



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

“Síntesis y evaluación del potencial antitumoral y antimicrobiano de pequeños péptidos catiónicos bioinspirados en fosfolipasas de venenos de serpientes”

María Sol Peña Carrillo

26 de febrero de 2020, ciudad de Tena, Napo, Ecuador

DERECHO DE AUTOR

Tena, 26 de febrero de 2020

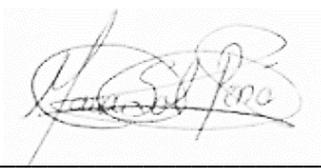
Yo, María Sol Peña Carrillo con documento de identidad N° 1724373269, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'María Sol Peña Carrillo', is centered within a rectangular box. The signature is fluid and cursive.

María Sol Peña Carrillo

CERTIFICADO DEL DIRECTOR

Tena, 26 de febrero de 2020

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Síntesis y evaluación del potencial antitumoral y antimicrobiano de pequeños péptidos catiónicos bioinspirados en fosfolipasas de venenos de serpientes”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: María Sol Peña Carrillo, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Firma:



Firma:



Tutor: Dr. José Rafael De Almeida

C.I:1757448954

Cotutor: MSc. Cristóbal Domínguez

C.I: 0921536843

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor José Rafael de Almeida, por su guía, confianza y apoyo incondicional durante el desarrollo de mi tesis.

A Cristóbal Domínguez, por guiarme diligentemente en el desarrollo de los diferentes ensayos desarrollados en el laboratorio de cultivo celular del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM)

A Joel Medina, por su apoyo y por la colaboración brindada en los procesos de purificación.

A Andrea Carrera, Giovanna Morán y Nina Espinosa de los Monteros, por la ayuda brindada en los ensayos desarrollados en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular.

A mi amigo Alejandro Pinos, que sin su ayuda no hubiese podido cumplir con todos mis objetivos.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma participaron en la realización de esta investigación, hago un sincero agradecimiento.

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo de manera especial a mis padres Carlos Peña y Susana Carrillo, quienes me han apoyado en mis sueños y me han inculcado los mejores valores. Han sabido demostrarme su amor a cada momento y con esfuerzo y sacrificio han sabido sacar adelante a mí y mis hermanos.

De igual manera, dedico mi tesis a mis hermanos, quienes me han apoyado y me han llenado de momentos felices.

A mi sobrina Romina, ya que cada día me motiva a ser una mejor mujer y persona con el fin de que vea en mí un ejemplo a seguir.

A mis compañeros de casa, quienes han sido como mi segunda familia.

Y finalmente a mis gatitos, por ser mi compañía fiel y adorable en estos cinco años de carrera.

ÍNDICE GENERAL

DERECHO DE AUTOR	ii
CERTIFICADO DEL DIRECTOR	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
1. CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	10
1.4. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	11
2. CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	12
2.1. Análisis bioinformático y diseño de péptidos	12
2.2. Síntesis química automática de péptidos diseñados	13
2.3. Identificación de péptidos.....	13
2.4. Purificación.....	14
2.5. Liofilización.....	15
2.6. Ensayos biológicos.....	16
3. CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	21
3.1. Análisis bioinformático y diseño de péptidos	21
3.2. Síntesis automática e Identificación de péptidos	27
3.3. Purificación por cromatografía FLASH	30
3.4. Caracterización por MALDI-TOF MS y RP-HPLC	32
3.5. Ensayos biológicos.....	35
3.5.1. Hemólisis	35
3.5.2. Ensayos anticancerígenos	36
3.5.3. Ensayos antimicrobianos.....	38
3.5.3.1. Concentración mínima Inhibitoria (CMI)	38

4.	CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	41
4.1.	Análisis bioinformático y diseño de los péptidos.....	41
4.2.	Ensayos biológicos.....	43
4.2.1.	Hemólisis	43
4.2.2.	Ensayos anticancerígenos	44
4.2.3.	Ensayos antibacterianos.....	46
5.	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
5.1.	CONCLUSIONES	49
5.2.	RECOMENDACIONES	49
6.	BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de herramientas bioinformáticas usadas para la determinación de propiedades físicas y químicas de los péptidos seleccionados.	12
Tabla 2. Gradiente empleado en el análisis de RP-HPLC de los péptidos sintéticos.	14
Tabla 3. Programa de gradiente utilizado en la purificación de los péptidos sintéticos mediante cromatografía FLASH.....	15
Tabla 4. Péptidos diseñados en base a las secuencias de fosfolipasa A ₂ Asp49 de <i>Bothrops marajoensis</i> , <i>Bothrops moojeni</i> y <i>Cerrophidion godmani</i>	21
Tabla 5. Principales características de los péptidos sintetizados calculadas por la herramienta bioinformática PepDraw	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de escisión de fosfolipasas PLA ₁ , PLA ₂ , PLB, PLC y PLD (2)	3
Figura 2. Análisis de la secuencia de la fosfolipasa A ₂ BmjeTX-I en AMPA.....	22
Figura 3. Análisis de la secuencia de la fosfolipasa A ₂ BmTX-I en AMPA.....	23
Figura 4. Análisis de la secuencia de la fosfolipasa A ₂ Q6EER5 en AMPA.	24
Figura 5. Predicciones de la estructura secundaria de los tres péptidos por I-TASSER. 25	
Figura 6. Proyección helicoidal determinado por NetWheels.	26
Figura 7. Análisis de la capacidad citotóxica de Bmje, Bmtxj y Cergo en ToxinPred.	26
Figura 8. Análisis del potencial hemolítico de Bmje, Bmtxj y Cergo en HemoPI.	27
Figura 9. Espectro de masas del péptido sintético Bmje crudo	27
Figura 10. Espectro de masas del péptido sintético Bmtxj crudo.....	28
Figura 11. Espectro de masas del péptido sintético Bmje crudo.....	28
Figura 12. Cromatograma péptido Bmje crudo..	29
Figura 13. Cromatograma del péptido Bmtxj crudo.	29
Figura 14. Cromatograma del péptido Cergo crudo	30
Figura 15. Cromatograma del péptido Bmje empleando un cromatógrafo FLASH..	31
Figura 16. Cromatograma del péptido Bmtxj empleando un cromatógrafo FLASH.....	31
Figura 17. Cromatograma del péptido Cergo empleando un cromatógrafo FLASH.....	32
Figura 18. Cromatograma del péptido Bmje purificado..	32
Figura 19. Espectro de masa del péptido Bmje purificado..	33
Figura 20. Cromatograma del péptido Bmtxj purificado... ..	33
Figura 21. Espectro de masa del péptido Bmtxj purificado.	34
Figura 22. Cromatograma del péptido Cergo purificado.	34
Figura 23. Espectro de masa del péptido Cergo purificado	35
Figura 24. Evaluación de la actividad hemolítica de Bmtxj, Bmje y Cergo	35
Figura 25. Ensayo de viabilidad celular MTT en HEPA-G2 Y CACO-II.	36
Figura 26. Ensayo de viabilidad celular MTT para cáncer de mama (MCF-7).....	37
Figura 27. Determinación del LC ₅₀ de Bmje en MCF-7.....	38
Figura 28. Evaluación del potencial antimicrobiano del péptido Bmje.	38
Figura 29. Evaluación del potencial antimicrobiano del péptido Bmtxj.	39
Figura 30. Evaluación del potencial antimicrobiano del péptido Cergo.	40

RESUMEN

El cáncer y la resistencia a los antibióticos son algunos de los principales problemas de salud y desafíos que actualmente enfrenta la humanidad, por ello la comunidad científica se ha enfocado en descubrir nuevas moléculas terapéuticas y en base a ellas diseñar nuevos fármacos que mitiguen esta problemática. Los péptidos bioinspirados en fosfolipasas (PLA₂) derivados del veneno de serpientes han surgido como una alternativa innovadora para la inhibición de tumores y de poblaciones microbianas patógenas. En este estudio se sintetizaron tres péptidos derivados de tres PLA₂s Asp49 básicas: Bmje (YNKKYRYHLKSKKADK), Bmtxj (YNKKYMKH LKPCCKA) y Cergo (NLRTYKKRYMFY). Dichas secuencias fueron analizadas por programas bioinformáticos tales como AMPA, PepDraw, I-TASSER, HemoPI, ToxinPred y NetWheels para determinar sus propiedades físico-químicas y su toxicidad *in silico*. Posteriormente, las secuencias seleccionadas fueron sintetizadas, purificadas por cromatografía FLASH e identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS. El grado de pureza se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). Seguidamente, el potencial antitumoral de los péptidos fue evaluado mediante el ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT en tres líneas celulares de carcinoma humano (Caco II, Hep-G2 y MCF-7), mientras que el potencial antimicrobiano fue evaluado en tres cepas bacterianas de interés clínico (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*). Se observó una actividad antitumoral moderada del péptido Bmje contra MFC-7 con una concentración letal media (CL₅₀) de 464,85 µM, mientras que Cergo presentó actividad antimicrobiana contra *E. coli* con un CMI de 75 µM y Bmtxj contra *S. aureus* con un CMI de 37,5 µM. Adicionalmente, ninguno de los tres péptidos evaluados presentó un carácter hemolítico. Estos resultados evidencian que las fosfolipasas representan un grupo de toxinas que puede funcionar como arquetipos adecuados para el diseño de moléculas bioactivas prometedoras contra problemas de salud pública.

Palabras clave: Fosfolipasa, péptido, anticancer, antimicrobiano, catiónico, veneno, serpiente.

ABSTRACT

Cancer and antibiotic resistance are the main health problems facing humanity today. Therefore, the scientific community has focused on discovering new therapeutic molecules and based on them design new medications that mitigate this problem. Bio-inspired peptides in phospholipases (PLA₂) derived from snake venom, have emerged as an innovative alternative for the inhibition of tumors and pathogenic microbial populations. In this study, three peptides derived from Asp49 PLA₂ were synthesized: Bmje (YNKKYRYHLKSCCKADK), Bmtxj (YNKKYMKH LKPCCKKA) and Cergo (NLRTYKKRYMFY). These sequences were analyzed by bioinformatics programs to determine their chemical physical properties, such as AMPA, PepDraw, I-TASSER, HemolP, ToxinPred and NetWheels. Subsequently, they were synthesized, purified by FLASH chromatography and identified by mass spectrometer MALDI-TOF MS. The degree of purity of the three peptides was determined by high efficiency liquid chromatography (RP-HPLC). Then, the antitumor and antimicrobial potential of the peptides was evaluated by cell viability assay by reduction of MTT in three human carcinoma cell lines (MCF-7, Caco II and Hep-G2), while antimicrobial potential was estimated in three bacterial strains of clinical interest (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*). Bmje presented a moderate anti-cancer activity in MFC-7 with a mean lethal concentration (LC₅₀) of 464.85 μM, while Cergo showed antimicrobial activity against *E. coli* with a MIC of 75 μM and Bmtxj against *S. aureus* with a MIC of 37,5 μM. In addition, none of the three peptides evaluated presented a hemolytic character. These results show that phospholipases represent a group of toxins that can function as specific archetypes for the design of promising bioactive molecules against public health problems.

Keywords. Phospholipase, peptide, anti-cancer, antimicrobial, cationic, venom, snake.

1. CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Problemas de salud pública: el cáncer y la resistencia a los antibióticos

Actualmente, el mundo enfrenta una serie de problemas de salud pública que requieren atención y entre ellos están el cáncer y la resistencia a los antibióticos (1,2). Se estima que si no se logra encontrar soluciones efectivas hasta el año 2050 ambos problemas de salud en conjunto llevarían a más de 18 millones de muertes en el mundo (3). Por ello, es de extrema utilidad conocer a fondo sobre el cáncer, la resistencia a antibióticos e investigar sobre posibles terapias innovadoras.

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen genético caracterizadas por la proliferación y crecimiento descontrolado de células somáticas. Estas células presentan una alta resistencia a la apoptosis lo que les confiere una baja tasa de mortalidad, y la capacidad de diseminarse a los tejidos aledaños y proliferar provocando una metástasis (4–6). El proceso por el cual se origina el cáncer es causado por alteraciones en el material genético tales como: mutaciones puntuales, amplificaciones, translocaciones y deleciones en cromosomas y mutaciones en protooncogenes volviéndolos oncogenes (5,6). Las alteraciones o mutaciones en el genoma pueden ser provocadas por distintos agentes como: la exposición a infecciones virales como HVP, a influencias ambientales como la exposición a agentes cancerígenos o a la radiación y al estilo de vida que se lleve (7).

Actualmente existen diversos tratamientos disponibles que buscan mitigar y eliminar el cáncer, como son: la cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia (6,8). Sin embargo, debido a los problemas inherentes a cada una de estas estrategias, la comunidad científica continúa buscando y desarrollando nuevos potenciales fármacos antitumorales de origen sintético o natural (9).

Por otro lado, la resistencia se define como el mecanismo por el cual un microorganismo patógeno logra disminuir la acción de los agentes antimicrobianos (10). Se considera que existe resistencia microbiana a un fármaco cuando este requiere de una concentración al menos cuatro veces mayor a la concentración mínima inhibitoria (CMI) (11). Se piensa que dicha resistencia nace como una respuesta de los microorganismos al

uso y el abuso de los antibióticos actuales, los cuales en su mayoría no han sido renovados desde la década de 1940 cuando fueron descubiertos (1,12–14).

Actualmente, el número de cepas bacterianas resistentes supera el número de compuestos antibióticos clínicamente aprobados en las últimas décadas (14). En virtud de esto, este obstáculo se ha convertido en un desafío mundial que requiere atención prioritaria.

Ante este contexto, la comunidad científica se ha dedicado a revelar nuevas estructuras moleculares capaces de abordar ambos problemas de salud pública. Tal es el caso de los venenos aislados de serpientes, los cuáles proveen de un amplio catálogo de moléculas dinámicas que sirven como plantillas potenciales para el desarrollo de estrategias innovadoras de tratamiento para combatir tanto a las bacterias resistentes como a las células tumorales (14–16).

1.1.2. Venenos de serpientes

Los venenos de serpientes están conformados por una amplia diversidad estructural y funcional de diferentes moléculas que incluyen péptidos, carbohidratos, proteínas, minerales y enzimas (17). Los elementos clave de estos cocteles proteicos a menudo son enzimas tales como las neurotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas y hematoxinas. Su efecto tóxico radica en la acción sobre blancos celulares específicos cumpliendo funciones de inmovilización y predigestión de las distintas presas (7,18,19).

Debido a la especificidad de los efectos biológicos, los componentes de los venenos se han convertido en materiales valiosos para la investigación. Lo cual incluye análisis estructurales y determinación del potencial terapéutico posibilitando el desarrollo de nuevos fármacos. (7,18). Dentro del grupo de biomoléculas con destacado potencial terapéutico se puede encontrar serinproteasas, metaloproteasas, acetilcolinesterasas, L-aminoácido oxidasas, desintegrinas, lectinas y principalmente fosfolipasas A_2 (PLA₂) (17,20). En especial estas últimas moléculas (PLA₂) poseen un valor terapéutico reconocido por sus distintas aplicaciones y propiedades farmacológicas (14). Además, están entre las proteínas más estudiadas y caracterizadas de los venenos de serpientes (21).

1.1.3. Fosfolipasas

Las fosfolipasas se conocen como un grupo de toxinas hidrolíticas que presentan la capacidad bioquímica de romper los enlaces éster presentes en los glicerofosfolípidos. Su mecanismo de acción resulta en la liberación de ácido araquidónico y lisofosfolípidos (22). Según el sitio de incisión, las fosfolipasas se clasifican en 5 grupos que son: A₁, A₂, B, C y D (7) (Figura 1).

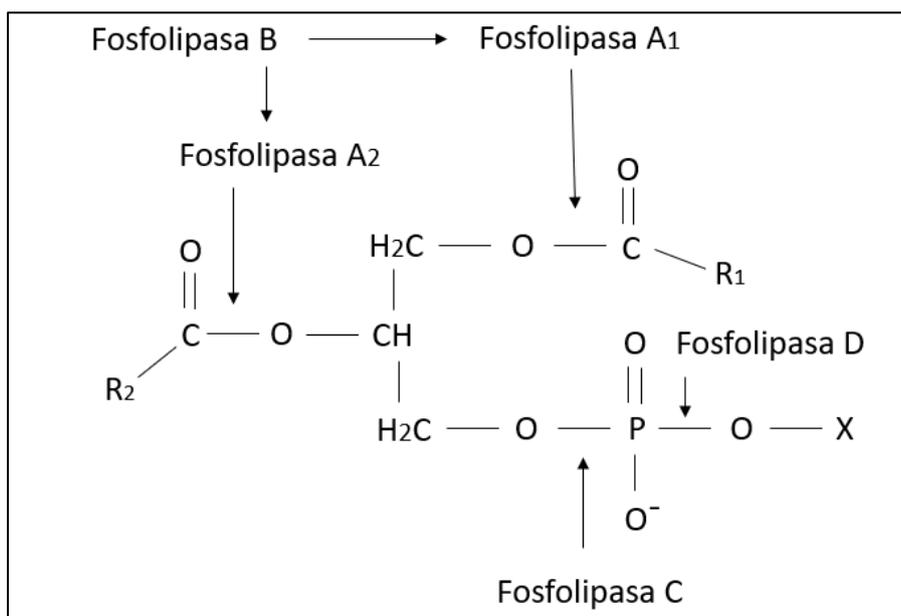


Figura 1. Sitios de incisión de las fosfolipasas PLA₁, PLA₂, PLB, PLC y PLD (7) . Las toxinas fosfolipasas actúan hidrolizando lípidos de membrana y pueden ser clasificadas según el sitio de corte y especificidad a este sustrato.

Las PLA₂s suelen ser las toxinas más abundantes en el veneno de serpientes, los cuales desencadenan una serie de alteraciones y desorganización en las membranas celulares (9,14). Tales eventos moleculares culminan en varios efectos farmacológicos incluyendo: miotoxicidad, anticoagulación, neurotoxicidad, relajación vascular e hipertensión (18). Generalmente, la actividad enzimática de las PLA₂s contribuye a sus propiedades biológicas. Por ejemplo, su participación en el proceso de inflamación depende de la liberación de factores proinflamatorios como el lisofosfolípido y el ácido araquidónico, que son productos de la catálisis llevada a cabo por estas biomoléculas (7,23)

Según el peso molecular, la secuencia de aminoácidos, la ubicación de los puentes de disulfuro y la necesidad de Ca^{2+} , las fosfolipasas A_2 se clasifican en 16 grupos (7), aunque otros autores indican la existencia de sólo 12- 14 grupos (22). Dentro de estos grupos se da una subdivisión en cinco tipos principales de enzimas que son: las secretadas (sPLA_2), las independientes de calcio (iPLA_2s), las citolíticas (cPLA_2s), las que se localizan en el tejido adiposo (AdPLA_2), las acetilhidrolasas del factor de activación plaquetaria (PAF-AH) y las lisosomales (24,25).

Desde el punto de vista estructural, las PLA_2s presentan 6 puentes de disulfuro y requieren del ion divalente Ca^{2+} para proceder con su mecanismo catalítico. Además, se conoce que su sitio activo comprende principalmente los residuos de histidina en la posición 48 (His48) y el ácido aspártico en la posición 99 (Asp99). En base a la diferencia en el centro activo y a la posición de uno de los seis puentes disulfuro, las sPLA_2 se subdividen en dos grupos que son: IA (Crotalidae y Elapidae) y IIA (Crotalidae y Viperidae) (7).

Del grupo IIA de origen Viperidae nacen dos subgrupos: Asp49, y Lys49 conocidas como homólogas (26). La principal diferencia entre estas isoformas Asp49 y Lys49 es que la segunda no posee actividad catalítica ya que el cambio de la carga presente en la posición 49 de la estructura de estas toxinas no permite el enlace al cofactor Ca^{2+} , fundamental para la catálisis enzimática (22). Sin embargo, a pesar de perder su capacidad de hidrolizar los fosfolípidos de membrana, las PLA_2s Lys49 mantienen sus propiedades biológicas como miotoxicidad, edema, actividad anticoagulante, antibacteriana y antitumoral (7,22,26). Estas toxinas inducen sus efectos mediante la interacción de regiones moleculares de su estructura con los componentes de los objetivos celulares. Por lo anteriormente expuesto, estas biomoléculas se han convertido en modelos moleculares y estructurales para el diseño de moléculas bioactivas con capacidad de interactuar con membranas de diferentes microorganismos y células relacionadas con enfermedades de importancia clínica (12,13)

Existen numerosos estudios que emplean las proteínas PLA_2 de venenos de serpientes como fuentes para el desarrollo de nuevos fármacos, ya que estas proteínas pueden mostrar efectos tóxicos y farmacológicos de interés por diferentes mecanismos (14,17,26,27). Pueden ejercer efectos antibacterianos, antifúngicos, anticoagulantes, antiplaquetarios e inclusive antitumorales (20). Por ejemplo, las fosfolipasas Asp49 CC- PLA_2s -1 y CC- PLA_2s -2 de *Cerastes cerastes* y MCL- PLA_2 de *Macrovipera vipera* presentan

actividad antitumoral al inhibir la adhesión y migración de células tumorales interactuando directamente con las integrinas αv y $\alpha 5\beta 1$. Estas mismas fosfolipasas reducen la angiogénesis y se infiere que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría estar implicada al ser bloqueada. También, se piensa que el bloqueo de los factores de crecimiento VEGF por estas proteínas da como resultado la antiangiogénesis (27,28). Además, en un estudio realizado por Nelson y colaboradores (29), se planteó la estrategia de un efecto sinérgico entre las fosfolipasas A_2 y las drogas tradicionales, como el paclitaxel, para tratar un linfoma de ratón en cultivo celular, teniendo resultados positivos al incrementar la muerte de células tumorales.

En el ámbito antimicrobiano, las PLA₂s (en sus dos isoformas Asp49 y Lys49) han mostrado una alta actividad antibacterial inclusive contra bacterias resistentes (30). Por ejemplo, el estudio realizado por Sudrshan y Dhananjaya (14,31), han demostrado el potencial antimicrobiano de la proteína básica VRV-PL-V (fracción de fosfolipasa A_2 del veneno de *Vipera russellii*) contra bacterias de tipo Gram positivas como *B. subtilis* y *S. aureus*, y Gram negativas como *E. coli*, *Xanthomonas axonopodis pv*, *Salmonella paratyphi* y *Vibrio cholerae*, con un CMI que oscilan entre 13 y 24 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Ante este alto potencial farmacológico y capacidad de interactuar con membranas celulares presentados por las PLA₂s derivados de veneno de serpientes, la comunidad científica ha optado por diseñar péptidos catiónicos inspirados en estas enzimas (14,26,32). El uso de péptidos ha emergido como un tratamiento potencial e innovador contra diversos patógenos en respuesta a la falla mundial de las terapias anticancerígenas tradicionales y los medicamentos antibacterianos actualmente disponibles en la clínicas (14).

1.1.4. Péptidos

Los péptidos son un tipo de biomolécula, de carácter anfótero, formadas por la unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos (33). A diferencia de las proteínas, los péptidos son más pequeños y tienen menos de 10 000 o 12 000 Daltons de masa (34). Se han identificado alrededor de 7 000 péptidos naturales capaces de ejercer varias funciones en los organismos actuando como neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento, ligandos de canales iónicos o como agentes antiinfecciosos (35).

La diversidad funcional, estructural y propiedades terapéuticas de este grupo de moléculas, les han convertido en un atractivo punto de partida para el diseño de nuevas

terapias. Además, se ha visto que su especificidad permite que sean más seguros, tolerables y eficaces en los seres humanos (35). Algunos estudios han demostrado la estabilidad térmica y solubilidad en agua de diferentes péptidos, e inclusive han mostrado su capacidad de promover la generación de inmunidad innata en el paciente (36).

Estas características, sumado a que su síntesis no es tan compleja y su costo de producción es relativamente bajo comparado con determinadas medicinas usadas en la terapia actual (35), han permitido el desarrollo de drogas peptídicas clínicamente aprobadas y que generan altas ganancias que alcanzan los billones de dólares. Entre los diferentes casos exitosos de la aplicación médica de la tecnología peptídica, están los fármacos: Captopril usado para el tratamiento de la hipertensión, Exenatide usado como terapia la diabetes tipo 2 (9) y Lupron útil en las terapias oncológicas, entre otros. (35).

Sin embargo, previo a su aplicación, los péptidos deben superar una serie de desafíos asociados con su naturaleza biológica y química, tales como: eliminación rápida por riñones e hígado, elevada toxicidad, incapacidad de administración oral, y baja estabilidad metabólica (37). Por lo anteriormente expuesto, investigadores dedicados a la síntesis, diseño y evaluación de péptidos se han enfocado en mejorar las propiedades fisicoquímicas de péptidos inspirados en sus formas nativas con el fin de volverlos más eficaces, selectivos, menos tóxicos y que su vida en el plasma se extienda (12,13,21). Según los mismos autores, actualmente se ha buscado desarrollar múltiples estrategias informáticas y experimentales para el diseño de péptidos multifuncionales que funcionen como agentes antimicrobianos, antitumorales, estimuladores de la respuesta inmune, cicatrización de heridas, entre otros.

1.1.5. Características fisicoquímicas relacionadas con la actividad antitumoral y antimicrobiana de péptidos

De manera continua se han diseñado, sintetizado y evaluado péptidos con propiedades farmacológicas, pero aún hoy no existe una relación clara entre la estructura de un péptido antimicrobiano o anticancerígeno y su grado de actividad que también depende en gran medida de la célula blanco (ya sea bacteria, parásito, hongo o células cancerígenas) (12). Sin embargo, existen ciertos lineamientos generales que deben ser considerados al momento de identificar regiones moleculares de interés en proteínas y al plantear una serie

de cambios al diseño de un nuevo péptido antitumoral y/o antimicrobiano. Tales lineamientos son: hidrofobicidad, anfipaticidad, carga neta y estructura (12,38).

De estos principios, son la hidrofobicidad, la carga del péptido y la anfipaticidad los que más importancia tienen, ya que estos permiten la interacción con las membranas negativas del objetivo y su posterior desestabilización. Específicamente, es la carga catiónica lo que permite que se dé la interacción electrostática con la membrana aniónica celular para luego, con su hidrofobicidad, introducir el péptido antimicrobiano (PAM) y/o anticancerígeno (PAC) en la membrana (12,13,21,39) provocando así la permeabilización y que el contenido interno del objetivo se desborde, seguido de la lisis y muerte del mismo (13,21,40,41). Por otro lado, se considera que la anfipaticidad (propiedad en la que el péptido presenta una cara hidrofóbica y una hidrofílica) es importante para la actividad antimicrobiana y selectividad de los PAMs y PACs, ya que su aumento o disminución afecta considerablemente la interacción con las membranas celulares (12,42).

1.1.6. Péptidos anticancerígenos derivados de fosfolipasas provenientes de venenos de serpientes

Además de existir un gran registro de investigaciones que manifiestan el potencial anticancerígeno de las PLA₂s aislados del veneno de serpientes, hay también estudios que plantean el diseño de nuevos péptidos inspirados en estas enzimas en base a los sitios farmacológicos específicos. La ventaja del uso de péptidos antitumorales radica en su alta afinidad, fuerte especificidad, baja toxicidad y buena penetración de los tejidos debido a su pequeño tamaño (43)

Por ejemplo, los experimentos realizados por Lomonte (16,26) y Gebrim (44) se han enfocado en la caracterización estructural y funcional de péptidos sintéticos catiónicos derivados de la región C-terminal (residuos 115-129) de PLA₂s Lys49. En el primer estudio se observó que las células tumorales son susceptibles a la acción de estos péptidos sintéticos cortos (pEM-2 y p-Appk de 13aa) generando una reducción del 36% de la masa tumoral en 23 días lo que le confiere un efecto similar, e inclusive levemente superior, al dado por la droga antitumoral paclitaxel. Se observó también que las modificaciones en cuanto al tamaño, carga, hidrofobicidad, estructura secundaria y anfipaticidad de las secuencias de estos péptidos pequeños (pEM-2 y p-Appk) pueden mejorar su efecto antitumoral y su

selectividad. En un segundo estudio se evaluó el potencial anticancerígeno del péptido BPB-BthTX-I *in vivo*, el cual redujo el 79% del tamaño del tumor en 60 días en comparación del grupo de control no tratado (44). Estas propiedades antitumorales, presentados por los péptidos descritos, podrían ser de interés en el desarrollo de estrategias terapéuticas con el cáncer.

1.1.7. Péptidos antimicrobianos derivados de fosfolipasas provenientes de venenos de serpientes

Diversos estudios han establecido que las PLA₂s de tipo Asp49 y Lys49 son macromoléculas con un alto potencial antimicrobiano (15,21,45). Sin embargo, dentro de las secuencias de dichas toxinas existen regiones moleculares, que han demostrado que pueden ejercer los mismos efectos antibacterianos presentados por las PLA₂s usadas como modelos (21,26,32). Este es el caso del primer péptido sintetizado p115-129 (bioinspirado en la región C-terminal p115-129 de PLA₂s del veneno de la serpiente *Bothrops asper*), que mostró una mayor actividad antibacteriana contra bacteria Gram-positivas y Gram-negativas a comparación de la miotoxina original (46). Posteriormente, en base a esta secuencia de p115-129, se sintetizó un péptido modificado llamado pEM-2 (32), que con unas concentraciones mínimas provocó un efecto bactericida en contra las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (1 mg/mL), *Vibrio cholerae* (1 mg/mL) *Shigella sonnei* (1 mg/mL) *Escherichia coli* (5 mg/mL) *Enterococcus faecalis* (5 mg/mL) y *Staphylococcus aureus* (5 mg/mL).

Recientemente se sintetizó el péptido antibacteriano pC-CoaTxII derivado de una PLA₂ Lys49, el cual posee aminoácidos cargados positivamente e hidrofóbicos, lo que genera interacción fuerte con las membranas lipídicas aniónicas como las de las bacterias. El péptido fue probado en cinco bacterias incluyendo los aislados clínicos que presentan resistencia a los antibióticos (47). Este mostró inhibición (> 50%) contra *S. aureus* BEC9393, *P. aeruginosa* ATCC y *E. coli* ATCC a las concentraciones de 11,92 μM, 5,95 μM y 47,67 μM respectivamente. Esta actividad confirma el potencial que tienen los péptidos diseñados en base PLA₂s para combatir la resistencia bacteriana, e inclusive presentan una probabilidad muy baja de generar dicha resistencia (47,48).

1.1.8. Péptidos multifuncionales que presentan actividad anticancerígena y antimicrobiano

Existen varios estudios que han mostrado que varios PAMs también poseen una actividad antitumoral. Esto se debe principalmente a que las células cancerígenas presentan diferentes características a las células normales, tales como un aumento de la carga negativa en la membrana, una mayor área de superficie y un citoesqueleto menos desarrollado (7,26,49). Esta carga negativa en la membrana es el factor clave para la selectividad y toxicidad de los péptidos (50).

Debido a la similitud entre las barreras lipídicas de bacterias y células tumorales, se considera que los PAMs funcionan de la misma forma: insertándose en las bicapas de lípidos provocando poros por donde se da una fuga de contenido. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que los PAMs pueden interactuar con moléculas receptoras de membrana y provocar diversos procesos que afecten las vías de señalización y los orgánulos (49), en especial las mitocondrias (50), para así iniciar las señales de muerte.

Actualmente, existe diversas PLA₂s y péptidos derivados que presentan ambas actividades antitumoral y antimicrobiano, tales como: pEM-2, MVL.PLA₂, Drs-PLA₂, BPB-BthTX-I, CC-PLA₂-1 y 2, BthA-I-PLA₂, entre otros (17). Estas presentan características comunes, tales como: carga positiva, cadenas cortas, hidrofobicidad y anfipaticidad, las cuales han sido relacionadas con su actividad de amplio espectro (51).

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer y la resistencia bacteriana son problemas de salud pública de suma importancia que ameritan la atención de la comunidad científica y médica mundial (52). El cáncer constituye la segunda causa de decesos en el mundo provocando cerca del 13% de todas las muertes. Además, de acuerdo a los datos la OMS, en 2018 se registraron alrededor de 17 millones de casos nuevos, de los cuales 9,6 millones terminaron en decesos (7,53,54). Se prevé que para el 2040 habrá 27,5 millones de casos nuevos. En Ecuador la incidencia en 2018 de cáncer fue de 157,2 casos por cada 100 000 habitantes, lo que constituye un importante problema de salud pública (55).

En el último siglo, se ha optado por tres tratamientos tradicionales para combatir las células cancerígenas. Estos son: cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, estos procedimientos son considerados invasivos y causan varios efectos secundarios como pérdida de peso, náuseas, vómitos y el debilitamiento del sistema inmune (56,57) que a su vez hace más propenso al paciente de sufrir de otros padecimientos provocados por agentes patógenos.

Adicionalmente, se ha observado una creciente resistencia hacia los fármacos anticancerígenos (58–61). El origen de esta renuencia puede darse por factores farmacológicos y celulares. Por otro lado, se proyecta que en los próximos 30 años las enfermedades de origen bacteriano superen en muertes a las causadas por cáncer, provocando también la prolongación de las estancias hospitalarias y el incremento de los costos médicos (21). Además, se estima que a nivel mundial se dan alrededor de 700 000 muertes a causa de infecciones por bacterias resistentes a los medicamentos actuales y que la cifra ascendería a 10 millones en los próximos 35 años (62). Otra problemática a considerar es que son pocas las farmacéuticas que invierten en recursos para la investigación de nuevos potenciales fármacos antimicrobianos, debido a que se considera poco rentable y es alta la dificultad de encontrar una nueva medicina que en un futuro no pierda gradualmente su capacidad antibacteriana (63). Por ello, el hallar nuevos antibióticos, cuyos costos de producción sea bajo y no generen resistencia, se ha convertido en una necesidad urgente.

En este contexto, es vital el desarrollo de nuevos tratamientos con mayor efectividad y selectividad, con el fin de aumentar la probabilidad de supervivencia de los pacientes que padecen de enfermedades cancerígenas o de infecciones severas por bacterias resistentes (12–14).

1.3. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos médicos, tanto para infecciones bacterianas como para enfermedades cancerígenas, han denotado un creciente declive causado por la resistencia que presentan varios patógenos hacia las drogas actuales (11,13,21,63,64). A este problema se le suma el hecho de que los abordajes terapéuticos actuales pueden provocar

efectos secundarios con serias secuelas en un futuro próximo o lejano, especialmente en los pacientes con cáncer (8,57,65).

Haciendo frente a esta problemática los investigadores se han enfocado en desarrollar nuevos agentes antimicrobianos y anticancerígenos con diferentes mecanismos de acción (9,17,26,66). Los PAMs y PACs de origen natural son considerados como buenos prospectos para la generación de nuevos medicamentos. Este es el caso de los péptidos derivados de fosfolipasas A₂ provenientes del veneno de serpiente, ya que presentan un carácter catiónico y anfipático, lo cual les otorgan una alta selectividad por diversos agentes patógenos y células cancerígenas caracterizadas por tener membranas con carga negativa (14). Por ello, es necesario diseñar y sintetizar péptidos sintéticos bioinspirados en PLA₂ de venenos de serpientes para que sean la base de nuevos medicamentos que puedan combatir las infecciones bacterianas y tratar diversos carcinomas sin generar efectos secundarios y sin inducir resistencia.

1.4. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

1.4.1. General

- Sintetizar y evaluar el potencial anticancerígeno y antimicrobiano de péptidos sintéticos pequeños bioinspirados en PLA₂s provenientes de venenos de serpientes.

1.4.2. Específicos

- Identificar regiones moleculares presentes en PLA₂ provenientes de venenos de serpientes con propiedades antitumoral y antibacterial.
- Sintetizar péptidos cortos derivados de la estructura primaria de las PLA₂s.
- Caracterizar propiedades físico-químicas y biológicas de los péptidos mediante análisis bioinformático.
- Determinar la citotoxicidad de los péptidos frente a eritrocitos humanos.
- Evaluar el potencial antitumoral y antimicrobiano de los péptidos sintéticos mediante ensayos biológicos.

2. CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Análisis bioinformático y diseño de péptidos

Para esta fase se generó una biblioteca con la información de las secuencias de una serie de PLAs, con sus respectivas características físico-químicas que fueron estimadas con el auxilio de herramientas de bioinformática disponibles en la plataforma Expasy (67). Se utilizó la aplicación web AMPA (68) con la finalidad de detectar regiones antimicrobianas en las proteínas de la librería y BLAST para evaluar homologías. En base a esto, se seleccionaron tres toxinas PLA₂s básicas que presentaron regiones con un probable potencial antibacterial. A partir de estas secuencias se definió el diseño y síntesis de 3 péptidos, de 10 a 20 aminoácidos a los cuales se les agregó un grupo amida al extremo C-terminal. Se seleccionaron tres PLA₂s Asp49 como arquetipos moleculares, porque son las menos estudiadas con este fin, en comparación a las PLA₂s Lys49. Posteriormente, una vez seleccionadas las secuencias de los péptidos, se procedió a analizarlas por medio de diferentes herramientas bioinformáticas que están descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Listado de herramientas bioinformáticas usadas para la determinación de propiedades físicas y químicas de los péptidos seleccionados.

Software libre	Función	Ref.
PepDraw	Calcula valores de carga, hidrofobicidad, punto isoeléctrico (pI) y masa	(69)
I-TASSER	Predice la estructura secundaria en base a una secuencia	(70)
NetWheels	Crea proyecciones de red y ruedas helicoidales para péptidos	(71)
ToxinPred	Predice la citotoxicidad de estos péptidos frente a células humanas	(72)
HemoPI	Predice la actividad hemolítica	(73)

2.2. Síntesis química automática de péptidos diseñados

Para la síntesis lineal automática en fase sólida de los péptidos se aplicó la estrategia Fmoc, usando como equipo un sintetizador automatizado de microondas Liberty Blue™ de la Corporación CEM. Se pesó 0,192g de resina de tipo Rink Amide Norabiochem (100-200 mesh) con 0,52 de granulación. Cada péptido fue sintetizado a partir del carboxilo al amino terminal. Para las desprotecciones se usó piperidina. Una vez que finalizado la síntesis de la cadena polipeptídica, la misma se liberó de la resina con el auxilio de una solución ácida que incluye 95% TFA, 2,5% triisopropil silano (TIPS) y 2,5% agua a temperatura ambiente. La extracción del péptido se realizó por medio de lavados sucesivos con éter etílico frío (36). Finalmente, se liofilizó los péptidos a -80°C y con una presión de 0,09 mT por 24 horas.

2.3. Identificación de péptidos

2.3.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF MS

Para aseverar la presencia del péptido se analizó el producto de síntesis por espectrometría de masas con desorción iónica provocada por láser y asistida por matriz con detección de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS). Se pesó aproximadamente 0,1 mg de péptido crudo y se le agregó 50 µL de agua ultra pura. A la par, en una placa de metal, se agregó 1 µL de matrix ácido α-Cyano-4-hidroxicinámico (CHCA) y se dejó secar a temperatura ambiente, luego se añadió 2 µL de la solución péptido-agua. La muestra fue analizada en modo Reflectrón con un poder de 40 unidades, recogiendo 500 perfiles por cada muestra y dando dos disparos por cada perfil.

2.3.2. RP-HPLC

Para determinar el grado de pureza de los péptidos, se procedió a analizarlos por RP-HPLC, usando un cromatógrafo (marca Waters) de cuatro bombas, más una columna (marca Phenomenex) C-18 (5µm, 300 Å) de tipo analítica con dimensiones de 250 x 4.6 mm. Las fases móviles fueron (A) agua con ácido fórmico al 0,1% y (B) ACN con ácido fórmico al 0,1%, los mismos que fueron filtrados con membranas de 0.22 µm y sonicados durante 10

minutos. Posteriormente, 0,5 mg de cada péptido fue diluido en una solución de agua con ácido acético glacial al 1% y se inyectó un volumen final de 50 μ L. Los péptidos fueron eluidos mediante el uso de un sistema de gradiente lineal A/B de 5% al 95% como se ve en la Tabla 2, con un flujo de 1 mL/min durante 60 minutos. Finalmente, la detección de señales se logró usando un detector UV-VIS a 220 nm (52).

Tabla 2. Gradiente empleado en el análisis de RP-HPLC de los péptidos sintéticos.

Tiempo (min)	% A	% B
0-20	95	5
20-30	0	100
30-40	0	100
40-50	95	5
50-60	95	5

2.4. Purificación

La purificación de los péptidos se lo realizó por un cromatógrafo FLASH (marca BUCHI modelo Sepacore[®] X10 y X50) con una columna C18 (40 μ m) con dimensiones de 7 cm de largo por 2 cm de ancho. La capacidad de la columna era de 5 a 200 mg de muestra por corrida. Se usó como fases móviles agua con ácido fórmico al 0,1% (A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% (B). Ambas fases móviles fueron sonicadas por 10 minutos. Por cada corrida se usó 50 mL por fase móvil A y B. Se disolvieron 10 mg de péptido en 1 mL de agua con ácido acético glacial a 1%, para posteriormente ser filtrada usando una membrana de 0,45 μ m. Se inyectó en el cromatógrafo FLASH con un flujo de 2,5 mL/minuto siguiendo el gradiente descrito en la Tabla 3. Las lecturas fueron realizadas con un detector UV-VIS a 220 nm.

Tabla 3. Programa de gradiente utilizado en la purificación de los péptidos sintéticos mediante cromatografía FLASH

Proceso	Tiempo (min)	Fase móvil A	Fase móvil B
Purga	0 – 10	50%	50%
Acondicionamiento	Inicial	50%	50%
	10	95%	5%
	25	95%	5%
Purificación	Inicial	95%	5%
	15	0%	100%
	20	0%	100%
	25	95%	5%

Se purificaron 70 mg por cada péptido, usando 50 mL de acetonitrilo por cada corrida. Cada fracción recolectada fue liofilizada para posterior análisis. Las muestras que correspondían a la masa esperada fueron marcadas y recolectadas en tubos cónicos de capacidad operacional de 50 mL.

2.5. Liofilización

Previo al proceso de liofilización, se agregó 30 mL de agua pura a cada tubo cónico (con capacidad de 50 mL) que contenía el péptido purificado. Los tubos fueron congelados a -80°C por 12 horas y después sumergidos en nitrógeno líquido por media hora. Luego, las muestras fueron introducidas al liofilizador (marca BenchTop Pro Omnitronics de 9 litros) y se configuró el equipo para que mantuviera una temperatura de -80°C para la cámara de refrigeración y una presión cercana a 0.09 mbar. Los péptidos fueron liofilizados durante 5 días hasta lograr una consistencia aterciopelada de color blanco. Posteriormente, fueron mantenidos en un desecador con vacío, a una temperatura de 20°C (36).

Posterior a la liofilización, nuevamente los productos purificados fueron analizados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF MS como se describe en el literal 2.3.1. De igual forma, se determinó el porcentaje de pureza de cada péptido mediante RP-HPLC siguiendo la metodología descrita en el literal 2.3.2.

2.6. Ensayos biológicos

2.6.1. Hemólisis

Para determinar el efecto hemolítico de los tres péptidos se siguió la metodología descrita por Proaño-Bolaños (74), con ligeras modificaciones. En un tubo vacutainer se extrajo 2 mL de sangre tipo O Rh⁺ de un voluntario. El contenido fue transvasado a un tubo cónico de 50 mL estéril y centrifugado a 1 000 rpm por 5 minutos con el fin de separar los glóbulos rojos del plasma. A continuación, se retiró el plasma y se agregó 10 mL de PBS 1X estéril y se homogeneizó la muestra de forma moderada para evitar que se dé una hemólisis temprana. Este proceso de centrifugación y lavado con PBS 1X estéril se repitió por 3 veces, hasta que se obtuvo un sobrenadante depurado. Posteriormente, se preparó una solución con los glóbulos rojos al 4%, para lo cual los 2 mL de sangre se diluyeron en 50 mL de PBS 1X estéril.

Se evaluaron 6 diferentes concentraciones predeterminadas (125 μ M, 100 μ M, 75 μ M, 50 μ M, 37,5 μ M, 25 μ M y 12,5 μ M). Para ello, se preparó una solución madre de 1 mL por cada péptido usando como disolvente tampón fosfato salino (PBS) 1X, y a partir de ella obtener las demás concentraciones usando el método de dilución seriada.

En un tubo de 1,5 mL se colocaron: 200 μ L del péptido diluido más 200 μ L de la suspensión de glóbulos rojos al 4%, esto para cada concentración del péptido previamente establecido. Se realizaron 3 repeticiones por cada una. Para el control positivo se mezcló en un tubo de 1,5 mL, 200 μ L de la suspensión de glóbulos rojos al 4% más 5 μ L de Tritón X-100 y 195 μ L de PBS 1X, mientras que para el control negativo se utilizaron 200 μ L de la suspensión de glóbulos rojos al 4% más 200 μ L de PSB 1X. Posteriormente, todos los tubos fueron incubados por 2 horas a 37 °C. Luego, los tubos fueron centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos. Por último, se colocaron 200 μ L de sobrenadante de cada tubo en una placa de 96 pocillos, la misma que fue analizada por un lector de placas a 550 nm. Por cada concentración se realizó 3 repeticiones, al igual que el control positivo y negativo.

2.6.2. Ensayos anticancerígenos

2.6.2.1. Determinación de la viabilidad celular por reducción del MTT

Para determinar el efecto antitumoral de los péptidos se utilizaron 3 líneas cancerígenas Caco II (cáncer de colon ATCC® HTB-37™), Hep-G2 (cáncer de hígado ATCC® HB-8065™) y MCF-7 (cáncer de mama ATCC® CRL-3435™), del banco de células del Laboratorio de cultivo celular del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM). Se siguió la metodología descrita por Cautain (75) con ligeras adaptaciones. El proceso constó de 4 fases que inició con la descongelación y traspaso de las células, seguido de la preparación de las placas, la aplicación del MTT y la lectura más el análisis de datos.

Se descongeló 1 mL de cada línea celular en 15 mL de sus medios respectivos previamente temperados a 37°C. Para Hep-G2 se usó el medio esencial mínimo de Eagle (EMEM), suplementado con 57 mL de suero bovino fetal (FBS) al 10% y 5,7 mL de glutamina, estreptomicina, piruvato sódico y aminoácidos no esenciales respectivamente. En cambio, para la línea Caco II se usó el medio EMEM con 100 mL de FBS al 10%, más 5 mL de Glutamina y 2,5 mL de estreptomicina. Para MCF-7 se usó el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con 50 mL de FBS al 10%, 5 mL de aminoácido no esenciales y de piruvato sódico respectivamente, 5,7 mL de estreptomicina y 10 µg/mL de Insulina. Finalmente, las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Después de 24 h, de incubación se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco, y se volvió a incubar por 48 h.

Para preparar las placas se procedió a agregar tripsina al contenido celular hallado en el frasco Flask. Para ello, se retiró el medio y se agregó 3 mL de tripsina previamente temperada a 37°C, y se lo dejó actuar por cinco minutos. Se agregó 15 mL de medio temperado (los descritos para cada línea), para luego recolectar el contenido y ponerlo en un tubo cónico de 50 mL. A continuación, se recogió una alícuota y se adicionó azul de tripán en una concentración de 1/10. De esta misma solución, se tomó 10 µL que fueron puestos en una Cámara de Neubauer para el conteo correspondiente y para determinar la viabilidad celular. Posteriormente, se centrifugo el tubo cónico a 1 000 g por 5 minutos.

Después de la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con medio de cultivo, ajustando la concentración a 100 000 cel/mL. A partir de este producto se dispenseo 100 µL en cada pocillo, (concentración de célula 10 000 cel/mL), las células fueron incubas por 24 horas. Después, se eliminó el medio, se realizó un lavado con 40 µL de PBS 1X y se reemplazó por 90 µL de medio fresco a todos los pocillos. En seguida se agregó 10 µL de péptido, a 250 µM y 50 µM respectivamente, para así lograr un volumen final del 100 µL por pocillo. Como control negativo se agregó 10µL de PBS 1X, mientras que para el control positivo se agregó 10 µL de Doxorubicina a 50 µM. Finalmente, se lo dejó incubar la placa por 24 - 48 horas (dependiendo de la línea celular) a 37°C y con 5% de CO₂

Posterior al tiempo de incubación, se eliminó el medio, se hizo un lavado con 4 µL con PBS 1X y se reemplazó por medio fresco sin rojo fenol donde fue agregado el MTT, (1mL de MTT a 5mg/ml en 9 mL de medio sin rojo fenol). A continuación, se dejó incubar por 2 horas, se eliminó el sobrenadante y los cristales de formazan fueron solubilizados con 200 µL DMSO. Por último, la placa fue analizada por un detector de placa (marca Varioskan LUX) a 620 nm. Cada concentración fue evaluada en 6 repeticiones. Los datos obtenidos fueron exportados a Microsoft Excel y procesados para la obtención de los porcentajes de viabilidad celular, considerando el 100 % de la viabilidad celular al promedio de las seis repeticiones del control negativo. Se calculó el porcentaje de viabilidad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\bar{X} AP \times 100}{\bar{X} AC^-} \quad (1)$$

Dónde: $\bar{X} AP$ = Promedio de la absorbancia obtenida por el efecto del péptido

a una concentración o dosis establecida

$\bar{X} AC^-$ = Promedio de la absorbancia obtenida por el control negativo

Las comparaciones entre los grupos en estudio se realizaron utilizando análisis de varianza (ANOVA) considerando una $p < 0.05$ como valor significativo.

2.6.2.2. Determinación de la concentración letal media CL₅₀

Con los péptidos que demostraron actividad antitumoral se procedió a realizar un ensayo de MTT (75) con el fin de determinar la concentración letal necesaria para afectar el 50% de la población celular. Para ello, en base a la concentración para la cual existe

bioactividad, se determinaron 6 concentraciones diferentes (75 μM , 100 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM y 500 μM). Cada concentración fue evaluada por quintuplicado, al igual que el control positivo y el negativo descritos en el apartado 2.6.2.2. Para determinar el CL_{50} se procedió a realizar un análisis Probit que consiste en una regresión lineal donde la variable independiente estuvo representada por el logaritmo en base 10 de las diferentes concentraciones evaluadas, mientras la variable dependiente correspondía a los porcentajes de mortalidad transformados a unidades Probit (76) (sacados de tablas preexistentes). Se calculó el CL_{50} con las siguientes fórmulas:

$$X = Y - \frac{b}{a} \quad (2)$$

$$CL_{50} = 10^X \quad (3)$$

Dónde: Y = Mortalidad del 50% en Unidades Probit

X= Log (dosis o concentración)

a = Pendiente de la recta

b= Intercepto

2.6.3. Ensayos antimicrobianos

2.6.3.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) por dilución en caldo

Para determinar el efecto de los tres péptidos se siguió la metodología descrita por la Proaño-Bolaños (74), con ligeras adaptaciones. Se prepararon diluciones seriadas de cada péptido en PBS 1X, obteniendo así concentraciones de 150 μM , 75 μM , 35,5 μM , 18,75 μM , 9,4 μM y 4,68 μM . Las concentraciones mínimas inhibitorias de los péptidos fueron evaluadas en cultivos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, las mismas que fueron reactivadas inicialmente en 10 mL de caldo Mueller Hinton (MHB) por 18 horas. Posteriormente, se tomaron 500 μL del cultivo anterior para ser traspasados a un envase estéril con de 20 mL de caldo MHB nuevo. Los cultivos se mantuvieron en constante agitación y a una temperatura de 37 °C hasta que llegaron a su densidad óptica correspondiente (0,4 para *E. coli*, 0,35 para *S. aureus* y 0,25 para *C. albicans*) determinado por un espectrofotómetro UV-VIS a 600 nm. Luego, cada microorganismo en fase logarítmica se diluyó en MHB para obtener el equivalente a 1×10^6 UFC/mL. A la par, se

preparó una placa estéril de 96 pocillos a los cuales se les agregó 2 μL de péptido diluido en PBS más 198 μL de medio con el microorganismo obteniendo un volumen final de 200 μL . Como control negativo se tomaron 2 μl de PBS más 198 μL de bacteria o levadura, mientras como control positivo se agregó en el pocillo 200 μL de medio MHB. Se realizaron 3 réplicas por concentración de péptido y se realizó por duplicado el experimento para confirmar los resultados.

A continuación, las placas estuvieron incubadas por 18 horas a 37°C y posterior a ese tiempo, fueron analizadas por un lector de placas a 600 nm. Los datos obtenidos fueron exportados a Microsoft Excel y procesados para la obtención de los porcentajes de viabilidad celular, considerando el 100 % de la viabilidad celular al promedio de las absorbancias obtenidas del control negativo. Se aplicó la fórmula (1) descrita en el literal 2.6.2.1. La CMI fue determinada como la concentración más baja de péptido que es capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano (42).

2.6.3.2. Concentración mínima bactericida (CMB)

Para determinar la CMB, se prepararon cajas Petri con Mueller Hintor agar (MHA), en donde se colocaron 10 μL previamente tomados de cada pocillo de las concentraciones que presentaron actividad antimicrobiana en el ensayo de CMI en MHB. Las cajas fueron incubadas por 24 horas a 37°C (74). La CMB fue determinada como la concentración más baja de péptido que mata las bacterias, es decir, aquella donde no hubo crecimiento en el agar (42).

3. CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Análisis bioinformático y diseño de péptidos

Se seleccionaron tres PLA₂s Asp49 como arquetipos moleculares que corresponden a las toxinas: BmTX-I P0C8M1 (PA2B1_BOTMO), Q6EER5 (PA2B_CERGO) y BmjeTX-I P86803 (PA2B1_BOTMA) (Tabla 4). Todas las toxinas seleccionadas presentaron regiones moleculares con alta probabilidad de inducir efecto antibacterial.

Tabla 4. Péptidos diseñados en base a las secuencias de fosfolipasas A₂ Asp49 de *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni* y *Cerrophidion godmani*.

Péptido	Secuencia	Proteína precursora	Especie	Características	Ref.
Bmje	YNKKYRYH LKSCCKADK	Fosfolipasa A ₂ Asp 49 básica del grupo II	<i>Bothrops marajoensis</i>	Viperidae. Endémica de Brasil.	(77)
Bmtxj	YNKKYMKH LKPCCKKA	Fosfolipasa A ₂ Asp49 básica del grupo II.	<i>Bothrops moojeni</i>	Viperidae. Endémica de Argentina, Brasil y Paraguay.	(78)
Cergo	NLRTYKKRYMF Y	Fosfolipasa A ₂ Asp 49 básica del grupo II	<i>Cerrophidion godmani</i> (<i>Bothrops godmani</i>)	Viperidae. Endémica de México y Guatemala	(79)

En el análisis con la herramienta AMPA de la secuencia que pertenece a la proteína BmjeTX-I con código P86803 (78) se identificó la presencia de dos regiones con una probable actividad antibacterial que son (A) YGCYCGWGGRGGKP y (B) YNKKYRYHLKSCCKADK (Figura 2). La primera esta entre la posición 25 y 35 de las proteínas, mientras que la segunda se posiciona cerca de la región C-terminal entre la posición 103 y 119.

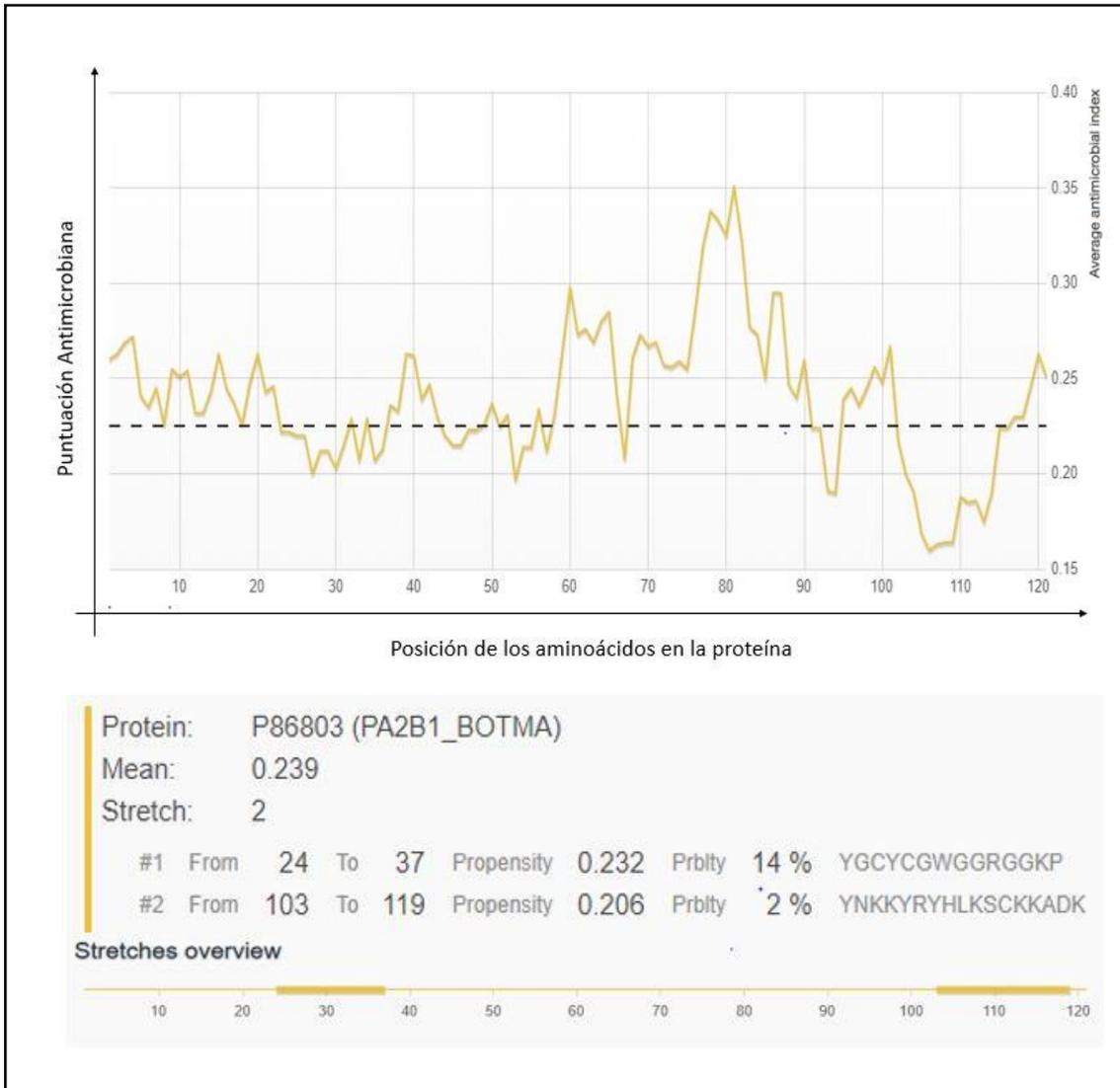


Figura 2. Análisis de la secuencia de la fosfolipasa A₂ BmjeTX-I en AMPA. Se denotan dos regiones cuyos porcentajes bajos (14% y 2%) denotan altas probabilidades de que tenga un potencial antimicrobiano, siendo (A) YGCYCGWGGRGGKP y (B) YNKKYRYHLKSKKADK.

En cambio, en la fosfolipasa A₂ básica BmTX-I con código POC8M1 (78) se halló una región con una probable actividad antibacteriana que corresponde a la secuencia YNKKYMKHLKPKCKKA ubicada en la región C-terminal cuyo porcentaje es del 3% (Figura 3).

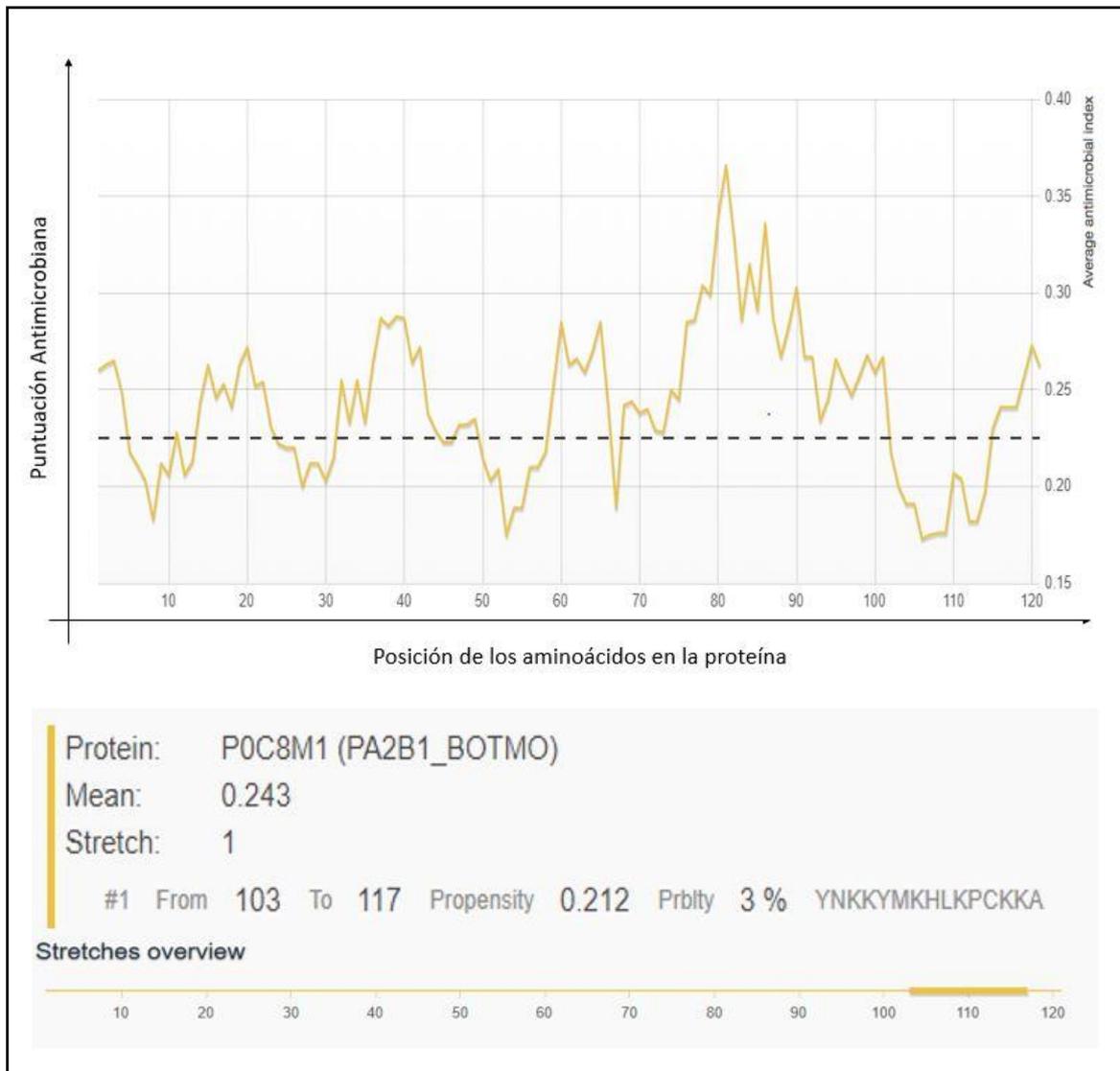


Figura 3. Análisis de la secuencia de la fosfolipasa A₂ BmTX-I en AMPA. Se observa una región cuyo porcentaje bajo (3%) denota una alta probabilidad de que tenga un potencial antimicrobiano, siendo (A) YNKKYMKHLKPKCKKA

Por otro lado, en el análisis bioinformático de la fosfolipasa con código Q6EER5 (80) se hallaron 3 regiones que presentaron una alta probabilidad de tener actividad antimicrobiana: FNKMIKIMTKKNAVP posicionada entre los aminoácidos 5 y 19, YGCYCGWGGRGKPK ubicada entre la posición 24 y 37, y NLRTYKKRYMFY ubicada en la región C-terminal entre los aminoácidos 99 y 110 (Figura 4).

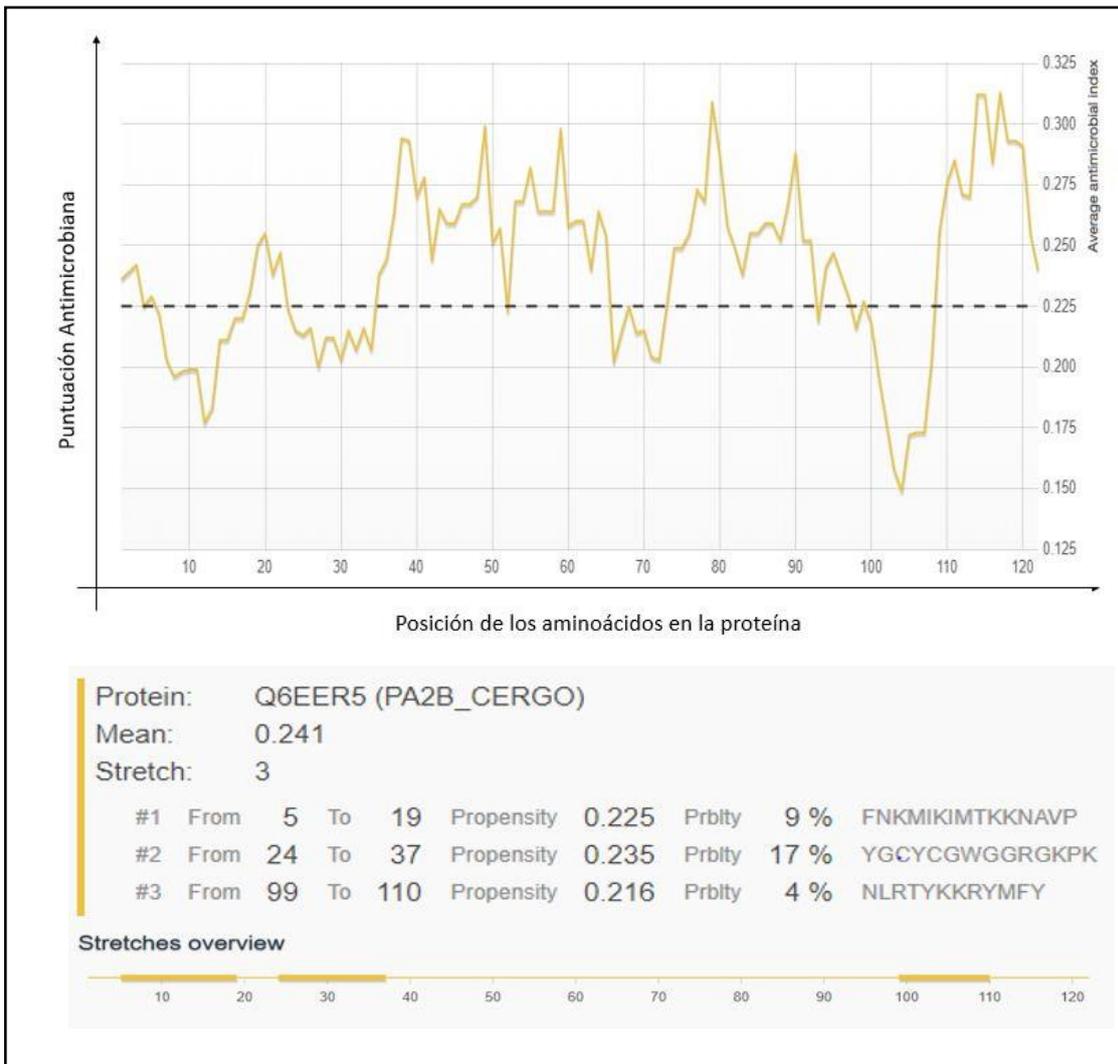


Figura 4. Análisis de la secuencia de la fosfolipasa A₂ Q6EER5 en AMPA. Se observan 3 regiones de interés cuyos porcentajes son 9%, 17% y 4% y que son candidatos para ser sintetizados como péptidos antimicrobianos, siendo éstos, (A) FNKMIKIMTKKNAV, (B) YGCYCGWGGRGKPK y (C) NLRTYKKRYMFY.

Se decidió sintetizar una región molecular de cada una de las fosfolipasas, eligiendo aquellas con el valor más pequeño en cuestión del porcentaje mostrado, ya que estas denotan una mayor probabilidad de que tenga actividad antimicrobiana o antitumoral. Estos son Bmje (YNKKYRYHLKSCCKADK), Bmtxj (YNKKYMKHLKPCCKA) y Cerigo (NLRTYKKRYMFY). Posteriormente, los tres péptidos fueron analizados por diferentes herramientas bioinformáticas para determinar sus características físico-químicas.

Mediante el análisis con PepDraw (Tabla 5) se observó que los tres péptidos presentaban una carga catiónica y un punto isoeléctrico (pI) de entre 10,30 y 10,45. Con respecto a la hidrofobicidad, los péptidos Bmje, Bmtxj y Cerigo presentaron un porcentaje

en cantidad de aminoácidos hidrofóbicos con respecto a la longitud del 29,71%, 40% y 50% respectivamente.

Tabla 5. Principales características de los péptidos sintetizados calculados por la herramienta bioinformática PepDraw.

Nombre	Longitud (aa)	pI	Carga	Hidrofobicidad Kcal * mol ⁻¹	Masa (Da)
Cergo	12	10,45	+5	+12,46	1680,8896
Bmtxj	15	10,45	+7	+25,16	1878,0453
Bmje	17	10,30	+7	+30,89	2171,1751

El análisis en I-TASSER mostró que los tres péptidos presentan una organización helicoidal (Figura 5). Para cada péptido se determinó la calidad del modelo (C-score) que consiste en un puntaje de confianza para los modelos predichos por I-TASSER. Su cálculo se basa en la importancia de alinear plantillas de subprocesos y los parámetros de convergencia de la estructura en simulaciones de ensamblaje y mientras mayor sea, más confiable es. El C-score fue de -0,02 para Bmje, -0,21 para Bmtxj y 0,01 para Cergo.

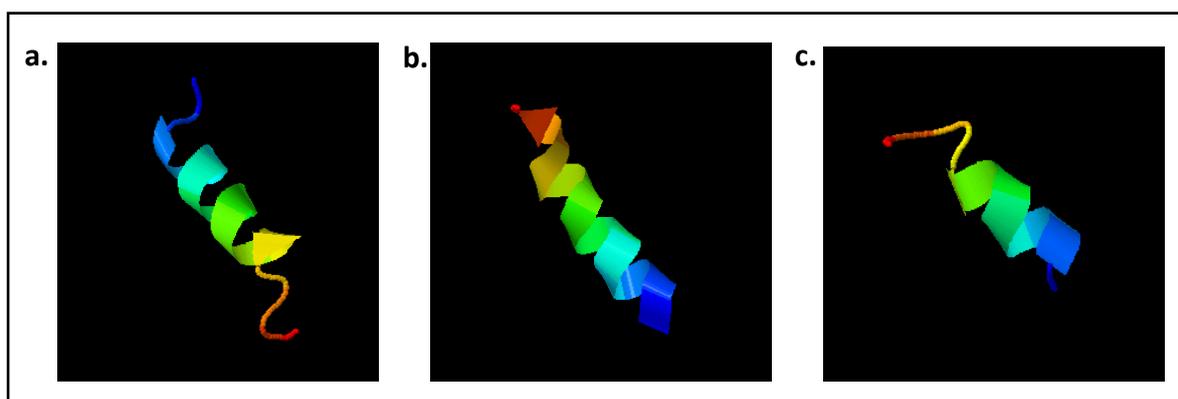


Figura 5. Predicciones de la estructura secundaria de los tres péptidos por I-TASSER. (a) Péptido Bmje (*C-score: -0.02), (b) Péptido Bmtxj (C-score: -0.21) y (c) Péptido Cergo (C-score: 0.01)

La organización de la cara hidrofílica e hidrofóbica de los tres péptidos se logró visualizar en diagramas de ruedas de hélice establecidas por NetWheels (Figura 6). En Bmje la distribución espacial de los 17 aminoácidos muestra una región polar o hidrofílica

sectorizada (6 aminoácidos polares en una misma cara) que se contrapone con una cara hidrofóbica que presenta una distribución uniforme de los aminoácidos que son de tipo polar (4), neutro (3), con carga negativa (1) y básicos (2). En Bmtxj la cara hidrofílica se mostró más definida que la cara hidrofóbica, con 5 aminoácidos polares en la primera cara y 4 aminoácidos no polares en la segunda cara que se encuentran conjugados con aminoácidos neutros y polares. Finalmente, Cergo posee una cara hidrofóbica más notoria por los 4 aminoácidos no polares dispuestos en una misma región espacial.

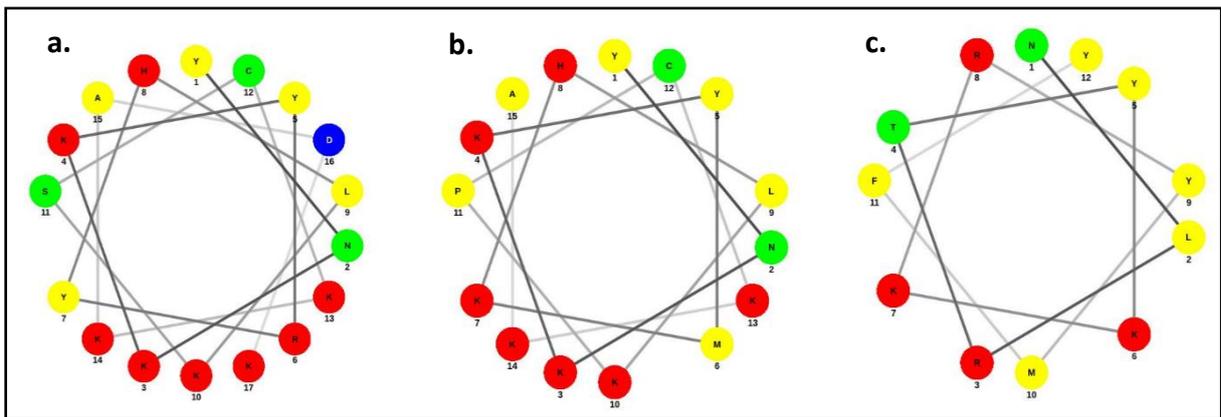


Figura 6. Proyección helicoidal determinado por NetWheels. (a) Péptido Bmje. (b) Péptido Bmtxj. (c) Péptido Cergo. Según los colores rojo es para aminoácido polares o básicos, verde para polares sin carga, amarillo para aminoácido no polares y azul para polares y ácidos.

Las secuencias los péptidos fueron evaluados con el software ToxinPred, el cual predijo que ninguno de los tres péptidos es tóxico (Figura 7). El software HemoPI indicó que los péptidos Bmje, Bmtxj y Cergo no poseen actividad hemolítica, ya que los tres péptidos mostraron un puntaje PROB de 0.0 (Figura 8). Además, ambos programas calcularon la carga, pI y carga molecular de los péptidos cuyos valores se aproximan a los presentados por PepDraw.

Query Peptides			
Peptide ID	Peptide Sequence	SVM Score	Prediction
Bmje	YNKKYRYHLKSKKADK	-0.43	Non-Toxin
Bmtxj	YNKKYMKHLKPKCKKA	-0.50	Non-Toxin
Cergo	NLRTYKKRYMFY	-0.73	Non-Toxin

Figura 7. Análisis de la capacidad citotóxica de Bmje, Bmtxj y Cergo por el programa ToxinPred. Bmje, Bmtxj y Cergo son péptidos no tóxicos con SVM scores de -0,43, -0,50 y -0,73 respectivamente.

Péptido original		
Secuencia de péptidos	Posición de mutación	Puntaje PROB
YNKKYRYHLKSCKKADK	Sin mutación	0.00
YNKKYMKHLKPKCKA	Sin mutación	0.00
NLRTYKKRYMFY	Sin mutación	0.00

Figura 8. Análisis del potencial hemolítico de Bmje, Bmtxj y Cergo por el programa HemoPI. El puntaje PROB es el puntaje SVM normalizado y varía entre 0 y 1, es decir, 1 es muy probable que sea hemolítico, 0 muy poco probable que sea hemolítico

3.2. Síntesis automática e Identificación de péptidos

Posterior a la síntesis se obtuvo como producto final 190,5 mg de Bmje, 149,1 mg de Cergo y 169 mg de Bmtxj. Para cada péptido, el porcentaje de crudo de reacción fue de 43,98% para Bmje, 45,01% para Bmtxj y de 44,42% para Cergo.

3.2.1. Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF MS

Mediante un análisis con MALDI-TOF MS se logró identificar las masas correspondientes a los tres péptidos, pero también se observaron picos de masas ajenos a las masas peptídicas que indicaban la presencia de impurezas. Por ejemplo, en la figura 9 se observa un pico prominente (100% de intensidad) en m/z en 2171,67 que corresponde a la masa péptido Bmje con la secuencia NLRTYKKRYMFY. Adicionalmente, en este espectro se observaron picos de 2227,69, 2231,72 y 2414.54 en m/z corresponden a impurezas que existen en la muestra, por lo que fue necesario la purificación por cromatografía.

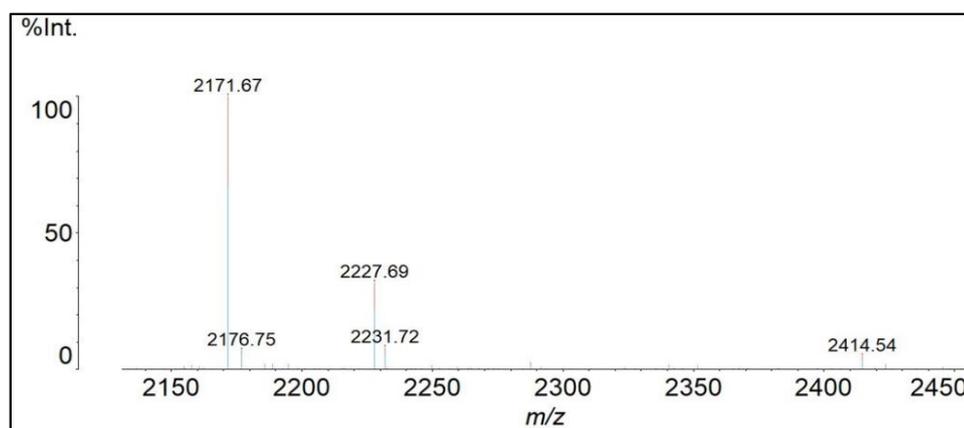


Figura 9. Espectro de masas del péptido sintético Bmje crudo. La m/z 2171,67 corresponde al péptido Bmje, las otras masas corresponden a impurezas.

En cambio, en la figura 10 se muestra el espectro de masas para Bmtxj. Se observa un pico en m/z de 1878,47 con una intensidad del 100% que corresponde a la masa del péptido con secuencia YNKKYMKHLKPKCKKA. A la par, también se detectaron masas de 1994,44, 2319,44 y 2341,38, que corresponden a impurezas existentes en la muestra de péptido recién sintetizado.

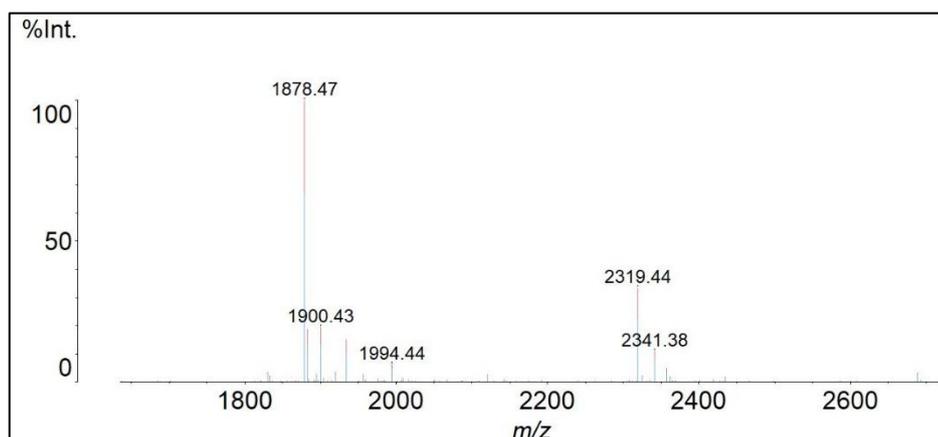


Figura 10. Espectro de masas del péptido sintético Bmtxj sin purificar. La m/z 1878,47 corresponde al péptido Bmje y a la par se observan 4 picos (1900,43, 1994,69, 2319,44 y 2341,38). El primero corresponde a la masa del péptido más sodio (Na^+), mientras que los tres siguientes corresponden a las impurezas.

Finalmente, en la figura 11 se muestra el espectro de masas del péptido Cergo, cuya masa corresponde a 1681,87 y muestra una intensidad del 100% aseverando su existencia en la muestra de péptido recientemente sintetizado. Además, se observan picos pequeños con masa de 1633,62, 1737,62 y 1933,53 que corresponden a la presencia de impurezas.

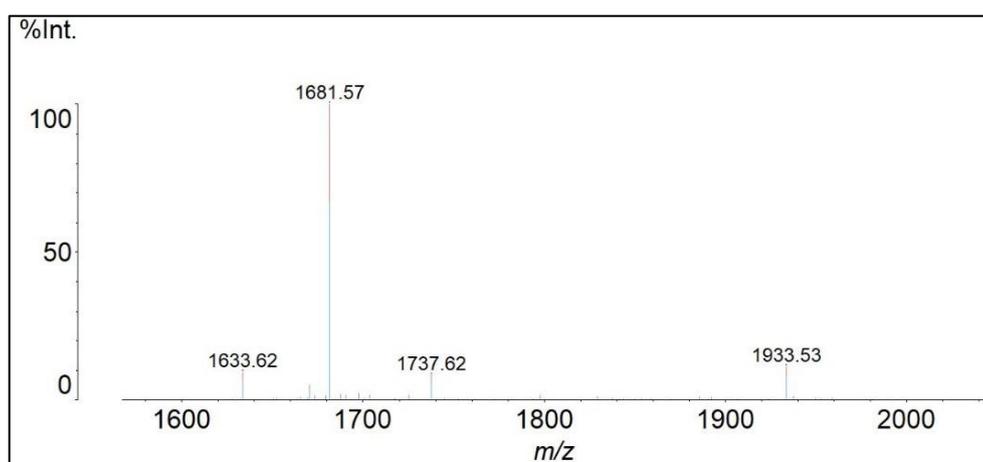


Figura 11. Espectro de masas del péptido sintético Bmje crudo. La m/z 1681,57 corresponde al péptido Bmje, las otras masas corresponden a impurezas.

3.2.2. Determinación del grado de pureza por RP-HPLC

Al realizar las corridas cromatográficas se obtuvieron diferentes picos, los cuáles fueron recolectados y analizados por el MALDI-TOF MS. El péptido Bmje fue identificado en el pico 1 (Figura 12) con un tiempo de retención de 9.682 y su pureza fue de 67,77%. En el mismo cromatograma se observó un segundo pico al que se lo considera una impureza o un subproducto resultante de la reacción de síntesis.

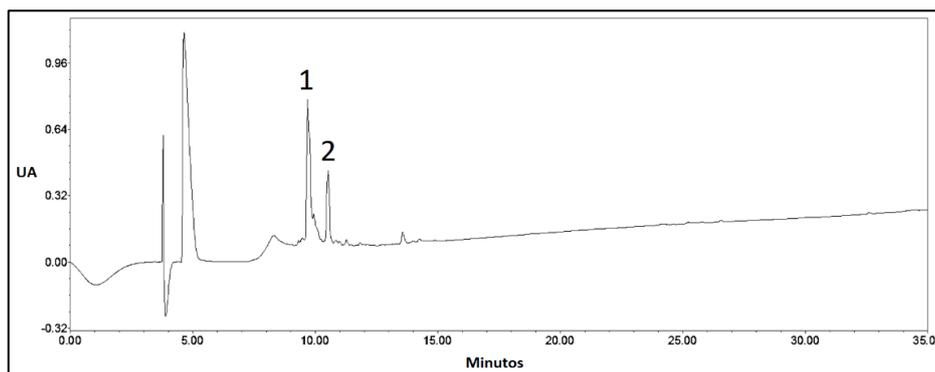


Figura 12. Cromatograma del péptido Bmje crudo. (1) Péptido Bmje y (2) Impureza no reconocida.

En cambio, el péptido Bmtxj fue detectado en el pico dos del cromatograma de la figura 13 con un tiempo de retención de 9,67 minutos y su pureza fue de 77,25%. Los demás picos son impurezas y presentan un tiempo de retención de 8,94, 10,55 y 13,76 minutos con un porcentaje de 4,29%, 11,9 % y 7,37% respectivamente. Cabe resaltar que los cromatogramas de Bmje y Bmtxj son muy similares, ya que poseen características fisicoquímicas semejantes.

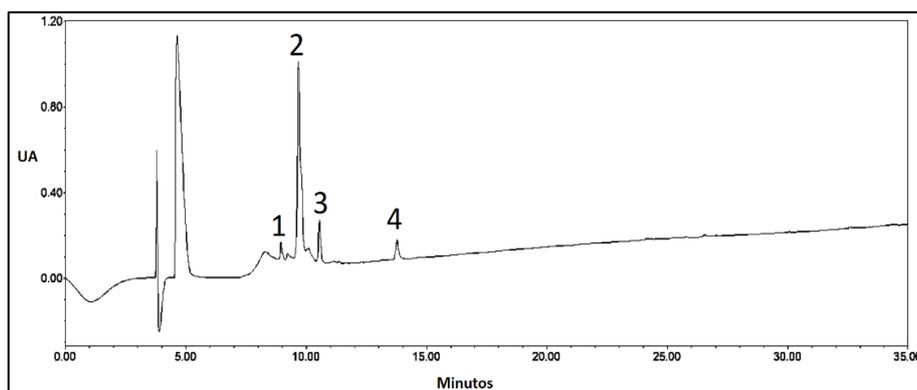


Figura 13. Cromatograma del péptido Bmtxj crudo. (1)(3)(4) Impurezas no identificadas, (2) Péptido Bmtxj.

Finalmente, para el péptido Cergo (Figura 14), se obtuvo un cromatograma con 3 picos. Entre ellos, el pico con un tiempo de retención de 13,056 minutos corresponde al péptido Cergo con una pureza del 68,76%. Las demás impurezas presentaron un tiempo de retención de 11,804 y 12,512 minutos con un porcentaje de 16,42% y 14,82% respectivamente.

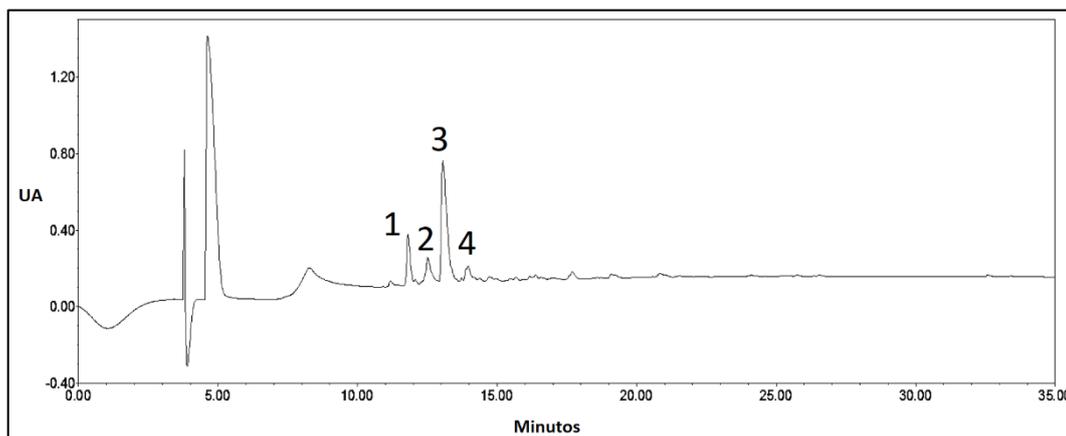


Figura 14. Cromatograma péptido Cergo crudo. (1)(2)(3) Impurezas no identificadas (3) péptido Bmtxj.

3.3. Purificación por cromatografía FLASH

La purificación de los tres péptidos se realizó mediante cromatografía FLASH en fase reversa, para lo cual se utilizaron las mismas condiciones y fases móviles empleadas en análisis por HPLC. Se realizaron 7 corridas por péptido empleando 10mg de muestra por corrida.

El péptido Bmje fue identificado mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) en el pico 2 del cromatograma que se observa en la figura 15 con un tiempo de retención 8,5 minutos. Los otros dos picos observados (1 y 3) correspondían a impurezas. En cambio, el péptido Bmtxj (figura 16) fue detectado en el pico dos con un tiempo de retención de 8,5 minutos. De igual manera se observaron dos picos que correspondían a impurezas. Ambos péptidos fueron detectados con un flujo de B (acetonitrilo con ácido acético al 0,1%) al 60%.

Por otro lado, el péptido Cergo (Figura 17) está en el pico 3 con un tiempo de retención de 16 minutos al 100% de fase móvil B (Acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1%). Los picos obtenidos en los diferentes cromatogramas presentaban más definición y menor cantidad de impurezas.

Las fracciones de los péptidos puros se liofilizaron obteniéndose un rendimiento del 30%. Es decir que por cada 10 mg de péptido impuro se recolectaba aproximadamente 3 mg de péptido puro. En total se obtuvo: 23,4 mg del péptido Bmtxj, 20,3 mg de Bmje y 19 mg de Cergo.

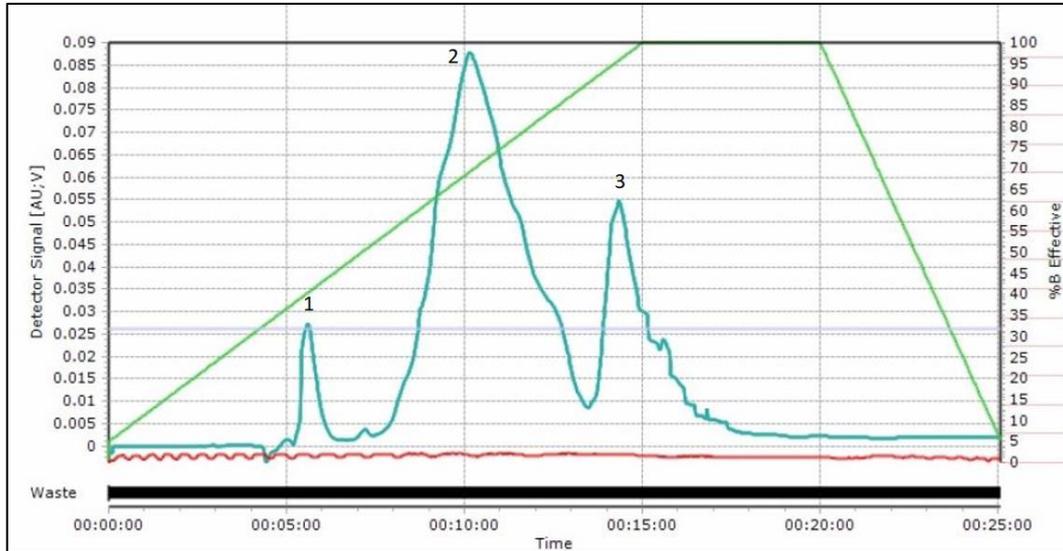


Figura 15. Cromatograma del péptido Bmje empleando un cromatógrafo FLASH. (1) Solvente: agua con ácido acético al 1%, (2) péptido Bmje, (3) impureza desconocida.

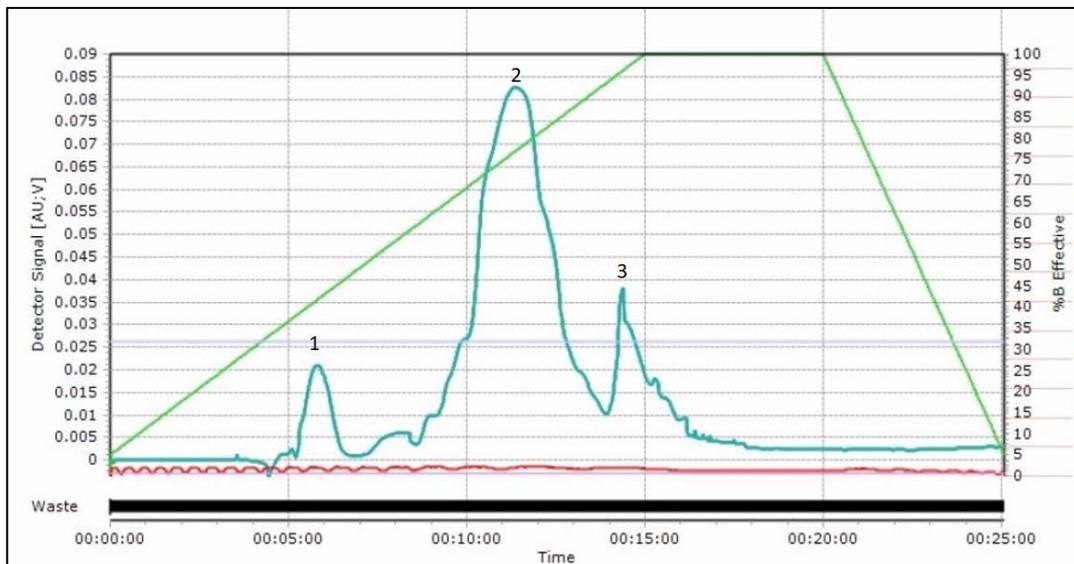


Figura 16. Cromatograma del péptido Bmtxj empleando un cromatógrafo FLASH. (1) Solvente: agua con ácido acético al 1%, (2) péptido Bmtxj, (3) impureza desconocida.

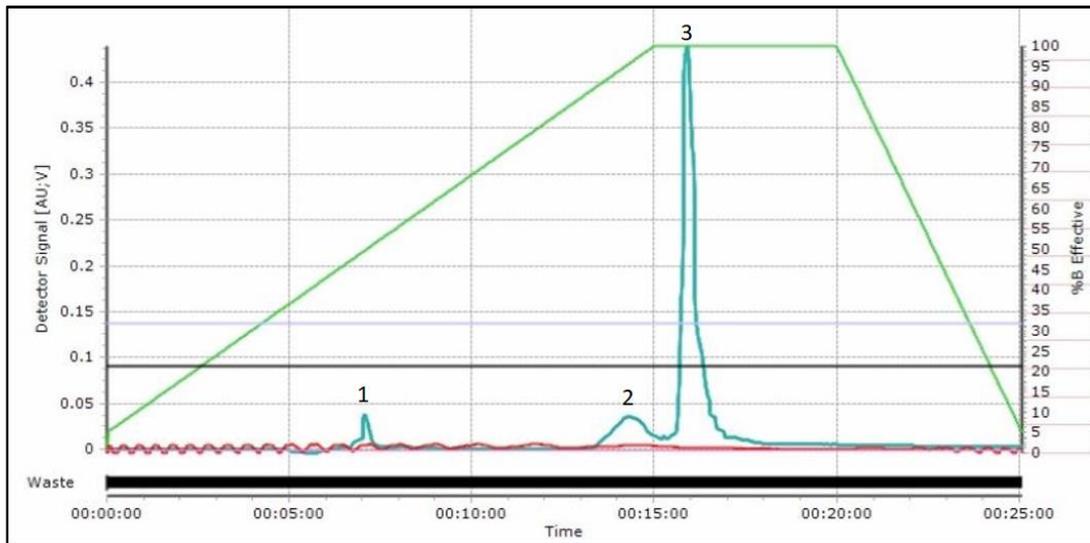


Figura 17. Cromatograma del péptido Cergo empleando un cromatógrafo FLASH. (1) Solvente: agua con ácido acético al 1%, (2) impureza desconocida, (3) péptido Cergo.

3.4. Caracterización por MALDI-TOF MS y RP-HPLC

Para determinar el nivel de pureza de los péptidos se procedió a analizarlos nuevamente por MALDI-TOF MS para identificarlos y RP-HPLC para determinar el porcentaje de pureza de los mismos. El péptido Bmje fue identificado en el pico 2 del cromatograma que se observa en la figura 18 con un tiempo de retención 10,019 minutos y presenta una pureza del 97,17%, lo que corrobora con el espectro de masas de la figura 19. En este último se observan diferentes grupos de picos que corresponden: a) la masa del péptido (2171), b) la masa del péptido más sodio (2195,24) y c) la masa del péptido más potasio (2211) y en todos los casos se observaron picos correspondientes a las masas con los diferentes isótopos (Figura 18).

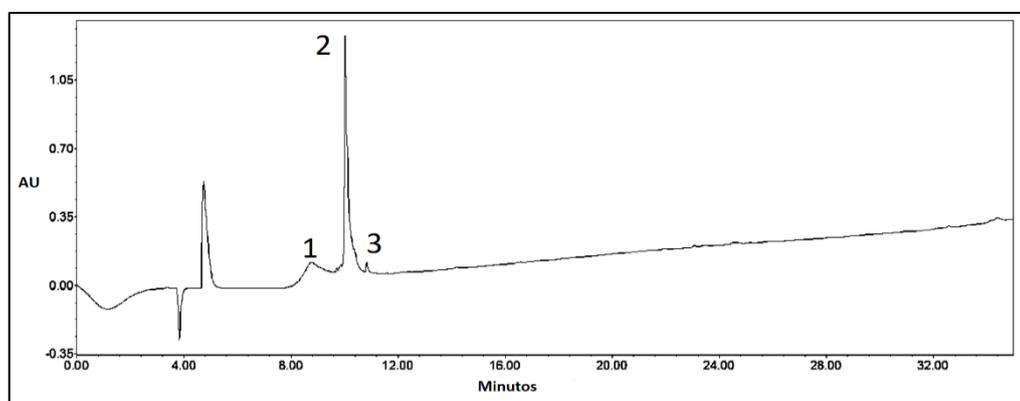


Figura 18. Cromatograma del péptido Bmje purificado. (2) Péptido Bmje, (1)(3) Impurezas no identificadas

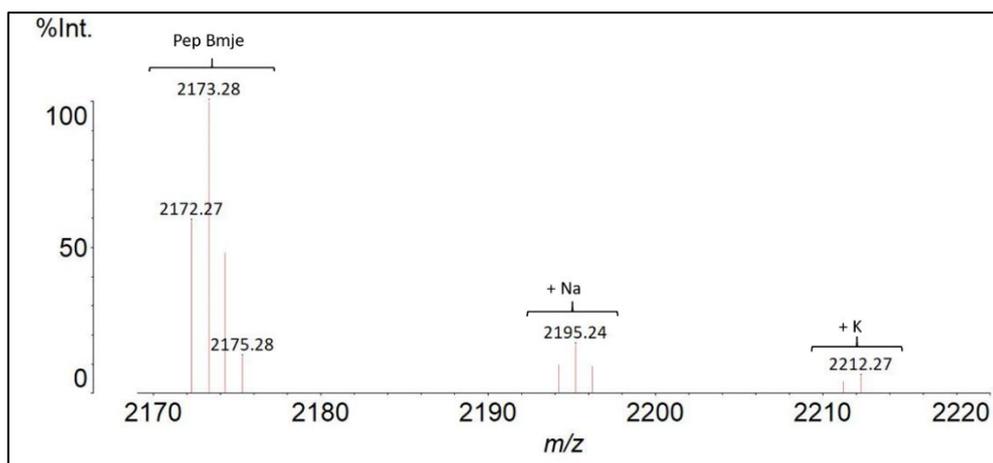


Figura 19. Espectro de masa del péptido Bmje purificado. El péptido es identificado en el espectro con una masa de 2173,28 con una intensidad del 100%. La muestra fue puesta en matriz CHCA y se la analizó en modo Reflecton.

El cromatograma del péptido Bmtxj presentó un único pico con respecto al solvente (Figura 20). Este presentó un tiempo de retención de 7,978 minutos y una pureza del 100%. En el espectro de masas de Bmtxj (Figura 21) se observaron 3 grupos de masas diferentes que corresponden: a) La masa del péptido (1878,85 en m/z), b) la masa del péptido más sodio (1901 en m/z) y c) la masa del péptido más potasio (1917 en m/z) más los picos correspondientes a las masas con los diferentes isótopos. Este espectro indica que el péptido Bmtxj tiene un alto grado de pureza lo que es confirmado por RP-HPLC.

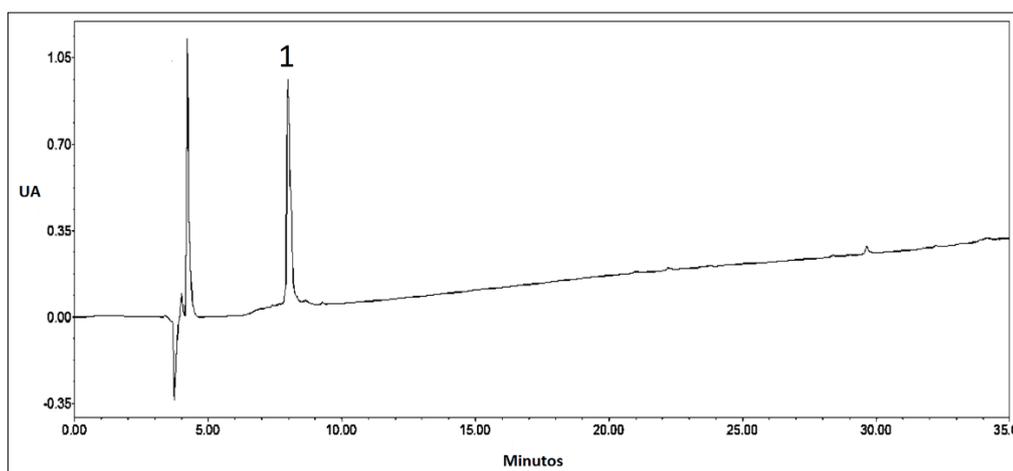


Figura 20. Cromatograma del péptido Bmtxj purificado. (1) Péptido Bmtxj con absorbancia de 0,94 UA

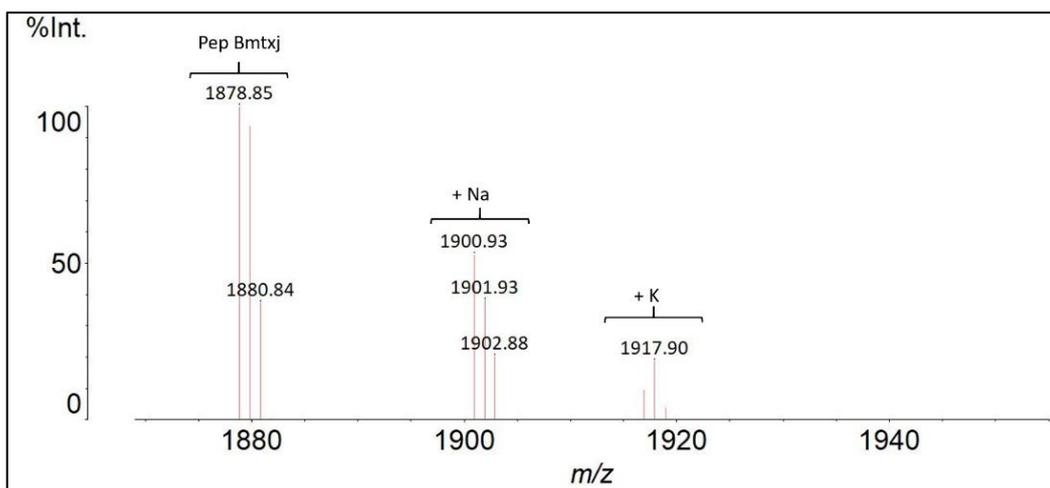


Figura 21. Espectro de masa del péptido Bmtxj purificado. El péptido es identificado en el espectro con una masa de 1878,85 con una intensidad del 100%. La muestra fue puesta en matriz CHCA y se la analizó en modo Reflecton.

El péptido Cergo fue detectado en el pico 3 del cromatograma de la figura 22, con un tiempo de retención de 13,5 minutos y un grado de pureza del 90.05%. Además, se detectaron tres picos adicionales con un tiempo de retención de 11,981, 12,447 y 14,021 minutos cuyos porcentajes son 1,45%, 2,09% y 6,42% respectivamente y que corresponden a impurezas. De manera similar, el péptido Cergo presentó 3 grupos masas en el espectro de MALDI-TOF MS, siendo la primera correspondiente al peso neto del péptido que es 1681,07. Posteriormente, se denotan las masas 1703,08 y 1719,09 que son propias de la masa peptídica más sodio y potasio respectivamente (Figura 23).

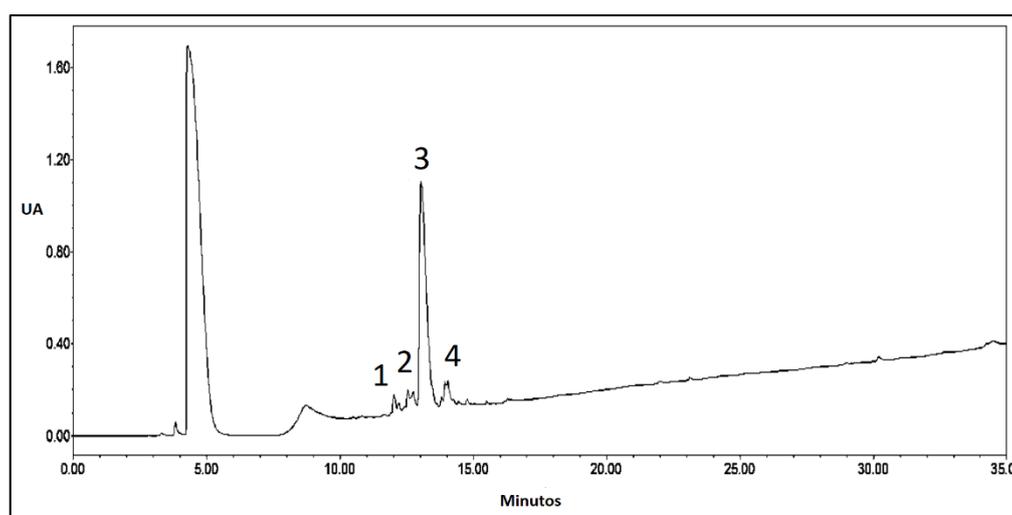


Figura 22. Cromatograma del péptido Cergo puro. (3) Péptido Cergo, (1)(2)(4) impurezas no identificadas.

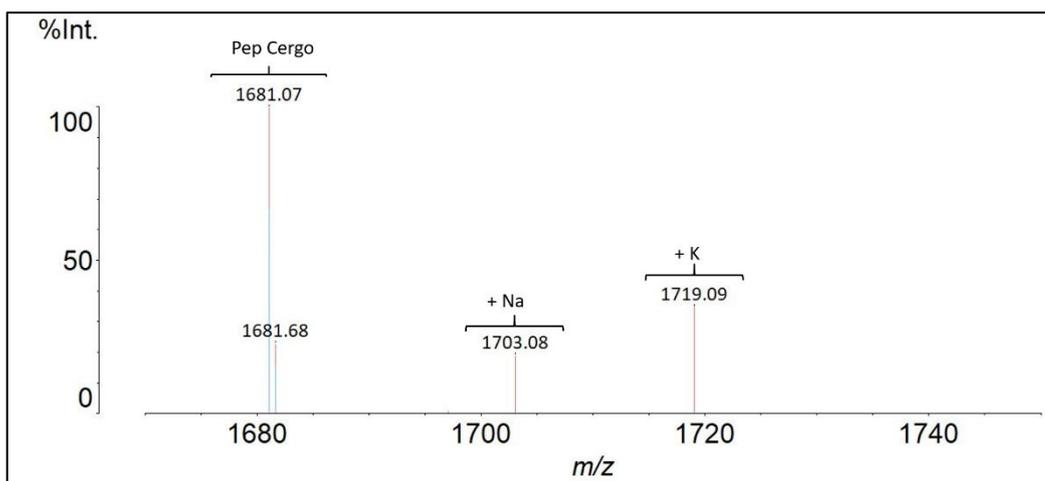


Figura 23. Espectro de masa del péptido Cergo purificado. El péptido es identificado en el espectro con una masa de 1878,85 con una intensidad del 100%. La muestra fue puesta en matriz CHCA y se la analizó en modo Reflecton.

3.5. Ensayos biológicos

3.5.1. Hemólisis

Se evaluó la actividad hemolítica de Bmtxj, Bmje y Cergo (Figura 24) y se obtuvo para los tres péptidos un máximo del 3% de hemólisis, inclusive para la concentración de 125 μ M. El control positivo fue considerado el porcentaje de hemólisis del 100%. Esto implica que los tres péptidos, Bmtxj, Bmje y Cergo, no son citotóxicos en las concentraciones evaluadas.

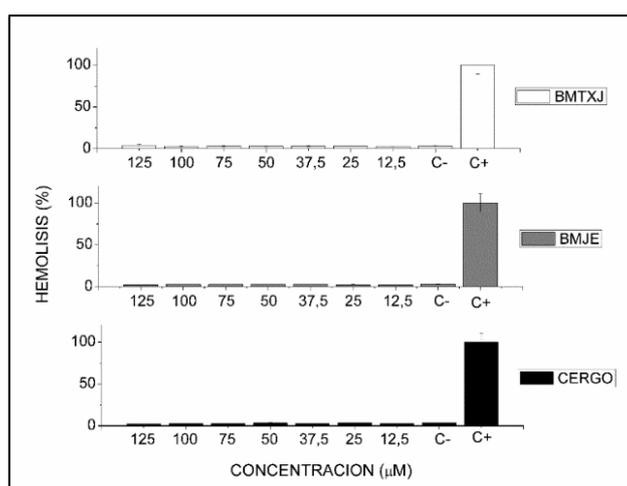


Figura 24. Evaluación de la actividad hemolítica de los péptidos Bmtxj (blanco), Bmje (gris) y Cergo (negro). Los péptidos fueron disueltos en PBS 1X en diferentes concentraciones. Como control negativo se usó PBS más 200 μ L de la solución de sangre en suspensión al 4% y como control positivo se dispuso 200 μ L de la solución sanguínea al 4% más 5 μ L de tritón X-100 y 195 μ L de PBS 1X.

3.5.2. Ensayos anticancerígenos

3.5.2.1. MTT

Para determinar el potencial anticancerígeno se realizó un ensayo de viabilidad celular con MTT con las líneas HEPA-G2, CACO II, y MCF-7. En los tres casos los resultados discreparon denotando que la bioactividad ejercida por cada péptido depende de la línea celular en la que está siendo evaluada. Así por ejemplo para HEPA-G2 (Figura 25) no se observó una actividad anticancerígena relevante para ninguno de los tres péptidos evaluados (un 9% en mortalidad). De igual forma, para CACO II (Figura 25) los péptidos Cergo y Bmje no denotaron ninguna actividad anticancerígena en esta línea, al contrario de Bmtxj que con las concentraciones de 250 μ M y 50 μ M produjeron una mortalidad entre el 20% y 27%, significativa en comparación al control negativo ($p > 0,05$).

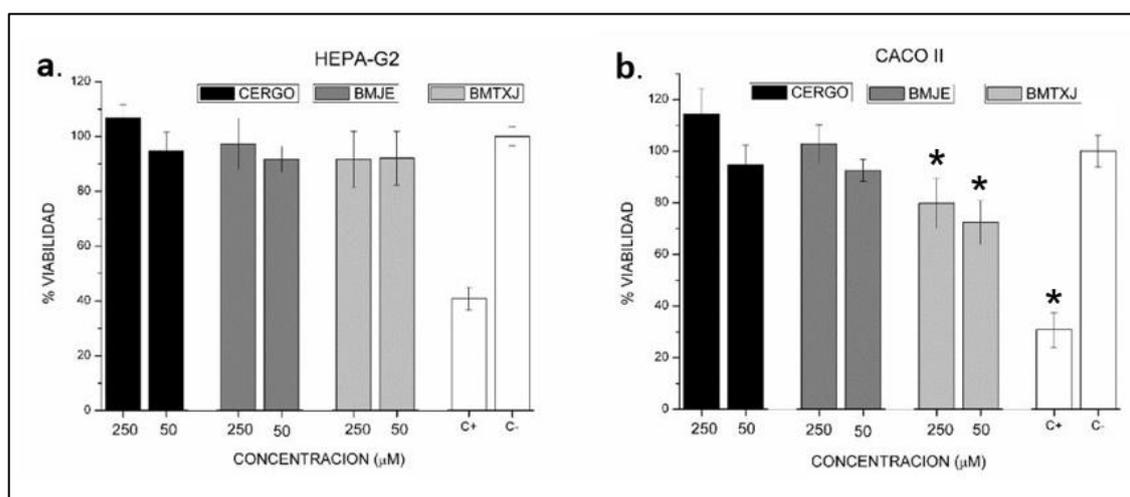


Figura 25. Ensayo de viabilidad celular MTT en HEPA-G2 Y CACO-II. Como control negativo (C-) se usó PBS 1X y como control positivo (C+) Doxorubicina, (a) Para HEPA-G2 los tres péptidos Bmtxj (gris claro), Bmje (gris oscuro) y Cergo (negro) presentaron una viabilidad del 100% e inclusive superior para la concentración de 250 μ M del péptido Cergo. (b) Para CACO II se observa una inhibición del 25% en promedio por parte de Bmtxj (gris claro). (*) Existe diferencia significativa en comparación al control negativo determinado por análisis de ANOVA ($p < 0,05$)

Por el contrario, todos los tres péptidos mostraron actividad antitumoral significativa para la línea celular MCF-7 (Figura 26) a una concentración de 250 μ M. La viabilidad celular luego del tratamiento con distintas concentraciones del péptido fue comparada con el control negativo mediante ANOVA ($p > 0,05$). Especialmente, el péptido Cergo produjo una mortalidad del 39,19%, mientras que para Bmtxj el porcentaje fue del 37,08% y de Bmje fue del 53,74%. Este último supera el 50% de mortalidad, e inclusive en

la foto (Figura 26, b) se observa una gran inhibición al compararlo con el control negativo (Figura 26, d), por lo que se procedió a determinar el CL₅₀ de Bmje en MCF-7. Si bien los otros péptidos mostraron significativa bioactividad, el porcentaje resultante no supera al 50%

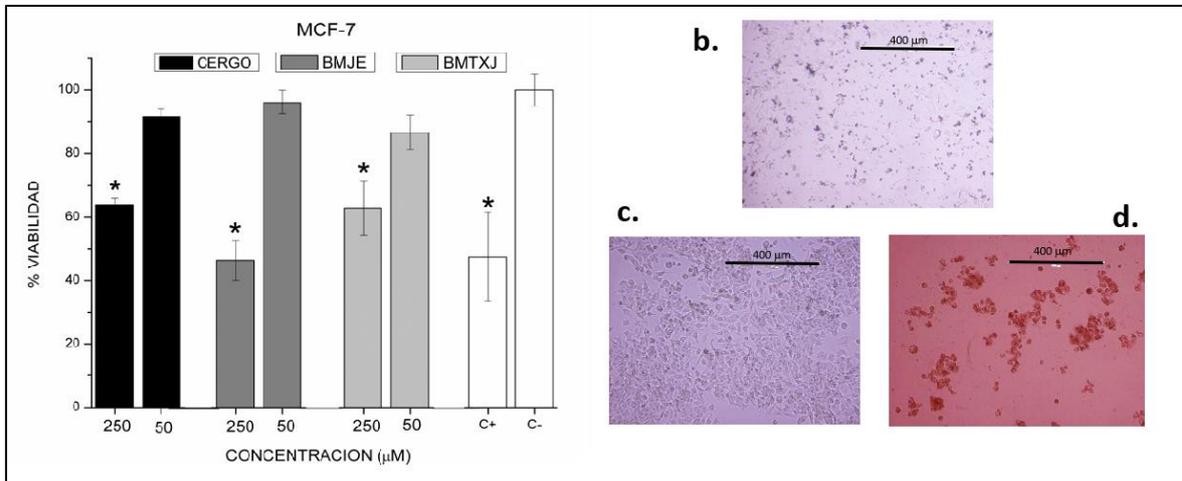


Figura 26. Ensayo de viabilidad celular MTT para cáncer de mama (MCF-7). Como control negativo (C-) se usó PBS 1X y como control positivo (C+) Doxorubicina, (a) Porcentaje de viabilidad obtenida posterior al tratamiento con los péptidos Cergo (negro), Bmje (gris oscuro) y Bmtxj (gris claro). b) Foto a las 24 horas de la línea MCF-7 tratado con Bmje a 250 µM de concentración. c) Foto a las 24 horas de MCF-7 sin ningún tratamiento. d) Foto a las 24 horas de MCF-7 tratado con Doxorubicina. (*) Existe diferencia significativa en comparación al control negativo determinado por análisis de ANOVA ($p < 0,05$)

3.5.2.2. CL₅₀

Para determinar el CL₅₀ se analizó el efecto del péptido Bmje a diferentes concentraciones como se observa en la figura 27. Los datos relevan una disminución de la actividad metabólica de las células desde la concentración más baja evaluada, llegando a una mortalidad de 52% en la concentración de 500 µM. Se obtuvo un CL₅₀ de 464,85 µM, que es la concentración en la que el péptido Bmje logra matar el 50% de la población celular.

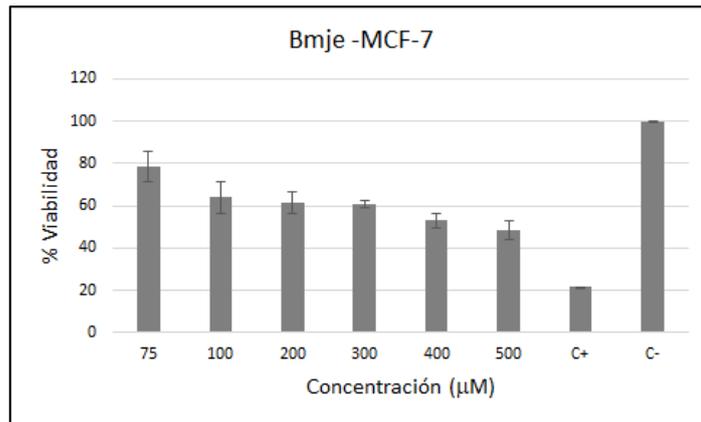


Figura 27. Determinación del CL₅₀ de Bmje en MCF-7. Porcentaje de viabilidad obtenida posterior al tratamiento de la línea MCF-7 con diferentes concentraciones del péptido Bmje.

3.5.3. Ensayos antimicrobianos

3.5.3.1. Concentración mínima Inhibitoria (CMI)

Se evaluó el potencial antimicrobiano de los péptidos Bmje, Bmtxj y Cergo en contra de tres microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Los efectos fueron variables según el péptido y microorganismos. Bmje no fue capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* como se puede visualizar en la figura 28.

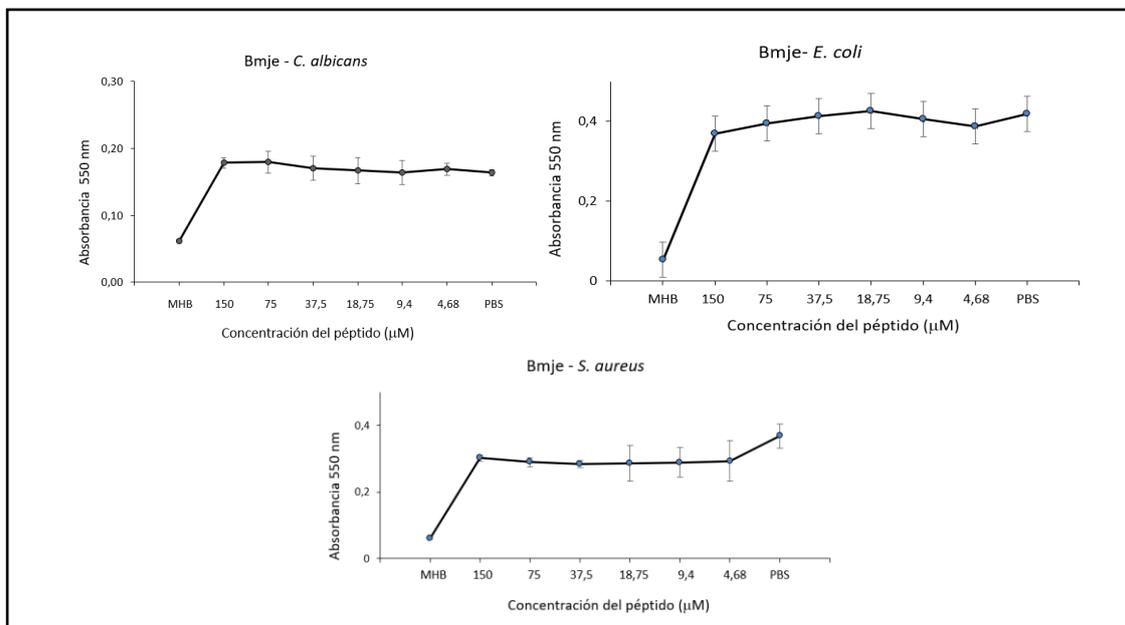


Figura 28. Evaluación del potencial antimicrobiano del péptido Bmje. Las gráficas son el resultado de la media de dos repeticiones del experimento.

El péptido Bmtxj presentó una concentración mínima inhibitoria de 37,5 μM (70,46 mg/L) para *S. aureus*. En cambio, para *E. coli* y *C. albicans* no se observó algún efecto antimicrobiano en ninguna concentración (Figura 29).

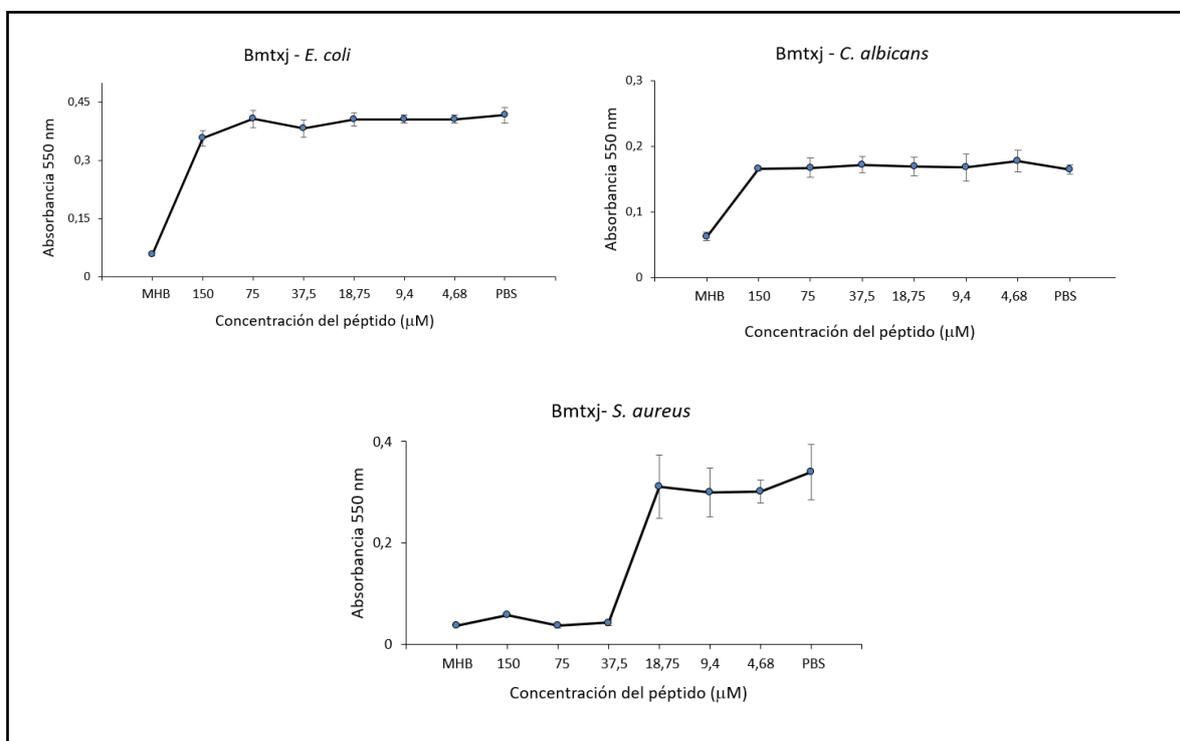


Figura 29. Evaluación del potencial antimicrobiano del péptido Bmtxj. Las gráficas son el resultado de la media de dos réplicas del experimento.

El péptido Cergo mostró actividad antimicrobiana contra los tres microorganismos *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* (Figura 30). Específicamente, para *E. coli* el CMI observado fue de 75 μM (63,07 mg/L). Contra este mismo microorganismo, a una concentración de 150 μM , se observó actividad bactericida en el ensayo con agar. Por otro lado, se apreció un CMI mayor a 150 μM (252,28 mg/L) para *S. aureus* y para *C. albicans*.

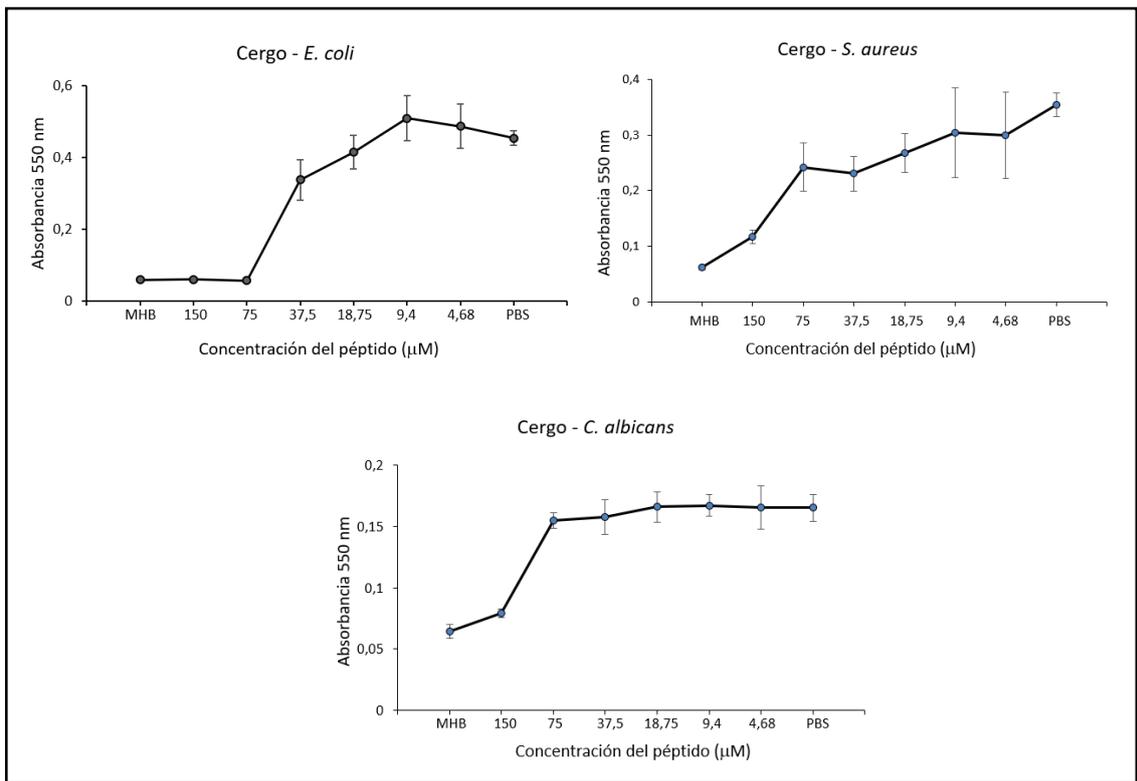


Figura 30. Evaluación del potencial antimicrobiano del péptido Cergo. Las gráficas son el resultado de la media de dos replicaciones del experimento.

4. CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis bioinformático y diseño de los péptidos

En este trabajo se diseñaron y sintetizaron tres péptidos cortos derivados de tres toxinas PLA₂ Asp49 de veneno de serpiente (Tabla 4). Estos son Bmje (YNKKYRYHLKSKKADK) originario de BmjeTX-I P86803 (PA2B1_BOTMA) (Figura 2), Bmtxj (YNKKYMKHLKPKCKKA) originario BmTX-I P0C8M1 (PA2B1_BOTMO) (Figure 3) y Cergo (NLRTYKKRYMFY) derivado de Q6EER5 (PA2B_CERGO) (Figura 4). Los tres péptidos fueron analizados mediante herramientas bioinformáticas para determinar si poseen las características físico-químicas que están relacionadas con la actividad antimicrobiana y antitumoral. Estas son: carga catiónica, hidrofobicidad, anfipaticidad y helicidad.

Los péptidos sintetizados Bmje, Bmtxj y Cergo presentaron una alta densidad de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos en sus secuencias, las cuales son características intrínsecas de la región C-terminal de las PLA₂s (81). Se establece que estas dos propiedades, en los rangos adecuados, son claves para la interacción, inserción y desestabilización de las membranas negativas del objetivo (42).

Diferentes trabajos han recomendado que la hidrofobicidad varíe en un rango de entre 8 y 22 kcal mol⁻¹ (14), lo cual es cumplido por el péptido Cergo (+12,46), al contrario de Bmje y Bmtxj que presentan una hidrofobicidad de +30,89 y +25,16 respectivamente (Tabla 5). Un exceso en la hidrofobicidad representa ser un problema, ya que investigaciones previas han señalado que al incrementar el valor de esta, también se aumenta la afinidad por fosfolípidos zwitteriónicos que están presentes en las membranas de las células de mamíferos (42). Este es el caso de las Magaininas, que son un grupo de PAMs altamente caracterizados en los cuales se ha encontrado que el aumento de la hidrofobicidad hace que el grado de especificidad del péptido hacia el microorganismo blanco disminuya y que su actividad hemolítica y citotóxica se acentúe (13,82). Sin embargo, Bmje y Bmtxj no mostraron una actividad hemolítica a ninguna de las concentraciones evaluadas a pesar de superar el rango recomendado. Se considera que la casi nula actividad hemolítica se debe a que la relación entre la longitud del péptido y su valor en porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos no supera el 50% de la conformación secuencial (42) en ninguno de los tres péptidos estudiados en este trabajo: Bmje con

29,71%, Bmtxj con 40% y Cergo con 50%. En este contexto, es importante recalcar que la relación estructura-función de los péptidos requieren un análisis más holístico, que considera diferentes parámetros y propiedades intrínsecas de la secuencia peptídica.

Con respecto a la carga, diferentes autores han sugerido que esté entre un intervalo de +2 a +9 para que el péptido tenga un efecto antimicrobiano (12–14) y una carga igual o mayor a 7 para que sea anticancerígeno (57,83), lo cual es cumplido por Bmtxj y Cergo, pero no por Cergo que posee una carga de +5 (Tabla 5). Los PAMs, a nivel de ensayos biológicos, poseen varias limitaciones, por lo cual es importante realizar ciertas modificaciones que aumenten la eficiencia de estas moléculas. Una modificación comúnmente empleada es la amidación del extremo terminal. Esta estrategia permite principalmente reducir la actividad hemolítica, estabilizar la formación de la alfa hélice anfipática e incrementar la estabilidad de los péptidos frente a proteasas (42,84). En virtud de esto, se utilizó la resina RinK Amide en la síntesis de los tres péptidos de este trabajo.

De igual manera, la anfipaticidad juega un papel crucial en la toxicidad interacción con las membranas de los blancos (12). Los péptidos Bmje, Bmtxj y Cergo denotan una anfipaticidad imperfecta (caras hidrofílicas e hidrofóbicas medianamente definidas). Diversas investigaciones han demostrado que una anfipaticidad de este tipo probablemente tienda a inhibir la actividad hemolítica y el efecto sobre las membranas de los blancos (42,85,86). Sin embargo, en el estudio realizado por Zhu (87), se demostró que el péptido con anfipaticidad disruptiva PRW4 también puede presentar actividad antibacterial y selectividad en bacterias Gram-positivas y Gram positivas. Esto ha generado discrepancias en cuanto al efecto de la anfipaticidad perfecta (caras muy definidas) e imperfecta sobre la función y selectividad de los PAMs y PACs. Por lo tanto, estos resultados subrayan la necesidad de más estudios para descifrar el enigma de la relación-estructura función de los péptidos, que es multifactorial.

Caracterización y purificación

Posterior al proceso de síntesis, los productos fueron analizados por RP-HPLC y MALDI-TOF MS. Con ello se pudo identificar los picos que contenían los péptidos, los cuáles marcaban absorbancias mayores de 0,80 UA a diferencia de los picos de las impurezas que marcaron absorbancias menores. Esto se considera un indicativo de la selectividad de la

síntesis (Figura 12,13,14). Con respecto a los tiempos de retención, estos varían con respecto a la hidrofobicidad, ya que las secuencias pueden generar mayor o menor interacción con la columna apolar del RP-HPLC (42) y FLASH (Figura 15,16, 17). Se observó que tanto para Bmje y Bmtxj eran similares (tanto en FLASH como en RP-HPLC), y si bien puede ser por su hidrofobicidad y estructura parecida, esto puede deberse más a las impurezas ya que ambos están “crudos” y no llegan al 80% de pureza. Esto hace que los tiempos de retención varíen. En cambio, ya purificados se observa una diferencia de 3 minutos, y en contra de lo esperado, Bmtxj eluye antes que Bmje que posee menor hidrofobicidad (Figura 18,20). La razón de este suceso puede deberse a que Bmje aún posee un porcentaje de impureza del 3% a diferencia de Bmtxj que está 100% puro.

En cambio, para Cergo se detectó un tiempo de retención de 13,5 minutos corroborando con que posee una mayor hidrofobicidad (Figura 22). Posterior a la purificación con FLASH, el tiempo de retención no varió mucho y esto puede deberse a que aun existía un 10% de impurezas, lo que es aceptable a comparación del 30% que tenía previa a la purificación. Al final se logró una pureza mayor al 90% en los tres péptidos, lo cual cumple con lo requerido o recomendado para realizar bioensayos (88).

Los espectros de masas, antes (Figura 9,10,11) y después de la purificación (Figura 19,21,23), mostraron una señal en m/z correspondientes a los péptidos Bmje, Bmtxj y Cergo, constatando las identidades de las moléculas.

4.2. Ensayos biológicos

4.2.1. Hemólisis

La selectividad es una característica primordial para la futura aplicación clínica de un péptido. Algunos péptidos caracterizados con alto potencial antimicrobiano y anticancerígeno, presentan a la par un elevado grado hemolítico (12–14). Investigaciones sugieren que los péptidos deben presentar un equilibrio con respecto a la hidrofobicidad, la carga, la anfipaticidad para evitar la actividad hemolítica (84,89). Por ejemplo, al aumentar la carga de +8 a +9 del péptido V13K resultó en una mayor actividad hemolítica, mientras que su disminución a +4 eliminó su actividad contra *P. aeruginosa* (90). Así mismo ocurrió con Indolicidin, cuya hidrofobicidad era cercano al 70% ya que es rico en triptófano,

haciendo que su aplicación clínica sea severamente limitada por su actividad hemolítica (82).

Ninguno de los tres péptidos Bmje, Bmtxj y Cergo mostraron actividad hemolítica en las concentraciones evaluadas (Figura 24). Probablemente se debe a que su hidrofobicidad no supera el 50%, a que poseen cargas dentro de lo establecido y su anfipaticidad es imperfecta. Todos estos aspectos permiten que los tres péptidos sean más selectivos y no hemolíticos. Además, la amidación de la región C-terminal que presentan Bmje, Bmtxj y Cergo puede contribuir a las actividades antimicrobianas, y a la reducción de la actividad hemolítica al disminuir la carga negativa estabilizando así la formación de una hélice anfipática (84). Los resultados de hemólisis *in vitro* corroboran con las predicciones *in silico* realizadas utilizando las herramientas bioinformáticas ToxinPred (Figura 7) y HemoPI (Figura 8).

4.2.2. Ensayos anticancerígenos

Diferentes investigaciones han mostrado que la citotoxicidad y selectividad de los PACs se debe a que las membranas de las células tumorales presentan una sobreexpresión de moléculas aniónicas (26,57,91). Por ello, al diseñar un péptido anticancerígeno se abordan los mismos principios usados para sintetizar PAMs efectivos, tales como carga, hidrofobicidad, estructura secundaria y anfipaticidad. El péptido Bmje presentó actividad antitumoral contra cáncer de mama (MCF-7) (Figura 26), con un $CL_{50} > 450 \mu M$ (Figura 27). Se puede inferir que su inicial actividad cancerígena se debió a que presenta una estructura alfa-helicoidal, que conjuntamente a su alta carga positiva, permitió al péptido afectar a MCF-7. Sin embargo, su carácter poco anfipático probablemente pudo ser la causante de que Bmje no sea potencialmente activo y requiera de altas concentraciones, ya que según el modelo de Carpet (modelo de la alfombra), los péptidos catiónicos y anfipáticos son los que logran unirse con mayor éxito a la superficie de las células (57). No obstante, se pudo observar que Bmje es altamente selectivo y mínimamente hemolítico a comparación de otros péptidos caracterizados en la literatura que, a pesar de tener alto potencial anticancerígeno, también inducen la hemólisis en concentraciones bajas (32,92). En este contexto se sugiere que debido a la notable selectividad presentada por Bmje, este péptido

representa un buen candidato para nuevas investigaciones que deben buscar reducir su CL_{50} frente a células tumorales y conservar su bajo efecto hemolítico.

Por otro lado, la moderada actividad del péptido genera desafíos y perspectivas para su futura aplicación. En este contexto, el sinergismo representa una oportunidad que se puede evaluar. Por ejemplo, en un estudio realizado por Nelson y sus colaboradores (29) se “combinaron” una PLA_2 Aps49 con drogas cancerígenas como paclitaxel y metotrexato, y se observó un efecto sinérgico y un incremento en la selectividad. Entonces Bmje, con su carácter catiónico, su estructura α -hélice y su incapacidad hemolítica, puede orientar a la droga anticancerígena hacia las membranas aniónicas de las células tumorales y mejorar así su selectividad, evitando a la vez el daño a las células sanas.

Por otro lado, el péptido Bmtxj mostró una inhibición de la viabilidad celular del 20% y 27% con las concentraciones de 250 μ M y 50 μ M respectivamente, contra la línea celular CACO-II (Figura 25,26). Se considera que esta leve actividad antitumoral se debe, de igual forma, a la carga catiónica que presenta (60% de los aminoácidos poseen carga positiva). Sin embargo, la anfipaticidad no es la idónea, lo que afecta su potencial anticancerígeno similarmente a como sucedió con el péptido Bmje.

El péptido Cergo no presentó una actividad antitumoral considerable en ninguna de las líneas celulares en las concentraciones evaluadas (Figura 25,26). Se asume que el principal problema con el péptido Cergo es que presenta una carga de +5, cuando se requiere de cargas iguales o mayores de +7 (57,83). Por otro lado, Cergo si presenta una anfipaticidad idónea, por lo que aumentar su carga podría otorgarle al péptido un potencial antitumoral inclusive mayor al presentado por Bmtxj y Cergo.

Otro punto a considerar es que la acción de los péptidos dependerá en gran medida del tipo de línea celular a tratar, ya que existe una variedad significativa en la estructura, forma y composición de las membranas (5,57). Por ejemplo, se ha observado que líneas celulares CAL27 Y SCC15 (derivados del carcinoma de células escamosas de la cavidad oral) mostraron heterogeneidad en la expresión de cargas aniónicas en su membrana celular, lo que claramente repercutiría sobre la acción antitumoral del péptido (57). Es probable que las células de HEPA-G2 y CACO-II presenten una menor carga aniónica superficial que las células de MCF-7; esto podría explicar el por qué los péptidos Bmje, Bmtxj y Cergo

presentaron actividad antitumoral (aunque bajo en el caso de Bmtxj y Cergo) contra MFC-7.

4.2.3. Ensayos antibacterianos

Las secuencias de los péptidos Bmje, Bmtxj y Cergo provienen de las regiones C-terminal de PLA_{2s} Asp49 básicas, sitios moleculares que han sido altamente citadas por diferentes investigaciones como la zona clave con mayor potencial antimicrobiano, especialmente por la presencia de varios residuos de lisina que le confiere su carga catiónica (26,38,93). Si bien los mecanismos de acción de los PLA_{2s} son diferentes, tienen en común de que no requieren de un agente complementario para efectuar su actividad antimicrobiana (94). Otra ventaja de los péptidos antibacterianos bioinspirados en PLA_{2s} es la poca resistencia que pueden generar a largo plazo (48).

Un análisis por microscopia electrónica de transmisión realizado por Páramo (15) indica que dicha región C-terminal de las PLA_{2s} produce cambios significativos en la morfología de las membranas bacterianas (95). De hecho, las investigaciones realizadas sobre el efecto antimicrobiano de PLA₂ de venenos de serpientes son en su mayoría basadas en esta región, ya sean de tipo Asp49 o Lys49. Por ejemplo, los péptidos p115-W3 (KKWRWWLKPLCKK) y pEM-2 (KKWRWWLKALAKK), los cuáles son originarios de la secuencia KKYRYLKLCKK provenientes del PLA₂ Lys49 aislado del veneno de serpiente de *Bothrops asper*, mostraron actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones mínimas bactericidas (CMB) contra las bacterias *S. aureus* (5,5 µg/mL para p115-W3 y 5 µg/mL para pEM-2), *S. enterica* serovar Typhimurium (10 µg/mL para p115-W3 y 5 µg/mL para pEM-2) y *E. coli* (5 µg/mL para pEM-2) (32). Cabe resaltar que dichas secuencias presentan similitud con Bmje (YNKKYRYHLKSKKADK), Bmtxj (YNKKYMKHLKPKCKA) y Cergo (NLRTYKKRYMFY).

Este estudio realizado con los péptidos pEM-2 y p115-W3 describen relaciones estructurales determinantes para las actividades antimicrobiana, antitumoral y hemolítica de los péptidos. En primera instancia en pEM-2 se dio un cambio de tirosinas (Y) por triptófanos (W), y se cambiaron la prolina (P) y cisteínas (C) por dos alaninas (A). Con estos cambios Santamaría y sus colaboradores (32) indican haber mejorado la hidrofobicidad, en especial con los residuos de triptófano (W) que presenta una clara preferencia por la región

interfacial de las bicapas lipídicas. Pero, se considera que lo que realmente mejoró su potencial está relacionado a la eliminación de la prolina y cisteína de la secuencia original.

Según los mismos autores, estos cambios se hicieron con el fin de evitar la dimerización oxidativa (Cys) y facilitar la síntesis (Pro). En este caso Bmtxj presenta en su secuencia ambos aminoácidos y se presume que su nula actividad contra *E. coli* se debe a ello, ya que se ha encontrado que la prolina afecta la capacidad del PAM de poder permeabilizar la membrana. Esto se debe a que la prolina puede estar alterando la postura α helicoidal del PAM gracias a su baja tendencia por formar este tipo de estructuras (96), lo que no concuerda mucho con el modelo presentado por I-TASSER (Figura 5). Sin embargo, p115-W3 presenta actividad contra *E. coli* a pesar de poseer Pro y Cys, aunque no en contra *S. aureus* como es el caso de Bmtxj que, con un CMI de 37,5 μ M pudo inhibir el crecimiento bacteriano de *S. aureus* (Figura 29)

Por otro lado, el péptido Bmje no presentó una actividad antibacteriana ni antifúngica (Figura 28). Se presume que este resultado puede deberse a que no posee una anfipaticidad idónea, ya que su parte hidrofílica supera considerablemente a su parte hidrofóbica (8 aminoácidos polares que integran una cara continua versus 5 aminoácidos apolares discontinuos) teniendo en cuenta también la longitud del péptido, lo que afectara de manera visible su potencial antimicrobiano (Figura 6). Probablemente su falta de actividad puede deberse a la presencia de un aspartato (D), ya que dicho aminoácido provee de una carga negativa a la secuencia lo que podría afectar su carácter catiónico. Sin embargo, la eliminación de las cargas negativas pudiera incrementar la actividad o potencia de los péptidos evaluados.

Finalmente, Cergo ha presentado actividad contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, especialmente en contra de *E. coli* con un CMI de 75 μ M (Figura 30) y una actividad bactericida contra *E. coli* a 150 μ M. Estos resultados pueden deberse a que cumple diversos parámetros con respecto a las diferentes propiedades analizadas en la parte inicial de la discusión. Presenta una carga de +5, además de la presencia de una Arg (R) cuya adición en los AMP suele ser una estrategia utilizada en trabajos similares (12–14), ya que otorga carga positiva a la secuencia. Además, Cergo presenta una hidrofobicidad que no supera el 50% y está dentro del intervalo de 8 y 22 kcal mol⁻¹ (12,46 kcal mol⁻¹) (Tabla 5) y más importante,

Cergo presenta un carácter anfipático notable debido al equilibrio existente entre sus caras hidrofóbicas e hidrofílicas (Figura 6).

Otro punto a considerar es el origen de los péptidos estudiados. Tanto Bmjje, Bmtxj y Cergo provienen de PLA₂s Asp49 que se caracterizan por presentar actividad catalítica, a diferencia de PLA₂s PLys49 que carecen de ella (7). Aunque ambos tipos de fosfolipasas presentan un efecto antibacterial, antifúngico y anticancerígeno, se ha notado que los péptidos derivados de Lys49 presenta mayor potencial. En un estudio realizado por Paramo y sus colaboradores (95) evaluaron el efecto antibacterial de myotoxin II (115-129) (bioinsirado en una PLA₂ Lys49) y de myotoxin III (Derivado de una PLA₂ Asp49), y se observó que, si bien ambos presentaban un efecto inhibidor de las unidades formadores de colonia, el péptido myotoxin II tenía mayor impacto (99% de reducción de UFC con 2,7 µg/mL de concentración). Se presume que esta diferencia se da debido a que las PLA₂ Lys49, al no tener actividad catalítica, recurre a otras regiones de la misma proteína para efectuar su efecto citotóxico sobre los fosfolípidos de las membranas celulares. Mientras las fosfolipasas Asp49 al presentar un mecanismo catalítico para romper las membranas celulares no depende de sus regiones para desestabilizar e inducir este efecto.

Tomando en cuenta la perturbación de la membrana celular como principal mecanismo de acción de péptidos derivados de PLA₂, la diferencia entre la potencia y actividad de los péptidos frente a los microorganismos y células aquí reportadas, se alinean a diversos trabajos que reportaron variaciones en la composición lipídica y proteica de las membranas celulares (97–100).

5. CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se identificaron tres regiones diferentes con potencial antimicrobiano: Bmje (YNKKYRYHLKSCCKADK), Bmtxj (YNKKYMKH LKPCCKA) y Cergo (NLRTYKKRYMFY) derivados de PLA2 Asp49 de venenos de serpiente, las cuales están ubicados en la zona C-terminal entre las posiciones 99 y 119 de las secuencias citadas.
- Se sintetizaron y purificaron tres péptidos correspondientes a Bmje, Bmtxj y Cergo, con una pureza del 91,17%, 100% y 90,05% respectivamente.
- Los péptidos Bmje, como Bmtxj y Cergo presentaron un carácter catiónico (+5, +7 y +7) e hidrofóbico (29,71%, 40% y 50%) similar a otros péptidos con actividad farmacológica descritos.
- Los tres péptidos sintéticos no mostraron actividad hemolítica en las concentraciones evaluadas.
- Bmje presentó actividad antitumoral hacia la línea celular MCF-7 con un CL₅₀ de 464,85 μ M.
- Cergo presentó actividad antibacteriana contra *E. coli* con un CMI de 75 μ M y una actividad bactericida con un CMB de 150 μ M.
- Bmtxj presentó actividad frente a la bacteria Gram-positiva *S. aureus* con un CMI de 37,5 μ M.
- La estructura primaria y características físico-químicas de los péptidos pueden ser responsables de las distintas potencias, actividades y selectividades observadas en los resultados.

5.2. RECOMENDACIONES

La ingeniería de estos péptidos, como eliminación de residuos negativos, pueden potenciar su actividad y debería ser evaluada. El estudio de la actividad sinérgica de los péptidos en combinación con fármacos utilizados en la clínica y/o otros péptidos pueden representar una oportunidad de desarrollo de estrategias innovadoras para problemas de salud pública.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Linde P. Resistencia a los antibióticos: La 'epidemia' que matará a más gente que el cáncer (si no lo remediamos) | Planeta Futuro | EL PAÍS. El País [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 7];
2. El País. Los 14 problemas de salud que más preocupan a la OMS | Planeta Futuro | EL PAÍS [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 8].
3. Pérez B. "En el 2050 morirá más gente por infecciones que por cáncer." 2019 Jan 7 [cited 2020 Apr 8];
4. DeVita VT, Lawrence TS RS. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. Lippincott Williams & Wilkins [Internet]. Lippincott Williams & Wilkins. 2011 [cited 2020 Feb 25]. 924–54 p.
5. Weinberg R. The Biology of Cancer. The Yale Journal of Biology and Medicine. Nueva York: Garland Science; 2006. 1–850 p.
6. Rivera S, Calderillo. Miguel, Quintana G. ONCOLOGÍA GENERAL PARA PROFESIONALES DE LA SALUD DE PRIMER CONTACTO [Internet]. México: Permanyer; 2017 [cited 2020 Apr 7]. 25–49 p. Available from: www.permanyer.com
7. Sobrinho JC, Simoes-Silva R, Holanda RJ, Alfonso J, Gomez AF, Zanchi FB, et al. Antitumoral potential of snake venom phospholipases A2 and synthetic peptides. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2016;17(14):1201–12.
8. Hoffmann F. Terapias biológicas en el cáncer [Internet]. 2009 [cited 2020 Apr 2]. 7.11-7.12.
9. Mahadevappa R, Ma R, Kwok HF. Venom Peptides: Improving Specificity in Cancer Therapy. *Trends in Cancer* [Internet]. 2017 Sep [cited 2018 Nov 30];3(9):611–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405803317301413>
10. Lilliam Cordiés Jackson D, Andrés Machado Reyes L, María Lilliam Hamilton Cordiés D. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Vol. 8, Índice Anterior Siguiete ACTA MEDICA. 1998.

11. Fernández F, López J, Ponce L, Macahado C. Resistencia bacteriana. *Rev Cuba Med Mil.* 2003 Jan 1;8(1):21–41.
12. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. Vol. 6, *Pharmaceuticals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2013. p. 1543–75.
13. Lei J, Sun LC, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. Vol. 11, *American Journal of Translational Research*. E-Century Publishing Corporation; 2019. p. 3919–31.
14. Almeida JR, Palacios ALV, Patiño RSP, Mendes B, Teixeira CAS, Gomes P, et al. Harnessing snake venom phospholipases A 2 to novel approaches for overcoming antibiotic resistance [Internet]. Vol. 80, *Drug Development Research*. Wiley-Liss Inc.; 2019 [cited 2020 Feb 20]. p. 68–85. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ddr.21456>
15. Paramo L, Lomonte B, Pizarro-Cerda J, Bengoechea J-A, Gorvel J-P, Moreno E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom . Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur J Biochem* [Internet]. 1998 Apr 15 [cited 2020 Feb 26];253(2):452–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.1998.2530452.x>
16. Araya C, Lomonte B. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms. *Cell Biol Int.* 2007;31(3):263–8.
17. Calderon LA, Sobrinho JC, Zaqueo KD, De Moura AA, Grabner AN, Mazzi M V., et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: New trends in cancer therapy. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
18. Chaisakul J, Hodgson WC, Kuruppu S, Prasongsook N. Effects of animal venoms and toxins on hallmarks of cancer. *J Cancer.* 2016;7(11):1571–8.
19. Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomomics. Strategy and applications. In: *Journal of Mass Spectrometry* [Internet]. 2007 [cited 2020 Feb 25]. p. 1405–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17621391>

20. Dhananjaya BL, Sivashankari PR. Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; an overview. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2015;15(7):649–57.
21. Almeida JR, Palacios ALV, Patiño RSP, Mendes B, Teixeira CAS, Gomes P, et al. Harnessing snake venom phospholipases A 2 to novel approaches for overcoming antibiotic resistance [Internet]. Vol. 80, *Drug Development Research*. Wiley-Liss Inc.; 2019 [cited 2020 Feb 24]. p. 68–85.
22. Rodrigues RS, Izidoro LF, de Oliveira RJJ, Sampaio S V, Soares AM, Rodrigues VM. Snake venom phospholipases A2: a new class of antitumor agents. *Protein Pept Lett* [Internet]. 2009;16(8):894–8.
23. Simoes-Silva R, Alfonso J, Gomez A, Holanda RJ, Sobrinho JC, Zaqueo KD, et al. Snake Venom, A Natural Library of New Potential Therapeutic Molecules: Challenges and Current Perspectives. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2018 Jun 21 [cited 2020 Feb 25];19(4):308–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29929461>
24. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* [Internet]. 2009 Apr [cited 2020 Feb 25];50(Supplement):S237–42. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R800033-JLR200>
25. Dennis EA, Cao J, Hsu Y-H, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem Rev* [Internet]. 2011 Oct 12 [cited 2020 Feb 25];111(10):6130–85. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr200085w>
26. Lomonte B, Angulo Y, Moreno E. Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A2 homologues from viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. *Curr Pharm Des*. 2010;16(28):3224–30.
27. Zouari-Kessentini R, Srairi-Abid N, Bazaa A, El Ayeb M, Luis J, Marrakchi N. Antitumoral potential of Tunisian snake venoms secreted phospholipases A2. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
28. Zouari-Kessentini R, Luis J, Karray A, Kallech-Ziri O, Srairi-Abid N, Bazaa A, et al. Two

- purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. *Toxicon* [Internet]. 2009;53(4):444–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.003>
29. Nelson J, Barlow K, Beck DO, Berbert A, Eshenroder N, Francom L, et al. Synergistic effects of secretory phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus* with cancer chemotherapeutic agents. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1–5.
 30. Samy R, Manikandan J, Sethi G, Franco O, Okonkwo JC, Stiles BG, et al. Snake Venom Proteins: Development into Antimicrobial and Wound Healing Agents. *Mini Rev Org Chem*. 2014 Apr 5;11(1):4–14.
 31. Sudarshan S, Dhananjaya BL. Antibacterial potential of a basic phospholipase a2 (VRV-PL-V) of *Daboia russellii pulchella* (Russell's Viper) venom. *Biochem* [Internet]. 2014 Nov [cited 2020 Feb 25];79(11):1237–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25540009>
 32. Santamaria C, Larios S, Quiros S, Pizarro-Cerda J, Gorvel J-P, Lomonte B, et al. Bactericidal and Antiendotoxic Properties of Short Cationic Peptides Derived from a Snake Venom Lys49 Phospholipase A2. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2020 Feb 24];49(4):1340–5. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.49.4.1340-1345.2005>
 33. Lehninger N. Nelson (2009) *Lehninger - Principios de Bioquímica 5ed* (1). 2009. 72–81 p.
 34. Navarrete E. Síntesis de péptidos. *Síntesis de Péptidos*. Cuernavaca-México: Universidad Autónoma de México; 2007. 61 p.
 35. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discov Today* [Internet]. 2015;20(1):122–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
 36. Rodríguez C. Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial. 2011;86. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6017/>

37. González M, Galán J, Morales F, Otero A. Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas | González García | Revista Cubana de Medicina Tropical. Rev Cubana Med Trop [Internet]. 2017 [cited 2020 Feb 26];9(2). Available from: <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/197/155>
38. Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Gräslund A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. J Biophys [Internet]. 2011 [cited 2020 Feb 26];2011:414729. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21687343>
39. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. Biopolym - Pept Sci Sect. 2000;55(1):4–30.
40. Som A, Vemparala S, Ivanov I, Tew GN. Synthetic mimics of antimicrobial peptides [Internet]. Vol. 90, Biopolymers - Peptide Science Section. 2008 [cited 2020 Feb 26]. p. 83–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314892>
41. Guo Y, Xun M, Han J. A bovine myeloid antimicrobial peptide (BMAP-28) and its analogs kill pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* by interacting with outer membrane protein A (OmpA). Med (United States) [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2020 Feb 26];97(42):e12832.
42. Yuribeth A, Santamaría B. Evaluación de la actividad antibacteriana y citotóxica de péptidos derivados de la secuencia Pfrif (321-340): RYRRKKMKKALQYIKLLKE. 2019.
43. Panda H, Jaiswal A, Narayan S. Proteins and Peptides as Anticancer Agents. In: Bioactive Food Proteins and Peptides [Internet]. CRC Press; 2011 [cited 2020 Feb 25]. p. 267–92. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b11217-13>
44. Gebrim LC, Marcussi S, Menaldo DL, de Menezes CSR, Nomizo A, Hamaguchi A, et al. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. Biologicals [Internet]. 2009 Aug [cited 2020 Apr 8];37(4):222–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19264509>
45. Mendes B, Almeida JR, Vale N, Gomes P, Gadelha FR, Da Silva SL, et al. Potential use of 13-mer peptides based on phospholipase and oligoarginine as leishmanicidal agents. Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol [Internet]. 2019 Dec 1 [cited

2020 Feb 24];226:108612.

46. Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson LA, Maccarana M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem* [Internet]. 1994 Nov 25 [cited 2020 Apr 8];269(47):29867–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961981>
47. Almeida JR, Mendes B, Lancellotti M, Marangoni S, Vale N, Passos Ó, et al. A novel synthetic peptide inspired on Lys49 phospholipase A 2 from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom active against multidrug-resistant clinical isolates. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2018 Apr 10 [cited 2020 Feb 21];149:248–56. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523418301922>
48. Memariani H, Shahbazzadeh D, Ranjbar R, Behdani M, Memariani M, Pooshang Bagheri K. Design and characterization of short hybrid antimicrobial peptides from pEM-2, mastoparan-VT1, and mastoparan-B. *Chem Biol Drug Des*. 2017 Mar 1;89(3):327–38.
49. Ma R, Mahadevappa R, Kwok HF. Venom-based peptide therapy: insights into anti-cancer mechanism. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Nov 21 [cited 2018 Nov 29];8(59):100908–30.
50. E-Kobon T, Thongararm P, Roytrakul S, Meesuk L, Chumnanpuen P. Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2016 [cited 2020 Feb 25];14:49–57.
51. Felício MR, Silva ON, Gonçalves S, Santos NC, Franco OL. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Front Chem* [Internet]. 2017 [cited 2018 Nov 30];5:5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28271058>
52. Organización Mundial de la Salud (OMS). Cáncer [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 26]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
53. Cancer Research UK. Worldwide cancer statistics [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb

26].

54. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
55. Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), Wild C, Weiderpass E, Stewart B. *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. 2018.
56. Garza J, Juárez P. *El Cáncer*. Primera. Ancer J, Garza R, Villarreal R, Salinas M, Garza C, Zavala J, editors. Vol. 1. México DF: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2014.
57. Solarte A, Doctorado En D, Biomédicas C, De F, Universidad M, De N, et al. Péptidos derivados de lactoferricina bovina como agentes anticancerígenos contra el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral. 2016.
58. Cervantes A. Resistencia a la quimioterapia: mecanismos y vías de modulación.
59. Sánchez-Suárez P, Luis Benítez-Bribiesca Y, Benítez Bribiesca L, Sánchez Suárez P. *Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas*. Vol. 1, *Cancerología*. 2006.
60. Quezada C, Peigñan L, Segura R, Riquelme F, Melo R, David Rojas Z, et al. Glioblastoma multiforme y estudio de la resistencia a la quimioterapia mediada por transportadores ABC. *Rev Med Chil*. 2011 Apr;139(4):415–24.
61. Lario AP, García CB, Echenique Elizondo M, Lobo C. Expression of proteins associated with multidrug resistance and resistance to chemotherapy in lung cancer. *Arch Bronconeumol*. 2007 Sep 1;43(9):479–84.
62. (OMS) OM de la S. United Nations meeting on antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ*. 2016 Sep 1;94(9):638–9.
63. Serra M. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana . *Rev Habanera Ciencias Médicas*. 2017 Sep 11;16(3):65–80.
64. Ooi N, O'Neill AJ. Revisiting unexploited antibiotics in search of new antibacterial drug candidates: The case of MSD-819 (6-chloro-2-quinoxalinecarboxylic acid 1,4-dioxide) [Internet]. Vol. 70, *Journal of Antibiotics*. Nature Publishing Group; 2017

[cited 2020 Feb 26]. p. 317–9.

65. Granados García M, Herrera Gómez Á. Manual de Oncología.Procedimientos Quirúrgicos [Internet]. cuarta. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORE, editor. México: McGraw-Hill Companies, Inc; 2010 [cited 2020 Feb 26]. 223–231 p. Available from: <http://bookmedico.blogspot.com>
66. Rozek T, Wegener KL, Bowie JH, Olver IN, Carver JA, Wallace JC, et al. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. *Eur J Biochem* [Internet]. 2000 Sep 1 [cited 2018 Nov 30];267(17):5330–41. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.2000.01536.x>
67. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, D. Appel R, Bairoch A. ExPASy: el servidor de proteómica para un profundo conocimiento y análisis de proteínas. *Acidos Nucleicos Rev* [Internet]. 2003 [cited 2020 Apr 6];31(13):3789–3788. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168970/>
68. Torrent M, Di Tommaso P, Pulido D, Nogués M, Notredame C., Boix E, et al. AMPA: un servidor web automatizado para la predicción de regiones antimicrobianas de proteínas. *Bioinformática*. 2012;28(1):1–29.
69. Freeman T, Badani H. PepDraw [Internet]. Universidad de Tulane. 2011 [cited 2020 Apr 6]. Available from: <http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/>
70. Yang J, Zhang Y. Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Curr Protoc Bioinforma*. 2015 Dec 1;52(1):5.8.1-5.8.15.
71. Mól AR, Castro MS, Fontes W. NetWheels: A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 6]. Available from: <https://doi.org/10.1101/416347>
72. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Raghava GPS. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. Patterson RL, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Sep 13 [cited 2020 Feb 26];8(9):e73957. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073957>

73. Chaudhary K, Kumar R, Singh S, Tuknait A, Gautam A, Mathur D, et al. A web server and mobile app for computing hemolytic potency of peptides. *Sci Rep*. 2016 Mar 8;6.
74. Proaño-Bolaños C, Zhou M, Wang L, Coloma LA, Chen T, Shaw C. Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziophyla calcarifer*. *J Proteomics* [Internet]. 2016 Sep [cited 2020 Jan 13];146:1–13.
75. Cautain B, De Pedro N, Schulz C, Pascual J, Sousa TDS, Martin J, et al. Identification of the lipodepsipeptide MDN-0066, a novel inhibitor of VHL/HIF pathway produced by a new *Pseudomonas* species. *PLoS One* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2020 Apr 3];10(5):e0125221.
76. Li C, Wu M, Wang H. LC₅₀ Calculado por Kochi, análisis de Probit y métodos de regresión lineal. *Prog Vet Med* [Internet]. 2012 [cited 2020 Apr 3];33(9):89–92. Available from: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-DYJZ201209022.htm
77. Ponce-Soto LA, Martins-de-Souza D, Marangoni S. Neurotoxic, Myotoxic and Cytolytic Activities of the New Basic PLA2 Isoforms BmjeTX-I and BmjeTX-II Isolated from the *Bothrops marajoensis* (Marajó Lancehead) Snake Venom. *Protein J* [Internet]. 2010 Feb 27 [cited 2020 Feb 2];29(2):103–13. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10930-010-9229-5>
78. Calgarotto AK, Damico DCS, Ponce-Soto LA, Baldasso PA, Da Silva SL, Souza GHM., et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* [Internet]. 2008 Jun [cited 2020 Jan 17];51(8):1509–19.
79. Chen YH, Wang YM, Hseu MJ, Tsai IH. Molecular evolution and structure-function relationships of crotoxin-like and asparagine-6-containing phospholipases A2 in pit viper venoms. *Biochem J* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2020 Feb 24];381(1):25–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032748>
80. CHEN Y-H, WANG Y-M, HSEU M-J, TSAI I-H. Molecular evolution and structure–function relationships of crotoxin-like and asparagine-6-containing phospholipases A2 in pit viper venoms. *Biochem J* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2020 Jan

17];381(1):25–34.

81. Costa TR, Menaldo DL, Oliveira CZ, Santos-Filho NA, Teixeira SS, Nomizo A, et al. Myotoxic phospholipases A₂ isolated from Bothrops brazili snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides*. 2008;29(10):1645–56.
82. Mirski T, Niemcewicz M, Bartoszcze M, Gryko R, Michalski A. Utilisation of peptides against microbial infections - a review. *Ann Agric Environ Med* [Internet]. 2017 Jun 7 [cited 2020 Feb 26];25(2):205–10.
83. Vogel HJ, Schibli DJ, Jing W, Lohmeier-Vogel EM, Eband RF, Eband RM. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. In: *Biochemistry and Cell Biology*. 2002. p. 49–63.
84. Kang S-J, Park SJ, Mishig-Ochir T, Lee B-J. Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2014 Dec 5 [cited 2020 Feb 24];12(12):1477–86.
85. Zhang SK, Song JW, Gong F, Li SB, Chang HY, Xie HM, et al. Design of an α -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Sci Rep*. 2016 Jun 8;6(1):1–13.
86. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function [Internet]. Vol. 1, *Protein and Cell*. Higher Education Press; 2010 [cited 2020 Apr 8]. p. 143–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21203984>
87. Zhu X, Dong N, Wang Z, Ma Z, Zhang L, Ma Q, et al. Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. *Acta Biomater* [Internet]. 2014 Jan [cited 2020 Apr 8];10(1):244–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24021230>
88. AmbioPharm.Inc. What purity percentage is required? [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 14]. Available from: <https://www.ambiopharm.com/faq/what-purity-percentage-is-required/>

89. Pfalzgraff A, Brandenburg K, Weindl G. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. Vol. 9, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2018. p. 281.
90. Jiang Z, Vasil AI, Hale JD, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolym - Pept Sci Sect* [Internet]. 2008 [cited 2020 Feb 26];90(3):369–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18098173>
91. Ma R, Mahadevappa R, Kwok HF. Venom-based peptide therapy: insights into anti-cancer mechanism. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Nov 21 [cited 2018 Nov 30];8(59):100908–30.
92. Lomonte B, Pizarro-Cerdá J, Angulo Y, Gorvel JP, Moreno E. Tyr→Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A2 expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1999 Nov 9;1461(1):19–26.
93. Santamaria C, Larios S, Quiros S, Pizarro-Cerda J, Gorvel J-P, Lomonte B, et al. Bactericidal and Antiendotoxic Properties of Short Cationic Peptides Derived from a Snake Venom Lys49 Phospholipase A2. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2020 Feb 21];49(4):1340–5. Available from: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.49.4.1340-1345.2005>
94. P. Samy R, Gopalakrishnakone P, G. Stiles B, S. Girish K, N. Swamy S, Hemshekhar M, et al. Snake Venom Phospholipases A2: A Novel Tool Against Bacterial Diseases. *Curr Med Chem* [Internet]. 2012 Dec 11 [cited 2020 Feb 26];19(36):6150–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22963667>
95. Páramo L, Lomonte B, Pizarro-cerdá J, Bengoechea JA, Gorvel JP, Moreno E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)- peptide identifies its bactericidal region. *Eur J Biochem* [Internet]. 1998 Apr 15 [cited 2020 Feb 26];253(2):452–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9654096>

96. Zhang L, Benz R, Hancock REW. Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of α -helical peptides. *Biochemistry* [Internet]. 1999 Jun 22 [cited 2020 Feb 26];38(25):8102–11.
97. Salton MR. Structure and function of bacterial cell membranes. *Rev Microbiol* [Internet]. 1967 [cited 2020 Apr 8];21:417–42.
98. Hubac C, Guerrier D, Ferran J, Tremolieres A, Kondorosi A. Lipid and protein composition of outer and inner membranes in wild-type strains and nod mutants of *Rhizobium meliloti*. *J Gen Microbiol*. 1992 Sep 1;138(9):1973–83.
99. Rilfors L, Wieslander A, Ståhl S. Lipid and protein composition of membranes of *Bacillus megaterium* variants in the temperature range 5 to 70 degrees C. *J Bacteriol* [Internet]. 1978 Sep 1 [cited 2020 Apr 8];135(3):1043–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/99426>
100. Perumal Samy R, Stiles BG, Franco OL, Sethi G, Lim LHK. Animal venoms as antimicrobial agents [Internet]. Vol. 134, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc.; 2017 [cited 2020 Feb 26]. p. 127–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28288817>