

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA SECUENCIA RRWQWR DE LACTOFERRICINA BOVINA

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Elaborado por:
Derly Yesenia Grueso Mariaca

Asesor Interno:
MSc. Sandra Mónica Estupiñán

Asesor Externo:
Ph.D. Javier Eduardo García Castañeda

Coasesor Externo:
MSc. Yerly Vargas Casanova

Noviembre 2019
Bogotá, Colombia



- **Introducción**
- **Antecedentes**
- **Justificación**
- **Pregunta Problema**
- **Objetivos**
- **Metodología**
- **Resultados**
- **Conclusiones**

Introducción



Resistencia
Antibacteriana

Está aumentando rápidamente
en todo el mundo

Sistema Mundial de Vigilancia
Antimicrobiana

- **Prioridad Crítica:**

- *Pseudomonas aeruginosa*
- Enterobacteriaceae (*E.coli*, *Klebsiella sp*, *Proteus sp*)
- *Acinetobacter baumannii*

- **Prioridad Elevada:**

- *Staphylococcus aureus*
- *Salmonella sp*
- *Enterococcus faecium*
- *Neisseria gonorrhoeae*

- **Prioridad Media:**

- *Shigella*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*

Introducción

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)

Agentes terapéuticos
que generan menos
resistencia



PAMs



**Actividad
Antimicrobiana**



- Carga neta
- Hidrofobicidad

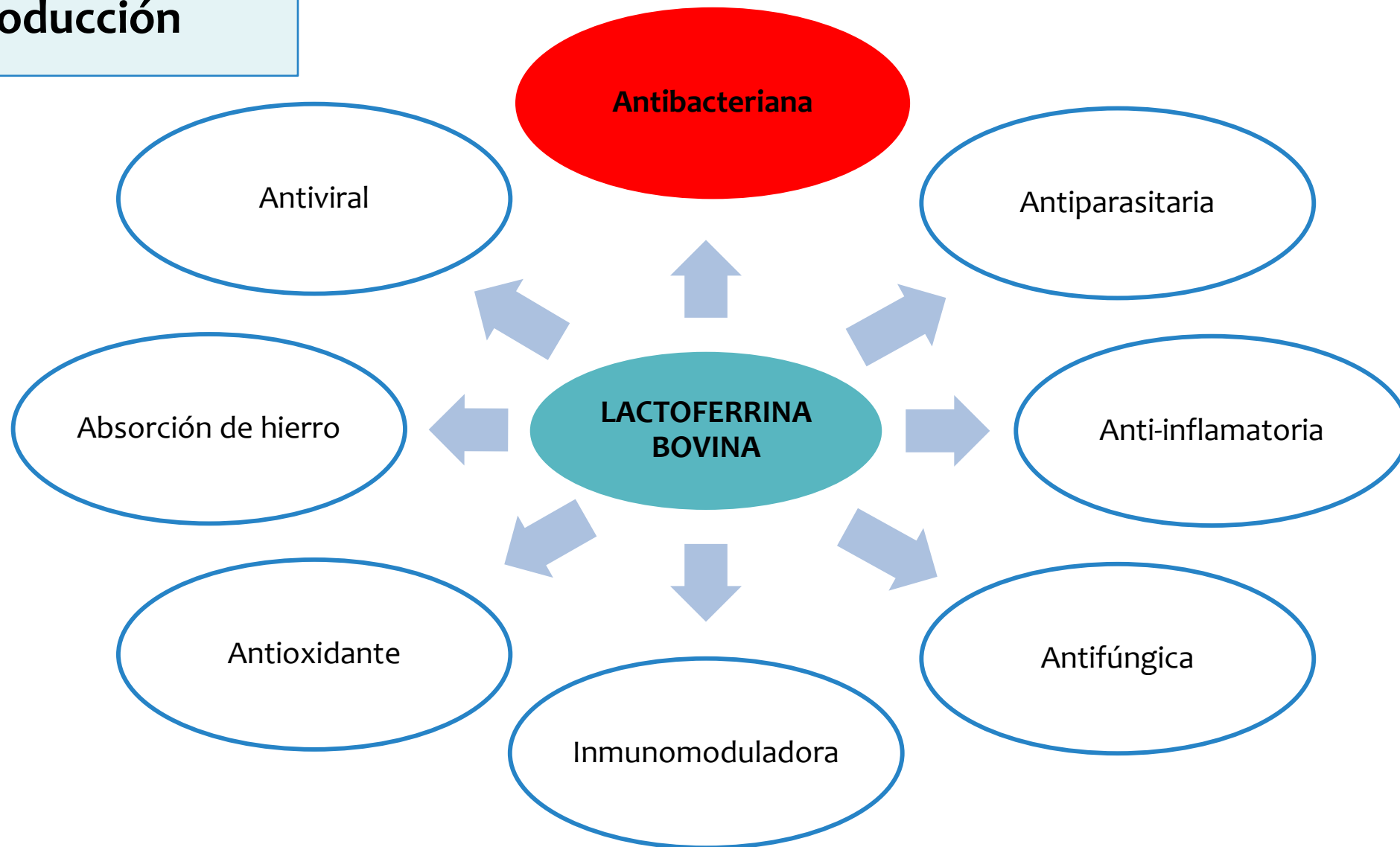


**Mecanismo de
acción**



Interacción del PAM con
las membranas de los
patógenos

Introducción



Introducción

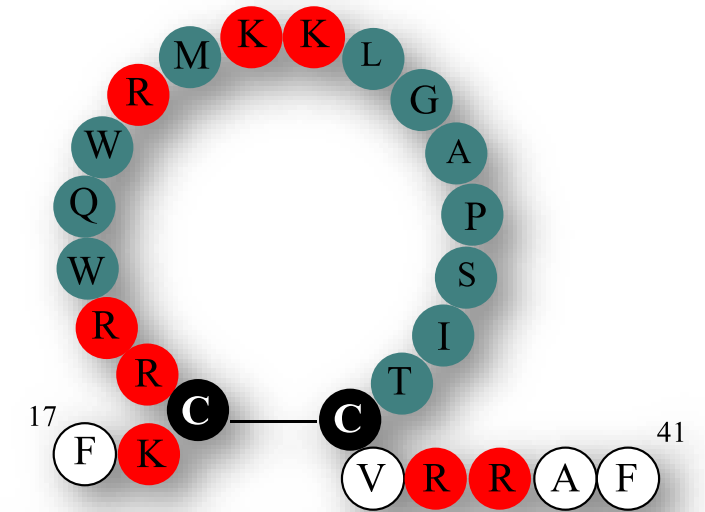
LACTOFERRICINA BOVINA

REGIÓN N-
TERMINAL

LACTOFERRINA BOVINA

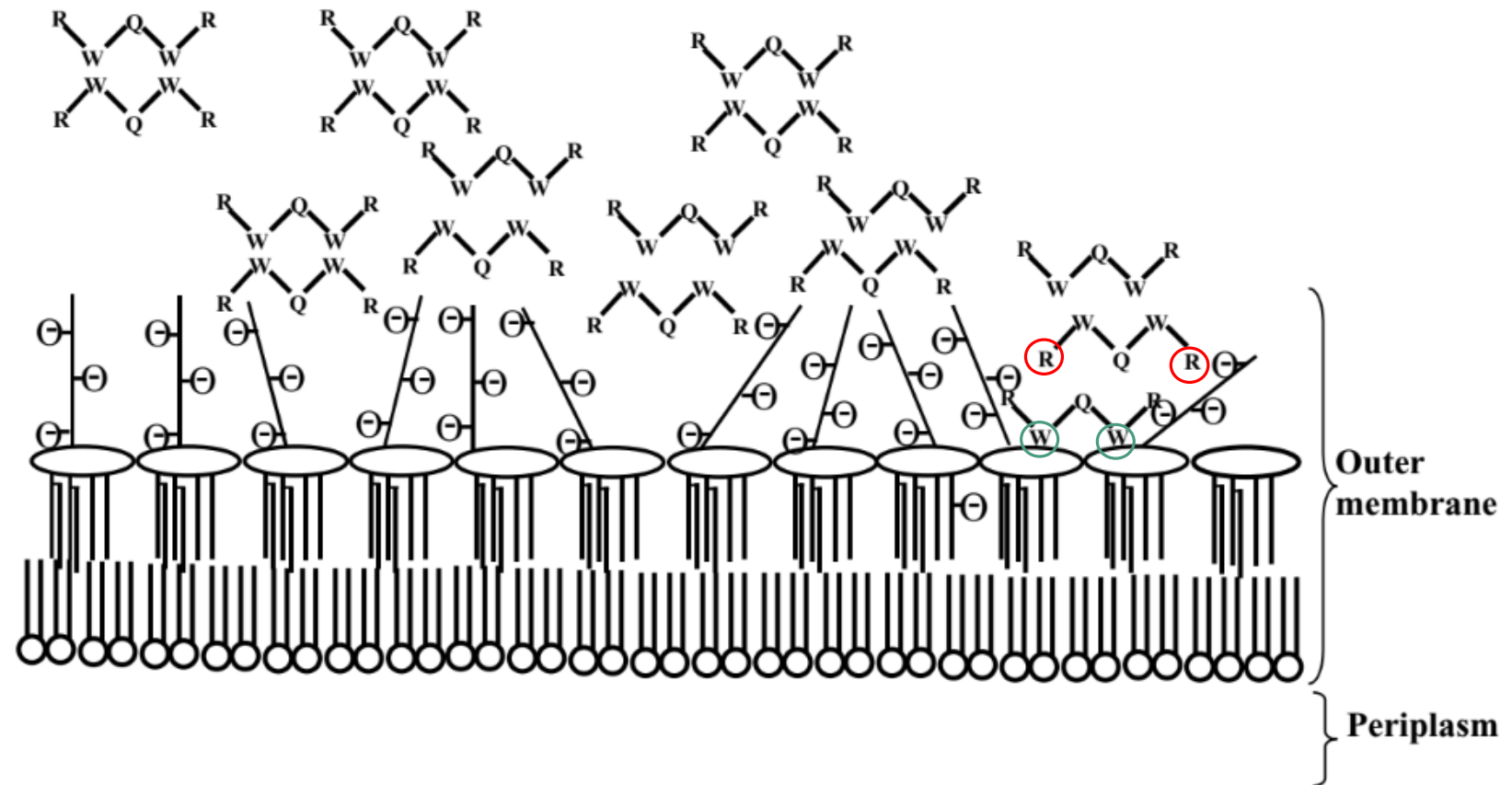
HIDRÓLISIS
PEPSINA GÁSTRICA

¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹



Estructura de LfcinB

MECANISMO DE ACCIÓN PROPUESTO DEL MOTÍVO MÍNIMO DE LfcinB



Carácter catiónico: Unión a ácido teicoico (Gram positivas) y lipopolisacáridos (Gram negativas)

ESTUDIOS DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN SAMP

Código del Péptido	Secuencia del Péptido	CMI (μM)	CMB (μM)	Cepa	% Hemólisis
Lfcin B (20-25)	RRWQWR	203	203	<i>E. coli</i> 25922	1
		203	>203	<i>P. aeruginosa</i> 27853	
		203	>203	<i>S. aureus</i> 25923	
Lfcin B (20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ K-Ahx	6	11	<i>E. coli</i> 25922	1-4
		23	91	<i>P. aeruginosa</i> 27853	
		91	91	<i>S. aureus</i> 25923	
LfcinB (20-25) ₄	((RRWQWR) ₂ K-Ahx-C) ₂	4-22	4-22	<i>E. coli</i> 25922	14-22
		11	22	<i>P. aeruginosa</i> 27853	
		22	44	<i>S. aureus</i> 25923	
LfcinB (21-25) _{pal}	RWQWRWQWR	17-27	34	<i>E. coli</i> 25922	7-19
		67	135	<i>P. aeruginosa</i> 27853	
		135	>135	<i>S. aureus</i> 25923	

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Péptido	Secuencia	CMI (μM)	Cepa
LFB-RW	RRWWWRRRW	8.8	<i>E. coli</i> ATCC 25922
LFB-KW	KKWWWKWKKW	7.2	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Tritrp3-Arg	VRRFAWWWAFLRR	2	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Tritrp3-Lys	VKKFAWWWAFLKK	2	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Tritrp8-Arg	VRRFPWWWAFLRR	2-4	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Tritrp8-Lys	VKKFPWWWAFLKK	4	<i>E. coli</i> ATCC 25922

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Péptido	Secuencia	Concentración del péptido ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Hemólisis
Tritrpticin	VRRFPWWWPFLRR	100	37
TRK	VKKFPWWWPFLKK	100	0
SYM11	RRFPWWWPFR	100	24
SYM11KK	KKFPWWWPFR	100	0

Pregunta Problema

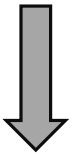
Disminuir costos

RRWQWR

(RRWQWR)₂K-Ahx

(RRWQWR)₂K-Ahx-C₂

RWQWRWQWR



KKWQWK

(KKWQWK)₂K-Ahx

(KKWQWK)₂K-Ahx-C₂

KWQWKWQWK



Afectar la actividad
antibacteriana

Reducir la actividad
hemolítica

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la actividad antibacteriana de péptidos derivados de LfcinB(20-25) que presentan sustituciones de Arginina por Lisina, contra las cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Objetivos específicos

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los péptidos sintéticos contra las cepas *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- Calcular la actividad hemolítica de los péptidos sintéticos derivados de LfcinB.
- Realizar la curva de letalidad para el péptido análogo que presente mayor actividad antibacteriana y menor actividad hemolítica contra las cepas ATCC mencionadas.

PÉPTIDOS

Código	Secuencia
LfcinB(20-25)	RRWQWR
LfcinB(20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ K-Ahx
LfcinB(20-25) ₄	(RRWQWR) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂
LfcinB(21-25) _{pal}	RWQWRWQWR

Código	Secuencia
(R->K) LfcinB(20-25)	KKWQWK
(R->K) LfcinB(20-25) ₂	(KKWQWK) ₂ K-Ahx
(R->K) LfcinB(20-25) ₄	(KKWQWK) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂
(R->K) LfcinB(21-25) _{pal}	KWQWKWQWK

Metodología

ETAPA 1

Actividad Antibacteriana
CMI y CMB

TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

ETAPA 2

Actividad Hemolítica

KKWQWK

(KKWQWK)₂K-Ahx

(KKWQWK)₄K₂-Ahx₂-C₂

KWQWKWQWK

ETAPA 3

Curvas de Letalidad

(KKWQWK)₂K-Ahx → -*Escherichia coli* ATCC 25922
-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

(KKWQWK)₄K₂-Ahx₂-C₂ → -*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

ETAPA 1

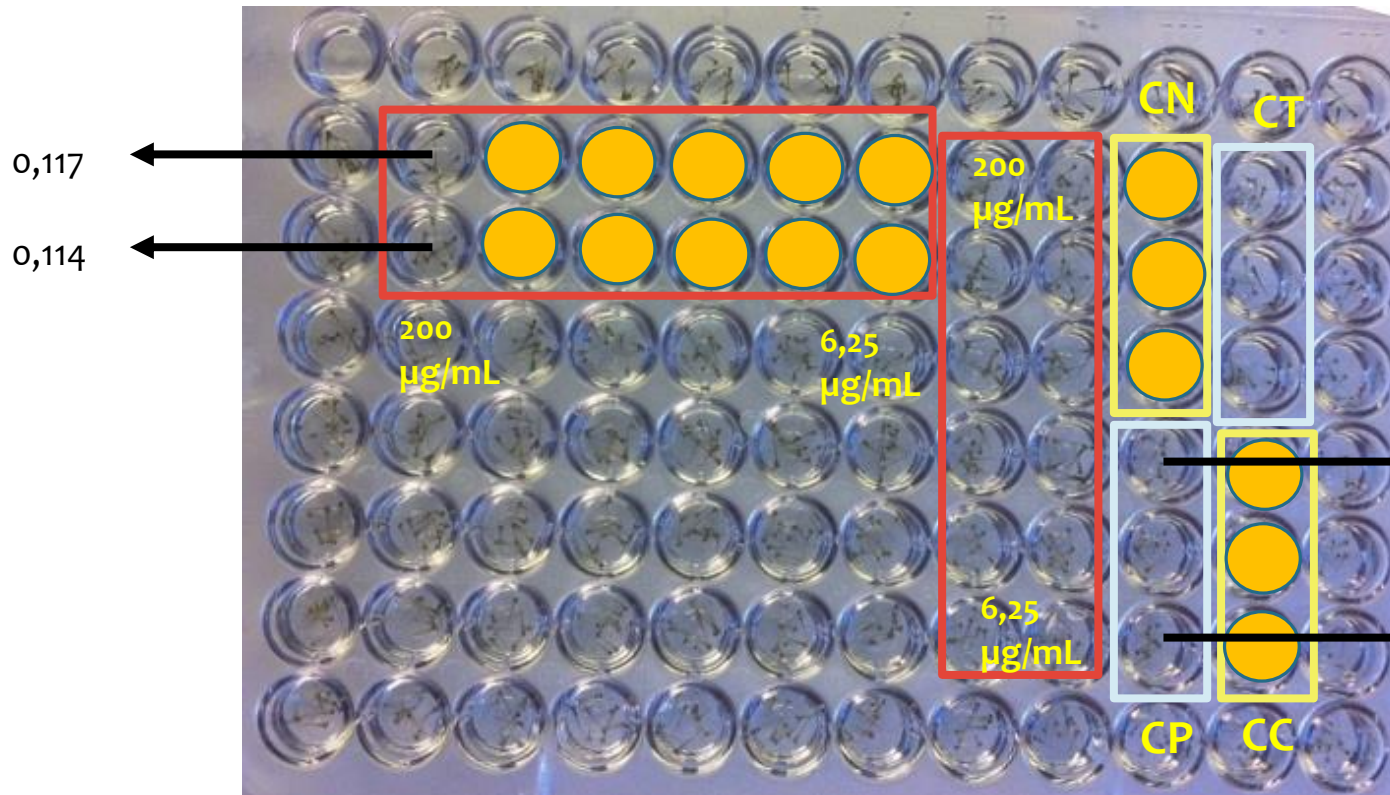
OBJETIVO 1:

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los péptidos sintéticos contra las cepas *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Metodología

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12,5 µg/mL	6,25 µg/mL	Control (+)	Control (-)	CT	CC
Rep 1	0,117	0,883	0,907	0,967	0,956	0,963	0,129	0,792	0,115	0,941
Rep 2	0,114	0,882	0,913	0,959	0,940	0,971	0,140	0,792	0,119	0,951



Control Técnica (CT): Caldo MH + Agua Peptonada
Control Crecimiento (CC): Caldo MH + inóculo
Control Positivo (+): Caldo MH + Inóculo + Antibiótico
Control Negativo (-): Caldo MH + Inóculo + Agua destilada

CMI: 200 µg/mL

Metodología

CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

Agitar la placa multipozos

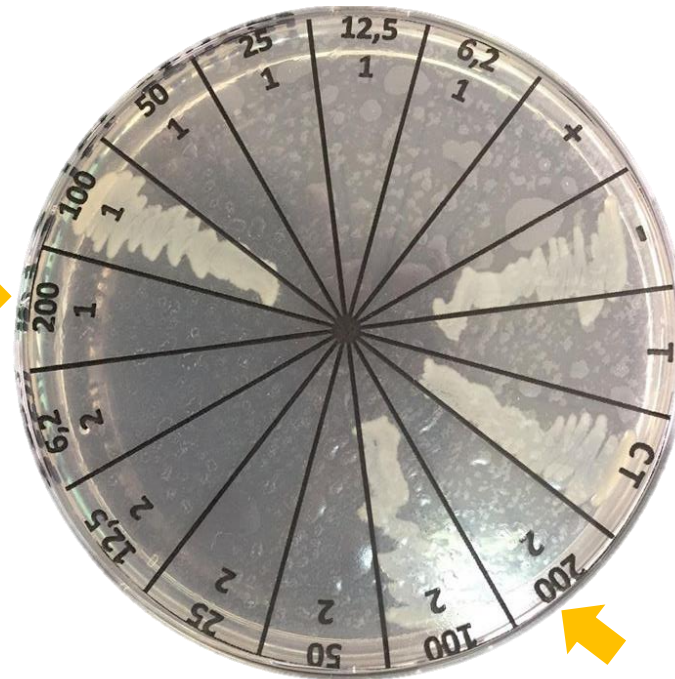


Sembrar con asa estéril las concentraciones donde no se observe crecimiento



Incubar por 24 h a 37°C

CMB: 200 µg/mL



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

E. coli ATCC 25922

Código	Secuencia	CMI / CMB (μ M)
LfcinB (20-25)	RRWQWR	203/>203
(R->K) LfcinB(20-25)	KKWQWK	222/222
LfcinB (20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ K-Ahx	6/11
(R->K) LfcinB (20-25) ₂	(KKWQWK) ₂ K-Ahx	24/24
LfcinB (20-25) ₄	(RRWQWR) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	11/11
(R->K) LfcinB (20-25) ₄	(KKWQWK) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	47/47
LfcinB (21-25) _{pal}	RWQWRWQWR	17/34
(R->K) LfcinB (21-25) _{pal}	KWQWKWQWK	36/36

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

P. aeruginosa ATCC 27853

Código	Secuencia	CMI / CMB (μM)
LfcinB (20-25)	RRWQWR	203/>203
(R->K) LfcinB(20-25)	KKWQWK	>222/>222
LfcinB (20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ -K-Ahx	23/91
(R->K) LfcinB (20-25) ₂	(KKWQWK) ₂ -K-Ahx	48/95
LfcinB (20-25) ₄	(RRWQWR) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	11/22
(R->K) LfcinB (20-25) ₄	(KKWQWK) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	47/47
LfcinB (21-25) _{pal}	RWQWRWQWR	67/135
(R->K) LfcinB (21-25) _{pal}	KWQWKWQWK	143/143

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

<i>S. aureus</i> ATCC 25923		
Código	Secuencia	CMI / CMB (μ M)
LfcinB (20-25)	RRWQWR	203/>203
(R->K) LfcinB(20-25)	KKWQWK	>222/>222
LfcinB (20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ -K-Ahx	91/91
(R->K) LfcinB (20-25) ₂	(KKWQWK) ₂ -K-Ahx	>95/>95
LfcinB (20-25) ₄	(RRWQWR) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	22/44
(R->K) LfcinB (20-25) ₄	(KKWQWK) ₄ K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	47/47
LfcinB (20-25) _{pal}	RWQWRWQWR	135/>135
(R->K) LfcinB (20-25) _{pal}	KWQWKWQWK	143/>143

Conclusión Etapa 1

- La actividad antibacteriana de los péptidos sustituidos con Lys se mantuvo, al comparar los resultados de CMI/CMB de los péptidos originales, con respecto a los resultados de sus análogos.

Péptido	CMI/CMB (μM)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
LfcinB (20-25)	203/>203	203/>203	203/>203
(R->K) LfcinB (20-25)	222/222	>222/>222	>222/>222
LfcinB (20-25) ₂	6/11	23/91	91/91
(R->K) LfcinB (20-25) ₂	24/24	48/95	>95/>95
LfcinB (20-25) ₄	11/11	11/22	22/44
(R->K) LfcinB (20-25) ₄	47/47	47/47	47/47
LfcinB (21-25) _{pal}	17/34	67/135	135/>135
(R->K) LfcinB (21-25) _{pal}	36/36	143/143	143/>143

ETAPA 2

OBJETIVO 2:

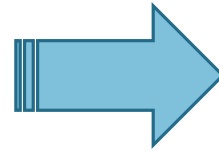
Calcular la actividad hemolítica de los péptidos sintéticos derivados de LfcinB.

Metodología

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA



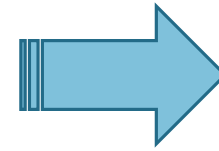
Sangre periférica



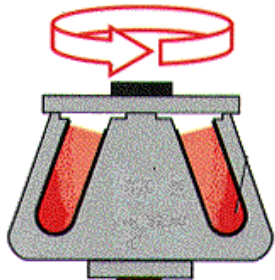
100 µL de eritrocitos (4% de hematocrito)



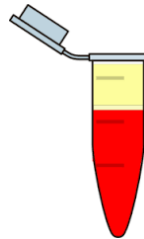
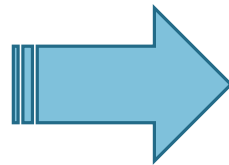
100 µL del péptido (200 hasta 6,2 µg/mL)



incubar a 37°C por 2h



Centrifugar a 2500 rpm durante 5 min



Medir absorbancia del sobrenadante (540 nm)



$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(\text{Abs Péptido} - \text{Abs NaCl})}{(\text{Abs Agua destilada} - \text{Abs NaCl})} * 100$$

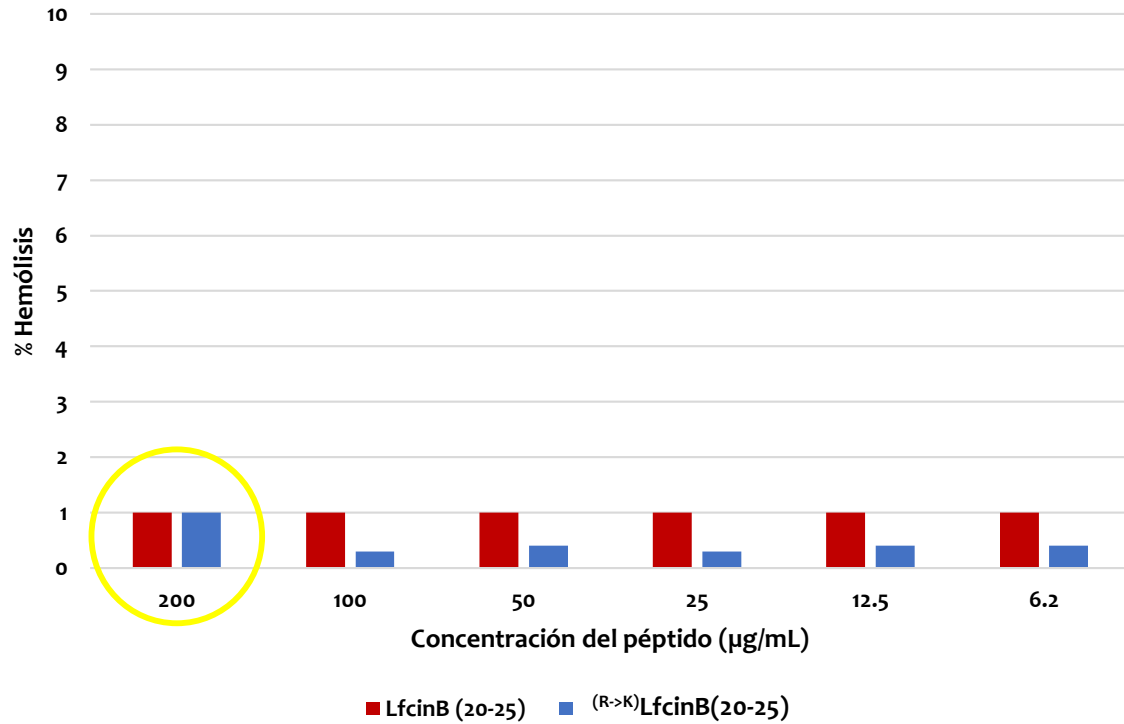
Controles:

- ✓ Solución Salina 0,9%
- ✓ Agua destilada

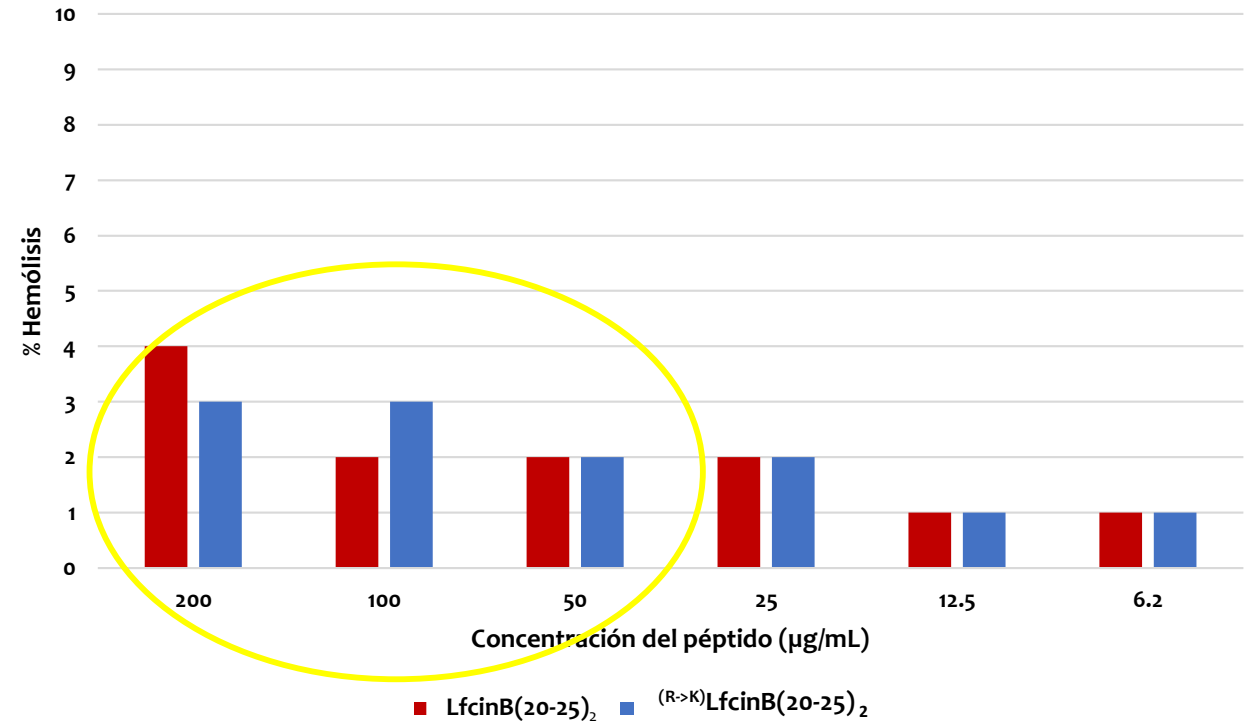
Resultados

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Monómeros

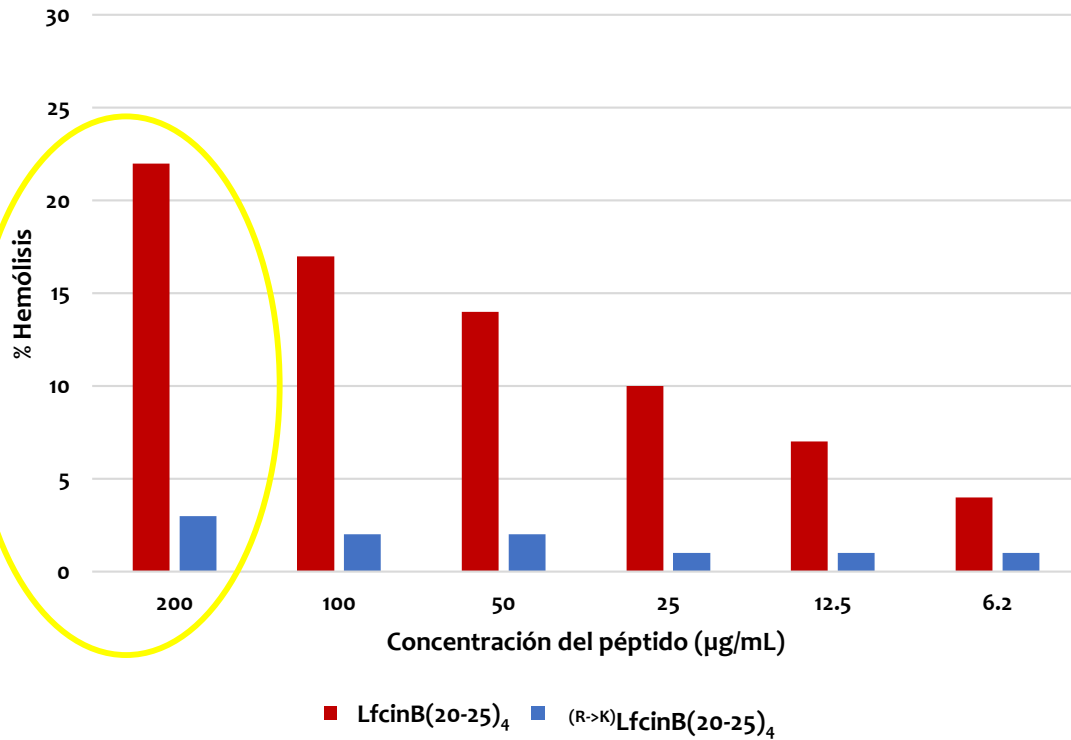


Dímeros

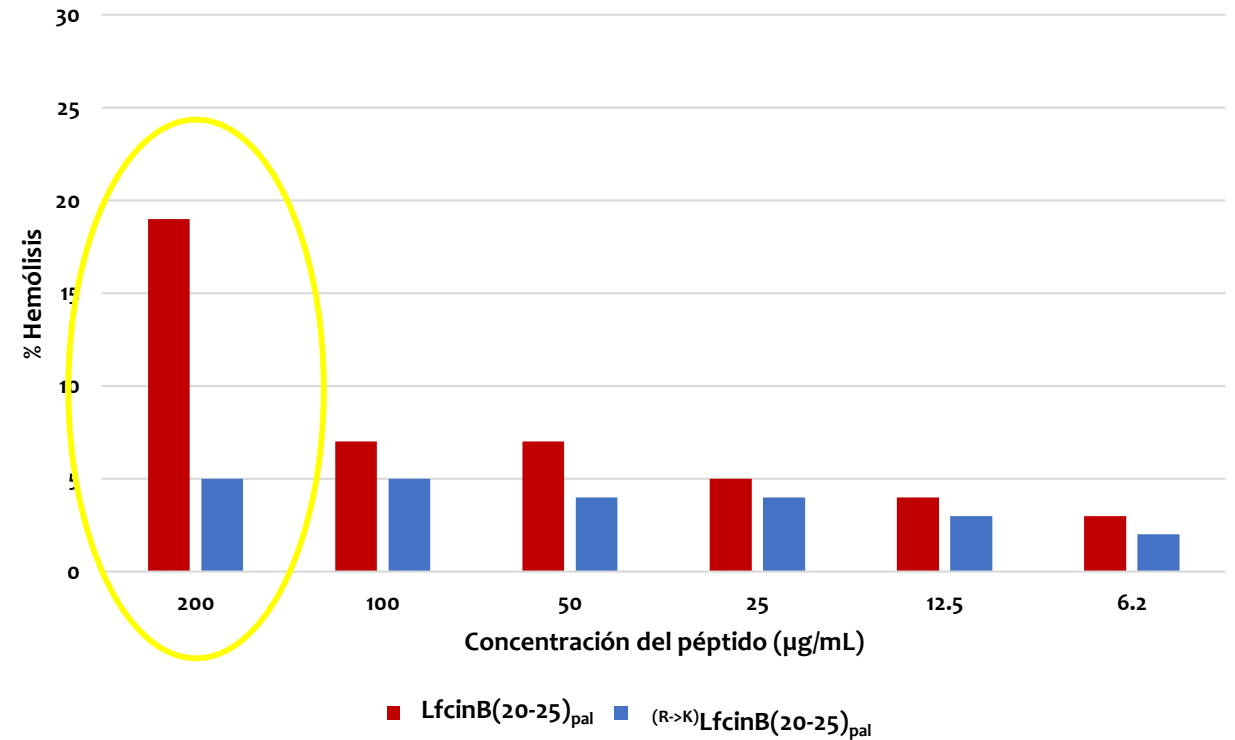


ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Tetrámeros



Palíndromos



ETAPA 3

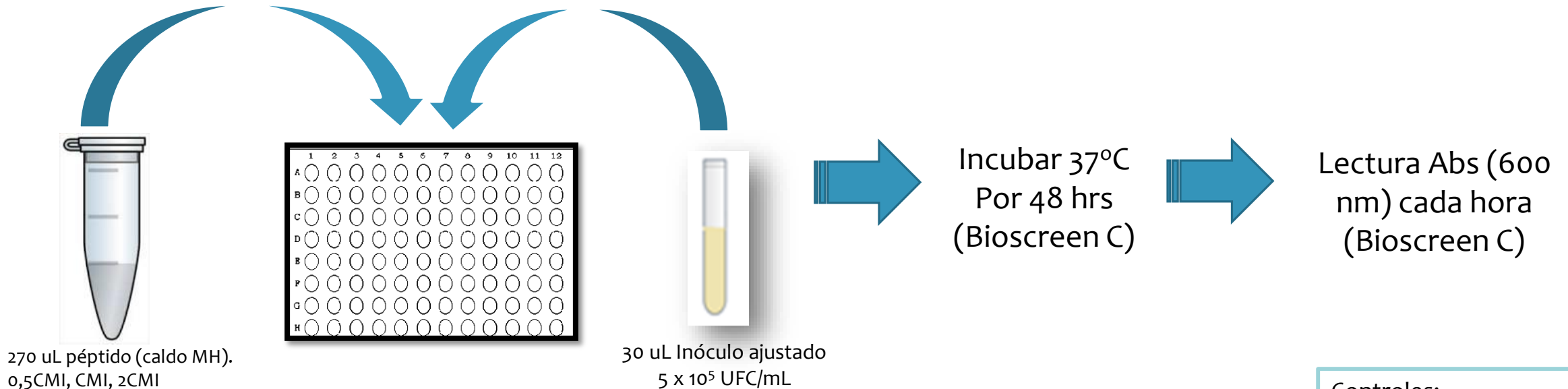
OBJETIVO 3:

Realizar la curva de letalidad para el péptido análogo que presente mayor actividad antibacteriana y menor actividad hemolítica contra las cepas ATCC mencionadas.

CURVAS DE LETALIDAD O MUERTE

(KKWQWK)₂K-Ahx → -*Escherichia coli* ATCC 25922
-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

(KKWQWK)₄K₂-Ahx₂-C₂ → -*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

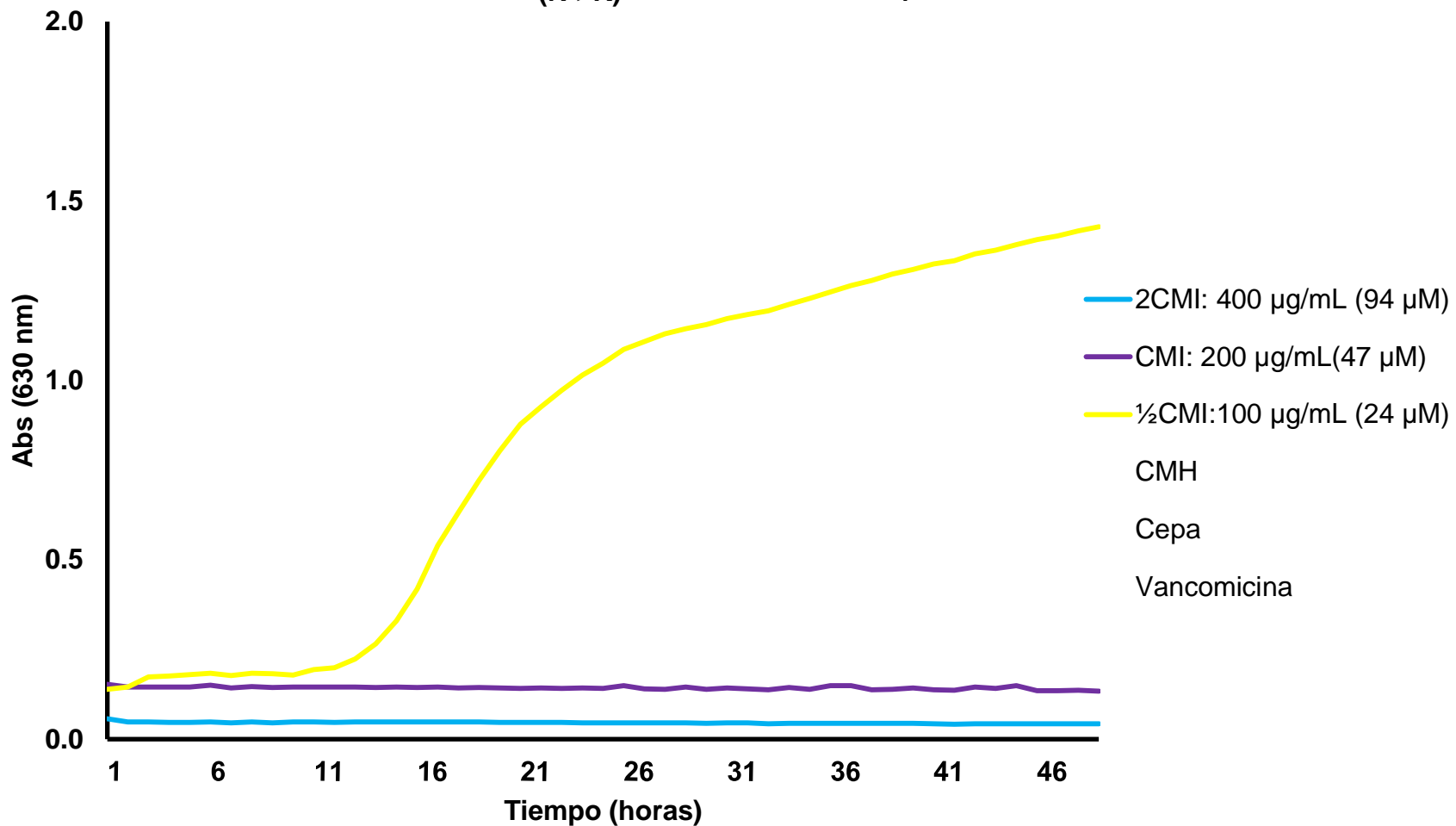


Controles:
✓ Caldo MH
✓ Cepa

Resultados

Tetrámero con sustitución de Arginina por Lisina, contra cepa ATCC de *S.aureus* 25923

(R->K)LfcinB (20-25)₄



Resultados

Péptido	Cepa ATCC	Efecto (μM)	
		Bacteriostático	Bactericida
$(\text{R}\rightarrow\text{K})\text{LfcinB}(20-25)_2$	<i>E. coli</i> 25922	24	-
$(\text{R}\rightarrow\text{K})\text{LfcinB}(20-25)_2$	<i>P. aeruginosa</i> 27853	24	48
$(\text{R}\rightarrow\text{K})\text{LfcinB}(20-25)_4$	<i>S. aureus</i> 25923	24	47

Conclusiones

PÉPTIDOS PROMISORIOS

Bacterias Gram Negativas

(R->K)LfcinB (20-25)₂
(R->K)LfcinB (20-25)₄
(R->K)LfcinB (20-25)_{pal}

Amplio Espectro

(R->K)LfcinB (20-25)₄

% hemólisis

Bacteriostáticos y bactericidas



Pregunta
Problema





VII Jornada de Investigación Grupo de enfermedades Infecciosas

Noviembre 25 de 2019
Auditorio Félix Restrepo – Sala A

Fecha límite de resúmenes

1 Noviembre de 2019

claudia.cuervo@javeriana.edu.co

Inscripciones On-line hasta

15 Noviembre de 2019

<https://forms.gle/EUq4TGWqTxcSGCBQ9>



Bacterias



Hongos



Parásitos



Virus

AGRADECIMIENTOS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA
VICERRECTORÍA ACADÉMICA

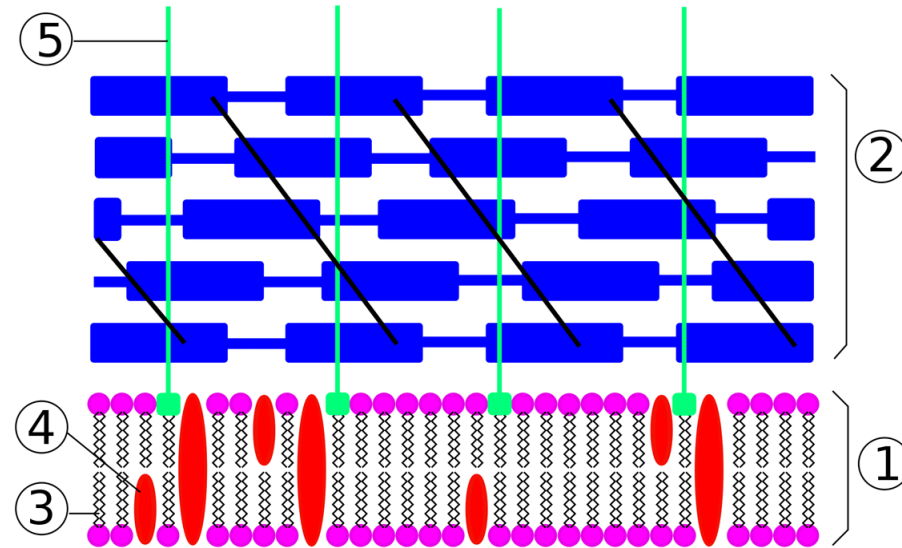


¡GRACIAS!



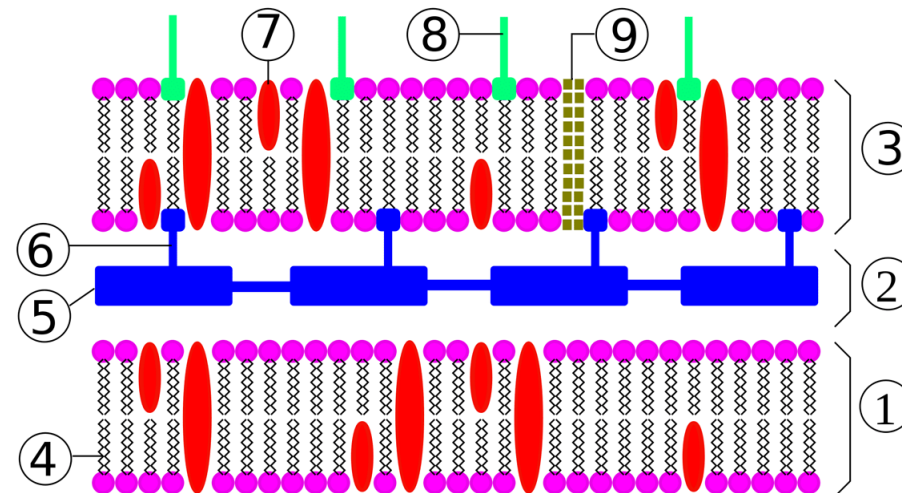
MEMBRANA DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS

Gram
positiva



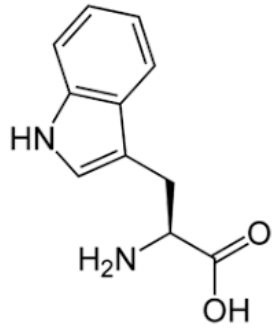
- 1 - Membrana citoplasmática
- 2 - Peptidoglicano
- 3 - Fosfolípido
- 4 - Proteína
- 5 - Ácido lipoteicoico

Gram
negativa

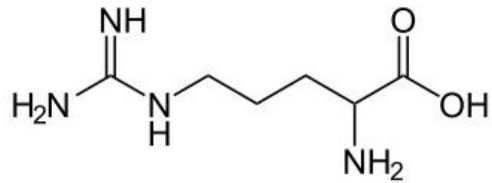


- 1 - Membrana interna
- 2 - Periplasma
- 3 - Membrana externa
- 4 - Fosfolípido
- 5 - Peptidoglicano
- 6 - Lipoproteína
- 7 - proteína
- 8 - lipopolisacárido
- 9 - porinas

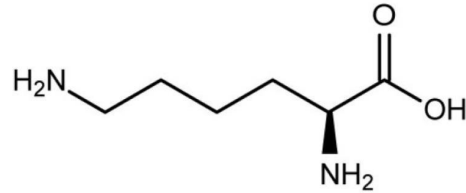
ESTRUCTURA DE LOS AMINOÁCIDOS



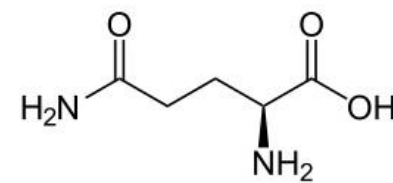
Triptófano (W)



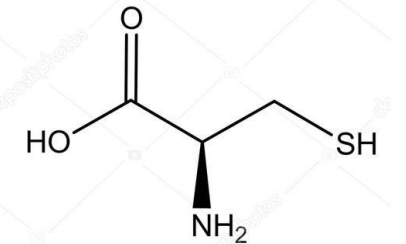
Arginina (R)



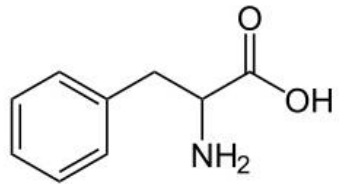
Lisina (K)



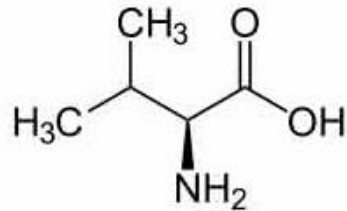
Glutamina (Q)



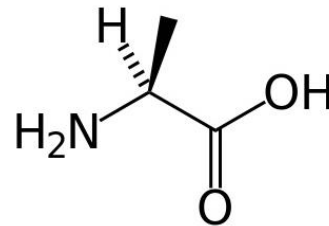
Cisteína (C)



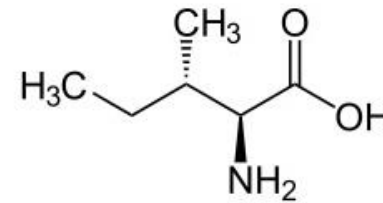
Fenilalanina (F)



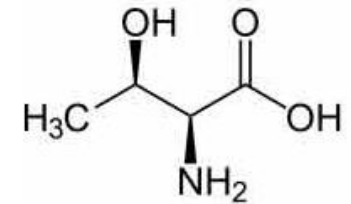
Valina (V)



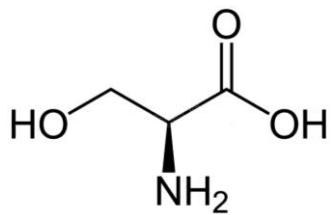
Alanina (A)



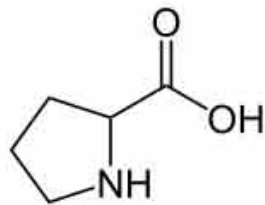
Isoleucina (I)



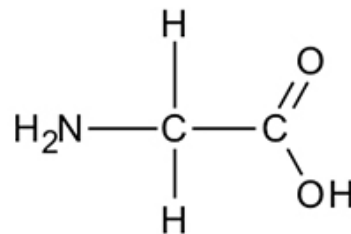
Treonina (T)



Serina (S)



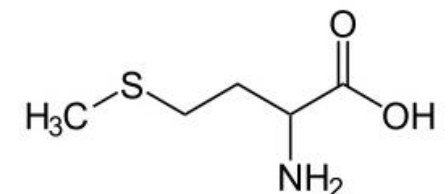
Prolina (P)



Glicina (G)

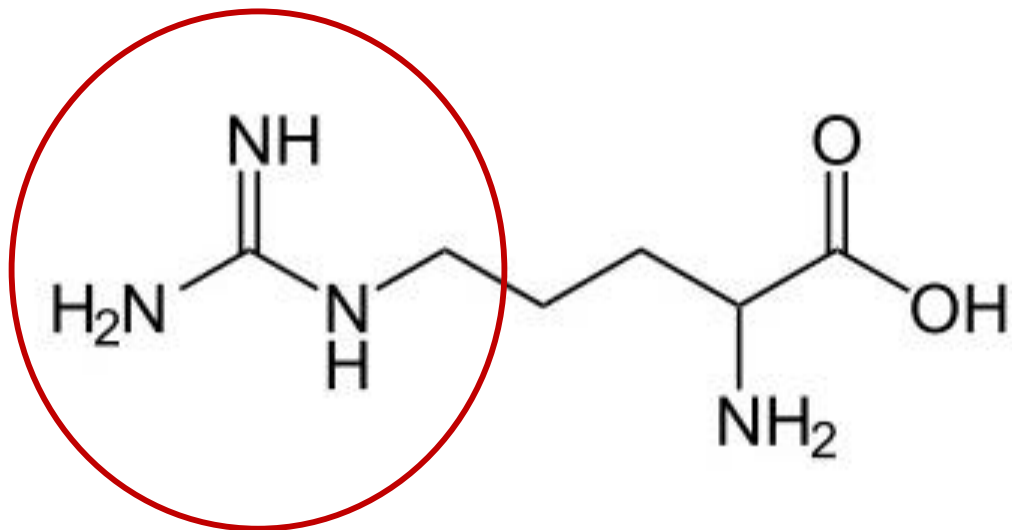


Leucina (L)



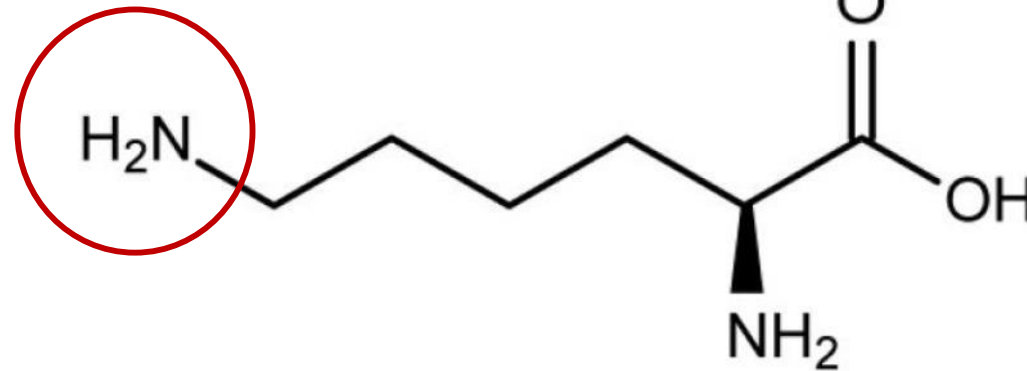
Metionina (M)

Guanidino



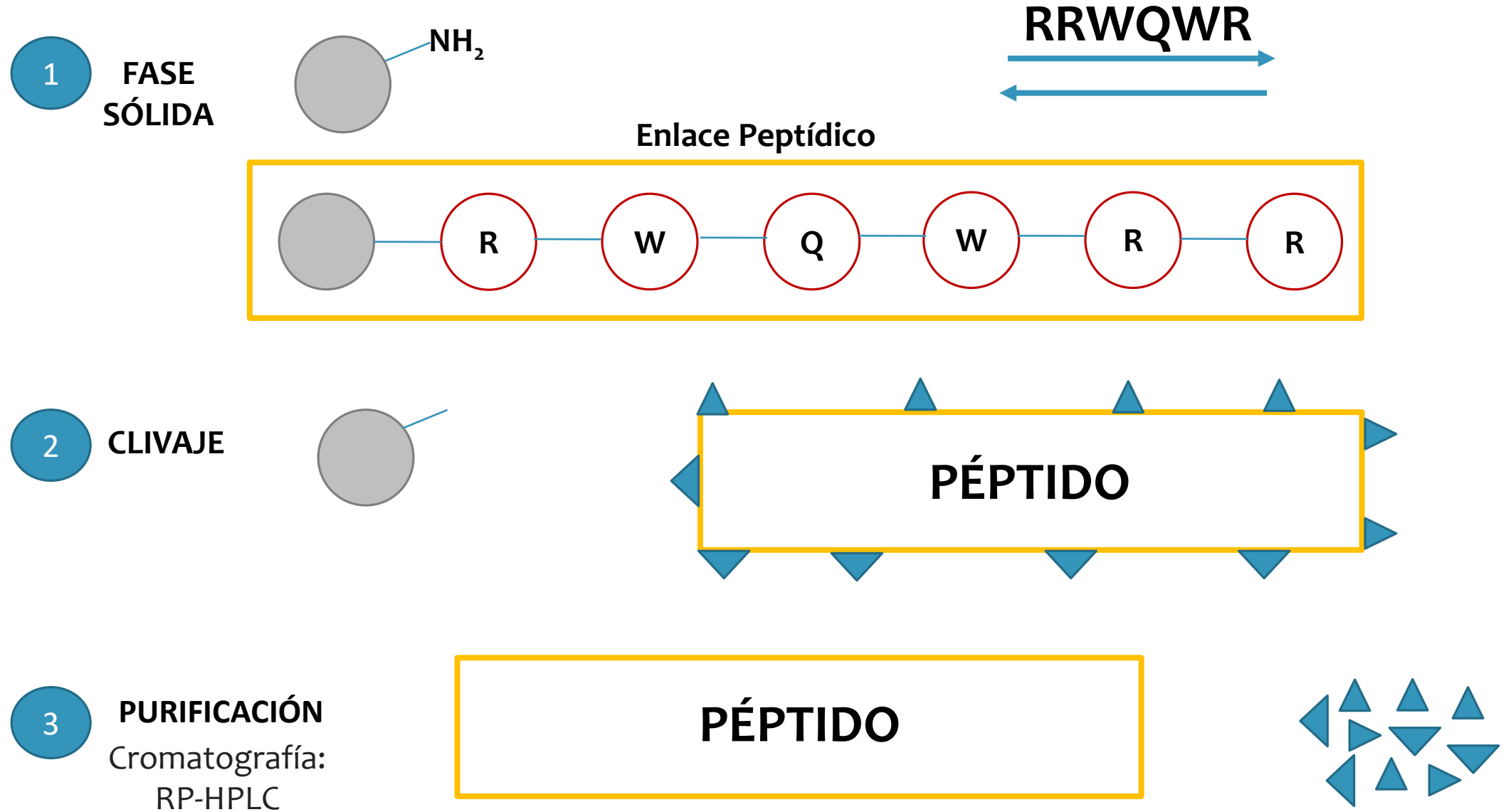
Arginina

Amino



Lisina

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS



Peptide Mass Calculator

Use this handy calculator to work out the mass of your amino acid sequence. It handles n-terminal modifications, oxidized cysteines and phosphorylated amino acids.

Type a * following an S, T or Y for phosphorylated amino acids.

Sequence

Options

- Oxidize cysteines
 C-Amide

N-Terminal Modifications

- None
 N-Acetyl
 N-Biotin
 N-Fluorescein

[clear sequence](#)

Results

Sequence (4 amino acids)
RLLR
Mass
555.708 (av.)
555.386 (mono.)

Characteristics
* Cys reduced
* N-term free
* C-term amide

Who are PPR?

[Find out more about us.](#)

Our service

If you have any questions please check our [FAQ page](#).



In-house synthesis

All peptides ordered from us are synthesized by us in our laboratories. We do not outsource any peptide synthesis.
→ [Frequently asked questions](#)

Jobs with PPR

We are always keen to hear from prospective candidates.
→ [Submit a CV](#)

$$\text{CMI } \mu\text{g/mL} \times \frac{1000 \text{ mL}}{\text{PM } \mu\text{mol}}$$

<http://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>

Ciprofloxacina

E. coli 25922: 0,2 µg/mL

P. aeruginosa 27853: 0,4 µg/mL

Vancomicina

S. aureus 25923: 3.2 µg/mL

AJUSTE DE INÓCULO 5×10^5 UFC/mL

***E. coli* 25922**

$$Y = 0,0101 + 0,0131$$

***P. aeruginosa* 27853**

$$Y = 0,0064 + 0,0053$$

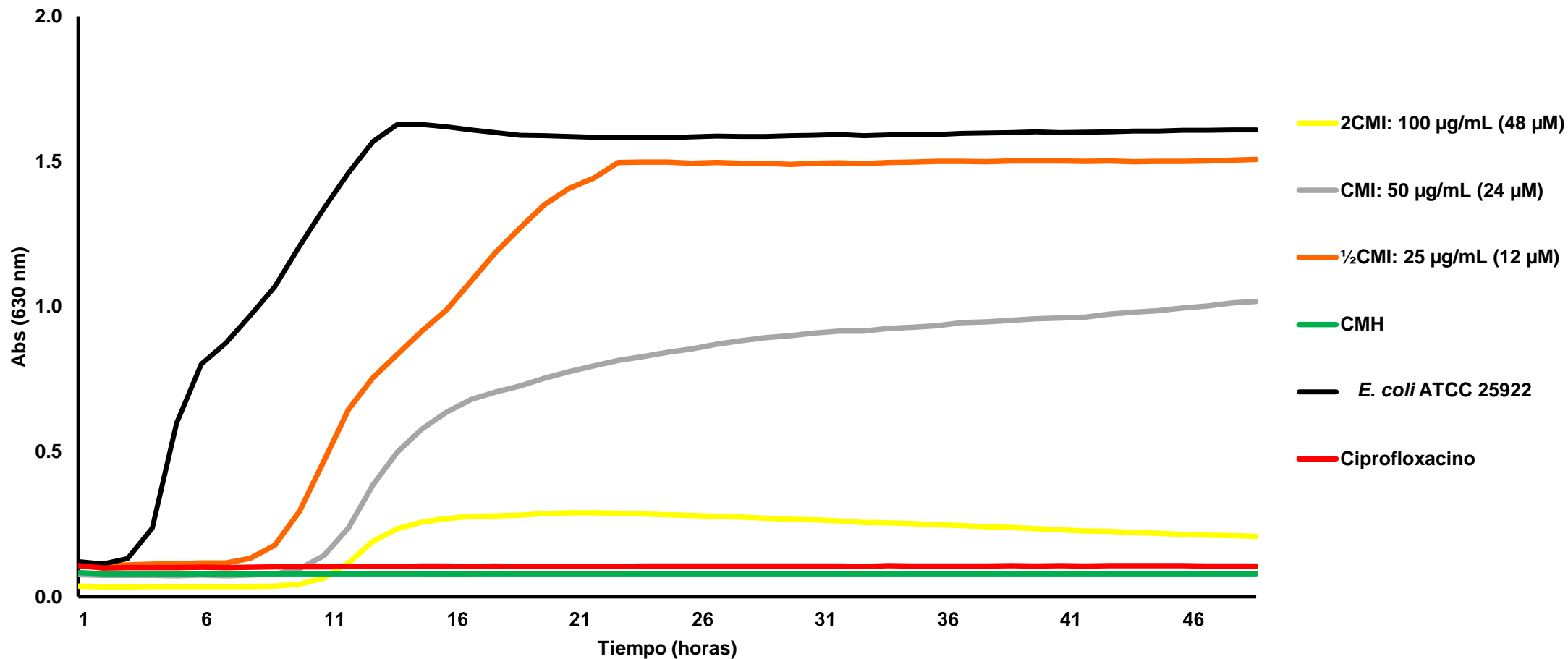
***S. aureus* 25923**

$$Y = 0,0071 + 0,0176$$

CURVAS DE LETALIDAD

Dímero con sustitución de Arginina por Lisina, contra cepa ATCC de *E. coli* ATCC 25922

(R->K)LfcinB (20-25)₂



Dímero con sustitución de Arginina por Lisina, contra cepa ATCC de *P.aeruginosa* 27853

(R->K)LfcinB (20-25)₂

