



**La Santiago**  
**transforma**  
**tu mundo**



**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE UN PÉPTIDO CATIÓNICO DERIVADO DE LA CECROPINA-D *Gallería mellonella* CON SISTEMAS DE MODELOS DE MEMBRANAS MULTILAMINARES QUE MUESTRAN SIMILITUD CON LAS MEMBRANAS BACTERIANAS**

**CRISTIAN GEOVANY ANTE VASQUEZ<sup>1</sup>**  
**ESMERALDA VERGARA MORENO<sup>2</sup>**

**DIRECTOR**  
**JOSE FERNANDO OÑATE GARZÓN**  
PhD Biología-Bioquímica y Biofísica

**CODIRECTOR**  
**DORIAN POLO CERÓN**  
PhD en Ciencias-Química

Universidad Santiago de Cali  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de Microbiología  
Santiago de Cali, Colombia  
2021



Calle 5a Carrera 62 Campus Pampalinda A.A. 4102 / Teléfono: PBX 5183000  
web: [www.usc.edu.co](http://www.usc.edu.co) / Nit. 890.303.797-1 / Santiago de Cali - Colombia





**La Santiago**  
**transforma**  
**tu mundo**



**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE UN PÉPTIDO CATIONICO DERIVADO DE LA CECROPINA-D *Gallería mellonella* CON SISTEMAS DE MODELOS DE MEMBRANAS MULTILAMINARES QUE MUESTRAN SIMILITUD CON LAS MEMBRANAS BACTERIANAS**

**CRISTIAN GEOVANY ANTE VASQUEZ<sup>1</sup>**  
**ESMERALDA VERGARA MORENO<sup>2</sup>**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Microbiólogo**

**DIRECTOR**  
**JOSE FERNANDO OÑATE GARZÓN**  
PhD Biología-Bioquímica y Biofísica

**CODIRECTOR**  
**DORIAN POLO CERÓN**  
PhD en Ciencias-Química

Línea de Investigación  
Química y Biotecnología

Grupo de Investigación  
QUIBIO

Universidad Santiago de Cali  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de Microbiología  
Santiago de Cali, Colombia  
2021



Calle 5a Carrera 62 Campus Pampalinda A.A. 4102 / Teléfono: PBX 5183000  
web: [www.usc.edu.co](http://www.usc.edu.co) / Nit. 890.303.797-1 / Santiago de Cali - Colombia



## IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
<b>Económico</b>	El uso de péptidos antimicrobianos como alternativa al uso de los antibióticos convencionales, redundará en la reducción de los altos costos en el manejo de las infecciones causadas por bacterias multidrogoresistentes (MDR).	Comunidad científica en general
<b>Científico</b>	Apropiación social del conocimiento. Los resultados obtenidos en esta investigación aportan significativamente al desarrollo de nuevos estudios enfocados en la modulación de las propiedades y características de los péptidos, las cuales inciden directamente en la acción antimicrobiana de estos.	Comunidad científica en general
<b>Tecnológico</b>	La implementación de estos métodos científicos, constituyen un soporte importante en el desarrollo de investigaciones en las cuales se requieren aproximaciones a resultados que no se logran alcanzar con la metodología tradicional.	Comunidad científica en general
<b>Ambiental</b>	El uso de los péptidos antimicrobianos reducirá significativamente la carga de residuos de antibióticos de consumo humano vertidos a las aguas residuales.	El medio ambiente (agua, flora y fauna)
<b>Social</b>	El uso de los péptidos antimicrobianos como alternativa en el tratamiento de procesos infecciosos, contribuye a la mitigación de enfermedades de vigilancia epidemiológica, y a una posible reducción de morbilidades y comorbilidades que afectan la calidad de vida de la población.	Población general

# ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE UN PÉPTIDO CATIONICO DERIVADO DE LA CECROPINA-D *Gallería mellonella* CON SISTEMAS DE MODELOS DE MEMBRANAS MULTILAMINARES QUE MUESTRAN SIMILITUD CON LAS MEMBRANAS BACTERIANAS

Cristian Geovany Ante Vasquez<sup>1</sup>, Esmeralda Vergara Moreno<sup>1</sup> José Fernando Oñate Garzón<sup>1</sup>, Dorian Polo Cerón<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Investigación QUIBIO - Línea de Investigación Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Básicas; Universidad Santiago de Cali, Campus Pampalinda Calle 5 No 62-00, Santiago de Cali-Colombia.

<sup>4</sup>Director Grupo de Investigación LICAP- Departamento de Química, Universidad del Valle, Campus Meléndez Calle 13 No 100-00, Santiago de Cali-Colombia.

## RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos son de gran importancia en muchos organismos vivos, ya que forman parte de su sistema inmune innato, realizando el rol de efectores en la defensa contra agentes infecciosos. Estos se encuentran en gran diversidad de seres vivos, de los cuales, se han aislado una gran variedad de estas moléculas, como por ejemplo la CECROPINA-D proveniente de *Gallería mellonella*; el péptido sintético M1 de 39 aminoácidos que ha sido obtenido a partir de la secuencia de Cecropina *Gallería mellonella*, es un homólogo catiónico derivado del péptido extraído originalmente. Se conoce que la acción antimicrobiana de estas moléculas se debe a la atracción de cargas opuestas que se dan entre la membrana microbiana con carga aniónica y el péptido con carga catiónica, por lo tanto, causa alteraciones en el cambio de fase resultando en un aumento de la permeabilidad de la membrana. Sin embargo, no se tiene suficiente información sobre los mecanismos de acción que tienen los péptidos para causar el cambio de fase de la membrana; En este trabajo, se evaluará el efecto del péptido sobre el comportamiento termotrópico de modelos de membrana que simulan a las de las bacterias, constituidas por DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina) y DMPG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilglicerol), respectivamente. Además, un análisis *in Silico* permite reconocer las interacciones moleculares péptido-membrana necesarias para entender dicho efecto. Se implementó la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DCS) y algoritmos de Dinámica Molecular, obteniendo resultados que comprobaron la capacidad de perturbación del péptido M1 a la membrana sintética. Se estima que esta capacidad está dada por la modulación de las características y parámetros fisicoquímicos sobre los modelos de membranas. Se observó un fuerte efecto en las membranas multilaminares (**MLVs**) formada por la mezcla Fosfatidilcolina (DMPC) y Fosfatilglicerol (DMPG) en una proporción (3:1), sobre el cambio de fase gel a cristalina con presencia del péptido, reduciendo en 1,7 °C la temperatura necesaria para la transición. En la concentración 1:10 del péptido, se presentó un cambio de fase gel a cristalina sin requerimiento de energía suministrada por un sistema externo. En la Dinámica Molecular se observó las interacciones de tipo HB: enlace de hidrógeno; IE: interacción electrostáticas; y HI: interacción hidrofóbicas presentes en el sistema durante un tiempo de 10 ns, repartido con toma de datos cada 2 ns, encontrando una gran presencia de interacciones de tipo enlaces de hidrógeno entre el péptido M1 y el resto del sistema, con afinidad por lípidos de DMPG y ausencia de afinidad con los lípidos DMPC, además se identificaron los principales aminoácidos que participaron de dichas interacciones. Otros datos encontrados y expuestos en este trabajo son el resultado de RMSD y de los datos de los resultados del Radio de Giro del péptido M1 en el sistema.

**Palabras clave:** péptidos catiónicos análogos, Cecropina D, *Gallería mellonella*, Dinámica Molecular.

## ABSTRACT

Antimicrobial peptides are of great importance in many living organisms, since they are part of the innate immune system, performing the role of effectors in defense against infectious agents. These are found in a great diversity of living beings, from which a great variety of these molecules have been isolated, such as CECROPINA-D from *Galleria mellonella*; the synthetic peptide M1 of 39 amino acids that has been obtained from the sequence of Cecropina *Galleria mellonella*, is a cationic homologue derived from the originally extracted peptide. It is known that the antimicrobial action of these molecules is due to the attraction of opposite charges that occur between the microbial membrane with an anionic charge and the peptide with cationic charge, therefore, it causes alterations in the change of phase resulting in an increase of the permeability of the membrane. However, there is not enough information about the mechanisms of action that peptides must cause the phase change of the membrane; In this work, the effect of the peptide on the thermotropic behavior of membrane models that simulate those of bacteria, consisting of DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and DMPG (1,2 -Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol), respectively. Furthermore, an in-silico analysis allows us to recognize the peptide-membrane molecular interactions necessary to understand this effect. For both activities, the Differential Scanning Calorimetry (DCS) technique and Molecular Dynamics algorithms were implemented, respectively. The results confirmed the perturbation capacity of the M1 peptide. It is estimated that this capacity is given by the modulation of the physicochemical characteristics and parameters on the membrane models. A strong effect was observed in the multilamellar membranes (MLVs) formed by the mixture Phosphatidylcholine (DMPC) and Phosphatylglycerol (DMPG) in a ratio (3: 1), on the change from gel to crystalline phase with the presence of the peptide, reducing by 1, 7 ° C the temperature necessary for the transition. At 1:10 concentration of the peptide, a gel to crystalline phase change occurred without requiring energy supplied by an external system. In Molecular Dynamics, HB-type interactions were observed: hydrogen bonding; IE: electrostatic interaction; and HI: hydrophobic interaction present in the system for a time of 10 ns, distributed with data collection every 2 ns, finding a large presence of hydrogen bond-type interactions between peptide M1 and the rest of the system, with affinity for lipids of DMPG and absence of affinity with DMPC lipids, in addition the main amino acids that participated in these interactions were identified. Other data found and exposed in this work are the result of RMSD and the data of the results of the Radius of Gyration of peptide M1 in the system.

**Keywords:** cationic peptide analogues, Cecropin D, *Galleria mellonella*, Molecular Dynamics

## 1. INTRODUCCIÓN

Los PAMs (Péptidos antimicrobianos) juegan un papel importante en el sistema inmune innato de muchos organismos vivos y son de interés científico para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, con el fin de sustituir o llegar a ser alternativas viables antimicrobianas en diferentes sectores industriales y clínicos. La mejora de la actividad antimicrobiana por incremento de las cargas catiónicas a los PAMs realizadas en trabajos previos, deja como resultado el interés de seguir investigando con más profundidad sus mecanismos de acción antimicrobianos [1]. Estas moléculas se encuentran en los organismos vivos incluyendo insectos, vertebrados y plantas, siendo componentes integrales del sistema inmune innato [2]. Los PAMs además poseen, toxicidad selectiva que permite atacar de manera específica las células blanco mediante mecanismos que, al parecer, dificultan la aparición de fenómenos de resistencia [3].

En la mejora de Péptido CECROPINA-D *Gallería mellonella* (WT) se insertaron residuos cargados positivamente en los primeros 18 aminoácidos de la región N-terminal, de la siguiente manera: péptido M1 con carga neta +9 con cinco sustituciones (E<sub>1</sub> R, E<sub>6</sub> Y, E<sub>8</sub> R, Q<sub>12</sub> K, y D<sub>16</sub> K), estas cargas catiónicas aumentan la acción antimicrobiana debido al incremento de la magnitud de la interacción con los lípidos que conforman la estructura de la membrana celular, donde se lleva a cabo la lisis celular, aspecto de gran interés en este estudio [3] otros estudios como el realizado por Oñate et al., 2017 en donde se demostró que el incremento de carga aumentó

significativamente la actividad antimicrobiana casi 40 veces motiva a continuar con la investigación conocer detalles sobre el mecanismo de acción, del péptido sobre la membrana que imita a bacterias.

El problema radica en que el mecanismo de acción de los PAMs aún tiene muchos interrogantes, por lo que se hace necesario estudiar cómo los PAMs interactúan con sus objetivos y, en consecuencia, como logran atacar los microorganismos. Este es un gran reto, ya que los métodos establecidos en estudios anteriores no proporcionan muchos detalles de la mecánica molecular. Especialmente, los métodos para estudiar los compuestos con actividad sobre las membranas han sido limitados [4]. La mayoría de las investigaciones se han centrado en la obtención y purificación de moléculas provenientes de insectos, plantas y otros mamíferos [5].

En la literatura no se encuentra información suficiente que demuestre una relación clara entre los grupos estructurales de los PAMs y su modo de acción. Incluso los PAMs con estructuras muy similares pueden tener mecanismos de acción drásticamente diferentes. Por ejemplo, la Buforina se dirige al ADN y al ARN; mientras que la Magainina 2, un péptido de estructura similar se dirige a la membrana celular causando la lisis celular. Aunque una predicción precisa de la actividad, modo de acción y rango de hospedaje basada en la estructura puede no ser posible, ciertos principios generales de diseño han sido propuestos por estudios previos [6]. El tamaño, la carga, la hidrofobicidad, la anfipaticidad y la solubilidad son propiedades fisicoquímicas cruciales para sus actividades antimicrobianas y la especificidad de los objetivos, es por lo que el cambio de estas características incidirá en la modificación de la actividad y el espectro objetivo de las PAMs [7].

Ortiz López encontró en sus estudios sobre Diseño de nuevos péptidos antimicrobianos, que el aumento de la actividad antimicrobiana no se debe exclusivamente al aumento de la carga positiva global del péptido, sino a la distribución de cargas positivas a lo largo de su estructura; Adicionalmente, comprobó que es posible mejorar las propiedades bioquímicas de los péptidos, añadiendo o quitando, estructuras nuevas conformadas por aminoácidos, e incrementar su actividad antibacteriana y mitigar su toxicidad. Por ejemplo, el aumento de las cargas positivas de los péptidos, así como el aumento de su naturaleza hidrófoba, incidieron positivamente en la actividad antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y de la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina, utilizando un péptido análogo identificado como GIBIM-P6 (*Datos del DC dicroísmo circular de los péptidos*), una estructura de hélice alfa bien definida. Este péptido fue diseñado *in Silico* como péptido antibacteriano de tipo hélice alfa y se visualizó con el programa PEP-FOLD 3.5 [8].

En el presente estudio se evaluó la interacción con las membranas bacterianas a nivel molecular del péptido análogo de Cecropina D; el cual fue modificado aumentando residuos cargados positivamente; los resultados obtenidos confirmaron su capacidad de perturbar la membrana modelo, lo cual aporta significativamente a los estudios actuales tendientes a posibilitar el uso de estos como alternativas médicas de forma segura y eficaz.

Para el estudio de interacción péptido-membrana se utilizaron vesículas sintéticas formadas por fosfolípidos. El uso de estas membranas modelos es de gran importancia, dado que estas muestran similitudes en su estructura, composición, selectividad y son fácilmente modulables, permitiendo el control de variables como el pH, fuerza iónica, actividad osmótica, composición química, entre otros, así como incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y de carácter anfifílico [7].

*A través de Dinámica Molecular se simuló y analizó el comportamiento o evolución del sistema en los parámetros (físico, químico o biológico) a través del tiempo, calculando las fuerzas entre los átomos que lo conforman mediante las ecuaciones del movimiento de Newton. Operacionalmente, este es un método que permite generar las trayectorias del sistema conformado por los modelos de membrana interactuando con el péptido.*

El objetivo de esta investigación fue identificar el mecanismo molecular responsable, de la actividad antimicrobiana, que tiene el péptido sobre la membrana modelo bacteriana de PC/PG, mediante la evaluación del comportamiento termotrópico y el análisis de la dinámica molecular.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Preparación de membrana modelo DMPC/DMPG para simular membranas bacterianas.

#### 2.1.1. Materiales

Para el desarrollo de este estudio, se adquirió el péptido Cecropina 1, lote U8724EC con una pureza del 96.1 %. Este péptido se obtuvo por el método de síntesis de fase sólida SSP.

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas del péptido M1

<b>Tipo</b>	Catiónico
<b>Secuencia</b>	RNFFKRIRRAGKRIRKAIISAAPAVETLAQAQKIIKGGD
<b>Carga</b>	+9
<b>Estructura</b>	Lineal de $\alpha$ -hélice sin residuos de cisteína
<b>Otras características</b>	Sustituciones en la parte N-terminal

#### Liposomas

En la tabla No 2 se relacionan los lípidos utilizados DMPC Y DMPG.

**Tabla 2.** Lípidos utilizados en las vesículas multilaminares MLVs

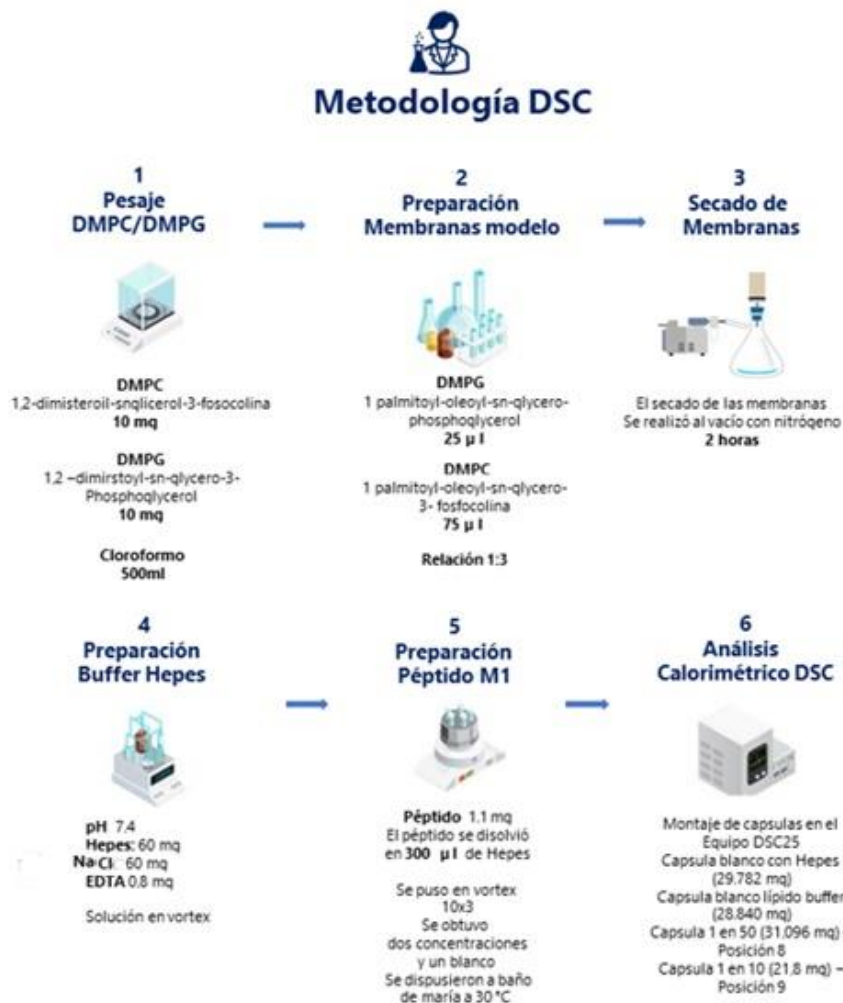
<b>Fosfatidilcolina</b>	<b>Tm</b>	<b>Fosfatilglicerol</b>	<b>Tm</b>
1,2 dimiristoil-sn glicero-3-fosfocolina (DMPG)	23°C	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilglicerol (DMPC)	23°C

#### 2.1.2. Preparación de las membranas

Los lípidos anhidros fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilcolina zwitteriónicos (PC) deshidratados se disolvieron en cloroformo / metanol (2: 1 v/v). Luego, cantidades suficientes de PC y PC / PG (3:1 o 1:1) que imitan las membranas de bacterias, respectivamente, se secaron bajo una corriente suave de nitrógeno y se colocaron al vacío durante 3h para eliminar cualquier solvente residual. Las películas lipídicas se hidrataron con tampón HEPES (HEPES 25 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, 0,2 mM EDTA), agitando vigorosamente durante 2 minutos

llevándolas a incubar durante 10 minutos a 37 °C por encima de la temperatura de transición de fase (T<sub>m</sub>), repitiendo esto tres veces en la obtención de vesículas multilaminares (MLV).

En la figura 1 se ilustra el esquema de la metodología desarrollada



**Fig. 1.** Metodología desarrollada para la DSC

A través del análisis por Calorimetría diferencial de barrido (DSC) se estudió la interacción del péptido con el sistema de modelo de membrana.

## 2.2. Análisis calorimétrico

### 2.2.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El análisis DSC se realizó utilizando un instrumento TA (DSC Q25). Los MLVs se prepararon usando 2 mg de lípidos y tres diluciones de péptidos para dar diferentes relaciones péptido-lípido: 1:10, 1:50 y 1:25; El tampón HEPES se utilizó como solución de referencia. Las muestras se encapsularon en bandejas DSC de aluminio estándar y el escaneo se realizó con una rampa de temperatura de 8-40 °C a una velocidad de calentamiento de 1 °C min<sup>-1</sup>. Los termogramas se analizaron utilizando el paquete de software Tríos (TA Instruments) para obtener la temperatura de transición de fase (T<sub>m</sub>) y la entalpía de transición ( $\Delta H$ ).

### **2.2.1.1. Montaje de las muestras en DSC**

Para el análisis en DSC se montaron 3 cápsulas, en las siguientes posiciones: Capsula blanco buffer con 28,840 mg en la Posición 7, Cápsula 1:50 con 31,096 mg en la Posición 8, y la Cápsula 1:10 con 21,8 mg en la Posición 9.

Los termogramas se analizaron utilizando el paquete de software Tríos (TA Instruments) para obtener la temperatura de transición de fase (T<sub>m</sub>) y la entalpía de transición ( $\Delta H$ ).

## **2.3. Modelación molecular del péptido antimicrobiano**

### **2.3.1. Equipo**

Equipo de cómputo, Lenovo Intel (R), Core (TM) i5-5200U CPU @ 2.20GHZ 2.20 GHz

### **2.3.2. Programas informáticos**

Windows VMD (Visual Molecular Dynamics) PyMOL GROMACS Linux, Para los estudios de dinámica molecular se utilizaron programas y bases de datos como NAMD, ProSA-Web, MolProbity, CHARMM-GUI, GROMACS, I-TAISSER y PyMOL.

Para la predicción de la estructura molecular del péptido de interés, se utilizó la plataforma I-TAISSER, en la cual se copió la secuencia del péptido que se obtuvo anteriormente en formato FASTA, el cual arrojó los resultados de diferentes modelos y se procedió a seleccionar el mejor candidato que se ajustara a las necesidades del estudio.

### **2.3.3. Validación de la modelación del péptido antimicrobiano**

Para la validación del péptido se procedió a cargar el archivo o modelo en ProSA-Web a formato PDB, para el cálculo del puntaje de calidad general para la estructura y de ese modo asegurar si se encontraba entre la puntuación z de la estructura, y si estaba dentro del rango típico requerido. La verificación de la validación se realizó por la plataforma MolProbity, a través del análisis de Ramachandran.

Se utilizó como molde el PDB Hit 2la2A el cual pertenece a la estructura de la solución de papiliocina aislada de la mariposa cola de golondrina, *Papilio xuthus*, clasificada además como proteína antimicrobiana.

### **2.3.4. Modelado de membrana**

Mediante la herramienta CHARMM-GUI se prepararon los modelos de membrana DMPC: DMPG con proporción 3:1, respectivamente, estipulando la bicapa como diseño para ambos sistemas; la orientación del péptido con respecto a la membrana para todos los sistemas fue el alineando principal del eje a lo largo de Z, con una posición de traslado a lo largo del eje Z, considerando para el péptido una distancia de 30 Å. Se seleccionó una forma rectangular para la caja de agua que contenía la membrana y el péptido, se modeló un espesor de 32 Å de agua. El sistema se solvató con iones de KCl a una concentración 0.15 M, la distribución de los iones se planeó

estadísticamente al azar mediante la opción de distribución de Monte-carlo. Por último, se utilizó la herramienta GROMACS como sistema de entrada para correr el sistema a una temperatura de 37 °C.

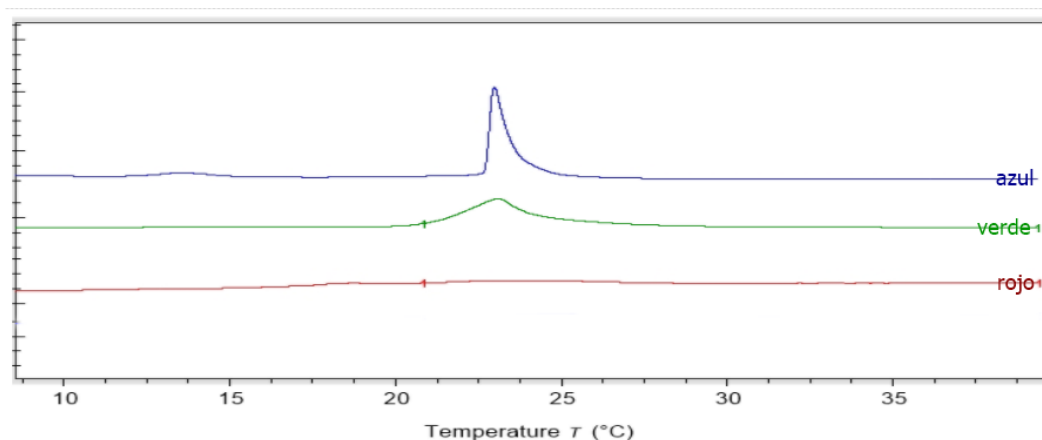
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis calorimétrico

##### 3.1.1. Curvas calorimétricas obtenidas

Los perfiles termotrópicos obtenidos por medio de la técnica DSC, permiten estudiar los datos cuantitativos del comportamiento endotérmico en función a las diferentes proporciones molares péptido-lípido. DSC es una técnica física relativamente simple y directa que mide los parámetros termodinámicos asociados con las transiciones de fase inducidas térmicamente [9].

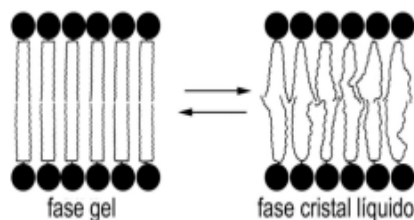
La estabilidad del sistema se ve asociada a la energía que se suministra al sistema, presentando así los cambios de fase con la energía ideal, mientras que la entalpía se asocia a la energía térmica. Al aumentar la temperatura las cadenas de acilo que forman las estructuras de los fosfolípidos disminuyen el efecto hidrofóbico de van der Waals dando lugar la transición de gel a cristalino [10].



**Fig. 2.** Termograma ensayo de interacción péptido PCPG

**La Figura 2** perfil termotrópico obtenido de los tres ensayos, interacción péptido y la membrana sintética a una proporción molar 1:10 ---- rojo (17,2 °C), 1:50----verde (19,4°C), 0:1----azul (22,7°C)

El termograma ilustrado en la figura 2, resume los resultados donde se observan notorias diferencias en la pronunciación los perfiles endotérmico asociado a la transición de fase respecto a la relación molar 0:1 y los termogramas obtenidos de las concentraciones 1:10 y 1:50. Se observa un pico bien pronunciado referente al cambio de fase y otro de menor pronunciación que hace referencia a la temperatura de Pre-transición de la membrana sin presencia de M1, a medida que la cantidad de péptido aumenta, se reduce la entalpía de transición de  $1,72 \text{ J.g}^{-1}$  a  $0,5 \text{ J.g}^{-1}$ . Lo cual demuestra una afinidad del péptido hacia la membrana MLVs, que según como se presentará en los resultados de DM. De este modo, en la relación molar 1:10 del péptido M1 con la membrana MLVs conformada por DMPC/DMPG 3:1 no se presenta un pico pronunciado de transición notorio, sugiriendo que M1 tiene un efecto en la transición de fase de la membrana según la comparación de los perfiles del endotérmicos.



**Fig. 3.** Representación cambio de fase

**Tabla 3.** Cambio de valores de la temperatura de transición péptido-lípido a diferentes concentraciones

MLVs	PCPG-Péptido cociente molar	Temperatura Pre-transición	Tm(°C)	$\Delta H$ (J.g <sup>-1</sup> )
DMPC: DMPG	0:1	13,6	22,7	1,72
DMPC: DMPG Péptido	1:50		19,4	1,56
	1:10		17,2	0,5

En la tabla No 3 se observan diferentes concentraciones y variaciones de temperatura 1:10 (17,2°C), 1:50 (21,0°C) y 0:1 (22,7°C). Se observa la disminución de la temperatura de transición de fase de la MLVs, con diferencia de menos 5.5 °C en presencia del péptido en relación molar 1:10.

La MLVs de DMPC/DMPG 3:1 mostró el pico endotérmico en las temperaturas de pretransición de 13,6 °C y principal 22,7 °C. Se puede identificar que a medida que aumenta la concentración del péptido en relación con la membrana, disminuyen los valores de Tm.

Los resultados demostraron un fuerte efecto en la membrana **MLVs**, en el cambio de fase gel a cristalina con presencia de M1, reduciendo en 1,7 °C la temperatura necesaria para la transición, a la concentración 1:50 comparada con el perfil termotrópico de la vesícula sin presencia de M1 y eliminado el pico endotérmico del termograma al estar presente el péptido en la concentración más alta 1:10 cual indica la ausencia de una transición de fase la cual no ocurre debido al efecto que tiene el péptido M1 a la concentración 1:10 donde genera en las cadenas de acilo de los fosfolípidos de DMPG conformeros gauche, que desajusta la membrana, haciéndola más fluida (Figura. 3).

Se conoce gracias a Riske et al. [11] que hasta un 20% de la población de lípidos fluidos se encuentran entre las transiciones pre y principal que conforman la membrana, la fase cristalina presenta conformadores de gauche en las cadenas de acilo que conforman los fosfolípidos en la pretransición [12]. De esta manera M1 suprime la pretransición, la Tm cambia moderadamente, y el tamaño del pico de la transición principal disminuye a medida que aumenta el ancho del pico.

### 3.2. Predicción estructura molecular del péptido

Los resultados obtenidos por I TASSER muestran las regiones donde se forman cadenas  $\alpha$ -hélice anfipáticas, que son de gran importancia para este estudio, ya que este tipo de cadenas, tienen como propiedad una alta estabilidad, por su composición de residuos hidrófobos en un lado de la hélice y residuos catiónicos / hidrófilos al otro lado, contribuyendo así a su actividad antibacteriana [5]. El péptido en su estructura presenta una  $\alpha$ -hélice anfipática desde los residuos 2 hasta el residuo 20, y desde el residuo 23 hasta el residuo 36, presentando dos cadenas  $\alpha$ -hélice (figura 4).

	20 
<b>Sequence</b>	RNFFKRIRRAGKRIRKAIISAAPAVETLAQAQKIIGGD
<b>Prediction</b>	CCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCHHHHHHHHHHHHHHHHCCC
<b>Conf. Score</b>	94889999998899998985160999999999871689
	H:Helix; S:Strand; C:Coil

**Fig. 4.** Estructura secundaria prevista por I TASSER

En la tabla 4 se registran los puntajes obtenidos para el mejor modelo seleccionado.

C-score	TM estimada	RMSD
0,39	0,77± 0,10	1.5±1.4Å

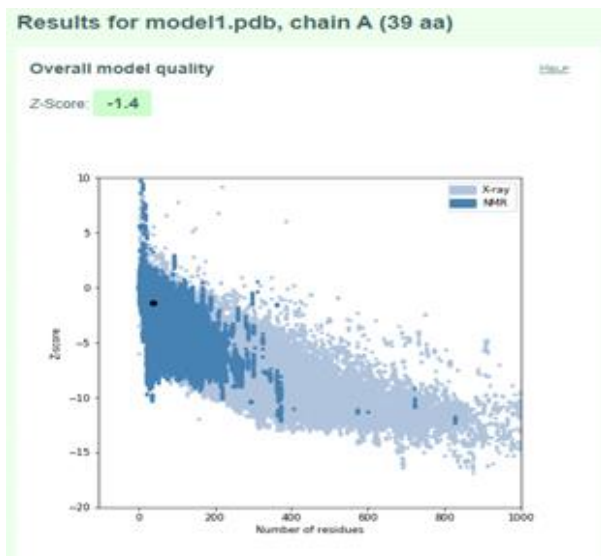
**Tabla 4.** Puntaje obtenido para el modelo seleccionado

El C-Score esta entre el rango de -5,2, a mayor valor más confiable el modelo.

La puntuación C-score es una puntuación de confianza para estimar la calidad de los modelos predichos por I-TASSER. Se calcula en función de la importancia de las alineaciones de la plantilla de roscado y los parámetros de convergencia de las simulaciones del ensamblaje de la estructura. El puntaje C está típicamente en el rango de [-5,2], donde un puntaje C de valor más alto significa un modelo con una alta confianza y viceversa. La puntuación <sup>TM</sup> estimada más alta informa que proteína PDB encontrada por I-TASSER podemos seleccionar, es este estudio se eligió la 2la2A como plantilla.

Una vez generado el modelo tridimensional presentado en la figura 5 se pasó a evaluar la "calidad" de los modelos basándose en distintos conceptos. La validación fue realizada en ProSA Web, plataforma de validación de estructuras proteicas, que permiten el reconocimiento de errores en estructuras tridimensionales. Este programa evalúa cuál es la energía del modelo tridimensional basado en estos potenciales. Se espera que los modelos malos tengan energías más altas que los buenos.

La estimación de calidad para el péptido M1 se realizó a través del análisis de Ramachandran.



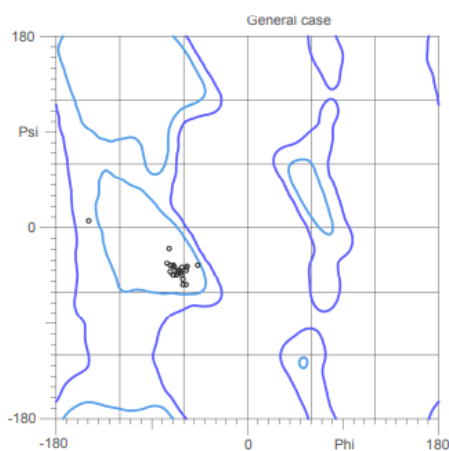
**Fig. 5.** Péptido M1 calificación z-Score -1.4

La puntuación z del péptido M1 indica la calidad general del modelo. Su valor se muestra en las gráficas que contienen las puntuaciones z de todas las cadenas de proteínas determinadas experimentalmente en el PDB actual [13] [14].

El puntaje obtenido de un z - 1.4, está alejado del valor ideal que sería -5; lo que indica posibles errores o zonas problemáticas que podrían afectar la interacción del péptido con la membrana; Sin embargo, al ser seleccionado por el sistema, probablemente los sitios de interés estén excluidos de dichas zonas, aspecto que debería tenerse en cuenta durante el análisis de resultados en la última fase.

### 3.3. Validación por MOLPROBITY

Se realizó una validación de estructuras de amplio espectro de la calidad del modelo y se obtuvo el siguiente gráfico de Ramachandran (figura 6).

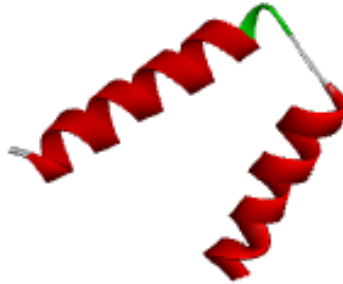


**Fig. 6.** Análisis de Ramachandran para el péptido M1 de 39 aa

El 91,9% (34/37) de todos los residuos fueron favorecidos. (98%) regiones.  
El 100,0% (37/37) de todos los residuos se encontraban en regiones permitidas.

### 3.4. Péptidos diseñados en PyMOL

La visualización y animación de las estructuras moleculares se realizaron en **PyMOL**, en la figura 7 se observa el péptido simulado.

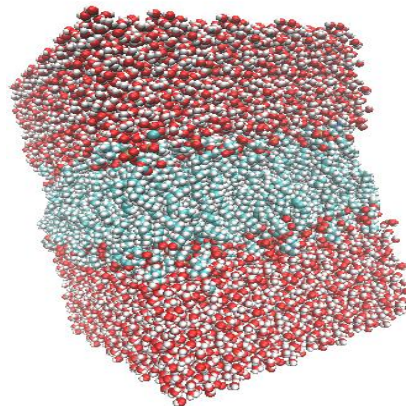


**Fig. 7.** Longitud péptido M1 30.2 Å y 28.5 Å,

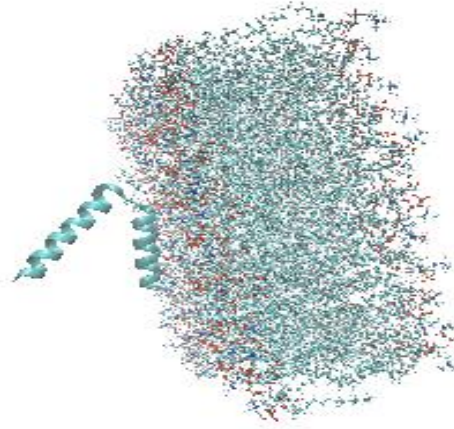
La (figura 7) ilustra la formación de 2  $\alpha$ -hélices anfipáticas en el péptido M1. Con presencia de la hélice desde el residuo 2 al 20 y del 22 al 36.

### 3.5. Sistema de membrana

En las figuras 8 y 9 se ilustran el sistema montado, la simulación en GROMACS visualizados con la herramienta VMD 1.9.3. Observándose el sistema completo en la figura 8 y con ausencia de la caja de agua en la figura 9.



**Fig. 8.** Sistema de membrana completo de DMPG/DMPC en la caja de agua visualizada en VMD

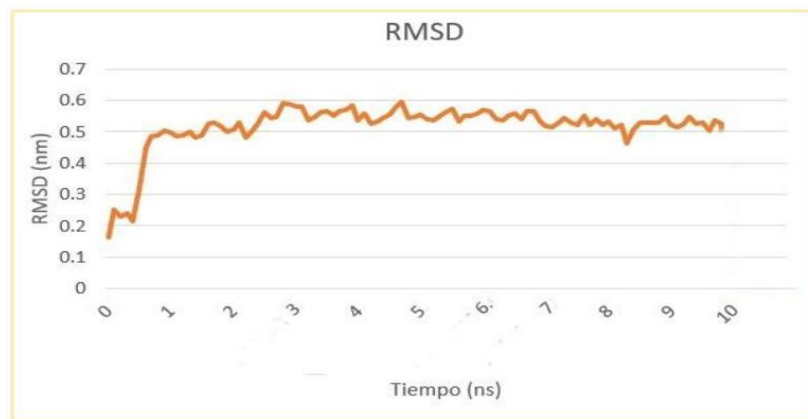


**Fig. 9.** Sistema de membrana de fosfolípidos DMPG/DMPC y péptido M1, en ausencia de la caja de agua, visualizada en VMD

Este modelo tridimensional por I TAISSEER obtuvo un alto valor de identidad.

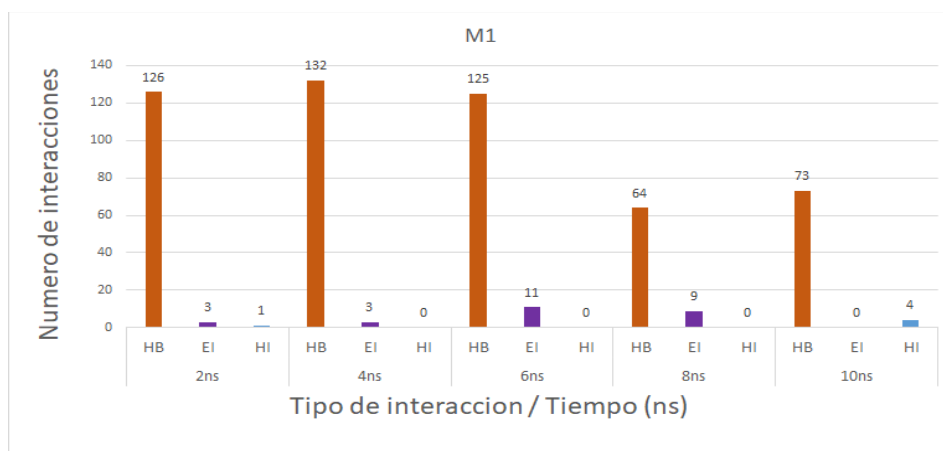
### 3.6. Análisis de la dinámica molecular

La figura 10 muestra los resultados del comportamiento del péptido M1 mediante la desviación cuadrática media de la raíz (RMSD), con el sistema modelo de membranas que simula las membranas bacterianas. El péptido M1 muestra una gran variación del comportamiento al inicio del tiempo de corrida de simulación y pequeños cambios durante el tiempo de corrida de la simulación, con pequeños desplazamientos de subconjuntos estructurales dentro de una estructura rígida [15], corroborando que la estructura de M1 por su doble hélice mantiene cierto equilibrio y no se deforma de manera importante. Además, también se puede observar que en el transcurso de la corrida el péptido presenta pequeños cambios estructurales causados por las interacciones con las moléculas de agua y con los lípidos DMPG; originando la fluidez de la membrana, observada en los termogramas realizados en DSC. El gráfico de RMSD permite observar cómo la estructura del péptido conserva cierto equilibrio empezando el primer ns, indicando que la interacción con la membrana no se introduce en ella, caso tal que podría ser un modelo de barril, si pasara de dicha manera, por lo cual no interacciona con regiones internas que podrían deformarlo notoriamente, lo cual supone que se trata de un mecanismo de acción de tipo de modelos Clústeres Lipídicos, el cual consta de una interacción de péptidos catiónicos unidos a la membrana que pueden agruparse con los lípidos aniónicos presentes en el modelo de membrana.



**Fig. 10.** Desviación cuadrática media de la raíz (RMSD) del péptido M1 en el sistema de modelo de membrana

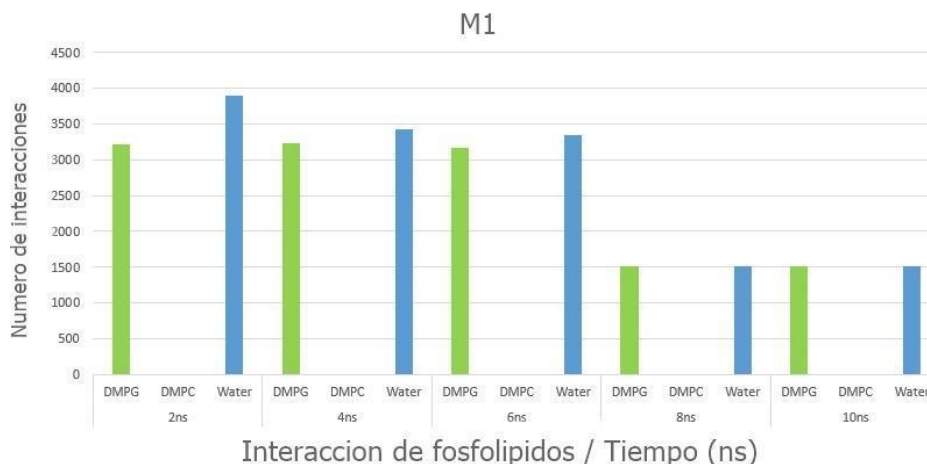
En la figura 11 se aprecian las interacciones intermoleculares entre el péptido M1 y los componentes que conforman el sistema de modelo de membrana, por un periodo de 10 ns. Donde se encontró que las principales interacciones, son interacciones de tipo enlace de hidrógeno, con un número de repeticiones que se mantuvieron entre 192 y 78 disminuyendo a medida que avanzó el tiempo de corrido. La disminución de enlaces de hidrógeno desde los 8 ns ocurre debido al inicio de las interacciones hidrofóbicas de los residuos GLY38, ALA31, ALA24, ALA17 y ALA1 con los fosfolípidos de DMPG.



**Fig. 11** Interacciones de Péptido M1

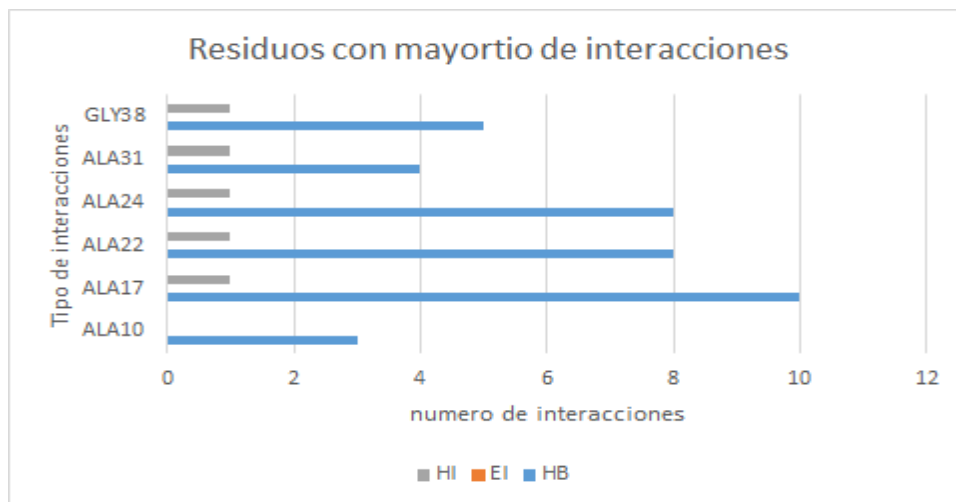
En total se dieron interacciones a 2, 4, 6, 8 y 10 ns HB: enlace de hidrógeno; IE: interacción electrostática; HI: interacción hidrofóbica

Durante los 10 nanosegundos de corrido, se observó interacciones del péptido con DMPG y el agua, mas no se observaron interacciones con los fosfolípidos DMPC (figura 12), presentando además la disminución del número de enlaces de hidrógeno luego de los 8 nanosegundos debido a la interacción con la región interfacial membrana-agua.

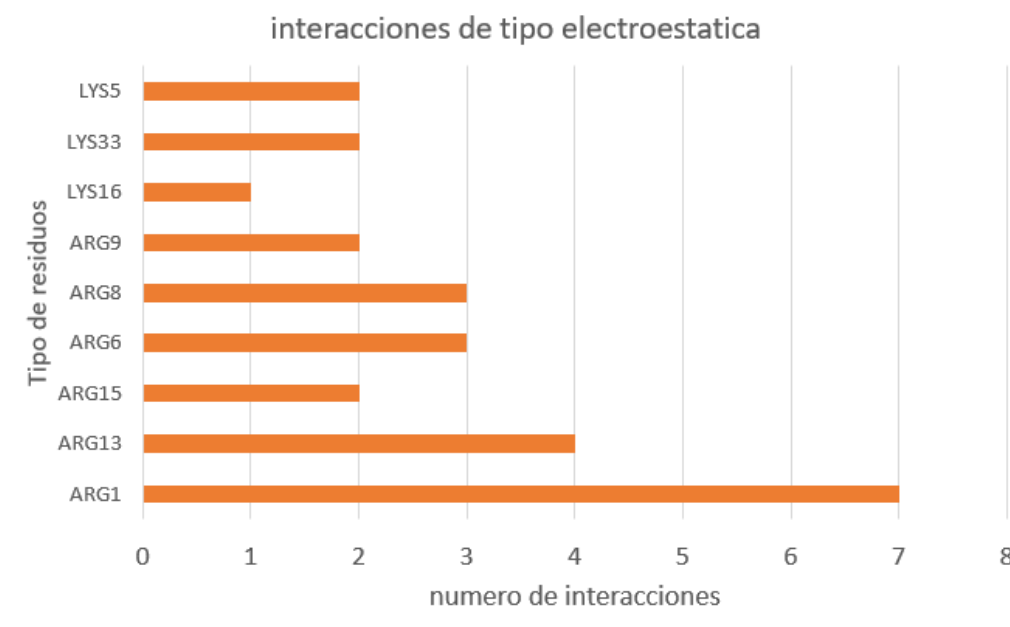


**Fig. 12** Interacción del péptido M1 con fosfolípidos y agua a 2, 4, 6, 8 y 10 ns.

Los residuos del péptido M1 que presentaron mayor número de interacciones con el sistema de membrana modelo, se observan en la figura 13. HB: enlace de hidrógeno; IE: interacción electrostática; HI: interacción hidrofóbica, los residuos Alanina (ALA17) tuvieron una interacción hidrofóbica, siendo el residuo de alanina (ALA17) el que presentó mayor número de interacciones. Las interacciones de tipo enlace de hidrógeno mermaron al final de la corrida, esto ocurre debido a que al interactuar el péptido con la membrana forman un cúmulo debido a la naturaleza no polar de los mismos, evitando así que se creen los enlaces de hidrógeno en esas regiones, así dejan de presentarse en esas regiones del péptido los enlaces de hidrógeno [5]. Otros residuos que interactuaron por hidrofobia a de más de (ALA17) fueron (ALA22), (ALA24), (ALA31) y Glicina (GLY8).

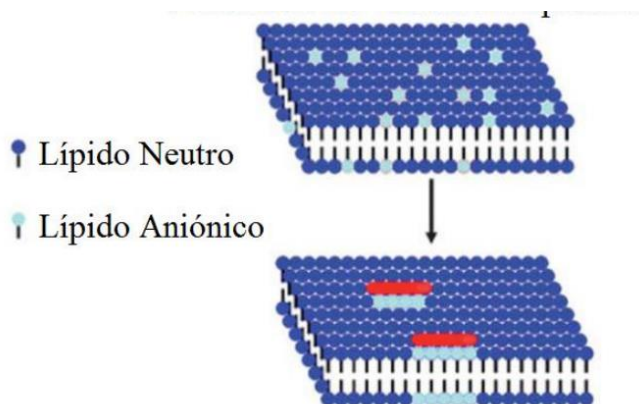


**Fig. 13** Residuos con mayor número de interacciones



**Fig. 14** Residuos con interacción electrostática

Las interacciones electrostáticas que presentaron los residuos observados en la gráfica 14 durante los 10 ns de corrido pueden ser partícipes del cambio de la fluidez de la membrana modelo, en especial con DMPG. Se conoce que el péptido M1 es anfipático presentando así una parte hidrofílica y otra hidrofóbica [16]. En el modelo propuesto, “modelo clústeres” péptidos catiónico M1 unido a la membrana, puede agruparse con los lípidos aniónicos DMPG, la interacción péptido-lípido puede cambiar el empaquetamiento lateral de los lípidos e incrementar la permeabilidad a través de la membrana.



**Fig. 15,** Mecanismo de acción por modelo Clústeres Lipídicos

El mecanismo de acción el cual se cree que presenta este péptido según lo observado en la visualización de dinámica molecular, evidenció que durante el tiempo de corrido el péptido no logra atravesar la membrana, lo cual es característico del mecanismo de acción de modelo Clústeres Lipídicos (figura 15), donde desde la parte externa de la membrana interactúa el péptido catiónico con los lípidos aniónicos DMPG de la membrana, disminuyendo el empaquetamiento de los lípidos y aumentando la permeabilidad en la membrana. Figura modificada y traducida de Wang et al. 2012.

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permitieron analizar el comportamiento termotrópico del modelo de membrana en presencia y ausencia del péptido M1. A través de MD se lograron identificar los tipos de interacción molecular del péptido con el sistema modelo de membrana. Este estudio arrojó datos importantes para la modulación en la estructura de los péptidos y de este modo potenciar su actividad antimicrobiana. Se comprobó la capacidad del péptido M1 para perturbar la integridad de las membranas, capacidad dada por la modulación de las características estructurales del péptido análogo; características como la longitud de la cadena lateral catiónica, la longitud de la cadena lateral hidrofóbica, el tipo de residuos, entre otras; lo cual originó el cambio de fase gel a cristalino. Estos cambios están relacionados con la afectación de dominios en las membranas. La composición de las vesículas compuestas por lípidos zwitteriónicos, contribuyeron al aumento considerable de la afinidad del péptido con la membrana. Posteriormente, mediante MD se evidenciaron interacciones de tipo HB: enlaces de hidrógeno; IE: interacción electrostáticas; y HI: interacción hidrofóbicas presentes en el sistema durante un tiempo de 10 ns, repartido con toma de datos cada 2 ns, encontrando una gran presencia de interacciones de tipo enlaces de hidrógeno entre el péptido M1 y el resto del sistema; además se identificaron los principales aminoácidos que participaron en dichas interacciones. Los residuos cargados positivamente, como la arginina y la lisina, desempeñaron un papel importante en las interacciones hidrofóbicas presentes. El residuo alanina fue predominante en las interacciones de enlace hidrógeno.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Extendemos nuestros agradecimientos a nuestro Director de Tesis, PhD José Fernando Oñate Garzón, por su dedicación, apoyo y paciencia en el desarrollo de esta investigación; a la docente PhD Sandra Patricia Rivera Sánchez; y al equipo de investigadores de la Universidad del Valle, el docente PhD Dorian Polo Cerón, y docente PhD Alberto Aragón Muriel; por habernos brindado todos sus conocimientos y apoyo en la realización de esta investigación, lo cual fue crucial para entender la dinámica de este importante estudio. Por último, agradecer a la Dirección General de Investigación de la Universidad Santiago de Cali, por la financiación de este proyecto.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Oñate-Garzón, A. Ausili, M. Manrique-Moreno, A. Torrecillas, F. J. Aranda , E. Patiño y J. C. Gomez-Fernandez, «The increase in positively charged residues in cecropin D-like *Galleria mellonella* favors its interaction with membrane models that imitate bacterial membranes,» *Arch Biochem Biophys*, vol. 1, nº 629, pp. 54-62, 2017.
- [2] M. Zasloff, «Antimicrobial peptides of multicellular organisms,» *Nature*, vol. 24, nº 415, pp. 389-95, 2002.
- [3] P. Gutierrez y S. Orduz, «Péptidos Antimicrobianos: Estructura, función y aplicaciones,» *Actual Biol*, vol. 25, nº 78, pp. 5-15, 2003.
- [4] A. Britt-Schafer y M. Wenzel, «A How-To Guide for Mode of Action Analysis of Antimicrobial Peptides,» *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 2020.
- [5] A. K. Samael Olascoaga-Del, E. G. Sanchez, N. I. Carmona, S. M. d. C. Galicia, L. A. Gómez, A. S.-J. Islas y S. J.-I. Castañeda, «Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas,» *Kompass Neumología*, pp. 15-21, 2019.
- [6] A. Bahar y D. Ren, «Antimicrobial Peptides,» *Pharmaceuticals*, vol. 6, nº 12, pp. 1543-1575, 2013.
- [7] R. M. Aldea, *Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas*, Madrid, 2013.
- [8] C. Ortiz-Lopez, «Diseño, síntesis, caracterización y evaluación in vitro de la actividad de los péptidos antimicrobianos contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos,» *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, vol. 43, nº 169, pp. 614-627, 2019.
- [9] R. NMcElhaney, «Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems,» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 864, nº 3, pp. 361-421, 1986.
- [10] D. Costas , «Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability,» *Journal of Liposome Research*, vol. 18, pp. 159-173, 2008.

- [11] K. Riske, P. R. Barroso, C.-C. Vequi-Suplicy, R. Germano, V.-B. Henriques y T.-M. Lamy, «Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1788, nº 5, pp. 954-963, 2009.
- [12] H. W. Meyer, «Pretransition-ripples in bilayers of dipalmitoylphosphatidylcholine: undulation or periodic segments? A freeze-fracture study,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 1302, nº 2, pp. 138-144, 1996.
- [13] Y. Liscano, S. Constain-H, L. Vargas, S. Cantor, V. Rojas-La verde y J. Oñate-Garzón, «Increases in Hydrophilicity and Charge on the Polar Face of Alyteserin 1c Helix Change its Selectivity towards Gram-Positive Bacteria,» *Antibiotics*, vol. 8, nº 4, p. 238, 2019.
- [14] B. P. Sergio, *Análisis in silico de los epítopes de la proteína Blo t2 del ácaro Blomia tropicalis*, Cartagena: Universidad de Cartagena, 2019.
- [15] A. Aragón-Muriel, A. Alessio, K. Sánchez, O.-E. Rojas-A, J. Londoño-Mosquera, P.-C. Dorian y J. Oñate-Garzón, «Studies on the Interaction of Alyteserin 1c Peptide and Its Cationic Analogue with Model Membranes Imitating Mammalian and Bacterial Membranes,» *Biomolecules*, vol. 25, nº 9, p. 527, 2019.
- [16] S. Morizane y R. Gallo-L, «Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis,» *The Journal of Dermatology*, 2012.