

# Mecanismos de acción de péptidos antibacterianos Ib-M contra *Escherichia coli*. Un estudio estructural y proteómico. Resultados preliminares

Ana Elvira Farfán-García<sup>1,2</sup>, Eliana Durley Restrepo-Pineda<sup>3</sup>,  
Johanna Marcela Flórez-Castillo<sup>2,4</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son una buena opción terapéutica contra bacterias multidrogoresistentes. Sin embargo, el uso terapéutico de los AMPs se ha obstaculizado, debido a su inestabilidad en ambientes específicos, propensión al clivaje por proteasas o en algunos casos citotoxicidad. Los AMPs exhiben pequeño tamaño, carga neta positiva y anfipaticidad, necesarios para adquirir estructura secundaria, en superficies hidrofóbicas e hidrofílicas, lo que facilita la interacción electrostática con las membranas bacterianas. Los péptidos Ib-M1, Ib-M2 e Ib-M6, que se usarán en este estudio, son análogos sintéticos del péptido Ib-AMP4, nativo de la planta *Impatiens balsamina*, que fueron obtenidos después de modificar su carga neta e hidrofobicidad mediante la inserción de arginina y triptófano. Estudios de la actividad biológica de Ib-M contra *E. coli* O157:H7, mostraron actividad inhibitoria menor a 10  $\mu$ M, sin evidencia de citotoxicidad en células *Vero*, por lo que se consideran agentes antibacterianos promisorios.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios recientes, señalan que es posible conocer las alteraciones que ocurren en las bacterias cuando son tratadas con péptidos, mediante la evaluación de las interacciones y cambios en las membranas, en el proteoma o en el transcriptoma, además de los estudios de determinación de estructura secundaria de péptidos por difracción circular (DC) en membranas y buffers. Si bien, ya se ha explorado que el péptido nativo Ib-AMP4

<sup>1</sup> Doctorado Ciencias Básicas Biomédicas. Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia.

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Manejo Clínico –CliniUDES– Universidad de Santander, Bucaramanga, Santander.

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

<sup>4</sup> 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: 1299980763392 CT-760-2018, 129974455449 CT-778-2016.

adquiere forma de hoja- $\beta$  en la interacción con la membrana y que ejerce actividad bactericida no lítica, aún no se conoce cuál es el modo de acción de los análogos Ib-M en *E. coli*. Estudios previos de DC indican que, péptidos Ib-M se estructuran en hélices- $\alpha$  cuando están en contacto con buffer que simulan membranas bacterianas, probablemente por las inserciones de triptófano y arginina. En este sentido, y dado que todavía no se conocen los factores que pueden estar relacionados con su actividad biológica y el tiempo que requieren para eliminar las células viables, este trabajo pretende evaluar cuál es el mecanismo de acción bactericida que ejercen los péptidos Ib-M contra *E. coli*, con el fin de brindar información para la realización de estrategias de inmovilización de péptidos, que faciliten su direccionamiento y dosificación hacia blancos moleculares.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar los mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos Ib-M contra *E. coli* mediante estudios estructurales y proteómicos.

## METODOLOGÍA

Este es un estudio experimental *in vitro*. Se determinarán la concentración mínima inhibitoria y bactericida (MIC y MBC) de los péptidos Ib-M1, Ib-M2 e Ib-M6 contra *E. coli* ATCC® 25922<sup>TM</sup>, su estabilidad frente a cationes y proteasas, así como la concentración citotóxica 50 (CC50) frente a una línea celular; estructura de los péptidos en buffers y membranas artificiales, se evaluará por difracción circular (DC); interacción y permeabilización de Ib-M en las membranas bacterianas, se estudiará con N-phenyl-1-naphthylamine (NPN),  $\beta$ -galactosidasa, afinidad de unión al lipopolisacárido (LPS) y potencial de membrana, cuyos resultados se correlacionarán con los de microscopía electrónica. Además, se evaluará si existe interacción de Ib-M con el material genómico y se elucidará la expresión proteica en *E. coli* en respuesta a los tratamientos. Se usarán como controles, péptidos con mecanismo de acción conocido y antibiótico de referencia. Cada ensayo se realizará por triplicado y en mínimo tres experimentos independientes.

## RESULTADOS PRELIMINARES

La MIC obtenida a partir de diluciones al doble de Ib-M contra *E. coli* en  $\mu$ M fueron de 3,1, 12,5 y 16,6 para Ib-M2, Ib-M1 e Ib-M6, siendo mejor Ib-M2. La MBC fue de 7,6, 23,6 y 26,3 para Ib-M2, Ib-M6 e Ib-M1. En las curvas

de latencia (lag) de *E. coli*, los péptidos Ib-M y estreptomina mostraron inhibición del crecimiento mayor a 20 horas pos-exposición en MICx8-MICx1. Sin embargo, en MICx0,5 se observó que Ib-M y el antibiótico mantenían la inhibición del crecimiento entre 8,7 y 17,3 horas, siendo menor para MICx0,25 (2 y 12 horas). Las MIC en concentraciones con diferencias de 0,5 uM, fueron de 3,0, 4,2 y 5,4 para a Ib-M2, Ib-M1, Ib-M6, respectivamente. Las MBC correspondieron a 3,2, 5,0 y 5,7 para Ib-M2, Ib-M1 e Ib-M6. La sensibilidad de los péptidos frente a cationes, mostró que no fueron afectados los valores de la MIC ni de la MBC de Ib-M2 en medios suplementados con KCl y NaCl, pero si para MgCl2 y CaCl2.

## DISCUSIÓN

Se evidenció el efecto bactericida de Ib-M contra *E. coli*. Variaciones de las concentraciones de péptidos en rangos de 0,5 µM, permitieron determinar un valor de MIC óptimo para cada péptido, cuya determinación es importante en la evaluación de los mecanismos de acción. Ib-M2 fue más tolerante a las sales monovalentes.

**Palabras clave:** Péptidos, Antibacterianos, *Escherichia coli*, Relación Estructura-actividad, Membrana Celular

## BIBLIOGRAFÍA

- 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):277-88.
- 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 May;1858(5):1012-23.
- 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):258-67.
- Fan X, Korytowski A, Makky A, Tanaka M, Wink M. Ib-AMP4 insertion causes surface rearrangement in the phospholipid bilayer of biomembranes: Implications from quartz-crystal microbalance with dissipation. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1860(2):617-623.
- Flórez-Castillo JM, Perullini M, Jobbágy M, Cano-Calle HJ. Enhancing Antibacterial Activity Against *Escherichia coli* K-12 of Peptide Ib-AMP4 with Synthetic Analogues. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2014;20(3):365-369.
- Flórez-Castillo JM, Rondón-Villareal P, Ropero-Vega JL, Mendoza-Espinel SY, Moreno-Amézquita JA, Méndez-Jaimes KD, Farfán-García AE, Gómez-Rangel SY, Gómez-Duarte OG. Ib-M6 Antimicrobial Peptide: Antibacterial Activity against Clinical Isolates of *Escherichia coli* and Molecular Docking. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(2):79.
- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*. 2007;2(1):1-33.
- Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(3):156-64.
- Kozłowska J, Vermeer LS, Rogers GB, Rehnnuma N, Amos SB, Koller G, McArthur M, Bruce KD, Mason AJ. Combined systems approaches reveal highly plastic responses to antimicrobial peptide challenge in *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. 2014;10(5):e1004104.
- Liu B, Huang H, Yang Z, Liu B, Gou S, Zhong C, Han X, Zhang Y, Ni J, Wang R. 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.
- Miao J, Chen F, Duan S, Gao X, Liu G, Chen Y, Dixon W, Xiao H, Cao Y. iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of the Antimicrobial Mechanism of Peptide F1 against *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2015; 63(32):7190-7197.
- Prada-Prada S, Flórez-Castillo J, Farfán-García A, Guzmán F, Hernández-Peñaranda I. Antimicrobial activity of Ib-M peptides against *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS One*. 2020;15(2):e0229019.
- Scott MG, Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol*. 2000;20(5):407-31.
- 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.
- Taylor RH, Acland DP, Attenborough S, Cammue BP, Evans IJ, Osborn RW, Ray JA, Rees SB, Broekaert WF. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J Biol Chem*. 1997;272(39):244807.