

19. Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos Ib-M contra *Escherichia coli*. Un estudio estructural y proteómico

Ana Elvira Farfán-García^{1,2}, Eliana Durley Restrepo-Pineda³, Johanna Marcela Flórez-Castillo⁴

INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) son producidos en los organismos y exhiben un amplio espectro de actividad biológica, siendo una buena opción terapéutica contra bacterias multiresistentes. Los mecanismos de acción de los AMPs antibacterianos dependen de la interacción entre sus parámetros estructurales y biofísicos con la carga negativa de las membranas. No obstante, esto aún es poco entendido.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Péptidos Ib-M1, Ib-M2 e Ib-M6 mostraron Concentración Mínima Inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) entre 1,6 y 9,4 μM frente a *E. coli* O157:H7, sin efectos citotóxicos en una línea celular (datos no publicados), sin embargo, aún no se conocen sus mecanismos de acción. Desde esta perspectiva, se plantean las siguientes preguntas: ¿Mediante estudios estructurales, de interacción con membranas y proteómicos, es posible conocer el o los mecanismos de acción de péptidos Ib-M contra *E. coli*? ¿Sus interacciones producen cambios estructurales que desestabilizan la membrana? ¿Es posible conocer el o los blancos de Ib-M y su mecanismo bactericida? Los resultados de este trabajo facilitarán la transferencia de estudios *in vitro* a modelos *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los mecanismos de acción de péptidos an-

¹ Doctorado Ciencias Básicas Biomédicas. Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia.

² Grupo de Investigación en Manejo Clínico –CliniUDES–Universidad de Santander, Bucaramanga, Santander.

³ Doctorado Ciencias Básicas Biomédicas. Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas. Grupo Bacterias y Cáncer. Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia.

⁴ Departamento de Ciencias Exactas, Exactas, Naturales y Agropecuarias. Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas –CIBAS– Universidad de Santander. Bucaramanga, Santander.

Correspondencia: ana.farfana@udea.edu.co

Financiación: Colciencias. Códigos: 129974455449 CT-778-2016, 1299980763392 CT-760-2018.

timicrobianos Ib-M contra *E. coli* mediante estudios estructurales y proteómicos.

METODOLOGÍA

Estudio experimental *in vitro*, en cual se determinará la MIC y la concentración mínima bactericida (MBC por sus siglas en inglés) de los péptidos Ib-M1, Ib-M2 e Ib-M6 (11) contra *E. coli* ATCC® 25922™ y su concentración citotóxica 50 (CC_{50}) frente a líneas celulares. Estructura de los péptidos en buffers y membranas artificiales, se determinará por difracción circular (DC). Durante su acción antibacteriana se analizará la estabilidad frente a cationes y proteasas. La interacción y permeabilización de Ib-M en las membranas externa e interna bacteriana, se estudiará con N-phenyl-1-naphthylamine (NPN), β -galactosidasa, afinidad al lipopolisacárido (LPS) y potencial de membrana, que serán correlacionadas con la morfología observada en estudios de Microscopía Electrónica de Transmisión y de Barrido. Finalmente, se elucidará la expresión proteica en *E. coli* como respuesta a los tratamientos. Se usarán péptidos controles Magainina, Buforina 2, Pw2 y medicamentos de referencia. Cada ensayo se realizará por triplicado y en mínimo tres experimentos independientes.

RESULTADOS ESPERADOS

Conocer el o los mecanismos de acción antibacterianos de Ib-M, con el fin de contribuir con información para la realización de investigaciones sobre estrategias de inmovilización de péptidos Ib-M que faciliten su direccionamiento y dosificación hacia blancos moleculares.

RESULTADOS PRELIMINARES

La MIC obtenida a partir de diluciones al doble de Ib-M contra *E. coli* en $\mu\text{M} \pm \text{D.E}$ fueron de $3,1 \pm 0$, $12,5 \pm 0$ y $16,6 \pm 6,2$ para Ib-M2, Ib-M1 e Ib-M6, siendo mejor Ib-M2 con respecto a estreptomycin (6,2 ± 0). La MBC fue de $7,6 \pm 2,7$, $23,6 \pm 4,1$ y $26,3 \pm 9,7$ para Ib-M2, Ib-M6 e Ib-M1, con un valor para estreptomycin de $12,5 \pm 14,3$. En las curvas de latencia (lag) de *E. coli*, los péptidos Ib-M y estreptomycin mostraron inhibición del crecimiento mayor a 20 horas pos-exposición en MICx8, MICx4, MICx2 y MICx1. Sin embargo, en MICx0,5 se observó que los péptidos Ib-M y el antibiótico mantenían la inhibición del crecimiento entre 8,7 y 17,3 horas, aunque menor para MICx0,25 (2 y 12 horas).

DISCUSIÓN

Los péptidos Ib-M mostraron un efecto bactericida, dado que la MBC no superó en más de 4 veces la MIC. Estos valores son comparables a los observados previamente en estos mismos péptidos frente a *E. coli* O157:H7. No obstante, la inhibición a sub-MIC de Ib-M y del antibiótico, sugiere evaluar la MIC en rangos de concentración más estrechos para establecer MIC óptimas.

CONCLUSIONES PRELIMINARES

Péptidos Ib-M presentaron actividad inhibitoria y bactericida contra *E. coli* ATCC 25922, siendo Ib-M2 el péptido con mejor efecto inhibitorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arias M, Jensen KV, Nguyen LT, Storey DG, Vogel HJ. Hydroxy-tryptophan containing derivatives of tritrypticin: modification of antimicrobial activity and membrane interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1848(1 Pt B):277-288.
2. Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(3):156-64.
3. Scott MG, Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol*. 2000;20(5):407-31.
4. Ashby M, Petkova A, Hilpert K. Cationic antimicrobial peptides as potential new therapeutic agents in neonates and children: a review. *Curr Opin Infect Dis*. 2014;27(3):258-267.
5. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto GF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol*. 2007;2(1):1-33.
6. Miao J, Chen F, Duan S, Gao X, Liu G, Chen Y, et al. iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of the Antimicrobial Mechanism of Peptide F1 against *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*. 2015;63(32):7190-7197.
7. Kozłowska J, Vermeer LS, Rogers GB, Rehnuma N, Amos TA, Koller G, et al. Combined systems approaches reveal highly plastic responses to antimicrobial peptide challenge in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. 2014;10(5):e1004104.
8. Sinha S, Zheng L, Mu Y, Ng WJ, Bhattacharjya S. Structure and Interactions of A Host Defense Antimicrobial Peptide Thanatin in Lipopolysaccharide Micelles Reveal Mechanism of Bacterial Cell Agglutination. *Sci Rep*. 2017;7(1):17795.
9. Arias M, Hoffarth ER, Ishida H, Aramini JM, Vogel HJ. Recombinant expression, antimicrobial activity and mechanism of action of tritrypticin analogs containing fluoro-tryptophan residues. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(5):1012-1023.
10. Liu B, Huang H, Yang Z, Liu B, Gou S, Zhong C, et al. Design of novel antimicrobial peptide dimer analogues with enhanced antimicrobial activity in vitro and in vivo by intermolecular triazole bridge strategy. *Peptides*. 2017;88:115-125.
11. Flórez-Castillo JM, Perullini M, Jobbágy M, Cano Calle HJ. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. Enhancing Antibacterial Activity Against *Escherichia coli* K-12 of Peptide Ib-AMP4 with Synthetic Analogues. *Int J Pept Res Ther*. 2014;20(3):365-369.