



Evaluación de la actividad antibacteriana de péptidos sintéticos análogos de la Buforina II contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*



Angie Katherine Hernández Cardona
Bacteriología y Laboratorio clínico

Directores:

MSc. Sandra Mónica Estupiñan Torres (Colegio Mayor de Cundinamarca)

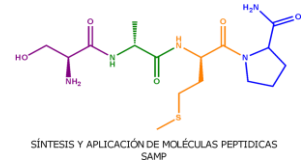
Ph.D. Javier Eduardo García Castañeda (Universidad Nacional de Colombia)

MSc. Hector M. Pineda (Universidad Nacional de Colombia)

2019

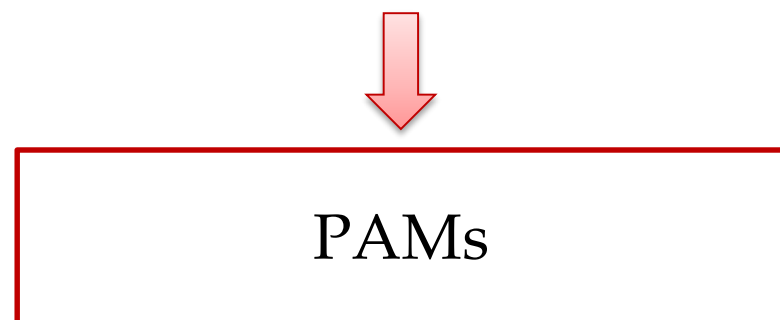


Tabla de contenido



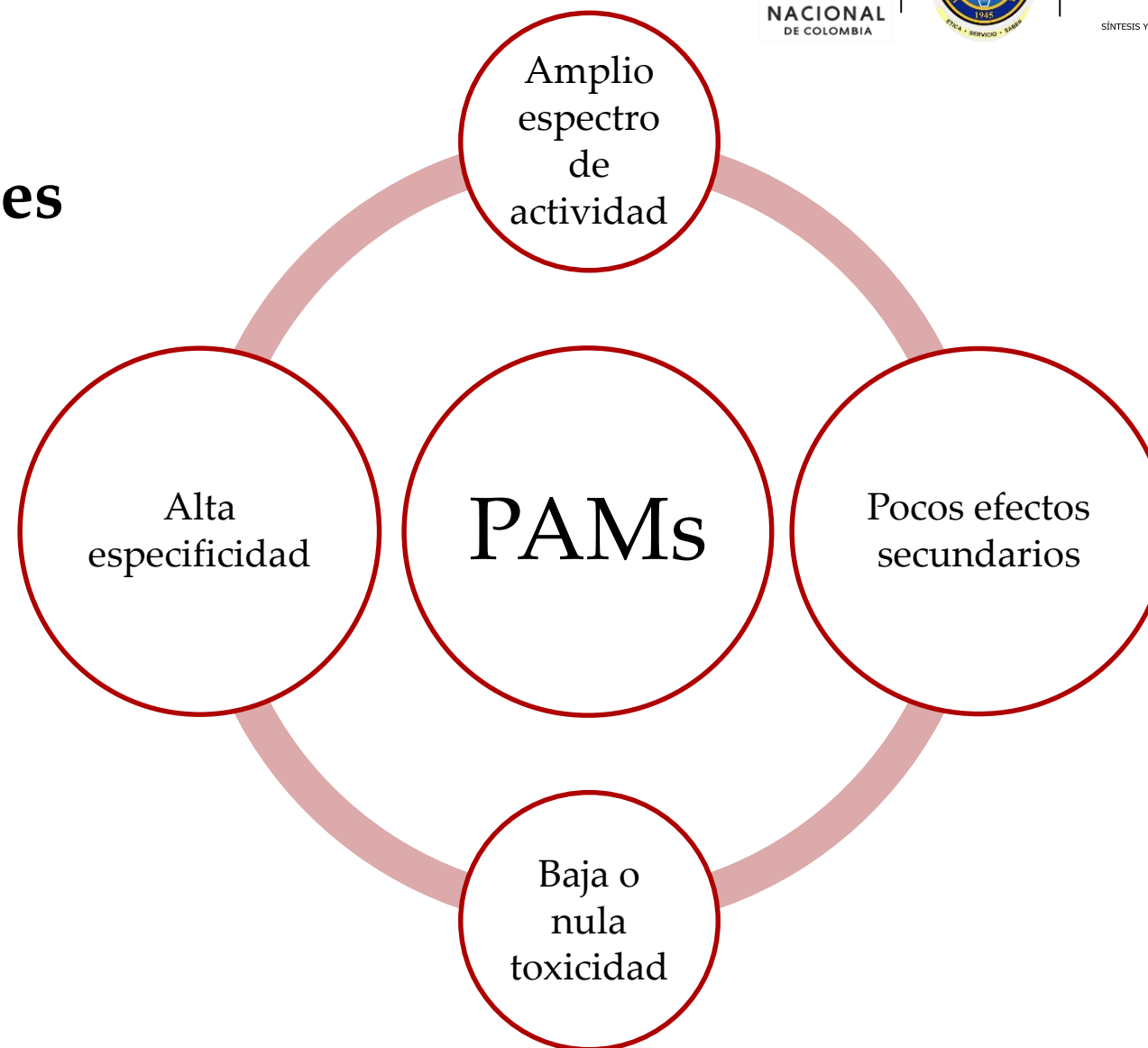
- Introducción
- Planteamiento del problema
- Buforina
- Pregunta problema
- Objetivos
- Metodología
- Resultados
- Conclusiones

Búsqueda de nuevos agentes terapéuticos

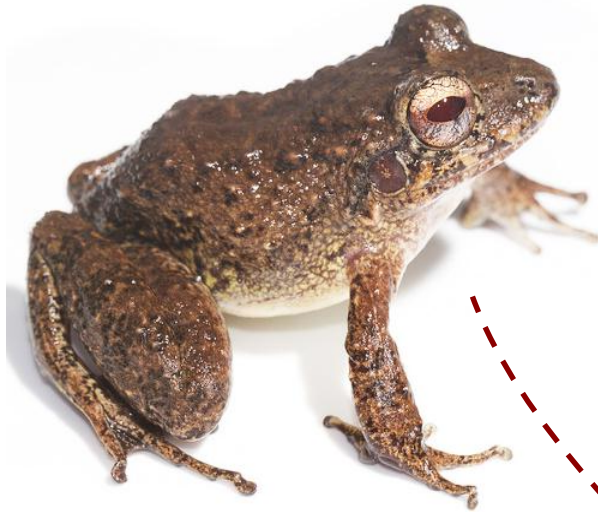


↓

Buforina II

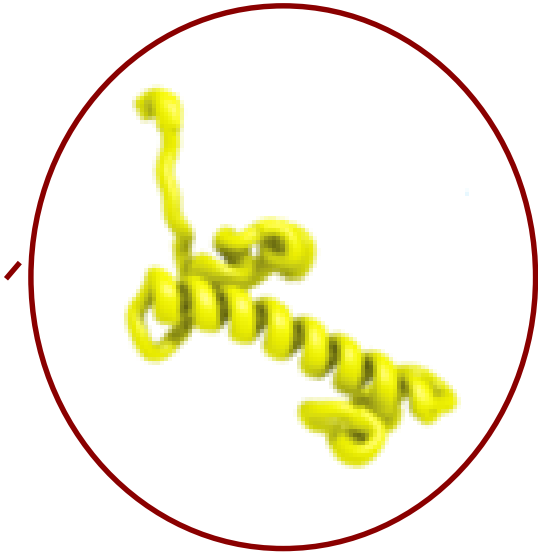
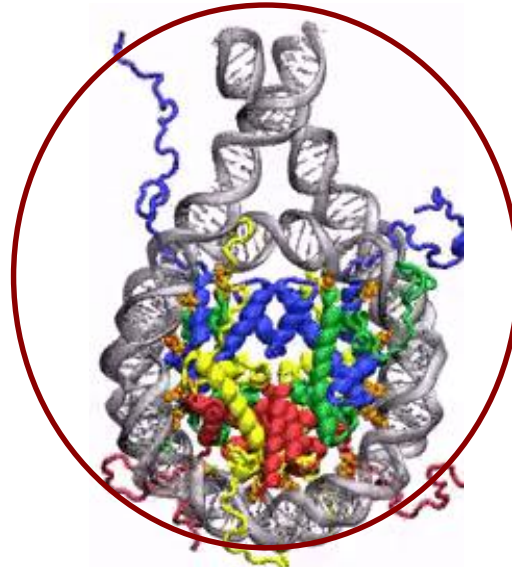


Buforina



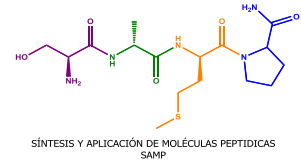
Bufo gargarizans

Octámero de histonas



Histona H2A

Buforina I



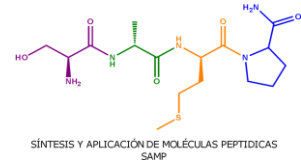
¹AGR GKQGGKVR AKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLR**KGNY³⁹**

BF I
39 aa

¹⁶TRSSRAGLQFPVGRVHRLLR**K³⁶**

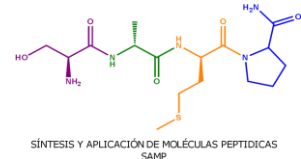
BF II
21 aa

Antecedentes



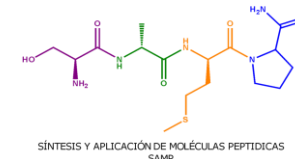
Péptido	Secuencia	<i>E. coli</i> CMI (µg/mL)	<i>S. aureus</i> CMI (µg/mL)
N-terminal H2A	S GRGKQGGK T RAKAKTRSSRAGLQFPVGRVH RLLR KGN Y AERV-	-	-
BFI	A GRGKQGGK V RAKAKTRSSRAGLQFPVGRVH RLLR KGN Y	8	4
BFII	TRSSRAGLQFPVGRVH RLLR K	4	4

Antecedentes



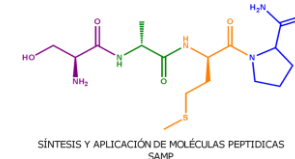
MÓLECULA	SECUENCIA	BACTERIA	CMI µg/mL
BUF (5–21)	RAGLQFPVGRVH RLLRK	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	2 2
BUF (6–21)	AGLQFPVGRVH RLLRK	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	8 44
BUF (7–21)	GLQFPVGRVH RLLRK	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	8 44
BUF (8–21)	LQFPVGRVH RLLRK	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	16 8
BUF (9–21)	QFPVGRVH RLLRK	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	64 32
BUF (10–21)	FPVGRVH RLLRK	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	32 32
BUF (11–21)	PVGRVH RLLRK	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	64 32

Antecedentes



MÓLECULA	SECUENCIA	BACTERIA	CMI µg/mL
BUF (1–17)	TRSSRAGLQFPVGRVHR	<i>S. aureus</i>	>256
		<i>E. coli</i>	>256
BUF (5–20)	RAGLQFPVGRVH RLLR	<i>S. aureus</i>	64
		<i>E. coli</i>	16
BUF (5–19)	RAGLQFPVGRVH RLL	<i>S. aureus</i>	128
		<i>E. coli</i>	64
BUF (5–18)	RAGLQFPVGRVH R L	<i>S. aureus</i>	256
		<i>E. coli</i>	256
[RVH RLLR] ₃	RVH RLLR RVH RLLR RVH RLLR	<i>S. aureus</i>	64
		<i>E. coli</i>	128

Antecedentes



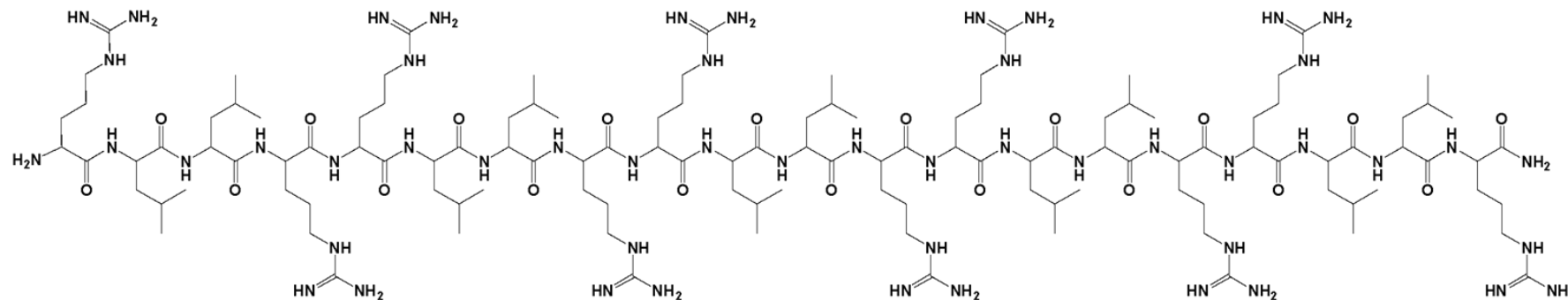
Estructuras palindrómicas

TRSSRAGLQFPVGRVH**RLLRK**

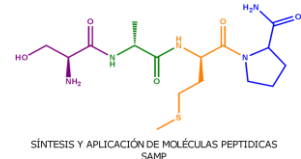
BFII: TRSSRAGLQFPVGRVH**RLLRK**
CMI *E. coli* : 1,62 μM

RLLRLLRLLRLLRLLR

[RLLR]₅: RLLRLLRLLRLLRLLRLLR
CMI *E. coli* : 0,7 μM



Antecedentes



Sustitución de residuos de Arginina (Arg) por Lisina (Lys)

RAGLQFPVGR**LLRRLLR**

BFIib: RAGLQFPVG**LLRRLLR**

CMI *S. aureus* : 1 µg/mL

CMI *E. coli* : 1 µg/mL

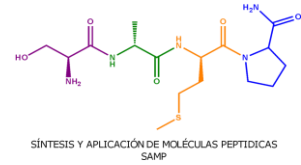
RAGLQFPVG**KLLKLLKRLKR**

Histonin: RAGLQFPVG**KLLKLLKRLKR**

CMI *S. aureus* : 2 µg/mL

CMI *E. coli* : 2 µg/mL

Antecedentes



Incorporación de aminoácidos no naturales

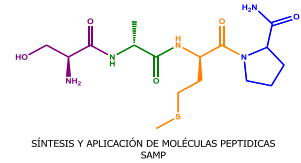
RRWQWR

LfcinB 20-25: RRWQWR
CMI *E. coli* ATCC 25922: 203 µg/mL

Ahx-RRWQWR

Ahx/LfcinB(20-25): Ahx-RRWQWR
CMI *E. coli* ATCC 25922: 182 µg/mL

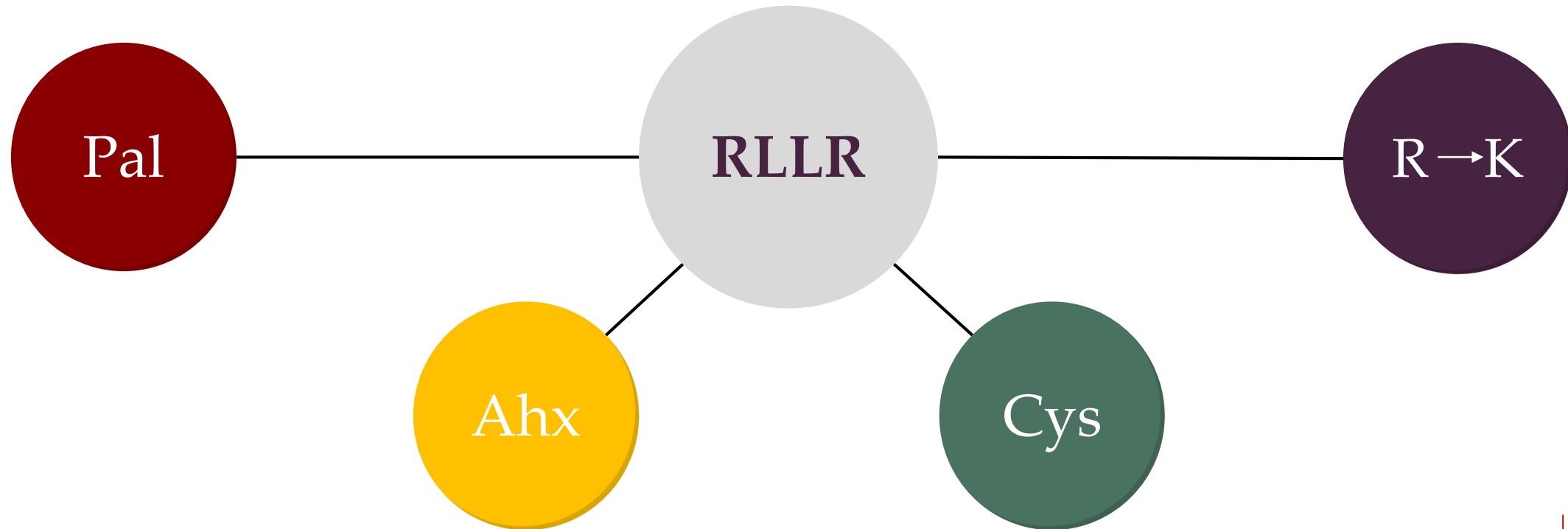
Pregunta problema



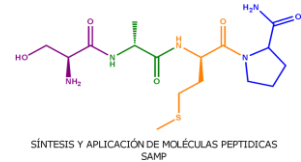
Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923



Objetivos



GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana de péptidos derivados de Buforina II contra *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923.

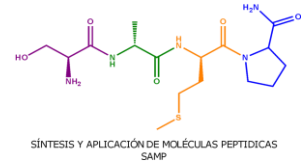
ESPECIFICOS

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

2. Calcular el porcentaje de hemólisis de los péptidos sintéticos.

3. Evaluar la actividad bactericida del péptido que presente mayor actividad por cepa mediante curvas de letalidad.

Péptidos



Familia	Secuencia	Código péptido
BFII ⁽³²⁻³⁵⁾	RLLR	BFII ⁽³²⁻³⁵⁾
	Ahx-RLLR	Ahx/BFII ⁽³²⁻³⁵⁾
	C-Ahx-RLLR	C/Ahx/BFII ⁽³²⁻³⁵⁾
	KLLK	(R→K)BFII ⁽³²⁻³⁵⁾
BFII ^{(32-35)pal}	RLLRLLR	BFII ^{(32-35)pal}
	Ahx-RLLRLLR	Ahx/ BFII ^{(32-35)pal}
	C-Ahx-RLLRLLR	C/Ahx/BFII ^{(32-35)pal}
	KLLKLLK	(R→K)BFII ^{(32-35)pal}

Suministrados por el grupo de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP) de la Universidad Nacional de Colombia.

Metodología

Cepas ATCC

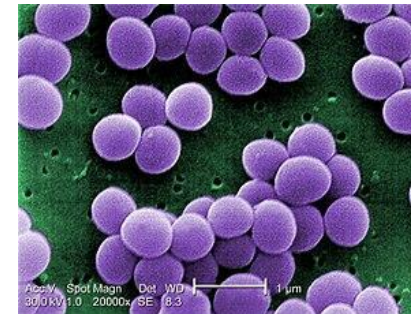
Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™)



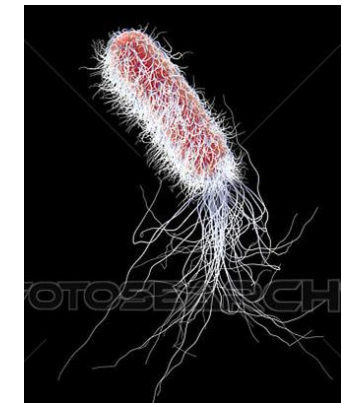
<http://bit.ly/2UX1o76>

Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) Migula (ATCC® 27853™)

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC® 25923™)

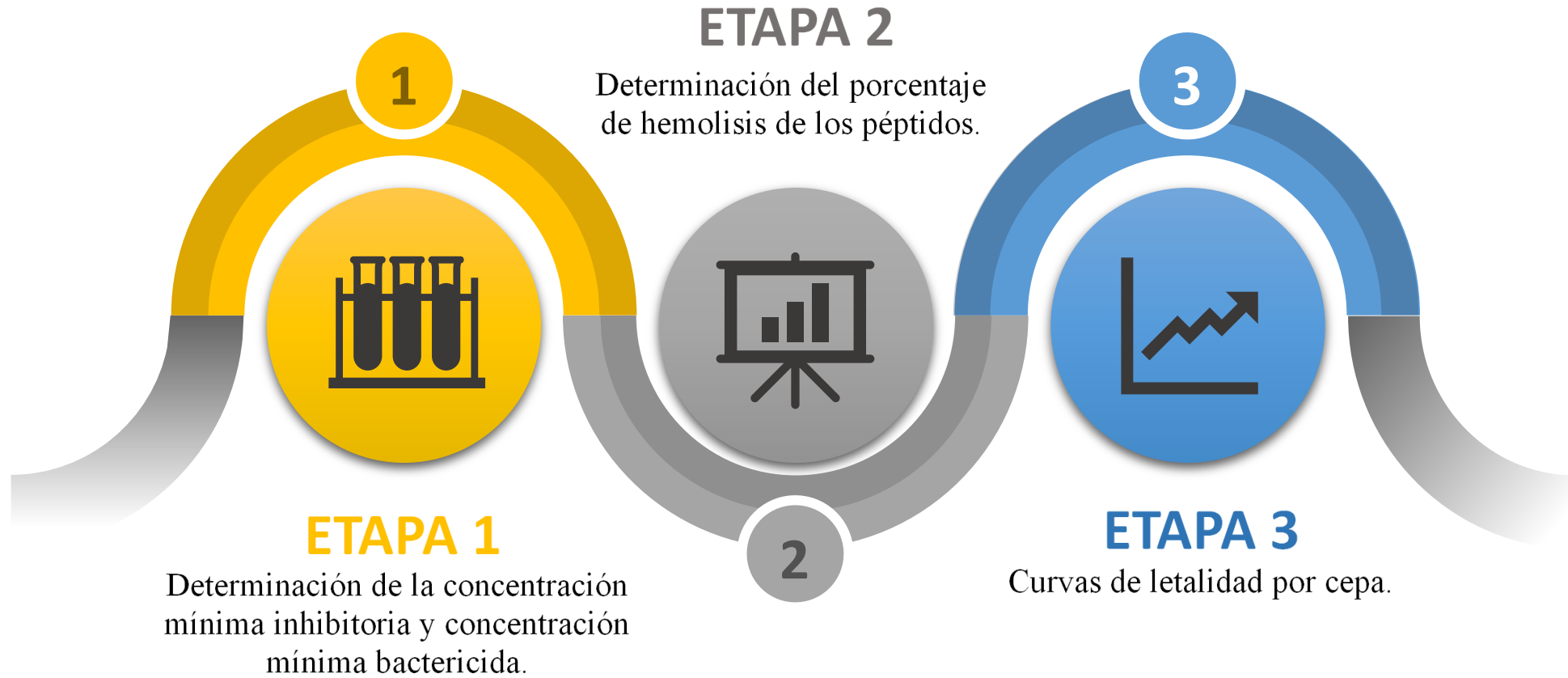
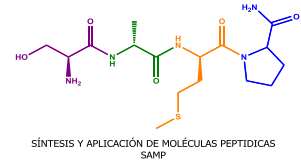


<http://bit.ly/2ZWqQNM>



<http://bit.ly/2J16uNX>

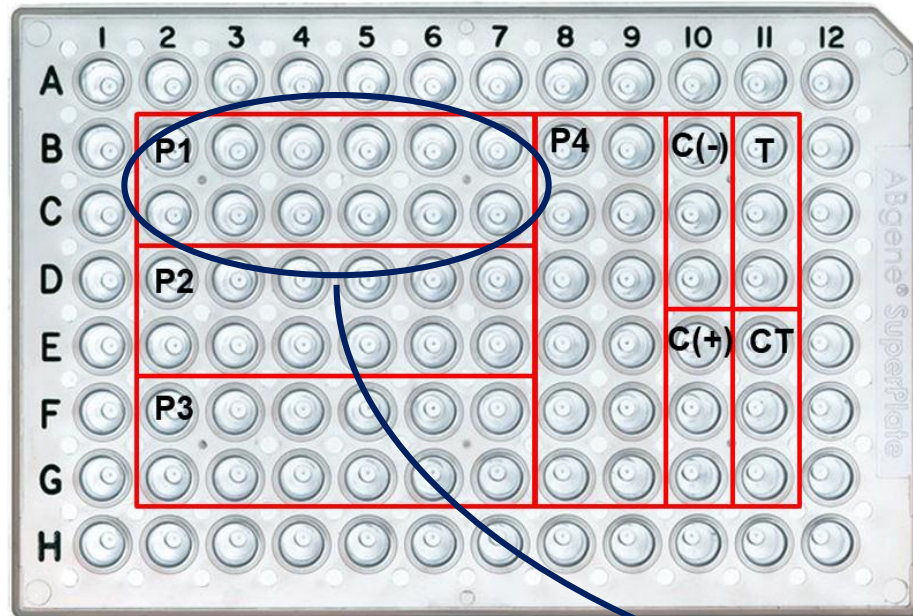
Metodología



Etapa 1.

Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los péptidos derivados de Buforina II contra *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923.

Métodos: CMI



Incubar
T= 37°C
t= 24 h
Lectura Abs 620 nm

Péptidos (P1, P2, P3, P4)

Control Negativo (-) CMH+Agua destilada+Inóculo

Control Positivo (+): CMH+Antibiótico+Inóculo

Control Técnica (CT): CMH+Agua peptonada

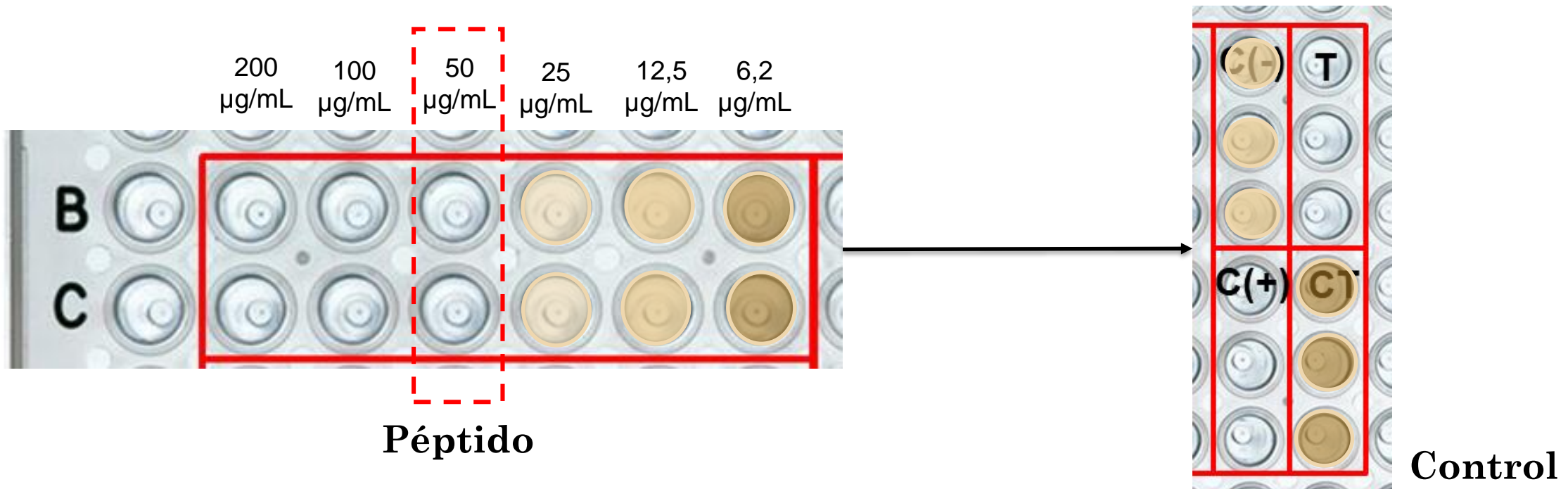
Control de Crecimiento (CC): CMH+Inóculo

200 100 50 25 12,5 6,2
µg/mL µg/mL µg/mL µg/mL µg/mL µg/mL

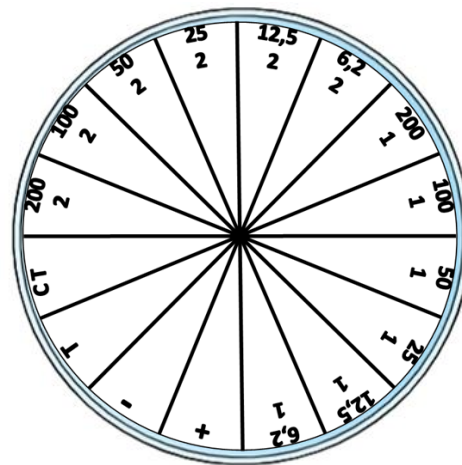
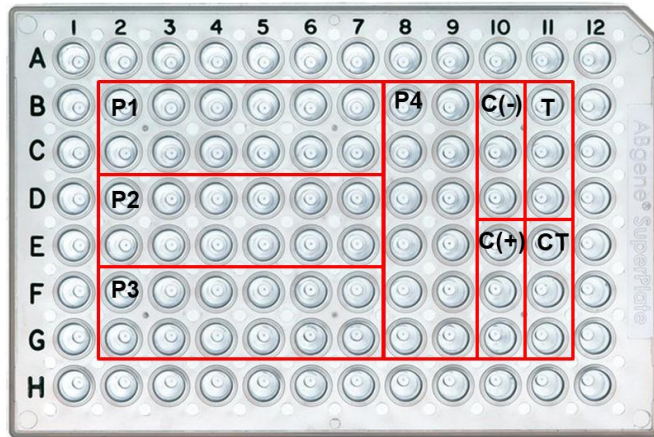


CMI: Interpretación

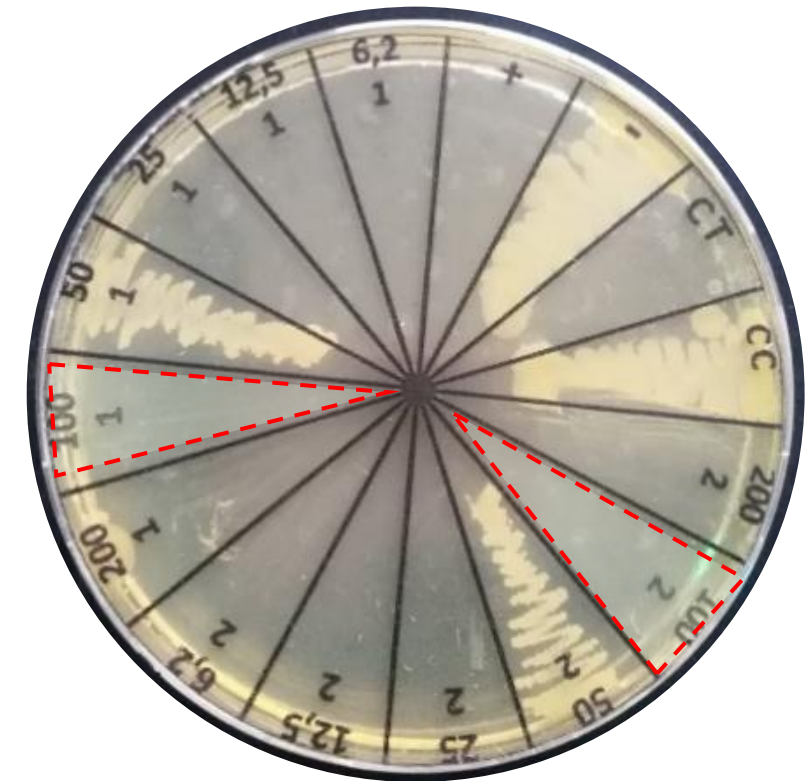
Péptido ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	200	100	50	25	12,5	6,25	Control (+)	Control (-)	T	CT
Rep 1	0,125	0,129	0,189	0,602	0,568	0,570	0,120	0,520	0,118	0,857
Rep 2	0,122	0,129	0,112	0,502	0,583	0,593	0,128	0,524	0,116	0,834



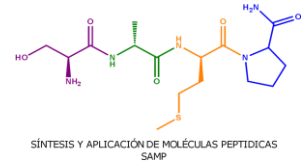
Métodos: CMB



Incubar
(24 h, 37 °C)

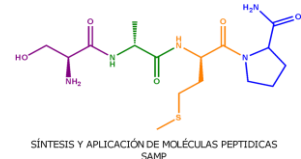


Resultados: CMI/CMB



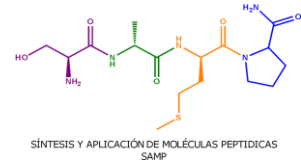
	Código	Secuencia	<i>E. coli</i> ATCC 25922 CMI/CMB (μ M)
BFII ⁽³²⁻³⁵⁾	BFII⁽³²⁻³⁵⁾	RLLR	>360/>360
	Ahx/BFII⁽³²⁻³⁵⁾	Ahx-RLLR	>299/>299
	C/Ahx/BFII⁽³²⁻³⁵⁾	C-Ahx-RLLR	259/>259
	(R→K)BFII⁽³²⁻³⁵⁾	KLLK	>400/>400
BFII ^{(32-35)pal}	BFII^{(32-35)pal}	RLLRLLR	91/91
	Ahx/BFII^{(32-35)pal}	Ahx-RLLRLLR	41/82
	C/Ahx/BFII^{(32-35)pal}	C-Ahx-RLLRLLR	38/76
	(R→K)BFII^{(32-35)pal}	KLLKLLK	204/204

Resultados: CMI/CMB



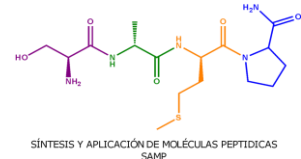
	Código	Secuencia	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 CMI/CMB (μ M)
BFII ⁽³²⁻³⁵⁾	BFII⁽³²⁻³⁵⁾	RLLR	>360/>360
	Ahx/BFII⁽³²⁻³⁵⁾	Ahx-RLLR	>299/>299
	C/Ahx/BFII⁽³²⁻³⁵⁾	C-Ahx-RLLR	>259/>259
	(R→K)BFII⁽³²⁻³⁵⁾	KLLK	>400/>400
BFII ^{(32-35)pal}	BFII^{(32-35)pal}	RLLRLLR	183/>183
	Ahx/BFII^{(32-35)pal}	Ahx-RLLRLLR	166/>166
	C/Ahx/BFII^{(32-35)pal}	C-Ahx-RLLRLLR	38/76
	(R→K)BFII^{(32-35)pal}	KLLKLLK	204/>204

Resultados: CMI/CMB



	Código	Secuencia	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 CMI/CMB (μ M)
BFII ⁽³²⁻³⁵⁾	BFII⁽³²⁻³⁵⁾	RLLR	>360/>360
	Ahx/BFII⁽³²⁻³⁵⁾	Ahx-RLLR	>299/>299
	C/Ahx/BFII⁽³²⁻³⁵⁾	C-Ahx-RLLR	>259/>259
	(R→K)BFII⁽³²⁻³⁵⁾	KLLK	>400/>400
BFII ^{(32-35)pal}	BFII^{(32-35)pal}	RLLRLLR	>183/>183
	Ahx/BFII^{(32-35)pal}	Ahx-RLLRLLR	166/166
	C/Ahx/BFII^{(32-35)pal}	C-Ahx-RLLRLLR	38/76
	(R→K)BFII^{(32-35)pal}	KLLKKLLK	>204/>204

Conclusión



C-Ahx-RLLRLLR

C/Ahx/BFII⁽³²⁻³⁵⁾pal

E. coli ATCC 25922

P. aeruginosa ATCC 27853

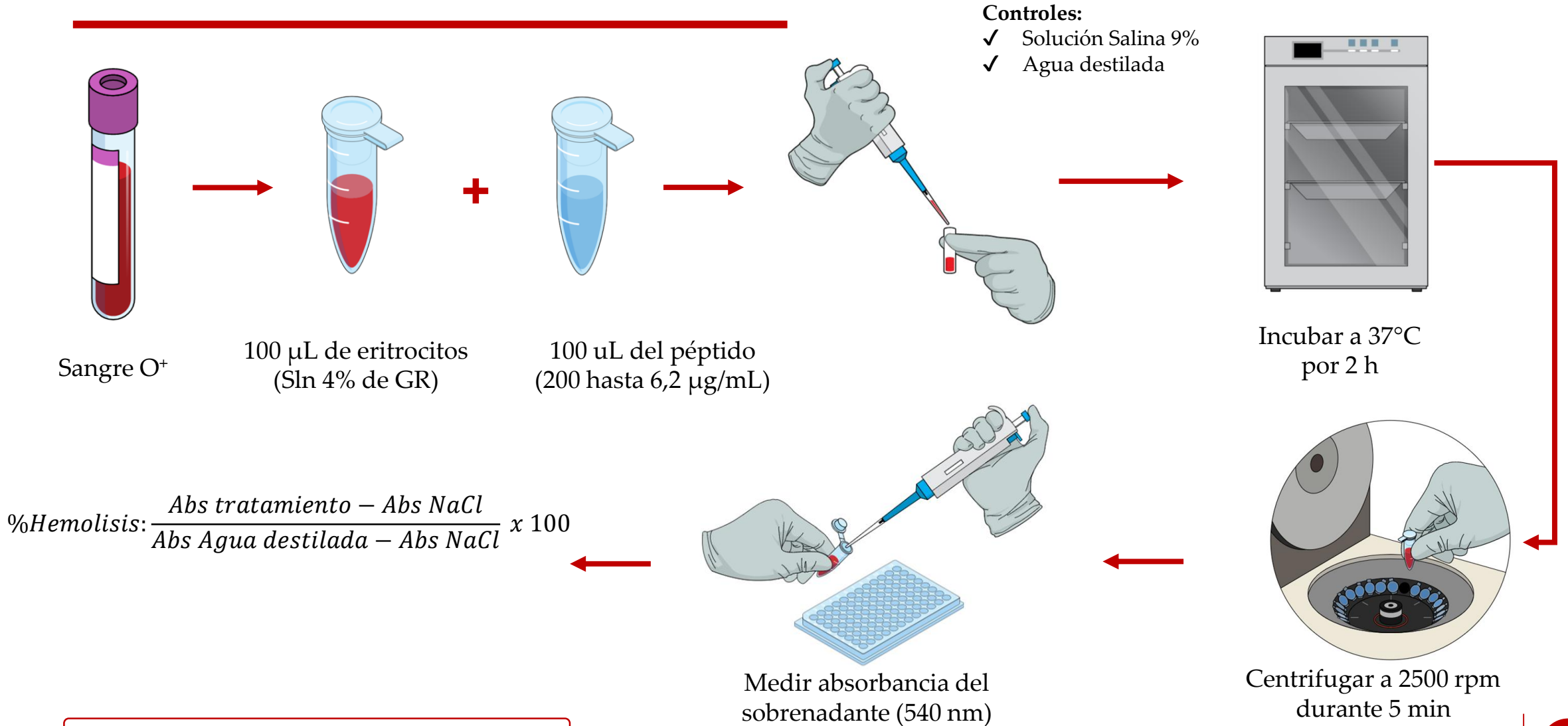
S. aureus ATCC 25923

Péptido de amplio espectro de actividad

Etapa 2.

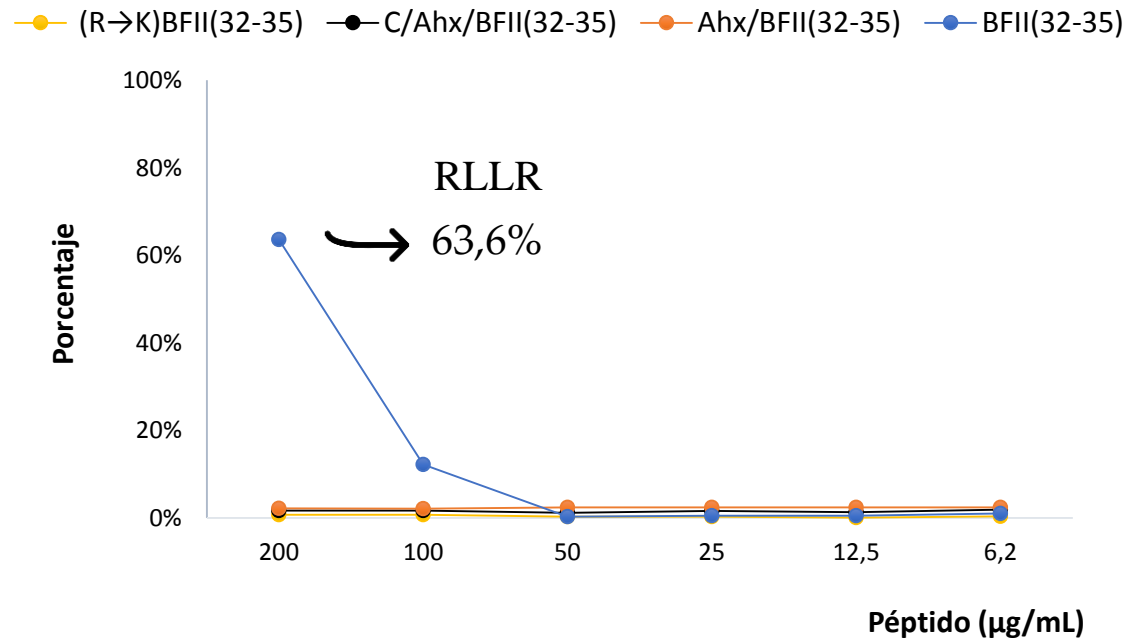
Calcular el porcentaje de hemólisis para todos los péptidos sintéticos derivados de la BFII⁽³²⁻³⁵⁾.

Métodos: Hemólisis

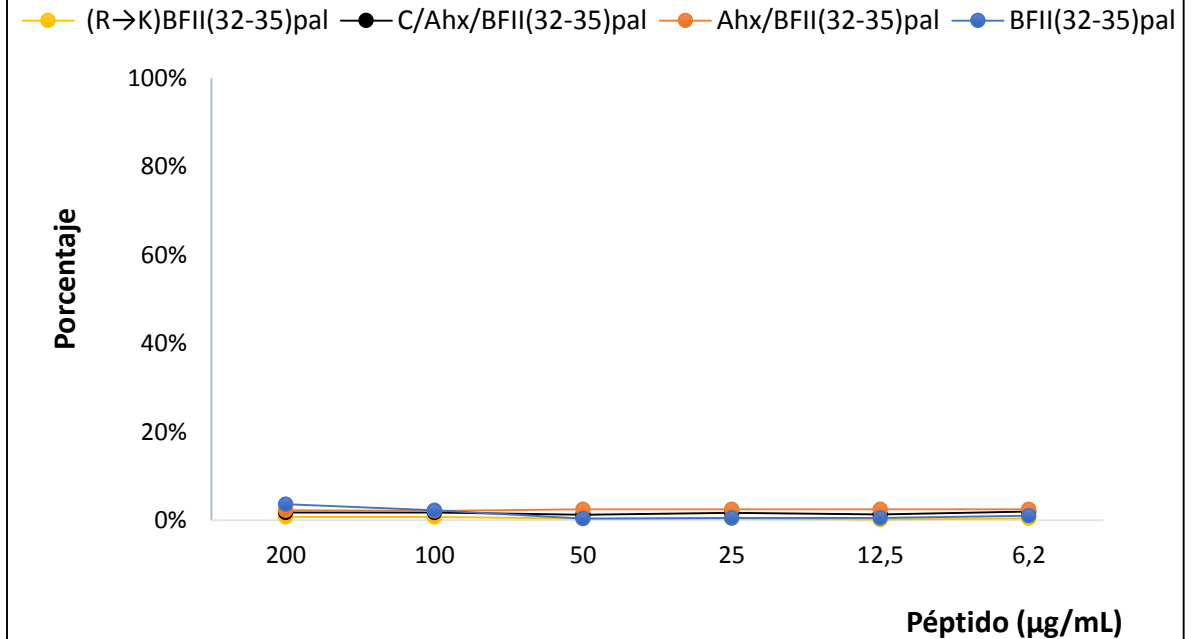


Resultados: Hemólisis

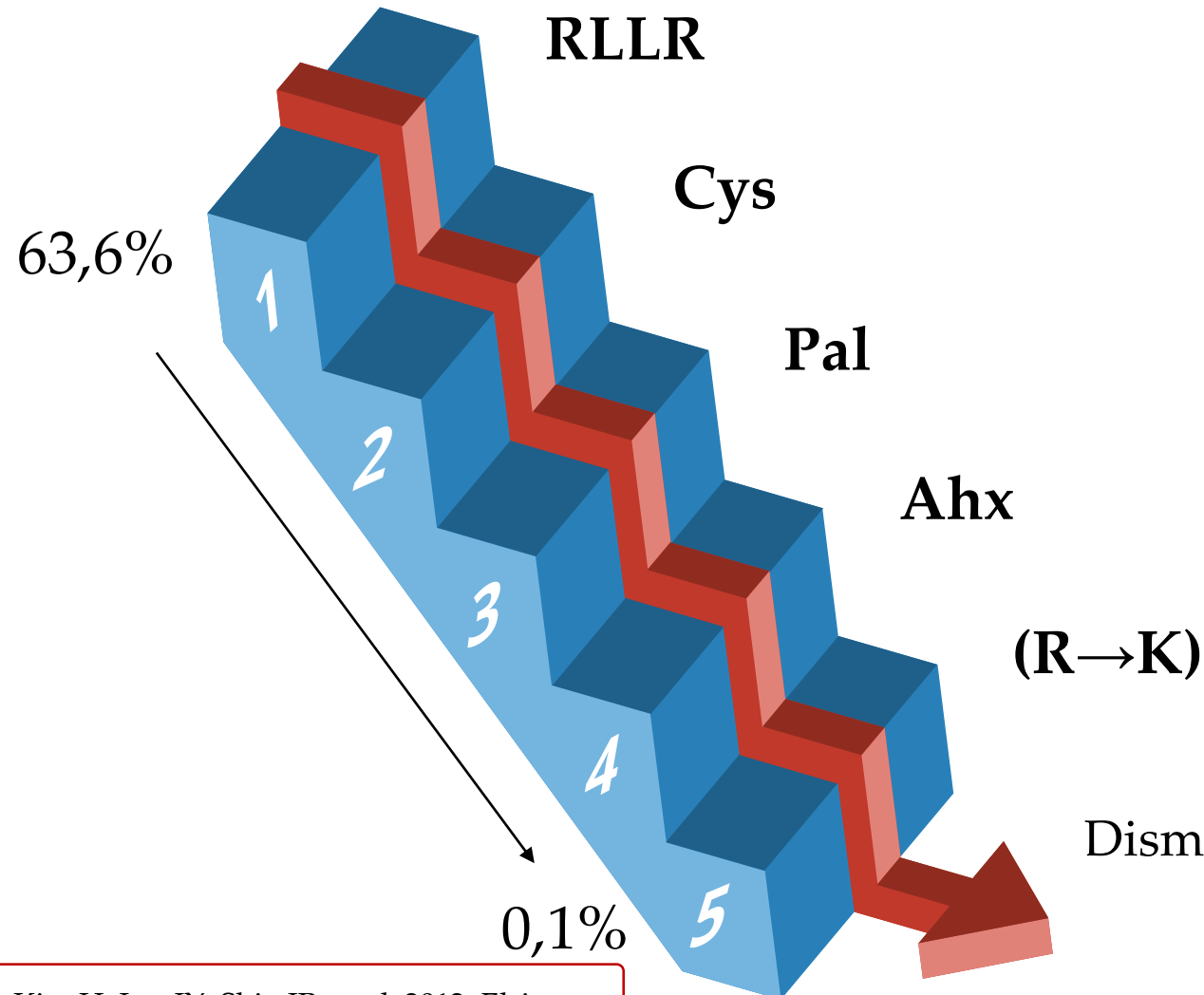
Hemólisis familia BFII⁽³²⁻³⁵⁾



Hemólisis familia BFII^{(32-35)pal}



Conclusión



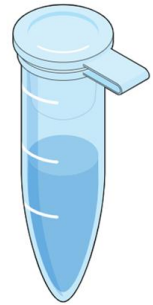
Naturalmente la BFII no presentaba hemólisis, y las modificaciones de la región N-terminal no afectaron la actividad hemolítica.

Disminuye el porcentaje de hemólisis

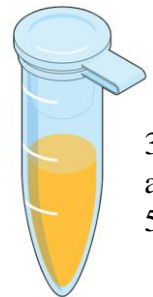
Etapa 3.

Evaluar la actividad bactericida del péptido que presente mayor actividad mediante curvas de letalidad.

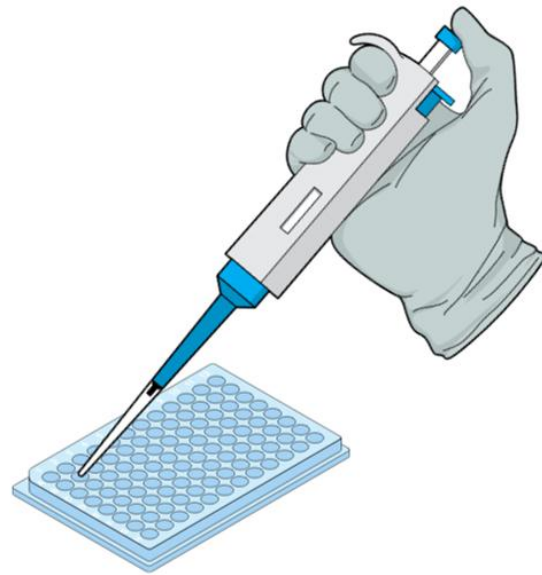
Métodos: Curva de letalidad



270 μ L péptido
(caldo MH).
0,5x CMI, CMI,
2x CMI



30 μ L Inóculo
ajustado
 5×10^5 UFC/mL

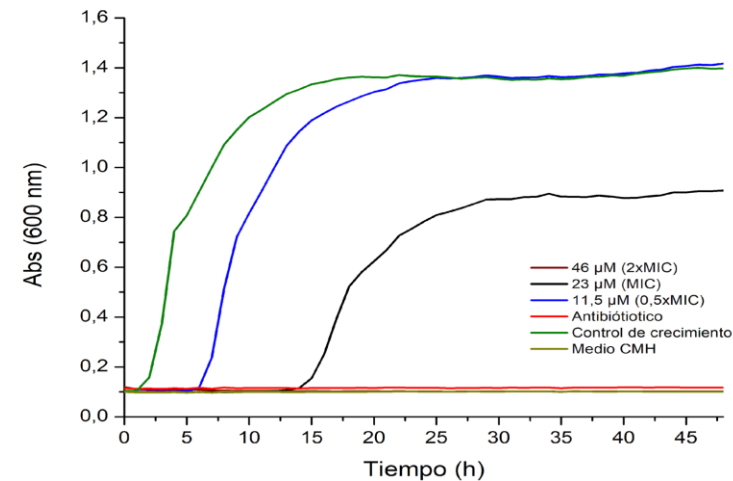


Controles:
Caldo MH
Cepa sola
Antibiótico

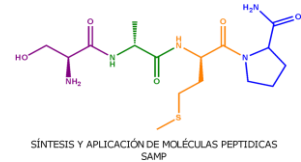


(Bioscreen C)

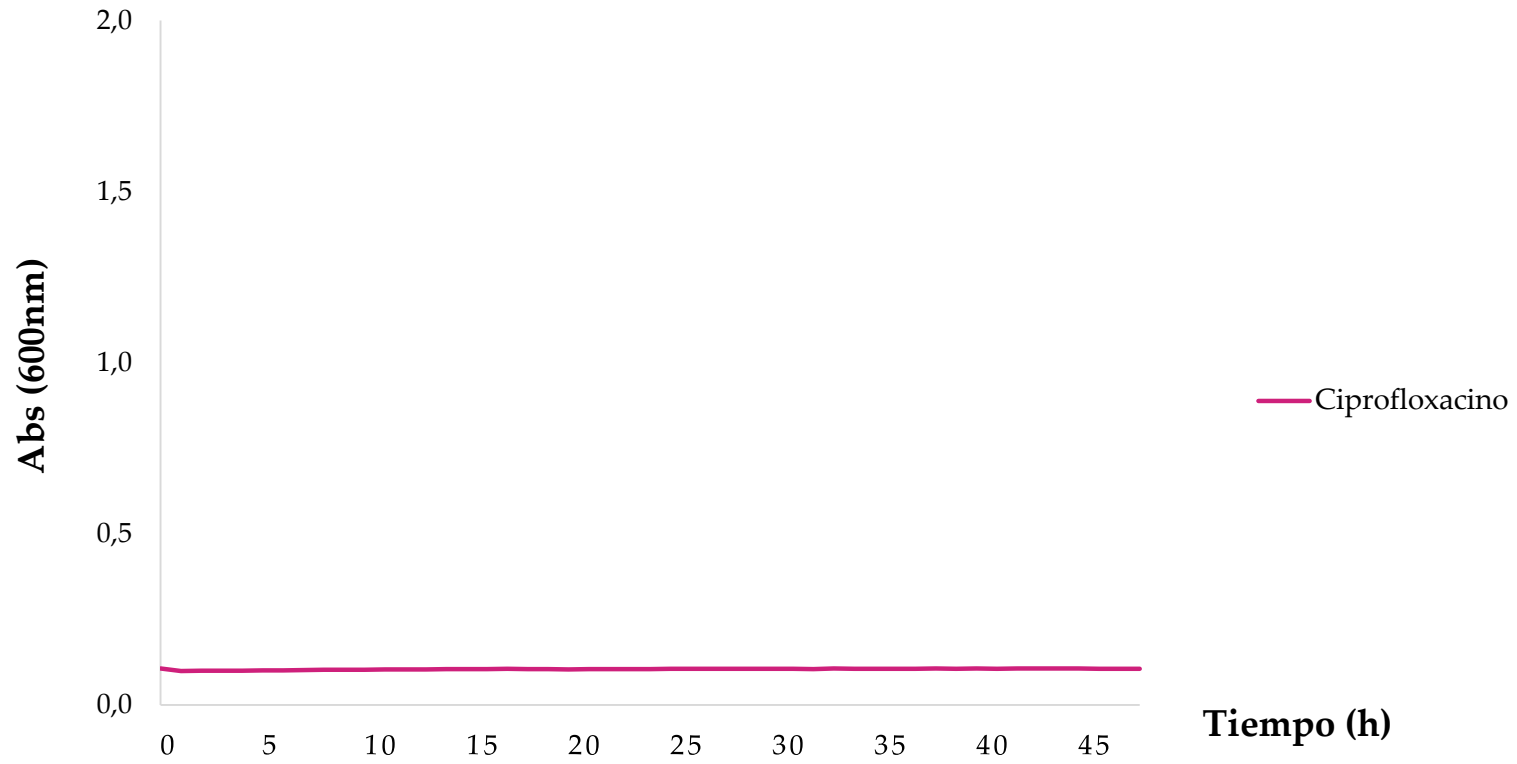
Incubar 37° por 48 h
Lectura Abs (λ 600 nm) cada hora



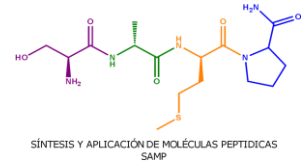
Resultados: Curvas de letalidad



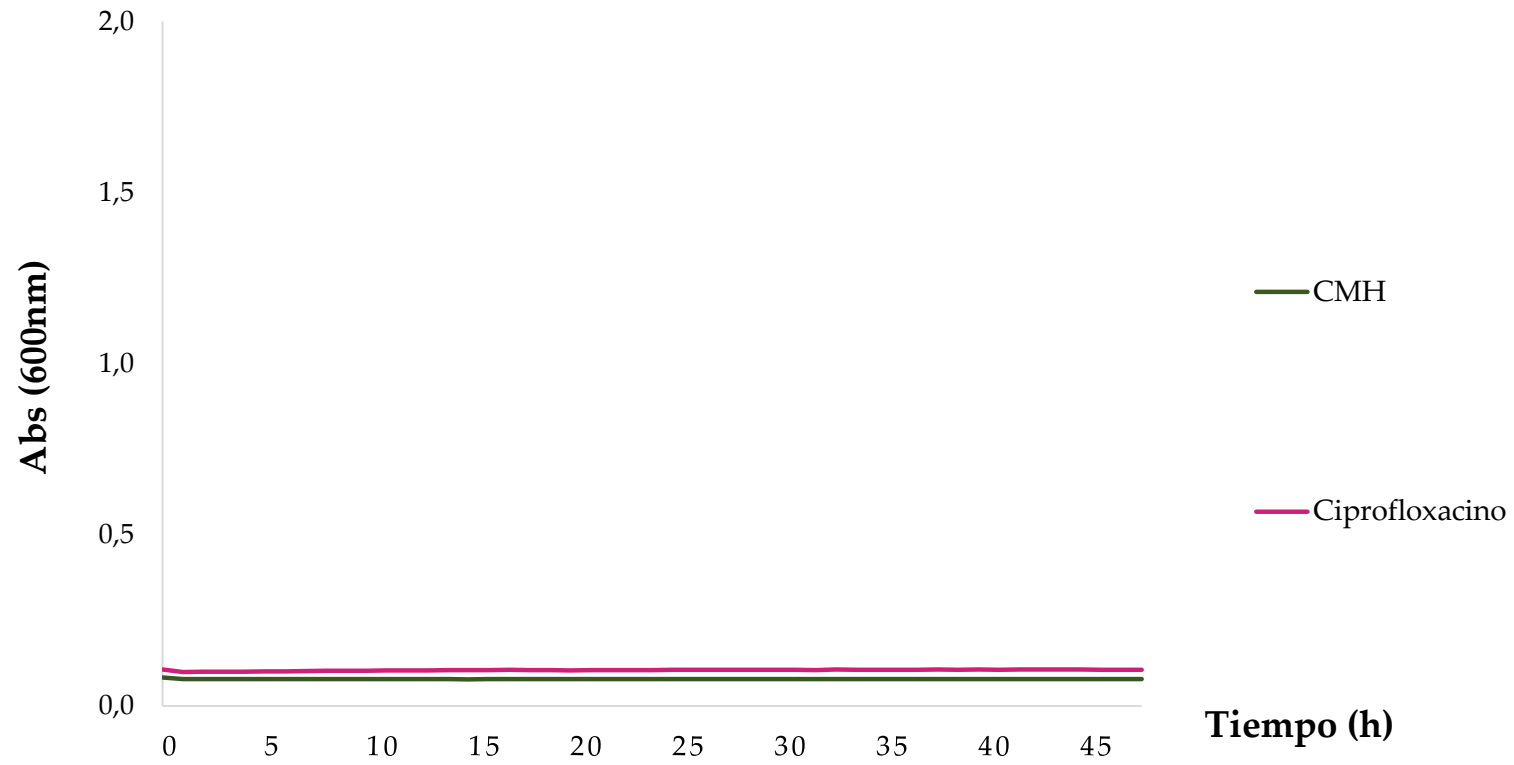
E. coli ATCC 25922 C-Ahx-RLLRLLR



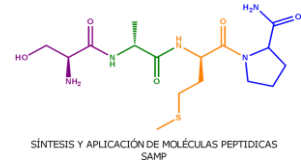
Resultados: Curvas de letalidad



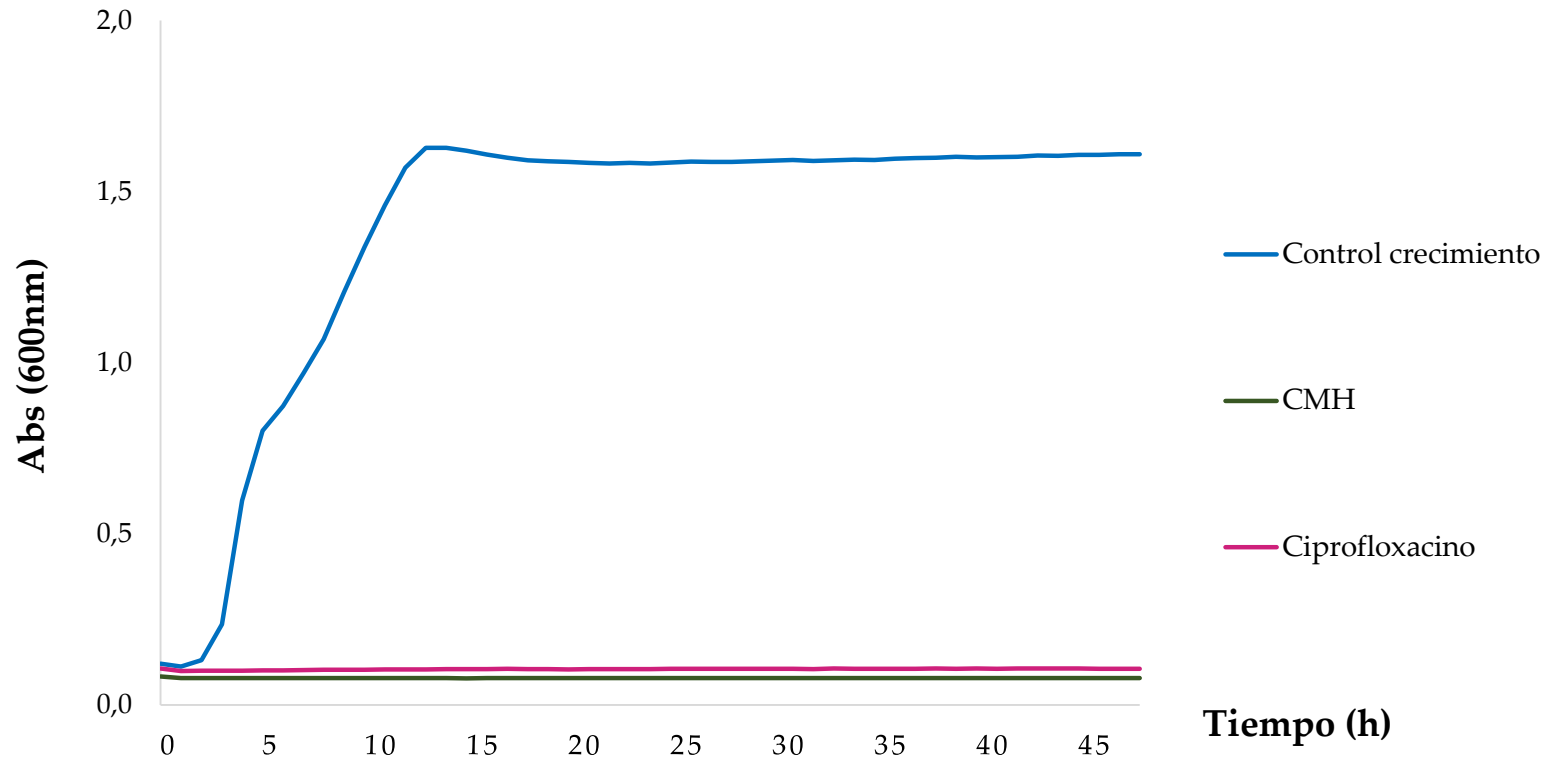
E. coli ATCC 25922 C-Ahx-RLLRLLR



Resultados: Curvas de letalidad

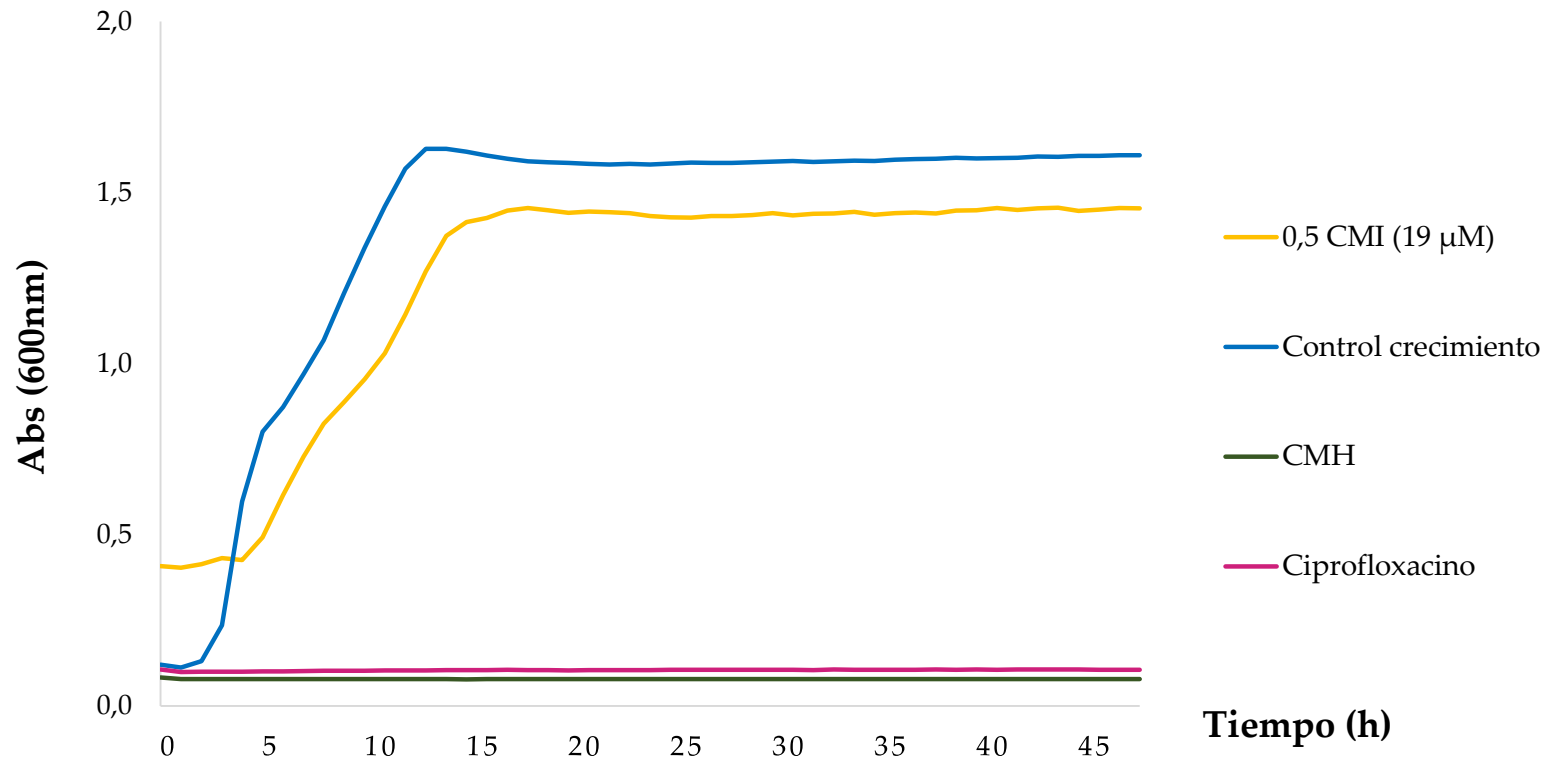


E. coli ATCC 25922 C-Ahx-RLLRLLR

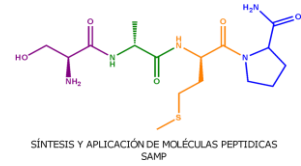


Resultados: Curvas de letalidad

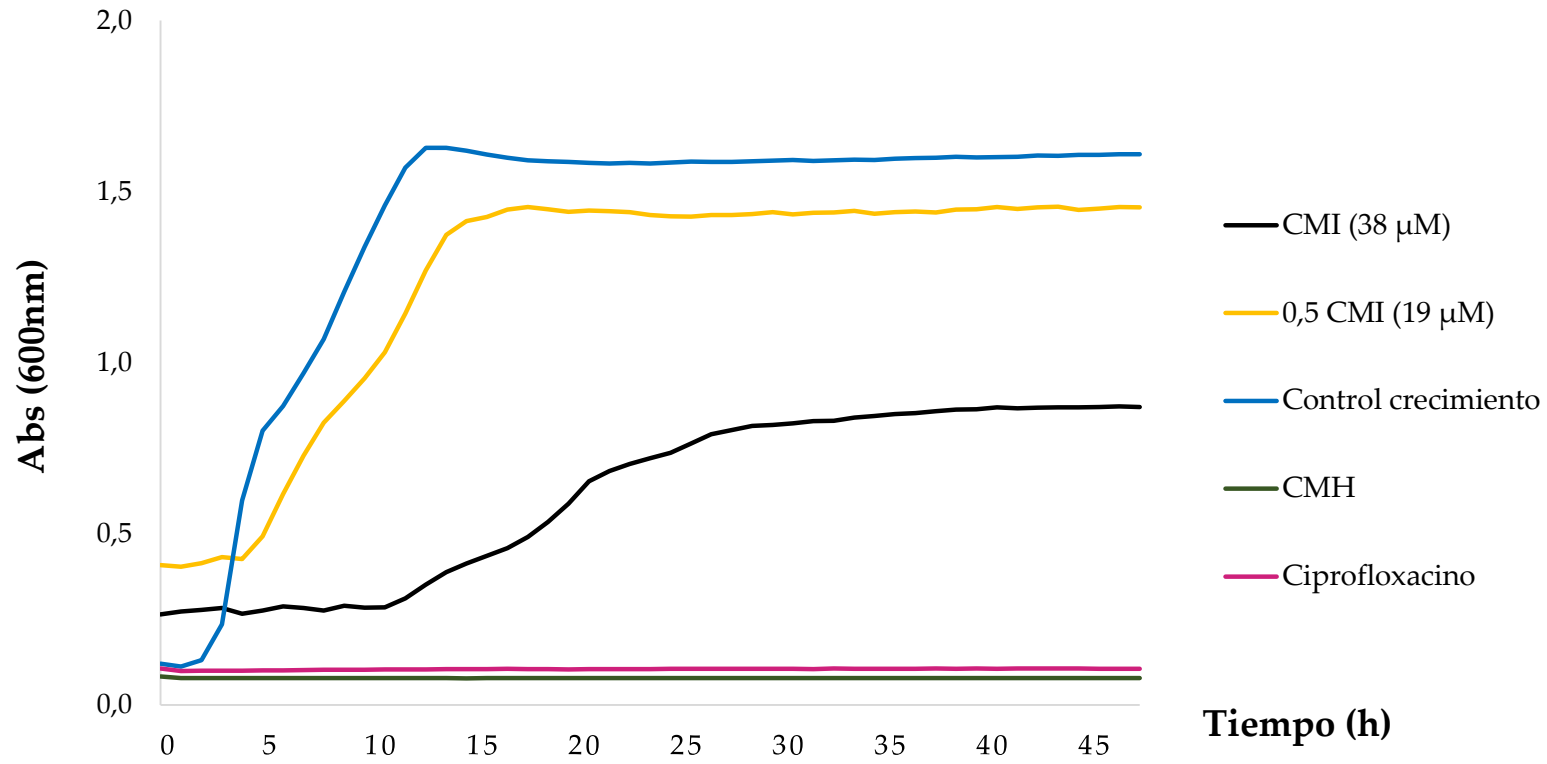
E. coli ATCC 25922 C-Ahx-RLLRLLR



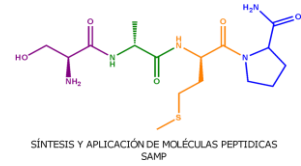
Resultados: Curvas de letalidad



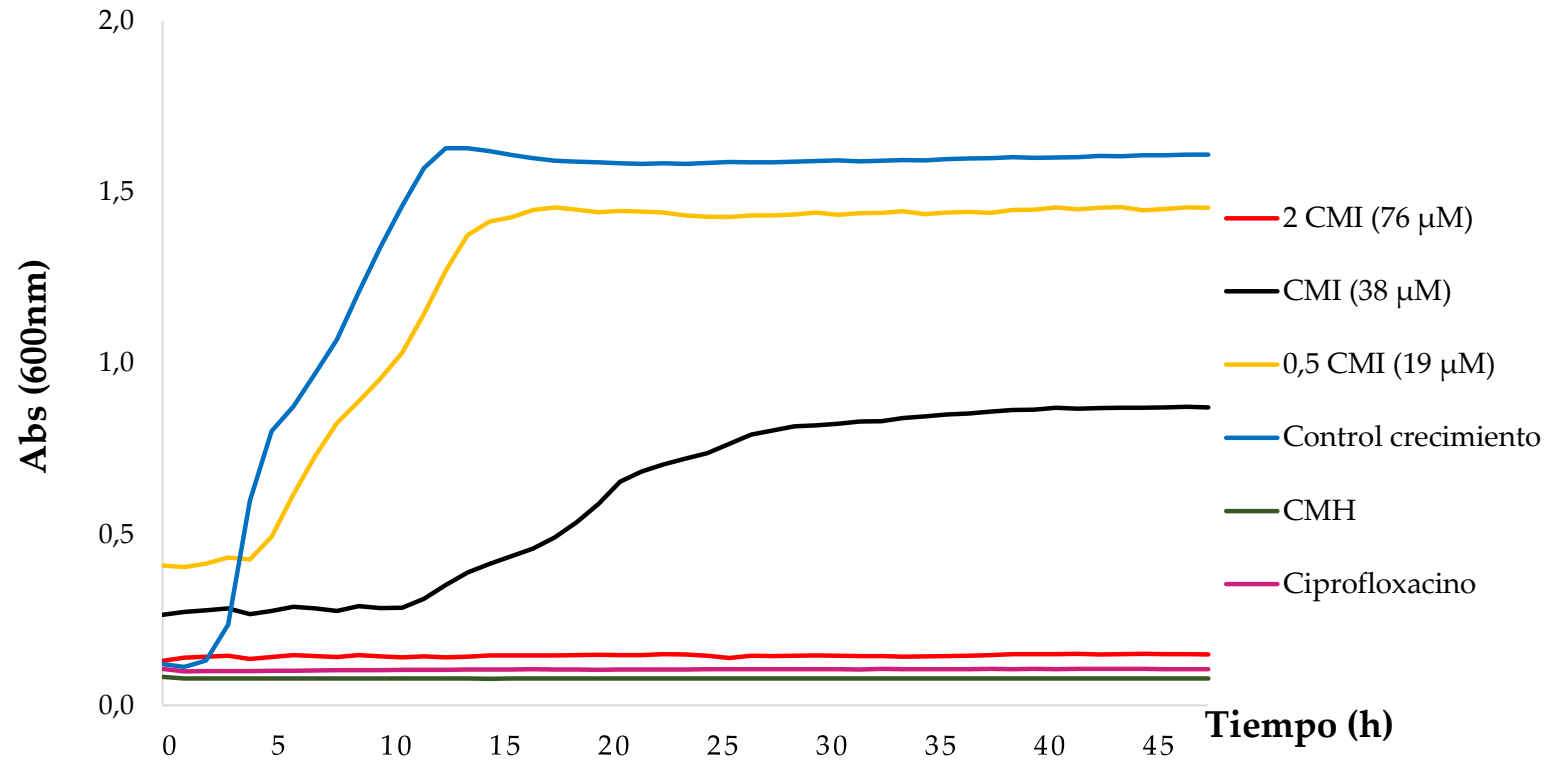
E. coli ATCC 25922 C-Ahx-RLLRLLR



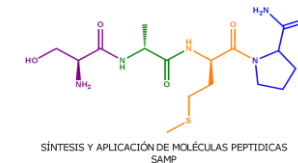
Resultados: Curvas de letalidad



E. coli ATCC 25922 C-Ahx-RLLRLLR

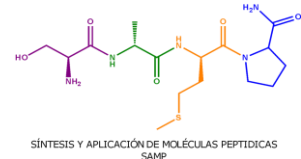


Conclusión



Código	Cepas bacterianas	Curvas de letalidad	
		Efecto bacteriostático (μM)	Efecto bactericida (μM)
C/Ahx/BFII ⁽³²⁻³⁵⁾ pal	<i>E. coli</i> ATCC 25922	38	76
C/Ahx/BFII ⁽³²⁻³⁵⁾ pal	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	19	38
C/Ahx/BFII ⁽³²⁻³⁵⁾ pal	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	19	38

Conclusiones



1

Fuimos capaces de hacer péptidos mas eficientes usando menos aminoácidos

2

Las incorporaciones en la región N-terminal de la secuencia peptídica eliminan la capacidad hemolítica del motivo mínimo

3

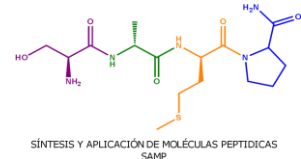
Se encontró un péptido promisorio con actividad antibacteriana en un amplio espectro de actividad

RLLR

No tóxicos  

C/Ahx/BFII(32-35)pal

Productos académicos



**XIX CONGRESO
INTERNACIONAL
DE BACTERIOLOGÍA**
CNB - COLOMBIA

¡UNIDOS POR LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA!
Noviembre 1 al 4 de 2019



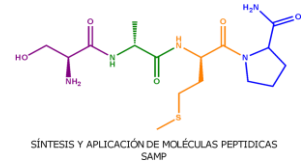
Colegio Nacional de Bacteriología
CNB - Colombia

Ágora Bogotá Centro de Convenciones



Cra. 15 Bis A No. 33 - 03 Bogotá - Colombia
PBX (57 - 1) 755 2977 Ext. 109 - 107 / congreso@cnbcolombia.org
www.cnbcolombia.org

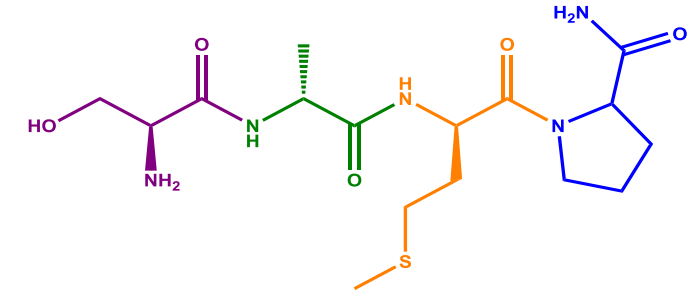
Agradecimientos



Universidad
Colegio Mayor de
Cundinamarca



Universidad
Nacional de
Colombia



SÍNTESIS Y APLICACIÓN DE MOLÉCULAS PEPTIDICAS
SAMP



Dr. Javier García



Dra. Zuly Rivera



Dr. Héctor Pineda



Dra. Sandra Estupiñán



Dra. Liliana Muñoz



Dra. Ruth Sánchez

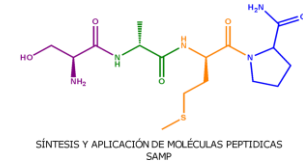


Dra. Gladys Pinilla

Gracias



Referencias bibliográficas



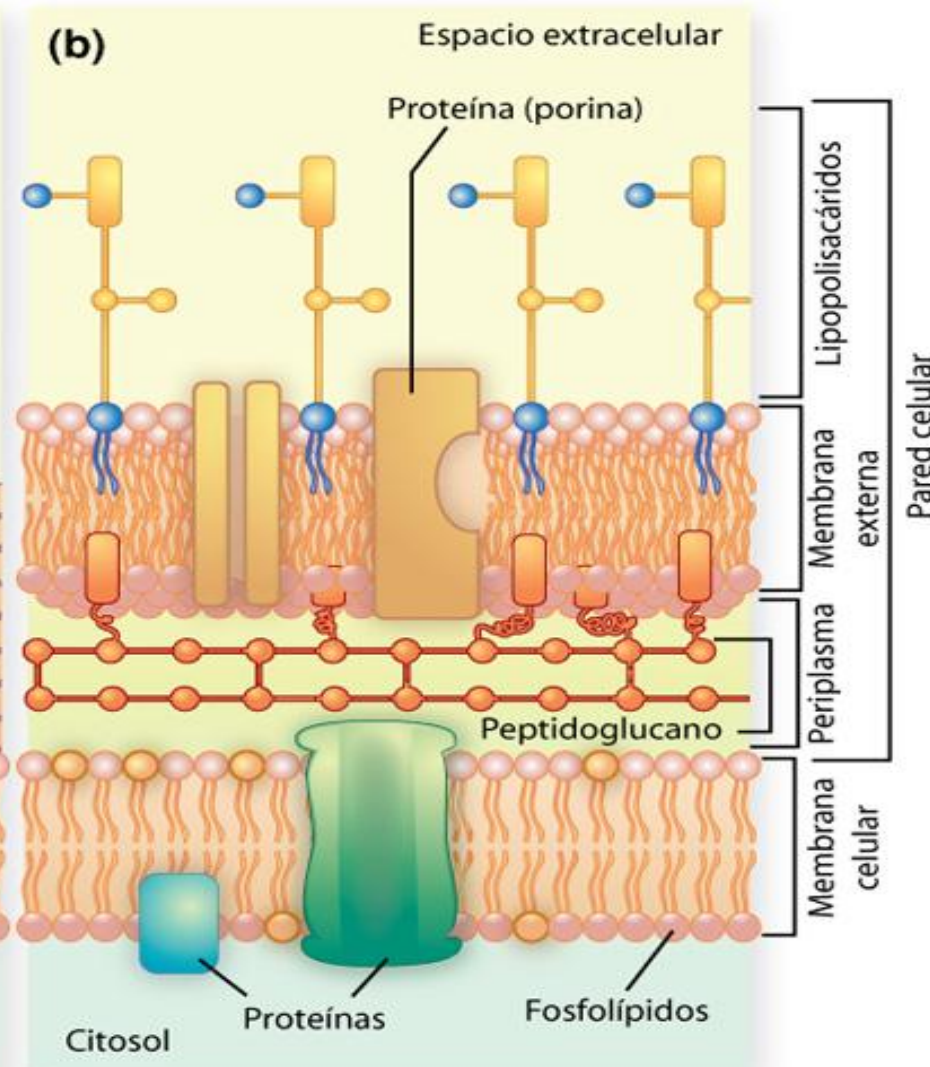
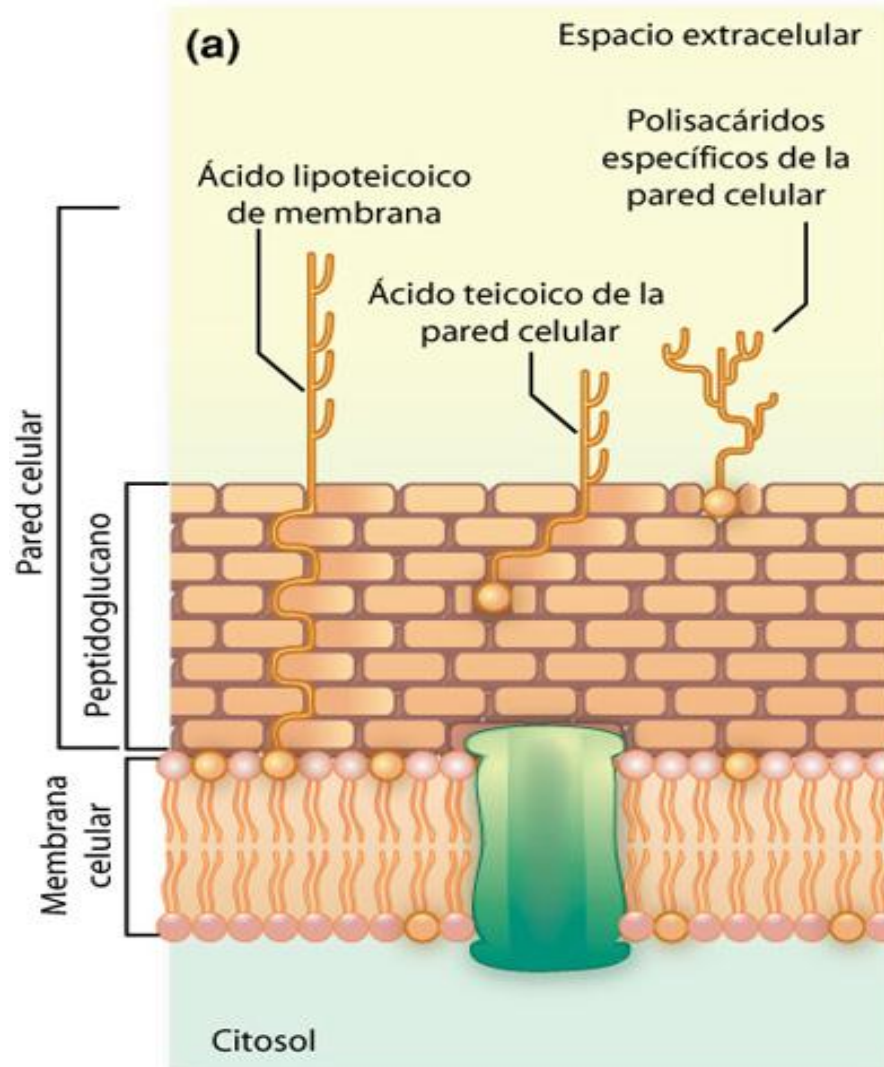
1. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012.) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9 (ISBN 1-56238-783-9 [Print]; ISBN 1-56238-784-7 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
2. NCCLS. (1999) Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. NCCLS document M26-A [ISBN 1-56238-384-1]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
3. Huertas Méndez, N., Vargas Casanova, Y., Gómez Chimbi, A., Hernández, E., Leal Castro, A., and Melo Diaz, J. et al. (2017). Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules*, 22(3), 452. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22030452>
4. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. ELSEVIER [Internet]. 2015 [citado 5 mayo 2018]; 33(10): 1-8. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-una-S0213005X14003413>
5. Camarena JJ, Sánchez R. INFECCIÓN POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA. CCS [Internet]. 1999 [citado 5 mayo 2018]: 1-5. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>
6. Valderrama SL, Gonzale PF, Caro MA, Ardila N, Ariza B, Gil F, et al. Factores de riesgo para bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano. *Biomédica* [Internet]. 2016 [citado 5 mayo 2018]; 36: 1-7. Disponible en: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2784/3060>
7. Vidal JE. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en tabasco* [Internet]. 2003 [citado 5 mayo 2018]; 9 (1): 3-8. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/26474896_Escherichia_coli_enteropatógena_EPEC_Una_causa_frecuente_de_diarrea_infantil
8. Yi GS, Park CB, Kim SC, Cheong C. Solution structure of an antimicrobial peptide buforin II. *FEBS* [Internet]. 1996 [cited 28 junio 2018]; 398: 1-4. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579396011933>
9. Hao G, Shi Y, Tang Y, Le G. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. Elsevier [Internet]. 2009 [cited 29 junio 2018]; 30: 1-6. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467281>

Anexos...



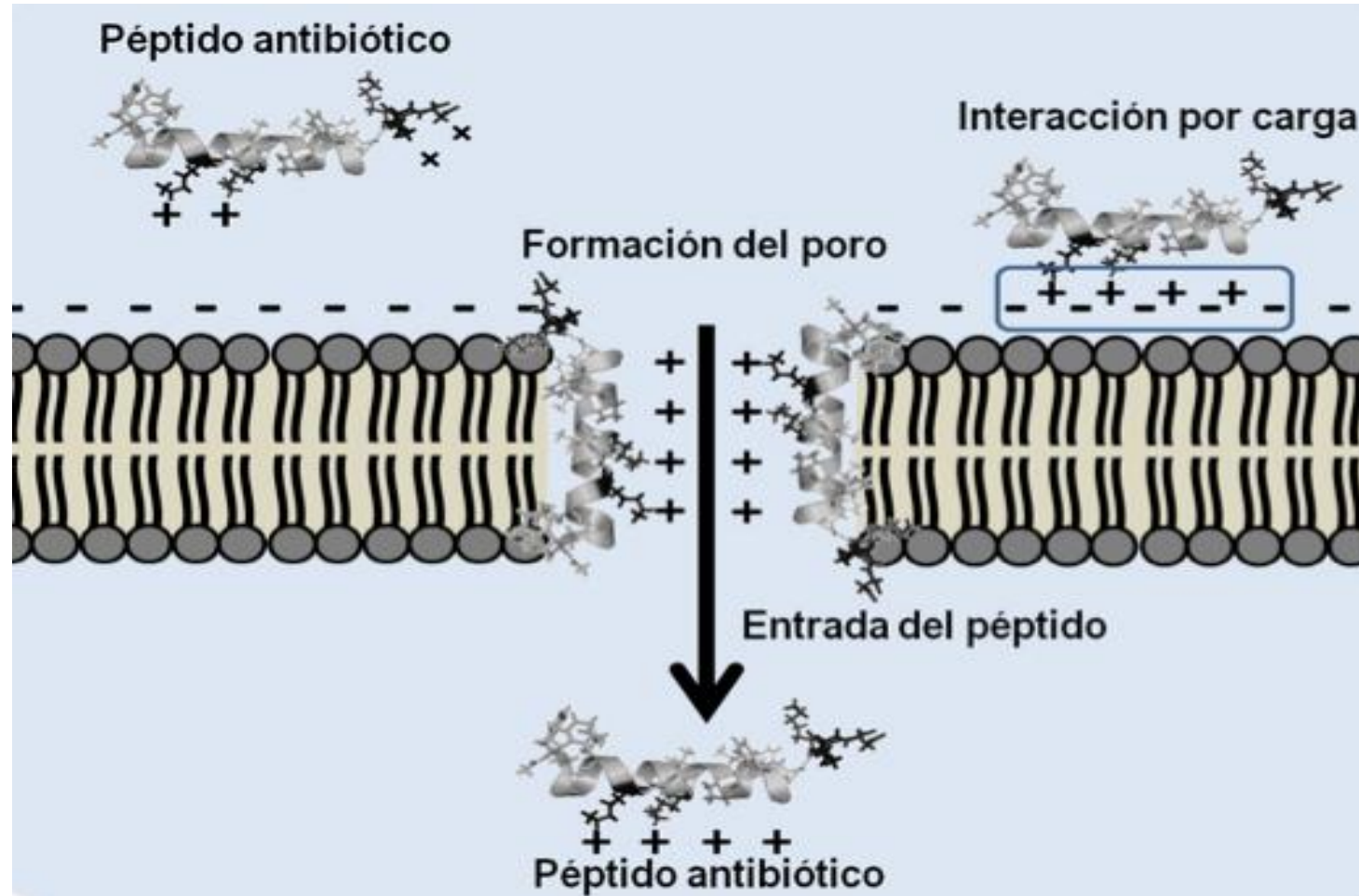
Pared bacteriana

Gram positiva



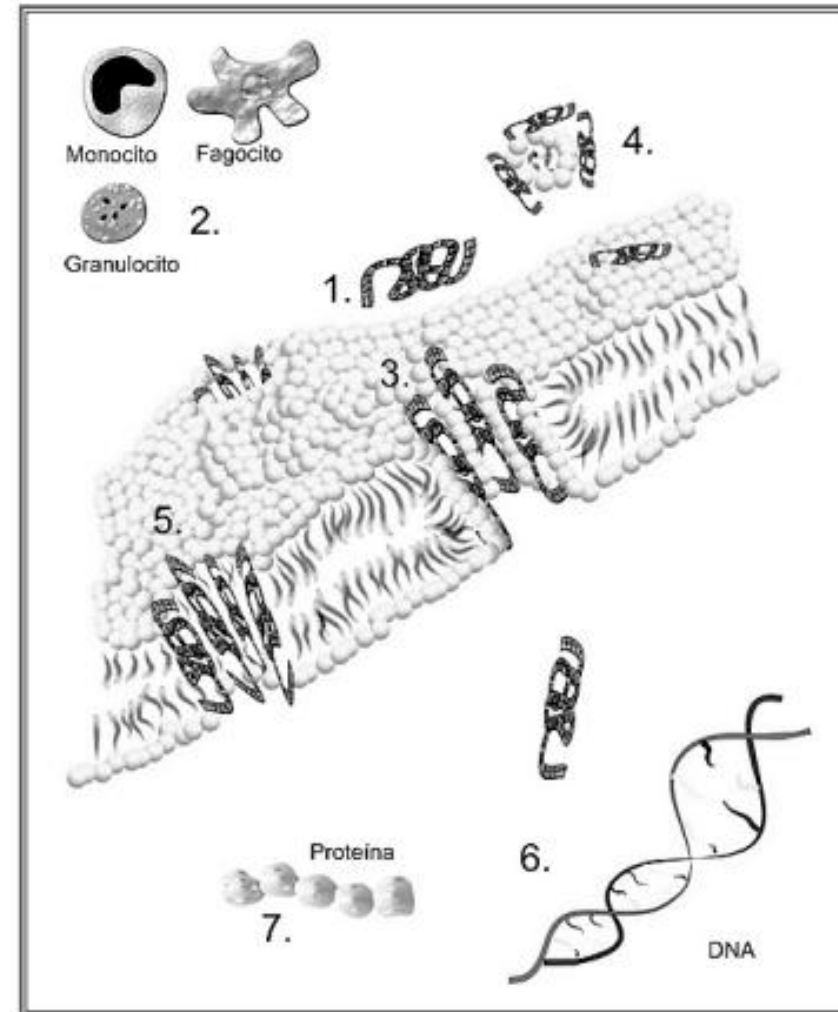
Gram negativa

Mecanismo de acción



Mecanismo de acción

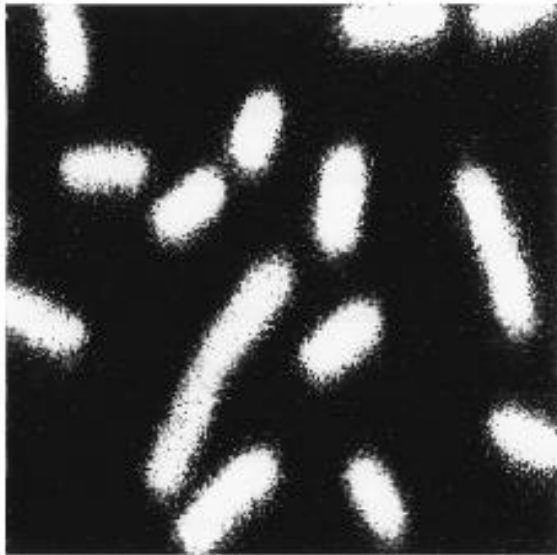
1. Interacción de membrana
2. Funciones inmunomoduladores
3. Formación de poro en forma anular
4. Mecanismo de agregado
5. Formación de poro en forma de barril
6. Interacciones con el DNA
7. Mecanismo de la síntesis y plegamiento de proteínas



Mecanismo de acción original

(A)

0.5 $\mu\text{g/ml}$ of
FITC-labeled buforin II

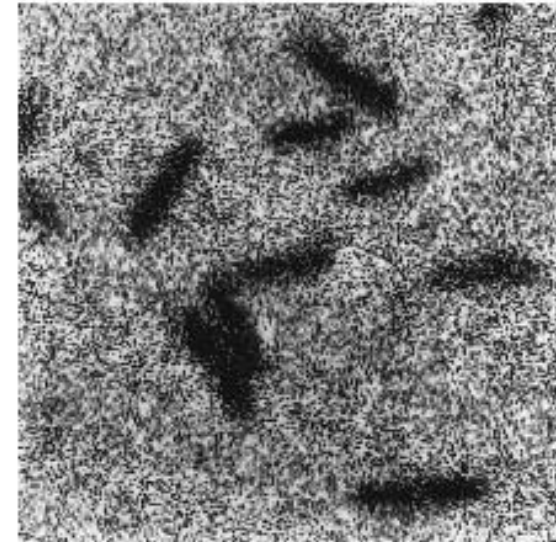


4 $\mu\text{g/ml}$ of
FITC-labeled buforin II

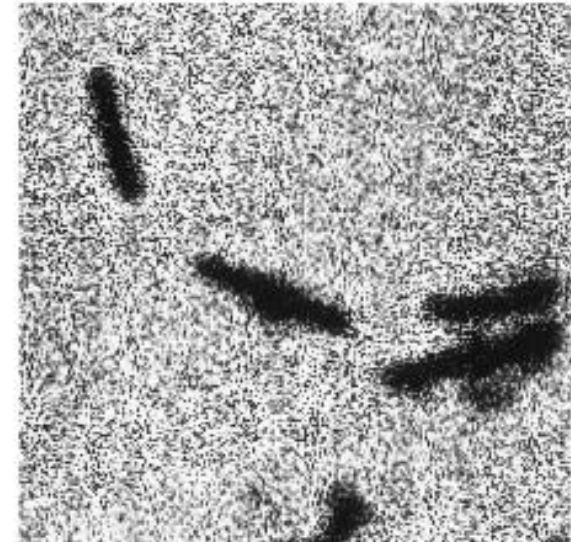


(B)

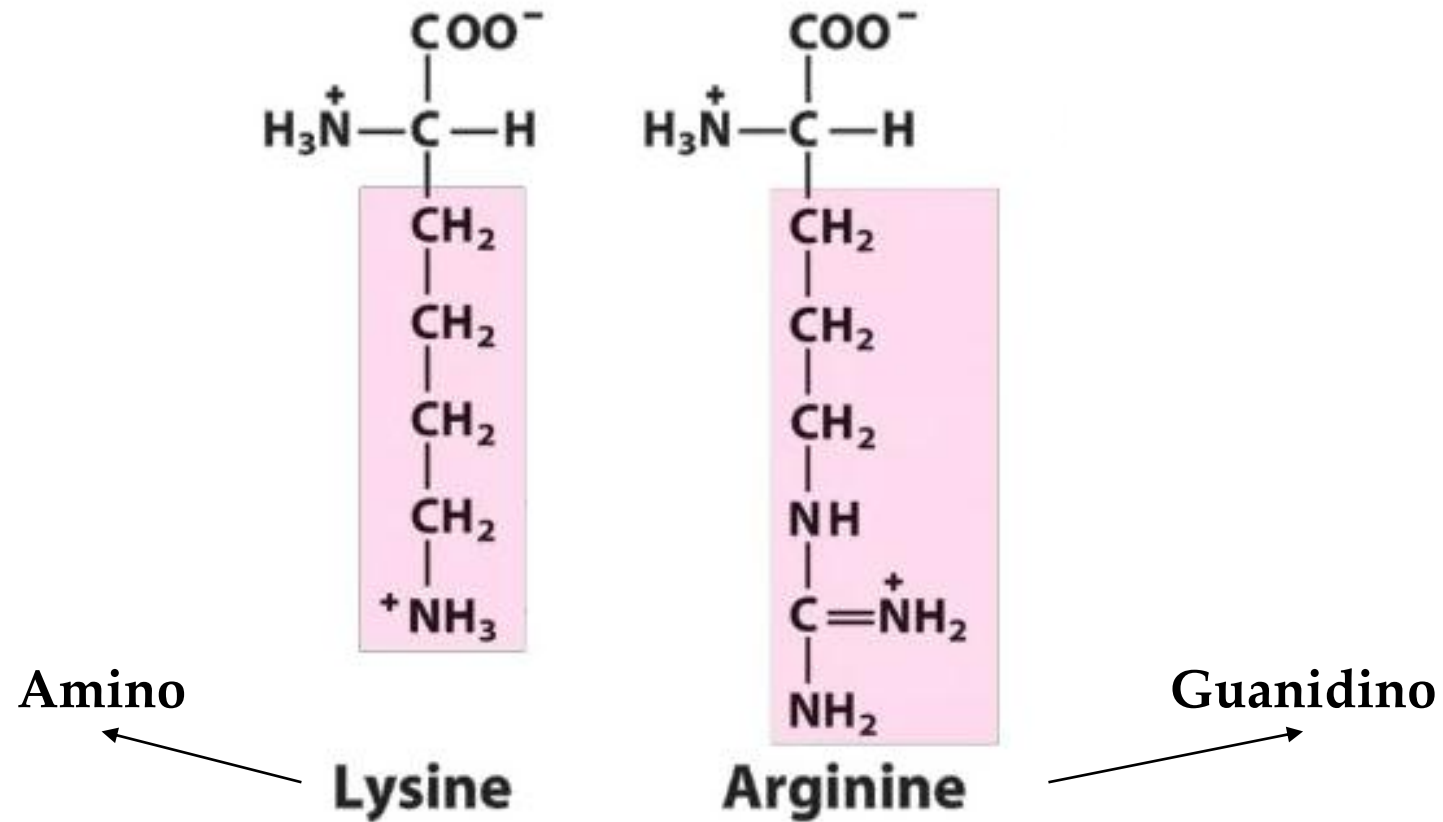
20 $\mu\text{g/ml}$ of
FITC-labeled magainin 2



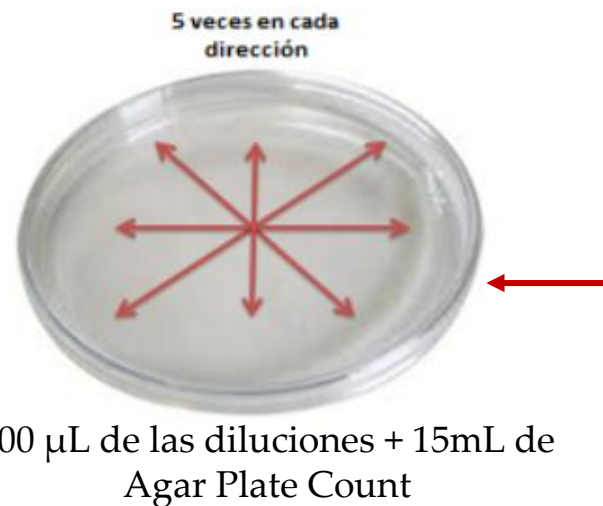
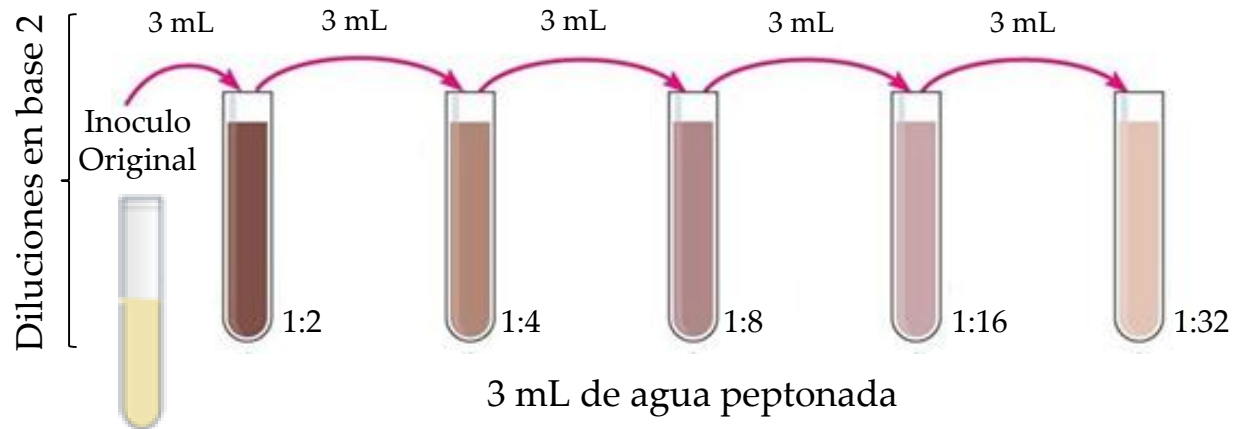
50 $\mu\text{g/ml}$ of
FITC-labeled magainin 2



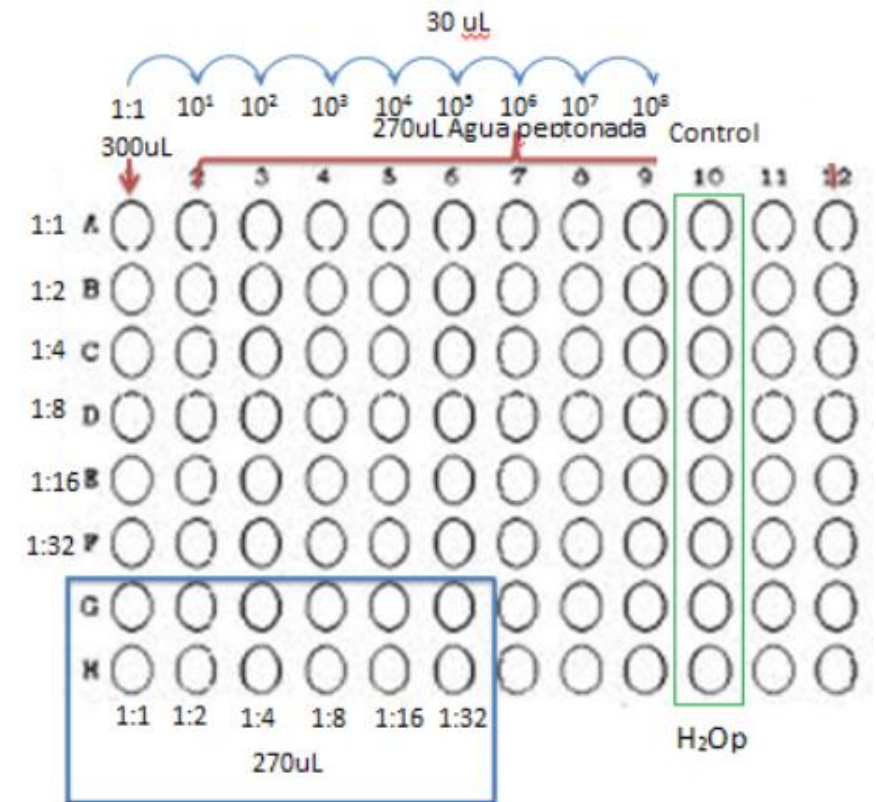
Arginina (Arg) – Lisina (Lys)

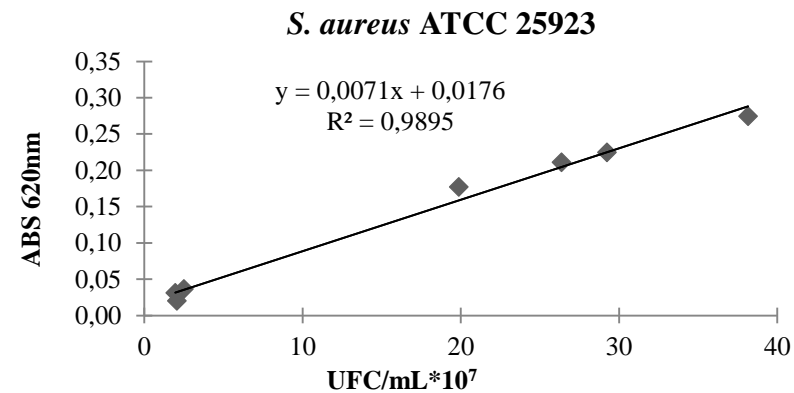
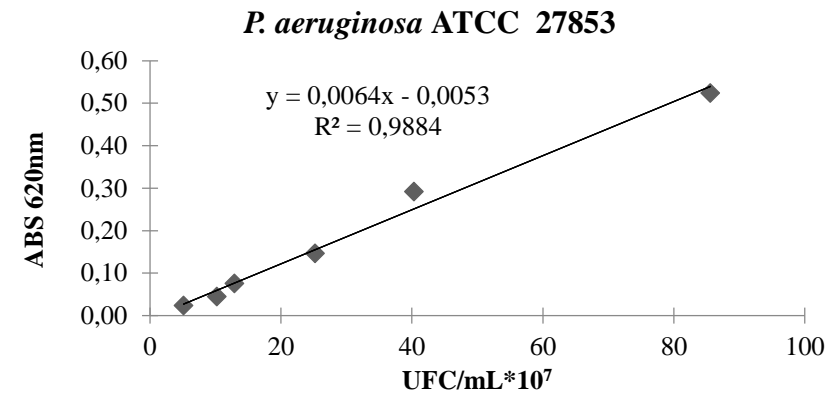
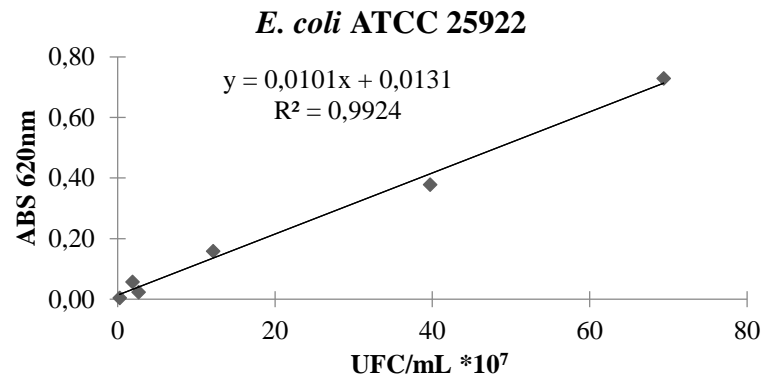


Curvas de calibración



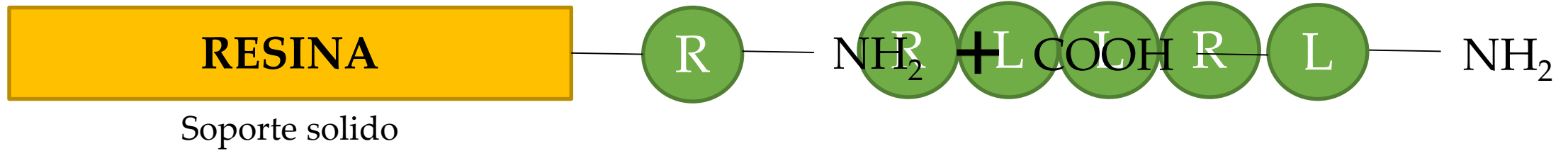
Dilución en base 2	Diluciones decimales sembradas
Original	10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5}
1:2	10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4}
1:4	10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4}
1:8	10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4}
1:16	10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4}
1:32	10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3}



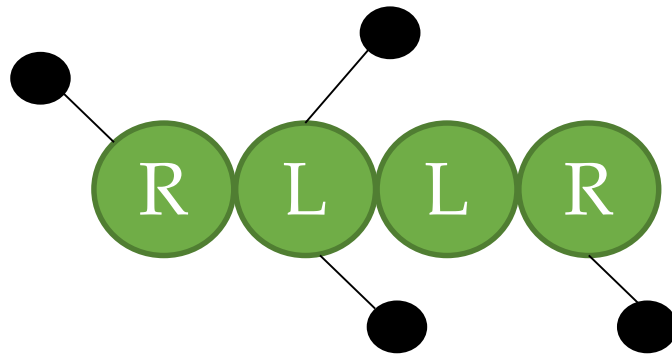


BACTERIA	ATCC	ECUACIÓN	R2
<i>E. coli</i>	25922	$Y = 0,0101x + 0,0131$	0,99
<i>P. aeruginosa</i>	27853	$Y = 0,0064x - 0,0053$	0,98
<i>S. aureus</i>	25923	$Y = 0,0071x + 0,0176$	0,98

Síntesis de péptidos



1. Incorporación de aminoácidos

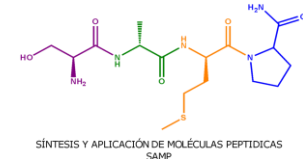


2. Clivaje



3. Purificación

Formula y pesos moleculares



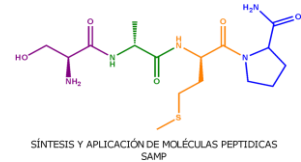
FORMULA CONVERSIÓN $\mu\text{g/mL}$ A μM

$$\frac{\text{CMI} \times 1000}{\text{Peso molecular}}$$

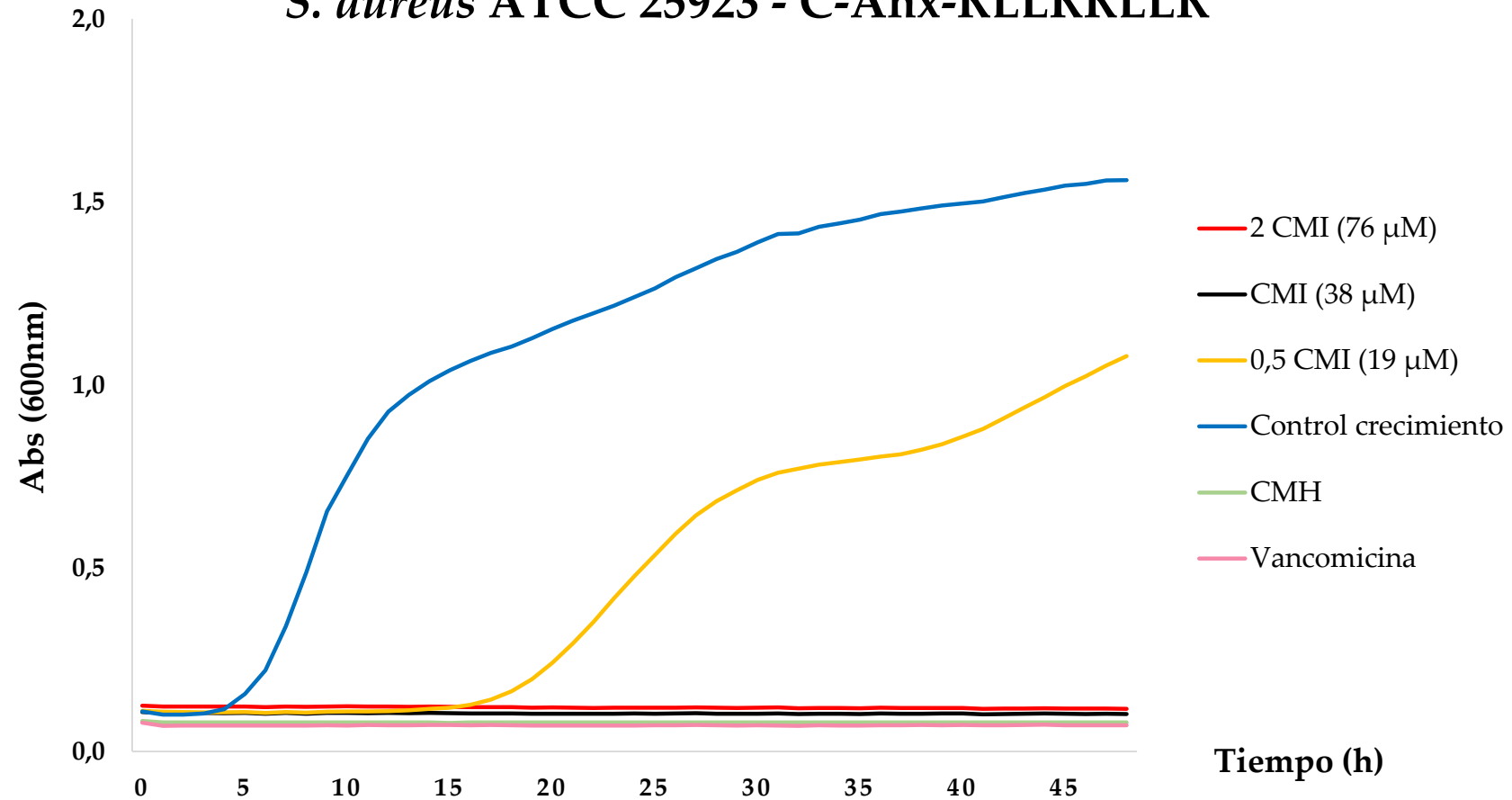
PESOS MOLECULARES

	Código	Secuencia	Peso molecular
BFII ⁽³²⁻³⁵⁾	BFII ⁽³²⁻³⁵⁾	RLLR	556
	Ahx/BFII ⁽³²⁻³⁵⁾	Ahx-RLLR	668
	C/Ahx/BFII ⁽³²⁻³⁵⁾	C-Ahx-RLLR	772
	(R→K) BFII ⁽³²⁻³⁵⁾	KLLK	500
BFII ^{(32-35)pal}	BFII ^{(32-35)pal}	RLLRLLR	1098
	Ahx/BFII ^{(32-35)pal}	Ahx-RLLRLLR	1219
	C/Ahx/BFII ^{(32-35)pal}	C-Ahx-RLLRLLR	1315
	(R→K) BFII ^{(32-35)pal}	KLLKLLK	983

Curva de letalidad

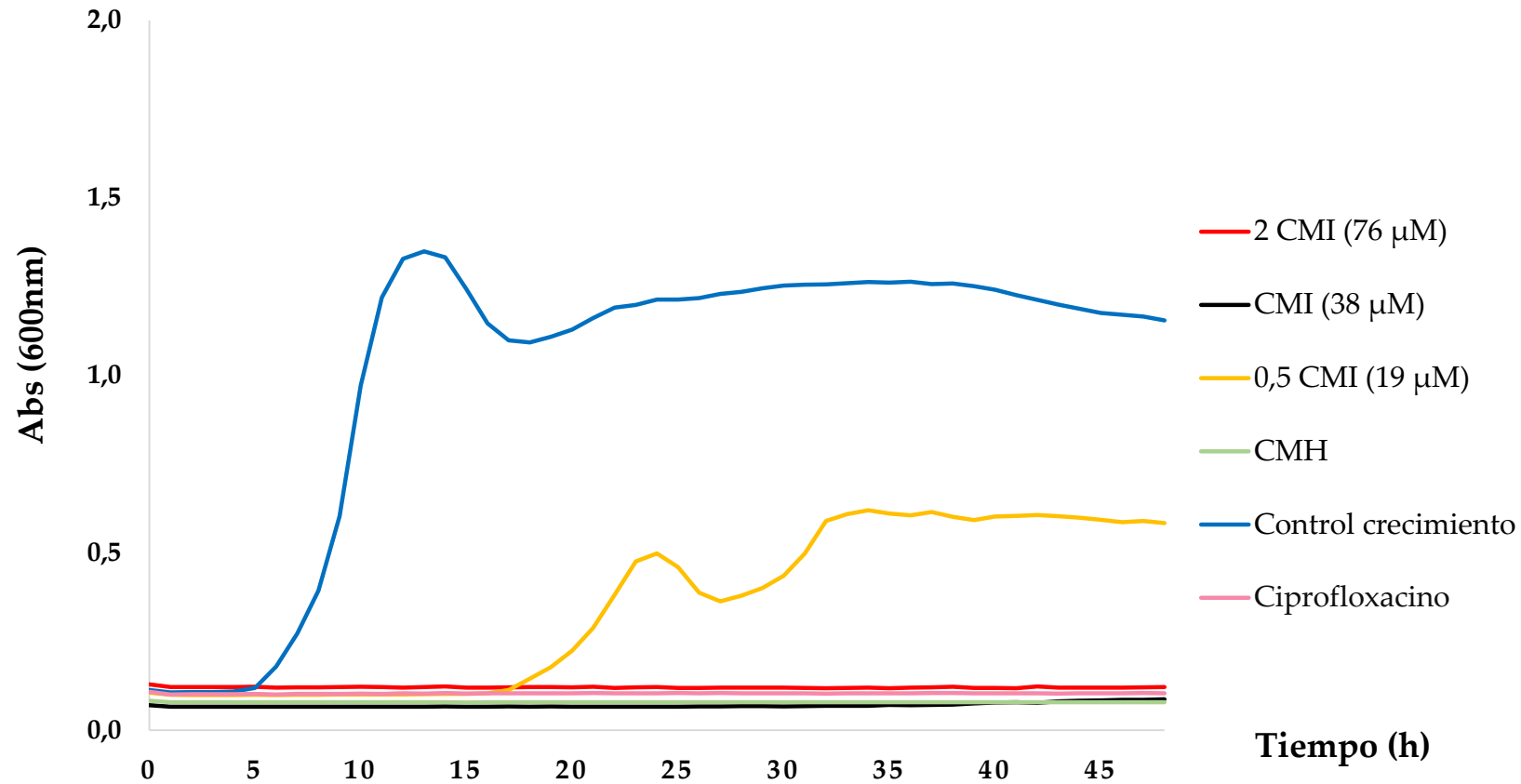


S. aureus ATCC 25923 - C-Ahx-RLLRLLR

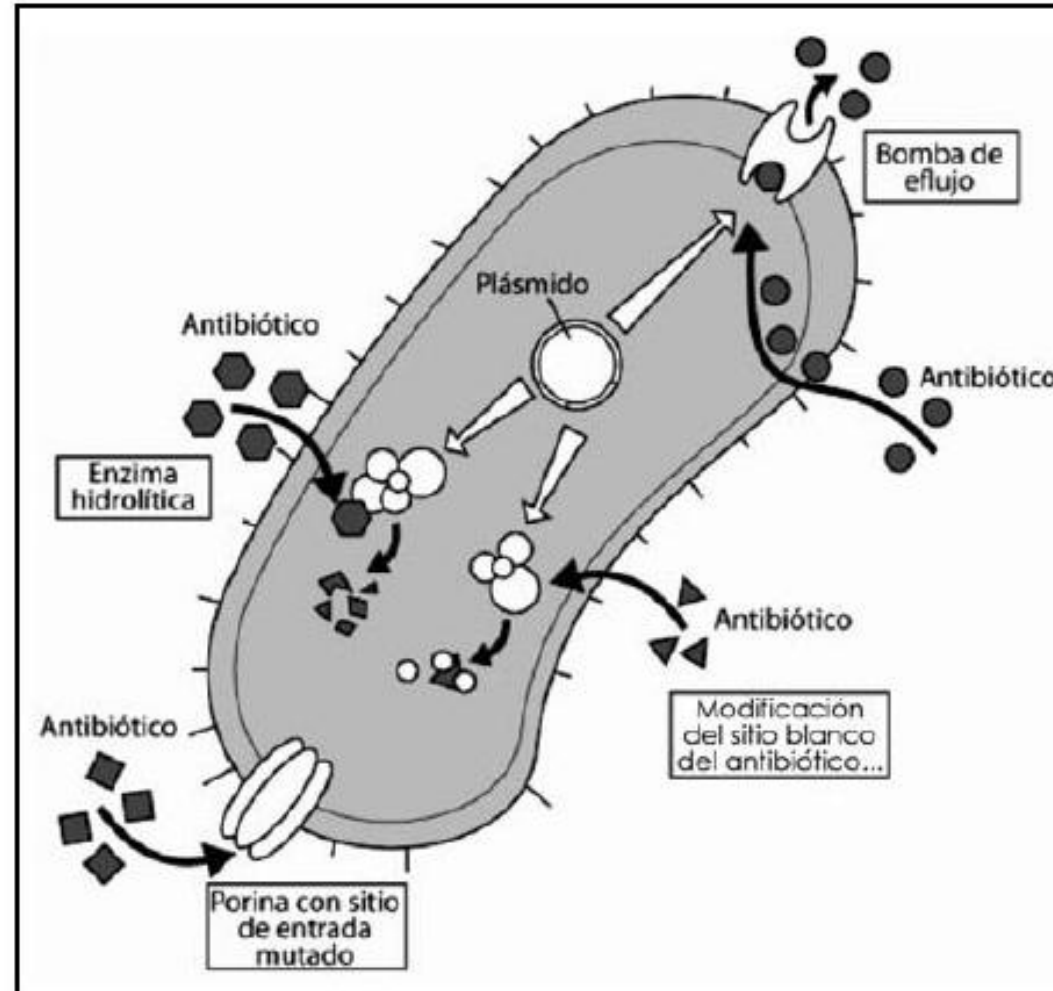


Curva de letalidad

P. aeruginosa ATCC 27853 C-Ahx-RLLRLLR



Resistencia antibióticos



Histonas

