



PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Simonutti, Valeria

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas- UNL

Director/a: Húmpola, Verónica

Codirector/a: Méndez, Emilce

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Péptidos antimicrobianos, actividad hemolítica, resistencia microbiana

INTRODUCCIÓN

Frente al alarmante aumento de la resistencia de las bacterias a los antimicrobianos, la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos se ha convertido en un tema relevante para la industria farmacéutica. Los péptidos antimicrobianos son candidatos ideales debido a su amplio espectro de actividad, rapidez de acción, selectividad y su baja tendencia a desarrollar resistencia, comparada con los antibióticos convencionales. Si bien éstos presentan ciertas desventajas para su aplicación farmacológica asociadas a su relativa baja estabilidad en plasma y sensibilidad a proteasas, los avances en estrategias de síntesis y en tecnologías para la formulación de medicamentos han permitido mejorar sus limitaciones terapéuticas, situándolos como agentes viables para el diseño, desarrollo y producción de nuevos fármacos.

OBJETIVOS

- Sintetizar y diseñar péptidos sobre la base de secuencias novedosas aisladas de pieles de anfibios.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados frente a bacterias gram + y gram -, aisladas de procesos infecciosos humanos y resistentes a los antibióticos convencionales.
- Investigar las propiedades toxicológicas de los péptidos que permitan definir su potencial terapéutico y las limitaciones para su aplicación.

Título del proyecto: Agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas:

Diseño de péptidos y peptidomiméticos con actividad anticolinesterásica

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director/a: Siano, Álvaro



Federación
Universitaria
del Litoral

100



UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL LITORAL

METODOLOGÍA

Síntesis y caracterización de péptidos

Tomando como modelo de partida péptidos naturales aislados e identificados a partir de la piel de *Hypsiboas cordobae*, anfibio anuro del Litoral Argentino (Spinelli y col., 2018) se sintetizaron 10 análogos amidados en el extremo C-terminal denominados Hcl-1, Hcl-3, Hcl-6, Hcl-9, Hcl-10, Hcl-11, Hcl-12, Hcl-13, Hcl-14 y Hcl-15, mediante síntesis en fase sólida, siguiendo la estrategia Fmoc. La caracterización y análisis de los compuestos sintetizados se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) en fase reversa, empleando una columna analítica Atlantis C18 (3 μ m, 4,6 x 150 mm) en un equipo HPLC Waters y por espectrometría de masas MALDI- TOF.

Evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de la actividad hemolítica de los compuestos sintetizados

La actividad antimicrobiana de cada péptido se evaluó mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), empleando el método de microtitulación por dilución en caldo, modificado para péptidos antimicrobianos catiónicos, propuesto por el laboratorio de R.E.W. Hancock (http://www.ihcworld.com/_protocols/), y la concentración bactericida mínima (CBM). Para ello se utilizaron los siguientes aislamientos clínicos de bacterias gram + y - resistentes: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Sa R1) y *Escherichia coli* resistente a ampicilina, cefazolina, ampicilina sulbactam y gentamicina (Ec).

Para evaluar las propiedades toxicológicas se determinó la actividad hemolítica frente a eritrocitos humanos, midiendo la hemoglobina liberada a 405nm, siguiendo protocolos ya optimizados por el grupo de trabajo (Humpola y col., 2017).

Estudio extendido sobre las propiedades fisicoquímicas, antimicrobianas y estructurales del péptido Hcl-15

Para investigar sus propiedades fisicoquímicas se realizó un estudio in silico utilizando el servidor en línea http://ciencias.medellin.unal.edu.co/gruposdeinvestigacion/prospeccionydisenobiomoleculas/InvErPep/public/home_en. Por otro lado, se ensayó la actividad antimicrobiana frente a dos nuevos aislamientos clínicos de bacterias gram (+) y (-): *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Sa R2) y *Klebsiella pneumoniae* (Kb). Además, se estudió la estructura secundaria del péptido en agua y en presencia de vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) mediante análisis por Dicroísmo Circular (DC).

CONCLUSIONES

En la Tabla 1 se muestran las características fisicoquímicas y los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) y de concentración bactericida mínima (CBM) de los péptidos estudiados. Se puede observar que los péptidos sintetizados son secuencias cortas, de entre 8 y 15 residuos aminoacídicos y la mayoría presentan carga neta positiva a pH 7. La capacidad de los péptidos de ser retenidos en una columna de C₁₈ (HPLC) se correlaciona con la hidrofobicidad de las secuencias y, por lo tanto, en base a los tiempos de retención obtenidos, se pudo establecer el siguiente orden de hidrofobicidad relativa de mayor a menor: Hcl-1>Hcl-14>Hcl-10>Hcl-13>Hcl-12>Hcl-3>Hcl-11>Hcl-9>Hcl-6>Hcl-15. El péptido Hcl-15 mostró capacidad de inhibir el crecimiento de ambas cepas bacterianas, con valores de CIM de 8 μ M y 128 μ M para *E. coli* y *S.*

aureus R1, respectivamente, presentando actividad bactericida a concentraciones de 128 μM frente a *E. coli*. Mientras que los demás péptidos no presentaron actividad antibacteriana en el rango de concentraciones ensayado.

Tabla 1: Péptidos sintetizados, propiedades fisicoquímicas y actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados

Péptido	Peso molecular (g/mol)	Cantidad de aminoácidos	Carga neta pH=7	Tiempo de retención (min)	Sa R1 CIM (μM) / CBM (μM)	Ec CIM (μM) / CBM (μM)
Hcl-1	1248	12	+2	16	>128/>128	>128/>128
Hcl-3	1556	15	-1	12,49	>128/>128	>128/>128
Hcl-6	1091	10	+3	11,52	>128/>128	>128/>128
Hcl-9	953	8	-1	11,64	>128/>128	>128/>128
Hcl-10	1509	14	0	14,25	>128/>128	>128/>128
Hcl-11	906	8	+3	12,24	>128/>128	>128/>128
Hcl-12	1436	15	+1	13,59	>128/>128	>128/>128
Hcl-13	1202	12	+3	13,74	>128/>128	>128/>128
Hcl-14	1190	12	+3	15,72	>128/>128	>128/>128
Hcl-15	1003	9	+5	6,57	128 />128	8/128

Respecto a la actividad hemolítica de los péptidos (Figura 1), se puede ver que Hcl-14 y Hcl-15 mostraron muy baja actividad lítica (< a 10 % de hemólisis) en todo el rango de concentraciones estudiado. No obstante, los demás péptidos presentaron considerable actividad hemolítica a concentraciones mayores a 50 μM , si bien a menores concentraciones tuvieron escasa hemólisis.

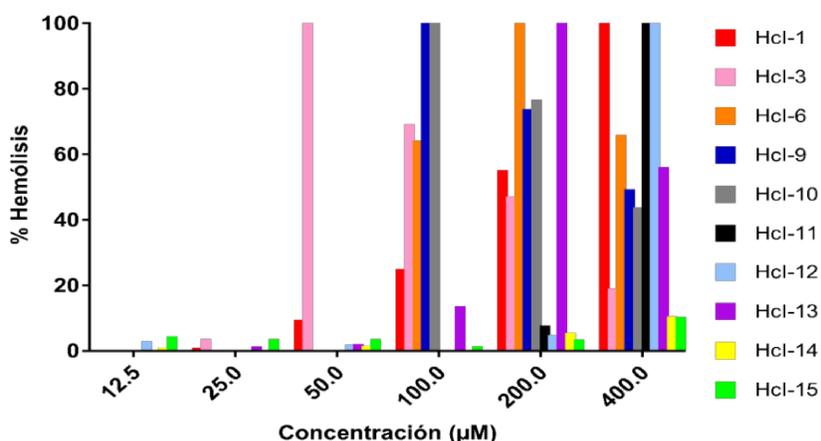


Figura 1: Actividad hemolítica de los péptidos sintetizados. Rango de concentración ensayado 400 a 12,5 μM .

En la Tabla 2 se presentan los resultados del estudio extendido de las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas del péptido Hcl-15, el cual presentó buena capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y baja actividad hemolítica. La carga neta positiva, la hidrofobicidad y la capacidad de generar una estructura anfipática en cercanías de las membranas bacterianas son parámetros determinantes para la actividad de los péptidos antimicrobianos. El péptido Hcl-15 presentó una buena cationicidad (carga neta a pH 7= +5), lo que le permitiría interactuar electrostáticamente con los componentes cargados negativamente de las membranas

bacterianas. Por otro lado, analizando el porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, la hidrofobicidad y el tiempo de retención obtenido por HPLC (ver Tabla 1 y 2) podemos observar que es un péptido hidrofílico y, además, tiene una baja tendencia a adoptar una estructura anfipática ($\mu\text{H}=0,24$). Por otro lado, Hcl-15 mostró también capacidad inhibitoria frente al aislamiento clínico de *S aureus* meticilino-resistente (CIM=64 μM), mientras que no presentó actividad inhibitoria frente a *Klebsiella pneumoniae*. En lo que respecta al análisis mediante Dicroísmo Circular, se pudo observar que en agua y en presencia de vesículas neutras de DPPC (Figura 2), las cuales mimetizan la membrana de células eucariotas, el péptido Hcl-15 se encontró desestructurado, presentando un mínimo a 198 nm. Mientras que en vesículas de DPPG, las cuales mimetizan las membranas bacterianas, el péptido se mostró parcialmente estructurado, lo que indicaría una mayor interacción, de naturaleza electrostática, con las vesículas cargadas negativamente.

Tabla 2: Estudio extendido de las propiedades fisicoquímicas v antimicrobianas del péptido Hcl-15

Carga neta pH=7	%aa H	H	μH	Sa R2		Kb	
				CIM (μM) / CBM (μM)	CIM (μM) / CBM (μM)		
+5	11	-1.91	0,24	64 / >128	>128/>128		

% aa H: porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos; H: Hidrofobicidad; μH : momento hidrofóbico

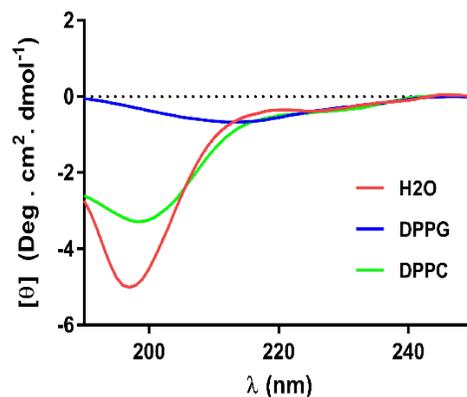


Figura 2: Análisis de la estructura secundaria de Hcl-15 mediante DC, en agua y en presencia de vesículas de

En base a estos resultados, podemos concluir que Hcl-15 es el péptido más promisorio para realizar estudios más extendidos sobre su aplicación como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades que tienen como agentes etiológicos a bacterias gram + y gram - resistentes y, por otro lado, para plantear el diseño de nuevos análogos, sobre la base de su secuencia peptídica, con el objetivo de ampliar su espectro de acción y mejorar sus propiedades terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Guilhelmelli, F.; Vilela, N.; Albuquerque, P.; Derengowski, L.D.; Silva-Pereira, I.; Kyaw, C.M.** (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol.* 4: 353.
- Húmpola, M.V.; Rey, M.C.; Carballeira, N.M.; Simonetta, A.C.; Tonarelli, G.G.** (2017). Biological and structural effects of the conjugation of an antimicrobial decapeptide with saturated, unsaturated, methoxylated and branched fatty acids. *J. Pept. Sci.* 23: 45–55.
- Spinelli, R.; Sanchis, I.; Aimaretti, F. M.; Attademo, A. M.; Portela, M.; Humpola, M. V.; Siano, A.** (2018). Natural multi-target inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidase enzymes with antioxidant potential from skin extracts of *Hypsiboas cordobae* and *Pseudis minuta* (Anura: Hylidae). *Chem. Biodiversity* 10.1002/cbdv.201800472.
- Stone, T. A.; Cole, G. B.; Nguyen, H. Q.; Sharpe, S.; Deber, C. M.** (2018). Influence of hydrocarbon-stapling on membrane interactions of synthetic antimicrobial peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(6), 1189–1196.