



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Licenciatura en Bioquímica y Biología Molecular

Instituto de Investigación de Ciencia Básica y Aplicada

Tesis:

**“La estabilidad del péptido FA-1 en plasma y orina de
ratón”**

Para obtener el grado de Licenciado en Ciencias con Área Terminal
Bioquímica y Biología Molecular

Presenta:

Guillermo Andrés Cano Morales

Director de Tesis:

M.C. Marco Antonio Ibarra Valencia

Comité tutorial:

Dra. María Angélica Santana Calderón

Dr. Armando Hernández Mendoza

M.C. Marco Antonio Ibarra Valencia

Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez

Dr. Rodrigo Said Razo Hernández

Esta investigación fue realizada en el laboratorio del Dr. Gerardo Corzo gracias al financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), número IT200321, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto de investigación denominado "Venenos y antivenenos", número 303045.

Agradecimientos

Especialmente a mis padres y hermana que estuvieron en todo el momento apoyándome.

Al Dr. Marco Ibarra que me confió y apoyo llevando a cabo este proyecto. Así como a la doctora María Angélica Santana Calderón y al doctor Armando Hernández Mendoza por sus correcciones y consejos en la realización de la tesis.

A mis compañeros de licenciatura, con los que compartir experiencias dentro y fuera del IICBA.

A mis amigos Juan, Pablo, Kevin, Fernando, Jorge y Cesar, que estuvieron en todo el momento apoyándome y a la vez de crear diferentes proyectos juntos.

Y especialmente a mi bisabuela.

Contenido

Introducción	7
Estabilidad de los péptidos antimicrobianos	9
Uso de modelos <i>in vitro</i> para el estudio de los péptidos antimicrobianos.....	11
Uso de modelos <i>in vivo</i> para el estudio de los péptidos antimicrobianos	12
Tipos de administración <i>in vivo</i>	13
Biodistribución de péptidos antimicrobianos.....	14
Antecedentes.....	17
Péptidos antimicrobianos derivados de veneno de alacrán.....	17
FA1.....	18
Justificación	20
Hipótesis	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares	20
Estrategia experimental	21
Materiales y Métodos.....	22
Purificación del péptido FA1 por HPLC	22
Animales.....	22
Obtención de orina	22
Incubación del péptido FA1 en orina	23
Obtención de plasma por punción cardíaca	23
Incubación del péptido FA1 en plasma.....	23
Antibiograma	24
Biodistribución del péptido en ratones CD1.....	25
Procesado de imágenes.....	25
Análisis estadístico	26
Resultados.....	27
Purificación de péptido	27
FA1 es estable en orina.....	28
No es posible determinar la estabilidad de FA1 en plasma de ratón.....	30
FA1 pierde su función antibiótica después de ser incubado en orina de ratón.....	31
Marcaje de FA1 con Alexa Flúor 750	32
Biodistribución del péptido FA1 en ratones CD1	33
Discusión	38
Conclusiones	43
Perspectivas	44
Bibliografía.....	45

Índice de Figura

Figura 1. Purificación de FA1	27
Figura 2. Espectrometría de masas del péptido FA1	28
Figura 3. Incubación de FA1 en orina.	29
Figura 4. Gráfica del área bajo la curva de los picos de FA1 en orina de ratón.....	30
Figura 5. Incubación de FA1 en plasma.	31
Figura 6. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en medio solido MH.	32
Figura 7. Marcaje de FA1 con Alexa Flúor 750.....	33
Figura 8. Imágenes de biodistribución en ratón.	35
Figura 9 Graficas de la intensidad de fluorescencia en zonas del ratón.	36
Figura 10. Fluorescencia en los órganos por el péptido FA1 marcado por Alexa Flúor 750.....	37
Figura 11. Gráfica de concentración de FA1.	37

Resumen

El uso indebido de los antibióticos ha ocasionado que las bacterias infecciosas desarrollen resistencia a estos, dificultando el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas. Se han investigado diferentes estrategias para combatirlas y unas de ellas es el uso de péptidos antimicrobianos, de origen natural o sintético, que inhiben el crecimiento bacteriano. Se han creado diferentes péptidos antimicrobianos sintéticos para aumentar la estabilidad y efecto antibiótico de origen natural. Uno de estos es el péptido FA1, derivado de los péptidos antimicrobianos: hadrurina y vejovina, provenientes de los alacranes *Hadrurus gertschi* y *Vaejovis mexicanus*, respectivamente. FA1 tiene una longitud y un índice de hemólisis menor al de hadrurina y vejovina, pero conserva su actividad antimicrobiana.

Sin embargo, los péptidos antimicrobianos son poco estables en fluidos biológicos, lo que perjudica su uso como tratamiento farmacológico. En este trabajo se realizaron pruebas *in vitro* e *in vivo* para demostrar la estabilidad del péptido FA1 en plasma y orina. Como resultado, se demostró por HPLC que el péptido es estable en orina de ratón por 24 horas, pero pierde su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además, se hicieron ensayos de biodistribución en ratones CD1, en los que se observó que el péptido puede sobrevivir por 4 horas antes de ser excretado. También se observó que FA1 se concentra en hígado y riñones, principalmente.

En conclusión, se pudo determinar que FA1 pierde su función antibiótica, pero mantiene su estabilidad en orina de ratón CD1. A la vez, se determinó que el péptido tiene un tiempo corto de retención en el cuerpo del ratón CD1 y alcanza una mayor concentración en hígado y riñones. Con esto se demuestra la importancia del estudio de la estabilidad y biodistribución de los péptidos antimicrobianos para su uso como tratamiento farmacéutico. Además de proponer diferentes medidas para mejorar la estabilidad del péptido para un efecto mayor prolongación.

Introducción

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un importante problema de salud debido a que conlleva un aumento en la dosis de medicamento recomendable para eliminar de las infecciones y provoca que las bacterias tengan una mayor resistencia a los antibióticos de uso común (Castañeda *et al.*, 2009). Se han investigado medidas alternas para el tratamiento de dichas infecciones, una de estas es el uso de péptidos antimicrobianos (PAM) (Rončević *et al.*, 2019).

Los PAM son péptidos de origen natural o sintético con propiedades antibióticas. Estos se han conservado a lo largo de la evolución de diversos organismos multicelulares como parte de su respuesta inmune innata para inhibir el crecimiento de las bacterias (González *et al.*, 2017). Se componen de aproximadamente 50 aminoácidos en los que se pueden encontrar de 2 a 9 residuos de lisina, poseen extremos de carga generalmente catiónica y son anfipáticos, lo cual favorece su interacción con la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática del patógeno (Michael *et al.*, 2016; Greco *et al.*, 2020). Se producen en diferentes tejidos y se pueden clasificar en cuatro principales clases: péptidos α -helicoidales; láminas- β estabilizadas por dos o tres puentes disulfuro; hélices extendidas con predominio de uno o más aminoácidos y formación de estructuras repetitivas (Sánchez *et al.*, 2013).

Los péptidos antimicrobianos tienen diferentes mecanismos de acción intracelular y extracelular para degradar a las bacterias. Uno de estos son los modelos de permeabilización membranal, como el modelo de barril, en el que el péptido interactúa con la membrana de los patógenos y crea un tapón conformado por péptidos helicoidales, la parte hidrofóbica del péptido interactúa con la membrana y la parte hidrofóbica del péptido forma la parte interior del poro; asimismo, el modelo del poro toroidal se compone de alfa hélices que interactúan con la membrana del patógeno e inducen a la monocapa de lípidos a plegarse sobre si misma de forma continua, lo que favorece la formación del poro por las interacciones hidrofóbicas (Castañeda *et al.*, 2009; Rončević *et al.*, 2020).

Finalmente, el modelo anular ocurre cuando la unión con la membrana alcanza una concentración límite que hace que los péptidos se doblen, formando un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos, creando así un canal mixto entre los lípidos de la membrana (Téllez *et al.*, 2010).

Actualmente, se sabe que su mecanismo de acción también se extiende al citoplasma bacteriano, en donde pueden cambiar la morfología del septo de la membrana plasmática, inhibir la síntesis de la pared celular y de ácidos nucleicos, proteínas y algunas actividades enzimáticas. De modo que se ha demostrado que los PAM tienen amplia actividad contra bacterias Gram negativas y Gram positivas (Mwangi *et al.*, 2019). Los péptidos antimicrobianos que actúan de manera intramembranal suelen ser ricos en triptófano, ingresan por translocación directa sin causar la lisis celular (Chan *et al.*, 2006). Por otro lado, los péptidos ricos en prolina ingresan a través de proteínas de transporte de membrana sin provocar lisis en ella. Estos tienen diferentes funciones para degradar a las bacterias, como la inhibición del metabolismo de ácidos nucleicos, del plegamiento de proteínas, o de las proteasas bacterianas, la división celular y la biosíntesis de la pared celular (Rončević *et al.*, 2019).

Además de las funciones mencionadas, se ha demostrado que cuentan con la capacidad de suprimir la vía de señalización dependiente de receptores TLR (toll-like receptors), la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α (factor de necrosis tumoral) y el choque séptico en algunos modelos animales. También se ha visto que algunos PAM no tienen efecto antimicrobiano, pero exhiben mecanismos inmunomoduladores sobre el proceso de cicatrización al inducir la expresión de interleucinas como la IL-8, estimular la proliferación de queratinocitos y aumentar la infiltración leucocitaria (Cardoso *et al.*, 2021, Téllez *et al.*, 2010).

No obstante, las bacterias a lo largo de millones de años se han encontrado en entornos hostiles, en los cuales han desarrollado diferentes estrategias para su protección contra los antibióticos. Tales como la síntesis de enzimas inhibitoras, el

bloqueo de la penetración intracelular del fármaco o la degradación del fármaco mediante la activación de bombas de salida (Oromi *et al.*, 2020).

Al igual que con los antibióticos, las bacterias son capaces de desarrollar a largo plazo resistencia específica hacia el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. Se han descubierto diferentes mecanismos de adaptación como la remodelación de la pared bacteriana, la cual se puede lograr disminuyendo la carga neta, la eliminación de fosfato de LPS o D-alanilación de ácidos teicoicos (Pérez *et al.*, 1998). Otra estrategia es la síntesis de la cápsula de polisacárido celular o la producción de exopolisacárido de biopelícula, la liberación de DNA extracelular dentro de la biopelícula, la disminución de la expresión de proteínas y la liberación de proteasas bacterianas (Li *et al.*, 2020). Dicho esto, es necesario saber la estabilidad de los péptidos antimicrobianos en los fluidos biológicos con el objetivo de utilizar nuevos péptidos antimicrobianos que ayuden a la defensa del huésped.

Estabilidad de los péptidos antimicrobianos

Unos de los principales problemas para considerar como fármacos a los péptidos antimicrobianos es su inestabilidad en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica, además de que son sensibles a la acción de proteasas, lo que limita su aplicación terapéutica, (Malik *et al.*, 2016). Esto es un factor importante para considerar durante un proceso infeccioso, debido a que en el organismo se encuentran diferentes sustancias proteolíticas liberadas por el sistema inmune durante la infección (Rodríguez *et al.*, 2021). La degradación también ocurre en el sistema gastrointestinal, el hígado, y en células inmunitarias, ya que se encuentran enzimas como la elastasa en diferentes células humanas como los leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos, células de músculo liso, fibroblastos, plaquetas y células endoteliales. Además, el plasma contiene proteínas como albumina, globulina y fibrinógeno, debido a sus propiedades de unión al ligando, sirven como transportadores circulantes de compuestos endógenos y exógenos, por lo tanto

pueden dificultar la vida media de los péptidos antimicrobianos en el organismo (Olsen *et al.*, 2004, Yi *et al.*, 2007).

A su vez, la baja estabilidad de los péptidos antimicrobianos ocasiona dificultades en su administración. Por ejemplo, por vía oral, la degradación enzimática y la mala absorción en la mucosa intestinal hacen que esta vía de administración no sea la más óptima. A su vez, la vía intravenosa limita la vida media corta de los péptidos antimicrobianos debido a la degradación por enzimas proteolíticas en el plasma y su eliminación de la circulación por el hígado y riñones. En cambio, la vía de administración tópica es la más común para el uso de péptidos antimicrobianos, sin embargo, incluso en esta son propensos a degradarse por enzimas proteolíticas tisulares (Mahlapuu *et al.*, 2016).

Se han propuesto diferentes estrategias para mejorar la estabilidad de los péptidos contra la degradación proteolítica, como la modificación química de sus extremos terminales, la alteración de sus estructuras secundarias, el desarrollo de péptidos análogos con algunas sustituciones no naturales, la modificación de sus propiedades hidrófobas, la carga neta y la longitud del péptido (Ortiz *et al.*, 2019). Uno de los éxitos en el método de la modificación de un péptido antimicrobiano para tener mayor estabilidad es el reemplazo de L- aminoácidos por D- aminoácidos; por ejemplo, en el péptido antimicrobiano ranalexina, se incrementó la retención *in vivo*, además de que se mantuvo constante su actividad antimicrobiana tras el cambio de la configuración de los aminoácidos (Domhan *et al.*, 2019). De igual forma, el rediseño de Arenicina-1, que es un péptido antimicrobiano aislado de *Polychaeta arenicola marina* en el cual se cicló la cadena principal de la molécula, dio como resultado un aumento en la actividad antimicrobiana, pero no causó una disminución en la citotoxicidad (Orlov, *et al.*, 2019). El uso de dichas modificaciones debe ser monitoreado en modelos *in vitro* e *in vivo* para detectar cambios en las funciones de los péptidos antimicrobianos que puedan perjudicar al organismo.

Uso de modelos *in vitro* para el estudio de los péptidos antimicrobianos

Los modelos *in vitro* han ayudado al desarrollo de las ciencias médicas por ser un sistema efectivo para la evaluación de fármacos (toxicidad y fisicoquímica) la proliferación celular y los efectos antioxidantes de muchos compuestos. De este modo, existen diferentes tipos de cultivos celulares usados para el estudio de los antimicrobianos; por ejemplo, el cultivo en monocapa es la propagación de las células que permite la formación de una capa que cubrirá la superficie, ya que, las células que se desarrollan de esta manera son estables genéticamente y tiene una naturaleza diploide normal (Spicer *et al.*, 2018). En cambio, el cultivo en suspensión se adhiere eficientemente a la placa, pero tiene la propiedad de mantener a las células en fase estacionaria cuando llegan a confluencia o cuando son fenotipos terminales. Este tipo de cultivo permite una reducida manipulación cuando se trata de producir cultivos a mayor escala de operación. Finalmente, en el cultivo en suspensión de células adheridas a microcargadores es necesario la combinación de moléculas cargadas positivamente y un factor de adherencia celular, los cuales deben estar enlazados a la superficie de un soporte para su cultivo en un biorreactor, lo que permite mejorar la adhesión celular y estabilizar el crecimiento de las células (Acevedo *et al.*, 2013). De estos, el cultivo en monocapa y en suspensión son los ideales para el estudio de los péptidos antimicrobianos, debido a que se puede observar cómo se degrada o se inhibe el crecimiento de las bacterias. A su vez, usando modelos *in vitro*, se puede conocer la concentración del péptido antimicrobiano necesaria para tener su efecto antibiótico.

Dichos modelos, son simulaciones que intentan recrear condiciones naturales, las cuales se pueden modificar para adecuarse al experimento y tienen como función el monitoreo de los fenómenos involucrados en los experimentos en poblaciones exactas en las que se puede hacer un control o modificación del ambiente para determinar las mejores condiciones para el uso de los péptidos antimicrobianos. Esto ayuda a determinar la estabilidad de los péptidos

antimicrobianos en condiciones fisiológicas de pH y proteasas (Lorena *et al.*, 2013., Mendez *et al.*, 2018).

Es así como se han usado modelos *in vitro* para demostrar la actividad bactericida y bacteriostática de diversos péptidos, como el Epi-1 en bacterias Gram (-) y Gram (+) el cual interactúa con la membrana bacteriana (Ying *et al.*, 2020). También, se usó el péptido antimicrobiano LyeTx I del veneno de la araña *Lycosa erythrognatha* del cual se derivaron tres nuevos péptidos LyeTx I mn; LyeTx I mn Δ K; LyeTx I mn Δ KAc, mismos que se evaluaron en modelos *in vivo* e *in vitro* para el estudio de su toxicidad y actividad biológica para ser propuestos como agentes antimicrobianos. Dando como resultado que el péptido LyeTx I mn Δ K fue capaz de reducir la infección de la bacteria *Staphylococcus aureus* en un modelo de ratón, es decir, es el mejor candidato como agente antimicrobiano, debido a su secuencia de aminoácidos más corta, menor toxicidad y mayor actividad biológica (Rodríguez *et al.*, 2021). De este modo, los modelos *in vitro* son necesarios para el estudio de la estabilidad de los péptidos antimicrobianos, permitiendo también observar su citotoxicidad y funciones antibióticas. A su vez, se puede modificar el ambiente para generar estrés al péptido, como el aumento en pH y las concentraciones de enzimas proteolíticas, con el objetivo de conocer su resistencia a dichos medios. Sin embargo, se necesita usar modelos *in vivo* para saber el comportamiento de los péptidos antimicrobianos en un ambiente donde hay variaciones de compuestos biológicos.

Uso de modelos *in vivo* para el estudio de los péptidos antimicrobianos

Los modelos animales han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de investigación, ya que son necesarios para proyectos de pruebas diagnósticas, terapéuticas y el control de productos farmacológicos (Suckow *et al.*, 2017). La ventaja de los experimentos *in vivo*, a comparación de los modelos *in vitro*, es la evaluación de enfermedades infecciosas y la producción de fármacos o terapias para dichas infecciones. A su vez pueden dar más información dentro del organismo, pues las propiedades fisicoquímicas son diferentes a los modelos *in*

vitro (Maldonado *et al.*, 2016). En los modelos *in vitro* sólo se observan los efectos del fármaco contenido en las formulaciones, mientras que los modelos *in vivo* se observan los efectos de la formulación como tal, ya que el vehículo farmacéutico contribuye a la liberación-solubilización del fármaco y por consiguiente su acción biológica (Escobedo *et al.*, 2015). De este modo, los experimentos en modelos *in vivo* pueden proporcionar la información necesaria para el diseño de pruebas farmacológicas en humanos debido a que los modelos que se utilizan son moldeables y se pueden simular condiciones humanas en ellos (Rodríguez *et al.*, 2007). Pese a esto, se debe de considerar que el modelo animal puede diferir fisiológicamente del humano, así como los procesos moleculares involucrados en la inmunidad innata y adaptativa (Mestas *et al.*, 2004).

El uso de modelos *in vivo* para la investigación de los péptidos antimicrobianos es esencial para el desarrollo de tratamientos contra infecciones microbianas, pero no se han obtenidos resultados satisfactorios, ya que, los péptidos antimicrobianos tienen una baja estabilidad metabólica y alta sensibilidad a las proteasas. Sin embargo, se puede usar el modelo *in vivo* para observar la biodistribución y la concentración de los péptidos antimicrobianos en los órganos del modelo (González *et al.*, 2017).

Tipos de administración *in vivo*

Existen diversas vías de administración de sustancias en los modelos *in vivo*, las principales son: tópica, oral e intravenosa (Jennifer *et al.*, 2020). Cada una tiene diferentes ventajas y desventajas que las diferencian en su efectividad. Esto es esencial para conocer la vía de administración óptima para los péptidos antimicrobianos.

La administración tópica es aquella que se aplica en la piel y las mucosas para efectos locales, permite una acción directa en la zona infectada y es económica, pero su efecto ocurre sólo en zonas poco profundas de la piel y hay posibilidad de efectos tóxicos (Torres *et al.*, 2010). Sin embargo, para los péptidos antimicrobianos esta es la vía más común de administración, pero con la

desventaja de que les afectan las enzimas proteolíticas tisulares (Mahlapuu *et al.*, 2016).

Por otro lado, en la vía oral se administra un fármaco por ingestión. Esta resulta cómoda y segura, por lo tanto, no altera ninguna protección del cuerpo como la piel en la vía parental, sin embargo, es común la inhibición de fármacos por los jugos gástricos, además de un efecto tardío del medicamento (Castro *et al.*, 2005). No obstante, es la peor vía de administración para los péptidos antimicrobianos, debido a las enzimas y la mala absorción en la mucosa gastrointestinal.

Finalmente, en la vía intravenosa se administra el fármaco en solución de forma directa en el torrente sanguíneo. Permite alcanzar la concentración deseada del fármaco al llegar al sitio blanco sin un proceso de absorción; sin embargo, se pueden contraer infecciones si no se tienen las medidas necesarias para la administración del fármaco (Torres *et al.*, 2010). Esta es la vía más óptima para administrar antimicrobianos, pero con la desventaja de la disminución de la tasa de vida corta debido a las enzimas del sistema circulatorio (Climb *et al.*, 2000).

Biodistribución de péptidos antimicrobianos

La biodistribución es el monitoreo de la absorción de un fármaco dentro de un organismo a través de los diferentes órganos y tejidos que lo conforman. Su distribución en los órganos depende de la concentración que alcanza en cada tejido. En donde la distribución y concentración depende del tamaño del órgano, su circulación sanguínea, solubilidad y fijación de macromoléculas sanguíneas. Los fármacos pueden viajar de forma libre o unidos a proteínas plasmáticas, la más común es la albumina, aunque también puede unirse a otras proteínas como la α -glucoproteína o la transcortina. Por ejemplo, el péptido digoxina tiene una gran afinidad por las proteínas tisulares y se acumula en el músculo esquelético, por lo tanto, solo llega una pequeña concentración del péptido llega al corazón, la cual hace su función farmacéutica. De este modo, la afinidad por los tejidos determina el fenómeno de acumulación y permite explicar el parámetro de

volumen aparente de distribución (Hill.*et al.*, 2013). Es así como el intestino, que es uno de los órganos más grandes, puede absorber una mayor concentración de fármaco, al igual que los pulmones. De igual forma, la sangre es un transportador que puede usar el fármaco para ingresar a diferentes órganos, tales como: el corazón, los pulmones, el cerebro y el hígado (Maya *et al.*, 2007).

Una de las técnicas para el monitoreo de la distribución es el marcaje con fluorescencia, que es un fenómeno por el cual una molécula denominada fluorocromo o fluoróforo emite luz durante unos nanosegundos después de haber absorbido cierta longitud de onda. Hay diferentes sondas comerciales tales como: enzimas, Isótopo radiactivos y fluorocromos que permiten el estudio de la distribución celular de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos (Samaniego *et al.*, 2012).

Las imágenes de fluorescencia tienen varias aplicaciones en muestras pequeñas, donde se puede obtener la imagen directa, además de hacer un mapeo en la posición y orientación de los péptidos en los sistemas de bicapa lipídica (Spicer *et al.*, 2018). Por lo tal, permiten investigar las interacciones de los péptidos con las células vivas, analizar su mecanismo de internalización a través de las membranas lipídicas y determinar su localización (Gizem *et al.*, 2018).

Se han utilizado péptidos antimicrobianos marcados con fluorescencia para su detección en *Escherichia coli*, 0157:H7, ya que, se pueden unir naturalmente al componente lipopolisacárido de las paredes celulares bacterianas como parte de su modo de acción. Para esto se usaron cecropina P1, SMAP29 y PGQ marcados con Cy5. En donde se observó que la cecropina P1 mejoró la detección de *E. coli*. 0157:H7 (Arcidiacono *et al.*, 2008). También, se han utilizado los péptidos antimicrobianos en el estudio de la biodistribución en donde se comparó el péptido SET-M33L con el péptido SET-M33L-PEG a nivel *in vivo* y *ex vivo* dando como resultado que tienen perfiles similares de concentración en los pulmones y no tienen acumulación significativa en el cerebro y los testículos. SET-M33L-PEG muestra una mayor acumulación en el intestino delgado después de 1 a 2 horas

de ser administrado. (Brunetti *et al.*, 2016). De este modo, el uso de la fluorescencia es esencial para el estudio de la distribución de péptidos para determinar la concentración en los órganos, el tiempo en que se concentra el péptido en los órganos y su tiempo de excreción.

Antecedentes

Péptidos antimicrobianos derivados de veneno de alacrán

El uso del veneno de alacrán para diferentes investigaciones es porque es una fuente rica de moléculas bioactivas, principalmente de bloqueadores de canales iónicos y péptidos, capaces de formar poros en las membranas de algunos microorganismos. La mayoría de estos péptidos carecen de cisteína y son de naturaleza α -helicoidal, mientras que otros contienen cisteínas y puentes disulfuro (Rivera *et al.*, 2010)

Se ha demostrado que el veneno de alacrán también tiene abundancia de PAMs y se ha sugerido que estos tienen como función la protección de la glándula del veneno de infecciones y facilitar la acción de otras neurotoxinas (Harrison *et al.*, 2014). Los péptidos antimicrobianos de alacranes se pueden caracterizar como péptidos anfipáticos cargados positivamente y se clasifican en tres categorías estructurales: péptidos que contienen cisteínas con puentes disulfuro; péptidos con una hélice α anfipática que carecen de residuos de cisteína y péptidos ricos de aminoácidos como prolina y glicina (Luo *et al.*, 2021).

El primer péptido antimicrobiano extraído del veneno de alacrán fue la defensina de la hemolinfa de *Leiurus quienquestriatus heabraeus*. (Harrison *et al.*, 2014) Posteriormente, los péptidos IsCT1 y 2 se obtuvieron de *Opisthacanthus madagascariensis* estos dos péptidos tienen una longitud de 13 aminoácidos con un C-terminal aminado y forman una estructura de hélice α con propiedades anfipáticas, tienen actividad antimicrobiana, pero también alta actividad hemolítica (Salud *et al.*, 2017). Recientemente, se descubrió la hadrurina que fue aislada del alacrán *Hadrurus gertschi*, el cual habita, principalmente, en el estado de Guerrero, su veneno no es peligroso para el ser humano y se ha usado para el aislamiento de péptidos antimicrobianos. La hadrurina es un péptido de 41 aminoácidos que inhibe el crecimiento de las bacterias Gram (+) (Quintero *et al.*, 2017), pertenece a una super familia de péptidos sin puentes disulfuro, puede inhibir el crecimiento de las bacterias *Salmonella Typhi*, *Klebsiella pneumoniae*,

Enterococcus cloacae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Serratia marscesnes*. De igual forma, otro alacrán importante en el descubrimiento de péptidos antimicrobianos es *Vaejovis mexicanus*, también conocido como alacrán marrón del centro, pertenece a la familia Vaejovis, descrita por Koch en 1836. Se localiza, principalmente, en la Ciudad de México y Tlaxcala (Villeda-Callejas *et al.*; 2012). Se puede identificar por el color de su carapacho y cuerpo de café negro abigarrado a marrón rojizo al igual que su vientre de color marrón rojizo. La especie puede llegar a medir 5 cm de longitud. La cola tiene quillas en los bordes en forma de gránulos, el agujón es largo y no presenta una curvatura muy amplia (Fet *et al.*, 2007). De este alacrán se aisló la vejovina, que es un péptido antimicrobiano de 47 aminoácidos sin puentes disulfuro y con un peso molecular de 4,873 g/mol (Garcia *et al.*, 2013), muestra una potente actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram (-), también contiene una baja actividad citolítica y hemolítica contra eritrocitos (Quintero *et al.*, 2017).

FA1

Durante la investigación con los péptidos hadrurina y vejovina se dio énfasis a la síntesis de diferentes péptidos antimicrobianos de menor longitud e índice de hemólisis, pero que conservaran la actividad antimicrobiana y que pudiera ser candidato a fármaco antimicrobiano por su baja toxicidad en células de mamíferos (Greco *et al.*, 2020). Para esto se tuvo en cuenta que al eliminar los primeros ocho residuos de vejovina se modifica su potencia hemolítica, pero también se causa una inactividad del péptido, así que se mantuvo la parte de la secuencia N-terminal y se añadió la secuencia de aminoácidos de la hadrurina en el C-terminal (Quintero *et al.*, 2017).

Fue así como se sintetizaron 12 péptidos antimicrobianos de entre los que se destacó FA1, el cual está conformado por 28 aminoácidos y cuenta con una secuencia de aminoácidos básicos (KLKR).

Durante los ensayos antimicrobianos y hemolíticos se observó un efecto microbicida mayor y disminución hemolítica en comparación con la hadrurina y la

vejovina (Sánchez *et al.*, 2013), lo cual es beneficiario, debido a que no hay una tasa alta de degradación de eritrocitos, dado a estos resultados se considera al péptido FA1 como un candidato para combatir las infecciones bacterianas. Arenas y colaboradores (2016) determinaron su concentración mínima inhibitoria (MIC) para *Escherichia coli* ATCC25922 (6.25 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 (25 µg/mL), *Staphylococcus aureus* ATCC25923 y *Klebsiella pneumoniae* (>50 µg/mL en ambos casos). Se observó también, que FA1 es estable en el sobrenadante de *S. aureus*. Sin embargo, es sensible a enzimas endoproteolíticas como tripsina, elastasa, quimiotripsina y pepsina. Sugiriendo su dificultad como tratamiento contra infecciones microbianas (Arenas *et al.*, 2016).

En 2017, Ibarra *et al.*, estudiaron FA1 a nivel *in vitro* e *in vivo* para determinar su efecto antimicrobiano, capacidad irritante, cicatrizante y distribución en *S. aureus* UDP13 y *P. aeruginosa* UDP3, aisladas de un paciente con úlcera de pie diabético. Se descubrió que FA1 sólo actúa *in vitro* contra infecciones microbianas, también carece de efectos irritantes y posiblemente promueva la cicatrización. Se observó también que se adentra al citosol bacteriano (Ibarra *et al.*, 2017). Dado esto, la importancia del estudio de la estabilidad del péptido FA1 radica en su efectividad contra bacterias Gram (+) y Gram (-) sin provocar la toxicidad en el huésped. Es importante saber la estabilidad en fluidos biológicos como el plasma y la orina, para el uso de tratamientos farmacológicos en donde se usarán los modelos *in vitro* para comprobar si no se pierde su función antibiótica al ser expuestos a dichos fluidos, a su vez, es necesario el estudio en modelos *in vivo* para determinar el tiempo de excreción y determinar las concentraciones absorbidas por el organismo.

Justificación

El mal uso de antibióticos ha ocasionado un aumento en la resistencia bacteriana, lo cual ha llevado a un aumento en su dosificación que puede ser contraproducente para el organismo. Se ha propuesto el uso de péptidos antimicrobianos, entre ellos FA1, como una opción de tratamiento debido a su gran espectro de actividad. Pero es necesario conocer su estabilidad en medios fisiológicos para así determinar su viabilidad en el tratamiento de infecciones microbianas.

Hipótesis

El péptido FA1 mantendrá su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (-) y Gram (+) tras estar en contacto con plasma y orina.

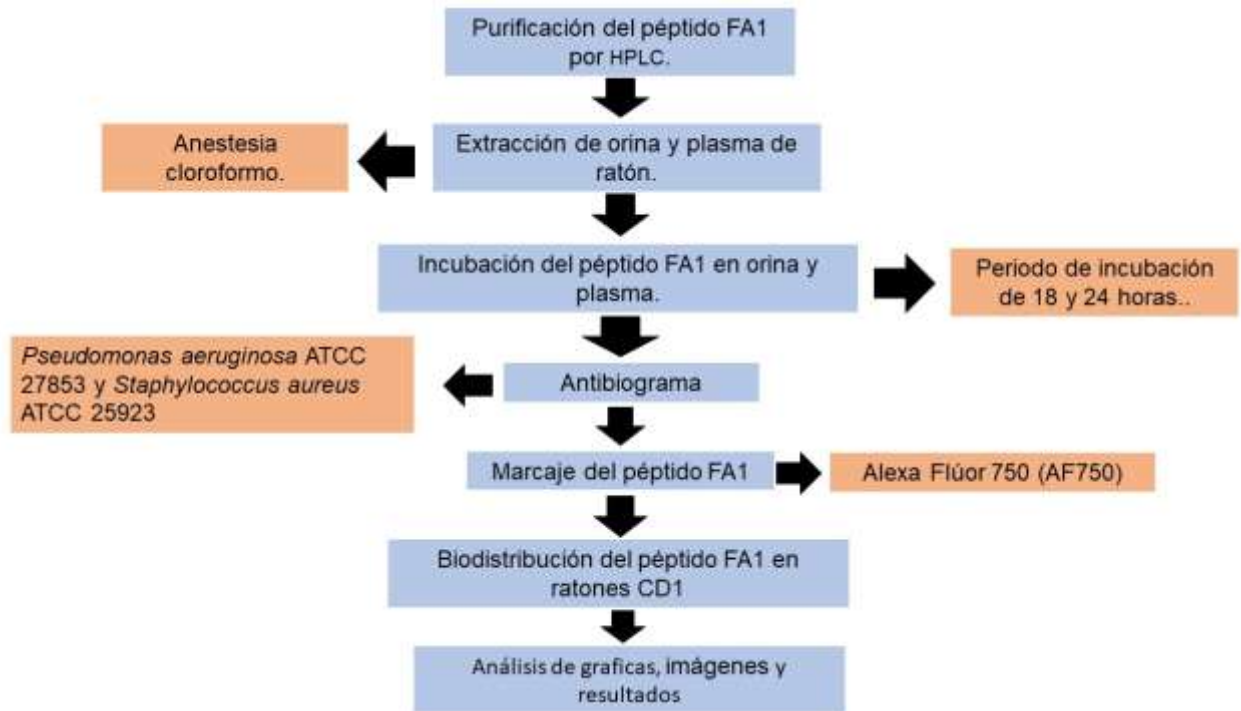
Objetivo general

Determinar la estabilidad del péptido FA1 en orina y plasma de ratón CD1 a diferentes tiempos.

Objetivos particulares

- Analizar la estabilidad del péptido FA1 en orina de ratón sano.
- Analizar la estabilidad del péptido FA1 en plasma de ratón sano.
- Analizar el efecto antimicrobiano del péptido FA1 después de ser expuesto a orina y plasma de ratón.
- Analizar la biodistribución del péptido FA1 en ratón.

Estrategia experimental



Materiales y Métodos

Purificación del péptido FA1 por HPLC

La cromatografía de interacción hidrofóbica de alto rendimiento o HPLC es una técnica de separación cromatográfica en columna que se utiliza para la purificación de macromoléculas como proteínas y polinucleótidos (Aguilar *et al.* 2004). Para esto, el péptido sintético en estado crudo es disuelto en 20% de acetonitrilo y se purifica en una columna semipreparativa C₁₈ (10 x 250 mm Vydac, EUA) de cromatografía de alta presión en fase reversa con un gradiente lineal de acetonitrilo de 20-80 % en presencia de 0.1% de TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) en 60 min en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Agilent 1100 (Agilent, EUA) equipado con un detector de UV a 230 nm. La primera purificación es para eliminar contaminantes de bajos pesos moleculares, reactivos y subproductos de la síntesis química y la segunda para comprobar la pureza del péptido.

Animales

Se usaron ratones macho de cepa CD1 con un peso de 20 a 25 g de una edad mayor a 1 mes. Recibieron una dieta de 3 a 5 g por día de preparados comerciales en forma de bloques sólidos y secos. Se siguieron los protocolos de Manejo de animales del Bioterio de la UAM-I, *Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio, para el uso correcto de los animales*, además de los requerimientos establecidos en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM con base en la NOM-062-ZOO-1999.

Obtención de orina

Para determinar la estabilidad del péptido FA1 en fluidos biológicos, se recolectó la orina de ratones CD1. Para esto, se realizó una intervención moderada, haciendo presión sobre la vejiga de forma manual con un tubo Eppendorf (Kurien *et al.*, 2004). La presión moderada transabdominal sobre la

vejiga causó una mayor presión en la uretra y provocó que el ratón orinara. La orina se almacenó a una temperatura de 4 - 20 °C para su uso posterior.

Incubación del péptido FA1 en orina

Para determinar la estabilidad en orina del péptido FA1, se incubó, en diferentes tiempos, 100 µg del péptido en 50 µL de orina de ratón a 37 °C. El lapso de incubación fue de 18 y 24 horas. Posteriormente, se añadió a la mezcla 950 µL de acetonitrilo 60% + TFA 0.1% y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min para precipitar a las proteínas presentes en la orina. El sobrenadante se pasó por HPLC de fase reversa siguiendo las condiciones mencionadas y se buscó la fracción que pertenece a FA1. Ésta se recolectó para su análisis por espectrometría de masas para comprobar la identidad del péptido. Se usó como control la orina sin el péptido para corroborar que no haya contaminación. Posteriormente, se calculó el promedio de las áreas bajo la curva de los triplicados en donde se graficó por medio del programa *GraphPad Prism 6* con el objetivo de promediar las áreas bajo la curva y determinar si el péptido se degradó.

Obtención de plasma por punción cardíaca

Se colocó al ratón en un frasco con cloroformo para anestesiarlo. Una vez anestesiado, se localizó el corazón en la zona del tórax y se introdujo una aguja con jeringa entre el espacio intercostal. Se fijó la aguja y la jeringa con los dedos para no retirarla del ventrículo y se retrajo el émbolo lentamente siguiendo el pulso de la entrada de sangre a la jeringa. Se recolectaron 600 µL aproximadamente de sangre por volumen del ratón. La sangre se vertió en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para evitar la coagulación y se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 minutos para separar en glóbulos rojos, glóbulos blancos con plaquetas y plasma. El plasma se separó para su uso posterior.

Incubación del péptido FA1 en plasma

Con el objetivo de determinar la estabilidad del péptido en plasma, se incubaron 100 µg FA1 en 50 µL de plasma a 37 °C durante 1 hora.

Posteriormente, se añadieron 950 μL de acetonitrilo 60% + TFA 0.1% y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min para precipitar a las proteínas presentes en plasma. El sobrenadante se pasó por HPLC siguiendo las condiciones mencionadas y con esto se buscó identificar la fracción que pertenece a FA1, la cual se recolectó para su análisis por espectrometría de masas para comprobar su identidad. Se usó como control de plasma sin el péptido, además del péptido sin el plasma para corroborar que no haya contaminación. De igual manera, se utilizó el programa *GraphPad Prism 6* para calcular el área bajo la curva de los promedios del triplicado de los experimentos.

Antibiograma

Se usaron las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con el objetivo de comprobar si el péptido FA1 incubado en fluidos biológicos de ratón CD1 mantiene su función antibiótica. Para lo cual, se incubaron, por 24 horas, 10 μL de cada bacteria en tubos con 3 mL de caldo LB, posteriormente se ajustaron a una densidad óptica 600 nm de 0.08 a 0.013 (aproximadamente 10^7 bacterias/mL). Esta dilución se esparció con isopos en placas de cultivo con Agar Mueller Hinton. Se usaron como controles 10 μL de antibiótico gentamicina [13.1 mg/mL] para *P. aeruginosa* ATCC 27853, 10 μL de ceftriaxona [1.1 mg/mL] para *S. aureus* ATCC 25923, 10 μL del péptido FA1 puro [100 μg] y 10 μL [100 μg] del péptido FA1 después de ser incubado en orina de ratón por 24 horas y purificado por HPLC. Las placas se incubaron por 24 horas a 37 °C, posteriormente se observó el halo de inhibición para determinar si el péptido mantenía su efecto antibiótico.

Marcaje del péptido FA1 con Alexa Flúor

Se utilizó Alexa flúor 750 (AF750) de *Molecular Probes* para observar la distribución del péptido en el modelo de ratón. El marcaje de FA1 se realizó mediante la esterificación del grupo ϵ -amino de residuos de lisina del péptido con el grupo succinimidil éster de AF750. Se disolvieron 6.7 mg de péptido en 300 μL de buffer bicarbonato de sodio 0.1M pH 8.3 y el fluoróforo en 20 μL de

Dimetilsulfóxido (DMSO). Se mezclaron lentamente las soluciones durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se purificó el péptido FA1 marcado por HPLC con un gradiente lineal de acetonitrilo de 20-80% siendo el solvente A agua + 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) y el solvente B acetonitrilo + 0.1% de TFA. Para identificar al péptido marcado del no marcado, o de los componentes presentes en el buffer, se tuvieron como controles: AF750 en DMSO y buffer de carbonatos. La cantidad de péptido marcado recolectado se determinó por peso seco.

Biodistribución del péptido en ratones CD1

Se administró el péptido FA1 marcado por AF750 por vía intravenosa a ratones CD1 en un volumen de 200 μ L considerando una dosis de 5mg/kg. Se usó como control AF750 en PBS. Después de la administración del péptido se anestesió a los ratones con isoflurano al 2% con un flujo de 1 mL/min de oxígeno y se esperó a que estuvieran completamente anestesiados. Tras esto se les colocó en un equipo de espectrometría *In vivo* Xtreme Bruker con detección de fluorescencia para observar la distribución del péptido marcado. Se adquirieron las imágenes de fluorescencia a las 0, 30 min, 1 hora, 2 horas y 4 horas. Finalizando los análisis se sacrificó a los ratones y se recolectó: corazón, estómago, intestino, pulmón, hígado, bazo, riñones y testículos para determinar, por imágenes de fluorescencia, si el péptido marcado se acumula en los órganos. Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada de la UNAM bajo la supervisión de la M. C. Verónica Rojo León.

Procesado de imágenes

Las imágenes adquiridas con el sistema *In vivo* Xtreme Bruker Scanner se procesaron en el software *FIJI* en donde se ajustó la fluorescencia y la reflexión, así como el contraste de la imagen para la determinación de fluorescencia en órganos. Con el programa *GraphPad Prism 6* se midieron los valores del área de la fluorescencia emitida para su posterior comparación. A nivel *ex vivo* se

siguieron los mismos pasos para definir el área de los órganos colectados y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de cada uno de estos.

Análisis estadístico

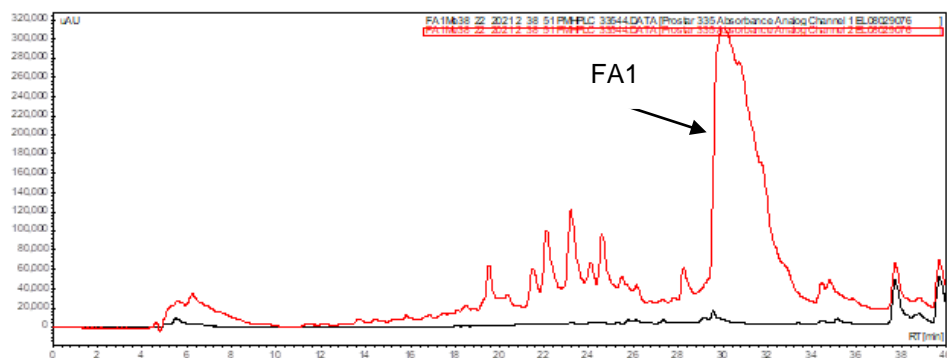
Se utilizó el programa *GraphPad Prism 6* para graficar el área de fluorescencia de cada órgano en los diferentes tiempos, al igual que el área bajo la curva del péptido FA1 durante los ensayos de estabilidad. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

Resultados

Purificación de péptido

El péptido antimicrobiano FA1 fue sintetizado químicamente por ChinaPeptides en estado crudo, debido a esto contiene contaminantes de péptido incompleto, o bien péptidos no sintetizados correctamente, por lo tanto, el péptido antimicrobiano FA1 fue purificado por HPLC de fase reversa, Figura 1, con un gradiente de 20 – 80% de acetonitrilo + 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) usando una columna semipreparativa C₁₈ de 4.6 x 250 mm con un flujo de 1 mL/min. Se observó la elusión al minuto 30 del péptido FA1 con una concentración de 55.6% del compuesto A y 44.6% de B, Figura 1 A. Se recolectó la fracción mencionada y se volvió a purificar para comprobar su pureza, Figura 1B.

A



B

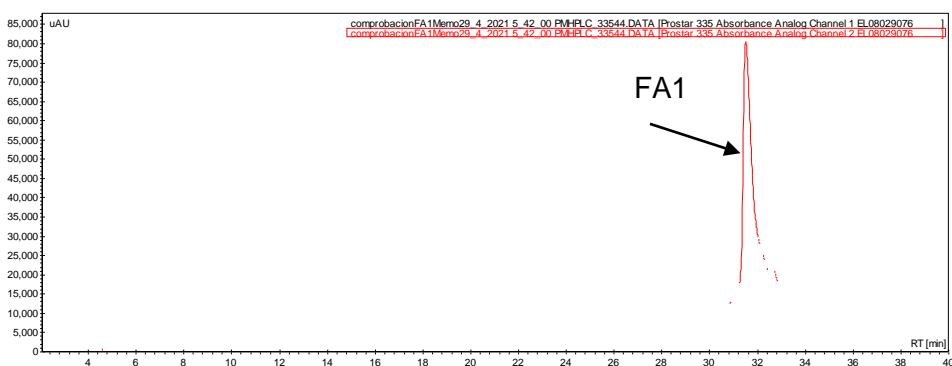


Figura 1. Purificación de FA1: Se purificó FA1 por HPLC para la eliminación de contaminantes o residuos de la síntesis peptídica. Columna C₁₈ (4.6 x 250 mm), gradiente 20-80 %B x 40 min, flujo 1 mL /min. Solvente A: H₂O + 0.1 % TFA; solvente B: Acetonitrilo + 0.1 % TFA. Tiempo de retención: 30 min (55.6% de A y 44.6% B). Los trazos representan la absorbancia a 230 (rojo) y 280 (negro) nm.

La fracción del minuto 30 fue colectada y analizada por espectrometría de masas. Dando como resultado un peso molecular de 3,009 Da, comparando con la literatura se demostró que el péptido recolectado es FA1, Figura 2.

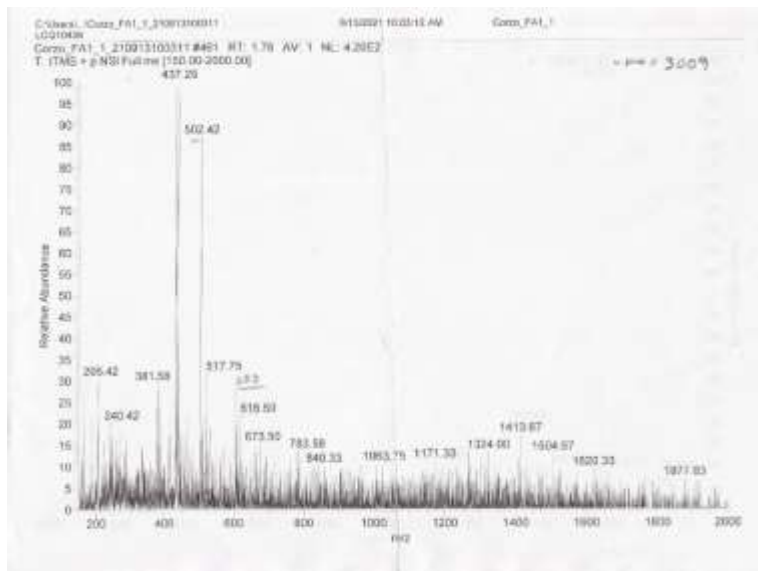


Figura 2. Espectrometría de masas del péptido FA1. Se determinó el peso molecular de la fracción mediante espectrometría de masas concluyendo que se recolectó el péptido FA1.

FA1 es estable en orina

Con el objetivo de saber si el péptido FA1 es estable en fluidos biológicos se hicieron incubaciones en diferentes tiempos para determinar si es estable en orina, ya que podría interactuar con diferentes proteínas presente en ella, haciendo esta disminuir. Sin embargo, en el ensayo que se hizo con las condiciones y metodología mencionadas, se pudo observar que la fracción del péptido FA1 al pasar 18 y 24 horas se mantiene estable en orina, a la vez que se muestra en los cromatogramas que el péptido conserva su hidrofobicidad debido a que se mantiene en el tiempo de retención original (55.6% de A y 44.6% de B), Figura 3.

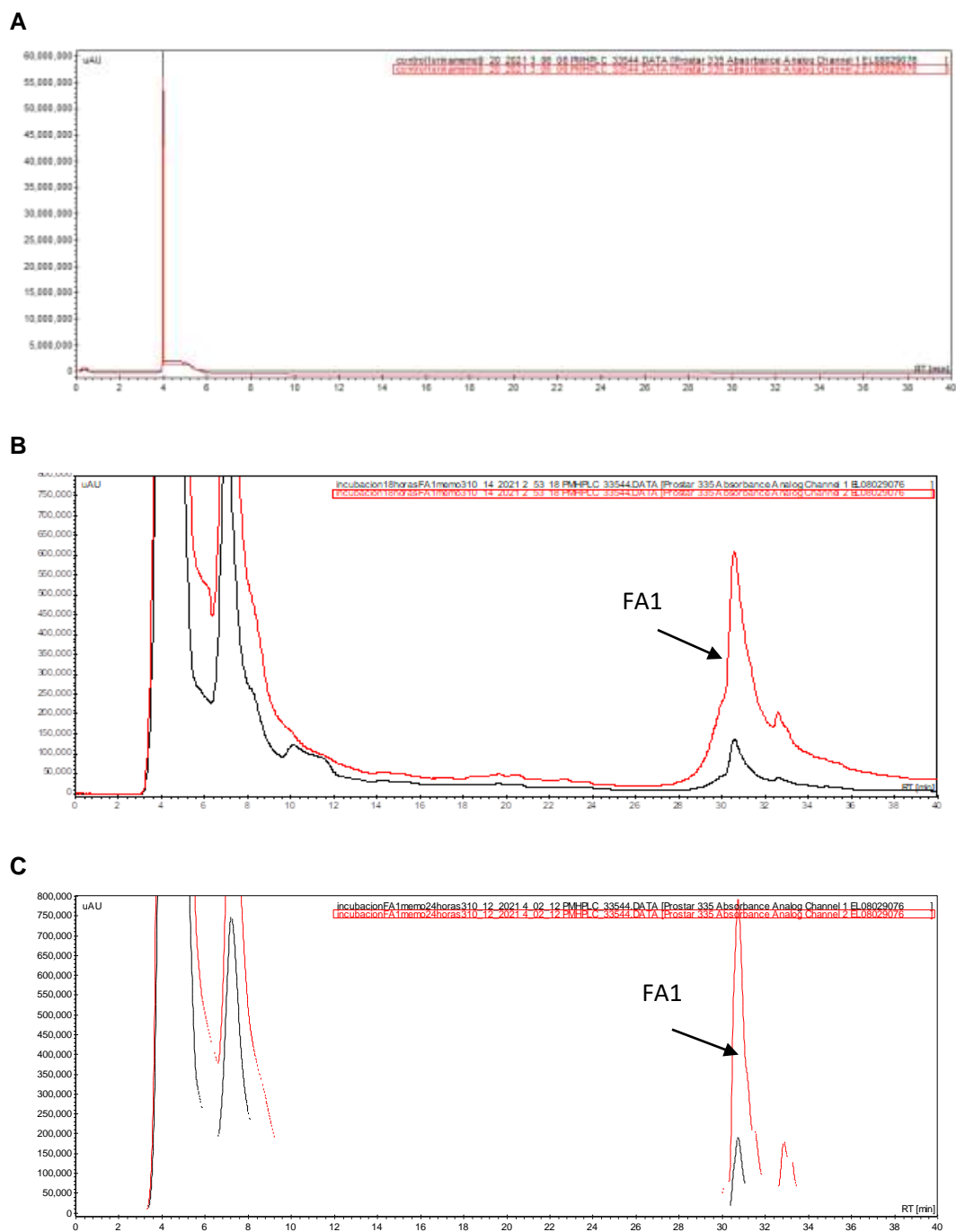


Figura 3. Incubación de FA1 en orina. Cromatogramas del péptido FA1 (100 µg) incubado en orina (50 µL) durante **A)** control, **B)** 18 horas, **C)** 24 horas. Utilizando una columna C₁₈ (4.6 x 250 mm), gradiente 20-80 %B x 40 min, flujo 1 mL /min. Solvente A: H₂O + 0.1 % TFA; solvente B: Acetonitrilo + 0.1 % TFA. Tiempo de retención: 31 min (55.6% de A y 44.6% B)

Se midió el área bajo la curva de los experimentos, hechos por triplicado, y se analizó mediante el programa GraphPad Prism 6, de tal modo que se determinó que el péptido FA1 es estable en orina por 24 horas, Figura 4.

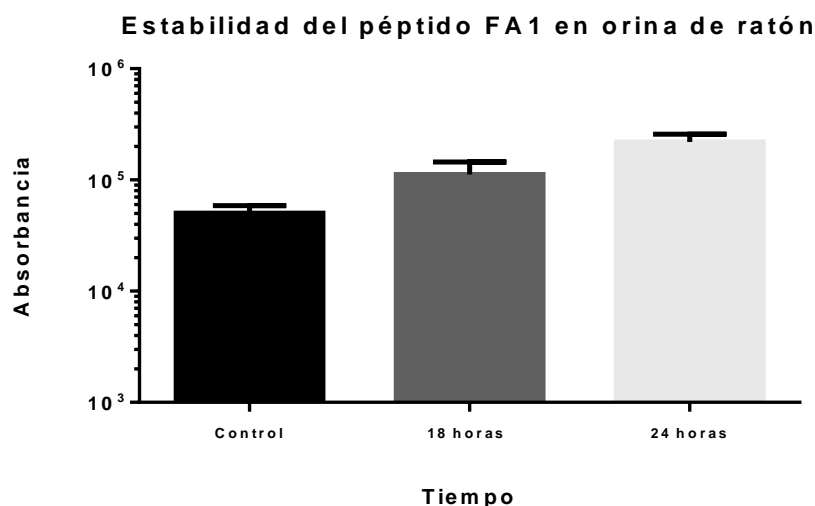


Figura 4. Gráfica del área bajo la curva de los picos de FA1 en orina de ratón. Se calculó el promedio de los valores del área bajo la curva de las fracciones de FA1 de los ensayos de estabilidad. Se muestra el promedio de tres experimentos de los grupos controles. Demostrando que la estabilidad se mantiene en dichos tiempos.

No es posible determinar la estabilidad de FA1 en plasma de ratón

Con el objetivo de saber si el péptido FA1 es estable en fluidos biológicos es necesario saber si el péptido puede mantener su estabilidad en plasma, debido a que existen diferentes proteínas y enzimas que pueden ocasionar que el péptido FA1 sea degradado. Por lo que se hicieron diferentes incubaciones en diferentes tiempos, con lo que se puede tener un rango estimado de vida media en un modelo *in vivo*. Para determinar si mantiene su estabilidad, se hicieron purificaciones por HPLC, sin embargo, se detectó una fracción con el mismo tiempo de retención y absorbancia del péptido FA1 en los controles de purificación de plasma, Figura 5 A. Esto ocasionó que no se pudiera saber si el péptido mantiene su estabilidad en plasma, debido a que la fracción detectada interfiere en los resultados de la purificación.

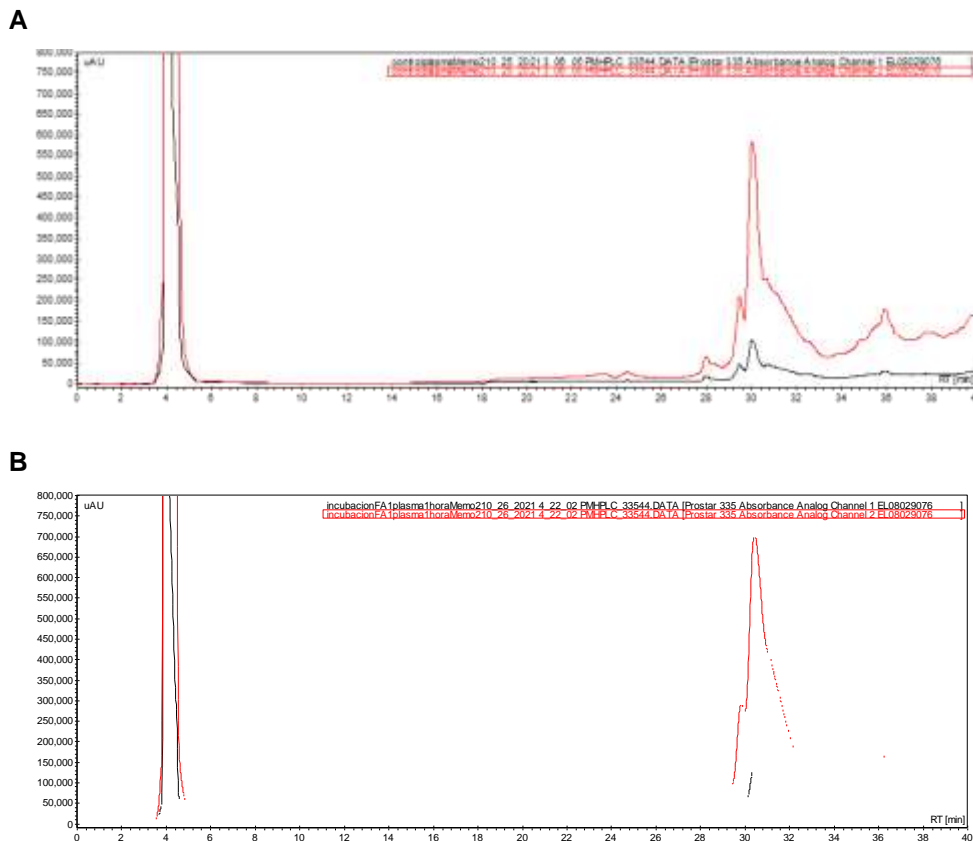
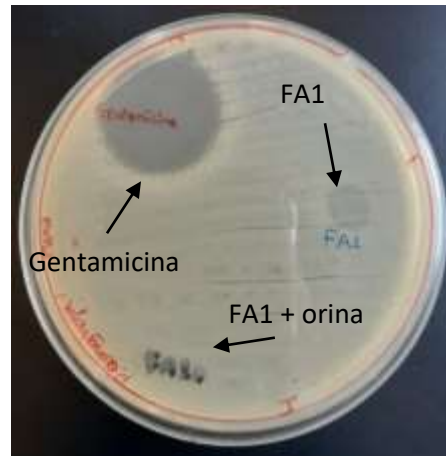


Figura 5. Incubación de FA1 en plasma. Cromatogramas del péptido FA1 (100 μ g) incubado en plasma (50 μ L) durante A) control, B) incubación de 1 hora. Mediante una columna C18 (4.6 x 250 mm), gradiente 20-80 %B x 40 min, flujo 1 mL /min. Solvente A: H₂O + 0.1 % TFA; solvente B: Acetonitrilo + 0.1 % TFA. Se comprobó los controles para el estudio de la estabilidad de FA1.

FA1 pierde su función antibiótica después de ser incubado en orina de ratón

Para demostrar que el péptido FA1 mantiene sus funciones antibióticas después de ser incubado en orina de ratón en un tiempo de 24 horas, se hicieron antibiogramas con bacterias Gram (+) y Gram (-), *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente, ya que se habían utilizado para demostrar las concentraciones mínimas inhibitoria (MIC) del péptido FA1 puro (Arenas *et al.*,2016). Sin embargo, se pudo observar que el péptido FA1 después de ser incubado en orina pierde su función antibiótica, Figura 6.

A)



B)

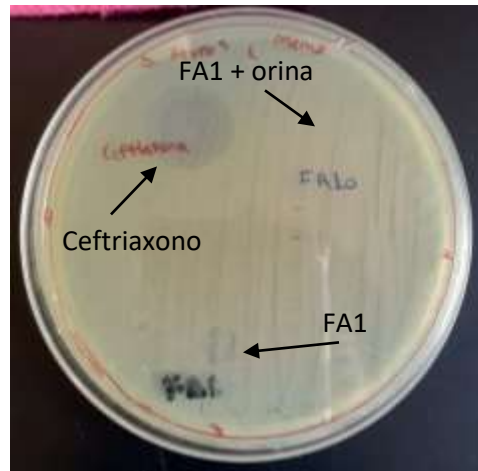


Figura 6. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en medio solido MH. Se determino si el péptido FA1 incubado en orina de ratón por 24 horas seguía conservando su función antibiótica usando 100 µg del péptido incubado. Resultado obtenido usando la bacteria A) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y B) *Staphylococcus aureus*. ATCC 25923 Se usaron como control 100 µg del péptido FA1 puro, 100 µg/mL de Ceftriaxona para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y 100 µg/mL de Gentamicina para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Marcaje de FA1 con Alexa Flúor 750

Se hizo el marcaje del péptido FA1 con Alexa Flúor 750 según el protocolo mencionado. La incubación se hizo por 2 horas a temperatura ambiente, seguido por una purificación por HPLC. Para identificar el péptido FA1 marcado se usaron los siguientes controles: FA1 sin marcar, buffer de carbonato y AF750, Figura 7. Se observa, en la Figura 7 D, que el péptido FA1 marcado no cambia su tiempo de retención, teniendo la misma concentración del compuesto A y B.

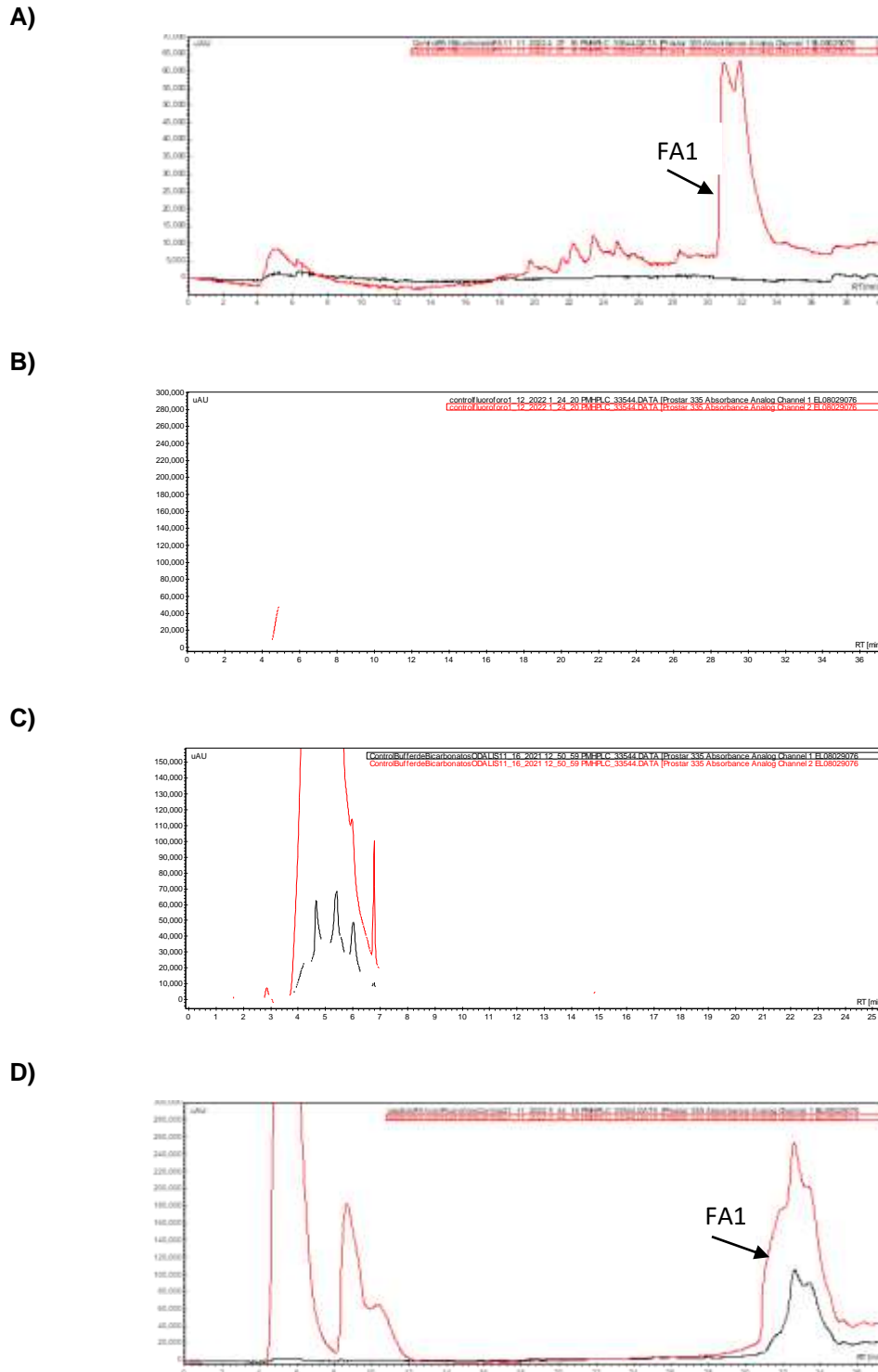


Figura 7. Marcaje de FA1 con Alexa Flúor 750. Siguiendo las condiciones de marcaje y HPLC mencionados se muestran los cromatogramas del péptido FA1 con sus respectivos controles. A) FA1 sin marcar, B) Alexa Flúor 750, C) Buffer de carbonato y D) FA1 marcado con Alexa Flúor.

Biodistribución del péptido FA1 en ratones CD1

Para comprobar la distribución del péptido FA1 marcado con AF750, se le inyectó al ratón un volumen de 200 μ L de PBS con el péptido marcado. Se usaron controles de PBS y AF750 disueltos en el mismo volumen. Usando los tiempos establecidos de 0, 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 4 horas, con el objetivo de tener el tiempo de concentración del péptido en las diferentes regiones del ratón, Figura 8. En los ratones inyectados por PBS, Figura 8 A-E, no se encontró fluorescencia, como era de esperarse por no tener un marcador para detectar su distribución. A su vez, el biomarcador AF750 inyectado se pudo detectar por todo el cuerpo esto habla de una distribución inespecífica, Figura 8 F-J. Así mismo, se demostró la distribución de FA1 + AF750, en el tiempo 0 la concentración del péptido se encontraba en la cola, después de un periodo de 30 minutos comenzó a acumularse en la parte abdominal. Después de esto, en el periodo de 1 hora, el péptido se comenzó a acumular en los riñones y en la zona inferior abdominal, pero después de 2 horas hubo una mayor acumulación en dicha zona. Finalmente, en el periodo de 4 horas la intensidad de fluorescencia disminuyó en la zona inferior abdominal, Figura 8 K-O.

Se uso el programa *GraphPad Prism 6* para calcular el área de la fluorescencia de cada zona del ratón, Figura 9. Se observa que, en las regiones de la cola, patas traseras, los riñones y los testículos el péptido se mantiene constante durante: 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 4 horas, Figura 9 A-C y H. Por otro lado, se observa un cambio en la concentración del péptido en la cabeza y los brazos, en donde aumenta su concentración en el periodo de 30 minutos a 1 hora, sin embargo, al transcurrir 2 horas disminuye en dichas regiones, Figura 8 D y E. En cambio, en las regiones de hígado y vejiga el péptido aumenta su concentración en el periodo de 30 minutos a 2 horas, pero disminuye su concentración en dichas regiones tras 4 horas, Figura 9 F y G.

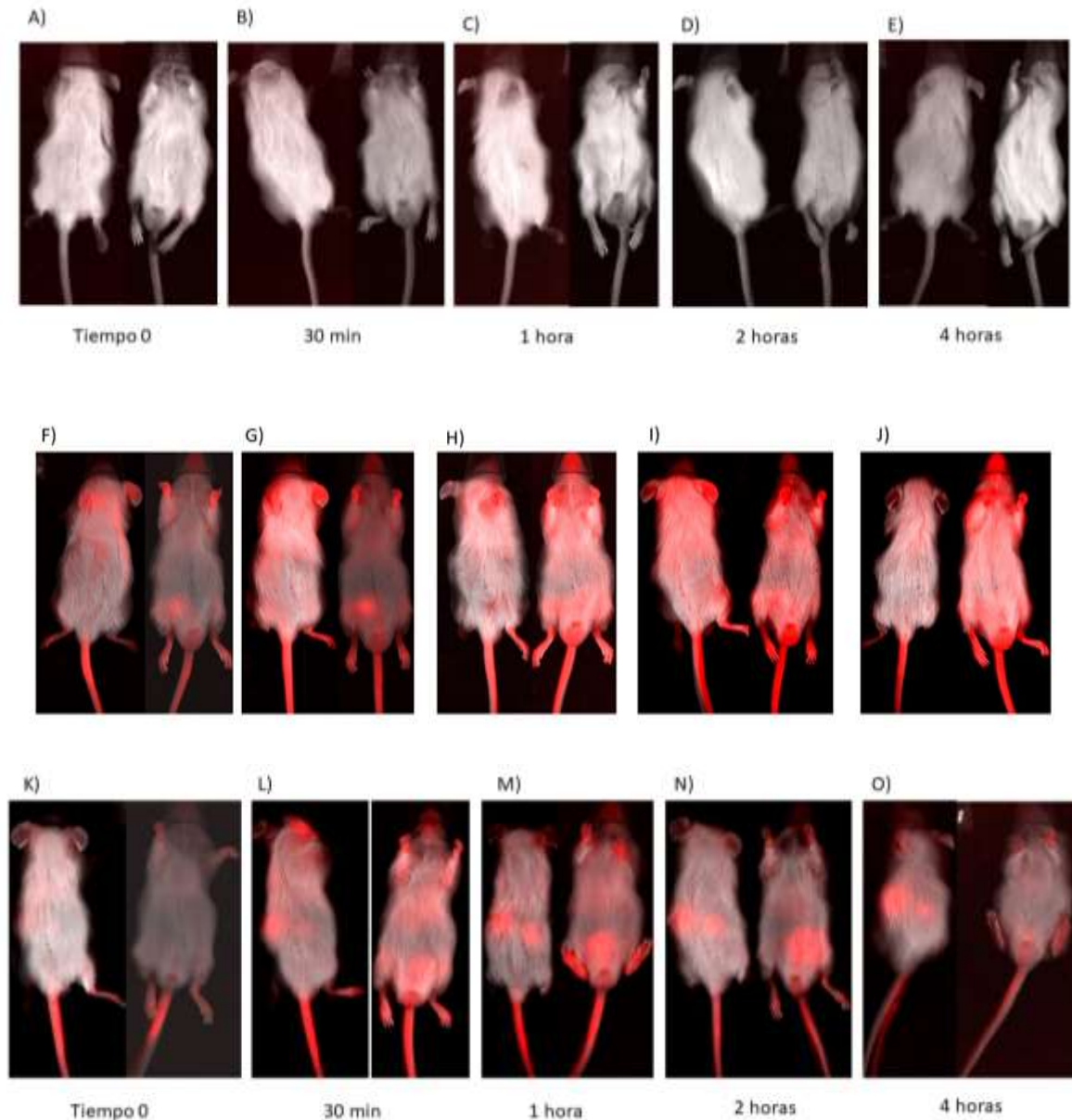


Figura 8. Imágenes de biodistribución en ratón. Se inyectó a diferentes ratones 200 μ L de PBS, PBS + AF750 y el péptido FA1 + AF750 con el objetivo de monitorear en diferentes tiempos la distribución. Se muestran a los ratones inyectados con **PBS**: A) tiempo 0, B) 30 min, C) 1 hora, D) 2 horas y E) 4 horas; **PBS + AF750**: F) tiempo 0, G) 30 min, H) 1 hora, I) 2 horas y J) 4 horas; **FA1 + AF750** K) tiempo 0, L) 30 min, M) 1 hora, N) 2 horas y O) 24 horas. Cada experimento se hizo por triplicado.

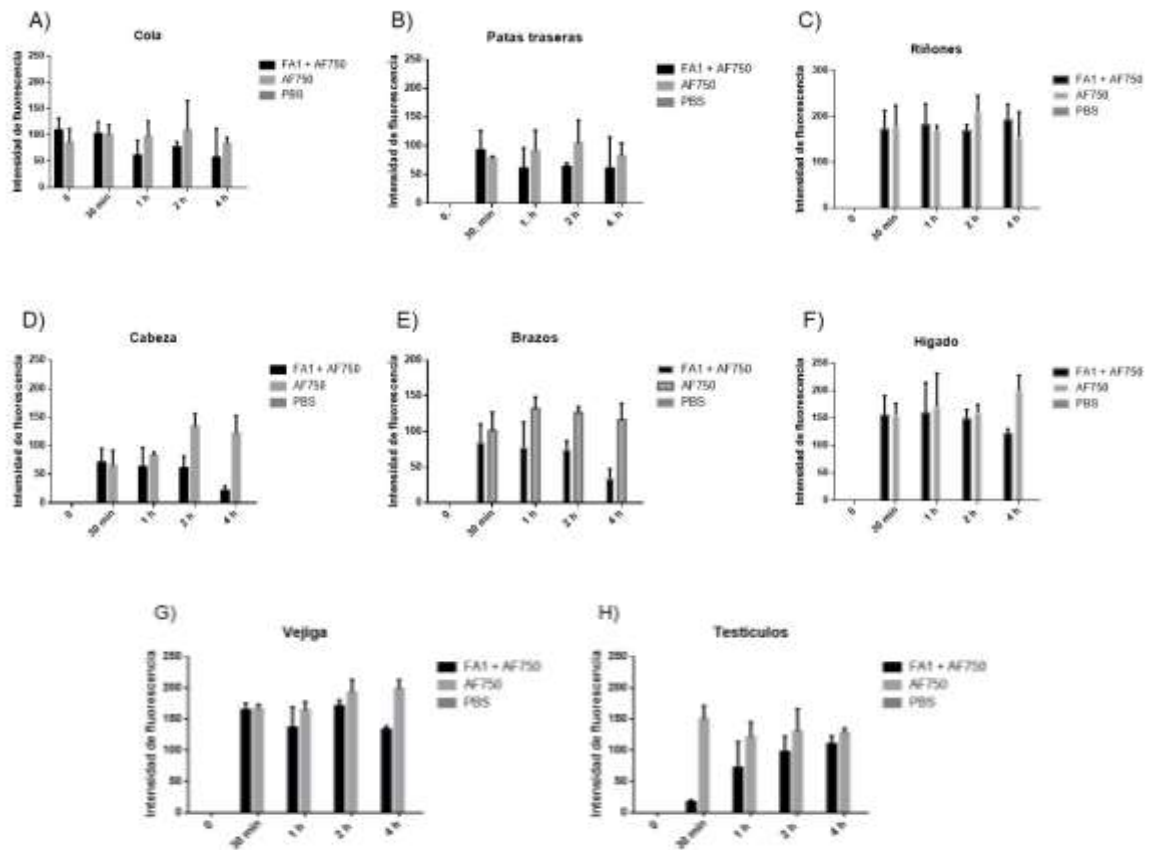


Figura 9 Graficas de la intensidad de fluorescencia en zonas del ratón. Se calculo el área de la intensidad de la fluorescencia en donde se graficaron A) cola, B) patas traseras, C) riñones, D) cabeza, E) brazos, F) hígado, G) vejiga y H) testículos. Se muestra el promedio con la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Finalmente, se hicieron las disecciones de los ratones analizados. En donde se observa que el péptido FA1 después de ser administrado a los ratones CD1 por 4 horas se acumula principalmente en los riñones, seguido por el hígado. No obstante, se observa una pequeña intensidad de fluorescencia en los demás órganos a excepción del bazo, corazón y pulmones, Figura 9. La emisión de fluorescencia se graficó en la Figura 10.

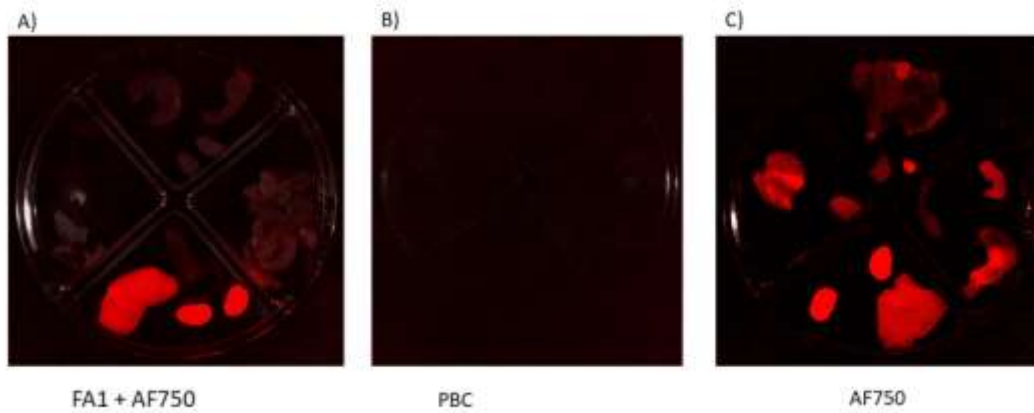


Figura 10. Fluorescencia en los órganos por el péptido FA1 marcado por Alexa Flúor 750. Se obtuvieron los órganos: pulmones, corazón, intestino, hígado, riñones, bazo, páncreas, estómago y testículos. En donde solamente hubo absorción en el hígado y en los riñones.

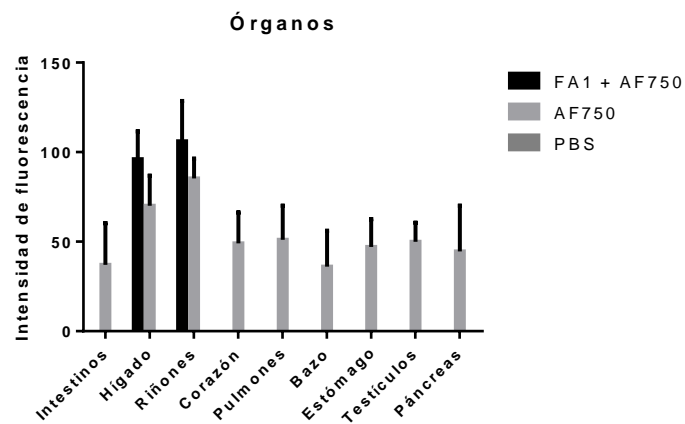


Figura 11. Gráfica de concentración de FA1. Se calculó el área de la fluorescencia considerando la intensidad de emisión de FA1 + AF750 en los órganos de los ratones después de ser inyectados con el péptido con fluoróforo, lo cual a transcurrir 4 horas fueron diseccionados. Se muestra el promedio con la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Discusión

El proyecto tiene como objetivo el estudio de la estabilidad del péptido FA1 en fluidos biológicos de ratón, con el propósito de entender la farmacocinética de este péptido para así establecer un tratamiento de infecciones sistémicas. Como se ha mencionado, tienen cierta limitante de estabilidad en medios fisiológicos por su sensibilidad a pH y fuerza iónica (Malik *et al.*, 2016). Esto dificulta el uso de los péptidos antimicrobianos en ciertos tratamientos, ya que suelen ser degradados por diferentes enzimas del organismo (Cavaco *et al.*, 2021).

En este proyecto se usó el péptido FA1 debido a que es un péptido sintético originado de los péptidos hadrurina y vejovina, del veneno de los alacranes *Hadrurus gertschi* y *Vaejovis mexicanus*, respectivamente. El cual destacó de entre otros candidatos creados de los mismos péptidos por su baja toxicidad en células de mamíferos (Greco *et al.*, 2020). De igual forma, se le insertó una secuencia de aminoácidos básicos (KLKR) teniendo en cuenta el N-terminal, la carga y su hidrofobicidad. Durante los ensayos antimicrobianos y hemolíticos se observó un efecto microbicida mayor y disminución hemolítica en comparación con la hadrurina y la vejovina, lo cual lo vuelve un buen candidato para su administración intravenosa (Sánchez *et al.*, 2013).

La baja estabilidad en fluidos fisiológicos que suelen presentar los péptidos es debida a que son susceptibles a ser degradados por enzimas, como amilasas o proteasas, también pueden interactuar con diversas proteínas y grandes concentraciones de sales fisiológicas que pueden inactivarlos (Yi *et al.*, 2007). Dado que en la orina se encuentran diferentes compuestos que pueden degradar o inactivar a los péptidos antimicrobianos, tales como sales, urea, ácido úrico, etc. Por otro lado, la sangre se compone de células inmunitarias, como los leucocitos polinucleares, neutrófilos, células de músculo liso, fibroblastos, plaquetas y células endoteliales, además de proteínas como albumina, globulina y fibrinógeno (Olsen *et al.*, 2004, Yi *et al.*, 2007). Dichos agentes pueden interferir en los efectos terapéuticos de los péptidos al ocasionar su degradación o inactivación.

Para saber si el péptido FA1 puede ser usado como un tratamiento a nivel fisiológico, sin que se degrade debido a que interactúe con diferentes proteínas, se analizó su estabilidad en orina y plasma en diferentes tiempos. Por medio de purificaciones por HPLC se pudo observar que el péptido mantenía su estabilidad después de ser incubado por 24 horas en orina de ratón, lo cual se muestra en la Figura 3. En donde se graficó el promedio del área bajo la curva de los tres experimentos dando como resultado, que el péptido es estable, Figura 4. Al comparar la medición del área bajo la curva de los cromatogramas de estos experimentos con los de Galeana *et al.*, 2020 con el péptido Pin2[G] demuestran que el péptido FA1 es más estable que dicho péptido. Esto puede indicar que el péptido FA1 no interactúa con los compuestos propios de la orina que puedan degradarlo. Es posible que el péptido FA1 interactúe con las proteínas o enzimas que no provoquen su degradación, por tal motivo se mantuvo estable después de las 24 horas. A su vez, se podrían hacer diferentes experimentos en donde se vería la unión del péptido FA1 con alguna proteína, por ejemplo, se podría hacer HPLC de carga iónica para determinar si el péptido FA1 cambió su carga neta por la interacción con proteínas o sales de la orina de ratón.

Por otro lado, no se pudieron concluir los ensayos de estabilidad en plasma de ratón, debido a que hay una fracción que se detecta en la purificación en HPLC en fase reversa en el tiempo en el que eluye el péptido FA1, además de que dicha fracción tiene la misma absorbancia que el péptido FA1 (Figura 5). Sin embargo, hay evidencia de que FA1 es degradado después de 12 horas incubado en plasma sanguíneo humano a 37 °C, esto debido a que el péptido interactúa con proteínas sanguíneas que podrían usar como transportador (Arenas *et al.*, 2016), lo cual posiblemente se pudo observar en los ensayos de biodistribución en los ratones CD1. Se pueden proponer alternativas para saber si el péptido FA1 es estable en un rango menor de 12 horas, proponiendo usar HPLC de carga iónica para saber si la fracción correspondiente que sale en el cromatograma control del plasma de ratón (Figura 5 A) tiene diferente carga que el péptido en mención. También se puede usar un gel de Tricina para comprobar el peso molecular del péptido FA1

incubado en plasma en diferentes horas, diferenciando el peso molecular de FA1 con la fracción mencionada.

Para comprobar si FA1 mantiene su efecto antibiótico tras su incubación en orina de ratón en un lapso de 24 horas se hicieron antibiogramas con las bacterias *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923. Usando 100 µg del péptido incubado y como controles 100 µg del péptido FA1 puro, 100 µg/mL de Ceftriaxona para *S. aureus* ATCC 25923 y 100 µg/mL de Gentamicina para *P. aeruginosa* ATCC 27853. En estos se pudo observar que el péptido pierde su función antibiótica, Figura 6. Esto puede ser debido a una interacción con las sales de la orina o proteínas que pudieron inactivar su efecto, por lo que puede bajar su carga neta provocando que el péptido al interactuar con las bacterias no pudiera atravesar a la membrana impidiendo su función antibiótica, debido a que el péptido FA1 tiene mecanismos de acción en el que es necesario su entrada a la bacteria. En la literatura se ha demostrado que el péptido FA1 se puede degradar por concentraciones altas de sales, esto no ocurre en la orina de ratón, pero sí perdió su efecto antibiótico. La inhibición de la función del péptido FA1 puede ser debido a que las sales tienden a modificar la fuerza iónica en péptidos antimicrobianos, lo cual puede provocar una disminución en su capacidad de traspasar o reconocer receptores de las bacterias. Por ejemplo, esto también pasó con el péptido enterocina CRL₃₅ el cual interactúa contra las células de *Listeria* que, en concentraciones altas, puede degradar a la bacteria, pero añadiéndole cationes monovalentes y cationes divalentes se inhibe la actividad antibiótica (Morero et al., 2003). Por lo tanto, se propone usar HPLC de carga iónica para demostrar si el péptido FA1 tuvo una modificación en su carga catiónica que pueda impedir el ingreso al interior de las bacterias. También, se podrían hacer diferentes antibiogramas con los diferentes tiempos de incubación del péptido FA1 en orina de ratón con el objetivo de saber si por el tiempo expuesto a dicho fluido se pierde exponencialmente su efecto antibiótico.

Observando que el péptido FA1 es estable en orina y considerando que en la literatura se vio que el péptido es degradado en un periodo de 12 horas en

plasma sanguíneo, es necesario saber el tiempo en el que el péptido puede sobrevivir en un modelo *in vivo*, además de determinar la concentración que alcanza el péptido en cada órgano. Para esto, se hizo una biodistribución *in vivo* en ratones CD1 usando Alexa Flúor 750 como marcador para el péptido. Demostrando que la concentración del péptido en un tiempo de 2 horas se observa principalmente en los riñones, además en el hígado, sin embargo, hubo una mayor concentración de fluorescencia en los riñones lo que demuestra que la vía de excreción es por la orina. Por otro lado, los resultados de la biodistribución muestran en el tiempo de 30 minutos a 1 hora una mayor distribución de FA1 en el organismo de ratón (Figura 8). Esto podría ser debido a la unión de proteínas sanguíneas con el péptido FA1. Sin embargo, su excreción sigue siendo muy temprana, por lo que se puede proponer el uso de un transportador que proteja al péptido FA1 de la degradación proteolítica. Por otra parte, no se pudo extraer orina en los tiempos deseados, debido a que el fármaco isoflurano disminuye la presión sanguínea, por lo cual, el ratón no podía orinar en los tiempos establecidos.

Comparando los resultados obtenidos con los del péptido Pin2[G] (Galeana *et al.*, 2020), en donde se pudo observar hasta un tiempo de 8 horas una disminución de fluorescencia en los riñones, se determina que el péptido FA1 tiene un tiempo corto de distribución en el organismo, A su vez, la biodistribución de peptoides, que son péptidos miméticos de los péptidos antimicrobianos, pero con la diferencia de que las cadenas laterales están unidas al nitrógeno de la cadena principal en lugar del carbono α , lo cual ocasiona que aumente su estabilidad a proteasas. En la investigación de Seo y asociados se usaron tres peptoides anfipáticos catiónicos para su estudio en biodistribución marcados con Cu y mostraron que se mantiene la concentración en los riñones en el tiempo de 2 a 24 horas (Seo *et al.*, 2012).

En el análisis *ex vivo* se hizo una disección tras 4 horas de la administración del péptido y se demostró que FA1 tiene una concentración mayor en los riñones y en el hígado, Figura 10. Determinando que el péptido FA1 tiene una distribución

en el organismo y excreción rápida por lo cual se observa que FA1 tiene mayor concentración en los riñones y hígado debido a que el hígado es el encargado de metabolizar la sangre por tal motivo se encuentra una acumulación significativa de péptido, de igual forma en los riñones que son los encargados de filtrar las sustancias del torrente sanguíneo se encontró mayor concentración de péptido. En comparación con el péptido Pin2[G] su tiempo en que llega a los riñones su concentración máxima es de 8 horas y el tiempo de la concentración máxima del péptido FA1 es de 4 horas se concluye que el tiempo de la biodistribución del péptido es más corto. Comparándolo con antibiótico Ceftriaxona que su tiempo de concentración máxima en los riñones es de un tiempo de 9 horas y el antibiótico Gentamicina que tiene un tiempo máximo de concentración en los riñones de 4 horas se puede concluir que el péptido FA1 tiene un tiempo de vida media en el organismo en el que puede hacer su función antibiótica.

Finalmente, se demostró que el péptido FA1 es estable en orina, pero a la vez pierde su función antibiótica, posiblemente debido a la unión de sales con el péptido. Se observó además una acumulación más específica en menor tiempo en el cuerpo del ratón CD1. Lo que podría deberse a su unión con una proteína sanguínea usándola como transportador. Sin embargo, su tiempo de retención en el hígado y los riñones fue mayor, esto sumado a que no hubo fluorescencia en el intestino, nos permite determinar que el péptido es evacuado por la orina.

En conclusión, el estudio de la estabilidad y biodistribución de los péptidos antimicrobianos es importante para determinar la vida media de ellos en fluidos biológicos y así poder desarrollar diferentes tratamientos farmacológicos para combatir contra la resistencia antimicrobiana.

Conclusiones

- FA1 es estable en orina de ratón hasta por 24 horas.
- FA1 pierde su función antibiótica después ser incubado por 24 horas en orina.
- FA1 se acumula en los riñones y hígado en un tiempo de 1 a 2 horas.
- FA1 se concentra después de 4 horas en los riñones y hígado del ratón.
- FA1 es excretado por medio de la orina

Perspectivas

- Hacer HPLC de carga iónica para comprobar la carga del péptido FA1 incubado en orina de ratón.
- Hacer HPLC de carga iónica de péptido FA1 incubado en plasma.
- Antibiogramas con diversas bacterias con las incubaciones del péptido FA1 en orina de ratón y plasma en diferentes tiempos.
- Seleccionar un transportador para proteger FA1 de las enzimas proteolíticas.
- Determinar la biodistribución de FA1 en ratones infectados.

Bibliografía

1. Orlov, D. S., Shamova, O. V., Eliseev, I. E., Zharkova, M. S., Chakchir, O. B., Antcheva, N., Zachariev, S., Panteleev, P. V., Kokryakov, V. N., Ovchinnikova, T. V., & Tossi, A. (2019). Redesigning Arenicin-1, an Antimicrobial Peptide from the Marine Polychaeta *Arenicola marina*, by Strand Rearrangement or Branching, Substitution of Specific Residues, and Backbone Linearization or Cyclization. *Marine drugs*, 17(6), 376. <https://doi.org/10.3390/md17060376>
2. Acevedo Fernández Juan José , Angeles Chimal José Santos, Rivera Heriberto Manuel , Petricevich López Vera Lucía , Nolasco Quintana Ninfa Yaret , Collí Magaña Dianelly Yazmín , Tapia Jesús Santa-Olalla . (2013). Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos, Facultad de Medicina Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Calle Leñeros <http://dx.doi.org/10.3926/oms.38>
3. Aguilar Marie-Isabel. (2004). High-Performance Hydrophobic Interaction Chromatography. HPLC of Peptide and Proteins Methods and Protocol (45-53). Totowa, New Jersey 07512: Humana Press.
4. Steven Arcidiacono, Philip Pivarnik, Charlene M. Mello, Andre Senecal, Cy5 labeled antimicrobial peptides for enhanced detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 23, Issue 11, (2008), Pages 1721-1727, ISSN 0956-5663, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.02.005>.
5. Arenas, I., Villegas, E., Walls, O., Barrios, H., Rodríguez, R., & Corzo, G. (2016). Antimicrobial Activity and Stability of Short and Long Based Arachnid Synthetic Peptides in the Presence of Commercial Antibiotics. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(2), 225. <https://doi.org/10.3390/molecules21020225>
6. Brown Robert Kelly L, Hancock E. W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides, *Current Opinion in Immunology*, Volume 18, Issue 1, 2006, Pages 24-30, ISSN 0952-7915, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.004>.<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791505001998>)
7. Brunetti, J., Falciani, C., Roscia, G., Pollini, S., Bindi, S., Scali, S., Arrieta, U. C., Gomez-Vallejo, V., Quercini, L., Ibba, E., Prato, M., Rossolini, G. M., Llop, J., Bracci, L., & Pini, A. (2016). In vitro and in vivo efficacy, toxicity, bio-distribution and resistance selection of a novel antibacterial drug candidate. *Scientific Reports*, 6(January), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep26077>
8. Cardoso, P., Glossop, H., Meikle, T. G., Aburto-Medina, A., Conn, C. E., Sarojini, V., & Valery, C. (2021). Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. *Biophysical reviews*, 13(1), 1–35. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00784-y>

9. Castañeda-Casimiro Jessica, Ortega-Roque José Antonio, Venegas-Medina Adriana Marcela, Aquino-Andrade Alejandra, Serafín-López Jeanet, Estrada-Parra Sergio, Estrada Iris . (2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. Medigraphic Artemisa Vol. 18, Num 1 <https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2009/al091d.pdf>
10. Castro Torres AM, Casas Vaguero H, Calzado Serrano LI, Olivera Suárez M, Pérez Llauger S, Hernández Hechemendía FN. Manual de procedimientos de enfermería. La Habana: Cincias Médicas; 2005.
11. Cavaco, M., Valle, J., Flores, I., Andreu, D., & A R B Castanho, M. (2021). Estimating peptide half-life in serum from tunable, sequence-related physicochemical properties. *Clinical and translational science*, 14(4), 1349–1358. <https://doi.org/10.1111/cts.12985>
12. Chan David I .Prenner Elmar J .Vogel Hans J.Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1758, Issue 9, 2006, Pages 1184-1202, ISSN 0005-2736, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.006>.
13. Chee, P. Y., Mang, M., Lau, E. S., Tan, L. T., He, Y. W., Lee, W. L., Pusparajah, P., Chan, K. G., Lee, L. H., & Goh, B. H. (2019). Epinecidin-1, an Antimicrobial Peptide Derived From Grouper (*Epinephelus coioides*): Pharmacological Activities and Applications. *Frontiers in microbiology*, 10, 2631. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02631>
14. Clim Jiménez Torres M. Martí. (2000). ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE MEDICAMENTOS: ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS. 03/02/2021, de - Sitio web: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/mivyna/miv05.pdf>
15. Constanza Briceñoa María A.Michea, Alcotab Fermín Marcela, González E. Péptidos antimicrobianos y mediadores lipídicos: rol en las enfermedades periodontales, *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, Volume 9, Issue 3, 2016, Pages 231-237, ISSN 0718-5391, <https://doi.org/10.1016/j.piro.2016.03.003>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0718539116000227>
16. Adochite, R. C., Moshnikova, A., Golijanin, J., Andreev, O. A., Katenka, N. V., & Reshetnyak, Y. K. (2016). Comparative Study of Tumor Targeting and Biodistribution of pH (Low) Insertion Peptides (pHLIP®) Peptides) Conjugated with Different Fluorescent Dyes. *Molecular imaging and biology*, 18(5), 686–696. <https://doi.org/10.1007/s11307-016-0949-6>
17. Domhan, C., Uhl, P., Kleist, C., Zimmermann, S., Umstätter, F., Leotta, K., Mier, W., & Wink, M. (2019). Replacement of l-Amino Acids by d-Amino Acids in the Antimicrobial Peptide Ranalexin and Its Consequences for Antimicrobial Activity and Biodistribution. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(16), 2987. <https://doi.org/10.3390/molecules24162987>

18. Escobedo-Moratilla Abraham , Barba de la Rosa Ana Paulina y Pérez-Urizar José Trinidad. (2015). Modelos preclínicos in vitro e in vivo para la evaluación de la actividad biológica en estudios de biocomparabilidad, de Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT), San Luis Potosí, S.L.P., México; Dixpertia S.A. de C.V, San Luis Potosí, S.L.P., México
https://www.anmm.org.mx/GMM/2015/n3/GMM_151_2015_3_377-386.pdf
19. Fet Victor & Soleglad Michael E.. (2007). SYNONYMY OF PARABROTEAS MONTEZUMA PENTHER , 1913 AND DESIGNATION OF NEOTYPE FOR VAEJOVIS MEXICANUS C. L. KOCH , 1836 (SCORPIONES : VAEJOVIDAE), de department of Biological Sciences, Marshall University, Huntington, Sitio web: https://www.academia.edu/3190708/SYNONYMY_OF_PARABROTEAS_MONTEZUMA_PENTHER_1913_AND_DESIGNATION_OF_NEOTYPE_FOR_VAEJOVIS_MEXICANUS_C_L_KOCH_1836_SCORPIONES_VAEJOVIDAE_
20. GARCÍA MONCADA JESUS. (2013). VEJOVINA: UN PEPTIDO ANTIBIOTICO., de UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO; INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA Sitio web: <https://pi.unam.mx/home/detalle?tipo=patentes&id=210>
21. Avci, F. G., Akbulut, B. S., & Ozkirimli, E. (2018). Membrane Active Peptides and Their Biophysical Characterization. *Biomolecules*, 8(3), 77. <https://doi.org/10.3390/biom8030077>
22. González García Melaine , Valdés I Mario E. , I Freitas Camila G. , Alba Menéndez Annia,, López Abarrategui Carlos, San Juan Galán Javier , Campos Diaz Simoni , Franco Octavio Luiz, Otero Gonzálezl Anselmo J. . (2017). Actividad biológica complementaria in vitro del péptido antifúngico Cm-p5 y predicción in silico de sus regiones funcionales. de Rev Cubana Med Trop vol.69 no.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2017 http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000100001
23. González-García M, San-Juan-Galán J, Morales-Vicente F, Otero-González A. Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *Revista Cubana de Medicina Tropical* [Internet]. 2017; 69 (2) Disponible en:<http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/197>
24. Greco, I., Molchanova, N., Holmedal, E., Jenssen, H., Hummel, B. D., Watts, J. L., Håkansson, J., Hansen, P. R., & Svenson, J. (2020). Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Scientific reports*, 10(1), 13206. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69995-9>
25. Harrison, P. L., Abdel-Rahman, M. A., Miller, K., & Strong, P. N. (2014). Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 88, 115–137. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06>.
26. Harrison Patrick L. A. Mohamed. Abdel-Rahmanb Peter N.StrongaMohamed M.TawfikaKeithMillera. Characterisation of three alpha-helical antimicrobial peptides from

- the venom of *Scorpio maurus palmatus*, *Toxicon*, Volume 117, 2016 Pages 30-36 ISSN 0041-0101, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.014>.
27. Hill McGraw; 2013 Farmacocinética. Conceptos generales. In: Palomares C, Vera G. eds. farmacológico.<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1510§ionid=98017078>
 28. Ibarra Valencia Marco Antonio. (2017). Acción de péptidos antimicrobianos en infecciones tóxicas en animales modelo. 23/02/2021, de UNAM
 29. Ishida J. , K. Nakamura Abe, M., Yamaguchi M. . (1996). Determinación cromatográfica líquida de alto rendimiento de albúmina sérica humana en plasma y orina mediante detección de mejora de la fluorescencia posterior a la columna utilizando ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico. de *Biol. Pharm. Bull.*, 19(11) 1391-1395 Sitio web: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb1993/19/11/19_11_1391/_pdf/-char/en
 30. J. Oromí Durich. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *ELSEVIER* Vol. 36 Núm. 10 páginas 367-370 (Diciembre 2000) Universidad de Barcelona. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-antibioticos-10022180>
 31. Kurien Biji T, Everds Nancy E. & Scofield R. Hal. (2004). Recolección experimental de orina en animales: Revisión. de *THE INTERNATIONAL JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND WELFARE* Edición en español de *Laboratory Animals* (2004) 38, 333-361 Sitio web: <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/11/Orina.pdf.pdf>
 32. Li Jiarui, Millan Pablo Fernández and Boix Ester,* (2020). Synergism between Host Defence Peptides and Antibiotics Against Bacterial Infections., de *Current Topics in Medicinal Chemistry*
 33. Lorena Fina Brenda, Lombarte Mercedes, Rigalli Alfredo. (2013). INVESTIGACIÓN DE UN FENÓMENO NATURAL: ¿ESTUDIOS IN VIVO, IN VITRO O IN SILICO?, de *Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe 3100, Rosario, Argentina. Actual Osteol* 9(3); 239-240. *Actual. Osteol* 2013; 9(3): 239-240 https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/21655/CONICET_Digital_Nro.25729.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 34. Luo, X., Ding, L., Ye, X., Zhu, W., Zhang, K., Li, F., Jiang, H., Zhao, Z., & Chen, Z. (2021). An Smp43-Derived Short-Chain α -Helical Peptide Displays a Unique Sequence and Possesses Antimicrobial Activity against Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Toxins*, 13(5), 343. <https://doi.org/10.3390/toxins13050343>
 35. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 194. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>

36. Maldonado-Villamizar Johana. (2016). Experimentación con biomodelos animales en ciencias de la salud. *Avances en Biomedicina*, vol. 5, núm. 3, pp. 173-177, 2016 de Universidad de los Andes Sitio web: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/3313/331349259008/html/index.html>
37. Malik, Erum, Sarah R. Dennison, Frederick Harris, and David A. Phoenix. 2016. "pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents" *Pharmaceuticals* 9, no. 4: 67. <https://doi.org/10.3390/ph9040067>
38. Maya Juan Diego. (2007). Farmacocinética: absorción y distribución. 23/01/2022, de Revista Biomédica Revisada Por Pares *Medwave* 2007 May;7(4):e3449 doi: 10.5867/medwave.2007.04.3449
39. MÉNDEZ KAREN DAYANA, YULIETH MENDOZA JAIMES STEPHANY, JULY ESPINEL, MORENO AMÉZQUITA ANDREA. (2018). EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO EN PATOTIPOS Y COMENSALES DE *Escherichia coli*. UNIVERSIDAD DE SANTANDER – UDES FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO BUCARAMANGA Sitio web: <https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/1068/1/Evaluaci%C3%B3n%20in%20vitro%20de%20la%20actividad%20antimicrobiana%20de%20un%20p%C3%A9ptido%20sint%C3%A9tico%20en%20patotipos%20y%20comensales%20de%20Escherichia%20coli.pdf>
40. Mourelle AC, Herrero E, Ricca M. Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. *Spei Domus*. 2013; 9(19): 39-47.
41. Mwangi, J., Hao, X., Lai, R., & Zhang, Z. Y. (2019). Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zoological research*, 40(6), 488–505. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062>
42. Olsen, H., Andersen, A., Nordbø. (2004). Pharmaceutical-grade albumin: impaired drug-binding capacity in vitro. 6/01/2022, de Central Laboratory, The Norwegian Radium Hospital , Norway Department of Anaesthesia, The Norwegian Radium Hospital Oslo, Norway corresponding authorCorresponding author. Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC406516/>
43. Ortiz López, C. . (2019). Diseño, síntesis, caracterización y evaluación in vitro de la actividad de los péptidos antimicrobianos contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos. *RACCEFYN*, 43(169), 614–627. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.864>
44. Perez Daza R.M.. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. , de Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud Sitio 1998; 22: 57-67 web: <https://www.mscbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

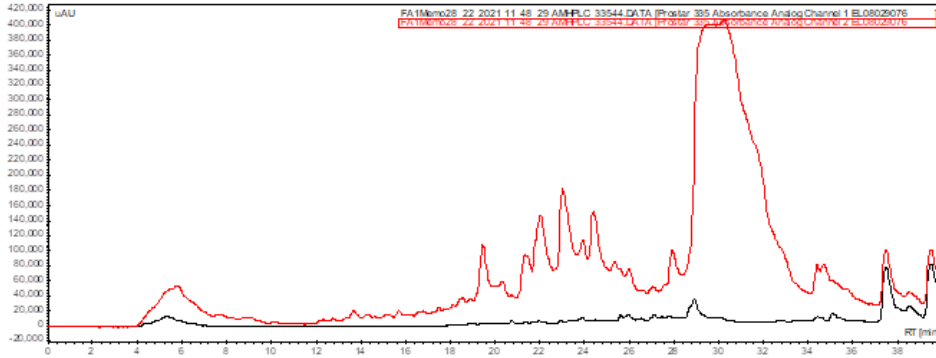
45. Quintero-Hernandez, Veronica & Cesa-Luna, Catherine & Rojas Muñoz, Jesús. (2017). Péptidos antimicrobianos de alacrán. 2. 10-16.
46. Rätty JK, Liimatainen T, Wirth T, Airene KJ, Ihalainen TO, Huhtala T, Hamerlynck E, Vihinen-Ranta M, Närvänen A, Ylä-Herttuala S, Hakumäki JM. Resonancia magnética de biodistribución de partículas virales in vivo. *Gene Ther.* 2006 Octubre;13(20):1440-6. doi: 10.1038/sj.gt.3302828. Epub 2006 Jul 20. PMID: 16855615.
47. Rivera Carlos; Flores Lidia ; Pantigoso Carmen y Escobar Enrique . versión On-line ISSN 1727-9933 *Rev. peru biol.* v.17 n.1 Lima abr. 2010 Aislamiento y caracterización de un péptido antibacteriano del veneno de *Centruroides margaritatus*. de *Revista Peruana de Biología* Sitio web: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332010000100016
48. Rodríguez Armando A., Otero-González Anselmo , Ghattas Marechia and Ständker Ludger . (2021). Discovery, Optimization, and Clinical Application of Natural Antimicrobial Peptides. 28/12/21, de Core Facility for Functional Peptidomics, Ulm University Medical Center, Ulm, Germany Core Unit of Mass Spectrometry and Proteomics, Ulm University Medical Center, 89081 Ulm, Germany Faculty of Biology, University of Havana, Havana,, Cuba; Faculty of Pharmacy and Biotechnology, German University in Cairo (GUC), Cairo Egypt; moc.liamg@yrehkafsattahgm Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8533436/>
49. Rodríguez, A. A., Otero-González, A., Ghattas, M., & Ständker, L. (2021). Discovery, Optimization, and Clinical Application of Natural Antimicrobial Peptides. *Biomedicines*, 9(10), 1381. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101381>
50. Rončević, T., Puizina, J., & Tossi, A. (2019). Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era?. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5713. <https://doi.org/10.3390/ijms20225713>
51. de la Salud Bea, R., Petraglia, A. F., Ascuitto, M. R., & Buck, Q. M. (2017). Antibacterial Activity and Toxicity of Analogs of Scorpion Venom IsCT Peptides. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 6(3), 13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6030013>
52. Sánchez-Vásquez L, Silva-Sanchez J, Jiménez-Vargas JM, Rodríguez-Romero A, Muñoz-Garay C, Rodríguez MC, Gurrola GB, Possani LD. Enhanced antimicrobial activity of novel synthetic peptides derived from vejovine and hadrurin. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jun;1830(6):3427-36. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.01.028. Epub 2013 Feb 9. PMID: 23403131.
53. Seo, J., Ren, G., Liu, H., Miao, Z., Park, M., Wang, Y., Miller, T. M., Barron, A. E., & Cheng, Z. (2012). In vivo biodistribution and small animal PET of (64)Cu-labeled antimicrobial peptoids. *Bioconjugate chemistry*, 23(5), 1069–1079. <https://doi.org/10.1021/bc300091d>

54. Téllez Germán Alberto, Castaño Jhon Carlos . (2010). Péptidos antimicrobianos. 23/01/2022, de - Sitio web: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14n1/v14n1a07.pdf>
55. Torres García, Magaly. Fundamentos de farmacología. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2010
56. Villeda - Callejas, María del Pilar; Colina – Garcés, Víctor Dana; Barrera - Escorcía, Héctor; Ruiz - Puga, Pablo; Lara - Vázquez, Ángel Vaejovis mexicanus (Koch 1838) (Scorpionida: Vaejovidae), Histología del mesodeo y hepatopáncreas. Revista de Zoología, núm. 23, 2012, pp. 1-8 Universidad Nacional Autónoma de México Tlalnepantla, México <https://www.redalyc.org/pdf/498/49830273001.pdf>
57. Yi J, Kim C, Gelfand CA. Inhibition of intrinsic proteolytic activities moderates preanalytical variability and instability of human plasma. J Proteome Res. 2007 May;6(5):1768-81. doi: 10.1021/pr060550h. Epub 2007 Apr 6. PMID: 17411080. Suckow, MA, Gobbett, TA y Peterson, RG (2017). Retraso en la cicatrización de heridas en la rata ZDSD. In vivo (Atenas, Grecia) , 31 (1), 55–60. <https://doi.org/10.21873/invivo.11025>
58. Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L. y Björn, C. (2016). Péptidos antimicrobianos: una categoría emergente de agentes terapéuticos. Fronteras en microbiología celular y de infecciones , 6 , 194. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
59. Spicer, CD, , Jumeaux, C., , Gupta, B., y Stevens, MM, (2018). Conjugados de nanopartículas de péptidos y proteínas: plataformas versátiles para aplicaciones biomédicas. Reseñas de la Sociedad Química , 47 (10), 3574–3620. <https://doi.org/10.1039/c7cs00877e>

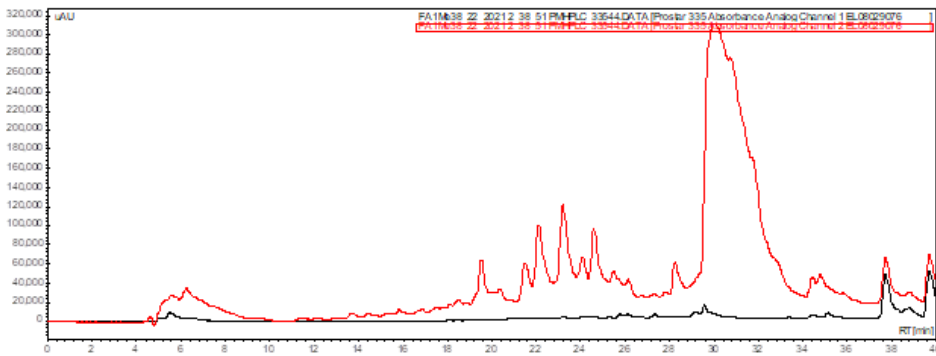
Anexo

A1 Purificación del péptido FA1 en estado crudo

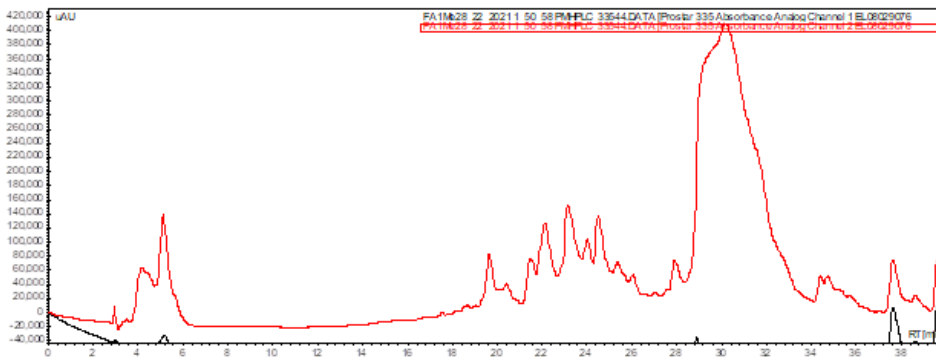
A)



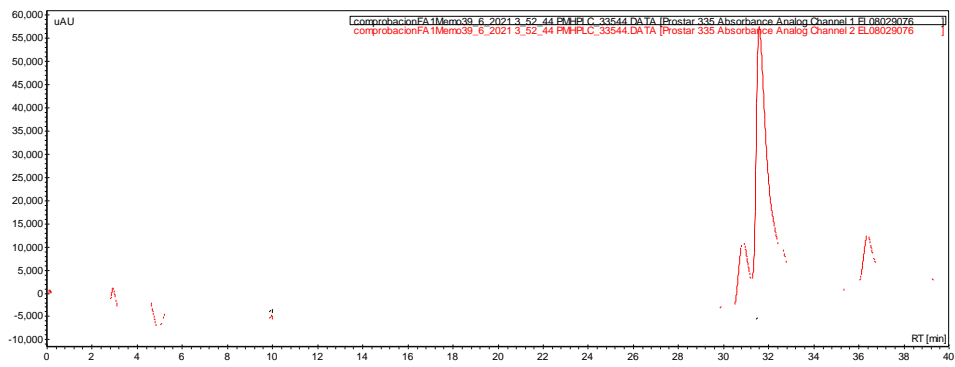
B)



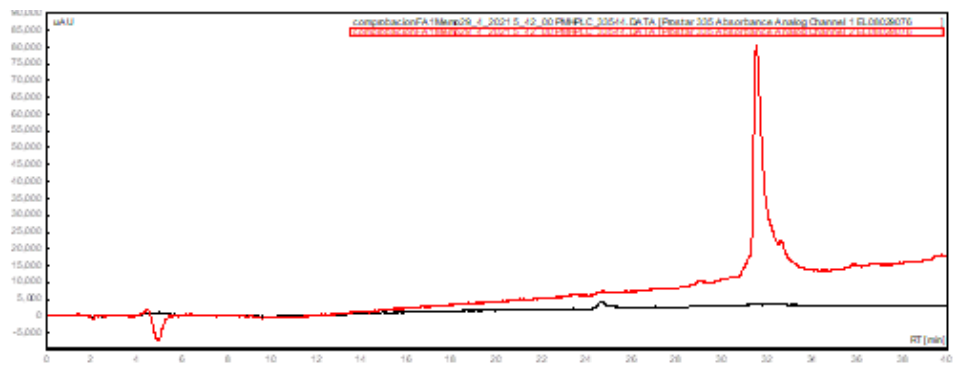
C)



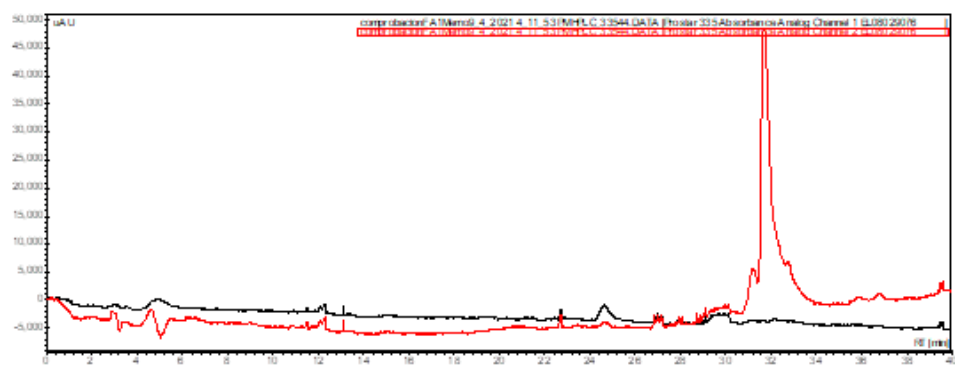
D)



E)



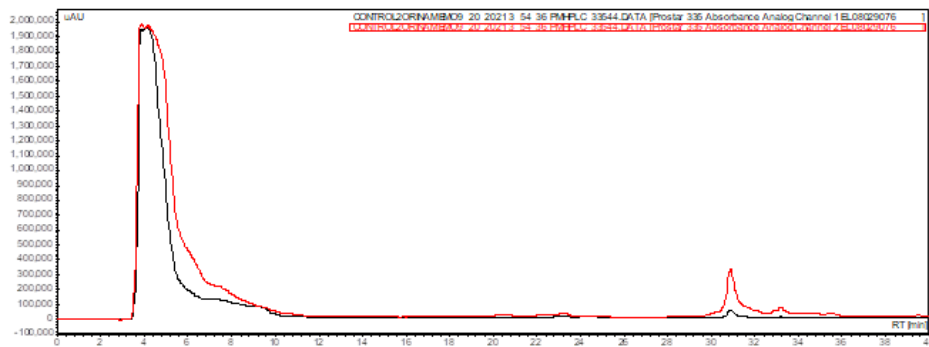
F)



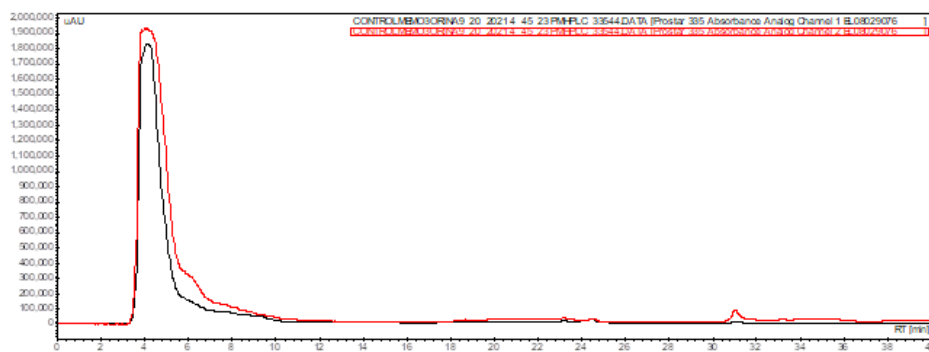
Anexo de la figura 1. Purificación del péptido FA1. Primera purificación del péptido FA1 A-C y la segunda purificación D-E

A2 Incubaciones del péptido FA1 en orina de ratón

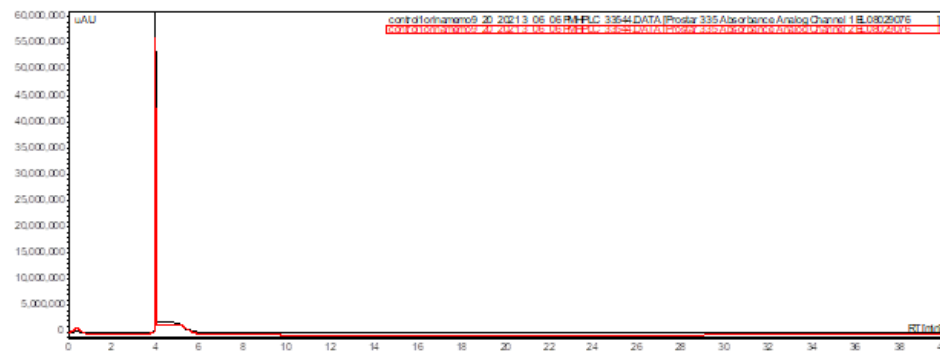
A)



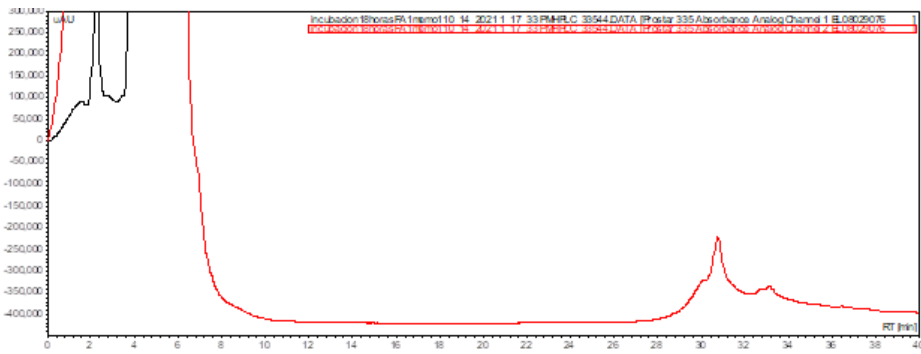
B)



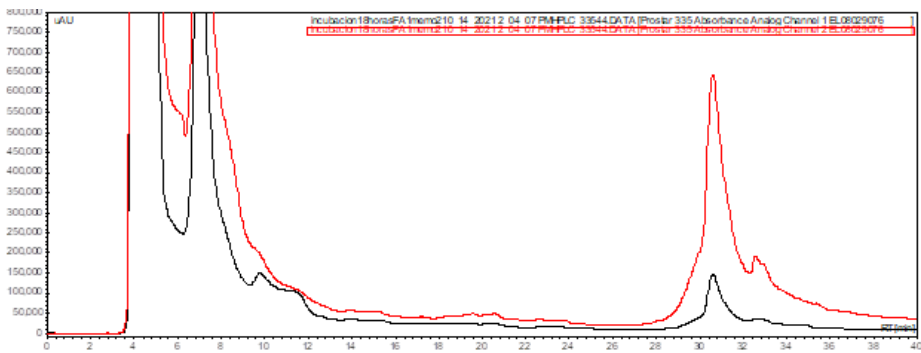
C)



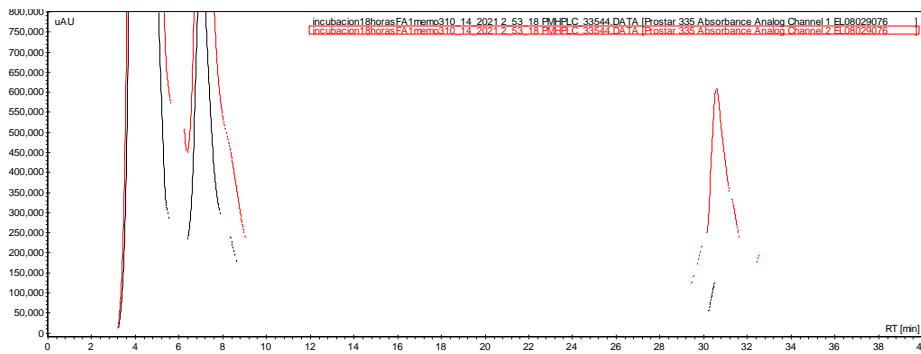
D)



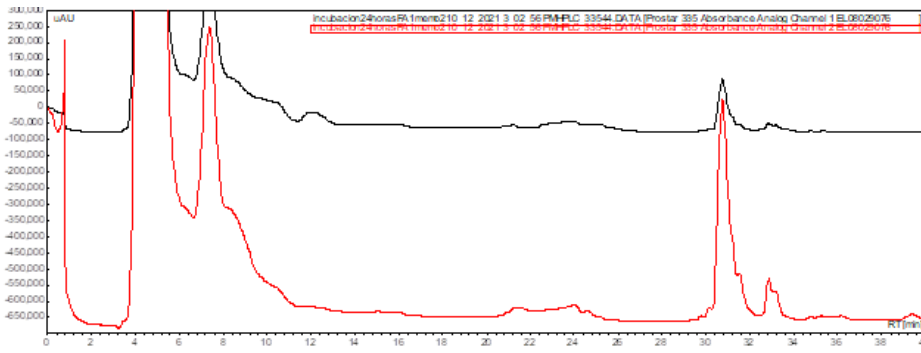
E)



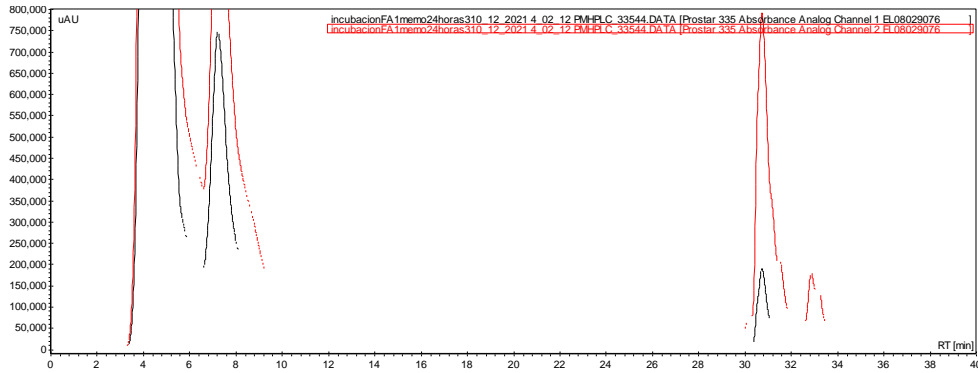
F)



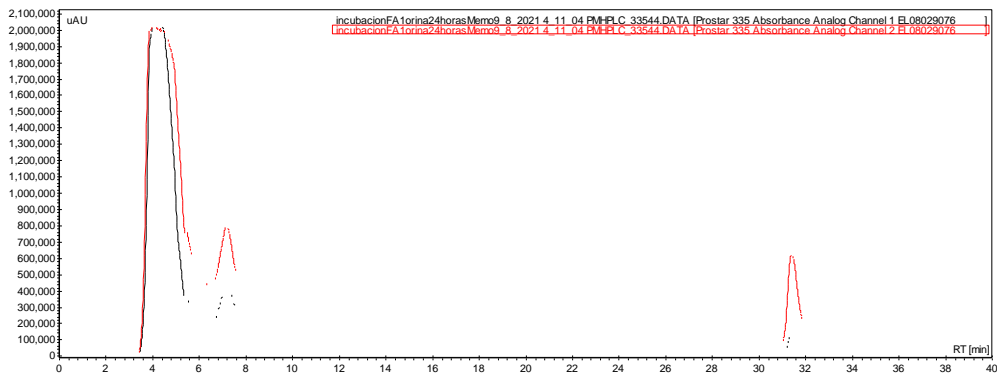
G)



H)



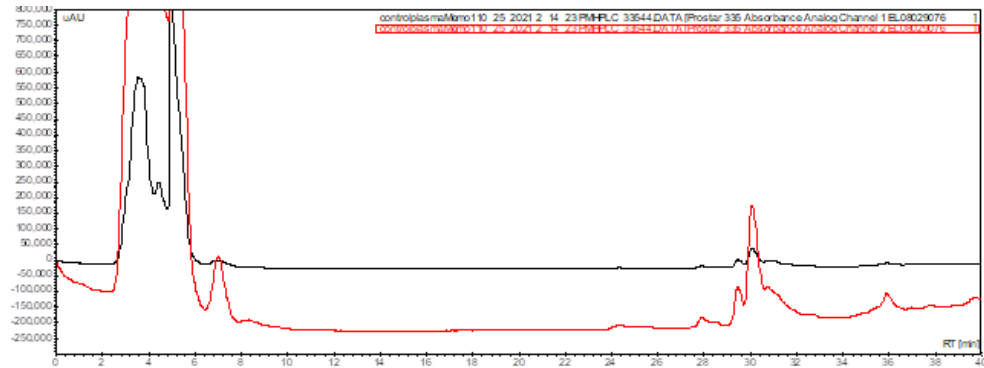
I)



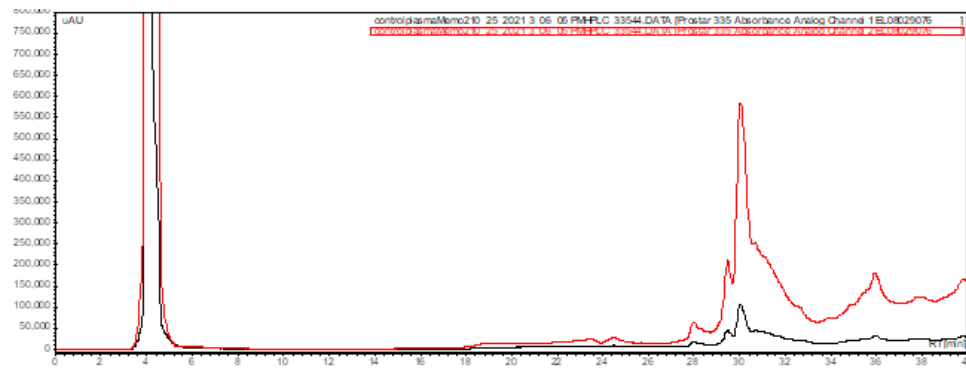
Anexo de la figura 3 Incubación del péptido FA1 en orina de ratón. Comatografía del control de la orina de raton A-C, cromatografía de la incubacion del péptido en un tiempo de 18 horas D-F, cromatografías de la incubación del péptido en un tiempo de 24 horas G-I.

A3 Cromatografías de la incubación del péptido FA1 en plasma de ratón.

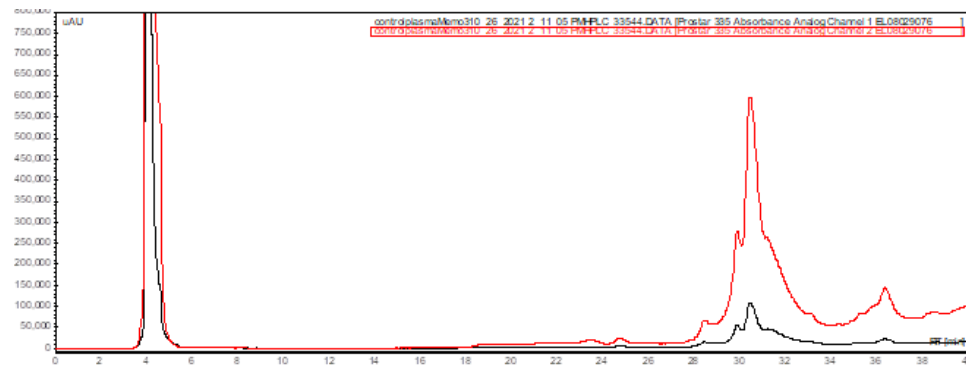
A)



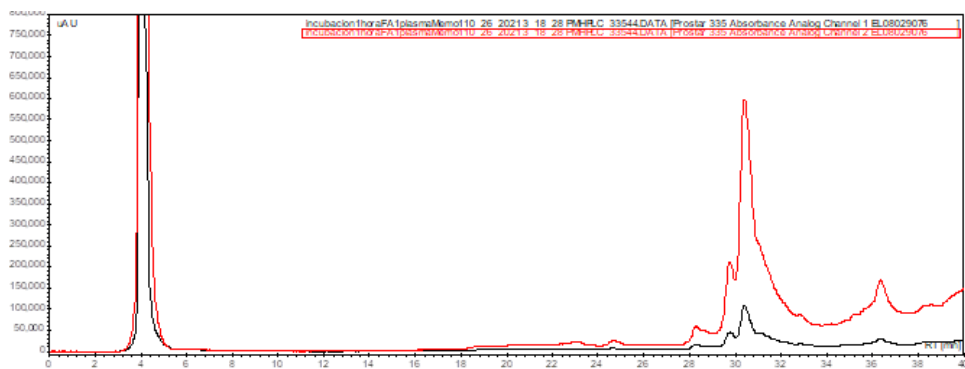
B)



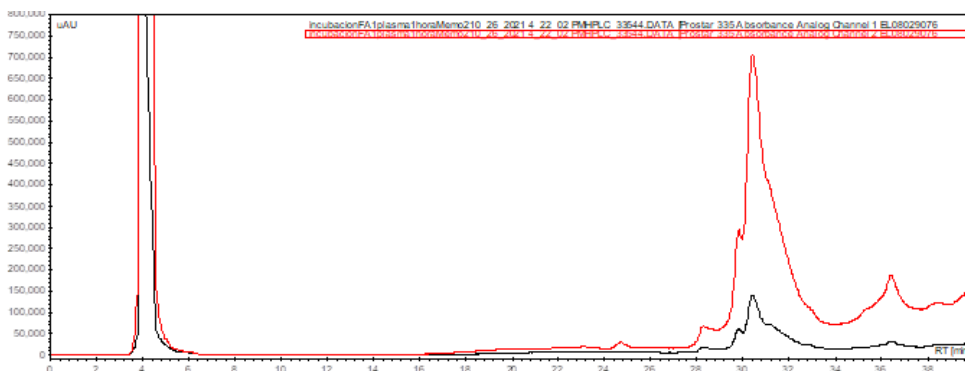
C)



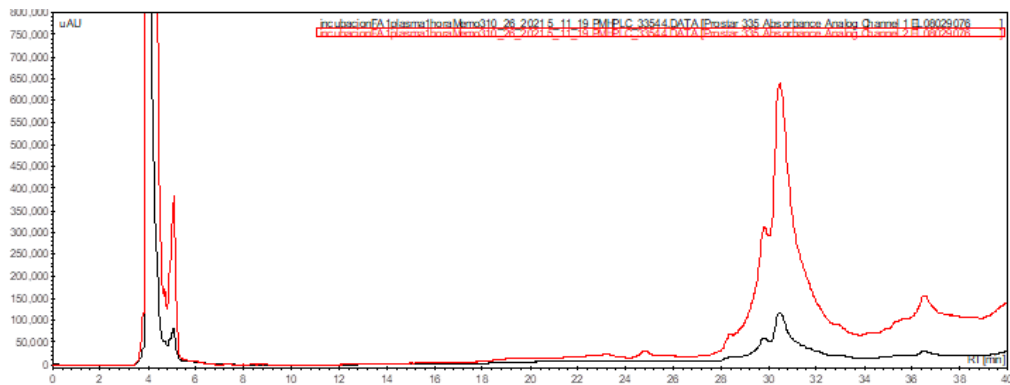
D)



E)



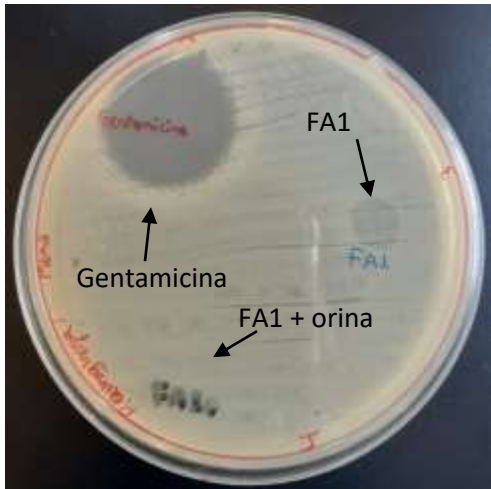
F)



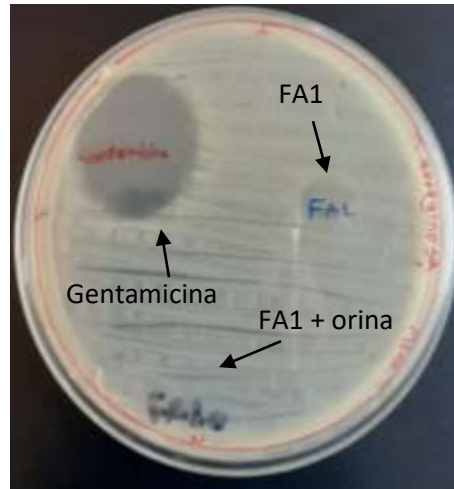
Anexo de la figura 5. Incubación del péptido FA1 en plasma. Cromatografía del control del plasma A-C y la cromatografía de la incubación de 1 hora E-F.

Anexo de los antibiogramas

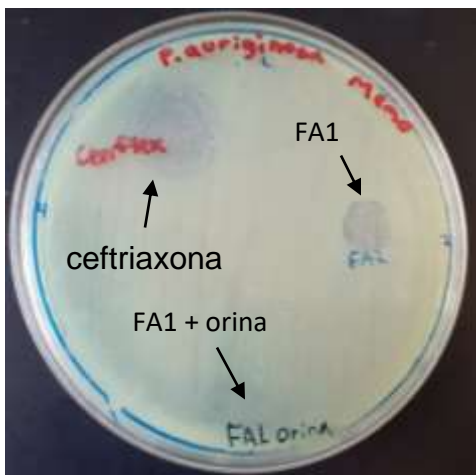
A)



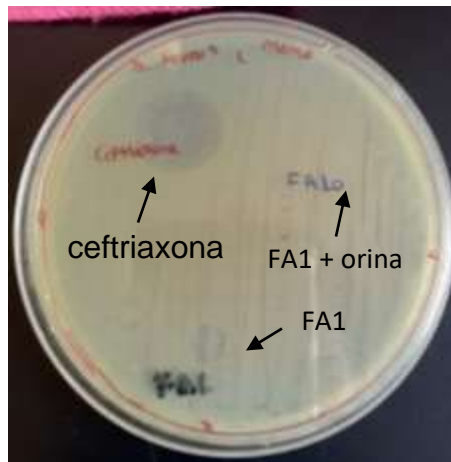
B)



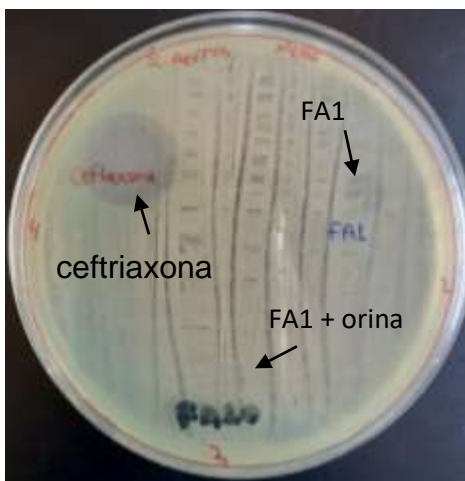
C)



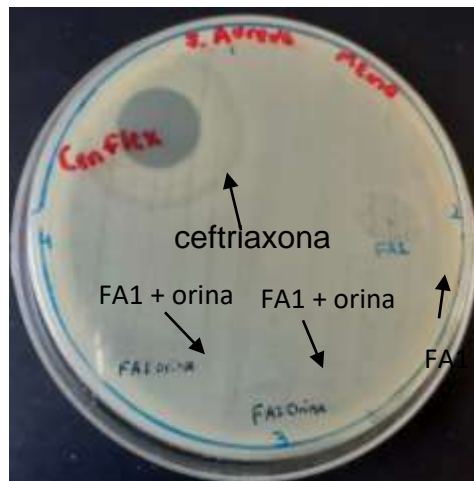
D)



E)



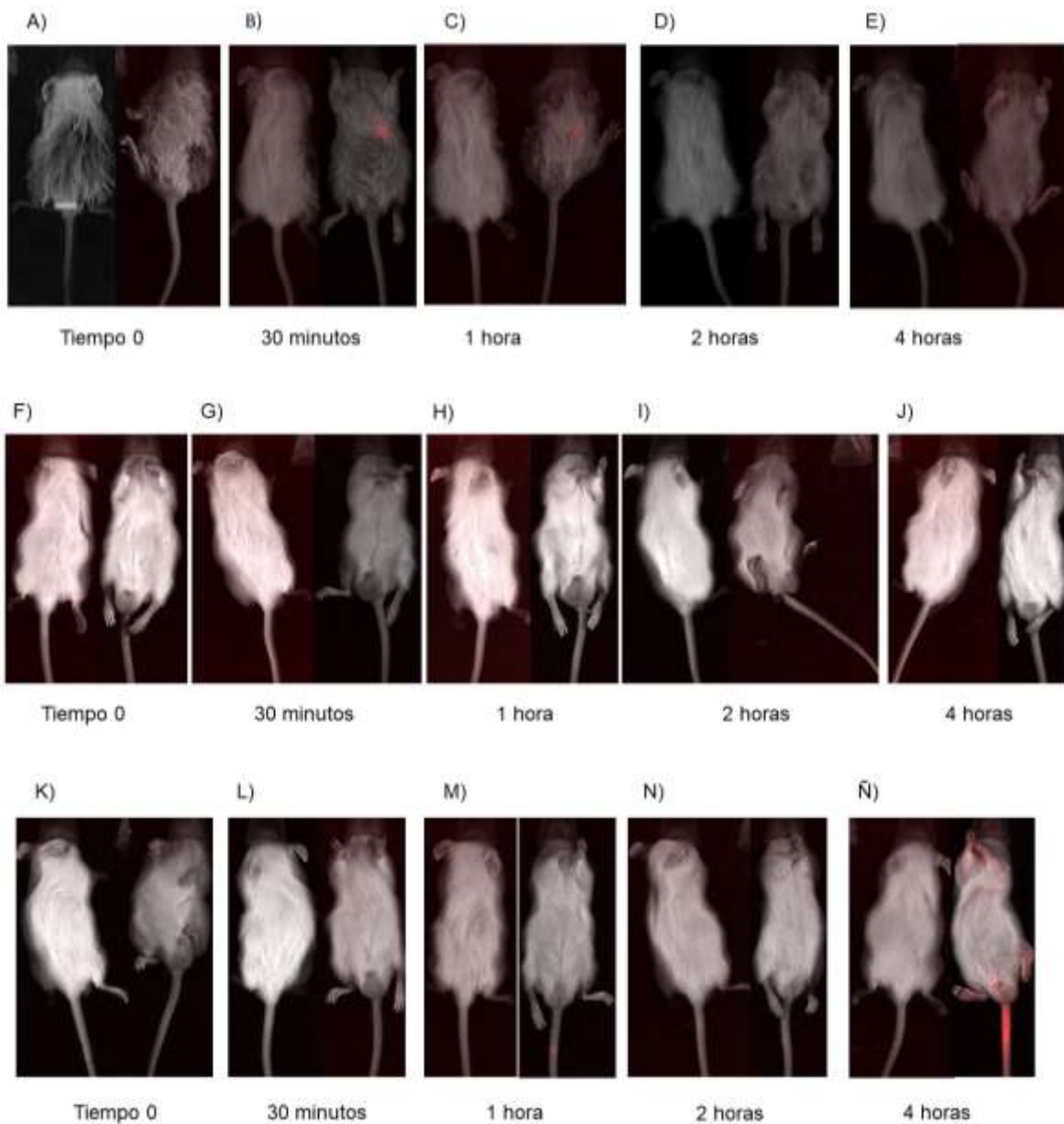
F)



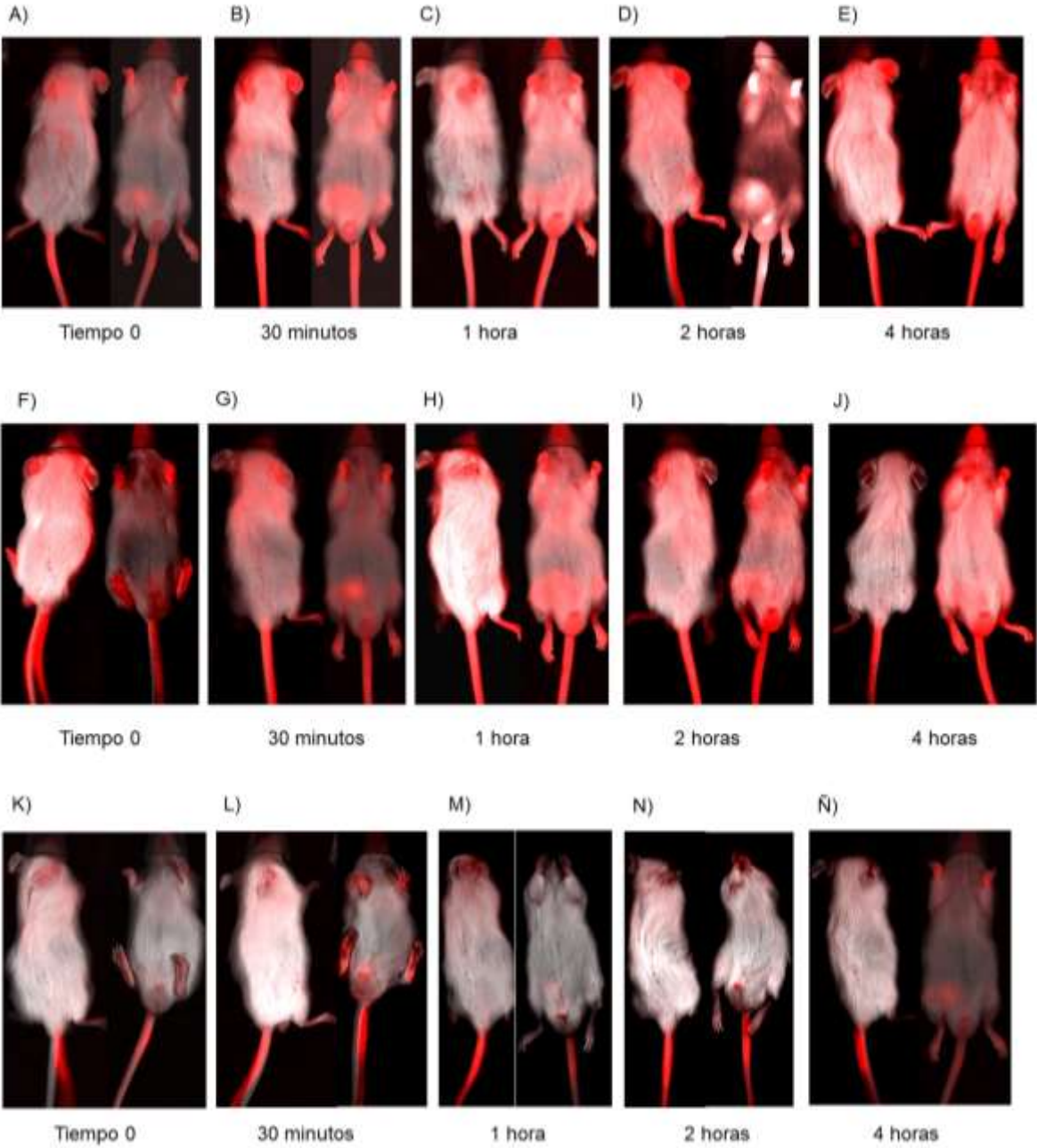
Anexo de la Figura 6. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en medio solido MH.

Se determino si el péptido FA1 incubado en orina de ratón por 24 horas seguía conservando su función antibiótica. Resultado obtenido usando la bacteria A-C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y D-F) *Staphylococcus aureus*. ATCC 25923

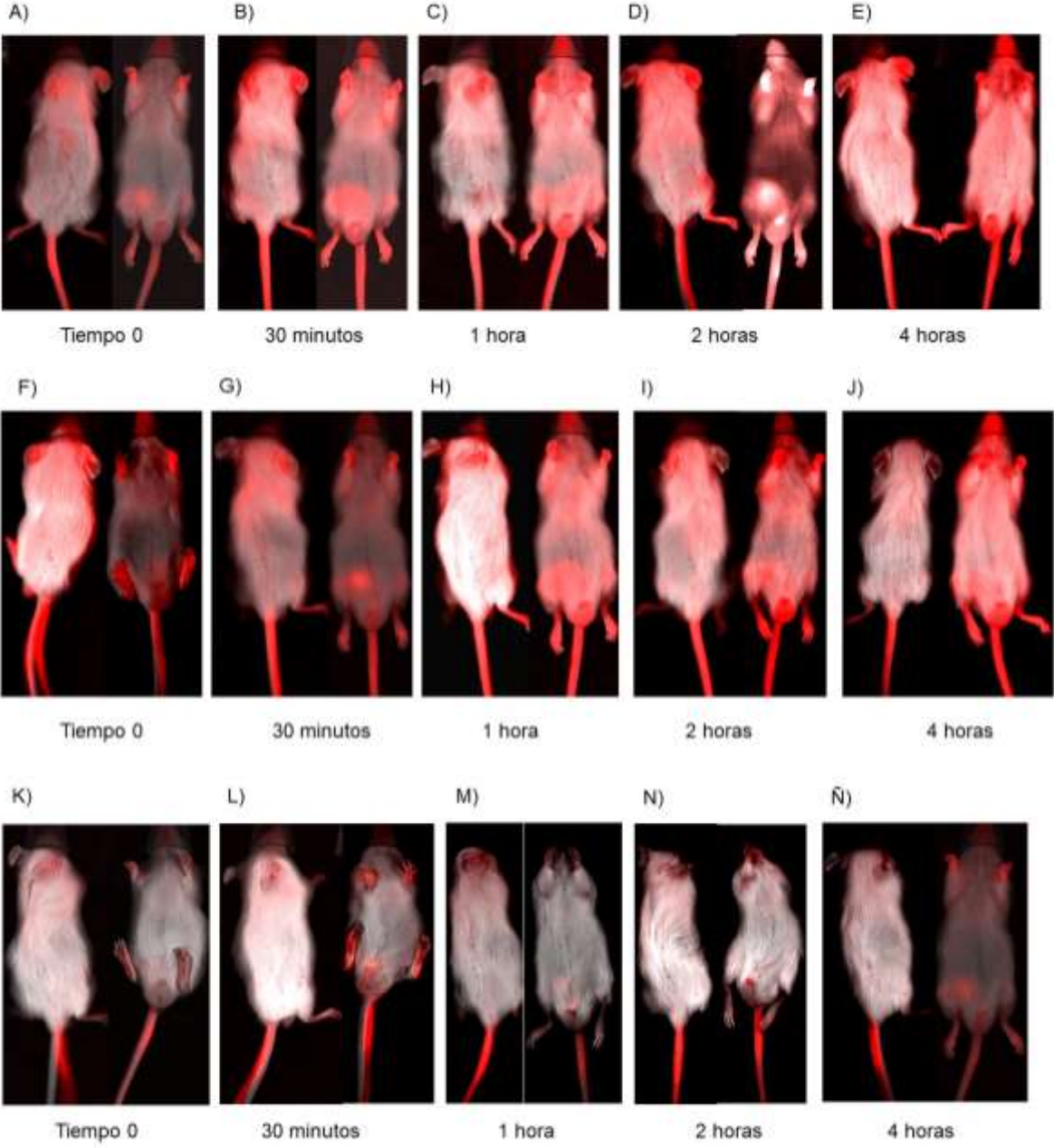
Anexo de la biodistribución de PBS de la Figura8



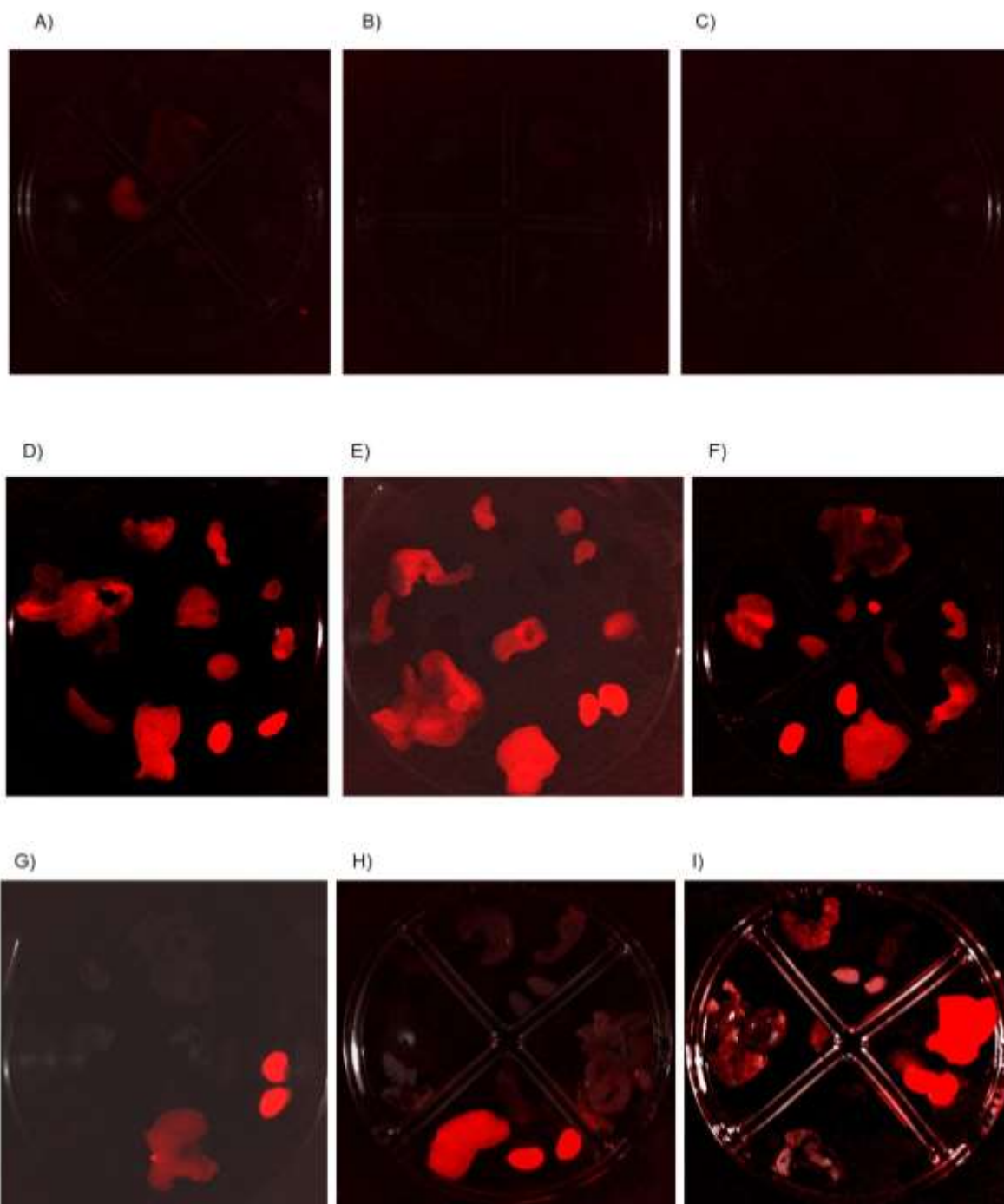
Anexo de la biodistribución de Alexa Flúor 750 de la figura 8



Anexo de la biodistribución del péptido FA1 con Alexa Flúor 750 de la figura 8



Anexo de la biodistribución del péptido FA1 en órganos de ratón



Anexo de la Figura 10. Fluorescencia en los órganos por el péptido FA1 marcado por Alexa Flúor 750. Se obtuvieron los órganos: pulmones, corazón, intestino, hígado, riñones, bazo, páncreas, estómago y testículos. En donde el control de PBS es del A-C, el control de Alexa Flúor es del D- F y del inciso G-H es la concentración del péptido FA1 en los órganos.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaría ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Presente.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **CANO MORALES GUILLERMO ANDRES** con número de matrícula **20164000863** cuyo título es:

“La estabilidad del péptido FA-1 en plasma y orina de ratón”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS CON AREA TERMINAL BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 09 de junio del 2023

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. ANGELICA SANTANA CALDERÓN	(PRESIDENTE)
DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA	(SECRETARIO)
M.C. MARCO ANTONIO IBARRA VALENCIA	(VOCAL)
DR. IVÁN MARTÍNEZ-DUNCKER RAMÍREZ	(SUPLENTE).
DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ	(SUPLENTE).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2023-06-09 10:07:22 | Firmante

oBAZdM6/+eEqiRkQa/UqX6HdeUKQDi4d3q+BzXCjAKfT5YVWAJDyqRPyxUgdOfXWsqbH/PMgNBjRglv6OPsbwv3Kz2BVeJztiMazowWs+nbYdWwsbgoFYG9VdC0EbG9jkwQnZAR6EqZtF7Bm4wkYI+Nq5lN9yb7dzhW6yUYCOTjqFeFvGqerP7VIMxRJ2yG7eVz/e2vePPg4z3z1FmiYcd3O70EhcXAnclUvkPFmV02qtvseUEZjK+I3b+ZEKM4D5WjhHCz+2jiDlPtCcPznm785028lQ+ODudyYmn/YNk2WDNqJ/4uXxyHEl5b9q/4QIG3x+flK/sRI+jGzn2s/bA==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2023-06-10 18:59:55 | Firmante

Fawcv5ihZQYUgPhmbCloYnOG2Wl3bAt/T9F2k/6+50KWPGH2aCIVwRGBfRLoTOr17afwJj1zR7szLINIU6s4vlGxD/MMISeg7D0qnn/Cn48jM4+/85vJ1nvUstQBAGq7RAJL2aSK5teVm8ZJxHL8EquadRbrdeYOAuPRJeEK9gpFX9S25NTio21yLAJAmJcA7j3KsaJ2tonuvZOfQqUgxdovWzrOyWQGfPbOR0icQdQs8qEZf6f6tk0bjksktyAFhhCZJ9p/ulUe0kY+UOyHlsLn5tHzJqVn8250U44HoedMWPpsadH9Q2Zq1PjgrZZsdqXowHhoQ2neHQUNGOMhQ==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2023-06-12 19:20:30 | Firmante

rAF/vzEXc8ZRhUptx/wg9NRXxYVAK7XuhC6Ow6fWDttvZaCghTUadC2SXO+YSGGEHJA37iCSbTBcXmb0UCBMTp6KFbyxMo3Xe/kC4hC3+2TAZ5mopnnoVwCqo0VdRDe5VTZVl4s8FgnGsY0m/Ax7qAJeDZqSU4AKdWflPwZSCgbl9LDs413qWuDCThxikCN3wrSIITUXSPWL4zV4s+DGw9rks3YSPtwXln1GGz7H9V0V1PdvzTi2QYBF0INJ4ZrPyiSmTPN Y63EIP/cCqZjRcBk3VebWlyBsmXzKEpw4+CFKy379xnUksGgSe3qDTV6maCtccRYawo4eE+WiCTw==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2023-06-13 09:23:03 | Firmante

G9HZDX7MjKqKUm2fBkh8cilBwCvgh9uql87jdij2unqeKTEku31GKbX0exkm/rV1DltmVX8TUZ15PGmUIVydYErSkperklvtSppp+O8viq0SaQFYF8Y5RzBmoeUNRA9f5LwpbFXe0gf79dh3YdLpA9gNkFzML9+9PrJUQhfuKDPKtNPFxyV7L/LeV3xmkj5kwKsPQQJGZ1DjvMnO7s4gGRfyhhqmpJ8Vp2da/YefepBtp+clRawzKAPUnnRTgO05dRxc/i7R+oJw1KzUX1rvmBFE+DLbCYlR+sg8qYeOZbabQvyfPcaQZG/MIMLLtJIB7tWdX0hczBd7QeRID1NQ==

MARCO ANTONIO IBARRA VALENCIA | Fecha:2023-06-13 23:52:06 | Firmante

Yp8H1IAy36/YhCYDXj+hrMckDPjoJvFrzwljo+WakeEBkF0e9Z14c0SjEYmqmdJy9/huMqCTJI+bTJ99MttltF+JOGltgXVV0JWDTpL+UVIKIYinzMtbGp/J7xX4o+HCf1ISCPBIXM6OCvSnBdMQsIPRz+QbsNIqIK1cRhBBPuVo4WISD7elLwxWuHZpLUBxa6MgliLNVzjply5JhEifFPhKoHIQJdWAOMIE+JOL375uKzFI6i+GisiW14QZa63H4aAVsIR3VEhDA7lcCvqvNhX24EVSqgeCjvYCVeQ0TYDyEajBPILwmhzi7shE7cF9KpSus6bPunEXRzLntQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



wX7givq6e

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/l3Te49eFfPb0dWo5aSzsmMGXhwrFQXgi>

