

PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA PIEL DE *BOANA PULCHELLA* Y SUS DERIVADOS ANÁLOGOS

Silvana Aguilar⁽¹⁾, Natalia Lorena Cancelarich⁽¹⁾, Néstor Guillermo Basso⁽²⁾, Luis Orlando Pérez⁽³⁾,
José R. Leite⁽⁴⁾, Daniel Moreira⁽⁴⁾, Eder Barbosa Alves⁽⁵⁾, Mariela Mirta Marani^(1,*)
*mmarani@cenpat-conicet.gob.ar

- (1) IPEEC – CONICET, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Puerto Madryn, Argentina.
(2) IDEAus – CONICET, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Puerto Madryn, Argentina.
(3) IPCSH – CONICET, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Puerto Madryn, Argentina.
(4) Área de Morfología, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasil
(5) Laboratorio de Espectrometría de Massa, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnología, Brasil; Laboratorio de Síntese e Análise de Biomoléculas, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasil

CONTEXTO

La línea de investigación presentada forma parte del proyecto “Péptidos bioactivos y sus derivados análogos: mejora química de su potencial como antimicrobianos y/o antioxidantes para su aplicación tecnológica” (PICT N°2278/2017) dirigido por la Dra. Mariela Marani. La Dra. Marani es directora del Grupo de Bioprospección y Aplicaciones Biotecnológicas de Péptidos (BIAPEP), que se enfoca en la identificación de péptidos bioactivos de anfibios desde el año 2011, en el Instituto Patagónico para el Estudio de los Ecosistemas Continentales (IPEEC – CONICET). Dicho grupo se relaciona con el IPEEC al plantear que la biodiversidad de los ecosistemas patagónicos podría ofrecer soluciones a problemas actuales, como lo es la resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos convencionales, por lo que se enfoca en el estudio de su potencial biotecnológico y la puesta en valor de la biodiversidad que lo compone.

RESUMEN

La rápida aparición microorganismos resistentes a fármacos ha impulsado la prospección de agentes antibióticos alternativos. En este sentido, los péptidos antimicrobianos (PAMs) son de suma importancia. Los anuros son una rica fuente de PAMs, aunque su potencial terapéutico es limitado por su toxicidad. El diseño racional de PAMs consiste en modificaciones estratégicas en la secuencia primaria de un péptido natural, buscando optimizar la actividad biológica de los mismos. En el presente trabajo se identificaron y caracterizaron 5 péptidos de la piel de *Boana pulchella*, con características típicas de PAMs. Los mismos fueron sintetizados químicamente y se evaluó la actividad antimicrobiana de tres de ellos, contra las cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, observando inhibición en el crecimiento de dichos microorganismos. Con el objetivo de mejorar su potencial terapéutico se realizó un exhaustivo análisis de la relación estructura-actividad (SAR). Se diseñaron y analizaron análogos *in silico* obteniendo estructuras con un mayor espectro de acción y una disminución significativa en su actividad hemolítica. Estos péptidos serán sintetizados para la posterior evaluación experimental de su actividad antimicrobiana, hemolítica y citotóxica.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos, *Boana pulchella*, análogos.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es posiblemente la mayor amenaza a la salud que enfrentará la humanidad en los próximos años. La falta de alternativas es una de las preocupaciones dentro del sector salud y por lo tanto una preocupación a nivel mundial. En 2017, la OMS anunció una lista de prioridades de bacterias resistentes a los antibióticos con el objetivo de facilitar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de antibióticos novedosos y eficientes para tratar las infecciones causadas por estos patógenos (OMS, 2016).

Los productos naturales son una fuente importante de nuevos antibióticos (Ling et al., 2015, Ng et al., 2016, Ramchuran et al., 2018). Los péptidos antimicrobianos (PAMs) han demostrado ser unas moléculas muy versátiles. Forman parte de la inmunidad innata de diversos organismos y poseen una distribución muy amplia en la naturaleza, siendo la piel de anfibios una de las fuentes más abundantes de PAMs (Mahlpuu et al., 2016). Dada su alta variabilidad y debido a que cada especie presenta un único arsenal, la evaluación de péptidos bioactivos provenientes de anfibios presenta una oportunidad única, con un gran potencial biotecnológico para el hallazgo de nuevos antimicrobianos (Marani et al., 2017, Marani et al. 2015). En las últimas décadas, los péptidos han superado a las moléculas pequeñas como agentes terapéuticos debido a su amplia gama de aplicaciones, alta actividad biológica contra una amplia variedad de patógenos, incluyendo bacterias resistentes a antibióticos y alta especificidad (Seong-Cheol Park et al., 2011, Wetzler & Hamilton, 2018). Sin embargo, los principales desafíos a superar para se conviertan en fármacos efectivos es su baja biodisponibilidad oral e inestabilidad en condiciones fisiológicas (Abdel Monaim et al., 2018).

La mayoría de los PAMs son catiónicos en la naturaleza, en general presentan una conformación anfipática específica y una estructura secundaria del tipo α -hélice (Conlon et al., 2011). Presentan afinidad por polisacáridos de la pared bacteriana y por los fosfolípidos bacterianos. Sin embargo, la falta de homología en la secuencia de los diferentes PAM sugiere que la estructura

3D y las interacciones fisicoquímicas son más importantes en su función que su estructura primaria. Alteraciones en su secuencia primaria podría mejorar la actividad antimicrobiana de los péptidos mediante la redistribución de las cargas y una mayor afinidad por las membranas microbianas que típicamente presentan superficies aniónicas (Mangoni et al., 2011). Así mismo, modificaciones en los extremos terminales de la molécula han demostrado ser estrategias eficaces para mejorar la estabilidad, al reducir la degradación por proteasas y peptidasas presentes en el suero o en los tejidos (McGregor, 2008).

2. LINEAS DE INVESTIGACION y DESARROLLO

Actualmente se está trabajando con secuencias peptídicas obtenidas a partir de la piel de rana de *Boana pulchella*. Estos PAMs, identificados a partir de técnicas de biología molecular, se sintetizaron químicamente y se está evaluando su actividad antimicrobiana y citotóxica. Además, se está llevando a cabo un análisis de la relación estructura-actividad (SAR) y mejoramiento de la actividad antimicrobiana de dichos péptidos, a través del diseño y caracterización de análogos (estructura, citotoxicidad y estabilidad en suero) para su potencial aplicabilidad.

3. RESULTADOS OBTENIDOS/ ESPERADOS

- Se identificaron y caracterizaron 5 nuevas secuencias peptídicas a partir de la extracción del ARNm de la piel de *Boana pulchella*, y posterior amplificación, clonación y secuenciación de los ADNc específicos. Las secuencias aisladas presentaron carga neta positiva, PM entre 1870 y 1996 Da y estructura 3D teórica de tipo α -hélice anfipática, con altas probabilidades de ser PAMs.
- Se realizó la síntesis manual en fase sólida de los péptidos identificados y se purificaron mediante RP-HPLC.
- Se evaluó la actividad antimicrobiana de tres de ellos, contra las cepas *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (ATCC 29313). Se observó inhibición del crecimiento de dichos microorganismos.
- Se utilizaron las secuencias de los cinco péptidos identificados como base para el diseño de derivados análogos, con el fin de mejorar su *performance* antimicrobiana.
- Las secuencias análogas se analizaron *in silico* y se seleccionaron las que presentaron un mayor espectro de acción (bacterias y hongos) y una disminución significativa en su actividad hemolítica.
- Se continuará con la evaluación la actividad

antimicrobiana de los dos péptidos restantes aislados de la piel de *B. pulchella*, y la actividad hemolítica y citotóxica para los cinco péptidos aislados.

- Los péptidos análogos seleccionados serán sintetizados para su posterior purificación y evaluación experimental de su actividad antimicrobiana, hemolítica y citotóxica.

4. BIBLIOGRAFIA

- Abdel Monaim et al. Taixobactin as a scaffold for unlimited new antimicrobial peptides: SAR study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2018); 26, 2788-2796.
- Conlon J.M. et al. Characterization of antimicrobial peptides in skin secretions from discrete populations of *Lithobates chiricahuensis* (Ranidae) from central and southern Arizona Peptides (2011); 34 664-669.
- Mahlapuu et al. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell. Infect. Microbiol.* (2016); 6 (194), 1-12.
- Mangoni M.L. et al. Structure-Activity Relationship, Conformational and Biological Studies of Temporin L Analogues. *J. Med. Chem.* (2011); 54, 1298–1307.
- Marani M.M. et al. Characterization and biological activities of ocellatin peptides from the skin secretion of the frog *Leptodactylus pustulatus*. *J. Nat. Prod.* (2015); 78 (7), 1495–1504.
- Marani M.M. et al. Thaulin-1: The first antimicrobial peptide isolated from the skin of a Patagonian frog *Pleurodema thaul* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) with activity against *Escherichia coli*. *Gene* (2017); 605, 70-80.
- McGregor. Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Current Opin. Pharmacol.* (2008); 8, 616-619.
- Ng, V. & Chan, W. C., New found hope for antibiotic discovery: lipid II inhibitors. *Chem. Eur. J.* (2016); 22, 12606-12616.
- Organización Mundial de la Salud. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, (2016); s. Geneva, Switzerland.
- Ramchuran et al. In vitro antibacterial activity of teixobactin derivatives on clinically relevant bacterial isolates. *Front. Microbiol.* (2018); doi: 10.3389/fmicb.2018.01535.
- Seong-Cheol Park. The Role of Antimicrobial Peptides in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections and Biofilm Formation. *Int J Mol Sci.* (2011); 12,9 5971–5992.
- Wetzler, M. & Hamilton, P., Peptides as therapeutics. In *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier (2018); pp 215-230.