



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA BIOTECNOLOGÍA



Obtención de un péptido antimicrobiano autoescindible inducido por inteína
utilizando un sistema de expresión en *Escherichia coli*

Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Kerly Lissette Cordones Chimborazo

Tutor: PhD. Mario Daniel García Solís

AMBATO-ECUADOR

Marzo - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mario Daniel García Solís, PhD.

CERTIFICA

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 11 de febrero de 2023

PhD. Mario Daniel García Solís

C.I. 1103605471

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Kerly Lissette Cordones Chimborazo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Cordones Chimborazo Kerly Lissette

C.I. 1804986600

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe final de Integración Curricular, modalidad proyecto de investigación, mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

PhD. Helena Maritza De La Torre Olvera

C.I. 1309651998

PhD. Tubón Usca Irvin Ricardo

C.I. 0604250357

Ambato, 06 de marzo del 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe final de Integración Curricular o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedemos los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Cordones Chimborazo Kerly Lissette

C.I. 1804986600

AUTORA

DEDICATORIA

A mi madre, mi ejemplo, quien me enseñó a luchar por mis sueños

A mis abuelitos, por su paciencia y amor

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi madre quien fue madre y padre para mí, enseñó a ser perseverante y valiente. Gracias por su paciencia, apoyo y amor, me ayudó en mis momentos más difíciles y celebró junto a mi cada uno de mis logros.

A mi abuelito Isidoro, quien me enseñó la importancia de la vida y lo corta que esta puede llegar a ser.

A mi abuelita Juana, quien con su amor y sabiduría me brinda paz y tranquilidad en mis momentos difíciles.

A los doctores Mario García y Liliana Cerda, gracias por brindarme su guía y sabiduría.

A mi mejor amiga, Sol, que es como mi hermana. Gracias por ser la persona que está al final del túnel, por soportar mis constantes cambios de humor y por ser una gran amiga.

A Diego por su amor, amistad y apoyo incondicional. Gracias por ser la persona con la cual puedo contar todo el tiempo y por los momentos memorables que pasamos juntos y al lado de nuestros amigos.

A mis amigas Mishu, Cami y Vivi, por enseñarme a ser una mejor persona y por las risas compartidas. Muchas gracias seres de luz.

A mis amigos y compañeros de la universidad con quienes inicié y terminé esta etapa tan importante e increíble de mi vida.

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por ser mi segundo hogar estos 5 años de mi vida y formarme para ser una excelente profesional.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS	x
ÍNDICE GENERAL DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.1.1. Resistencia de microorganismos patógenos a compuestos antimicrobianos	1
1.1.2. Péptidos antimicrobianos como una nueva alternativa para el tratamiento contra bacterias patógenas humanos	4
1.1.3. Cecropinas	9
1.1.4. Métodos actuales para la producción de Cecropinas.....	12
1.1.5. Inteína	15
1.2. Objetivos	18
1.2.1. Objetivo general.....	18
1.2.2. Objetivos específicos	18
CAPÍTULO II.....	19
2. METODOLOGÍA	19
El presente proyecto de investigación se llevó a cabo empleando los equipos, instrumentos e insumos de laboratorio, reactivos, y material de escritorio descritos en las Tablas 1 a 5.....	19
2.1.1. Equipos de laboratorio:	19
2.1.2. Instrumentos de laboratorio:	20

2.1.3.	<i>Reactivos de laboratorio:</i>	21
2.1.4.	<i>Insumos de laboratorio:</i>	21
2.1.5.	<i>Materiales de escritorio:</i>	22
2.2.	Métodos	22
2.2.1.	<i>Reconstrucción ancestral del péptido</i>	22
2.2.2.	<i>Construcción de plásmido</i>	24
2.2.3.	<i>Expresión del péptido en Escherichia coli</i>	25
2.2.4.	<i>Purificación del péptido antimicrobiano</i>	28
CAPÍTULO III		29
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1.	Reconstrucción ancestral del péptido	29
3.1.1.	<i>Procesamiento de datos</i>	29
3.1.2.	<i>Árbol filogenético</i>	31
3.1.3.	<i>Reconstrucción ancestral</i>	33
3.2.	Construcción del plásmido	33
3.2.1.	<i>Construcción His_tag_intein_N0</i>	33
3.2.2.	<i>Construcción del plásmido pET-11b_His_tag_intein_N0</i>	34
3.3.	Expresión del péptido en <i>Escherichia coli</i>	35
3.3.1.	<i>Ensayo de expresión del péptido antimicrobiano</i>	35
3.4.	Expresión y purificación del péptido antimicrobiano	37
3.4.1.	<i>Expresión y purificación de la construcción His_tag_intein_N0</i>	37
3.4.2.	<i>Desalting</i>	39
3.4.3.	<i>Ensayos de autoescisión mediada por una inteína</i>	40
3.4.4.	<i>Purificación del péptido CRP_N0</i>	43
CAPÍTULO IV		45
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
4.1.	Conclusiones	45
4.2.	Recomendaciones	45
MATERIAL DE REFERENCIA		1

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de diferentes Cecropinas.....	11
Figura 2.	Mecanismo de acción de la inteína <i>Npu</i> DnaE.....	16
Figura 3.	Alineamiento múltiple de secuencias de diferentes Cecropinas	30
Figura 4.	Árbol filogenético para las Cecropinas	32
Figura 5.	Construcción His_tag_intein_N0.....	34
Figura 6.	Construcción del plásmido pET-11_ His_tag_intein_N0	35
Figura 7.	Ensayo de expresión de la construcción His_tag_intein_N0.....	36
Figura 8.	Purificación de la proteína recombinante His_tag_intein_N0 por cromatografía de afinidad Ni-NTA.....	38
Figura 9.	Cromatograma del desalado del péptido His_tag_Intein_N0 por filtración en gel	39
Figura 10.	Ensayo de autoescisión mediado por inteína a diferente pH y temperatura. 41	
Figura 11.	Purificación de CRP_N0 mediante una columna de afinidad.....	43

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1.	Equipos de laboratorio.	19
Tabla 2.	Instrumentos de laboratorio.	20
Tabla 3.	Reactivos de laboratorio.	21
Tabla 4.	Insumos de laboratorio.....	21
Tabla 5.	Material de escritorio.	22
Tabla 6.	Formulación del medio de cultivo lisogenia, LB.....	26

RESUMEN

Actualmente, la prevalencia de resistencia antimicrobiana representa un gran peligro para la salud pública. Como respuesta ante esta problemática surge la utilización de péptidos antimicrobianos (PAMs), donde se destacan las Cecropinas debido a que presentan actividad contra bacterias Gram negativas y positivas, siendo una buena opción terapéutica contra la resistencia bacteriana. Los principales métodos de producción de las Cecropinas, son la síntesis química y obtención de fuentes naturales. Sin embargo, estos métodos presentan un elevado valor económico, por lo que la expresión mediante proteínas de fusión que enmascaran su actividad es la alternativa más viable. Con estos antecedentes, en el presente estudio se diseñó un péptido (CRP_N0) empleando reconstrucción ancestral. Para conseguir la expresión del péptido CRP_N0 en *Escherichia coli* BL21 pG-Tf2, se construyó una proteína de fusión conformada por una inteína flanqueada por una cola de histidinas y el péptido CRP_N0 en los extremos N- y C- terminal, respectivamente. Esta construcción fue clonada en el vector de pET-11b. Mediante diferentes ensayos de expresión se determinó que las condiciones óptimas se dan al incubar las células a temperatura ambiente, en presencia de 0.4 mM IPTG durante 4 horas. Además, se evaluaron diferentes condiciones de temperatura y pH para inducir la autoescisión de la inteína y liberación del péptido CRP_N0. Se determinó que la escisión total se da al incubar a 25 grados centígrados y pH 10. De esta manera, se consiguió obtener un péptido con potencial actividad antimicrobiana empleando reconstrucción ancestral y un sistema económico de expresión en *E. coli*.

Palabras claves: péptido antimicrobiano, Cecropina, reconstrucción ancestral, proteína de fusión, inteína, autoescisión, cromatografía de afinidad.

ABSTRACT

Nowadays, the antimicrobial resistance prevalence represents a great danger to public health. In response to this problem, the use of antimicrobial peptides (PAMs) arises, where Cecropins stand out because they present activity against Gram-negative and positive bacteria, being a good therapeutic option against bacterial resistance. The main production methods of Cecropins are chemical synthesis and obtaining them from natural sources. However, these methods have a high economic value, so expression through fusion proteins that mask their activity is the most viable alternative. With this background, in the present study a peptide (CRP_N0) was designed using ancestral reconstruction. To achieve the expression of the CRP_N0 peptide in *Escherichia coli* BL21 pG-Tf2, a fusion protein consisting of an intein flanked by a histidine tag and the CRP_N0 peptide at the N- and C-terminus, respectively, was constructed. This construct was cloned into the pET-11b vector. Through different expression assays, it was determined that the optimal conditions occur when the cells are incubated at room temperature, at 0.4 mM IPTG for 4 hours. In addition, different temperature and pH conditions were evaluated to induce intein self-excision and release of the CRP_N0 peptide. It was determined that total cleavage occurs when incubating at 25 degrees Celsius and pH 10. In this way, it was possible to obtain a peptide with potential antimicrobial activity using ancestral reconstruction and an economical expression system in *E. coli*.

Keywords: antimicrobial peptide, cecropins, ancestral reconstruction, fusion protein, intein, self-cleavage, affinity chromatography.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Resistencia de microorganismos patógenos a compuestos antimicrobianos

El rápido aumento de microorganismo patógenos resistentes a compuestos antimicrobianos convencionales está dirigiendo a la población mundial hacia una nueva era en la cual los tratamientos previamente efectivos ya no serán relevantes. Esta perspectiva demanda que se tomen medidas urgentes. Según datos publicados por la **OMS (2014)**, las bacterias que más infecciones causan en hospitales y la comunidad son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* y *Neisseria gonorrhoea*. La mayoría de estas bacterias presentan una alta tasa de resistencia a varios antimicrobianos de primera generación, provocando que las terapias contra infecciones graves sean tratadas con antibióticos de segunda generación, lo cual causa problemas debido a que presentan efectos secundarios más severos y son más costosos, limitando su utilización (**Aslam et al., 2018**).

Las infecciones ocasionadas por *E. coli* y *K. pneumoniae* llaman aún más la atención cuando estas presentan resistencia a carbapenémicos de tercera generación, ya que limitan los tratamientos orales disponibles para las infecciones urinarias que se presentan con mayor frecuencia en la comunidad (**Murray et al., 2022; Larsson & Flach, 2022**).

1.1.1.1. Impacto de microorganismos resistentes y multirresistentes a fármacos para la salud pública

La OMS reporta que cada año ocurren alrededor de 700 000 muertes a nivel mundial causadas por infecciones resistentes a antibióticos. Se estima que para el año 2050 dicha cifra ascenderá a más de 10 millones de muertes por año (**Inoue, 2019**), razón por la cual se ha catalogado a la resistencia antimicrobiana como una de las 3 principales amenazas más importantes para la salud pública (**Poirier et al., 2022**).

Por otro lado, en la mayoría de los casos las infecciones causadas por bacterias multirresistentes generalmente se presentan posterior al tratamiento farmacológico de los pacientes. La CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica), ha reportado que alrededor de 3 millones de personas adquieren infecciones resistentes o multirresistentes después de la toma de antibióticos y que casi 50 000 personas mueren como resultado de estas (**Phillips, 2015**).

En el Ecuador, se ha logrado identificar a varios microorganismos con resistencia antimicrobiana que representan un peligro para la salud pública a nivel nacional. Las principales amenazas encontradas fueron *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, en las cuales se detectó la presencia de varios genes de resistencia a fármacos (**Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2018**). Esto se debe al uso indiscriminado de compuestos antimicrobianos en humanos, animales, plantas y el medio ambiente, promoviendo así el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia. En algunos casos los microorganismos resistentes son difíciles de detectar debido a las debilidades del sistema de salud pública, contribuyendo de esta manera a su prevalencia (**Larsson & Flach, 2022**).

1.1.1.2. Mecanismos de resistencia a compuestos antimicrobianos

Los microorganismos han adquirido diferentes mecanismos moleculares y bioquímicos para responder a amenazas tales como la acción de moléculas antimicrobianas que ponen en peligro su supervivencia. Esto se da debido a que las bacterias se encuentran en constante interacción con microorganismos que producen compuestos antimicrobianos de manera natural, ocasionando mecanismos de resistencia (**Huemer et al., 2020**).

En primer lugar, se encuentran las modificaciones genéticas, las cuales se pueden catalogar en dos diferentes estrategias de adaptación a antimicrobianos (**Brito et al., 2022**). i) La resistencia mutacional que surge en un conjunto de bacterias susceptibles a los antibióticos, las cuales desarrollan mutaciones en diferentes genes, afectando la actividad del compuesto antimicrobiano. Dichas mutaciones pueden provocar modificaciones en la diana antimicrobiana, disminución de la captación del fármaco y/o cambios en rutas metabólicas (**Yamasaki et al., 2022**). ii) La transferencia horizontal de genes, que se da como resultado de la interacción de los microorganismos dentro de su entorno, ocasionando la adquisición de material genético externo, ya sea por transformación, transducción o conjugación (**Lerminiaux & Cameron, 2019**).

En segundo lugar, se tiene a los mecanismos bioquímicos. Las bacterias pueden utilizar diferentes rutas metabólicas para resistir el efecto antimicrobiano. Dichas rutas pueden coexistir en la bacteria y al mismo tiempo inhibir la acción del fármaco. En esta descripción los mecanismos son clasificados en base a la ruta bioquímica involucrada: i) producción de enzimas, las cuales ocasionan modificaciones de la molécula antimicrobiana por la adición de compuestos químicos que destruyen a la molécula antimicrobiana (**Brito et al., 2022**). ii) Barreras de permeabilidad, la membrana bacteriana actúa como primera línea de defensa contra compuestos tóxicos, por ello, producen cambios en la permeabilidad o bombas de flujo para evitar que el antibiótico ingrese a la célula (**Yamasaki et al., 2022**). iii) Alteración del sitio blanco del

antibiótico, las bacterias han desarrollado técnicas como la modificación del sitio diana, ya sea por alteración enzimática y remplazo o derivación del sitio objetivo, evitando que el antibiótico interfiera con el sitio diana, disminuyendo la afinidad del fármaco (**Gabibov et al., 2020**). Por estas razones, varios investigadores se enfocan en la búsqueda de nuevas moléculas para el control de infecciones.

1.1.2. Péptidos antimicrobianos como una nueva alternativa para el tratamiento contra bacterias patógenas humanas

El rápido incremento de bacterias resistentes y multirresistentes ha impulsado la búsqueda de nuevos métodos que ayuden a combatir infecciones. Los péptidos antimicrobianos (PAMs) han captado la atención de la comunidad científica como posibles candidatos para el tratamiento de infecciones, debido a que presentan actividad antimicrobiana, antifúngica y/o antitumoral (**Haney et al., 2017**). Estructuralmente los PAMs son moléculas cortas, de entre 12 a 60 aminoácidos, que forman parte del mecanismo innato de defensa del huésped frente a una infección (**Sierra et al., 2017**).

1.1.2.1. Moléculas naturales de defensa en insectos

La primera línea de protección en los insectos contra patógenos está representada por barreras físicas como la cutícula, la pared intestinal y las tráqueas. En el caso de que los invasores logren pasar a través de dichas barreras, se activan las respuestas del sistema inmune, tales como las respuestas celulares y humorales (**Walker et al., 2021**). En el caso de los insectos, la respuesta celular está mediada por hemocitos, el componente celular de la hemolinfa, encargada de la encapsulación y fagocitosis de patógenos. Por otra parte, los hemocitos y las células del cuerpo graso forman parte de la respuesta humoral en donde se incluye la síntesis de PAMs, y cascadas enzimáticas que regulan la coagulación y mecanización de la hemolinfa (**Sheehan et al., 2020**).

1.1.2.2. Clasificación de los péptidos antimicrobianos

La clasificación de los PAMs de acuerdo con su estructura se divide en tres familias principales: los péptidos lineales α -helicoidales, péptidos globulares de β láminas y una combinación entre hélices α y láminas β (Chia et al., 2023).

Los péptidos lineales α -helicoidales generalmente se localizan en la matriz extracelular de ranas e insectos, en este grupo se encuentran Cecropinas, Mellitina, Maculatinas, Catelicidina, LL-37 (PAM humano), y Magaininas, cuya característica común es que poseen un residuo amino y una hélice α más corta e hidrófoba en el extremo C-terminal (Brady et al., 2019).

Los péptidos globulares de β láminas incluyen Defensinas, Protegrinas, Taquiplesinas, Bactenesinas y Catelicidinas. Se caracterizan por tener residuos de cisteína altamente conservados que forman enlaces disulfuro. En el caso de las Defensinas, el grupo más grande de PAMs, los enlaces disulfuro contribuyen a la estabilidad estructural y disminuyen su degradación por proteasas (Zharkova et al., 2019).

En la tercera clasificación se encuentra la Defensina lucifencina aislada a partir *Lucilia sericata*. Esta proteína presenta una combinación entre hélices α y láminas β , que se encuentran conectadas por dos enlaces disulfuro. Este PAM ha presentado una alta actividad antimicrobiana en estudios *in vitro* (Manniello et al., 2021).

1.1.2.3. Péptidos miméticos

Los péptidos miméticos se pueden definir como compuestos diseñados sintéticamente para imitar las propiedades biológicas de un péptido natural. Son creados a partir de secuencias originales de péptidos, en donde se realizan sustituciones en diferentes

secciones del péptido y pueden ser utilizados como opciones terapéuticas, gracias a su alto potencial y baja toxicidad (**Ochoa et al., 2022**). Para ello, se dan optimizaciones sintéticas de péptidos activos, alteración de la longitud o columna vertebral, modificaciones en las cadenas laterales, hidrofobicidad, carga y antipática (**Andrea et al., 2018**).

En los últimos años se ha logrado desarrollar péptidos miméticos mediante la manipulación del perfil farmacológico de los PAMs, obteniendo un mayor grado de comprensión sobre la relación que existe entre la estructura y la actividad antimicrobiana (**Lee, 2022**). Por ello, se considera a los péptidos miméticos como un gran potencial en la industria farmacéutica.

1.1.2.4. Desarrollo de péptidos antimicrobianos

El desarrollo de PAMs ha llamado la atención debido a la baja probabilidad de resistencia que presentan las bacterias a sus mecanismos de acción, especialmente debido a las limitaciones que tienen los patógenos por preservar la funcionalidad y estructura de la membrana, mientras intenta evitar la actividad disruptiva de los PAMs (**Moretta et al., 2021**). El ataque a múltiples objetivos de baja afinidad, en lugar de atacar a un solo objetivo de alta afinidad (como de los antibióticos actuales), el amplio espectro de acción y los rápidos efectos antimicrobianos con una menor propensión a desarrollar resistencia, ha convertido a los PAMs en candidatos muy prometedores para el tratamiento de enfermedades infecciosas (**Bechinger & Gorr, 2017**).

En la actualidad, grandes esfuerzos se han realizado en torno a la síntesis y creación de nuevos PAMs con la finalidad de satisfacer la necesidad mundial que existe con respecto a nuevos tratamientos contra infecciones causadas por bacterias resistentes. Por ello, varios investigadores se han enfocado en la evaluación *in vitro* de diferentes péptidos con un amplio espectro antibacteriano (**Ziaja et al., 2020**). Por ejemplo, la

gramicidina, un ciclodecapéptido, es utilizada en tratamientos tópicos en casos muy específicos, en los cuales no funcionan los antibióticos (**Kaman et al., 2022**). El LTX-109 es un péptido mimético utilizado para el tratamiento en infecciones cutáneas ocasionadas por bacterias Gram-positivas (**Nilsson et al., 2015**). La polimixina es utilizada en tratamientos oculares y en infecciones gastrointestinales provocadas por bacterias resistentes a antibióticos (**Rigatto et al., 2019**).

1.1.2.5. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos

La capacidad de los péptidos para dirigirse hacia las células bacterianas sin afectar las células eucariotas se basa en los componentes que poseen sus membranas celulares. Por un lado, los compuestos como fosfatidilglicerol, cardiolipina y fosfatidilserina, presentes en la membrana celular de bacterias, le confieren una carga negativa. Por otra parte, las células eucariotas poseen una carga positiva debido a la presencia de fosfolípidos zwitteriónicos (compuestos con carga neutra) y colesterol (**Park et al., 2022**). Los PAMs contienen hasta un 50% de residuos hidrófobos y cuentan con una carga positiva neta, la cual interactúa con las membranas lipofílicas de las células bacterianas cargadas negativamente (**Haney et al., 2017**).

En este contexto, los PAMs son atraídos por cargas electrostáticas hacia las membranas celulares bacterianas, en donde se da una interacción con los residuos hidrófobos del péptido. Los mecanismos más comunes utilizados por los PAMs contra los microorganismos los cuales se describe a continuación:

1.1.2.5.1. Modelo de agregados

El modelo de agregados se basa en la unión de las estructuras α -helicoidales con la membrana externa bacteriana, dando paso a la formación de canales. Los PAMs atraviesan la membrana mediante la formación de complejos supramoleculares

péptido-lípido, responsable de la transportación de PAMs. Estos complejos interactúan con las superficies hidrofóbicas e hidrofílicas dando la formación de canales por donde ingresan iones y péptidos (**Luo & Song, 2021**).

1.1.2.5.2. Modelo toroidal

El modelo toroidal se basa en dos interacciones, la primera en donde la región hidrofóbica de PAM interactúa con el núcleo del lípido y la segunda en donde la región hidrofílica está relacionada con la cabeza de los fosfolípidos, estas interacciones permiten que los PAMs ingresen de manera perpendicular ocasionando que la membrana se curve y se formen poros (**Aisenbrey et al., 2019**).

1.1.2.5.3. Modelos de duela de barril

El modelo de la duela de barril se centra en la unión de las estructuras α -helicoidales con los monómeros para enlazarse con la membrana. La región hidrofóbica del PAM interactúan con el núcleo lipídico, mientras que las zonas hidrofílicas ingresan a la célula. Conforme se unen más monómeros a las estructuras α -helicoidales se incrementa el tamaño del poro (**Bechinger & Gorr, 2017**).

1.1.2.5.4. Modelos de tapete

El modelo de tapete consiste en asociarse a la membrana bacteriana mediante los ejes de los dominios α -helicoidales de forma paralela a la superficie de la bicapa lipídica, adquiriendo una forma de “tapete”, mientras las cadenas laterales no polares del péptido ingresan en el núcleo hidrófobo de la membrana (**Tsai et al., 2022**). Esta estructura tiene la capacidad de expandir la membrana externa, dando paso a la formación de poros, lo cual aumenta la permeabilidad y afecta el equilibrio electrolítico celular, provocando una muerte bacteriana (**Robles et al., 2022**).

1.1.2.5.5. Mecanismo de no penetración de membrana

El mecanismo de no permeación de membrana se diferencia de los anteriores debido a que actúa dentro de la célula. En estos casos se puede dar una inhibición de la síntesis de proteínas de membrana o ADN, rupturas en las cadenas de ADN, síntesis de moléculas que provoquen estrés celular o activación de mecanismos de autodestrucción celular (**Zhang et al., 2022**).

1.1.3. Cecropinas

1.1.3.1. Origen de las Cecropinas

Las Cecropinas forman parte de la familia más abundante de PAMs lineales α -helicoidales en insectos. La primera Cecropina fue aislada a partir de la hemolinfa de *Hyalophora cecropiay* y se caracterizó debido a que presentaba actividad contra bacterias Gram-negativas (**Liu et al., 2022**). En resumen, el proceso de síntesis de este PAM en los insectos comienza con la secreción de una proteína inmadura, que posteriormente pasa por un proceso de proteólisis, en donde se eliminan secciones que no poseen actividad mediante péptido señales, obteniendo así una Cecropina madura con actividad antimicrobiana (**Islam et al., 2022**).

El potencial farmacológico que han mostrado las Cecropinas y péptidos similares en bacterias patógenas ha llamado la atención de varios investigadores. Incluso, en algunos casos han presentado una acción antifúngica como, por ejemplo, la cecropina A con una concentración de 4mg/mL presenta actividad antimicótica contra *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Mucor* sp. (**Zhang et al., 2015**). Otros estudios muestran que la C18, un péptido derivado de la cecropina-4, presenta una actividad antifúngica superior al fluconazol contra *Candida albicans* y *Candida tropicalis* con una MIC de 32 μ g/mL y 8 o 16 μ g/mL, respectivamente (**Sun et al., 2022**).

También se ha demostrado que la cecropina B-LHRH' posee actividad anticancerígena en células de cáncer de ovario. Estudios realizados en conejillos de indiano indican que este PAM inhibió el crecimiento de células cancerígenas con una reducción del 20 y 23% del peso tumoral (Li et al., 2016). Xu et al. (2020), informan que las Cecropinas A y D presentan una actividad anticariógena en células Eca109 y TE13, estas líneas celulares pertenecen a células de cáncer de esófago, en donde se obtuvo una inhibición en el crecimiento de las mismas a una MIC de 40 µg/mL.

1.1.3.2. Estructura

Dependiendo del tipo de cecropinas, tienen diferentes estructuras. En el caso de la cecropina A (Figura 1A), está conformada por dos α -helices conectadas por una región bisagra, que es importante en la expresión de la actividad antimicrobiana (Wang et al., 2018). Este PAM ha demostrado tener una alta actividad antimicrobiana en diferentes cepas de *Acinetobacter baumannii*, con una MIC de 2-8 mg/L (Rodríguez-Hernández et al., 2006). Por otra parte, las cecropinas P1, 4 y la Aedecina (Figuras 1B, 1C y 1D) están conformadas por una α -hélice, las cuales han presentado una alta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. La cecropina 4 posee una MIC contra *S. aureus* de 4 µg/mL (Peng et al., 2021). También Godreuil et al. (2014), reportan que la Aedesina tiene una MIC de 2 µg/mL contra la misma bacteria. Estos resultados muestran que la estructura de las diferentes cecropinas influyen en la actividad antimicrobiana que estas poseen.

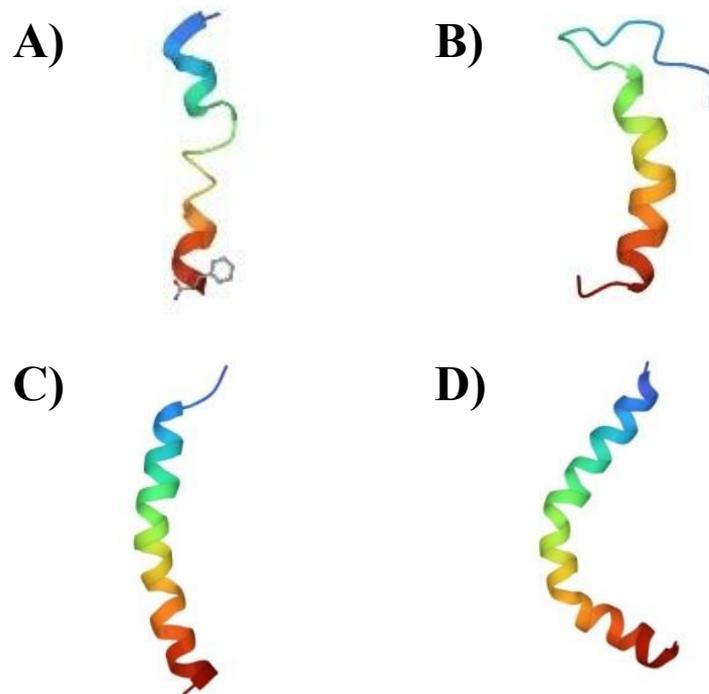


Figura 1. Estructura de diferentes Cecropinas.
A) Cecropina A; **B)** Cecropina P; **C)** Cecropina 4; **D)** Aedesina

Fuente:(RCSB PDB, 2022).

Independientemente de su estructura, las cecropinas utilizan el modelo de tapete mencionada anteriormente para su actividad antimicrobiana (**Blair et al., 2022**). La mayoría tiene un extremo polar y otro apolar, estas características se dan en base a los grupos funcionales que poseen en sus extremos terminales. El extremo N-terminal está cargado positivamente debido a la presencia del grupo amino, convirtiéndolo en un extremo hidrofílico (**Manniello et al., 2021**). Por otro lado, el extremo C-Terminal posee características hidrofóbicas dado la presencia de grupos carboxilos, lo cual le confiere una carga negativa. Esta propiedad permite que el extremo N-terminal interactúe con la superficie de la membrana de células bacterianas, otorgándole una actividad antimicrobiana (**Godreuil et al., 2014**).

1.1.4. Métodos actuales para la producción de Cecropinas

1.1.4.1. Síntesis química

La síntesis química o síntesis en fase sólida de péptidos (FMOC, por sus siglas en inglés) ha permitido el desarrollo significativo de múltiples productos comerciales y farmacéuticos, los cuales han logrado entrar en estudios clínicos (**Kistemaker et al., 2018**). Por ejemplo, las Cecropinas A y D producidas mediante dicho método han mostrado una alta acción antimicrobiana, especialmente en organismos Gram-positivos y negativos (**Muchintala et al., 2020; Zhang, Movahedi, et al., 2015**).

La FMOC se basa en agregar a un soporte polimérico insoluble, conocido como resina, una cadena peptídica nascente mediante una unión covalente, el péptido anclado a la resina se extiende mediante ciclos de adición de aminoácidos, que son completadas con la utilización de reactivos solubles en exceso, que posteriormente son eliminados mediante una filtración o lavado. Al finalizar el proceso de alargamiento, la cadena peptídica es separada del soporte. Generalmente, la síntesis en fase sólida se da en dirección $C \rightarrow N$ y los péptidos son sintetizados como ácidos C-terminales o aminas (**Zhou & Liang, 2021**).

A pesar de la eficiencia y flexibilidad que presentan este método para la síntesis de Cecropinas, no se realiza con frecuencia debido a las limitaciones que presenta. Por ejemplo, las cadenas de secuencias >50 aminoácidos tienen un menor rendimiento y pureza. Además, el costo de la síntesis obstaculiza su desarrollo a nivel industrial. Razón por la cual se han buscado nuevos métodos que logren sintetizar péptidos. En cierta medida, estos problemas se han evitado mediante la obtención de PAMs en sistemas heterólogos (**C. Liu et al., 2021**).

1.1.4.2. Obtención de Cecropinas en sistemas heterólogos

1.1.4.2.1. Producción en células vegetales

Las transformaciones genéticas realizadas en cultivos vegetales o cultivo de tejidos han demostrado un alto grado de integración y herencia de transgenes. En base a ello, la utilización de células vegetales para la producción de PAMs ha demostrado tener ventajas económicas y seguras (**Liu & Timko, 2022**).

Estudios realizados en plantas de arroz, tabaco y tomate han mostrado una alta tasa de acumulación del péptido antimicrobiano, sin representar un efecto nocivo para las células huésped. Sin embargo, varias de estas plataformas de expresión presentan desafíos puesto que tienen un rendimiento relativamente bajo en comparación con otros sistemas de expresión y un elevado costo de purificación (**Hashemi et al., 2022; Montesinos et al., 2016**). Además, las regulaciones con respecto al uso de plantas transgénicas utilizadas para la biología molecular presentan limitaciones, ya que se debe evaluar el riesgo que representan para la salud ambiental y humana (**Clark & Maselko, 2020**).

1.1.4.2.2. Producción en bacterias

La síntesis de PAMs en bacterias representan un alto potencial como sistema de expresión, pero existen diferentes puntos de vista. Por un lado, este método de expresión tiene un bajo costo en comparación de otros, debido a que no requiere de procesos químicos con elevado valor económico, y su producción se puede dar en periodos de tiempo cortos por la alta tasa de replicación que poseen las células bacterianas. Además, estudios demuestran que esta técnica presenta un alto rendimiento en la producción de péptidos, lo cual es atractivo para las industrias.

Por otra parte, a pesar de ser un atractivo sistema de expresión, una de las principales limitaciones que presenta la expresión de PAMs en bacterias es la autodestrucción del huésped por a la acción antimicrobiana del péptido, volviéndolo tóxico para la bacteria. Además, la expresión de genes extraños en células bacterias, puede inducir la formación de moléculas peptídicas desnaturalizadas, que se encuentran empaquetadas en forma de partículas insolubles, conocidas como cuerpos de inclusión (**Rinas et al., 2017**). Estas moléculas carecen de actividad biológica, y para la recuperación del producto requiere de procedimientos elaborados de solubilización, repliegue y purificación, en donde el resultado es una recuperación parcial del producto (**Singhvi et al., 2020**). Una forma de evadir este problema es enmascarar la actividad del PAM mediante su fusión a una proteína no tóxica para la bacteria.

1.1.4.2.3. Producción en Escherichia coli

La alta capacidad de producción y purificación de péptidos a partir de diferentes cepas de *E. coli*, lo ha convertido en un sistema óptimo para la obtención de PAMs. Las características más destacadas son: su alta tasa de crecimiento, métodos recombinantes bien desarrollados para su manipulación y abundante literatura disponible sobre su morfología y fisiología genética, el bajo costo del medio de cultivo y requerimientos que las células de *E. coli*, además del alto rendimiento de expresión (**Cheng et al., 2018**).

1.1.4.2.4. Expresión del péptido como proteína de fusión

Para reducir la toxicidad de los péptidos en las bacterias se han establecido construcciones para que las células sinteticen moléculas que pueden ser utilizadas como etiquetas (tags), unidas a PAMs mediante enlaces peptídicos, conocidas como proteínas de fusión. Estas construcciones permiten inhibir el potencial antimicrobiano de los péptidos, evitando afectar la viabilidad de las células huésped durante la producción de PAMs (**Wang et al., 2018**).

Actualmente, se han desarrollado múltiples sistemas de etiquetas para la expresión de Cecropinas. Entre las proteínas más utilizadas se puede mencionar a la quitina, SUMO, MBP, y unión a proteasas, las cuales mostraron un alto nivel de expresión y purificación de Cecropinas (**Li et al., 2017; Park et al., 2021**). Dentro de estos sistemas ha emergido la expresión del péptido junto con una inteína, que presenta varias ventajas, siendo la principal su capacidad de autoescisión (**Fang et al., 2020**).

1.1.5. *Inteína*

La inteína es una proteína que pertenece a la clase endoproteasas. Tiene la capacidad de empalmarse de manera espontánea con sus extremos N- y C- terminal flanqueantes, para transformarse en una proteína madura y poder escindirse de una secuencia, mediante la escisión de enlaces peptídicos específicos en un proceso conocido como splicing inteínico (**Amaranto et al., 2021**). Cuando contiene una cola de histidinas en su extremo N-terminal, la inteína es utilizada principalmente como una etiqueta de afinidad autoescindida, cuyo objetivo es recuperar la proteína sintetizada en bacterias mediante un sistema de expresión recombinante.

En el año 1988 se descubrió la primera secuencia de inteína en *Saccharomyces cerevisiae*. Investigadores buscaban descifrar porque el gen de la ATPasa vacuolar de este organismo era muy grande (**Shih et al., 1988**). Para ello, se realizaron estudios de análisis de genes en donde se descubrió la ausencia del gen *VMA1* en la ATPasa madura, y se dedujo que una sección interna de la proteína es eliminada mediante empalme de proteínas. También se mostró que un solo gen puede codificar a dos proteínas estables, la proteína huésped denominada exteína y la proteína intermedia a la cual se la nombró como inteína (**Wang et al., 2021**).

1.1.5.1. Mecanismo de acción de la inteína

La inteína generalmente se encuentra inhibida y su actividad proteolítica bloqueada, hasta que se activan las condiciones de corte, cambiando la conformación de la misma y liberado su propiedad de escisión. El mecanismo de escisión de la inteína *Npu* DnaE se da en cuatro pasos, en donde se incluyen remplazos nucleotídicos. Primero, se da un desplazamiento en el grupo acilo (N-S o N-O), donde el primer residuo de la inteína (Cys1), ataca al grupo carbonilo y se forma un éster lineal (tioéster) (Figura 2A). Después, el primer residuo de la C-exteina, que puede ser una cisteína, serina o treonina, interaccionan con el grupo carbonilo provocando así la escisión en el extremo N-terminal de la inteína y forma un compuesto ramificado (Figura 2B). En este punto las exteinas ya se encuentra unidas, pero necesitan ser escindidas del extremo C-terminal de la inteína. Para ello, se produce una transamidación en el último aminoácido de la inteína (Asn) y se realiza una ciclación de la asparagina (Figura 2C). Finalmente, se da un desplazamiento de acilo X-N con las exteinas liberadas, lo cual revierte el tioéster a un enlace peptídico y se forma el producto final (Figura 2D) (Nanda et al., 2020).

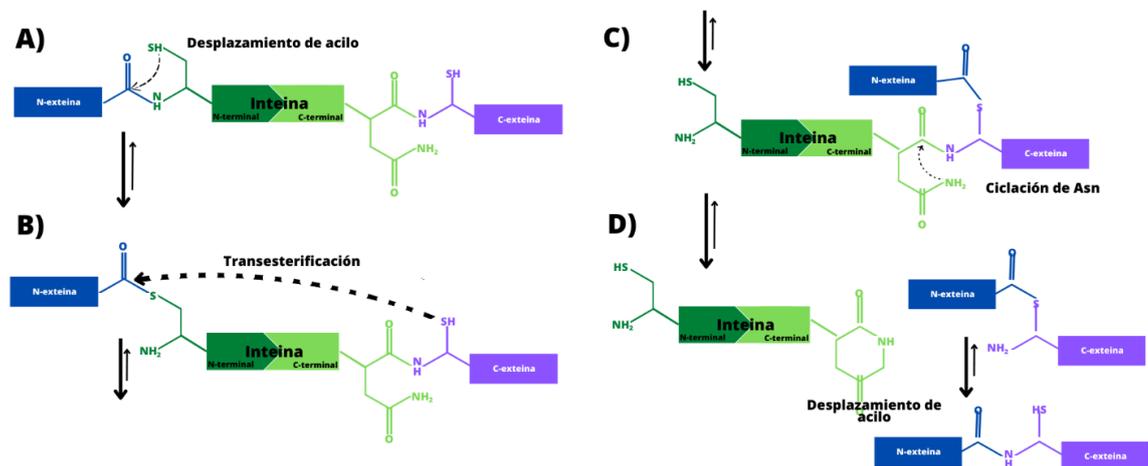


Figura 2. Mecanismo de acción de la inteína *Npu* DnaE

1.1.5.2. Aplicaciones de la inteína en biociencia

Las primeras aplicaciones de la inteína se centraron en etiquetas de afinidad autoescindidas y el etiquetado de proteínas, en las cuales se utilizaron mutaciones para alterar el empalme de los extremos N- y C- terminales. Por ejemplo, las mutaciones para ocasionar la escisión en el extremo C-terminal se dan en el primer residuo de la inteína cisteína (Cys1), la cual generalmente es remplazada por una Alanina o Glicina, para evitar que se dé el corte en el extremo N-terminal. Una mutación realizada en el último residuo del extremo N-terminal (Asn), provoca la escisión en el extremo C-terminal (**Xia et al., 2020**).

Una vez que se logra sintetizar la inteína junto a la proteína de interés, las cuales forman una proteína de fusión, se procede a utilizar métodos de purificación, siendo el más utilizado la cromatografía. Una vez purificada la proteína de fusión, se induce a la inteína para escindirse de la proteína de interés. La principal ventaja que presenta el sistema de expresión y purificación es su capacidad de autoescindirse al variar las condiciones de temperatura, pH y concentración de sales que se encuentra en la solución, facilitando la purificación de la proteína diana (**Pavankumar, 2018**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Obtener un péptido antimicrobiano mediante la expresión de una proteína de fusión utilizando un inteína autoescindible mediante un sistema de expresión en *Escherichia coli*.

1.2.2. Objetivos específicos

Diseñar un péptido antimicrobiano mediante reconstrucción ancestral de secuencias.

Evaluar las condiciones de expresión del péptido antimicrobiano en *Escherichia coli*.

Purificar el péptido antimicrobiano mediante cromatografía líquida de proteínas.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo empleando los equipos, instrumentos e insumos de laboratorio, reactivos, y material de escritorio descritos en las Tablas 1 a 5.

2.1.1. Equipos de laboratorio:

Tabla 1. Equipos de laboratorio.

Detalle	Cantidad
Agitador incubador orbital Shaker mini-Benchmarle	1
Autoclave Hirayma/HV-110	1
Balanza analítica Adventurer Pro/OHAUS	1
Cámara de electroforesis Biorad	1
Cámara de flujo laminar Tipo I OptiMAIRR	1
Centrífuga Hettich	1
Congelador (-2°C)	1
Espectrofotómetro	1
Estufa ESCO/LFA-110-2	1
Incubadora ESCO/Isotherm	1
Nanodrop Thermo Scientific	1
Nevera (4°C)	1
Pipeta de 1-10 mL	1
Pipeta de 200-1000µL	2
Pipeta de 20-200 µL	2

Pipeta de 2-20 μ L	1
Plancha de agitación IK.C-MAG HS7	1
Potenciómetro Metler Toledo/SevenCompact	1
Sonicador Mrc/Sonic	1
Termobloque ThermoScientific	1
Ultracongelador (-80°C)	1
Vortex Labnet/Mixer/VX200	1

2.1.2. *Instrumentos de laboratorio:*

Tabla 2. Instrumentos de laboratorio.

Detalle	Cantidad
Agitadores magnéticos	3
Asas de incubación	3
Botellas de pata azul	4
Cajas Petri	10
Cubetas UV/Vis desechables	5
Gradillas para tubos de microcentrífuga	1
Gradillas para tubos Falcon	3
Mecheros	2
Pisetas	2
Puntas para micropipetas de 20,200 y 1000 μ L	3 cajas
Puntas para pipetas de 10 mL	1 caja
Tubos Epperdorf de 1.5 mL	100
Tubos Falcon de 15mL	50
Tubos Falcon de 50 mL	50

2.1.3. *Reactivos de laboratorio:*

Tabla 3. Reactivos de laboratorio.

Detalle	Cantidad
Acrilamida	100 g
Agar - Agar	50 g
Agua destilada	1 L
Alcohol al 70 – 96%	3 L
Ampicilina	100 mg
Azul de coomassie	100 g
Buffer TRIS 20	100 mL
Cloruro de sodio	500 g
Extracto de levadura	500 g
Glicerol	100 mL
IPTG (isopropil-B-tiogalactopiranosido)	1 g
Marcador de proteína	1 mL
SDS (Dodecilsulfato sódico)	25 g
Triptona	500 g

2.1.4. *Insumos de laboratorio:*

Tabla 4. Insumos de laboratorio.

Detalle	Cantidad
Cinta adhesiva	1
Cinta de autoclave	1
Guastes de nitrilo	1 caja
Mascarillas	1 caja
Papel aluminio	2
Papel film	1
Papel filtro	1
Parafilm	1

2.1.5. Materiales de escritorio:

Tabla 5. Material de escritorio.

Detalle	Cantidad
Calculadora	1
Computadora	1
Cuaderno	1
Esferos	2
Lápices	2
Rotuladores	2
Tijera	1

2.2.Métodos

2.2.1. Reconstrucción ancestral del péptido

La reconstrucción ancestral del péptido antimicrobiano se realizó en 4 etapas: Recopilación de secuencias de Cecropinas de diferentes especies, alineamiento múltiple de secuencias, construcción de un árbol filogenético y reconstrucción ancestral.

2.2.1.1. Recopilación de secuencias

La recopilación de secuencias de Cecropinas se llevó a cabo de forma similar a lo realizado por **Acosta y García (2022)**. Primeramente, se partió de la secuencia de la Aedesina, un péptido antimicrobiano producido por *Aedes aegypti* y cuya secuencia es: “GGLKKLGKKLEGAGKRVFKASEKALPVVVGIIKAIGK”. Esta secuencia fue obtenida de la base de datos Protein Data Bank, con el código 2MMM (**Godreuil et al., 2014**). Posteriormente, con esta secuencia de aminoácidos se analizó la base de datos de UniProt (Universal Protein) mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con el objetivo de encontrar secuencias homólogas mediante alineamiento. Se

seleccionaron secuencias de Cecropinas con un porcentaje de identidad >50%. Las Cecropinas se generan mediante modificación post-traducciona de un péptido inmaduro. Por ello, para identificar la secuencia madura para cada Cecropina se empleó la información desplegada en la sección PTM de Uniprot.

2.2.1.2. Alineamiento múltiple de secuencias

Para el alineamiento múltiple de secuencias, se utilizó la herramienta Clustal Omega (**Sievers & Higgins, 2018**). En síntesis, se cargó las secuencias recopiladas en formato fasta dentro del casillero en blanco que proporciona la herramienta. La configuración para el alineamiento se realizó empleando los valores establecidos por defecto. Una vez finalizado el proceso, se descargó el archivo generado en formato fasta. Se eliminaron los espacios generados en las secuencias durante el alineamiento junto con los extremos, hasta conseguir que todas las secuencias tengan la misma longitud (**Bodén, 2020**).

2.2.1.3. Construcción del árbol filogenético

Para la construcción del árbol filogenético se empleó el programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (**Kumar et al., 2018**). Para ello, se cargaron al programa las secuencias previamente alineadas en formato fasta, y se identificó el modelo de análisis para la construcción del árbol de máxima verosimilitud. Una vez terminado el proceso, se descargó el árbol filogenético el formato Newick.

2.2.1.4. Reconstrucción ancestral

La reconstrucción ancestral se realizó en la plataforma GRASP (Graphical representation of ancestral sequence predictions), este programa ayudó a predecir el

ancestro común para las Cecropinas, mediante la determinación de las mutaciones que pudieron ocurrir en las secuencias lo largo de millones años de evolución.

Una vez obtenido el alineamiento en la Clustal Omega y el árbol filogenético en MEGA X, se cargaron los archivos .fasta y .nwk, respectivamente en la plataforma GRASP. Se seleccionó el modelo evolutivo determinado mediante MEGA para la construcción del árbol (LG), y se dio click en “perform reconstruction”. Posteriormente, se desplegó una ventana con la reconstrucción ancestral, de donde se descargaron los datos del árbol filogenético de los ancestros y sus respectivas secuencias, entre las cuales se encontró la del ancestro común N0, empleado en el presente estudio (CRP_N0).

2.2.2. Construcción de plásmido

2.2.2.1. Optimización de codones

Para la expresión del péptido CRP_N0 en *E. coli* fue necesario inferir el gen que codifica para su secuencia de aminoácidos y realizar una optimización de codones. Para ello se utilizaron los servicios web de la empresa IDT™ (Integrated DNA Technologies). Finalmente, se descargó la secuencia de nucleótidos optimizada en formato fasta.

2.2.2.2. Diseño de plásmido para la expresión del ancestro N0

Estudios han demostrado que los péptidos antimicrobianos son altamente tóxicos, dificultando así su expresión en sistemas de heterólogos como *E. coli*. Para resolver esta problemática diversos estudios han propuesto varios métodos para la biosíntesis de PAMs recombinantes. **Wu et al. (2022)**, han diseñado un sistema de autoescisión

mediado por inteína para proteger las células huésped del efecto tóxico del PAM y facilitar purificación mediante cromatografía de afinidad.

Por ello, en el presente estudio se siguió una metodología similar, la cual incluye la construcción de una proteína recombinante conformada por una cola de histidinas, seguida de la inteína fusionada a la secuencia del ancestro N0. Esta construcción se insertó entre los sitios de restricción *Nde I* y *BamH I* del plásmido pET-11b. El plásmido pET-11b tiene una resistencia a la ampicilina y un sistema de inducción de expresión de la proteína recombinante controlada por el represor del operón *lac*. El plásmido obtenido se denominó pET-11b-PAM.

La elaboración del plásmido para la expresión del ancestro CRP_N0 se realizó por la empresa Gene Universal.

2.2.3. *Expresión del péptido en Escherichia coli*

2.2.3.1. *Transformación bacteriana*

2.2.3.1.1. *Transformación de células competentes de E. coli BL21 pG-Tf2*

La transformación del vector de expresión en *E. coli* BL21 pG-Tf2 se realizó mediante choque térmico según la metodología descrita por **Cohen et al., (1972)**. En resumen, se tomó una alícuota 100 µL de un stock de células químicamente competentes de *E. coli* BL21 pG-Tf2 almacenadas a -80 °C y se las descongeló durante 30 minutos en un baño con hielo. A continuación, se añadió 100 ng de la construcción pET-11b-PAM y se incubó durante 30 minutos en hielo. Después, se llevó a las células a un baño termostático a 42 °C por 90 segundos para inducir el choque térmico y se las colocó en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se añadió 900 µL de caldo LB (Tabla 6) y se incubó a 37 °C durante 1 hora en agitación constante (200 rpm). Finalmente, se

inoculó 50 y 200 μL de este cultivo en agar LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó toda la noche a 37 °C.

Tabla 6. Formulación del medio de cultivo lisogenia, LB.

Reactivo	Cantidad (g/L)
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	10
Triptona	10
Agar	20

Fuente: (Agilent Technologies, 2015).

2.2.3.1.2. Ensayo de expresión del péptido antimicrobiano en *E. coli* BL21 pG-Tf2

El ensayo de expresión se realizó según la metodología propuesta por **Fang et al. (2019)**. Primero, se realizó un pre-cultivo, para lo cual se inoculó una colonia de *E. coli* BL21 pG-Tf2 transformada en 60 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a 37 °C durante toda la noche a una velocidad de agitación de 200 rpm. A continuación, se tomó 5 mL del precultivo, se inoculó en 45 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a 37 °C hasta llegar a una DO_{600} de 0,6-0,8. Este procedimiento se realizó en 6 matraces. Para definir el tiempo óptimo de expresión del péptido antimicrobiano, en 3 matraces se añadió Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.4 mM. Los matraces se incubaron durante 4, 8 y 24 horas, respectivamente. Similarmente, los 3 matraces restantes se incubaron en los mismos intervalos de tiempo, pero en ausencia de IPTG. Finalmente se recolectaron las células mediante centrifugación a 3910 rfc por 20 minutos. La expresión de la proteína recombinante fue analizada mediante

electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) siguiendo la metodología descrita (**Matsumoto et al., 2019**).

2.2.3.1.3. Expresión del péptido antimicrobiano

La expresión del péptido antimicrobiano se realizó en base a las metodologías anteriormente propuesta (**Fang et al., 2019; Thomas et al., 2020**). Inicialmente, se tomó una colonia aislada de *E. coli* BL21 pG-Tf2 transformada, se inoculó en 50 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37 °C durante 16 horas en agitación constante (200 rpm). Después, se tomó todo el precultivo, se inoculó en 1 L de medio LB con ampicilina y se incubó a 37 °C a una velocidad de agitación de 200 rpm hasta que se obtuvo una DO₆₀₀ de 1,3. Posteriormente, se añadió IPTG (0.4 mM), con la finalidad de inducir la expresión de la proteína recombinante, y se incubó 4 h a temperatura ambiente. Las células fueron colectadas por centrifugación a 3910 rfc durante 20 minutos a 4°C. Finalmente, se almacenaron las células a -20 °C.

2.2.3.2.Lisis celular

La lisis celular se realizó con base a lo descrito por **Wu et al. (2022)** con ciertas modificaciones. Para ello, cada gramo de células se resuspendió en 6 mL de buffer de lisis (Fosfato de sodio 20 mM, imidazol 40mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, Triton X-100 0,5%, pH 8,5). Posteriormente, se realizaron 10 ciclos de 10 segundos de sonicación constante con pausas de 10 segundos. Finalmente, se centrifugó el extracto celular a 21130 rfc por 1 h y a 4 °C.

2.2.4. Purificación del péptido antimicrobiano

2.2.4.1. Purificación de la proteína recombinante

La purificación se dio mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA (**Park et al., 2021; Ramos et al., 2021**) empleando un sistema FPLC ÄKTA Start (Cytiva). Primero, se lavó la columna con tampón de equilibrio (Fosfato de sodio 20 mM, Imidazol 40 mM, NaCl 150 mM, pH 8,5). Este buffer también se utilizó para cargar la muestra y lavar las proteínas de la columna. Posteriormente, se realizó la elución del péptido con buffer de elución (Fosfato de sodio 20 mM, Imidazol 400 mM, NaCl 150 mM, pH 8,5). La proteína se colectó en fracciones de 1 mL. Las fracciones que contuvieron la proteína de interés se cargaron a una columna PD-10 para eliminar las sales presentes. Para ello, se equilibró la columna con tampón fosfato 20mM pH 7. Luego, se cargaron 2 mL de la proteína de fusión y se añadió 0,5 mL del tampón en base a lo descrito por el fabricante (**Cytiva, 2021**). Finalmente se realizó la elución de la muestra con el mismo buffer. Las muestras fueron colectadas en alícuotas de 1mL, analizadas por nanodrop y almacenadas a -80 °C. La pureza de la proteína de fusión fue analizada mediante SDS-PAGE.

2.2.4.2. Ensayo de autoescisión inducida por inteína

Para el ensayo de autoescisión inducida por inteína se analizaron diferentes condiciones de pH y temperatura. Se prepararon diferentes soluciones tampón fosfato 20 mM en un rango de pH 5-10, con intervalos de 1. Las muestras fueron sometidas a 25, 35 y 45 °C, a los diferentes pH durante 72 h de acuerdo a lo descrito anteriormente (**Zhang et al., 2020**). Los resultados de la autoescisión fueron analizados mediante SDS-PAGE.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Reconstrucción ancestral del péptido

3.1.1. *Procesamiento de datos*

A partir del BLAST realizado en UnirProt empleando la secuencia de aminoácidos de la Aedesina, se obtuvieron 41 secuencias de Cecropinas que presentaron un porcentaje de identidad de secuencia superior al 50%. En la figura 3 se puede observar el alineamiento múltiple de las 41 secuencias de Cecropinas construido en Clustal Omega luego de eliminar los espacios y aminoácidos no alineados en los extremos N- y C-terminal. Esto permitió que todas las secuencias identificadas mediante BLAST presenten la misma longitud. El alineamiento múltiple de secuencias permitió identificar 3 residuos altamente conservados en todas Cecropinas (Lys, Gly y Pro). Además, se puede observar que las secuencias son ricas en residuos cargados positivamente (Lys y Arg) y residuos hidrofóbicos (Ala, Gly, Phe, Pro, Leu y Val). De acuerdo a la literatura, estos aminoácidos son responsables del efecto antimicrobiano de las Cecropinas. Según **Godreuil et al. (2014)**, la Lys forma una α hélice regular en la parte N-terminal del péptido, aumentando su capacidad inhibitoria contra bacterias. La secuencia de cada Cecropina está estrechamente relacionada a su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, la Cecropina AD presenta un bajo nivel de actividad antimicrobiana en comparación a la Cecropina A (**Chen et al., 2009; Zhang et al., 2020**).

>A0A6E8P802	GLKLLKLEGGAGKRVFKASEKALPVVVGIKA	31
>A0A6E8P7Y8	GLKLLKLEGGVGRVFKASEKALPVVTGYKA	31
>A0A6E8P7Z7	GLKLLKLEGGVGRVFKASEKALPVIITGYKA	31
>A0A6E8PGI8	GLKLLKLEGGAGKRVFNAAEKALPVVAGAKA	31
>B0WWG8	GLKFKKLEGGVGRVFKASEKALPVVTGFKA	31
>B0WWH0	GLKFKRLEERVGKHVFEATAKALPVVAGINA	31
>B0WWG9	PRWLLKLEKVGKRVFKAAQKALPVVAGFKA	31
>P82592	GLKLLKLEGGAGKRVFNAAEKALPVVAGAKA	31
>Q86PR6	GLKFKKLEGGVGRVFKASEKALPVVTGFKA	31
>P82290	RLKLLKLEGGAGKRVFKAAEKALPVVAGVKA	31
>W5JK17	FLKLLKLEGGAGKRVFNAAEKALPVAAGVKA	31
>A0A6P7FKX0	FWRKFKKLEKVGQNVKAAEKTLPVQGYAG	31
>P81417	GLKLLKLEGGVGRVFKASEKALPVAAGVKA	31
>Q963B0	GLKFKKLEGGVGRVFKASEKALPVAAGVKA	31
>Q17NR4	PRWFKKLEKVGKRVFNAAEKALPVAAGYKA	31
>Q5TWE5	HLKFKKLEKVGKRVFHAKEKVPVVLQGIQD	31
>A0A084VVD5	CFKRRRLGRAGRRITAKAVQKVPVAVGAVRA	31
>B6DDX7	RFRKFKKVEGAGRRITNAAQKGLPVAAGVKG	31
>Q8MUF4	PRWFKRLEKLGKRVFNAAEKALPVIAGYKA	31
>Q9Y0Y0	GLKLLKLEGGVGRVFKASEKALPVLTYGYKA	31
>Q86PR5	RLKLLKLEKAGKRVFNAAQKGLPVAAGVQA	31
>A0A7F5RDD2	RWKGFKKLEKAGKRVFKAAEKGLPVAAGVYAA	31
>A0A1W4XF49	KWGWKKLEKGGKRVFKAAEKGLPVIAGYKG	31
>B6DE19	KWGWKKLEKGGKRVFKAAEKGLPVIAGYKG	31
>A0A7F5RDE2	RWKGFKKLEKAGKRVFKAAEKGLPVAAGVQA	31
>Q86PR4	RSKLLKLEKAGKRVFNAAQKGLPVAAGVQA	31
>Q963A9	GLKLLKLEGGVGRVFKASEKALPVLTYGYKA	31
>Q8MUF3	RFKFKKVEGAGRRVANAAQKGLPVAAGVKG	31
>Q9Y0X9	GLKLLKLEGGAGKRVFNAAEKALPVAAGAKA	31
>Q963A8	GLKLLKLEGGAGKRVFNAAEKALPVAAGAKA	31
>B0WDY4	RLKLLKLEKAGKRVFNAAQKGLPVAAGVQA	31
>A0A226YGV8	GLKFKKLEGGVGRVFKASEKALPVAAGVKA	31
>A0A084VNU3	RLKLLKLEGGVGRVFKAAEKALPVAAGVKA	31
>A0A7J6YWZ6	KWRGWKKLEKVGKKAFFEEAEKALPVAAGYAG	31
>A0A7J6ZHD9	KWGWKKLEKAGKRVFNAAEKALPVAAGYAG	31
>A0A182XY86	PRWFKRLEKLGKRVFNAAEKALPVAAGYKA	31
>A0A084VVE2	RRWRLRLELGLQNLFRAAQKALPVIAGYKA	31
>A0A182YNK7	HLKFKKLEKIGKRVFHAKEKVPVVLAVGVD	31
>A0A182GLT4	KLKLLKLEKVGKRVFHAKEKVPVVLAVGVD	31
>A0A182H9J7	KLKLLKLEKVGKRVFHAKEKVPVVLAVGVD	31
>A0A0N1IQG2	PKWKIKKLEKVGKRVFHAKEKVPVVLAVGVD	31
	::: *:. * *	

Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias de diferentes Cecropinas

* = residuos totalmente conservados; : = altamente conservados; . = residuos conservados.

El extremo N-terminal de las Cecropinas (Figura 3) presenta una fuerte carga catiónica, debido al alto porcentaje de residuos de Lys, lo cual ha demostrado que favorece a la actividad antimicrobiana de las Cecropinas A, B y B2 (Fang et al., 2019; Park et al., 2021; Wang et al., 2018).

La mayoría de Cecropinas maduras tienen un residuo triptófano entre sus primeras posiciones, considerado importante ya que influye en la actividad antimicrobiana del péptido. Según Choi et al. (2021), dado que las Cecropinas no tienen receptores específicos, la presencia de triptófano y fenilalanina en la región N-terminal son

importantes para que el péptido completo interactúe con los lipopolisacáridos cargados negativamente en la membrana externa y forme poros en la membrana interna de las bacterias Gram-negativas.

3.1.2. *Árbol filogenético*

En la figura 4, se puede observar el árbol filogenético obtenido a partir de las 41 secuencias seleccionadas mediante el programa MEGA X empleando el modelo LG+G, con una distribución Gamma = 3. De manera general, se pudo observar que las secuencias están distribuidas en 34 clados. La primera división está conformada por dos clados, en donde se observa que la mayoría de las secuencias forman parte del clado 1, en esta se encuentra el péptido con el cual partió la búsqueda de secuencias. Los valores de soporte de la mayoría de clados son bajos, lo cual sugiere que los péptidos pueden tener diferencias estructurales entre sí, debido a que la mayoría de ellos son aislados a partir de diferentes organismos.

Además, se puede evidenciar que la mayoría de clados tienen un ramal con una longitud corta, en comparación con las de los taxones A0A084VVD5 y A0A0N1IQG2 perteneciente al clado 1 y 2, respectivamente. En base a lo descrito por **Kapli et al. (2021)**, los ramales más largos, señalan que las secuencias correspondientes tienen una relación evolutiva más lejana que el resto de las secuencias.

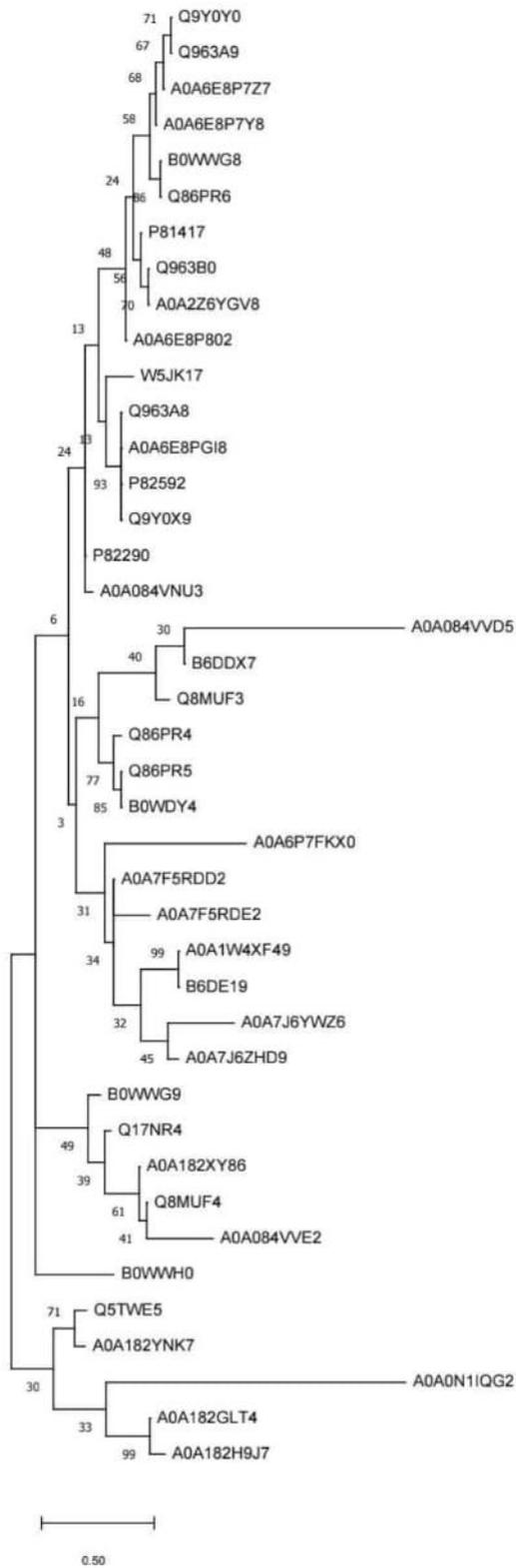


Figura 4. Árbol filogenético para las Cecropinas

3.1.3. *Reconstrucción ancestral*

La reconstrucción ancestral dio como resultado 38 nodos que parten del ancestro común N0, al cual se lo denominó CRP_N0. Esta técnica permitió conocer la secuencia de la cual teóricamente evolucionaron la variedad de Cecropinas que se conocen hasta la actualidad, gracias a una extrapolación en el tiempo de las características de las secuencias (**Arenas, 2022**). Mediante dicha técnica se pretendió recuperar las características ancestrales de la molécula que existió hace millones de años. Las reconstrucciones ancestrales han ayudado probar hipótesis sobre la evolución de la función molecular de diferentes proteínas, identificando ancestros con mayores actividades moleculares que sus descendientes (**Aadland et al., 2019; Bailleul et al., 2021**).

3.2. **Construcción del plásmido**

3.2.1. *Construcción His_tag_intein_N0*

Para la construcción de la proteína de fusión His_tag_inteína_N0 primero se seleccionó la inteína *Npu* DnaE, a la cual se le realizó una mutación al inicio de la secuencia (Cys1 – Ala) con la finalidad de impedir la escisión de la cola de histidinas en el extremo N-terminal. La autoescisión de la inteína, se da de acuerdo a las condiciones de variación de temperatura, pH y concentración de sales en la solución, y la eficiencia del corte depende de los mismo, ayudando a controlar su proceso de autoescisión durante el presente estudio (**Lee, 2022**).

En la figura 5 se puede observar la construcción His_tag_intein_N0, realizada con la finalidad de purificar el péptido antimicrobiano mediante cromatografía líquida de afinidad con la adicción de la cola de histidinas en el extremo N-terminal de la inteína. Esta adición permite que dicha cola adhiera al níquel presente en la columna de afinidad, permitiendo que la muestra se separe de los compuestos que no interaccionan con el níquel. Posteriormente, se añadió el péptido CRP_N0 al extremo C-terminal de

la inteína, para lo cual se tuvieron en cuenta los parámetros recomendados por **Lee & Sue, (2019)**, donde se recomienda que el primer residuo de la proteína diana no debe ser una Cys, Ser o Thr, puesto que puede desfavorecer al punto de corte C-terminal de la inteína.

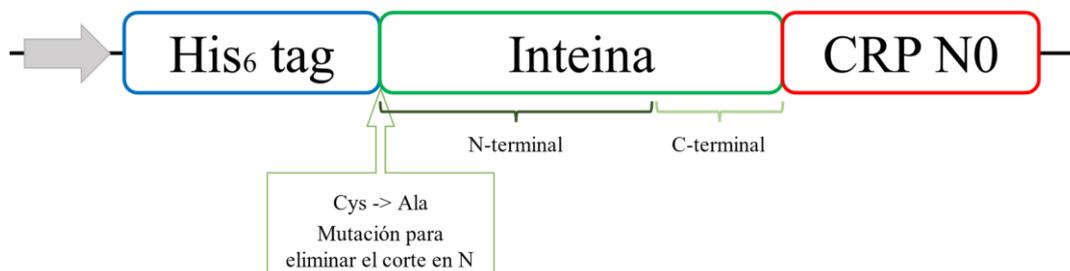


Figura 5. Construcción His_tag_intein_N0

3.2.2. Construcción del plásmido pET-11b_His_tag_intein_N0

La figura 6 muestra la construcción del plásmido pET-11b_His_tag_intein_N0. Durante la construcción del plásmido se añadió un condón de paro en el extremo C-terminal del ancestro N0, debido a que el sitio de corte necesario para que actúe *BamHI* no coincidía con la secuencia de nucleótidos de CRP_N0. Dicho codón tiene como fin evitar que se añadan aminoácidos en la cadena peptídica que no pertenecen a secuencia original del PAM N0 (**Bautista et al., 2021**).

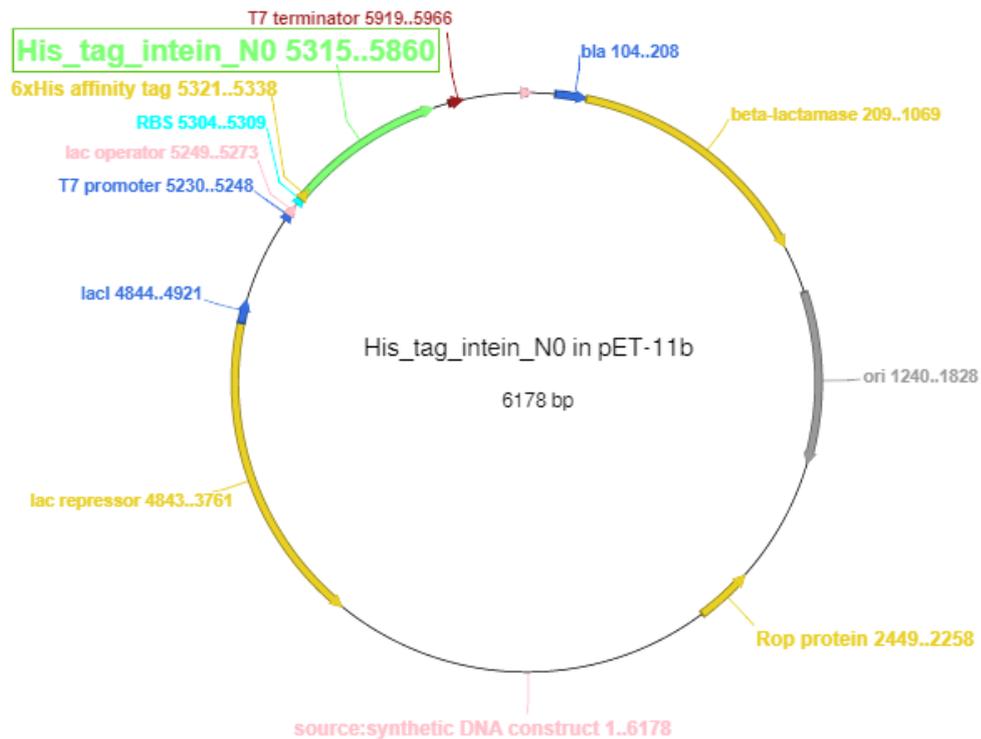


Figura 6. Construcción del plásmido pET-11_His_tag_intein_N0

La construcción His_tag_intein_N0 se encuentra marcada en verde.

3.3. Expresión del péptido en *Escherichia coli*

3.3.1. Ensayo de expresión del péptido antimicrobiano

Para determinar las condiciones óptimas de expresión de la proteína de fusión, se realizó un ensayo de expresión en *E. coli* BL21 pG-Tf2. La expresión se realizó con la adición de IPTG en una concentración de 0.4 mM, con periodos de incubación entre 4, 8 y 24 horas a temperatura ambiente (~22 °C). Pasado este periodo, se analizaron los resultados mediante SDS-PAGE (Figura 7), con el objetivo de determinar cuál es tiempo de incubación idóneo para la expresión del péptido mediante la comparación de la intensidad de las bandas ubicadas alrededor de los 20 kDa y que corresponden a la construcción His_tag_intein_N0.

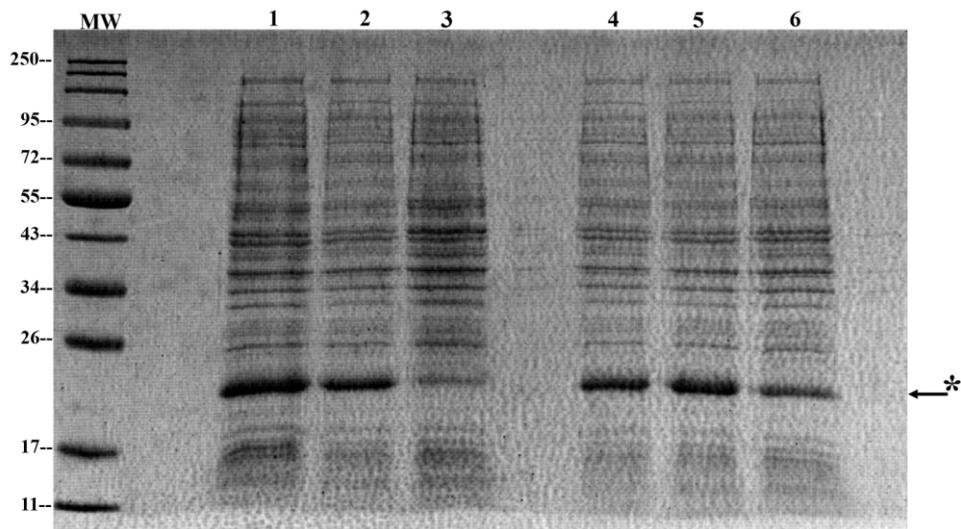


Figura 7. Ensayo de expresión de la construcción His_tag_intein_N0

MW) marcador de peso molecular; **1)** Inducción 4 h con IPTG; **2)** Inducción 8 h con IPTG; **3)** Inducción 24 h con IPTG; **4)** Inducción 4 h sin IPTG; **5)** Inducción 8 h sin IPTG; **6)** Inducción 24 h sin IPTG. (*) Construcción His_tag_intein_N0, PM = 20,26 kDa.

En la figura 7 se puede observar que la cantidad de proteína recombinante obtenida es inversamente proporcional al tiempo de incubación. Esto se puede deber a que probablemente la inteína se autoescinde dentro de la célula, provocando una muerte celular por la posible actividad antimicrobiana de CRP_N0. Por tal motivo, se dedujo que el mejor tiempo de incubación para la expresión de la proteína recombinante es de 4 horas con IPTG, ya que se puede apreciar una banda con mayor intensidad en dicho periodo de tiempo.

Estos datos coinciden con resultados obtenidos por otros investigadores con respecto al tiempo de expresión de péptidos antimicrobianos. Según **Zhang et al. (2020)**, el tiempo óptimo de inducción de la expresión del péptido fue de 4 h. **Azari et al., (2020)**, indican que las células fueron incubadas 5 horas después de la inducción con IPTG. Otros estudios también señalan que a periodos de tiempo menores a 6 h se muestra un alto nivel de producción de péptidos antimicrobianos (**Sima et al., 2020**). Por ello, el

tiempo en el cual se estableció la expresión del péptido concuerda con la literatura mencionada anteriormente.

Por otra parte, se puede observar que existe un significativo nivel de expresión de la construcción His_tag_intein_N0 en ausencia de IPTG (Figura 7, carriles 4, 5 y 6). En estudios previos también se observó la producción de la proteína sin adición de IPTG y empleando el plásmido pET-11b como vector de expresión. Dicho plásmido cuenta con una fuga en la expresión de la proteína de interés. Esto señala que la región del promotor no se encuentra bloqueada correctamente, provocando una fuga en la expresión de la proteína de fusión (Abdallah et al., 2000; Wu et al., 2022). Este problema se puede solucionar adicionando glucosa (1%) al medio de cultivo (Suzuki et al., 2014).

3.4. Expresión y purificación del péptido antimicrobiano

3.4.1. Expresión y purificación de la construcción His_tag_intein_N0

La expresión de la proteína se realizó de acuerdo a lo establecido en el ensayo de expresión, en donde se obtuvo 6.34 g de células a partir de 2 litros de cultivo. Después, las células fueron lisadas por sonicación, para lo cual se añadió 6 mL/g de buffer de lisis. Posteriormente, se purificó la muestra con el equipo FPLC ÄKTA Start. Los resultados de la purificación fueron analizados mediante SDS-PAGE.

En la figura 8 se puede evidenciar que la proteína recombinante se encuentra presente en todas las fracciones analizadas. Además, se puede identificar que un porcentaje de la misma se precipitó junto con el pellet, esto se pudo deber a que se formaron cuerpos de inclusión, los cuales precipitaron durante la centrifugación.

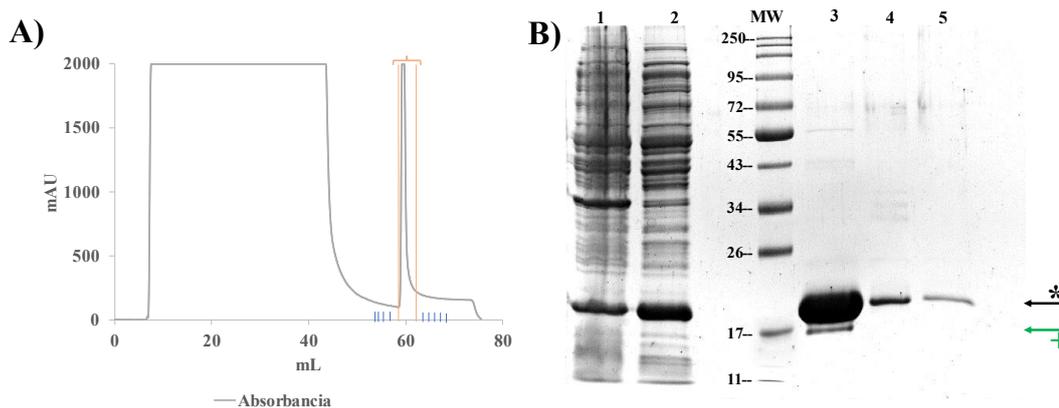


Figura 8. Purificación de la proteína recombinante His_tag_intein_N0 por cromatografía de afinidad Ni-NTA

A) Cromatograma obtenido de la purificación de la construcción His_tag_intein_N0. La proteína de interés eluyó en un solo pico comprendido entre las fracciones 5 a 7 que se encuentra señaladas en rojo. **B)** Análisis SDS-PAGE (gel al 12%) de la construcción His_tag_intein_N0. **1)** Pellet; **2)** Sobrenadante; **3)** Fracción 5; **4)** Fracción 6; **5)** Fracción 7. (*) Construcción His_tag_intein_N0, peso de 20,26 kDa, (+) His_tag_Inteína, peso de 16,87 kDa.

En la figura 8A se observa que existe un pico que supera la capacidad de medición del equipo (max. 2000 mAU), indicando que existe una alta concentración de proteína purificada en la fracción 5, lo cual es corroborado en el análisis SDS-PAGE (Figura 8B). Además, se puede observar que debajo de la banda de la construcción His_tag_intein_N0 se encuentra una banda con un peso molecular de aproximadamente 17 kDa. Aparentemente, esta banda pertenece a la inteína unida a la cola de histidinas, pero sin el péptido antimicrobiano, la cual tiene un peso de 16,87 kDa. Este resultado es un posible indicador de que la autoescisión de la inteína se dió al interior de la célula huésped, lo cual brinda mayor soporte a la hipótesis planteada anteriormente, donde un prolongado tiempo de inducción da lugar a una menor cantidad de la proteína recombinante por muerte celular (Figura 7). Alternativamente, esta banda pudo originarse debido a la auto-digestión mediada por la inteína en la columna cromatográfica. Sin embargo, este evento es menos probable debido a que las soluciones tampón empleadas durante la purificación contienen una elevada concentración de NaCl con el fin de inhibir la autoescisión.

3.4.2. Desalting

Para preparar la proteína de fusión para la autoescisión mediada por la inteína, primero se realizó un desalado (desalting) por filtración en gel empleando una columna PD-10. Para ello se empleó las fracciones 5 y 6 obtenidas durante la cromatografía de afinidad. La mezcla de ambas fracciones dio como resultado una solución con una concentración de 13,624 mg/mL. Como se mencionó anteriormente, la inteína *Npu* DnaE tiene una condición de prohibición e inducción dependiente de la concentración de sales (**Lee & Sue, 2019**). Al encontrarse en una solución con una concentración alta de sal (150 mM) se mantiene la condición de prohibición y no se realiza la escisión de la misma. Por ello, el buffer de elución contiene una alta concentración de sales. Estas condiciones permiten que la inteína no se autoescinda durante el proceso de purificación de la proteína recombinante.

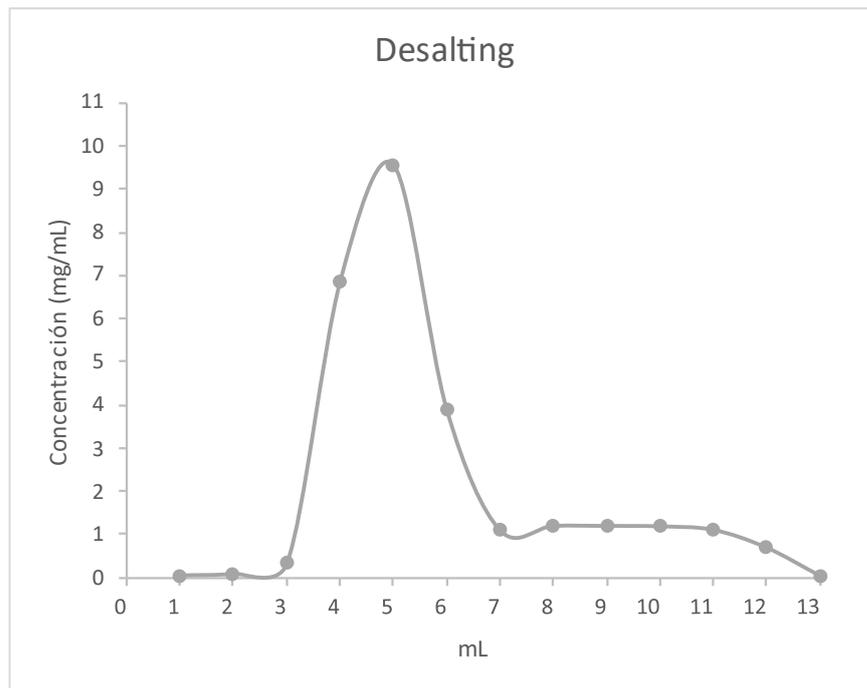


Figura 9. Cromatograma del desalado del péptido His_tag_Intein_N0 por filtración en gel

Al disminuir las concentraciones de sal (<150 mM), se activa la condición de inducción de la inteína, permitiendo que se realice el corte en el extremo C-terminal y la liberación del péptido CRP_N0. Para ello, pasaron 2 mL de muestra + 0,5 mL del buffer a través de la columna según señala el protocolo. En la figura 9 se puede identificar que la proteína presenta una mayor concentración en las fracciones 4, 5 y 6, lo cual indica que la muestra se diluyó 1.2 veces, de acuerdo con las indicaciones del fabricante el factor de dilución al utilizar la columna PD-10 es de 1.4, la variación se pudo dar por la imprecisión en la toma de fracciones, puesto que se realizó de manera manual. El cromatograma producto del desalado concuerdan con los sugeridos por el fabricante, en donde se observa que la muestra debe eluir entre las fracciones 3 y 6 (Cytiva, 2021).

3.4.3. Ensayos de autoescisión mediada por una inteína

En la figura 10 se puede identificar el ensayo de autoescisión de la inteína realizado a diferentes pH (5 a 10, con intervalos de 1) y diferente temperatura (25, 35 y 45 °C). Según **Cooper et al. (2018)**, la escisión de la inteína es dependiente de la temperatura y el pH. Por ello, el objetivo del ensayo fue ajustar las condiciones de corte de la inteína para maximizar la eficiencia de la purificación, permitiendo así la liberación de péptido CRP_N0.

Durante la optimización de la autoescisión, se determinó que, a pH básico, entre 9 y 10 (Figura 10B y 10A, respectivamente), existe un mayor porcentaje de corte de la inteína. La mejor condición de autoescisión se observó a pH = 10, punto en el cual se obtiene una escisión completa de la muestra. Este resultado concuerda con lo reportado previamente en la literatura (**Wu et al., 2022**). Es importante considerar que el punto isoeléctrico de la construcción His_tag_intein_N0 ocurre a pH = 10.5, lo cual puede afectar la estabilidad y solubilidad de la proteína recombinante. Por tal motivo, se determinó que los ensayos no deben exceder valores de pH superiores a 10.

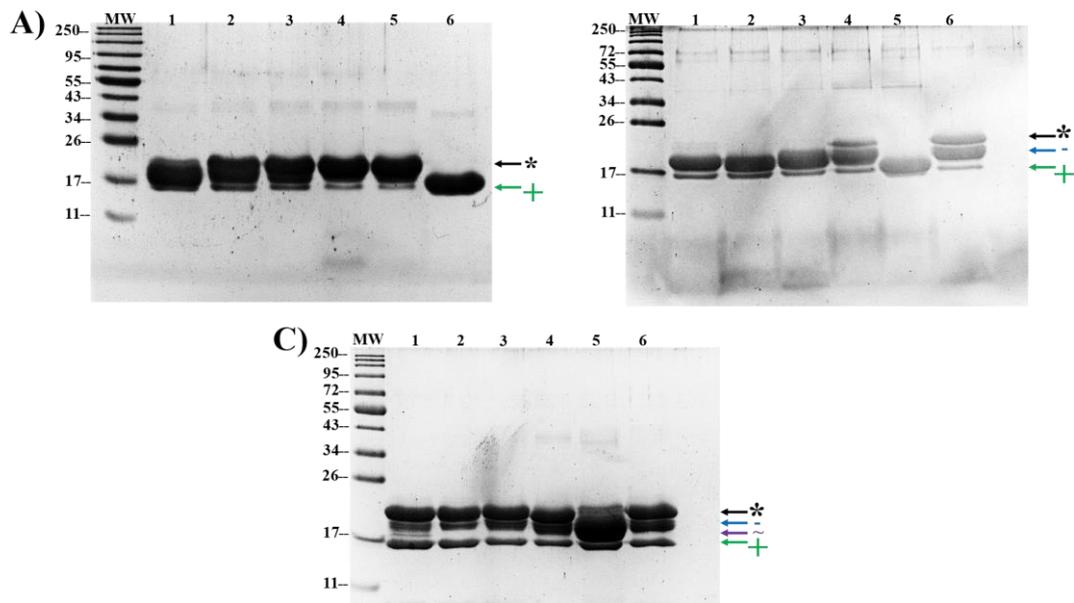


Figura 10. Ensayo de autoescisión mediado por inteína a diferente pH y temperatura.

A) Ensayo de autoescisión a 25 °C; **B)** Ensayo de autoescisión a 35 °C; **C)** Ensayo de autoescisión a 45 °C. Cada carril corresponde a la muestra sometida a diferentes pH y se cargó de la siguiente manera: **1)** pH 5; **2)** pH 6; **3)** pH 7; **4)** pH 8; **5)** pH 9; **6)** pH 10. La flecha negra señala a la construcción His_tag_intein_N0 con un peso de 20,26 kDa, la flecha azul señala una proteína con un peso aproximado de 19 kDa, la flecha morada señala una proteína de aproximadamente 18kDa, la flecha verde señala la inteína autoescindida con un peso de 16.87 kDa,

Por otra parte, también se pudo identificar que a pH ácido existe un porcentaje bajo de autoescisión de la inteína. Esto se puede deber a que el corte puede ser catalizado por el hidronio presente en la solución mediante la protonación de la amida que se encuentra en el enlace peptídico, debilitando el enlace y dando así el primer paso para la escisión del extremo C-terminas de la inteína en entornos ácidos (**Shemella et al., 2007**). En otros estudios, a pH ácido (< 6) la inteína puede aumentar su velocidad de ruptura en el extremo C-terminal de acuerdo al pKa del residuo que se encuentre en el punto de corte (**Zhang et al., 2020**). Sin embargo, el rendimiento del corte a pH ácido no es favorable para la construcción realizada en este estudio.

En cuanto a la temperatura, se puede identificar que el aumento de la misma provoca cortes inespecíficos en la proteína recombinante. Esto se concluyó al observar la presencia de múltiples bandas de diferentes pesos moleculares por debajo del peso molecular de la construcción His_tag_intein_N0 (20,26 kDa). Se identificó que la proporción de proteína de fusión aumenta conforme sube la temperatura del ensayo. Según reportan varios autores, la temperatura de escisión en el extremo C-terminal de la inteína *Npu* DnaE se ubica entre los 22 a 30 °C. (**Ramirez et al. (2013)**) se demostró que se recupera un 80% de la proteína de interés cuando la escisión se da a temperatura ambiente. Esto contrasta con lo descrito por **Cooper et al. (2018)**, quien afirma que el incremento de temperatura aumenta la eficiencia de escisión de la inteína.

En este estudio, aparentemente el punto de corte se vuelve menos específico conforme se aumenta la temperatura, ocasionando que se dé una digestión parcial y se formen proteínas de diferentes pesos moleculares que varían entre los 18 y 19 kDa, aproximadamente. Los cortes inespecíficos se pueden deber a que la inteína reconoce otro punto escisión en la secuencia de aminoácidos del péptido CRP_N0, formando fragmentos de diferente peso molecular. En anteriores estudios también se puede observar la presencia de bandas no identificadas que podrían ser el resultado de cortes inespecíficos. Sin embargo, los autores de dichos estudios no explican la razón de la presencia de las mismas (**Iwai et al., 2006; Ramirez et al., 2013; Zettler et al., 2009**).

En el caso de la banda con un peso aproximado de 19 kDa, se planteó que su origen se pudo deber a la posibilidad de un corte en el extremo N-terminal de la inteína. Estudios en los cuales se evaluó la eficiencia de corte de los extremos N y C-terminales por separado demostraron que a pesar de mutar el primer residuo de la inteína (Cys), se produce un corte en el extremo N-terminal de una pequeña porción de la muestra (**Iwai et al., 2006; Wu et al., 1998**). Por lo tanto, al aumentar la temperatura de incubación aparentemente se promueve esta reacción. Con base a todos los análisis realizados con respecto a la temperatura y pH del ensayo, se determinó que las condiciones apropiadas

para que se dé la autoescisión de la inteína en el extremo C-terminal son a 25 °C con un pH = 10.

3.4.4. Purificación del péptido CRP_N0

La purificación del péptido CRP_N0 se realizó en base a las condiciones determinadas en el ensayo de escisión. La autoescisión de la inteína se realizó en una columna Ni-NTA previamente equilibrada con tampón fosfato 20 mM (pH = 10). Una vez cargada la proteína de fusión, se incubó la columna a 25 °C por 72 horas. El péptido CRP_N0 se obtuvo lavando la columna con 5 mL de tampón fosfato 20 mM (pH = 10) (Figura 11A). La inteína se eluyó con buffer de elución (pH 8,5) y se colectaron 9 mL (Figura 11B). Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE.

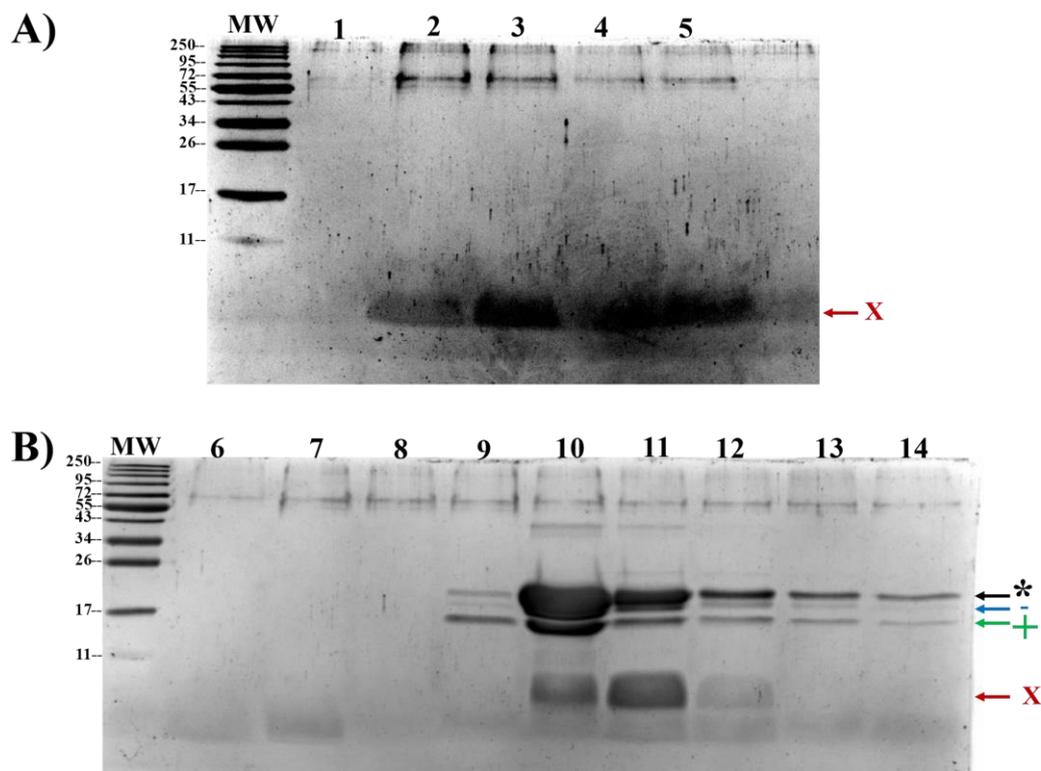


Figura 11. Purificación de CRP_N0 mediante una columna de afinidad

Análisis SDS-PAGE (gel al 15%) de las fracciones obtenidas en la purificación de CRP_N0. **A)** Se tomaron muestras del lavado de la columna, donde las muestras fueron cargadas en el siguiente orden: **1)** Fracción 1; **2)** Fracción 2; **3)** Fracción 3; **4)** Fracción 4; **5)** Fracción 5. **B)** Muestras tomadas en la elución de la proteína, donde se cargaron las muestras de la siguiente manera: **6)** Fracción 6; **7)**

Fracción 7; **8)** Fracción 8; **9)** Fracción 9; **10)** Fracción 10; **11)** Fracción 11; **12)** Fracción 12; **13)** Fracción 13; **14)** Fracción 14. (*) Construcción His_tag_intein_N0, peso de 20,26 kDa, (-) proteína de aproximadamente 19 kDa, (+) Inteína, peso de 16,87 kDa, (X) péptido CRP_N0.

Como se observa en la figura 11 correspondiente a la purificación del péptido CRP_N0, eluyeron proteínas de elevado peso molecular conjuntamente con el péptido de interés (Figura 11A). Estas proteínas están presentes en todas las fracciones y eluyeron en ausencia de imidazol, lo cual sugiere que no contienen una cola de histidinas y que no corresponden a la proteína de interés.

En la figura 11B se puede identificar que existe un gran porcentaje de proteína sin autoescindir, lo cual supone un problema para la purificación, puesto que el rendimiento del corte es bajo. Probablemente, el corte no se da de manera adecuada debido a que la inteína tiene varios residuos de cisteína desapareados, lo cuales tiene una alta probabilidad de formar enlaces disulfuro intermoleculares, evitando que se dé el corte en el extremo C-terminal de la proteína (**Zong et al., 2022**). También se puede identificar la presencia de una proteína con un peso aproximado de 19 kDa, esto ratificaría la hipótesis de que la inteína reconoce otro punto de corte dentro de la secuencia del péptido CRP_N0 y no se da un corte en el extremo N-terminal, debido a que esta proteína contiene aún una cola de histidinas que se desprende de la columna durante la elución en presencia de imidazol.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se diseñó un péptido antimicrobiano mediante reconstrucción ancestral empleando secuencias de diferentes Cecropinas, al cual se lo denominó CRP_N0.
- Las condiciones óptimas para la expresión de la construcción His_tag_Intein_N0 son 4h de incubación en presencia de 0,4 mM de IPTG a temperatura ambiente.
- La purificación del péptido se realizó en tres etapas. Primero se purificó la construcción His_tag_Intein_N0 mediante cromatografía de afinidad. Después, se realizó un intercambio de buffer con el fin de eliminar las altas concentraciones de sales mediante cromatografía de filtración en gel. Finalmente, se incubó la muestra en una columna Ni-NTA con tampón fosfato 20 mM, pH = 10, a 25 °C durante 72 h. Este protocolo permitió obtener el péptido CRP_N0 con un elevado porcentaje de pureza.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda evaluar otras condiciones para mejorar el rendimiento de autoescisión de la inteína
- Se recomienda ensayar la actividad antimicrobiana del péptido CRP_N0 purificado.

MATERIAL DE REFERENCIA

- Aadland, K., Pugh, C., & Kolaczowski, B. (2019). High-Throughput Reconstruction of Ancestral Protein Sequence, Structure, and Molecular Function. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 1851*, 135–170. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8736-8_8
- Abdallah, M., Pollenz, R., Droog, F., Nunamaker, R., Tabachnick, W., & Murphy, K. (2000). Isolation and characterization of a cDNA clone coding for a glutathione S-transferase class delta enzyme from the biting midge *Culicoides variipennis sonorensis* Wirth and Jones. *Biochemical Genetics*, 38(11–12), 377–390. <https://doi.org/10.1023/A:1026471830868>
- Acosta, D., & García, M. (2022). *Análisis bioinformático de péptidos con actividad antimicrobiana*. <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/34955>
- Aisenbrey, C., Marquette, A., & Bechinger, B. (2019). The Mechanisms of Action of Cationic Antimicrobial Peptides Refined by Novel Concepts from Biophysical Investigations. *Advances in Experimental Medicine and Biology, 1117*, 33–64. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_4
- Amaranto, M., Vaccarello, P., Correa, E., Barra, J., & Godino, A. (2021). Novel intein-based self-cleaving affinity tag for recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology, 332*, 126–134. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2021.04.003>
- Andrea, A., Molchanova, N., & Jenssen, H. (2018). Antibiofilm Peptides and Peptidomimetics with Focus on Surface Immobilization. *Biomolecules, 8*(2). <https://doi.org/10.3390/BIOM8020027>
- Arenas, M. (2022). Methodologies for Microbial Ancestral Sequence Reconstruction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2569*, 283–303. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2691-7_14
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M., Nisar, M., Alvi, R., Aslam, M., Qamar, M., Salamat, M., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic

- resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, *11*, 1645. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Azari, M., Asad, S., & Mehrnia, M. (2020). Heterologous production of porcine derived antimicrobial peptide PR-39 in *Escherichia coli* using SUMO and intein fusion systems. *Protein Expression and Purification*, *169*, 105568. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2020.105568>
- Bailleul, G., Nicoll, C., Mascotti, M., Mattevi, A., & Fraaije, M. (2021). Ancestral reconstruction of mammalian FMO1 enables structural determination, revealing unique features that explain its catalytic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, *296*. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA120.016297>
- Bautista, D., Carr, J., & Mitchell, A. (2021). Suppressor Mutants: History and Today's Applications. *EcoSal Plus*, *9*(2). <https://doi.org/10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0037-2020>
- Bechinger, B., & Gorr, S. U. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research*, *96*(3), 254–260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- Blair, J., Zeth, K., Bavro, V. N., & Sancho-Vaello, E. (2022). The role of bacterial transport systems in the removal of host antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *46*(6). <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAC032>
- Bodén, M. (2020). *GRASP*. Graphical Representation of Ancestral Sequence Predictions. <http://grasp.scmb.uq.edu.au/>
- Brady, D., Grapputo, A., Romoli, O., & Sandrelli, F. (2019). Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS20235862>
- Chen, X., Zhu, F., Cao, Y., & Qiao, S. (2009). Novel expression vector for secretion of cecropin AD in *Bacillus subtilis* with enhanced antimicrobial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(9), 3683–3689. <https://doi.org/10.1128/AAC.00251-09>

- Cheng, K. T., Wu, C. L., Yip, B. S., Yu, H. Y., Cheng, H. T., Chih, Y. H., & Cheng, J. W. (2018). High Level Expression and Purification of the Clinically Active Antimicrobial Peptide P-113 in *Escherichia coli*. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23040800>
- Chia, L. Y., Kumar, P. V., Maki, M. A. A., Ravichandran, G., & Thilagar, S. (2023). A Review: The Antiviral Activity of Cyclic Peptides. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 29(1). <https://doi.org/10.1007/S10989-022-10478-Y>
- Choi, J., Jang, A., Yoon, Y., & Kim, Y. (2021). Development of novel peptides for the antimicrobial combination therapy against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Pharmaceutics*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13111800/S1>
- Clark, M., & Maselko, M. (2020). Transgene Biocontainment Strategies for Molecular Farming. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00210>
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110–2114. <https://doi.org/10.1073/PNAS.69.8.2110>
- Cooper, M. A., Taris, J. E., Shi, C., & Wood, D. W. (2018). A Convenient Split-Intein Tag Method for the Purification of Tagless Target Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 91(1), 5.29.1-5.29.23. <https://doi.org/10.1002/CPPS.46>
- PD-10 Desalting Column Product Booklet*, (2021) (testimony of Cytiva). <https://d3.cytivalifesciences.com/prod/IFU/52130800.pdf>
- de Brito, F. A. E., de Freitas, A. P. P., & Nascimento, M. S. (2022). Multidrug-Resistant Biofilms (MDR): Main Mechanisms of Tolerance and Resistance in the Food Supply Chain. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11121416>

- Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2018). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador. *Ministerio de Salud Pública*, 2(1).
- Fang, Y., Lai, W., Liu, J., & Liu, Y. (2019). Enhanced cecropin B2 production via chitin-binding domain and intein self-cleavage system. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(2), 209–215. <https://doi.org/10.1002/BAB.1716>
- Fang, Y., Li, S., Hu, N., Yang, J., Liu, J., & Liu, Y. (2020). Study on Cecropin B2 Production via Construct Bearing Intein Oligopeptide Cleavage Variants. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25041005>
- Gabibov, A. G., Dontsova, O., & Egorov, A. (2020). Overcoming Antibiotic Resistance in Microorganisms: Molecular Mechanisms. *Biochemistry. Biokhimiia*, 85(11), 1289–1291. <https://doi.org/10.1134/S0006297920110012>
- Godreuil, S., Leban, N., Padilla, A., Hamel, R., Luplertlop, N., Chauffour, A., Vittecoq, M., Hoh, F., Thomas, F., Sougakoff, W., Lionne, C., Yssel, H., & Missé, D. (2014). Aedesin: Structure and Antimicrobial Activity against Multidrug Resistant Bacterial Strains. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0105441>
- Haney, E., Mansour, S., & Hancock, R. (2017). Antimicrobial Peptides: An Introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1548, 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_1
- Hashemi, S., Niazi, A., Baghizadeh, A., & Taghizadeh, M. S. (2022). Successful use of *Nicotiana tabacum* hairy roots for the recombinant production of Cecropin A peptide. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(3). <https://doi.org/10.1002/bab.2158>
- Huemer, M., Shambat, S. M., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21(12). <https://doi.org/10.15252/EMBR.202051034>

- Inoue, H. (2019). Strategic approach for combating antimicrobial resistance (AMR). *Global Health & Medicine*, *1*(2), 61–64. <https://doi.org/10.35772/GHM.2019.01026>
- Islam, M., Kim, D., Kim, K., Park, S., Akter, S., Kim, J., Bang, S., Kim, S., Kim, J., Lee, J., Hong, C., & Shin, M. (2022). Engineering of lysin by fusion of antimicrobial peptide (cecropin A) enhances its antibacterial properties against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.988522>
- Iwai, H., Züger, S., Jin, J., & Tam, P. H. (2006). Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split *DnaE* intein from *Nostoc punctiforme*. *FEBS Letters*, *580*(7), 1853–1858. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.02.045>
- Jan, P., Huang, H., & Chen, H. (2010). Expression of a synthesized gene encoding cationic peptide cecropin B in transgenic tomato plants protects against bacterial diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.00698-09>
- Kaman, W. E., Nazmi, K., Voskamp-Visser, A. I., & Bikker, F. J. (2022). Gramicidin A is hydrolyzed by a d-stereospecific peptidase produced by *Bacillus anthracis*. *Environmental Microbiology Reports*, *14*(4), 570–576. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13069>
- Kapli, P., Flouri, T., & Telford, M. (2021). Systematic errors in phylogenetic trees. *Current Biology*, *31*(2), R59–R64. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.11.043>
- Kistemaker, H., Voorneveld, J., & Filippov, D. (2018). ADPr-Peptide Synthesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1813*, 345–369. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8588-3_24
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY096>

- Lai, W., Kan, S., Lin, C., Shieh, C., & Liu, Y. (2016). Antibacterial Peptide CecropinB2 Production via Various Host and Construct Systems. *Molecules*, *21*(1). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21010103>
- Larsson, D., & Flach, C. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews. Microbiology*, *20*(5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/S41579-021-00649-X>
- Lee, Y. (2022). Peptidomimetics and Their Applications for Opioid Peptide Drug Discovery. *Biomolecules*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/BIOM12091241>
- Lee, Y., & Sue, S. (2019). Salt-sensitive intein for large-scale polypeptide production. *Methods in Enzymology*, *621*, 111–130.
- Lerminiaux, N., & Cameron, A. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, *65*(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/CJM-2018-0275>
- Li, L., Mu, L., Wang, X., Yu, J., Hu, R., & Li, Z. (2017). A novel expression vector for the secretion of abaecin in *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *48*(4), 809. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2017.01.009>
- Li, X., Shen, B., Chen, Q., Zhang, X., Ye, Y., Wang, F., & Zhang, X. (2016). Antitumor effects of cecropin B-LHRH' on drug-resistant ovarian and endometrial cancer cells. *BMC Cancer*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-016-2287-0>
- Liu, C., Xie, J., Wu, W., Wang, M., Chen, W., Idres, S. B., Rong, J., Deng, L. W., Khan, S. A., & Wu, J. (2021). Automated synthesis of prexasertib and derivatives enabled by continuous-flow solid-phase synthesis. *Nature Chemistry*, *13*(5), 451–457. <https://doi.org/10.1038/S41557-021-00662-W>
- Liu, H., & Timko, M. P. (2022). Improving Protein Quantity and Quality-The Next Level of Plant Molecular Farming. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031326>

- Liu, W. T., Chen, C. C., Ji, D. der, & Tu, W. C. (2022). The cecropin-prophenoloxidase regulatory mechanism is a cross-species physiological function in mosquitoes. *IScience*, 25(6). <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2022.104478>
- Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/IJMS222111401>
- Manniello, M. D., Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Lucchetti, D., Vogel, H., Sgambato, A., & Falabella, P. (2021). Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(9), 4259. <https://doi.org/10.1007/S00018-021-03784-Z>
- Matsumoto, H., Haniu, H., & Komori, N. (2019). Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1855, 101–105. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_10
- Montesinos, L., Bundo, M., Izquierdo, E., Campo, S., Badosa, E., Rossignol, M., Montesinos, E., Segundo, B., & Coca, M. (2016). Production of biologically active cecropin A peptide in rice seed oil bodies. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146919>
- Moretta, A., Scieuzo, C., Petrone, A. M., Salvia, R., Manniello, M. D., Franco, A., Lucchetti, D., Vassallo, A., Vogel, H., Sgambato, A., & Falabella, P. (2021). Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.668632>
- Muchintala, D., Suresh, V., Raju, D., & Sashidhar, R. B. (2020). Synthesis and characterization of cecropin peptide-based silver nanocomposites: Its antibacterial activity and mode of action. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 110. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.110712>
- Murray, C., Ikuta, K., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S., Browne, A., Chipeta, M., Fell,

- F., Hackett, S., Haines, G., Kashef, B. H., Kumaran, E., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nanda, A., Nasker, S. S., Mehra, A., Panda, S., & Nayak, S. (2020). Inteins in Science: Evolution to Application. *Microorganisms*, 8(12), 1–30. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8122004>
- Nilsson, A. C., Janson, H., Wold, H., Fugelli, A., Andersson, K., Håkangård, C., Olsson, P., & Olsen, W. M. (2015). LTX-109 Is a Novel Agent for Nasal Decolonization of Methicillin-Resistant and -Sensitive *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 145. <https://doi.org/10.1128/AAC.03513-14>
- Ochoa, R., Cossio, P., & Fox, T. (2022). Protocol for iterative optimization of modified peptides bound to protein targets. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 36(11), 825–835. <https://doi.org/10.1007/S10822-022-00482-1>
- Park, A. R., Kim, S. W., Kim, S. Y., & Kwon, K. C. (2021). Expression of Antimicrobial Peptide (AMP), Cecropin B, in a Fused Form to SUMO Tag With or Without Three-Glycine Linker in *Escherichia coli* and Evaluation of Bacteriolytic Activity of the Purified AMP. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(6), 1780. <https://doi.org/10.1007/S12602-021-09797-1>
- Park, S., Son, H., Kim, Y., Lee, J., Park, S., Lim, H., Lee, J., & Jang, M. (2022). Design of Antimicrobial Peptides with Cell-Selective Activity and Membrane-Acting Mechanism against Drug-Resistant Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(11), 1619. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11111619>
- Pavankumar, T. (2018). Inteins: Localized Distribution, Gene Regulation, and Protein Engineering for Biological Applications. *Microorganisms*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS6010019>
- Peng, J., Mishra, B., Khader, R., Felix, L., & Mylonakis, E. (2021). Novel Cecropin-4 Derived Peptides against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

Antibiotics (Basel, Switzerland), 10(1), 1–19.
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10010036>

Phillips, A. (2015). National strategy and action plan for combating antibiotic resistant bacteria. In *National Strategy and Action Plan for Combating Antibiotic Resistant Bacteria*.

Poirier, M., Viens, A., Penney, T., Rogers, S., Astbury, C., Lin, G., Nanyangwe, T., & Hoffman, S. (2022). Principles and methods of global legal epidemiology. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 76(9), 828–832.
<https://doi.org/10.1136/JECH-2021-217202>

Ramirez, M., Valdes, N., Guan, D., & Chen, Z. (2013). Engineering split intein DnaE from *Nostoc punctiforme* for rapid protein purification. *Protein Engineering, Design and Selection*, 26(3), 215–223.
<https://doi.org/10.1093/PROTEIN/GZS097>

Ramos, L., de Oliveira, J., Andrade, G., Lixa, C., de Castilho, L., Nogueira, F., Pinheiro, A., Gomes, F., AnoBom, C., Almeida, R., & de Oliveira, D. (2021). Identification and recombinant expression of an antimicrobial peptide (cecropin B-like) from soybean pest *Anticarsia gemmatilis*. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 27.
<https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0127>

RCSB PDB. (2022). *RCSB PDB: Página de inicio*. Protein Data Bank.
<https://www.rcsb.org/>

Rigatto, M., Falci, D., & Zavascki, A. (2019). Clinical Use of Polymyxin B. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1145, 197–218.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_14

Rinas, U., Garcia, E., Corchero, J., Vázquez, E., Seras, J., & Villaverde, A. (2017). Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(9), 726–737. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2017.01.005>

Robles, A., Pinos, E., Mendes, B., Ortega, J., Proaño, C., Plisson, F., Teixeira, C., Gomes, P., & Almeida, J. (2022). Traditional and Computational Screening of

Non-Toxic Peptides and Approaches to Improving Selectivity. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/PH15030323>

Rodríguez, M., Saugar, J., Docobo, F., de la Torre, B., Pachón, M., García, A., Fernández, F., Andreu, D., Rivas, L., & Pachón, J. (2006). Studies on the antimicrobial activity of cecropin A-melittin hybrid peptides in colistin-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(1), 95–100. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKL145>

Sheehan, G., Farrell, G., & Kavanagh, K. (2020). Immune priming: the secret weapon of the insect world. *Virulence*, 11(1), 238–246. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1731137>

Shemella, P., Pereira, B., Zhang, Y., van Roey, P., Belfort, G., Garde, S., & Nayak, S. K. (2007). Mechanism for Intein C-Terminal Cleavage: A Proposal from Quantum Mechanical Calculations. *Biophysical Journal*, 92(3), 847. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.106.092049>

Shih, C., Wagner, R., Feinstein, S., Kanik, C., & Neff, N. (1988). A dominant trifluoperazine resistance gene from *Saccharomyces cerevisiae* has homology with FOF1 ATP synthase and confers calcium-sensitive growth. *Molecular and Cellular Biology*, 8(8), 3094–3103. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.8.3094-3103.1988>

Sierra, J., Fusté, E., Rabanal, F., Vinuesa, T., & Viñas, M. (2017). An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(6), 663–676. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315402>

Sievers, F., & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 27(1), 135. <https://doi.org/10.1002/PRO.3290>

Sima, S., Shafiee, F., & Jahanian, A. (2020). Expression and one step intein-mediated purification of biologically active human G-CSF in *Escherichia coli*. *Molecular*

Biology Reports, 47(4), 2861–2869. <https://doi.org/10.1007/S11033-020-05404-8/FIGURES/5>

Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S., & Panda, A. K. (2020). Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends in Biotechnology*, 38(5), 474–486. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2019.12.011>

Sun, C., Peng, J., Yang, L., Jiao, Z., Zhou, L., Tao, R., Zhu, L., Tian, Z., Huang, M., & Guo, G. (2022). A Cecropin-4 Derived Peptide C18 Inhibits *Candida albicans* by Disturbing Mitochondrial Function. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.872322>

Suzuki, R., Hirakawa, H., & Nagamune, T. (2014). Electron donation to an archaeal cytochrome P450 is enhanced by PCNA-mediated selective complex formation with foreign redox proteins. *Biotechnology Journal*, 9(12), 1573–1581. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201400007>

Thomas, D. S., Manoharan, C., Rasalkar, S., Mishra, R. K., & Gopalapillai, R. (2020). Recombinant expression of sericin-cecropin fusion protein and its functional activity. *Biotechnology Letters*, 42(9), 1673–1682. <https://doi.org/10.1007/S10529-020-02911-3>

Tsai, C., Salawu, E., Li, H., Lin, G., Kuo, T., Voon, L., Sharma, A., Hu, K. di, Cheng, Y., Sahoo, S., Stuart, L., Chen, C., Chang, Y., Lu, Y., Ke, S., Ortiz, C., Fang, B., Wu, C., Lan, C., ... Yang, L. (2022). Helical structure motifs made searchable for functional peptide design. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-27655-0>

Walker, A., Robinson, S., Paluzzi, J., Merritt, D., Nixon, S., Schroeder, C., Jin, J., Goudarzi, M., Kotze, A., Dekan, Z., Sombke, A., Alewood, P., Fry, B., Epstein, M., Vetter, I., & King, G. (2021). Production, composition, and mode of action of the painful defensive venom produced by a limacodid caterpillar, *Doratifera vulnerans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(18). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2023815118>

- Wang, J., Ma, K., Ruan, M., Wang, Y., Li, Y., Fu, Y., Song, Y., Sun, H., & Wang, J. (2018). A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties. *PeerJ*, 6(7). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.5369>
- Wang, M., Zheng, K., Lin, J., Huang, M., Ma, Y., Li, S., Luo, X., & Wang, J. (2018). Rapid and efficient production of cecropin A antibacterial peptide in *Escherichia coli* by fusion with a self-aggregating protein. *BMC Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12896-018-0473-7>
- Wang, W., Khojasteh, S. C., & Su, D. (2021). Biosynthetic Strategies for Macrocyclic Peptides. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(11). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26113338>
- WHO. (2014). Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. *World Health Organization*, 61(3). <https://doi.org/10.1007/s13312-014-0374-3>
- Wu, C., Chih, Y., Hsieh, H., Peng, K., Lee, Y., Yip, B., Sue, S., & Cheng, J. (2022). High Level Expression and Purification of Cecropin-like Antimicrobial Peptides in *Escherichia coli*. *Biomedicines*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10061351>
- Wu, H., Hu, Z., & Liu, X. Q. (1998). Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split *DnaE* gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9226–9231. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.16.9226>
- Xia, H., Zhou, T., Du, Y., Wang, Y., Shi, C., & Wood, D. (2020). Improved protein purification system based on C-terminal cleavage of *Npu* DnaE split intein. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(11), 1931–1941. <https://doi.org/10.1007/S00449-020-02382-W/FIGURES/12>
- Xu, P., Lv, D., Wang, X., Wang, Y., Hou, C., Gao, K., & Guo, X. (2020). Inhibitory effects of *Bombyx mori* antimicrobial peptide cecropins on esophageal cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 887. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.173434>

- Yamasaki, S., Koga, N., Zwama, M., Sakurai, K., Nakashima, R., Yamaguchi, A., & Nishino, K. (2022). Spatial Characteristics of the Efflux Pump MexB Determine Inhibitor Binding. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00672-22>
- Zettler, J., Schütz, V., & Mootz, H. D. (2009). The naturally split *Npu* DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction. *FEBS Letters*, 583(5), 909–914. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2009.02.003>
- Zhang, J., Movahedi, A., Wang, X., Wu, X., Yin, T., & Zhuge, Q. (2015). Molecular structure, chemical synthesis, and antibacterial activity of ABP-dHC-cecropin A from drury (*Hyphantria cunea*). *Peptides*, 68, 197–204. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2014.09.011>
- Zhang, L., Li, X., Zhan, N., Sun, T., Li, J., & Shan, A. (2020). Maltose Induced Expression of Cecropin AD by SUMO Technology in *Bacillus subtilis* WB800N. *The Protein Journal*, 39(4), 383–391. <https://doi.org/10.1007/S10930-020-09908-X>
- Zhang, M., Zhang, Y., Wu, B., Peng, Y., Simair, A. A., Siegel, G. W., Lu, C., & Chen, T. (2020). Intein-mediated recombinant expression of monomeric B22Asp desB30 insulin. *BMC Biotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12896-020-0598-3>
- Zhang, R., Xu, L., & Dong, C. (2022). Antimicrobial Peptides: An Overview of their Structure, Function and Mechanism of Action. *Protein and Peptide Letters*, 29(8), 641–650. <https://doi.org/10.2174/0929866529666220613102145>
- Zharkova, M., Orlov, D., Golubeva, O., Chakchir, O., Eliseev, I., Grinchuk, T., & Shamova, O. (2019). Application of Antimicrobial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics-A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2019.00128>

- Zhou, Y., & Liang, X. W. (2021). Recent applications of solid-phase strategy in total synthesis of antibiotics. *RSC Advances*, *11*(60), 37942–37951. <https://doi.org/10.1039/D1RA07503A>
- Ziaja, M., Dziedzic, A., Szafraniec, K., & Piastowska, A. (2020). Cecropins in cancer therapies-where we have been? *European Journal of Pharmacology*, *882*. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.173317>
- Zong, H., Han, L., Chen, J., Pan, Z., Wang, L., Sun, R., Ding, K., Xie, Y., Jiang, H., Lu, H., Gilly, J., Zhang, B., & Zhu, J. (2022). Kinetics study of the natural split *Npu* DnaE intein in the generation of bispecific IgG antibodies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *106*(1), 161–171. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11707-Y/FIGURES/6>