

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Actividad *in vitro* e *in silico* de cinco péptidos solapantes
procedentes de un péptido antimicrobiano

Valentina Luridiana Galati

Tutor: José M. Pérez de la Lastra

Máster en Biomedicina

Universidad de La Laguna

Curso 2021-2022



Dr. José Manuel Pérez de la Lastra, coordinador del Grupo de Investigación en Biotecnología de macromoléculas del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (CSIC), adscrito a la titulación Máster en Biomedicina por la ULL,

CERTIFICA:

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado «Actividad *in vitro* e *in silico* de cinco péptidos solapantes procedentes de un péptido antimicrobiano» ha sido realizado bajo mi supervisión por D.^a Valentina Luridiana Galati, matriculada en el Máster en Biomedicina durante el curso académico 2021-2022.
- Que, una vez revisada la memoria final del TFM, da su consentimiento para que sea presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de la memoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente informe en La Laguna a 5 de septiembre de 2022

PEREZ DE LA
LASTRA PEREZ DE
LA LASTRA JOSE
MANUEL -
30534621M

Firmado digitalmente por
PEREZ DE LA LASTRA
PEREZ DE LA LASTRA JOSE
MANUEL - 30534621M
Fecha: 2022.09.05 21:50:05
+01'00'



Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
1 Introducción.....	3
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Estado actual.....	5
1.2.1 Estudios con PrAMP	5
1.2.2 Estudios con péptidos truncados.....	6
2 Hipótesis y objetivos	9
2.1 Hipótesis	9
2.2 Objetivos.....	9
3 Materiales y métodos.....	11
3.1 Materiales	11
3.1.1 Equipo.....	11
3.1.2 Medios de cultivo y tampones	11
3.1.3 Microorganismos	11
3.1.4 Eritrocitos	12
3.1.5 Péptidos	12
3.2 Preparación de los medios	13
3.2.1 Ensayos <i>in vitro</i>	13
3.2.1.1 Ensayos de actividad de los péptidos frente a <i>E. coli</i>	13
3.2.1.2 Ensayos de actividad de los péptidos frente a <i>S. aureus</i>	15
3.2.1.3 Ensayos de actividad de los péptidos frente a <i>C. albicans</i>	16
3.2.1.4 Ensayos de integridad de las membranas celulares	17
3.2.1.5 Ensayos de actividad hemolítica.....	17
3.2.2 Análisis estadístico	18

3.3	Modelos bioinformáticos	18
3.3.1	Estructura tridimensional con I-TASSER	19
3.3.2	Actividad antimicrobiana con DBAASP	19
3.3.3	Actividad antimicrobiana con CAMP _{R3}	20
3.3.4	Actividad antifúngica con Antifp	20
3.3.5	Interacción con membranas con PPM	20
4	Resultados.....	21
4.1	Ensayos de actividad antimicrobiana	21
4.1.1	Ensayos con <i>E. coli</i>	21
4.1.2	Ensayos con <i>S. aureus</i>	22
4.1.3	Ensayos con <i>C. albicans</i>	24
4.2	Ensayo con eritrocitos humanos	26
4.3	Modelos bioinformáticos	27
4.3.1	Estructura tridimensional con I-TASSER	27
4.3.2	Actividad antimicrobiana con DBAASP	29
4.3.3	Actividad antimicrobiana con CAMP _{R3}	29
4.3.4	Actividad antifúngica con Antifp	30
4.3.5	Interacción con membranas predicha con PPM	31
4.3.5.1	Interacción con membranas de bacterias gramnegativas.....	31
4.3.5.2	Interacción con membranas de bacterias grampositivas u hongos	31
5	Discusión	35
5.1	Fuentes de error experimental	35
5.1.1	Precisión interna del instrumento: medidas de densidad óptica	35
5.1.2	Precisión interna del ensayo: efecto de borde en las microplacas	35
5.1.3	Sedimentación de las muestras de cultivos.....	36
5.1.4	Formación de biofilm	36

5.1.5	Proporción de medio de cultivo a concentraciones altas.....	37
5.2	Actividad de los péptidos	37
5.2.1	Actividad observada <i>in vitro</i>	37
5.2.2	Actividad predicha <i>in silico</i>	38
5.2.3	Implicaciones de los resultados y perspectivas futuras	41
6	Conclusiones.....	43
7	Referencias	45
7.1	Fuentes bibliográficas.....	45
7.2	<i>Software</i>	49
7.2.1	Herramientas bioinformáticas.....	49
7.2.2	Visualización de péptidos	49
7.2.3	Cálculos y gráficos	49
7.2.4	Dibujos.....	49

Índice de las figuras

Figura 3.1.	Secuencia del péptido original y los cinco péptidos derivados.....	12
Figura 3.2.	Disposición de las muestras en las placas para los ensayos con <i>E. coli</i>	14
Figura 3.3.	Preparación del inóculo y recuento en placa	15
Figura 3.4.	Disposición de las muestras para los ensayos con <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i>	16
Figura 3.5.	Disposición de las muestras en la placa para el ensayo con eritrocitos.	17
Figura 4.1.	Actividad de los péptidos frente a <i>E. coli</i>	22
Figura 4.2.	Actividad de los péptidos frente a <i>S. aureus</i>	24
Figura 4.3.	Actividad de los péptidos frente a <i>C. albicans</i>	25
Figura 4.4.	Actividad hemolítica de los péptidos en función de la concentración.	26
Figura 4.5.	Estructura tridimensional de los péptidos con I-TASSER.....	28

Figura 4.6. Interacción con membranas de bacterias gramnegativas según PPM.....	32
Figura 4.7. Interacción con membranas de bacterias grampositivas y hongos.....	33
Figura 5.1. Efecto de la evaporación en el borde de la placa	36

Índice de las tablas

Tabla 3.1. Características principales de los péptidos estudiados	12
Tabla 3.2. Resumen de los ensayos	13
Tabla 3.3. Densidad óptica del inóculo de <i>C. albicans</i>	16
Tabla 4.1. Actividad de los péptidos frente a <i>E. coli</i>	21
Tabla 4.2. Recuento en placa: <i>E. coli</i>	22
Tabla 4.3. Valores de absorbancia del ensayo con <i>S. aureus</i>	23
Tabla 4.4. Actividad de los péptidos frente a <i>S. aureus</i>	23
Tabla 4.5. Recuento en placa: <i>S. aureus</i>	23
Tabla 4.6. Actividad de los péptidos frente a <i>C. albicans</i>	24
Tabla 4.7. Recuento en placa: <i>C. albicans</i>	25
Tabla 4.8. Actividad hemolítica de los péptidos	26
Tabla 4.9. Estructura espacial predicha con I-TASSER.....	27
Tabla 4.10. Actividad antimicrobiana según DBAASP	29
Tabla 4.11. Actividad antimicrobiana según CAMP _{R3}	30
Tabla 4.12. Actividad antifúngica según Antifp.....	30
Tabla 4.13. Parámetros de inserción de los péptidos en modelos de membrana.....	31

RESUMEN

La aparición de cepas microbianas superresistentes está impulsando la búsqueda de alternativas a los antibióticos tradicionales. Una alternativa prometedora son los péptidos antimicrobianos (AMP), presentes en el sistema inmunitario innato de numerosos organismos vivos. Las ventajas principales de los AMP son su amplio espectro —pueden tener propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, entre otras— y la escasa propensión a desarrollar resistencias. Las desventajas principales son la posible toxicidad y los costes de síntesis. Estas desventajas justifican que se investiguen los AMP ricos en prolina (PrAMP), que presentan una toxicidad comparativamente baja, y versiones truncadas de los péptidos activos, más económicos de producir. En este trabajo estudiamos la estructura y actividad *in vitro* e *in silico* de cinco fragmentos de un PrAMP antibacteriano y antifúngico para identificar el dominio activo del péptido completo y obtener información sobre su modo de acción. Los ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro* mostraron que ninguno de los fragmentos conserva las propiedades antimicrobianas del péptido completo frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Los modelos *in silico* arrojaron resultados no concluyentes, que pueden explicarse teniendo en cuenta las aproximaciones de las herramientas bioinformáticas utilizadas. En su conjunto, este trabajo confirma resultados previos sobre la existencia de una longitud límite para la actividad de los péptidos de esta clase y establece un límite inferior al intervalo de longitud relevante. Los estudios futuros deberán enfocarse a péptidos de tamaños intermedios y a ensayos específicos que permitan la identificación del mecanismo de acción.

ABSTRACT

The emergence of super-resistant microbial strains is a compelling reason to investigate alternatives to traditional antibiotics. One promising alternative is antimicrobial peptides (AMPs), which are found in the innate immune system of many organisms. The main advantages of AMPs include their wide spectrum of activity against bacterial, fungal, and viral agents and their scant susceptibility to pathogens' developing resistance. The main disadvantages are their potential toxicity and high production costs. Two approaches promise to mitigate these disadvantages: proline-rich AMPs (PrAMPs) have low toxicity, and truncated AMPs are cheaper to synthesise than full-length AMPs, although previous results suggest that AMPs antimicrobial activity is limited when the peptide is truncated beyond a certain limit. To determine the minimal fragment that retains the antimicrobial properties of the complete peptide and gain insight into its mode of action, we used *in vitro* and *in silico* experiments to study the structure and activity of five fragments of an antibacterial and antifungal PrAMP. In *in vitro* microbial activity assays, none of the fragments retained the antimicrobial properties of the full-length peptide against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, or *Candida albicans*. *In silico* models yielded inconclusive results, probably because their underlying hypotheses are not fully representative of the peptides studied. Our results corroborate those of previous studies suggesting a minimal length for AMPs to be active against different pathogens and establish a lower limit to the relevant length range. Future studies should focus on intermediate-sized AMPs and should use specific assays tailored to identifying their mechanisms of action.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

«Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant».

El 11 de diciembre de 1945, en su discurso de aceptación del Nobel de Medicina, Alexander Fleming alertaba contra el peligro de la resistencia microbiana¹. Setenta años después, la Organización Mundial de la Salud definía la resistencia microbiana como una de las diez principales amenazas a la salud pública mundial y señalaba el uso indebido y excesivo de antimicrobianos como su causa principal². Los distintos organismos regulatorios han respondido a la alerta restringiendo el uso, tanto profiláctico como terapéutico, de los antibióticos. Estas barreras regulatorias, aun siendo razonables desde el punto de vista científico, han convertido el desarrollo de los antibióticos en un negocio poco lucrativo para las farmacéuticas, contribuyendo a vaciar la cartera de desarrollo de nuevos productos y a poner fin a la «edad de oro de los antibióticos».

En este contexto de emergencia sanitaria mundial, adquiere relevancia la búsqueda de productos antimicrobianos alternativos. Una alternativa especialmente prometedora son los péptidos antimicrobianos (*antimicrobial peptides*, AMP), una clase amplia y heterogénea de pequeños péptidos (la longitud típica es inferior a 60 aminoácidos³⁻⁶) que forman parte del sistema inmunitario innato de los seres vivos^{5,7,8}. Actualmente se conocen más de 3000 AMP procedentes de organismos muy diversos de hasta seis reinos, incluidos bacterias, hongos, plantas y animales⁹. Los AMP se clasifican en familias, en función de su estructura primaria y características filogenéticas; en los animales, las más importantes son las defensinas y las catelicidinas¹⁰.

Los AMP tienen un espectro de actividad antibacteriana y antifúngica más amplio que el de los antibióticos y pueden también presentar propiedades antivíricas y antiparasitarias^{8,10}. En los organismos pluricelulares pueden manifestar, además, propiedades inmunomoduladoras, anticancerosas y antiinflamatorias^{7,10,11}. Más de la mitad de los AMP conocidos son antibacterianos y alrededor de un cuarto, antifúngicos; en particular, se han identificado catelicidinas con propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, inmunomoduladoras, antiinflamatorias y procicatrizantes^{5,11,12}.

La gran mayoría de los AMP son catiónicos y anfipáticos, dos características que determinan sus propiedades antimicrobianas. La carga positiva favorece selectivamente el acercamiento a las membranas bacterianas, cargadas negativamente; la adsorción en la superficie celular facilita la inserción de los residuos hidrofóbicos del péptido en la membrana^{4,6,8} y puede llevar a su desintegración mediante tres mecanismos básicos: el poro toroidal, la alfombra y la duela de barril. El poro toroidal se forma cuando un péptido, inicialmente paralelo a la membrana, empieza a penetrar en ella arrastrando consigo la cabeza hidrófila de los fosfolípidos, hasta que la superficie externa se fusiona con la superficie citoplasmática. En el modelo de alfombra, los péptidos disgregan la superficie celular en micelas, actuando como un detergente. En el modelo de duela de barril, un polímero compuesto de varias unidades de AMP dispuestas en paralelo penetra perpendicularmente en la membrana, formando un poro cilíndrico. Los AMP pueden también actuar con mecanismos no citolíticos, como la inhibición de la síntesis de la pared celular, la formación de poros transitorios, la interferencia con procesos metabólicos, la interacción química con el ADN y la inhibición de la formación de biofilm^{3,5,6,13,14}. En muchos casos, se trata de mecanismos más generales respecto a los de los antibióticos, que habitualmente se dirigen a una proteína específica; además, muchos AMP disponen de más de un mecanismo. Esta versatilidad dificulta el desarrollo de resistencias microbianas y constituye una ventaja de los AMP frente a los antibióticos tradicionales^{8,10}; además, algunos AMP presentan un importante efecto sinérgico con los antibióticos^{6,15}. Un aspecto negativo es que algunos de estos mecanismos conllevan una toxicidad indeseada hacia las células eucariotas.

El mecanismo de acción específico de un AMP está determinado por su estructura secundaria, que permite clasificarlos en hélices α , láminas β y estructuras extendidas; estos últimos se caracterizan por la abundancia de residuos de Trp, Pro y Arg, que confieren rigidez a la estructura. La clasificación en grupos estructurales no es unívoca ni exhaustiva, ya que un mismo AMP puede combinar distintas estructuras (por ejemplo, una hélice α y una lámina β), presentar una estructura cíclica (por puentes disulfuro o enlace covalente entre los extremos) o cambiar de forma tras la interacción con una membrana. En las hélices α , hay una segregación axial de la anfipaticidad, que permite al péptido embeberse en la membrana celular paralelamente a esta, con el lado hidrofóbico hacia el interior celular y el lado hidrofílico hacia el exterior. Estas estructuras tienden a formar poros toroidales y, a altas concentraciones, micelas; la actividad citolítica está

modulada por la rigidez y la longitud de la hélice y por la distribución de los dominios hidrófobos e hidrófilos a lo largo de la estructura, que determinan la profundidad de la inclusión y la inclinación del péptido respecto a la membrana. Los péptidos con láminas β pueden formar poros toroidales o ensamblarse en estructuras multiméricas que permeabilizan la membrana celular por el mecanismo de duela de barril^{5,8}, aunque algunos tienen también un modo de acción intracelular¹⁰. Por último, los AMP extendidos no suelen tener actividad citolítica y actúan inhibiendo la síntesis proteica u otros procesos metabólicos^{10,16}; estos modos de acción están asociados a una baja citotoxicidad, lo que los convierte en candidatos interesantes para aplicaciones terapéuticas. Un subgrupo de especial interés es el de los péptidos ricos en prolina (*prolin-rich AMP*, PrAMP).

1.2 Estado actual

Como se ha descrito en el apartado anterior, los AMP disponen de un amplio repertorio de mecanismos de acción, apenas generan resistencias y pueden actuar en sinergia con los antibióticos. Sin embargo, sus posibles aplicaciones se ven limitadas por la toxicidad y el coste de síntesis, entre otros factores.

Estas limitaciones pueden resolverse con distintas estrategias. La toxicidad puede controlarse *a priori*, restringiendo el estudio a los AMP con baja toxicidad intrínseca, como los PrAMP, o *a posteriori*, modificando oportunamente la estructura de los AMP naturales. El coste puede reducirse sintetizando AMP más cortos que solo contienen el dominio activo del AMP natural. Aunque se presentan por separado a efectos explicativos, estas estrategias están relacionadas ya que el acortamiento de un péptido puede modificar su citotoxicidad.

1.2.1 Estudios con PrAMP

El mecanismo de acción de los PrAMP no está bien estudiado. Se cree que la mayoría de los PrAMP penetran en el citoplasma de forma no destructiva y se dirigen hacia el ribosoma, donde inhiben la síntesis de proteínas o interfieren con su plegamiento^{10,13}, aunque a altas concentraciones pueden presentar una actividad citolítica¹⁰. Se ha identificado un mecanismo de permeación no destructivo, el transporte por el transportador de membrana SbmA¹⁷, pero se ha observado penetración de PrAMP

también en especies que no expresan SbmA, lo que permite inferir la existencia de otros mecanismos^{10,18}.

Un PrAMP muy prometedor es Lv_RR32, un péptido pequeño (longitud: 32 aminoácidos) y muy catiónico (carga: +12) del cetáceo *Lipotes vexillifer*. Contrariamente a otros PrAMP, activos solo frente a bacterias gramnegativas^{6,10,13,16,19}, Lv_RR32 tiene un amplio espectro de actividad que abarca bacterias gramnegativas y grampositivas y hongos^{10,18,20}. Estas características podrían apuntar a distintos modos de acción y a la posible concurrencia de mecanismos citolíticos e intracelulares.

1.2.2 Estudios con péptidos truncados

Numerosos estudios han probado que versiones truncadas de los AMP conservan la actividad antimicrobiana del péptido completo. La mayoría de estos estudios se han centrado en AMP con hélices α . Gustaffson *et al.* (2010) estudiaron la producción de citocinas proinflamatorias inducida por la catelicidina humana Hs_LL37 y dos de sus fragmentos en presencia de ácido lipoteicoico y concluyeron que los fragmentos tienen una actividad comparable a la del péptido entero, confirmando resultados previos obtenidos en experimentos de neutralización de endotoxina bacteriana^{21,22}. Kwon *et al.* (2019) estudiaron la toxicidad y la actividad antibacteriana de seis fragmentos aminoterminal o carboxiterminal de un péptido de 20 aminoácidos. La mayoría de los fragmentos conservaron la actividad antibacteriana en los experimentos de concentración mínima inhibitoria (MIC) y de biofilm y presentaron una capacidad hemolítica reducida³. Lin *et al.* (2013) estudiaron la actividad antibacteriana y anticancerosa de fragmentos de distinta longitud procedentes de tres AMP naturales. Aunque la mayoría de los fragmentos perdieron actividad respecto a los péptidos originales respectivos, algunos conservaron las propiedades originales¹⁵.

Algunos estudios se han centrado en los PrAMP. Uno de los más estudiados es Bac7, un PrAMP de bovino con una importante homología de secuencia con Lv_RR32, en particular en su región aminoterminal (coinciden 15 de los 16 primeros residuos). Benincasa *et al.* (2004) estudiaron la actividad antimicrobiana de los fragmentos de Bac7 y encontraron que la actividad se conserva solo si está incluida la región aminoterminal del péptido original, fuertemente catiónica; constataron, además, la existencia de una longitud límite de 16 aminoácidos por debajo de la cual la actividad cae abruptamente. El estudio determinó también que la actividad antimicrobiana del péptido completo y sus

fragmentos activos se ejerce por inhibición de la síntesis proteica¹⁶. Seefeldt *et al.* (2016) precisaron que Bac7(1-16) actúa inhibiendo la traducción mediante la obstrucción del ribosoma^{10,19}. Sola (2020) estudió 8 fragmentos del PrAMP bovino Bac5 y el péptido completo Lv_RR32. En el caso de Bac5, encontró que la actividad antimicrobiana es proporcional a la longitud del fragmento y se ejerce por inhibición de la síntesis proteica; el mecanismo de permeación preferente, aunque no exclusivo, es el transporte por SbmA^{10,17,19}. En el caso de Lv_RR32, observó actividad frente a distintas bacterias grampositivas y gramnegativas y hongos, atribuible a la inhibición de la síntesis proteica.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

En numerosos AMP y, en particular, en algunas catelicidinas de tipo PrAMP, se ha podido identificar el dominio responsable de la actividad antimicrobiana, lo que ha permitido producir péptidos más cortos con propiedades antimicrobianas equivalentes o mejoradas y baja toxicidad. Experimentos previos del grupo de investigación han mostrado que el péptido Lv_RR32, una catelicidina de tipo PrAMP del cetáceo *Lipotes vexillifer*, tiene una marcada actividad antimicrobiana frente a bacterias gramnegativas y grampositivas y hongos. Estos resultados apoyan la hipótesis de que existan fragmentos de Lv_RR32 que conservan la actividad antimicrobiana del péptido completo.

2.2 Objetivos

El trabajo pretende caracterizar el espectro de actividad antimicrobiana y la toxicidad de cinco péptidos solapantes derivados de Lv_RR32 y obtener información sobre posibles mecanismos de acción, con el objetivo de abaratar el coste de síntesis de un péptido activo.

Para conseguir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Cuantificar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los cinco péptidos frente a tres microorganismos de referencia (una bacteria gramnegativa [*Escherichia coli*], una bacteria grampositiva [*Staphylococcus aureus*] y un hongo [*Candida albicans*]).
- Evaluar la integridad de las membranas celulares expuestas a los péptidos con el colorante de ácidos nucleicos Sytox Green.
- Estudiar la actividad hemolítica de los cinco péptidos.
- Modelar la estructura tridimensional de Lv_RR32 y los cinco péptidos derivados.
- Predecir la actividad antimicrobiana de los cinco péptidos y su interacción con membranas simuladas mediante herramientas bioinformáticas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

A continuación, se detallan el equipo de laboratorio y los materiales usados en el desarrollo del proyecto.

3.1.1 Equipo

- Agitador magnético con calefacción H20 de LBX Instruments
- Agitador mecánico Unimax 1010 de Heidolph
- Agitador vórtex Classic de VELP Scientifica
- Autoclave Presoclave de JP Selecta
- Báscula de precisión Navigator de OHAUS
- Campana de flujo laminar de clase II Bio II Advance Plus de Telstar
- Centrífuga Concentrator plus de Eppendorf
- Densitómetro McFarland DEN-1B de Biosan
- Incubadora digital IL-23 de VWR
- Incubadora Mini Incubator de Labnet
- Lector de placas FLUOstar Ω de BMG Labtech
- Pipetas mecánicas monocanal y multicanal de Eppendorf

3.1.2 Medios de cultivo y tampones

- Cloruro de sodio de M&B Laboratory Chemicals (para suero fisiológico)
- Caldo Mueller-Hinton de ITW Reagents (n. cat. 413788.1210)
- Agar Mueller-Hinton para microbiología de ITW Reagents (n. cat. 413787.1210)
- Agar de papa y glucosa para microbiología de Sigma Aldrich (n. cat. 70139-500G)
- Caldo de papa y dextrosa de MP Biomedicals (n. cat. 1008617)
- Detergente Tritón X-100 de Sigma Aldrich (n. cat. 93443)

3.1.3 Microorganismos

- *Escherichia coli* (CECT 434)
- *Staphylococcus aureus* (CECT 794)
- *Candida albicans* (CECT 1392)

3.1.4 Eritrocitos

- Eritrocitos de sangre humana comercial (Single Donor Human Whole Blood de Innovative Research, cat. IWB1K2E10ML)

3.1.5 Péptidos

Los péptidos analizados son fragmentos solapantes del péptido antimicrobiano Lv_RR32, una catelicidina del cetáceo *Lipotes vexillifer*. Los péptidos se sintetizaron a escala de 10 mg (Caslo, Lyngby, Dinamarca) con una pureza superior al 90% (analizada por HPLC). El extremo aminoterminal de los péptidos se acetiló y el extremo carboxiterminal se amidó para evitar su degradación durante el procesamiento. Se diluyeron alícuotas de cada polipéptido (2 mg) en agua destilada a una concentración madre de 1 mM para facilitar la eficacia del ensayo. En la Tabla 3.1 se muestran las características principales de los seis péptidos y en la Figura 3.1 se comparan las secuencias.

Tabla 3.1. Características principales de los péptidos estudiados

Péptido	Secuencia aminoacídica	%P	%R	Longitud	Carga	% polares	Peso mol.
Lv_RR32	RRIRIRPPRLPRPRPRPWFPFRFPIPRIPGKR	34	34	32	+12	37 %	4035,95
T1 [Lv_RR32(1-10)]	RRIRIRPPRL	20	50	10	+5	50 %	1332,66
T2 [Lv_RR32(7-16)]	PPRLPRPRPR	50	40	10	+4	40 %	1241,51
T3 [Lv_RR32(13-22)]	PRPRPWFPFR	50	30	10	+3	30 %	1305,55
T4 [Lv_RR32(19-28)]	FPPRFPIPRI	40	20	10	+2	20 %	1239,53
T5 [Lv_RR32(23-32)]	FPIPRIPGKR	30	20	10	+3	30 %	1180,46

%P: porcentaje de residuos de prolina; %R: porcentaje de residuos de arginina.

Lv_RR32	R R I R I R P P R L P R P R P R P W F P P R F P I P R I P G K R
T1	R R I R I R P P R L
T2	P P R L P R P R P R
T3	P R P R P W F P P R
T4	F P P R F P I P R I
T5	F P I P R I P G K R

Figura 3.1. Secuencia del péptido original y los cinco péptidos derivados

3.2 Preparación de los medios

En los días previos a los ensayos, se prepararon los medios de cultivo sólidos y líquidos de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes, y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Con los medios sólidos se prepararon placas de cultivo en condiciones estériles; las placas se dejaron enfriar, se introdujeron en bolsas estériles y se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Los medios líquidos y el suero fisiológico (SF) se almacenaron en refrigeración a 4 °C.

3.2.1 Ensayos *in vitro*

Para estudiar el potencial antimicrobiano de los péptidos solapantes, se realizaron ensayos *in vitro* con distintos microorganismos: una bacteria gramnegativa (*Escherichia coli*), una bacteria grampositiva (*Staphylococcus aureus*) y un hongo (*Candida albicans*). Para cada microorganismo se consideraron distintas concentraciones, en función de los datos previos conocidos y los resultados provisionales del proyecto. Asimismo, se realizó un ensayo de hemólisis con eritrocitos humanos para evaluar la citotoxicidad de los péptidos a distintas concentraciones. En la Tabla 3.2 se muestra un resumen de los ensayos.

Tabla 3.2. Resumen de los ensayos

Péptido	Diluciones finales	Muestra	t
T1, T2, T3, T4, T5	10 × 1:2 (50 µM - 100 nM)	<i>E. coli</i>	22 h
T1, T2, T3, T4, T5	50 µM	<i>S. aureus</i>	21 h
T1, T2, T3, T4, T5	200 µM, 100 µM, 50 µM	<i>S. aureus</i>	20 h
T1, T2, T3, T4, T5	200 µM, 100 µM, 50 µM	<i>C. albicans</i>	24 h
T1, T2, T3, T4, T5	50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,75 µM	Eritrocitos humanos	45 min

3.2.1.1 Ensayos de actividad de los péptidos frente a *E. coli*

A partir de una placa de cultivo de *E. coli*, se inocularon 2 o 3 colonias aisladas en 6 ml de medio de cultivo MH y se dejaron crecer a 37 °C con agitación durante unas 5 horas.

Se prepararon 10 diluciones seriadas 1:2 de los cinco péptidos T1, T2, T3, T4 y T5 con medio de cultivo MH partiendo de una concentración inicial de 100 µM. Se añadieron alícuotas de 50 µl de las diluciones en 4 réplicas a una placa de 96 pocillos, de acuerdo con la disposición de la Figura 3.2 (véase también el resumen de los ensayos, Tabla 3.2). La columna 1 y la 12 se reservaron para el blanco y el control positivo, respectivamente.

Después de medir la densidad óptica del preinóculo en el densitómetro, se realizaron dos diluciones seriadas 1:10 con SF seguidas de una dilución 1:10 con medio de cultivo MH para obtener un inóculo con una concentración estimada de $\sim 10^5$ UFC/ml. Se añadieron alícuotas de 50 μ l del inóculo a los pocillos de las placas, a excepción de los del blanco. Las placas se incubaron a 37 °C durante unas 20 horas y, a continuación, se colocaron en un lector de microplacas para medir la absorbancia a 595 nm.

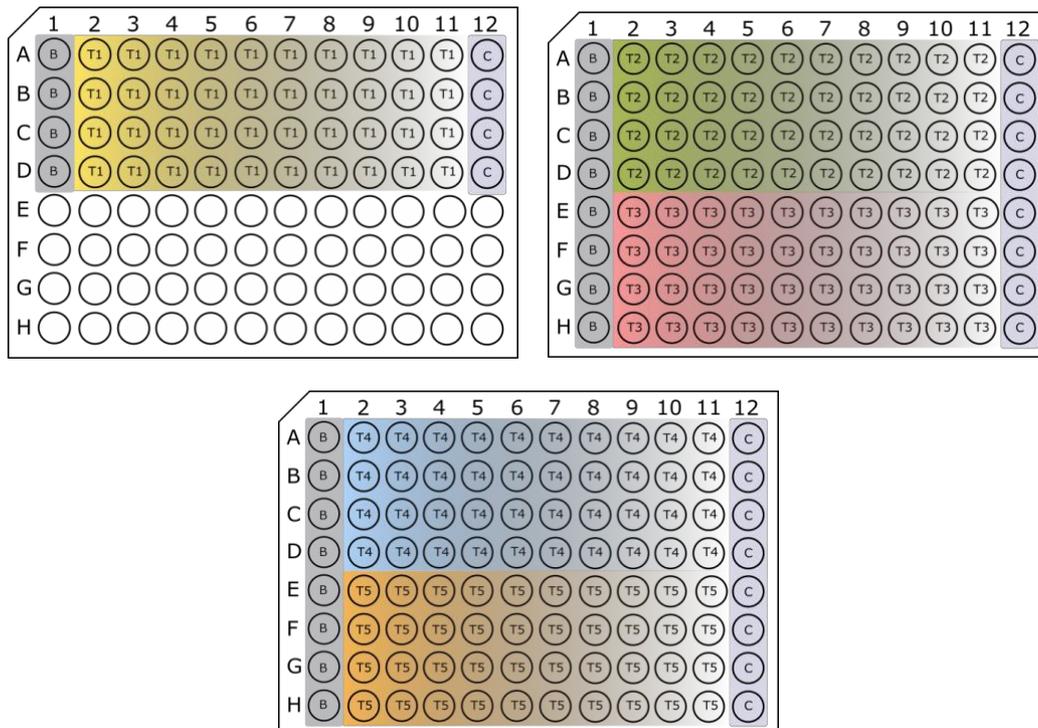


Figura 3.2. Disposición de las muestras en las placas para los ensayos con *E. coli*

El inóculo se utilizó también para crear un banco de diluciones con concentraciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} veces la concentración del inóculo para los ensayos de recuento microbiano. Se extendieron 100 μ l de cada dilución en placas de Petri, se sellaron las placas con biofilm y se incubaron a 37 °C durante unas 20 horas (Figura 3.3).

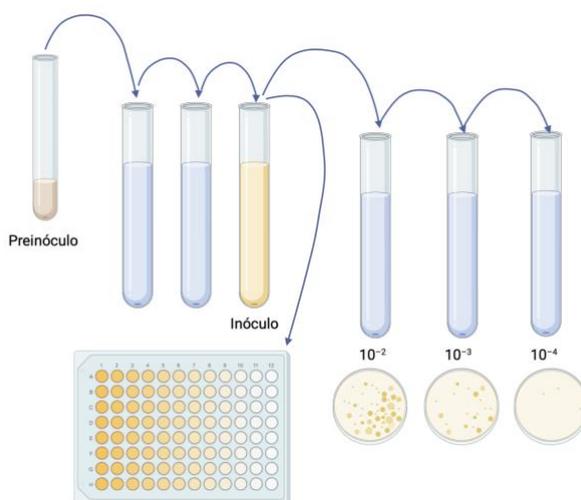


Figura 3.3. Preparación del inóculo y recuento en placa

3.2.1.2 Ensayos de actividad de los péptidos frente a *S. aureus*

A partir de una placa de cultivo de *S. aureus*, se inocularon 1 o 2 colonias aisladas en 6 ml de medio de cultivo MH y se dejaron crecer a 37 °C con agitación durante unas 4 horas.

Se prepararon muestras de los cinco péptidos T1, T2, T3, T4 y T5 a una concentración de 100 μM con medio de cultivo MH y 3 diluciones seriadas 1:2 de los cinco péptidos con medio de cultivo MH partiendo de una concentración inicial de 400 μM . De todas las concentraciones, se añadieron alícuotas de 50 μl en 4 réplicas a una placa de 96 pocillos (Tabla 3.2 y Figura 3.4). Las columnas 1 y 12 se reservaron para el blanco y el control positivo, respectivamente; el medio de cultivo en el cuadrante inferior derecho de la placa se añadió para controlar la evaporación en los pocillos colindantes (véase el apartado 5.1.2).

Después de comprobar la densidad óptica del preinóculo en el densitómetro, se realizaron dos diluciones seriadas 1:10 con SF seguidas de una dilución 1:10 con medio de cultivo MH para obtener un inóculo con una concentración estimada de $\sim 10^5$ UFC/ml. Se añadieron alícuotas de 50 μl del inóculo a todos los pocillos de las placas menos los del blanco, obteniendo concentraciones finales de los péptidos de 50, 100 y 200 μM . Las placas se incubaron a 37 °C durante unas 20 horas y, a continuación, se colocaron en un lector de microplacas para medir su absorbancia a 595 nm.

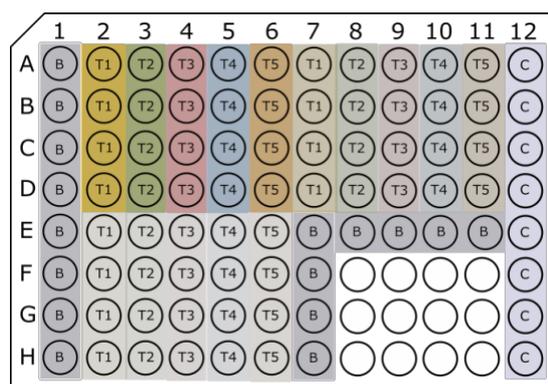


Figura 3.4. Disposición de las muestras para los ensayos con *S. aureus* y *C. albicans*

La solución obtenida se utilizó también para crear un banco de diluciones con concentraciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} veces la concentración del inóculo. Se extendieron 100 μ l de cada dilución en placas de Petri, se sellaron las placas con biofilm y se incubaron a 37 °C sin agitación durante unas 20 horas.

3.2.1.3 Ensayos de actividad de los péptidos frente a *C. albicans*

El día previo al ensayo, se sembraron 1-2 colonias de cultivo en 6 ml de medio de cultivo PDB y se incubaron con agitación a 37 °C. Tras 22 h, se midió una densidad óptica de 7,5 en la escala de McFarland²³. Se prepararon dos diluciones seriadas 1:10 con suero fisiológico a partir de 1 ml de preinóculo (Tabla 3.3). De acuerdo con una calibración previa realizada en el laboratorio, un valor de densidad óptica de McFarland de $\sim 1,40$ - $1,50$ corresponde a la concentración deseada de $\sim 10^5$ UFC/ μ l, por lo que se decidió usar para la siembra la dilución 2.

Tabla 3.3. Densidad óptica del inóculo de *C. albicans*

Núm. dilución	Concentración relativa	Densidad óptica [McFarland]
1	1	7,57 \pm 0,03
2	10^{-1}	1,50 \pm 0,06
3	10^{-2}	0,02 \pm 0,02

Se prepararon 3 diluciones seriadas 1:2 de los cinco péptidos T1, T2, T3, T4 y T5 con medio de cultivo PDB partiendo de una concentración inicial de 400 μ M. Se añadieron alícuotas de 50 μ l de las diluciones en 4 réplicas a una placa de 96 pocillos, con la misma disposición usada para *S. aureus* (también para blancos y controles; véase la Figura 3.4).

Se añadieron alícuotas de 50 μl de inóculo a todos los pocillos de las placas menos los del blanco. La placa se incubó a 37 °C durante unas 24 horas y, a continuación, se colocó en un lector de microplacas para medir su absorbancia a 595 nm.

El inóculo se utilizó también para crear un banco de diluciones con concentraciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} veces la concentración del inóculo. Se extendieron 100 μl de cada dilución en placas de Petri, se sellaron las placas con biofilm y se incubaron a 37 °C durante unas 22 horas.

3.2.1.4 Ensayos de integridad de las membranas celulares

A la luz de los resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana (véase el apartado 4.1), se consideró que estos ensayos eran superfluos, por lo que se omitieron.

3.2.1.5 Ensayos de actividad hemolítica

Partiendo de una muestra comercial de eritrocitos humanos, se realizaron 3 lavados sucesivos con suero fisiológico para eliminar los posibles eritrocitos muertos. A continuación, se prepararon 4 diluciones seriadas 1:2 de los cinco péptidos T1, T2, T3, T4 y T5 partiendo de una concentración inicial de 100 μM y se añadieron alícuotas de 75 μl en 4 réplicas a una placa de 96 pocillos (Tabla 3.2 y Figura 3.5). Como control positivo se utilizó una solución de eritrocitos tratada con Tritón X-100 al 1,5% en agua para inducir la hemólisis completa y como control negativo, una solución de eritrocitos en suero fisiológico. Agitando suavemente el tubo, se resuspendieron los eritrocitos y se añadieron alícuotas de 75 μl a la placa mediante una pipeta multicanal. Después de incubar la placa a 37 °C durante 45 minutos, se transfirieron alícuotas de 100 μl de sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 405 nm.

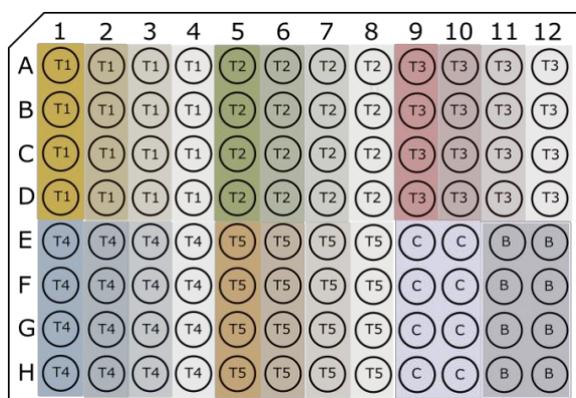


Figura 3.5. Disposición de las muestras en la placa para el ensayo con eritrocitos

3.2.2 Análisis estadístico

Para cada ensayo, péptido y dilución se determinó un valor de densidad óptica \overline{OD} promediando los valores de las distintas réplicas: en el caso de los ensayos con microorganismos se consideraron solo los 3 pocillos más internos y se excluyó del análisis el pocillo ubicado en el borde de la placa; en el caso del ensayo con eritrocitos, las medias se calcularon tomando en cuenta las 4 réplicas (véase la discusión en el apartado 5.1.2). El error sobre \overline{OD} se aproximó con la desviación estándar de los valores (3 o 4 réplicas) considerados en cada caso. En los ensayos con microorganismos, a partir de los valores de \overline{OD} se calculó la densidad óptica relativa de acuerdo con la expresión:

$$f_D^{T_i} = \frac{\overline{OD}_D^{T_i} - \overline{OD}^B}{\overline{OD}_D^C - \overline{OD}^B},$$

donde los superíndices T_i , B y C indican el tipo de muestra (péptido T_i , blanco o control, respectivamente) y el subíndice D , la dilución; $f_D^{T_i}$ puede variar entre 0 (máxima actividad antimicrobiana) y 1 (actividad antimicrobiana nula, crecimiento bacteriano máximo). En el ensayo de actividad hemolítica, a partir de los valores de \overline{OD} se calculó la actividad porcentual:

$$a_D^{T_i} = \left[\frac{\overline{OD}_D^{T_i} - \overline{OD}^B}{\overline{OD}_D^C - \overline{OD}^B} \right] \times 100 \%,$$

donde los índices tienen el significado anterior y los posibles valores están comprendidos entre 0 % (actividad hemolítica nula) y 100 % (actividad hemolítica máxima). En todos los casos, el error sobre la variable derivada se calculó propagando los errores de las variables que la definen, supuestas independientes.

Para el recuento en placa de los ensayos con microorganismos, el resultado se obtuvo como media de los recuentos individuales ponderada por el volumen de cada muestra.

3.3 Modelos bioinformáticos

Se analizaron los péptidos mediante una serie de herramientas bioinformáticas para determinar sus características principales y predecir su actividad antimicrobiana y la posible interacción con membranas.

3.3.1 Estructura tridimensional con I-TASSER

Para determinar la estructura tridimensional de los 6 péptidos (el péptido original y los cinco péptidos solapantes derivados), se utilizó I-TASSER²⁴⁻²⁷ (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*). I-TASSER predice el plegamiento de una proteína a partir de su secuencia aminoacídica mediante el método del «diseño por homología remota» o *threading*: una predicción inicial, basada en la superposición de fragmentos homólogos de proteínas caracterizadas previamente mediante cristalografía de rayos X, se refina mediante simulaciones iterativas de las interacciones intramoleculares. Para cada péptido, I-TASSER calcula entre uno y cinco modelos y los puntúa de acuerdo con una serie de escalas²⁴⁻²⁸. Las predicciones más importantes a efectos de este trabajo son las siguientes:

- La estructura secundaria de cada residuo (hélice α , lámina β o plegamiento irregular) y el nivel de confianza correspondiente en una escala de 0 a 9.
- La puntuación *C* (*C-score*) de calidad del mejor modelo. Esta puntuación está determinada por la densidad de soluciones próximas a la mejor solución, la desviación cuadrática media del mejor modelo respecto al centroide de posibles soluciones y la calidad de las proteínas elegidas como plantillas por los siete algoritmos de *threading* que conforman el núcleo computacional de I-TASSER. Esta puntuación suele estar comprendida en el intervalo $[-5, +2]$ y un valor superior a $-1,5$ indica que la topología predicha es correcta.
- La puntuación TM (*TM-score*), que mide la distancia entre la solución y la plantilla; no es una medida de la calidad del modelo, aunque está fuertemente correlacionada con la puntuación *C*. Un valor superior a 0,5 indica que los plegamientos de la plantilla son representativos del modelo e inferior a 0,17, que no hay ninguna relación entre la plantilla y el modelo final.
- La desviación cuadrática media RDMS, que mide la distancia espacial entre el mejor modelo y la plantilla.

3.3.2 Actividad antimicrobiana con DBAASP

Se utilizó una herramienta de aprendizaje automático de la base de datos DBAASP^{29,30} (*Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides*) para predecir la actividad de los seis péptidos. La herramienta predice la actividad de AMP lineales (no cíclicos) contra especies microbianas específicas, sobre la base de propiedades fisicoquímicas como la hidrofobicidad, la carga neta, el punto isoeléctrico, la profundidad de

penetración, el ángulo de inclinación y el índice de anfifilicidad de los péptidos; un péptido se considera activo si $MIC < 25 \mu\text{g/ml}$ y no activo si $MIC > 100 \mu\text{g/ml}$.

3.3.3 Actividad antimicrobiana con CAMP_{R3}

Se utilizaron cuatro distintos algoritmos de aprendizaje supervisado (SVM [*Support Vector Machine*], bosques aleatorios, redes neuronales y análisis discriminante) de la base de datos CAMP_{R3}^{31,32} (*Collection of Anti-Microbial Peptides*) para predecir la actividad antimicrobiana de los seis péptidos. Los algoritmos clasifican los péptidos sobre la base de su composición, propiedades fisicoquímicas y características estructurales, comparándolas con las de los péptidos de un conjunto de entrenamiento cuya actividad antimicrobiana se ha determinado *in vitro*. Contrariamente al algoritmo de DBAASP, esta herramienta no hace predicciones específicas según el tipo de microorganismo.

3.3.4 Actividad antifúngica con Antifp

Se utilizó la herramienta Antifp³³ para predecir la actividad antifúngica de los seis péptidos. Antifp es un método desarrollado para diseñar péptidos antifúngicos *in silico* que predice las propiedades antifúngicas de péptidos no caracterizados previamente a partir de la composición aminoacídica, el análisis posicional de los residuos y otras propiedades generales. La predicción se resume en una puntuación que varía en el intervalo $[-1, 1]$, donde -1 corresponde a péptidos sin actividad antifúngica y 1 , a péptidos antifúngicos; una puntuación intermedia implica propiedades intermedias entre las de los dos grupos. En este trabajo, se ha utilizado una versión entrenada en un conjunto de 1168 péptidos antifúngicos y 1168 péptidos no antifúngicos y validada en 291 péptidos antifúngicos y 291 péptidos no antifúngicos.

3.3.5 Interacción con membranas con PPM

Se utilizó la herramienta PPM³⁴ de la base de datos *Orientations of Proteins in Membranes* para modelar la interacción de los seis péptidos con membranas celulares. PPM puede aplicarse tanto a proteínas caracterizada experimentalmente como a modelos teóricos y permite visualizar el sistema con Jmol. La versión 2.0 considera bicapas lipídicas planas utilizando perfiles de polaridad ortogonales a la membrana; la versión 3.0 permite tomar en cuenta la curvatura de la membrana y diferenciar el tipo de microorganismos. Para todos los péptidos, incluido el péptido completo, se compararon las predicciones obtenidas con ambas versiones.

4 RESULTADOS

4.1 Ensayos de actividad antimicrobiana

En los apartados siguientes, se muestran los resultados de los ensayos en forma tabular y gráfica.

4.1.1 Ensayos con *E. coli*

En la Tabla 4.1 y la Figura 4.1 se muestran los resultados de los ensayos con *E. coli* para los distintos péptidos y se comparan con resultados previos obtenidos para el péptido completo. La Tabla 4.2 muestra los resultados del recuento en placa.

Tabla 4.1. Actividad de los péptidos frente a *E. coli*

		Concentración [μM]									
		50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
<i>E. coli</i>	T1	0,73 $\pm 0,12$	0,83 $\pm 0,05$	0,87 $\pm 0,05$	0,84 $\pm 0,14$	0,90 $\pm 0,05$	0,84 $\pm 0,15$	0,91 $\pm 0,08$	0,93 $\pm 0,07$	0,94 $\pm 0,04$	0,94 $\pm 0,05$
	T2	0,86 $\pm 0,09$	0,85 $\pm 0,05$	0,89 $\pm 0,06$	0,91 $\pm 0,06$	0,92 $\pm 0,08$	0,93 $\pm 0,07$	0,93 $\pm 0,09$	0,92 $\pm 0,08$	0,97 $\pm 0,11$	0,94 $\pm 0,07$
	T3	0,95 $\pm 0,14$	0,88 $\pm 0,13$	0,95 $\pm 0,08$	0,90 $\pm 0,06$	0,93 $\pm 0,07$	0,95 $\pm 0,08$	0,94 $\pm 0,08$	0,95 $\pm 0,06$	0,95 $\pm 0,10$	0,98 $\pm 0,07$
	T4	0,94 $\pm 0,12$	0,87 $\pm 0,08$	0,87 $\pm 0,10$	0,87 $\pm 0,09$	0,94 $\pm 0,16$	0,90 $\pm 0,08$	0,89 $\pm 0,10$	0,92 $\pm 0,09$	0,93 $\pm 0,08$	0,95 $\pm 0,14$
	T5	0,97 $\pm 0,09$	0,94 $\pm 0,11$	0,92 $\pm 0,11$	0,91 $\pm 0,09$	0,92 $\pm 0,09$	0,96 $\pm 0,08$	0,94 $\pm 0,09$	0,94 $\pm 0,10$	0,85 $\pm 0,40$	0,95 $\pm 0,15$
	Lv_RR32	–	–	0,02 $\pm 0,01$	0,00 $\pm 0,02$	0,00 $\pm 0,02$	0,00 $\pm 0,02$	0,00 $\pm 0,01$	0,00 $\pm 0,12$	0,71 $\pm 0,12$	0,79 $\pm 0,04$

Densidad óptica relativa de los cultivos de *E. coli* en función de la concentración de los cinco péptidos. Se muestran por comparación resultados previos del grupo de investigación para el péptido completo Lv_RR32.

Para todos los péptidos y todas las concentraciones se obtuvieron valores de densidad óptica relativa próximos a 1, que indican una actividad antimicrobiana pequeña o nula. No se detectó ninguna tendencia clara con la concentración que pudiera hacer suponer un aumento de la actividad a valores mayores que los considerados, con la única posible excepción del péptido T1. Este resultado contrasta con el comportamiento del péptido completo, que presentó una actividad importante hasta valores de concentración relativamente bajos ($\text{MIC} < 0,39 \mu\text{M}$)²⁰.

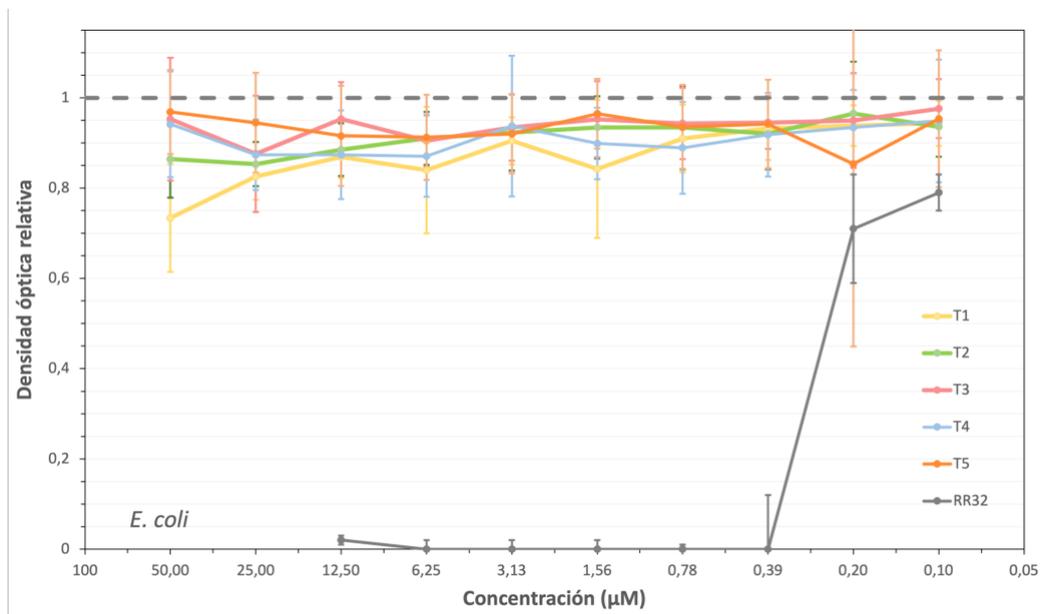


Figura 4.1. Actividad de los péptidos frente a *E. coli*. Densidad óptica relativa en función de la concentración al final del ensayo con *E. coli*; un valor de 1 indica actividad nula. En gris se indican los valores obtenidos con el péptido original Lv_RR32 en un ensayo previo²⁰. La escala horizontal es logarítmica.

Tabla 4.2. Recuento en placa: *E. coli*

	Densidad óptica del preinóculo	UFC			Concentración del inóculo
	[McFarland]	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	[UFC/ml]
<i>E. coli</i>	–	–	–	–	–
	4,42	198	19	4	$2,0 \times 10^5$
	4,58	184	14	1	$1,8 \times 10^5$

Resultados de los ensayos de recuento microbiano con *E. coli*.

4.1.2 Ensayos con *S. aureus*

En la Tabla 4.3, la Tabla 4.4 y la Figura 4.2 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos con *S. aureus*. Como en el caso de *E. coli*, no se observó una correlación entre la actividad antimicrobiana y la concentración del péptido, aunque en este caso se obtuvieron valores de densidad óptica relativa algo menores (de ~0,7 para todos los péptidos y todas las concentraciones). Este resultado contrasta con el comportamiento del péptido completo, que presentó una actividad importante hasta valores de concentración relativamente bajos ($MIC < 1 \mu M$)²⁰.

Tabla 4.3. Valores de absorbancia del ensayo con *S. aureus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,230	0,809	0,734	0,727	0,800	0,794	0,791	0,855	0,809	0,898	0,892	0,974
B	0,234	0,718	0,612	0,669	0,645	0,623	0,593	0,669	0,680	0,661	0,693	0,858
C	0,234	0,689	0,707	0,675	0,646	0,597	0,571	0,672	0,607	0,642	0,774	0,833
D	0,233	0,763	0,688	0,682	0,675	0,696	0,580	0,689	0,650	0,715	0,723	0,903
E	0,270	0,727	0,757	0,653	0,685	0,687	0,256	0,22	0,202	0,208	0,171	0,930
F	0,242	0,732	0,87	0,779	0,734	0,757	0,176	0,014	0,017	0,013	0,012	1,003
G	0,205	0,729	0,802	0,696	0,69	0,745	0,182	0,016	0,012	0,012	0,011	0,983
H	0,220	0,880	0,754	0,863	0,864	0,922	0,237	0,012	0,001	0,009	0,006	1,006
	Blanco	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5	Control

Matriz de valores de absorbancia para uno de los ensayos con *S. aureus*.

Tabla 4.4. Actividad de los péptidos frente a *S. aureus*

		Concentración [μM]						
		50	200	100	50	0,78	0,39	0,20
<i>S. aureus</i>	T1	0,68 $\pm 0,15$	0,71 $\pm 0,15$	0,51 $\pm 0,10$	0,72 $\pm 0,20$			
	T2	0,65 $\pm 0,12$	0,63 $\pm 0,15$	0,65 $\pm 0,12$	0,84 $\pm 0,18$			
	T3	0,62 $\pm 0,15$	0,64 $\pm 0,11$	0,60 $\pm 0,14$	0,69 $\pm 0,21$			
	T4	0,64 $\pm 0,04$	0,61 $\pm 0,12$	0,64 $\pm 0,14$	0,68 $\pm 0,20$			
	T5	0,62 $\pm 0,20$	0,59 $\pm 0,15$	0,72 $\pm 0,16$	0,72 $\pm 0,22$			
	Lv_RR32					0,00 $\pm 0,09$ $\pm 0,00$	0,73 $\pm 0,08$	0,92 $\pm 0,14$

Densidad óptica relativa de los cultivos de *S. aureus* en función de la concentración de los cinco péptidos. Se muestran por comparación algunos resultados previos del grupo de investigación para el péptido completo Lv_RR32.

Tabla 4.5. Recuento en placa: *S. aureus*

		Densidad óptica del preinóculo [McFarland]	UFC			Concentración del inóculo [UFC/ml]
			10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
<i>S. aureus</i>	Día 1	2,07	>300	>300	>300	–
	Día 2	1,85	>300	103	8	$1,0 \times 10^6$

Resultados de los ensayos de recuento microbiano con *S. aureus*.

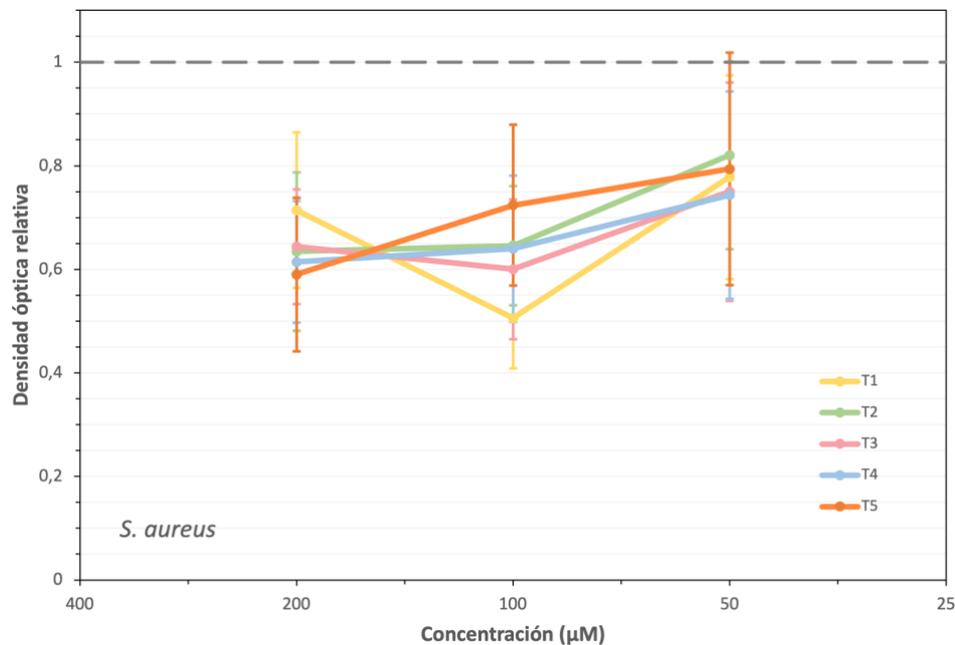


Figura 4.2. Actividad de los péptidos frente a *S. aureus*. Densidad óptica relativa en función de la concentración al final del ensayo con *S. aureus*; un valor de 1 indica actividad nula. La escala horizontal es logarítmica.

4.1.3 Ensayos con *C. albicans*

En la Tabla 4.6 y la Figura 4.3 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos con *C. albicans* para los distintos péptidos, así como resultados previos obtenidos para el péptido completo. La Tabla 4.7 muestra los resultados del recuento en placa.

Tabla 4.6. Actividad de los péptidos frente a *C. albicans*

		Concentración [µM]			
		200	100	50	25
<i>C. albicans</i>	T1	0,81 ±0,04	0,86 ±0,06	0,88 ±0,06	–
	T2	0,82 ±0,06	0,86 ±0,06	0,91 ±0,05	–
	T3	0,76 ±0,08	0,85 ±0,08	0,94 ±0,04	–
	T4	0,79 ±0,05	0,87 ±0,06	0,95 ±0,05	–
	T5	0,79 ±0,05	0,89 ±0,06	0,95 ±0,05	–
	Lv_RR32			0,12 ±0,02	0,69 ±0,08

Densidad óptica relativa de los cultivos de *C. albicans* en función de la concentración de los cinco péptidos. Se muestran por comparación algunos resultados previos del grupo de investigación para el péptido completo Lv_RR32²⁰.

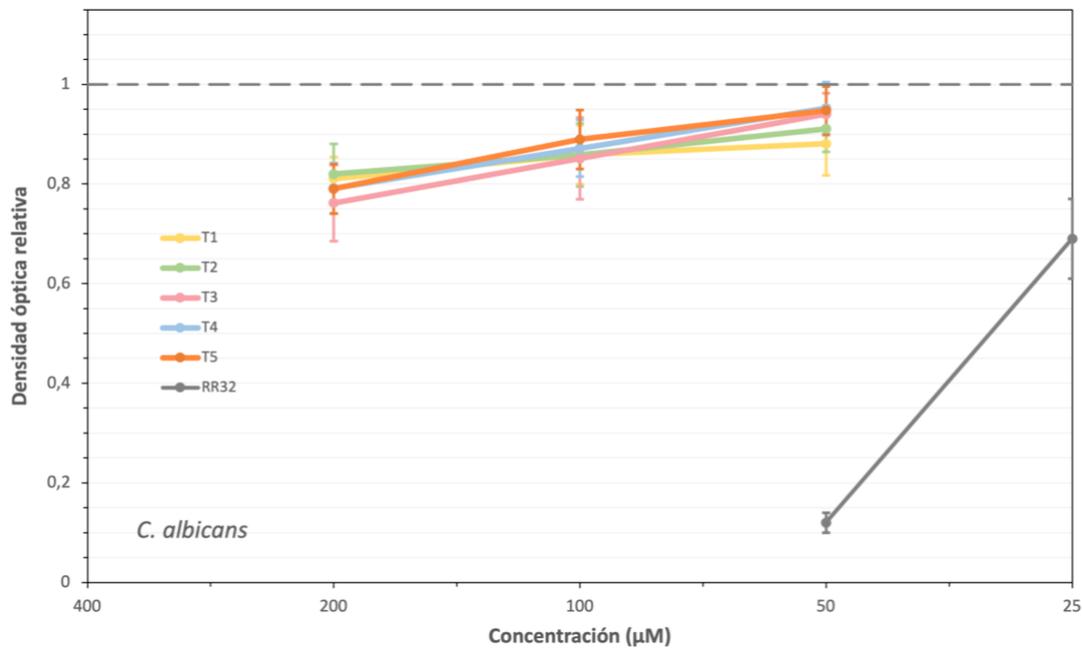


Figura 4.3. Actividad de los péptidos frente a *C. albicans*. Densidad óptica relativa en función de la concentración al final del ensayo con *C. albicans*; un valor de 1 indica actividad nula. En gris se indican los valores obtenidos con el péptido original Lv_RR32 en un ensayo previo²⁰. La escala horizontal es logarítmica.

Como en los ensayos anteriores con *E. coli* y *S. aureus*, la actividad antimicrobiana observada fue muy escasa para todos los péptidos y todas las concentraciones, aunque en este caso se observó una correlación con la concentración, con valores de densidad óptica relativa que aumentan desde ~0,8 en el extremo superior del intervalo considerado hasta valores $\geq 0,9$ en el extremo inferior. Una vez más, este resultado contrasta con el comportamiento del péptido completo, que seguía presentando una actividad importante a valores de concentración inferiores a los considerados en este ensayo (aunque en este caso no se determinó un valor para la MIC)²⁰.

Tabla 4.7. Recuento en placa: *C. albicans*

	Densidad óptica del preinóculo [McFarland]	UFC			Concentración del inóculo [UFC/ml]
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
<i>C. albicans</i>	1,50	117	7	1	$1,1 \times 10^5$

Resultados de los ensayos de recuento microbiano con *C. albicans*.

4.2 Ensayo con eritrocitos humanos

En la Tabla 4.8 y la Figura 4.4 a continuación se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de actividad hemolítica.

Tabla 4.8. Actividad hemolítica de los péptidos

		Concentración [μM]			
		50	25	12,5	6,25
Eritrocitos humanos	T1	8 \pm 5	10 \pm 5	2 \pm 2	2 \pm 2
	T2	0 $^{+3}_{-0}$	0 $^{+2}_{-0}$	0 $^{+1}_{-0}$	0 $^{+1}_{-0}$
	T3	3 \pm 3	0 $^{+4}_{-0}$	0 $^{+9}_{-0}$	0 $^{+2}_{-0}$
	T4	6 \pm 4	8 \pm 4	7 \pm 5	7 \pm 4
	T5	5 \pm 5	5 \pm 5	2 $^{+3}_{-2}$	1 $^{+3}_{-1}$

Valores porcentuales de actividad hemolítica de los cinco péptidos en función de la concentración.

La actividad hemolítica observada en el intervalo de concentraciones estudiado fue nula en el caso de los péptidos T2 y T3 y muy pequeña (con valores $\lesssim 10\%$) en el caso de los demás péptidos.

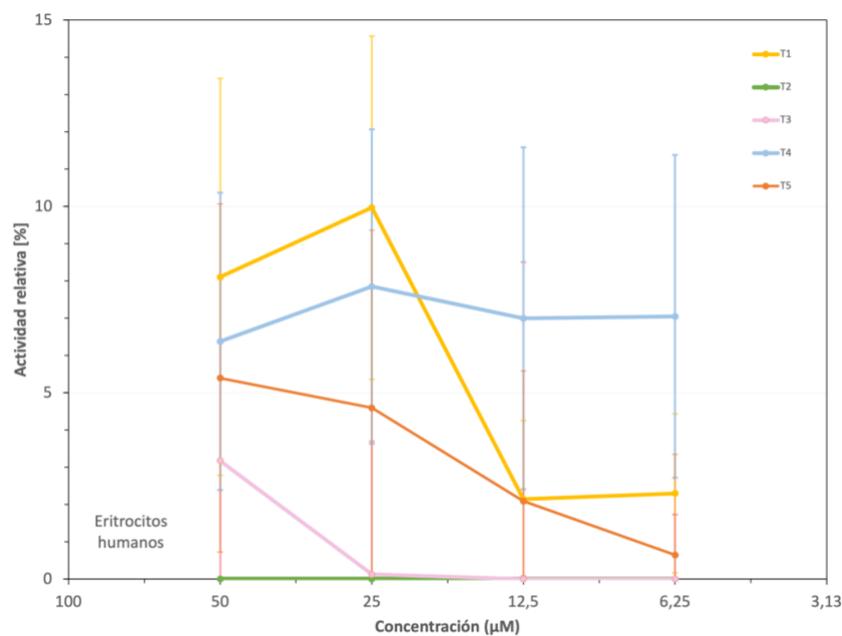


Figura 4.4. Actividad hemolítica relativa de los péptidos en función de la concentración. La escala horizontal es logarítmica.

4.3 Modelos bioinformáticos

4.3.1 Estructura tridimensional con I-TASSER

I-TASSER predice una estructura secundaria de plegamiento irregular para todos los residuos de todos los modelos: es decir, tanto el péptido completo como los péptidos derivados tienen la estructura extendida característica de los PrAMP, sin hélices α ni láminas β , como se confirma por el análisis del visor Jmol. El nivel de confianza atribuido a esta predicción es generalmente alto con algunas excepciones, de las cuales la más notable es la secuencia RIRIR que comparten Lv_RR32 y T1. La calidad de la topología de los modelos, medida por la puntuación C , es satisfactoria para todos los péptidos truncados. Las predicciones se resumen en la Tabla 4.9 y la Figura 4.5.

Tabla 4.9. Estructura espacial predicha con I-TASSER

	N_{mod}	C	TM	RDMS (Å)	Nivel de confianza de la estructura secundaria																																
					R	R	I	R	I	R	P	P	R	L	P	R	P	R	P	R	P	W	F	P	P	R	F	P	I	P	R	I	P	G	K	R	
Lv_RR32	5	-1,97	0,48	5,6 $\pm 3,5$	9	5	1	1	1	6	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8	8	8	7	7	6	6	7	6	7	8	8	8	9	
T1	1	0,07	0,72	0,5 $\pm 0,5$	9	4	0	0	2	6	8	8	8	9																							
T2	2	0,03	0,72	0,5 $\pm 0,5$							9	8	7	7	7	7	8	8	8	8																	
T3	1	-0,10	0,70	0,5 $\pm 0,5$													9	7	7	7	6	7	8	8	8	8											
T4	3	-0,31	0,67	0,5 $\pm 0,5$																		9	8	7	7	7	5	6	7	7	9						
T5	2	-0,23	0,68	0,5 $\pm 0,5$																								9	8	5	6	6	7	7	8	8	9

N_{mod} : número de modelos calculados; C : puntuación C ; TM: puntuación TM; RDMS: desviación cuadrática media del modelo respecto al centroide de simulaciones. Un número bajo de modelos indica una convergencia rápida del algoritmo. Se consideran satisfactorios los valores de $C > -1,5$. Todos los residuos de todos los modelos tienen una estructura secundaria de plegamiento irregular (*coil*). Nivel de confianza de la estructura secundaria: 0 = mínimo, 9 = máximo. Código de colores de la calidad de la predicción: verde: satisfactorio; naranja: límite; rojo: insatisfactorio.

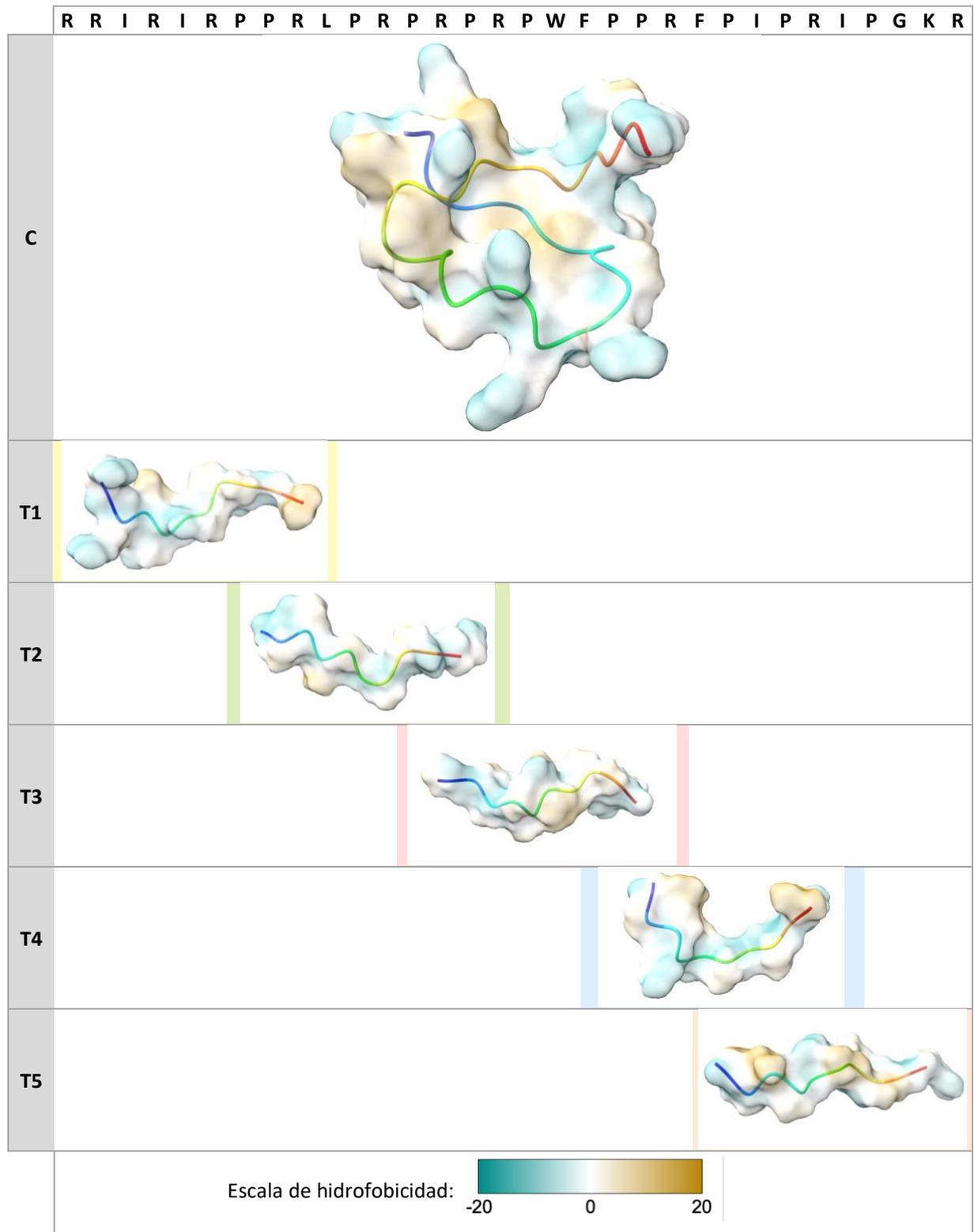


Figura 4.5. Estructura tridimensional de los péptidos con I-TASSER. Modelos de estructura tridimensional y carácter hidrófobo predichos por I-TASSER. Esqueleto: azul: extremo aminoterminal; rojo: extremo carboxiterminal. La escala relativa de tamaños es aproximada.

4.3.2 Actividad antimicrobiana con DBAASP

Las predicciones de la herramienta de DBAASP se muestran en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Actividad antimicrobiana según DBAASP

Tipo de muestra (cepa)	Péptido	Actividad	Valor predictivo
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922, CECT 434)	Lv_RR32	Activo	0,84
	Lv_T1	No activo	0,63
	Lv_T2	No activo	0,67
	Lv_T3	No activo	0,65
	Lv_T4	No activo	0,79
	Lv_T5	No activo	0,79
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923, CECT 435)	Lv_RR32	No activo	0,72
	Lv_T1	No activo	0,83
	Lv_T2	No activo	0,91
	Lv_T3	No activo	0,78
	Lv_T4	No activo	0,88
	Lv_T5	No activo	0,88
<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)	Lv_RR32	No activo	0,91
	Lv_T1	No activo	0,87
	Lv_T2	No activo	0,94
	Lv_T3	No activo	0,91
	Lv_T4	No activo	0,88
	Lv_T5	No activo	0,91
Eritrocitos humanos	Lv_RR32	No activo	0,62
	Lv_T1	No activo	0,85
	Lv_T2	No activo	0,96
	Lv_T3	No activo	0,96
	Lv_T4	No activo	0,92
	Lv_T5	No activo	0,90

Predicciones de la actividad antimicrobiana de los distintos péptidos con DBAASP. El valor predictivo indicado es el positivo cuando el resultado es «activo» y el negativo cuando es «no activo» para los tres microorganismos y viceversa para los eritrocitos.

4.3.3 Actividad antimicrobiana con CAMP_{R3}

Las predicciones de los cuatro algoritmos de la herramienta de CAMP_{R3} se muestran en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11. Actividad antimicrobiana según CAMP_{R3}

Péptido	SVM		Bosques aleatorios		Redes neuronales		Análisis discriminante
	Clase	Prob.	Clase	Prob.	Clase	Prob.	
Lv_RR32	Activo	0,999	Activo	0,904	Activo	0,998	Activo
Lv_T1	Activo	0,783	Activo	0,655	Activo	0,942	Activo
Lv_T2	Activo	0,581	Activo	0,514	Activo	0,955	No activo
Lv_T3	Activo	0,556	Activo	0,578	Activo	0,937	No activo
Lv_T4	No activo	0,293	Activo	0,530	Activo	0,748	Activo
Lv_T5	Activo	0,609	Activo	0,524	Activo	0,830	Activo

Predicciones de la actividad antimicrobiana de los distintos péptidos con CAMP_{R3}. Prob.: probabilidad de la predicción.

En lo que respecta a la coherencia interna, se obtuvieron resultados concordantes en el caso de Lv_RR32, T1 y T5 (los cuatro algoritmos arrojaron el mismo resultado) y discordantes en el caso de T2, T3 y T4 (tres algoritmos de cuatro predijeron actividad antimicrobiana). En lo que respecta a la coherencia con los datos experimentales, solo las predicciones para el péptido completo y las de SVM para Lv_T4 concuerdan, ya que en todos los demás casos se predijo actividad *in silico*, pero no se observó *in vitro*. La probabilidad asociada a la predicción es generalmente baja en el caso de los péptidos truncados, lo que implica una fiabilidad baja.

4.3.4 Actividad antifúngica con Antifp

Las predicciones de Antifp sobre la actividad antifúngica se muestran en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12. Actividad antifúngica según Antifp

Péptido	Puntuación	Predicción	Hidrofobicidad	Anfipaticidad	Hidrofilia	Carga
Lv_RR32	0,09	Activo	-0,50	0,96	0,58	12,00
Lv_T1	-0,10	No activo	-0,70	1,23	0,96	5,00
Lv_T2	0,01	Activo	-0,69	0,98	1,02	4,00
Lv_T3	-0,09	No activo	-0,46	0,74	0,31	3,00
Lv_T4	-0,60	No activo	-0,11	0,49	-0,26	2,00
Lv_T5	0,48	Activo	-0,24	0,78	0,26	3,00

Actividad antifúngica y propiedades relacionadas predichas por Antifp.

La predicción no concuerda con los datos *in vitro* para los dos péptidos T2 y T5 y concuerda para los demás péptidos.

4.3.5 Interacción con membranas predicha con PPM

A continuación, se muestran algunas predicciones realizadas con la herramienta PPM. Dado el elevado número de parámetros a considerar (péptido y tipo de membrana), solo se mostrarán algunos ejemplos representativos.

4.3.5.1 Interacción con membranas de bacterias gramnegativas

La Figura 4.6 muestra la inserción de Lv_RR32 y los cinco péptidos derivados en un modelo de membrana gramnegativa. Para todos los péptidos se predijo un pequeño grado de inserción en la membrana externa (unos pocos Å, frente a un espesor hidrófobo de la bicapa de 23,9 Å; véase la Tabla 4.13). T1, T2 y T3 se insertan por la parte central, donde cuentan con varios residuos hidrófobos; T4, que tiene una estructura de mancuerna con dos extremos hidrófobos, penetra por los extremos; por último, T5, que cuenta con 4 residuos hidrófobos consecutivos en el extremo aminoterminal, penetra con una inclinación mucho más próxima a la vertical alcanzando una profundidad mayor.

Tabla 4.13. Parámetros de inserción de los péptidos en modelos de membrana

	Gramnegativa		Grampositiva		Hongos	
	Profund.	Ángulo	Profund.	Ángulo	Profund.	Ángulo
Lv_RR32	2,1 Å	55°	2,0 Å	52°	2,1 Å	55°
T1	3,1 Å	82°	2,5 Å	83°	2,9 Å	82°
T2	3,7 Å	78°	3,9 Å	74°	3,7 Å	78°
T3	2,6 Å	76°	2,7 Å	78°	2,7 Å	78°
T4	3,0 Å	86°	3,1 Å	86°	3,1 Å	86°
T5	6,7 Å	55°	6,8 Å	48°	7,0 Å	58°

Parámetros espaciales de inserción de los péptidos en modelos de membrana según PPM.

4.3.5.2 Interacción con membranas de bacterias grampositivas u hongos

Las predicciones de PPM para el caso de membranas de bacterias grampositivas o de hongos fueron muy parecidas a las del caso anterior, como es esperable dada la aproximación del modelo (la única diferencia es el espesor de la bicapa, que para una proteína periférica no es relevante). La Figura 4.7 compara los dos modelos para el péptido T4.

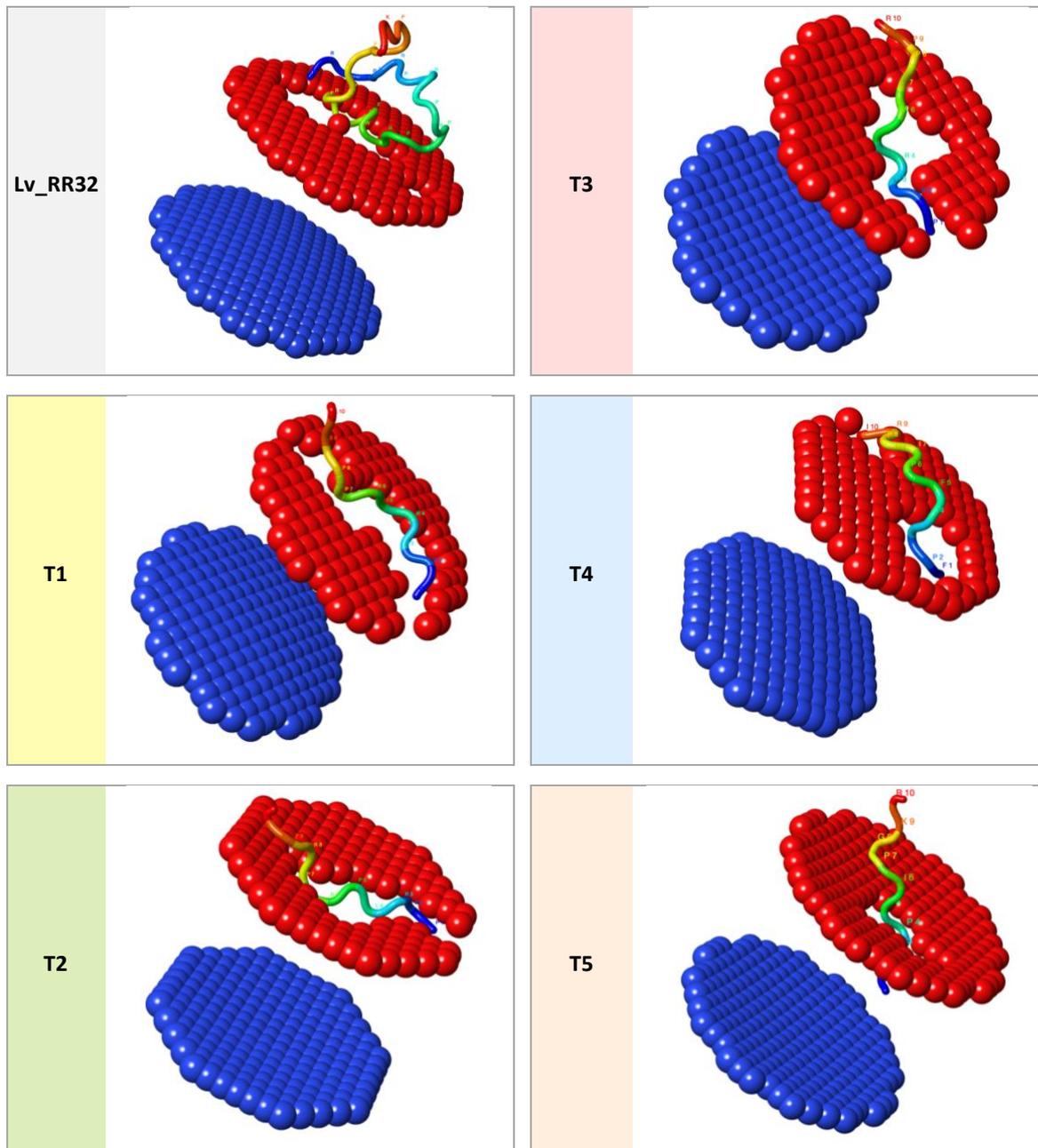


Figura 4.6. Interacción con membranas de bacterias gramnegativas predicha por PPM. Rojo: pseudoátomos de la capa superior de la membrana externa; azul: pseudoátomos de la capa inferior de la membrana externa.

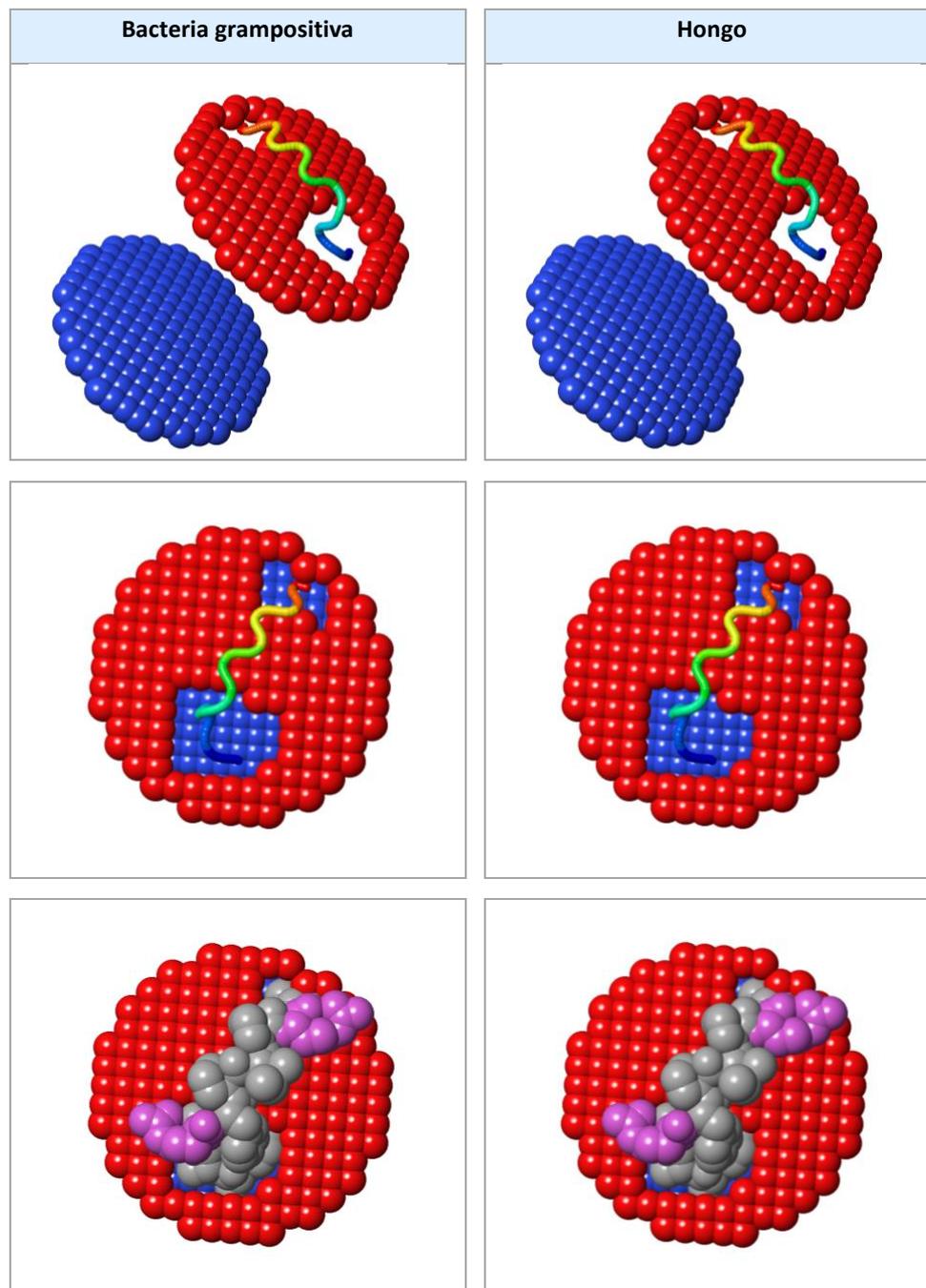


Figura 4.7. Interacción con membranas de bacterias grampositivas y hongos. Comparación del modelo de interacción del péptido T4 con membranas de bacteria grampositiva (izquierda) y hongo (derecha). Paneles superiores: vista diagonal; paneles intermedios: vista superior; paneles inferiores: como los intermedios, resaltando las regiones polares (magenta) e hidrófobas (gris) del péptido. Rojo: pseudoátomos de la capa superior de la membrana; azul: pseudoátomos de la capa inferior.

5 DISCUSIÓN

A continuación, se discutirán brevemente las posibles fuentes de incertidumbre experimental y se analizarán los resultados.

5.1 Fuentes de error experimental

Los resultados *in vitro* mostrados en el capítulo anterior indican de forma inequívoca que los péptidos truncados no tienen actividad antimicrobiana. A pesar de que el resultado es contundente, es buena práctica de laboratorio controlar y cuantificar los posibles errores experimentales. En este apartado, se describirán algunas posibles fuentes de error del proyecto y se indicarán estrategias para minimizar su impacto.

5.1.1 Precisión interna del instrumento: medidas de densidad óptica

Al realizar dos lecturas consecutivas de una muestra, los valores difieren a partir del segundo o tercer dígito decimal, tanto si se deja la placa en el lector entre una lectura y otra como si se saca y se vuelve a introducir. Por lo tanto, en el análisis de los resultados es suficiente considerar dos dígitos significativos.

5.1.2 Precisión interna del ensayo: efecto de borde en las microplacas

En los ensayos antimicrobianos realizados, la densidad óptica es sistemáticamente más alta en los bordes de la placa (Figura 5.1). Este fenómeno es consecuencia de la evaporación diferencial a través de la placa, que aumenta la concentración de la solución en los pocillos externos, y está descrito, aunque no explicado, en la literatura^{35,36}. Los datos pueden explicarse con un mayor crecimiento bacteriano en los pocillos externos: aunque la evaporación aumenta tanto la concentración del péptido como la de los nutrientes, si el péptido es inactivo el único efecto relevante es el aumento de la concentración de los nutrientes, que favorece la proliferación bacteriana. Esta explicación concuerda con el hecho de que los pocillos del blanco no están prácticamente afectados. Nótese, además, que la dispersión obtenida con 3 medidas es sistemáticamente inferior a la que se obtiene considerando las 4 réplicas. En consecuencia, en los ensayos con tiempo de incubación largo se tomaron en cuenta solo las 3 réplicas más internas de cada caso. Asimismo, en los ensayos en los que la placa era incompleta se añadió solución del blanco a los pocillos colindantes con los pocillos de las muestras (véase la Figura 3.4). En los

ensayos de hemólisis no fue necesario excluir el pocillo del borde de la placa dado el corto tiempo de incubación.

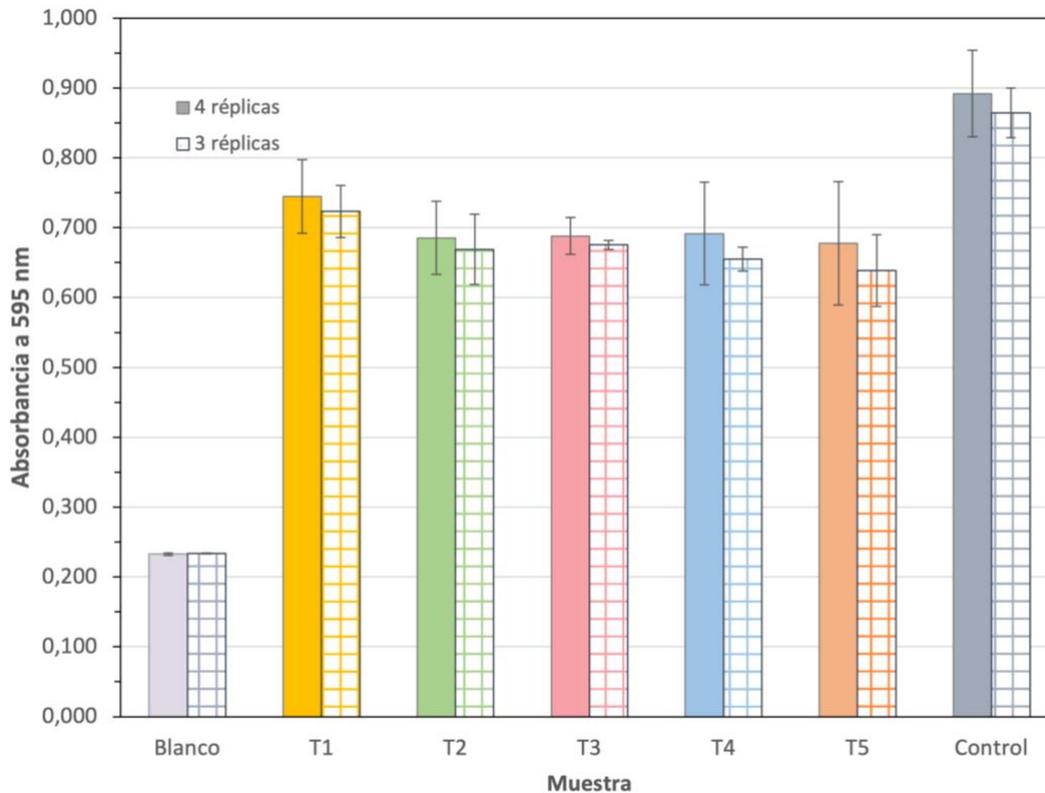


Figura 5.1. Efecto de la evaporación en el borde de la placa sobre la proliferación bacteriana. Valores medidos de absorbancia promediados sobre las 4 réplicas (barras de colores lisos) o las 3 réplicas más internas (barras de cuadros), para la dilución intermedia (100 μ M) del ensayo con *S. aureus*.

5.1.3 Sedimentación de las muestras de cultivos

Dado que las placas se incubaron sin agitación, la sedimentación de las muestras puede, en principio, afectar los resultados. Para evaluar este efecto, se resuspendieron las muestras de una de las microplacas bombeando manualmente el contenido de los pocillos con una pipeta multicanal y, a continuación, se repitió la medida. El resultado no difirió sustancialmente de la medida previa a la agitación, dentro de los límites especificados en el apartado 5.1.1.

5.1.4 Formación de biofilm

Las cepas bacterianas utilizadas son importantes formadoras de biofilm³⁷⁻³⁹. Los ensayos se llevaron a cabo sin agitación, lo que podría haber propiciado la formación de biofilm e interferido con la acción antimicrobiana, ya que la presencia de biofilm reduce la

susceptibilidad de los microorganismos a los antibióticos en factores de entre 10 y 1000 respecto a los microorganismos planctónicos¹⁰. Este efecto no se ha controlado.

5.1.5 Proporción de medio de cultivo a concentraciones altas

Para los péptidos T1 y T3, la actividad parece aumentar al disminuir la concentración del péptido en el ensayo con *S. aureus*. Este comportamiento podría ser un artefacto no relacionado con la actividad del péptido, sino con la menor concentración de medio de cultivo: en el caso de la dilución D1 (concentración final de 200 μM), el medio de cultivo representa solo el 80% del volumen, y el resto es el agua de disolución del péptido. Nótese que se trata del efecto opuesto al efecto de borde descrito en el apartado 5.1.2.

5.2 Actividad de los péptidos

5.2.1 Actividad observada *in vitro*

En términos generales, los resultados experimentales muestran una actividad antimicrobiana escasa o nula para las distintas especies estudiadas a todas las concentraciones.

En el caso de *E. coli*, la actividad de los cinco péptidos es casi nula en todo el intervalo de concentraciones explorado, en neto contraste con el comportamiento del péptido completo observado en ensayos anteriores^{10,20}. No se detecta ninguna correlación con la concentración, con la única excepción del péptido T1, que muestra indicios de un aumento de la actividad para concentraciones $\geq 50 \mu\text{M}$. La mayor actividad de T1 frente a los otros fragmentos concuerda cualitativamente con trabajos previos sobre otros péptidos que localizan el dominio activo en el extremo aminoterminal del péptido completo^{10,15,16}; por otro lado, la debilidad de la tendencia observada concuerda con la existencia de una longitud de corte (superior a la de T1) por debajo de la cual no se espera actividad apreciable^{10,16}. Considerando las incertidumbres, se trata de explicaciones tentativas más que de conclusiones robustas; en cualquier caso, las concentraciones muy altas carecen de interés a efectos de posibles aplicaciones prácticas de los péptidos.

Los resultados obtenidos con *E. coli* y el hecho de que los PrAMP suelen ser más activos frente a las bacterias gramnegativas respecto a las grampositivas motivaron que para *S. aureus* se exploraran concentraciones más altas. Los resultados son parecidos a los encontrados con *E. coli* tanto en el aspecto cualitativo como en el cuantitativo: los valores

de actividad son pequeños, con una tendencia incipiente hacia el aumento de la actividad con la concentración y valores absolutos próximos a los obtenidos con *E. coli* en el único valor de concentración común entre los dos ensayos (50 μM). La tendencia observada es muy moderada (la pendiente de las curvas de la Figura 4.2 es pequeña), lo que impide atribuir el efecto a la inhibición de la síntesis proteica y sugiere que podría tratarse de un artefacto ligado a la composición del medio de cultivo (véase el apartado 5.1.5) o de otro mecanismo inespecífico de toxicidad. En todo caso, esta posible actividad carece de interés práctico dadas las altas concentraciones.

Los resultados de los ensayos con *C. albicans* son parecidos a los obtenidos con las dos especies bacterianas: una actividad antimicrobiana inespecífica con una tendencia incipiente a aumentar con la concentración, con valores muy pequeños incluso a las concentraciones más altas.

La citotoxicidad de los péptidos, evaluada mediante el ensayo de actividad hemolítica, es muy baja o nula para todos los péptidos y todas las concentraciones consideradas. Si bien este es un resultado favorable de cara a una posible aplicación terapéutica del fármaco, resulta irrelevante a la luz de los resultados negativos de actividad.

La falta de actividad antimicrobiana observada motivó que no se realizara el ensayo de integridad de las membranas con Sytox Green.

5.2.2 Actividad predicha *in silico*

I-TASSER predice para el péptido completo y los 5 fragmentos una estructura de plegamiento irregular y le atribuye valores de confianza altos en todos los residuos, a excepción de las regiones alrededor de las isoleucinas (Tabla 4.9). Las posibles razones son la escasez de plantillas adecuadas en la PDB o la posible inestabilidad de secuencias que alternan residuos polares e hidrófobos muy próximos, como RIRIR (Lv_RR32(2-6)). Por otro lado, el algoritmo considera la topología resultante correcta ($C > -1,5$) en el caso de los fragmentos; no así para el péptido completo ($C = -1,97$). Interpretamos esta diferencia como el efecto de la longitud del péptido, que amplifica las incertidumbres derivadas de la escasez de plantillas adecuadas.

DBAASP predice correctamente que ninguno de los cinco péptidos truncados presenta actividad, pero falla al predecir la ausencia de actividad de Lv_RR32 frente a *C. albicans* y *S. aureus*^{10,20}. Puede haber distintas razones para la discrepancia. En primer lugar, la actividad de un AMP frente a un microorganismo dado puede variar en función de la

cepa: esto se ha observado en el caso de péptidos derivados de Bac5 y Bac7 frente a *E. coli*¹⁰ y podría explicar la discrepancia parcial entre los resultados de Lv_RR32 obtenidos por Atance (2022) y Sola (2020), quienes usaron la misma cepa de *E. coli* (obteniendo el mismo MIC) y cepas distintas de *S. aureus* y *C. albicans* (obteniendo MIC distintos)^{10,20}. Las predicciones de DBAASP se refieren a la misma cepa de *E. coli* usada en este trabajo, pero a cepas distintas en el caso de *S. aureus* y *C. albicans*. A la luz de estos resultados, no podemos excluir que la actividad de Lv_RR32 frente a *C. albicans* y *S. aureus* también dependa de la cepa considerada. En segundo lugar, el organismo más representado en la base de datos es *E. coli*, con un 50 % de ejemplos más que *S. aureus* y 6 veces más que *C. albicans*, por lo que las predicciones relativas a *E. coli* son más robustas que las relativas a los otros dos organismos estudiados. En tercer lugar, los PrAMP de la base de datos con la que se ha entrenado la herramienta son menos del 2 % del total⁴⁰, por lo que es esperable que la fiabilidad de las predicciones no sea muy alta para esta clase de péptidos.

CAMP_{R3} también falla, si bien en la dirección opuesta, ya que predice actividad antimicrobiana para todos los fragmentos. Ni el sitio web ni los artículos a los que remite ofrecen detalles sobre el cálculo de la probabilidad de la predicción, pero podemos formular algunas hipótesis sobre las razones de la discrepancia entre estos resultados y los ensayos *in vitro*: por un lado, la herramienta se ha entrenado sobre una base de datos que no contiene péptidos extendidos y muy pocas secuencias parcialmente extendidas (solo 16 péptidos tienen al menos el 50% de residuos con plegamiento irregular). Por otro lado, una evaluación de CAMP_{R3} frente a DBAASP en un conjunto de datos de entrenamiento muestra que CAMP_{R3} tiene una sensibilidad mayor (detecta más del 90 % de los péptidos activos frente al ~75 % de DBAASP), pero una especificidad muy inferior (un 75 % de los péptidos considerados activos son, en realidad, falsos positivos, frente a solo el ~15 % en el caso de DBAASP): en otras palabras, CAMP_{R3} tiende a sobreestimar la actividad⁴⁰, lo que concuerda con los resultados de este trabajo (Tabla 4.10 y Tabla 4.11).

Antifp atribuye erróneamente propiedades antifúngicas a T2 y T5, un resultado que se explica considerando varios factores. Por un lado, una puntuación próxima a 0 equivale a una asignación poco robusta, por lo que T2, con una puntuación de 0,01, se sitúa en la frontera entre los dos grupos (antifúngicos/no antifúngicos). Aunque la frontera entre los dos grupos está fijada por defecto en 0, puede variarse arbitrariamente en función de los

valores de sensibilidad y especificidad deseados; en particular, si se desea obtener una especificidad alta (pocos falsos positivos), es recomendable elegir un valor límite relativamente alto; si se eligiera, por ejemplo, un valor de +0,50, T5 también se consideraría inactivo (aunque, en ese caso, Lv_RR32 también resultaría inactivo). Un problema de Antifp a efectos de este trabajo es que solo el 3 % (36 de 1168) de los péptidos activos y el 5% (57 de 1168) de los inactivos del conjunto de entrenamiento tienen una longitud de 10 aminoácidos o menos, por lo que es esperable que las predicciones no sean muy fiables para estos tamaños (de hecho, los autores recomiendan aplicar la predicción solo a péptidos de al menos 15 aminoácidos [P. Agrawal, comunicación privada], a pesar de que el conjunto de entrenamiento contiene péptidos con longitudes de hasta 4 aminoácidos). Por último, el análisis detallado de la base de datos de entrenamiento, descargable desde la página web de Antifp, muestra que, entre los péptidos de 10 aminoácidos o menos del conjunto de entrenamiento, ninguno de los péptidos activos y solo 4 de los inactivos son PrAMP. Esto, por un lado, indica que un posible PrAMP corto podría no ser correctamente identificado por Antifp; por otro, es una prueba indirecta de que los PrAMP cortos tienden a ser inactivos, lo que anticipa una conclusión que se expondrá más adelante.

Por último, los modelos de PPM de interacción con membranas basados en la estructura tridimensional calculada por I-TASSER muestran, en todos los casos, una capacidad de inserción moderada de los distintos péptidos en las membranas. No se observa ninguna correlación entre las características de esta interacción (la profundidad y el ángulo de penetración o el tamaño del posible orificio) y los valores de actividad medidos en cada caso. Superficialmente, esto parecería confirmar los resultados experimentales previos sobre el péptido completo (la actividad antibacteriana de Lv_RR32 no conlleva la destrucción de la membrana¹⁰) y los del presente trabajo sobre los fragmentos (ninguno de los fragmentos presenta actividad citolítica). Sin embargo, el modelo de PPM de interacción con membranas de la catelicidina humana Hs_LL37, un péptido con un modo de acción citolítico, es indistinguible de los modelos presentados en este trabajo: la razón es que PPM solo permite predecir la disposición espacial de un péptido en la membrana, pero no la evolución del sistema, que depende de muchos factores no tomados en cuenta en este modelo sencillo, como la acción colectiva de varias moléculas o la existencia de transportadores de membrana.

5.2.3 Implicaciones de los resultados y perspectivas futuras

Los resultados *in vitro* muestran de forma inequívoca que los fragmentos analizados no son activos. Los datos previos disponibles sobre el péptido completo y los datos publicados sobre péptidos similares sugieren que la inactividad es consecuencia del tamaño excesivamente pequeño de los fragmentos. Si bien existen péptidos activos muy pequeños —los hay de tan solo 6 aminoácidos⁸—, lo habitual es una longitud mínima de ~13-15 aminoácidos⁴⁰. Los datos publicados sobre Bac5 y Bac7 —dos péptidos con alto grado de similitud con Lv_RR32, en particular, en el extremo aminoterminal— apuntan a un posible valor de corte de unos 15 aminoácidos, que debería explorarse en futuros trabajos. Los mismos argumentos respaldan que se prioricen los fragmentos que incluyen el extremo aminoterminal de Lv_RR32.

Los experimentos llevados a cabo en este trabajo no permiten determinar la causa de la inactividad, es decir, si en los péptidos cortos falla el mecanismo de transporte al interior de la célula o la inhibición de la síntesis proteica. Para aclarar este aspecto, los experimentos futuros deberían incluir ensayos de permeabilidad con péptidos de tamaños próximos a 15.

Otro aspecto que queda por determinar es el mecanismo de transporte. Sabemos que, en algunos casos, el transporte ocurre vía SbmA^{13,17}, pero también que hay al menos un modo de transporte alternativo¹⁰. Para identificar los mecanismos alternativos, podrían plantearse ensayos de actividad con cepas mutantes de *E. coli* u otro microorganismo, siguiendo la estrategia que llevó a la identificación del papel causal de SbmA, que consiste en comparar el genoma de las cepas resistentes con el de las cepas vulnerables¹⁷. Además, la identificación de otros mecanismos de acción para péptidos y microorganismos específicos podría dar pistas para entender ciertas diferencias clave entre los péptidos, como el hecho de que Bac7 y otros PrAMP no tienen actividad contra bacterias grampositivas y Lv_RR32 sí.

Un punto relacionado con el anterior es el posible papel de la cepa del microorganismo. Una vez determinado el tamaño mínimo de péptido que conserva las propiedades antibacterianas, debería estudiarse si la cepa influye sobre la actividad. La posible sensibilidad del potencial antimicrobiano a la cepa del microorganismo podría representar una ventaja (una mayor especificidad, que puede ser deseable para ciertas aplicaciones)

así como una desventaja (una mayor vulnerabilidad a las resistencias). Se trata, en cualquier caso, de un aspecto a estudiar en trabajos futuros.

En cuanto a los modelos *in silico*, en este trabajo solo se han usado para sacar conclusiones *ex post facto* y no para guiar los ensayos en el laboratorio. Esto ha sido consecuencia de una circunstancia favorable —la disponibilidad de datos experimentales sólidos, que siempre mandan sobre el modelo—, pero también de limitaciones, como la inexperiencia de la autora de este trabajo, que impide el pleno aprovechamiento de las numerosísimas herramientas informáticas existentes, así como las aproximaciones intrínsecas de los modelos. Ambos factores solo pueden mejorar, y en futuras investigaciones las mismas herramientas que se usaron en este trabajo podrían servir para guiar decisiones experimentales o para ayudar la interpretación de los datos.

A medida que se acumulen estudios de este tipo, tanto experimentales como bioinformáticos, se podrá esclarecer la relevancia de todas las variables en juego e, idealmente, pasar de un nivel de comprensión fenomenológico a un modelo molecular detallado que explique la acción antimicrobiana mediante mecanismos y motivos estructurales específicos^{10,18}. Esto permitirá optimizar la estrategia de búsqueda de nuevos péptidos naturales y sistematizar su modificación química, y proporcionará criterios explícitos para construir péptidos híbridos o totalmente sintéticos; de forma que, quizás, podamos aplicar a los péptidos antimicrobianos las reflexiones sobre la penicilina con las que Fleming concluyó su discurso:

«And we are not at the end of the penicillin story. Perhaps we are only just at the beginning. We are in a chemical age and penicillin may be changed by the chemists so that all its disadvantages may be removed and a newer and a better derivative may be produced».

6 CONCLUSIONES

- Los cinco péptidos analizados presentan una actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* muy inferior a la del péptido completo, lo que sugiere que el mecanismo antimicrobiano de los péptidos truncados difiere del del péptido completo.
- La escasa actividad antimicrobiana observada en los ensayos *in vitro* sugiere que los péptidos truncados no comprometen la integridad de las membranas de los microorganismos estudiados.
- La escasa o nula dependencia con la concentración de la actividad antimicrobiana observada en los ensayos *in vitro* sugiere que el mecanismo antimicrobiano de los péptidos truncados es inespecífico.
- A las concentraciones estudiadas, ninguno de los cinco péptidos presenta una actividad hemolítica apreciable frente a los eritrocitos humanos.
- El modelado *in silico* de la estructura de los cinco péptidos permitió estudiar la interacción con membranas simuladas, pero no fue posible extraer conclusiones sobre la relación entre la actividad observada y los parámetros principales de la interacción, como el ángulo y el número de residuos embebidos.
- El modelado *in silico* de la actividad antimicrobiana de los cinco péptidos arroja resultados generalmente en desacuerdo con los ensayos *in vitro*, lo que podría deberse al pequeño tamaño de los péptidos y a su estructura extendida, escasamente representados en las bases de datos.

7 REFERENCIAS

7.1 Fuentes bibliográficas

1. Fleming A. Penicillin. <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf>.
2. WHO. Antimicrobial resistance. Published 2021. Accessed August 2, 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
3. Kwon JY, Kim MK, Mereuta L, Seo CH, Luchian T, Park Y. Mechanism of action of antimicrobial peptide P5 truncations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *AMB Express*. 2019;9(1):122. doi:10.1186/s13568-019-0843-0
4. Lee EY, Lee MW, Fulan BM, Ferguson AL, Wong GCL. What can machine learning do for antimicrobial peptides, and what can antimicrobial peptides do for machine learning? *Interface Focus*. 2017;7(6). doi:10.1098/rsfs.2016.0153
5. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.582779
6. Boto A, de La Lastra JMP, González CC. The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs. *Molecules*. 2018;23(2). doi:10.3390/molecules23020311
7. Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*. 2004;198:169-184. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x
8. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*. 2011;29(9):464-472. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
9. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(D1):D1087-D1093. doi:10.1093/nar/gkv1278

10. Sola R. *Towards the Design of Peptide Antibiotics: New Insights from Synthetic Analogues and from Natural Sources*. Università degli studi di Trieste; 2020.
11. Mookherjee N, Brown KL, Hancock REW. Cathelicidins. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier; 2013:77-84.
12. Benincasa M, Scocchi M, Podda E, Skerlavaj B, Dolzani L, Gennaro R. Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides (NY)*. 2004;25(12):2055—2061. doi:10.1016/j.peptides.2004.08.004
13. Scocchi M, Mardirossian M, Runti G, Benincasa M. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015;16(1):76-88. doi:10.2174/1568026615666150703121009
14. Tsai PW, Yang CY, Chang HT, Lan CY. Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of *Candida albicans* by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. *PLoS ONE*. 2011;6(3). doi:10.1371/journal.pone.0017755
15. Lin MC, Hui CF, Chen JY, Wu JL. Truncated antimicrobial peptides from marine organisms retain anticancer activity and antibacterial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Peptides (NY)*. 2013;44:139-148.
16. Benincasa M, Scocchi M, Podda E, Skerlavaj B, Dolzani L, Gennaro R. Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. *Peptides (NY)*. 2004;25(12):2055-2061. doi:https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.08.004
17. Mattiuzzo M, Bandiera A, Gennaro R, *et al.* Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Molecular Microbiology*. 2007;66(1):151-163. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05903.x
18. Sola R, Mardirossian M, Beckert B, *et al.* Characterization of cetacean proline-rich antimicrobial peptides displaying activity against escape pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(19):1-17. doi:10.3390/ijms21197367
19. Seefeldt AC, Graf M, Pérébaskine N, *et al.* Structure of the mammalian antimicrobial peptide Bac7(1-16) bound within the exit tunnel of a bacterial ribosome. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(5):2429-2438. doi:10.1093/nar/gkv1545

20. Atance Gómez C. *Evaluación de La Actividad Antimicrobiana de Dos Catelicidinas En Presencia de Iones Metálicos*. Trabajo de fin de máster. Universidad de La Laguna; 2022.
21. Gustaffson A, Sigel S, Ljunggren. The antimicrobial peptide LL37 and its truncated derivatives potentiates proinflammatory cytokine induction by lipoteichoic acid in whole blood. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 2010;70:512-518.
22. Gustaffson A, Olin AI, Ljunggren L. LPS interactions with immobilized and soluble antimicrobial peptides. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2010;70(3):194-200.
23. Escala de referencia de McFarland. http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf .
24. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*. 2015;12(1):7-8. doi:10.1038/nmeth.3213
25. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 2010;5(4):725-738. doi:10.1038/nprot.2010.5
26. Zheng W, Zhang C, Li Y, Pearce R, Bell EW, Zhang Y. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Reports Methods*. 2021;1(3). doi:10.1016/j.crmeth.2021.100014
27. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 2008;9. doi:10.1186/1471-2105-9-40
28. Zhang Y, Skolnick J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 2004;57(4):702-710. doi:10.1002/prot.20264
29. Gogoladze G, Grigolava M, Vishnepolsky B, *et al*. DBAASP: Database of antimicrobial activity and structure of peptides. *FEMS Microbiology Letters*. 2014;357(1):63-68. doi:10.1111/1574-6968.12489
30. Pirtskhalava M, Amstrong AA, Grigolava M, *et al*. DBAASP v3: Database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for

- development of new therapeutics. *Nucleic Acids Research*. 2021;49(D1):D288-D297. doi:10.1093/nar/gkaa991
31. Waghugh FH, Idicula-Thomas S. Collection of antimicrobial peptides database and its derivatives: Applications and beyond. *Protein Science*. 2020;29(1):36-42. doi:10.1002/pro.3714
 32. Waghugh FH, Barai RS, Gurung P, Idicula-Thomas S. CAMPR3: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(D1):D1094-D1097. doi:10.1093/nar/gkv1051
 33. Agrawal P, Bhalla S, Chaudhary K, Kumar R, Sharma M, Raghava GPS. In silico approach for prediction of antifungal peptides. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9(FEB). doi:10.3389/fmicb.2018.00323
 34. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. OPM database and PPM web server: Resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(D1). doi:10.1093/nar/gkr703
 35. Jaquith J. Three Ways To Reduce Microplate Edge Effect. <https://www.wellplate.com/three-ways-reduce-microplate-edge-effect/>.
 36. Thermo Scientific Nunc Edge 96-well Plates. <https://static.thermoscientific.com/images/D01285~.pdf>.
 37. Mottola C, Matias CS, Mendes JJ, *et al.* Susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* biofilms in diabetic foot infections. *BMC Microbiology*. 2016;16(1). doi:10.1186/s12866-016-0737-0
 38. Piras C, di Ciccio PA, Soggiu A, *et al.* *S. Aureus* biofilm protein expression linked to antimicrobial resistance: A proteomic study. *Animals*. 2021;11(4). doi:10.3390/ani11040966
 39. Crémet L, Corvec S, Batard E, *et al.* Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;75(3):252-255. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.019
 40. Vishnepolsky B, Gabrielian A, Rosenthal A, *et al.* Predictive Model of Linear Antimicrobial Peptides Active against Gram-Negative Bacteria. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2018;58(5):1141-1151. doi:10.1021/acs.jcim.8b00118

7.2 *Software*

7.2.1 Herramientas bioinformáticas

- I-TASSER: <https://zhanggroup.org/I-TASSER>
- DBAASP: <https://dbaasp.org/tools?page=special-prediction>
- CAMP_{R3}: <http://www.camp3.bicnirrh.res.in/predict>
- Antifp: <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/antifp>
- PPM: https://opm.phar.umich.edu/ppm_server3

7.2.2 Visualización de péptidos

- Jmol: <http://www.jmol.org/>
- ChimeraX: <https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax/>

7.2.3 Cálculos y gráficos

- Excel 16.61.1
- Matlab R2022a Update 2

7.2.4 Dibujos

- Inkscape: <https://inkscape.org> (v. 1.0 beta2)
- GIMP: <https://www.gimp.org> (v. 2.10.14)