedon, A., & Groisman, E. (1996). The antibacterial action of protamine: evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology (Reading, England)*, 142 (Pt 1, 3389–97).
31. Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunagas, F., Mutas, T., Iwanagall, S., Niwa, M., et al. (1988). Tachyplesin, a Class of Antimicrobial Peptide from the Hemocytes of, 263(32), 16709–16713.
32. Mechkarska, M., Ahmed, E., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., Vaudry, H., King, J. D., et al. (2010). Antimicrobial peptides with therapeutic potential from skin secretions of the Marsabit clawed frog *Xenopus borealis* (Pipidae). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 152(4), 467–72.
33. Walsh, T. J. (1999). MINIREVIEW Antifungal Peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens, 43(1), 1–11.
34. Ganz, T. (2004). Defensins : antimicrobial peptides of vertebrates, 327, 539–549.
35. Wessely-Szponder, J., Majer-Dziedzic, B., & Smolira, A. (2010). Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. *Journal of microbiological methods*, 83(1), 8–12.

36. Wessely-Szponder, J., Majer-Dziedzic, B., & Smolira, A. (2010). Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. *Journal of microbiological methods*, 83(1), 8–12.
37. Ramanathan, B., Davis, E. G., Ross, C. R., & Blecha, F. (2002). Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 4(3), 361–72.
38. Thennarasu, S., Tan, A., Penumatchu, R., Shelburne, C. E., Heyl, D. L., & Ramamoorthy, A. (2010). Antimicrobial and membrane disrupting activities of a peptide derived from the human cathelicidin antimicrobial peptide LL37. *Biophysical journal*, 98(2), 248–57.
39. Brogden, K. A., Nordholm, G., & Ackermann, M. (2007). Antimicrobial activity of cathelicidins BMAP28 , SMAP28 , SMAP29 , and PMAP23 against *Pasteurella multocida* is more broad-spectrum than host species specific. *Veterinary Microbiology*, 119, 76–81.
40. Rivas-santiago, B., C, M., Sada, E., Hernández-pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas, 48(1), 62–71.
41. Zhang, X., Oglęcka, K., Sandgren, S., Belting, M., Esbjörner, E. K., Nordén, B., & Gräslund, A. (2010). Dual functions of the human antimicrobial peptide LL-37-target membrane perturbation and host cell cargo delivery. *Biochimica et biophysica acta*, 1798(12), 2201–8.
42. Sang, Y., & Blecha, F. (2009). Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions. *Developmental and comparative immunology*, 33(3), 334–43.
43. Ganz, T. (2004). Defensins : antimicrobial peptides of vertebrates, 327, 539–549.
44. Liu, P. T., & Modlin, R. L. (2008). Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Current opinion in immunology*, 20(4), 371–6.
45. Tellez, D. E. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55–67.
46. Castañeda-casimiro, J., Ortega-roque, J. A., Marcela, A., Aquino-andrade, A., Serafín-lópez, J., Estrada-parra, S., & Estrada, I. (2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Artemisa*, 18, 16–29.
47. Mihajlovic, M., & Lazaridis, T. (2010). Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. *Biochimica et biophysica acta*, 1798(8), 1494–502.
48. Jean-François, F., Elezgaray, J., Berson, P., Vacher, P., & Dufourc, E. J. (2008). Pore formation induced by an antimicrobial peptide: electrostatic effects. *Biophysical journal*, 95(12), 5748–56.
49. Haney, E. F., Nathoo, S., Vogel, H. J., & Prenner, E. J. (2010). Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides: a potential link to mode of action. *Chemistry and physics of lipids*, 163(1), 82–93.
50. Matsuzaki, K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(8), 1687–92.
51. Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*, 29(9), 464–72.
52. 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), 149–77.
53. Zelezetsky, I., & Tossi, A. (2006). Alpha-helicoidal antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(9), 1436–49.
54. Saravanan, R., Bhunia, A., & Bhattacharjya, S. (2010). Micelle-bound structures and dynamics of the hinge deleted analog of melittin and its diastereomer:

- implications in cell selective lysis by D-amino acid containing antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta*, 1798(2), 128–39.
55. Bessalle, R., Kapitkovsky, a, Gorea, a, Shalit, I., & Fridkin, M. (1990). All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. *FEBS letters*, 274(1-2), 151–5.
 56. Wittig, I., & Schägger, H. (2008). Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et biophysica acta*, 1777(7-8), 592–8.
 57. Upadhyaya, R. S., Vandavasi, J. K., Vasireddy, N. R., Sharma, V., Dixit, S. S., & Chattopadhyaya, J. (2009). Design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling studies of novel quinoline derivatives against Mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(7), 2830–41.
 58. Santos, P., Gordillo, A., Osses, L., Salazar, L.-M., & Soto, C.-Y. (2012). Effect of antimicrobial peptides on ATPase activity and proton pumping in plasma membrane vesicles obtained from mycobacteria. *Peptides*, 36(1), 121–8.
 59. Williams, P.; Albericio, F.; Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. Universidad de Barcelona. España 1997. Págs: 2-74.
 60. Kimmerlin, T., & Seebach, D. (2005). “100 Years of Peptide Synthesis”: Ligation Methods for Peptide and Protein Synthesis With Applications To Beta-Peptide Assemblies. *The journal of peptide research: official journal of the American Peptide Society*, 65(2), 229–60.
 61. Amblard, M., Fehrentz, J., Martinez, J., & Subra, G. (2006). Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Synthesis*, 33.
 62. Keiderling, T. a. (2002). Protein and peptide secondary structure and conformational determination with vibrational circular dichroism. *Current opinion in chemical biology*, 6(5), 682–8.
 63. Vega-Avila, E., & Pugsley, M. K. (2011). An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 54, 10–4.
 64. Malagoli, D. (2007). A full-length protocol to test hemolytic activity of palytoxin on human erythrocytes. Technical Report, 92–94.
 65. Cariani, L., Thomas, L., Brito, J., & Castillo, J. R. (2004). Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases. *Analytical Biochemistry*, 324, 79–83.
 66. Siano, A.; Tonarelli, G.; Imaz, M. S.; Perin, J. C.; Ruggeri, N.; Lopez, M.; Santi, M. N. & Zerbini, E. (2010). Bactericidal and Hemolytic Activities of Synthetic Peptides Derived from Granulysin. *Protein and Peptide Letters*, 17 (4) 517-521.
 67. Chene, P., ATPases as drug targets: learning from their structure. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. 1(9) 665-73