

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Evaluación de la actividad antimicrobiana del péptido escigonadina recombinante frente a cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus*.

Por
Laura María Montenegro Rodríguez

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en Microbiología Aplicada

Junio, 2026

Evaluación de la actividad antimicrobiana del péptido escigonadina recombinante frente a cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus*

Revisión de tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Director de tesis

Dra. Jessica Judith Gómez Lugo

Subdirectora de tesis

Dr. Néstor G. Casillas Vega

Comité tutorial

Dr. José Rubén Morones Ramírez

Comité tutorial

Dra. Pilar Del Carmen Morales San Claudio

Comité tutorial

Dr. Javier Rivera de la Rosa

Subdirector de Posgrado

Evaluación de la actividad antimicrobiana del péptido escigonadina recombinante frente a cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus*

Aprobación de tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Director de tesis

Dra. Jessica Judith Gómez Lugo

Subdirectora de tesis

Dr. Néstor G. Casillas Vega

Comité tutorial

Dr. José Rubén Morones Ramírez

Comité tutorial

Dra. Pilar Del Carmen Morales San Claudio

Comité tutorial

Dr. Javier Rivera de la Rosa

Subdirector de Posgrado

Dedicatoria

A Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de este camino. Por darme la sabiduría, la paciencia y la perseverancia necesarias para superar cada desafío y permitirme llegar hasta este momento.

A mi abuela María J. García Calzada y mi madre Cristina Rodríguez García por su incansable apoyo, fortaleza y amor incondicional.

Sin ustedes, este logro no habría sido posible.

Agradecimientos

Al llegar al final de este importante capítulo de mi vida, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, agradezco profundamente a la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)** por su invaluable apoyo, así como a la **Universidad Autónoma de Nuevo León**, a la **Facultad de Ciencias Químicas** y a la **División de Estudios de Posgrado**, por brindarme el espacio, las herramientas y la formación académica necesaria para desarrollar este proyecto.

A mi asesor, el **Dr. Xristo Zárate**, le agradezco su guía, paciencia y compromiso durante todas las etapas de esta investigación. También extendo mi gratitud a los distinguidos miembros del comité, cuyo conocimiento y observaciones enriquecieron este trabajo.

A mis compañeros y amigos de generación, gracias por acompañarme a lo largo de este camino lleno de desafíos y aprendizajes. Su apoyo, compañerismo y motivación fueron fundamentales durante esta etapa, no solo en lo académico, sino también en lo personal, haciendo de esta experiencia algo mucho más enriquecedor y significativo.

A mi madre y a mi abuela, les agradezco infinitamente su amor, su fe en mí y su constante ejemplo de esfuerzo y dedicación.

A mi mejor amiga Yenisey, gracias por estar presente siempre, con palabras de aliento y apoyo. A mi pareja, gracias por caminar a mi lado con paciencia, comprensión y amor. Y a mi suegra, por su cariño y respaldo constante.

A todos ustedes, gracias por creer en mí y por ser parte de este logro.

Tabla de contenido

1.INTRODUCCIÓN	14
CAPITULO 2	22
2. ANTECEDENTES	22
2.1 Escigonadina.	22
2.2 Producción recombinante de péptidos antimicrobianos.	23
2.3 Proteínas de fusión y sistema SmbP.	24
2.4 Sistema de expresión pET30a.	25
2.5 Expresión en <i>E. coli</i> SHuffle.....	26
CAPITULO 3	28
3. Hipótesis y Objetivos.....	28
3.1 Hipótesis	28
3.2 Objetivo general	28
3.3 Objetivos específicos.....	28
CAPITULO 4	29
4. Metodología	29
4.1 Metodología General	29
4.2 Expresión y purificación del péptido.	30
4.2.1 Microexpresión.	30
4.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
4.3 Escalamiento de la expresión de proteínas a 1 L de medio de cultivo	32
4.3.1 Lisis celular y obtención de clarificado	33
4.3.2 Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC).....	34
4.3.3 Análisis de las fracciones de la expresión a escala de 1 L mediante SDS-PAGE..	35
4.3.4 Diálisis para la remoción de imidazol.....	35
4.3.5 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford	36
4.3.6 Remoción del tag de afinidad mediante digestión con enteroquinasa	37
4.3.7 Segunda purificación en columna de gravedad con resina de afinidad	37

4.3.8 Preparación del gel de Tricine (SDS-PAGE).....	38
4.3.9 Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	40
CAPITULO 5	43
5. Resultados.....	43
5.1 Transformación y expresión del constructo recombinante SmbP-escigonadina	43
5.1.3 Análisis de la purificación del constructo SmbP-Escigonadina mediante SDS-PAGE	47
5.1.4 Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.	49
5.1.5 Análisis del péptido escigonadina libre mediante SDS-PAGE en geles de Tricina.	51
5.1.6 Actividad antimicrobiana del péptido escigonadina libre	53
CAPITULO 6	57
6. Discusión	57
CAPITULO 7	61
7. Conclusiones	61
CAPITULO 8	63
8. Perspectivas a futuro.....	63
CAPITULO 9	64
9. Disposición de residuos generados	64
CAPITULO 10	65
10. Referencias:	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación esquemática del mecanismo de acción general de los péptidos antimicrobianos sobre bacterias. Inicialmente ocurre una interacción con la superficie bacteriana, seguida de alteraciones en la membrana celular que pueden provocar su ruptura o interferir en procesos intracelulares esenciales. Estos efectos conducen finalmente a la lisis bacteriana y a la muerte celular [42]. 18
- Figura 2.** Sistema de expresión basado en promotor T7 (pET30a) para la producción recombinante de péptidos antimicrobianos. 26
- Figura 3.** Metodología general de trabajo 29
- Figura 4.** Diseño de la placa de microdilución utilizada para la determinación de la actividad antimicrobiana de escigonadina recombinante frente a (CRAB) y (MRSA). Se incluyeron controles negativos (CN), controles positivos (CP), blanco de medio (B) y diluciones seriadas del péptido en concentraciones de 8.0 a 0.25 μ M, evaluadas por triplicado 42
- Figura 5.** Micro expresión de SmbP-SCY en *E. coli* SHuffle 15% SDS-PAGE. En los carriles 1 y 6 observamos el marcador de peso molecular, en los carriles 2 y 7 el control. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 6.** Cromatograma de purificación por IMAC de SmbP-escigonadina (21kDa) expresado en *E. coli* SHuffle. Elución en un paso, con una solución amortiguadora con imidazol 200 mM. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 7.** Cromatograma de elución correspondiente a SmbP-escigonadina. Se observa un pico principal de elución a un volumen de aproximadamente 1.4175 mL, con una absorbancia máxima cercana a 1922.33 mAU, lo que indica la presencia predominante de la proteína de interés. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 8.** Gel de SDS-PAGE del 15% después de la purificación en IMAC. En el 1 carril observamos el marcador de peso molecular, en el 2 carril la lisis total, en el 3 carril fracción percolado y las fracciones correspondientes a la elución en los carriles del 4 al 10. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 9.** Curva estándar de BSA obtenida mediante el método de Bradford. Relación entre la concentración de albúmina sérica bovina (BSA) y la absorbancia a 595 nm. Los datos corresponden al promedio de tres mediciones independientes. La línea representa el ajuste de regresión lineal ($y = 0.8348x + 0.1239$; $R^2 = 0.9822$)..... **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 10.** Análisis por SDS-PAGE de tricina del corte enzimático del constructo SmbP-escigonadina. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. El 2 carril corresponde a la muestra posterior a diálisis. El carril 3 corresponde a la digestión enzimática. Del carril 4 al 7 corresponde a la muestra digerida. El carril 8 corresponde a la fracción de lavado. Se observa la presencia de una banda alrededor de 11.27 kDa, correspondiente al péptido escigonadina libre, así como la disminución de la banda del constructo completo (21 kDa), lo que indica el corte enzimático... **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 11.** Actividad antimicrobiana del péptido escigonadina frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB). Los datos representan el crecimiento relativo (%) respecto al control (100%) como promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Evaluado mediante t-tes. Significancia (***) $p < 0.001$ vs control negativo. 55

Figura 12. Actividad antimicrobiana del péptido escigonadina libre frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Los datos representan el crecimiento relativo (%) respecto al control (100%) como promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Evaluado mediante t-tes. Significancia (***) $p < 0.001$ vs control negativo..... 56

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Datos de la curva de calibración estándar de BSA.	50
Tabla 2. De los manejos de residuos generados durante el presente estudio, de acuerdo con los lineamientos establecidos en el Programa Institucional para el Manejo y Gestión de Residuos de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).	64

NOMENCLATURA

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AMPs – Péptidos antimicrobianos (Antimicrobial Peptides)

APS – Persulfato de amonio

BSA – Albúmina sérica bovina

CFU / UFC – Unidades formadoras de colonia

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CRAB – *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos

DO₆₀₀ – Densidad óptica a 600 nm

EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético

GFP – Proteína verde fluorescente

g – Gramo

g/L – Gramos por litro

GS – Linker de glicina-serina

h – Horas

His-tag – Etiqueta de histidina

IMAC – Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranósido

Kan – Kanamicina

kDa – Kilodaltones

L – Litro

LB – Medio Luria-Bertani

log UFC/mL – Logaritmo de unidades formadoras de colonia por mililitro

M – Molar

mL – Mililitro

mL/min – Mililitros por minuto

mM – Milimolar

mg – Miligramos

mg/L – Miligramos por litro

MH – Medio Mueller-Hinton

MIC – Concentración mínima inhibitoria

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

mAu – milli Absorbance Units (milésimas de unidades de absorbancia).

NaCl – Cloruro de sodio

Ni²⁺ – Ion níquel

nm – Nanómetros

OMS – Organización Mundial de la Salud

PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida

pmrB – Gen regulador del sistema PmrA/PmrB

RAM – Resistencia antimicrobiana

rpm – Revoluciones por minuto

SCY / Escigonadina – Péptido escigonadina

SDS – Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

SmbP – (Small metal-binding protein) Pequeña proteína de unión a metales

SmbP-SCY – Proteína de fusión SmbP-escigonadina

TAE – Tris-acetato-EDTA

TBS – Tris-buffered saline

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TGS – Tris-glicina-SDS

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

TrxA – Tioredoxina A

T7 – Promotor T7

UFC/mL – Unidades formadoras de colonia por mililitro

µg – Microgramo

µg/mL – Microgramo por mililitro

µL – Microlitro

µM – Micromolar

°C – Grados Celsius

RESUMEN

Laura María Montenegro Rodríguez

Fecha de graduación: julio 2026

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de la tesis: Evaluación de la actividad antimicrobiana del péptido escigonadina recombinante frente a cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus*

Número de páginas: 70

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método de Estudio: Expresar, purificar y evaluar la actividad antimicrobiana del péptido escigonadina recombinante marcado con SmbP y producido en *Escherichia coli*. El péptido fue liberado de la proteína de fusión mediante digestión enzimática y su actividad se determinó frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) y *Staphylococcus aureus* (MRSA) mediante el método de microdilución para determinar la MIC.

Contribuciones y conclusiones

- Se obtuvo el péptido escigonadina recombinante en cantidades suficientes para su caracterización y evaluación antimicrobiana.
- La identidad del péptido fue confirmada mediante análisis electroforético, en el que se observó el peso molecular esperado.
- Se observó una inhibición casi total del crecimiento de CRAB en todas las concentraciones evaluadas.
- Frente a MRSA, el péptido mostró una actividad significativa, pero parcial, dependiente de la concentración.
- Los resultados evidencian el potencial de la escigonadina como agente antimicrobiano, con mayor eficacia frente a CRAB.

FIRMA DEL ASESOR: _____

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos.

CAPÍTULO 1

1.INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana (RAM) se ha consolidado como una de las principales amenazas para la salud pública a nivel mundial, comprometiendo de manera significativa los avances logrados en medicina moderna en las últimas décadas. Este fenómeno se caracteriza por la capacidad de los microorganismos para sobrevivir a la acción de fármacos previamente eficaces, lo que reduce las opciones terapéuticas disponibles y aumenta la morbilidad asociada a infecciones bacterianas [1,4,35]. Organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) han advertido que, de no implementarse estrategias efectivas para su control, la RAM podría convertirse en una de las principales causas de muerte a nivel global en las próximas décadas, superando incluso a las enfermedades crónicas como el cáncer [1,3].

Actualmente, la resistencia antimicrobiana representa una crisis sanitaria global que impacta tanto a países desarrollados como a países en vías de desarrollo. Se estima que más de 1.2 millones de muertes anuales están directamente relacionadas con infecciones causadas por bacterias resistentes, mientras que un número considerable de fallecimientos adicionales se asocia de manera indirecta a esta problemática [3,35]. Este escenario se ve agravado por diversos factores, entre los que destacan el uso indiscriminado de antibióticos en la práctica clínica, su uso en la producción animal y agrícola, así como la limitada innovación en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos [4,41]. En conjunto, estos factores han favorecido la generación, selección y expansión de cepas bacterianas resistentes en múltiples especies de importancia clínica.

Entre los patógenos bacterianos que representan una mayor amenaza se encuentran *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

(MRSA), ambos reconocidos por su alta capacidad de adaptación, virulencia y resistencia a múltiples clases de antibióticos [2,3]. Estas bacterias están frecuentemente asociadas a infecciones nosocomiales severas, tales como neumonía asociada a ventilación mecánica, bacteriemias, infecciones urinarias y complicaciones en heridas quirúrgicas, que presentan altas tasas de mortalidad y generan una carga significativa para los sistemas de salud [19,21].

Acinetobacter baumannii es una bacteria Gram negativa oportunista que ha emergido como uno de los patógenos hospitalarios más problemáticos a nivel mundial, particularmente en unidades de cuidados intensivos. Su notable capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales adversas y persistir en superficies inanimadas facilita su transmisión nosocomial, lo que contribuye a brotes hospitalarios difíciles de controlar [19].

Las cepas resistentes a carbapenémicos (CRAB) representan una amenaza crítica debido a que los carbapenémicos han sido considerados antibióticos de última línea para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas. La resistencia en estas cepas se debe a una combinación de mecanismos, incluyendo la producción de carbapenemasas, alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa, sobreexpresión de bombas de eflujo y la adquisición de elementos genéticos móviles que facilitan la diseminación horizontal de genes de resistencia [20,34].

Además, la capacidad de *A. baumannii* para formar biopelículas y sobrevivir en condiciones de estrés contribuye significativamente a su persistencia en ambientes clínicos, lo que incrementa la dificultad de erradicación y el riesgo de infecciones recurrentes. Debido a su impacto clínico y epidemiológico, la OMS ha incluido a *A. baumannii* resistente a los carbapenémicos en la categoría de patógenos prioritarios críticos para el desarrollo de nuevos antimicrobianos [2].

Por otro lado *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva que forma parte del microbiota normal de la piel y las mucosas humanas; sin embargo, puede comportarse como un patógeno oportunista, capaz de causar infecciones que van desde cuadros leves hasta enfermedades potencialmente mortales [21].

La aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) ha complicado significativamente el tratamiento de las infecciones asociadas a este microorganismo. Este tipo de resistencia está mediado principalmente por la adquisición del gen *mecA*, que codifica la proteína PBP2a, una proteína fijadora de penicilina con baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos, lo que impide la inhibición eficaz de la síntesis de la pared celular bacteriana [22].

Adicionalmente, muchas cepas de MRSA presentan la capacidad de formar biopelículas, lo que incrementa su resistencia a los tratamientos antibióticos y a la respuesta inmune del hospedador. Este fenómeno favorece la persistencia de infecciones crónicas, especialmente en dispositivos médicos implantables, lo que constituye un desafío clínico significativo [23]. La evolución constante de MRSA ha dado lugar a cepas con mayor virulencia y capacidad de diseminación, lo que subraya la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas [22,23].

Ante el incremento sostenido de bacterias multirresistentes, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas se ha convertido en una prioridad en el ámbito biomédico. En este contexto, los péptidos antimicrobianos (AMPs) han emergido como candidatos prometedores debido a su amplio espectro de actividad, su rapidez de acción y su papel esencial en la inmunidad innata de diversos organismos [5–7,24–28].

Los AMPs son moléculas generalmente cortas, con propiedades anfipáticas y una carga neta que les permite interactuar eficientemente con las membranas celulares bacterianas. Su mecanismo de acción se basa principalmente en la desestabilización de la membrana, lo que conduce a la formación de poros, a la pérdida del contenido intracelular y a la muerte celular [5,7,26,39]. No obstante, estudios recientes han evidenciado que algunos AMPs también pueden interferir con procesos intracelulares esenciales, ampliando así su espectro funcional [36,41].

Desde el punto de vista estructural, los AMPs presentan una gran diversidad, que incluye α -hélices, estructuras β estabilizadas por enlaces disulfuro y conformaciones no convencionales ricas en residuos específicos. Estas características determinan su interacción con las membranas bacterianas y su selectividad frente a las células del hospedador [26–28,38].

Una de las ventajas más relevantes de los AMPs es su menor propensión para inducir resistencia bacteriana en comparación con los antibióticos convencionales, ya que su mecanismo de acción suele actuar sobre múltiples blancos simultáneamente. Esto los posiciona como una alternativa terapéutica viable frente a infecciones causadas por patógenos multirresistentes [27–29,37].

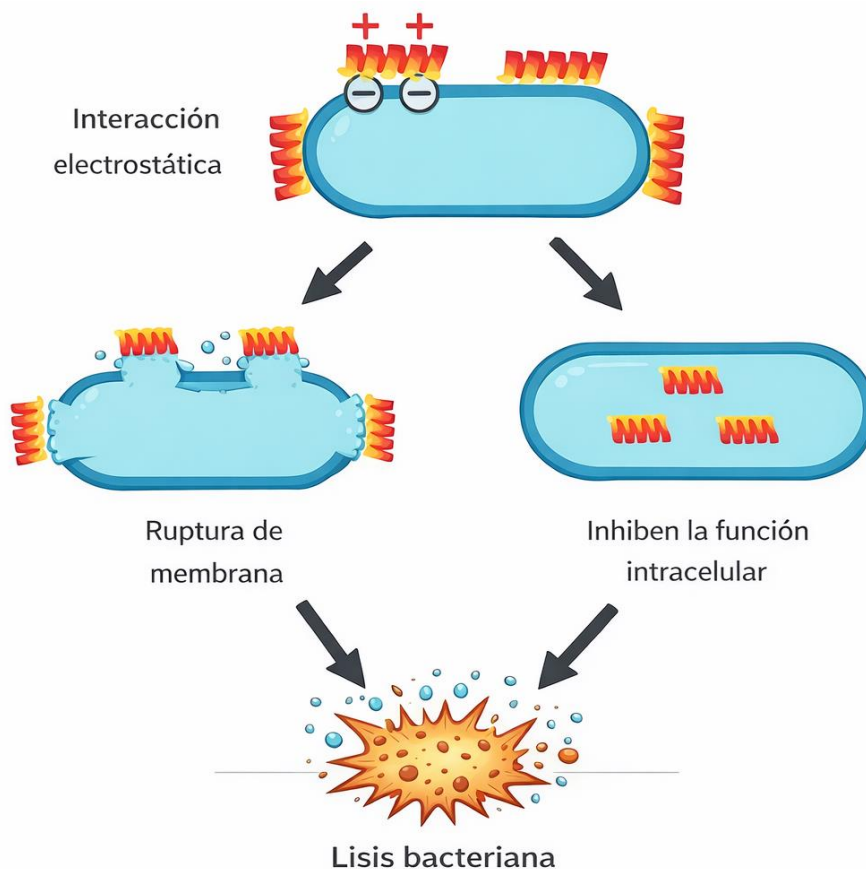


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de acción general de los péptidos antimicrobianos sobre bacterias. Inicialmente ocurre una interacción con la superficie bacteriana, seguida de alteraciones en la membrana celular que pueden provocar su ruptura o interferir en procesos intracelulares esenciales. Estos efectos conducen finalmente a la lisis bacteriana y a la muerte celular [42].

Los ecosistemas marinos constituyen una fuente rica y diversa de compuestos bioactivos con potencial farmacológico. En particular, los péptidos antimicrobianos derivados de organismos marinos han despertado un creciente interés debido a sus propiedades únicas y su eficacia frente a microorganismos patógenos [9,29–32].

Estos péptidos han evolucionado en ambientes altamente competitivos, lo que ha favorecido el desarrollo de estructuras y mecanismos de acción altamente eficientes. Su naturaleza anfipática les permite interactuar con la membrana bacteriana, provocando alteraciones en su integridad y permeabilidad, lo que conduce a la muerte celular [26,31,38].

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) de origen marino han despertado un creciente interés debido a sus propiedades estructurales, las cuales les confieren estabilidad, resistencia a la degradación proteolítica y actividad biológica en diversas condiciones ambientales. Estas características los convierten en candidatos prometedores para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas frente a infecciones causadas por microorganismos multirresistentes [29,32,40].

Entre estos compuestos destaca la escigonadina, un péptido derivado de *Scylla serrata* que ha demostrado actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos. Sus propiedades fisicoquímicas sugieren un mecanismo de acción relacionado con la interacción y alteración de las membranas bacterianas, favoreciendo la inhibición del crecimiento microbiano [5,8,17,26,39].

Desde una perspectiva biotecnológica, la producción recombinante de escigonadina en sistemas de expresión basados en *Escherichia coli* ha permitido obtener cantidades suficientes para su caracterización y evaluación funcional. Asimismo, el empleo de proteínas de fusión, como SmbP, ha contribuido a mejorar la solubilidad, estabilidad y recuperación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad (IMAC) [11,13,14,17]. Adicionalmente, el uso de cepas especializadas como *E. coli* SHuffle favorece la formación adecuada de enlaces disulfuro, aspecto fundamental para la correcta estructura y actividad biológica de este péptido [18].

Considerando el potencial antimicrobiano de la escigonadina, resulta relevante evaluar su actividad frente a patógenos prioritarios como *Acinetobacter baumannii* resistente a

carbapenémicos (CRAB) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), con el fin de explorar su posible aplicación como alternativa terapéutica ante la creciente problemática de la resistencia bacteriana.

Debido a la creciente problemática de la resistencia antimicrobiana, aunada a la limitada disponibilidad de nuevos antibióticos eficaces, se pone de manifiesto la necesidad urgente de explorar alternativas terapéuticas innovadoras. En este escenario, los péptidos antimicrobianos han surgido como una estrategia prometedora debido a su diversidad estructural, su amplio espectro de actividad y a los mecanismos de acción que dificultan el desarrollo de la resistencia bacteriana [27–29,37].

En particular, los péptidos de origen marino representan una fuente prometedora de moléculas bioactivas con potencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente a infecciones causadas por microorganismos multirresistentes [29,32,40]. Entre ellos, la escigonadina ha despertado interés debido a sus características estructurales y funcionales, las cuales sugieren un mecanismo de acción asociado con la interacción y alteración de las membranas bacterianas. Este mecanismo podría ofrecer ventajas frente a algunos antibióticos convencionales y reducir la probabilidad de aparición de resistencia bacteriana [8,17,41].

Asimismo, los avances en biotecnología han impulsado el desarrollo de sistemas eficientes para la producción recombinante de péptidos antimicrobianos, permitiendo superar las limitaciones asociadas a su obtención a partir de fuentes naturales. En este sentido, los sistemas de expresión basados en *Escherichia coli*, junto con el empleo de etiquetas de fusión como SmbP, han demostrado ser herramientas eficaces para incrementar la solubilidad, estabilidad y recuperación de proteínas recombinantes, facilitando tanto su purificación como su posterior caracterización [11,13,14].

Bajo este contexto, resulta relevante evaluar la actividad antimicrobiana de la escigonadina frente a patógenos de importancia clínica, como *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), los cuales representan una amenaza creciente para la salud pública debido a las limitadas opciones terapéuticas disponibles [2,3]. El estudio de este péptido no solo contribuye a la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas, sino que también amplía el conocimiento sobre sus mecanismos de acción y su posible aplicación en el combate de la resistencia bacteriana.

De esta manera, la investigación sobre la producción, purificación y evaluación funcional de la escigonadina se posiciona como una línea de estudio relevante en el campo de la microbiología aplicada, con implicaciones tanto científicas como clínicas en la búsqueda de soluciones frente a la crisis global de la resistencia antimicrobiana.

CAPITULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1 Escigonadina.

Entre los péptidos antimicrobianos de origen marino, la escigonadina (Scygonadin, SCY) ha sido identificada como una molécula con potencial de actividad antimicrobiana e interés biotecnológico. Este péptido fue originalmente aislado del plasma seminal del cangrejo *Scylla serrata*, donde forma parte del sistema inmunológico innato y desempeña un papel importante en la defensa frente a microorganismos patógenos [8].

La escigonadina está compuesta por aproximadamente 102 aminoácidos y presenta un peso molecular cercano a 11.27 kDa. Desde el punto de vista estructural, se ha descrito que presenta regiones con potencial para formar enlaces disulfuro, lo cual es esencial para su estabilidad conformacional y su actividad biológica [8,15]. Estas características estructurales sugieren que su actividad antimicrobiana podría estar asociada tanto a interacciones con membranas bacterianas como a mecanismos más complejos que implican la alteración de procesos celulares esenciales [26,38].

Diversos estudios han demostrado que la escigonadina presenta actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo *Micrococcus luteus* y *Aeromonas hydrophila*, lo que evidencia su amplio espectro de acción [8]. De manera más reciente, investigaciones han comenzado a explorar su eficacia frente a bacterias de relevancia clínica, destacando su potencial como agente antimicrobiano contra patógenos multirresistentes [17,41].

Asimismo, se ha propuesto que la escigonadina podría presentar mecanismos de acción distintos a los de los péptidos antimicrobianos clásicos, particularmente debido a su naturaleza estructural y a su posible comportamiento aniónico en determinadas condiciones, lo que abre nuevas perspectivas en el estudio de AMPs no convencionales [36,39]. En este contexto, el estudio de este péptido no solo resulta significativo desde el punto de vista terapéutico, sino también para comprender la diversidad funcional de los sistemas de defensa innatos en organismos marinos.

2.2 Producción recombinante de péptidos antimicrobianos.

La obtención de péptidos antimicrobianos a partir de fuentes naturales presenta limitaciones importantes, como bajos rendimientos, variabilidad en la composición y dificultades en los procesos de purificación. Debido a ello, la producción recombinante en sistemas heterólogos se ha consolidado como una estrategia eficiente para obtener estos compuestos en cantidades suficientes para su caracterización y aplicación [10,13–16].

Entre los sistemas de expresión más utilizados, *Escherichia coli* destaca por su rápido crecimiento, facilidad de manipulación genética, bajo costo de cultivo y capacidad para producir proteínas recombinantes a gran escala [13]. No obstante, la expresión de péptidos antimicrobianos en este organismo puede verse limitada por factores como la toxicidad para la célula hospedadora, la formación de cuerpos de inclusión y la degradación proteolítica [10,14].

Para superar estas limitaciones, se han desarrollado diversas estrategias biotecnológicas, incluyendo la optimización de codones, el uso de promotores fuertes, como el sistema T7, la expresión en condiciones controladas de temperatura y el empleo de etiquetas de fusión que incrementan la solubilidad y la estabilidad de los péptidos [13,16].

La producción recombinante no solo permite obtener mayores cantidades de péptido, sino que también facilita la introducción de modificaciones dirigidas que pueden mejorar su actividad antimicrobiana, su estabilidad estructural o su especificidad frente a determinados microorganismos [10,41]. En este sentido, esta estrategia resulta fundamental para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos basados en péptidos.

2.3 Proteínas de fusión y sistema SmbP.

El uso de proteínas de fusión representa una de las estrategias más efectivas para mejorar la expresión y purificación de péptidos antimicrobianos en sistemas recombinantes. Estas proteínas actúan como “portadores” que aumentan la solubilidad del péptido, lo protegen frente a la degradación y facilitan su recuperación durante los procesos de purificación [14].

Entre las proteínas de fusión más recientes destaca SmbP (Small metal-binding protein), una proteína periplásmica originalmente identificada en *Nitrosomonas europaea*. Esta proteína está compuesta por aproximadamente 93 aminoácidos y presenta un peso molecular cercano a 9.9 kDa, lo que la convierte en una etiqueta de fusión de tamaño reducido en comparación con otras proteínas utilizadas comúnmente [11].

Una de las características más relevantes de SmbP es su capacidad para unirse a iones metálicos divalentes como Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} , lo que permite su uso en sistemas de purificación mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Esta propiedad elimina la necesidad de añadir etiquetas adicionales, como la poli-histidina, lo que simplifica el diseño de los constructos recombinantes [11,14].

El uso de SmbP como etiqueta de fusión presenta múltiples ventajas, entre ellas su alta solubilidad, su estabilidad estructural y su capacidad para mejorar la expresión de péptidos difíciles de producir. Además, se ha demostrado que esta proteína puede actuar como un elemento protector frente a la degradación proteolítica, lo cual resulta especialmente relevante en la producción de péptidos antimicrobianos [11,17].

En el caso de la escigonadina, el uso de SmbP ha permitido mejorar significativamente los niveles de expresión y facilitar su purificación, manteniendo su actividad biológica tras la remoción de la etiqueta mediante proteasas específicas [17]. Esto posiciona a SmbP como una herramienta biotecnológica clave para el desarrollo de sistemas de producción eficientes de péptidos antimicrobianos.

2.4 Sistema de expresión pET30a.

El sistema de expresión pET es uno de los más utilizados para la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Este sistema se basa en el uso del promotor T7, que permite una expresión altamente controlada y eficiente del gen de interés tras la inducción con IPTG [16].

El vector pET30a es ampliamente utilizado debido a su versatilidad, ya que permite la inserción de genes de interés en marcos de lectura que incluyen etiquetas de purificación y sitios de corte proteolítico. En este tipo de construcciones, el péptido antimicrobiano puede fusionarse a proteínas como SmbP, lo que facilita su expresión y su posterior purificación mediante IMAC [11,17].

Adicionalmente, estos sistemas suelen incorporar sitios de reconocimiento para enzimas proteolíticas específicas, como la enteroquinasa, lo que permite separar la proteína de fusión del

péptido de interés tras la purificación. Este paso es fundamental para recuperar el péptido en su forma activa y funcional [17].

El sistema pET30a, en combinación con estrategias de fusión y condiciones de expresión optimizadas, ha demostrado ser una plataforma robusta para la producción de péptidos antimicrobianos recombinantes con aplicaciones tanto en investigación como en desarrollo biotecnológico.

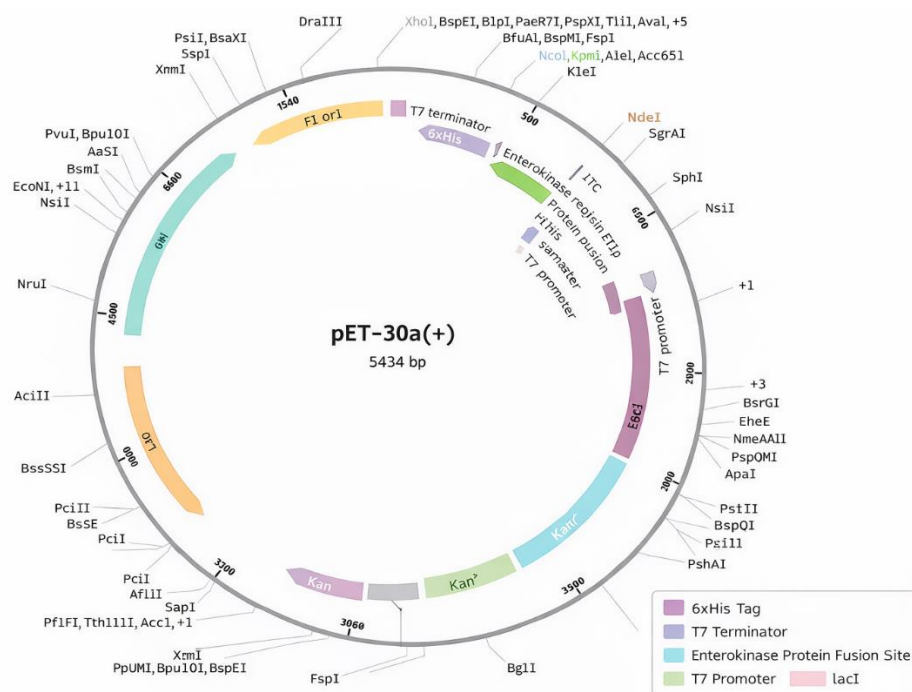


Figura 2. Sistema de expresión basado en promotor T7 (pET30a) para la producción recombinante de péptidos antimicrobianos.

2.5 Expresión en *E. coli* SHuffle.

La correcta formación de enlaces disulfuro es un factor crítico para la estabilidad y actividad biológica de muchos péptidos antimicrobianos. Sin embargo, el citoplasma de *Escherichia coli*

presenta un ambiente reductor que dificulta la formación de estos enlaces, lo que puede afectar negativamente el plegamiento de proteínas recombinantes [15].

Para abordar esta limitación, se han desarrollado cepas modificadas, como *E. coli* SHuffle, que presentan alteraciones en las vías redox celulares que favorecen la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma. Estas cepas presentan mutaciones en genes como *trxB* y *gor*, lo que propicia un ambiente más oxidante para el plegamiento correcto de proteínas complejas [18].

El uso de cepas SHuffle ha demostrado mejorar significativamente la solubilidad, la estabilidad y la actividad biológica de proteínas recombinantes que contienen enlaces disulfuro. En el caso de péptidos antimicrobianos como la escigonadina, esta estrategia resulta particularmente relevante, ya que permite obtener productos funcionales sin necesidad de procesos adicionales de refolding [18].

CAPITULO 3

3. Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

El péptido antimicrobiano aniónico escigonadina recombinante, producido en *Escherichia coli* y fusionado a la proteína SmbP, presentará actividad antimicrobiana contra *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), con una concentración inhibitoria mínima (MIC) cercana a 15 μ M.

3.2 Objetivo general

Determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) del péptido escigonadina recombinante frente a cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus*.

3.3 Objetivos específicos

- 1- Expresar, purificar y caracterizar el péptido escigonadina recombinante producido en *Escherichia coli*.
- 2- Evaluar la actividad antimicrobiana del péptido escigonadina recombinante frente a cepas de CRAB y MRSA mediante el método de microdilución en caldo.
- 3- Determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) del péptido frente a ambas bacterias.

CAPITULO 4

4. Metodología

El péptido escigonadina se obtendrá mediante transformación con el ADN plasmídico. Las cepas bacterianas que se utilizarán, *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), serán aisladas y caracterizadas por el Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Universitario. Los medios de cultivo, reactivos y demás materiales necesarios para llevar a cabo los ensayos, incluidos los kits para la preparación de soluciones y la determinación de la actividad antimicrobiana, serán adquiridos de proveedores especializados.

4.1 Metodología General

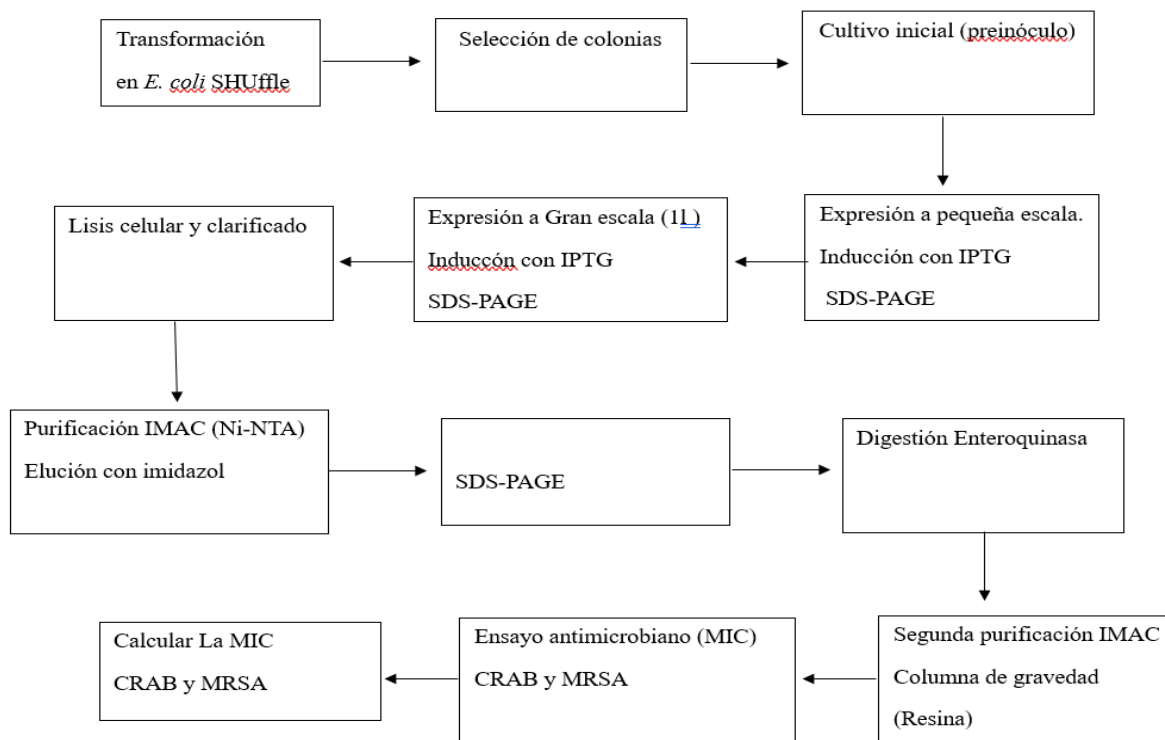


Figura 3. Metodología general de trabajo

4.2 Expresión y purificación del péptido.

Utilizando un ADN plasmídico positivo, se llevó a cabo la transformación en la cepa *E. coli* SHuffle, la cual se utiliza para la expresión de proteínas con enlaces disulfuro. En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 30 μ L de células calcio-competentes más 1.5 μ L (10 – 15 ng) de ADN plasmídico; se incubaron en hielo durante 30 min y, posteriormente, se llevó a cabo el choque térmico a 42 °C durante 45 segundos; una vez finalizada la reacción, se incubaron en hielo durante 2 min. Después, se añadieron 800 μ L de caldo LB y se mezcló suavemente, la reacción se incubó a 37 °C con agitación (150 rpm) por 1 hora. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 13,300 rpm durante 2 min; se retiró el exceso de medio, dejando aproximadamente 100 μ L, en los que se resuspendieron y se sembraron las células en placas de LB/kanamicina mediante la técnica de extensión por varilla; finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

4.2.1 Microexpresión.

De las placas con células transformadas, se tomaron diversas colonias las cuales fueron sembradas en un tubo con 2 mL de caldo LB/kanamicina y se incubaron a 37 °C con agitación (150 rpm) hasta que alcanzaran una D.O.600 entre 0.4 – 0.6, cuando los inóculos alcanzaron esta D.O. se agregaron 2 μ L de Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.1 M alcanzando una concentración final de 0.2 mM; después se incubaron a 25 °C con agitación (150 rpm) por 16 horas.

La biomasa se recolectó mediante centrifugación a 13,000 rpm por 4 minutos y se descartó el sobrenadante. Se llevó a cabo una lisis alcalina utilizando sample buffer 6x (2.4 mL Tris-HCl 1M pH 6.08, 4 mL glicerol 100%, 0.8 g SDS, 4 mg azul de bromofenol, 0.5 mL β -mercaptoetanol, 3.1 mL agua destilada). El pellet fue resuspendido en 100 μ L de agua estéril y 20 μ L de buffer a una concentración final de 1X. Finalmente, se llevó a incubar en baño de agua a 80 °C por 10 minutos para desnaturalizar la estructura secundaria de la proteína.

4.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La caracterización de las proteínas obtenidas durante el proceso de expresión se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se preparó un gel de resolución al 15% mezclando 1.775 mL de agua destilada, 1.875 mL de acrilamida al 40%, 1.250 mL de buffer de resolución (Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8), 50 μ L de SDS al 10%, 2.5 μ L de TEMED y 25 μ L de persulfato de amonio (APS) al 10%. Posteriormente se preparó un gel de apilamiento al 4%, compuesto por 3.8 mL de agua destilada, 0.5 mL de acrilamida al 40%, 1.250 mL de buffer de apilamiento (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8), 50 μ L de SDS al 10%, 2.5 μ L de TEMED y 25 μ L de persulfato de amonio al 10%.

Como sistema amortiguador para la corrida electroforética se utilizó buffer de electrodos Tris-glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS, pH aproximado de 8.3). El gel de resolución se vertió cuidadosamente entre dos placas de vidrio del sistema de electroforesis y se añadieron 200 μ L de butanol sobre la superficie para evitar la formación de burbujas y permitir una polimerización adecuada. El gel se dejó solidificar durante 30 minutos. Posteriormente, se retiró el butanol y el gel se lavó tres veces con agua destilada para eliminar los residuos. A continuación, se vertió el gel de apilamiento al 4% y se dejó polimerizar durante 25 minutos.

Una vez preparado el sistema, se cargaron 3 μ L de cada muestra en los pozos del gel, junto con 3 μ L de marcador de peso molecular New England Biolabs (NEB, utilizado como referencia para estimar el peso molecular de las proteínas analizadas. La corrida electroforética se llevó a cabo inicialmente a 80 V durante 10 minutos para permitir el apilamiento de las proteínas, seguida de 110 V durante aproximadamente 1.3 horas para la separación de las bandas proteicas.

Finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue para visualizar las bandas proteicas. Posteriormente se realizó un proceso de decoloración hasta obtener un fondo claro que permitiera distinguir adecuadamente las proteínas separadas.

El peso molecular de las proteínas observadas se estimó mediante la comparación con el marcador de peso molecular, con un rango de masas moleculares de 10 a 200 kDa, compuesto por 13 bandas de referencia correspondientes a 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 150 y 200 kDa. En particular, se detectó una banda correspondiente a la proteína de fusión SmbP-escigonadina, con un peso molecular aproximado de 21.17 kDa, resultado de la suma del dominio SmbP (9.8 kDa) y del péptido escigonadina (11.27 kDa).

4.3 Escalamiento de la expresión de proteínas a 1 L de medio de cultivo

Para la expresión del constructo SmbP-escigonadina, se inocularon 200 μ L de células transformadas de *Escherichia coli* SHuffle en 10 mL de medio LB suplementado con kanamicina a 30 μ g/mL. El cultivo se incubó a 37 °C, con agitación a 150 rpm, durante aproximadamente 16 horas, con el objetivo de obtener un cultivo inicial.

Posteriormente, la expresión a mayor escala se realizó utilizando cinco matraces de 500 mL, cada uno con 200 mL de medio LB con kanamicina (30 μ g/mL), para un volumen total de cultivo de 1 L. Cada matraz fue inoculado con el cultivo previo y se incubó a 37 °C y 150 rpm durante 3–4

horas, hasta que los cultivos alcanzaron una densidad óptica a 600 nm (OD600) entre 0.4 y 0.6.

Una vez alcanzada la fase de crecimiento deseada, se indujo la expresión del constructo mediante la adición de 200 μ L de IPTG, obteniéndose una concentración final de 1 M. Después de la inducción, los cultivos se incubaron a 25 °C con agitación a 150 rpm durante 16 horas para favorecer la producción de la proteína recombinante.

4.3.1 Lisis celular y obtención de clarificado

Finalizado el periodo de expresión, las células bacterianas fueron recolectadas mediante centrifugación refrigerada a 4 °C durante 15 minutos a 12,000 rpm, utilizando tubos de 500 mL. Los pellets celulares obtenidos fueron resuspendidos en un buffer de lisis compuesto por 50 mM de Tris y 500 mM de NaCl, ajustado a pH 8.08.

Para facilitar la ruptura celular se añadieron 22 g de perlas de vidrio de 0.1 mm, junto con 10 μ L de cóctel inhibidor de proteasas y 10 μ L de antiespumante, con el fin de evitar la degradación proteica y la formación excesiva de espuma durante el proceso de lisis. Las muestras fueron sometidas a agitación en vórtex durante 10 minutos, alternando periodos de vórtex con incubaciones en hielo para evitar el aumento de la temperatura del lisado.

Posteriormente, el material celular fue sometido a centrifugación refrigerada a 4 °C durante 20 minutos a 12,000 rpm para separar los restos celulares insolubles. Finalmente, el sobrenadante clarificado, que contiene proteínas solubles, fue cuidadosamente transferido a un tubo Falcon de 50 mL limpio para su purificación posterior.

4.3.2 Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC).

La purificación de la proteína recombinante SmbP-escigonadina se llevó a cabo en un sistema ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare) mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC). Este método se basa en la interacción entre los residuos de histidina presentes en la etiqueta 6xHis de la proteína de fusión y los iones metálicos inmovilizados en la matriz cromatográfica, que pueden ser níquel, cobre o zinc.

Para la purificación, se empleó una columna HisTrap FF de 1 mL, previamente cargada con iones de Ni(II). Antes de la aplicación de la muestra, la columna fue equilibrada con cinco volúmenes de buffer de equilibrio (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.08), manteniendo un flujo de 0.7 mL/min y una presión máxima de 0.5 MPa.

Posteriormente, el lisado celular previamente clarificado se cargó en la columna, recolectando simultáneamente el percolado correspondiente a las proteínas que no presentaron afinidad por la resina. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó con 10 volúmenes del mismo buffer de equilibrio (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.08) con el fin de eliminar proteínas unidas de manera inespecífica, y el lavado se continuó hasta que la absorbancia registrada descendió a aproximadamente 0.09 a 280 nm.

La elución de la proteína recombinante se realizó mediante la adición directa de un buffer de elución compuesto por 50 mM Tris, 500 mM NaCl y 200 mM de imidazol ajustado a pH 8.0, el cual compite con las histidinas de la proteína por los sitios de unión del níquel. La elución se efectuó en un solo paso utilizando la concentración máxima de imidazol, recolectándose tres fracciones consecutivas de 1 mL cada una, manteniendo un flujo constante de 0.7 mL/min y una presión menor a 0.5 MPa.

Las fracciones obtenidas se analizaron posteriormente para evaluar la presencia y la pureza de la proteína recombinante.

4.3.3 Análisis de las fracciones de la expresión a escala de 1 L mediante SDS-PAGE

Con el objetivo de evaluar la presencia y el peso molecular de la proteína recombinante obtenida tras la purificación por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), se analizaron las fracciones correspondientes al pico de elución mediante electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Para la separación de las proteínas se preparó un gel de resolución al 15%, el cual se obtuvo mezclando 1.775 mL de agua destilada, 1.875 mL de solución de acrilamida al 40%, 1.250 mL de buffer de resolución (pH 8.8), 50 µL de SDS al 10%, 2.5 µL de TEMED y 25 µL de persulfato de amonio (APS) al 10%. Posteriormente se preparó el gel de apilamiento al 4%, compuesto por 3.8 mL de agua destilada, 0.5 mL de acrilamida al 40%, 1.250 mL de buffer de resolución (pH 8.8), 50 µL de SDS al 10%, 2.5 µL de TEMED y 25 µL de persulfato de amonio al 10%.

Las fracciones recolectadas durante la etapa de elución fueron cargadas en los pocillos del gel para su análisis electroforético, lo que permitió observar el patrón de bandas proteicas y confirmar la presencia de la proteína recombinante de interés.

4.3.4 Diálisis para la remoción de imidazol

Las fracciones obtenidas durante la etapa de elución fueron sometidas a diálisis para eliminar el imidazol del buffer de elución. Para ello, las muestras se colocaron en una membrana de diálisis SnakeSkin™ con un peso molecular de corte (MWCO) de 10 kDa, que permite la difusión de

moléculas pequeñas, como el imidazol, mientras retiene las proteínas de mayor tamaño.

Posteriormente, la membrana fue sumergida en un buffer de diálisis frío compuesto por 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl, ajustado a pH 8.0, manteniendo una agitación suave para favorecer el intercambio de solutos. Se realizaron tres cambios de buffer de diálisis, cada uno de 1 hora, con el fin de asegurar la eliminación progresiva del imidazol. Finalmente, se realizó un cuarto cambio de buffer y la muestra se mantuvo en diálisis durante toda la noche.

El proceso de diálisis se llevó a cabo a temperatura ambiente (24 °C) para preservar la estabilidad de la proteína recombinante.

4.3.5 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford

La concentración de proteína en las muestras se determinó mediante el método de Bradford, que se basa en la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con los grupos básicos y aromáticos presentes en las proteínas, lo que produce un cambio en la absorbancia proporcional a la concentración proteica.

Para la cuantificación se construyó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar, empleando un rango de concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.3 µg/mL. En cada celda se colocaron 20 µL de las diferentes diluciones del estándar, a los cuales se añadieron 1 mL de reactivo de Bradford preparado a una concentración de 1X.

Las mezclas se homogenizaron suavemente y se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y en completa oscuridad para permitir el desarrollo completo de la reacción colorimétrica. Posteriormente, la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 595 nm utilizando un espectrofotómetro JENWAY (7305), y los valores obtenidos se emplearon para construir la curva estándar. Finalmente, la concentración de proteína en las muestras se determinó

mediante la interpolación de los valores de absorbancia obtenidos en la curva de calibración.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio $\pm$ desviación estándar.

4.3.6 Remoción del tag de afinidad mediante digestión con enteroquinasa

La separación del péptido de interés a partir de la proteína de fusión SmbP-escigonadina se llevó a cabo mediante digestión enzimática con enteroquinasa porcina de cadena ligera (GenScript), que reconoce específicamente el sitio de clivaje diseñado entre la proteína portadora y el péptido.

Para la digestión se utilizó la totalidad de la proteína obtenida tras el proceso de diálisis y cuantificada mediante el método de Bradford, correspondiente a 3 mL de muestra. A esta solución proteica se añadieron 6.4 μ L de enteroquinasa (100 μ g/ μ L) y la reacción se incubó a 22 °C durante 22 horas, permitiendo la escisión del péptido escigonadina del dominio de fusión SmbP.

4.3.7 Segunda purificación en columna de gravedad con resina de afinidad

Después de la digestión enzimática con enteroquinasa, se realizó una segunda purificación en una columna de gravedad con resina de afinidad a histidinas, con el objetivo de separar el péptido escigonadina de la proteína portadora SmbP. Este procedimiento se basa en que las proteínas que conservan la etiqueta de histidina presentan afinidad por la resina, mientras que el péptido liberado se recupera principalmente en la fracción no retenida.

Para ello, se colocaron 2.5 mL de resina en una columna de gravedad y se permitió el drenaje del líquido de conservación. Posteriormente, la resina se lavó con 8 volúmenes de agua destilada (8 mL en total) para eliminar el conservante. Una vez acondicionada, la columna se equilibró con 5

volúmenes de buffer de equilibrio compuesto por 50 mM Tris y 500 mM NaCl, pH 8.0, equivalentes a 5 mL.

Posteriormente, se aplicó a la columna la muestra digerida completa (3 mL), lo que permitió su interacción con la resina. La columna se mantuvo en incubación a 4 °C durante 1 hora, realizando una homogenización suave cada 15 minutos para favorecer la unión de las proteínas con afinidad por la matriz.

Finalizado el tiempo de incubación, se retiró el tapón inferior de la columna y se recolectó el percolado, correspondiente a la fracción que no se unió a la resina y en la que se recuperó principalmente el péptido escigonadina. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 1 mL de buffer de equilibrio cada uno (2 mL en total), recolectando cada fracción por separado.

Finalmente, las proteínas retenidas en la resina fueron recuperadas mediante tres eluciones consecutivas, utilizando 2.5 mL de buffer de elución en cada una. Las fracciones obtenidas durante este procedimiento fueron analizadas posteriormente mediante Tricine-SDS-PAGE, que permite una mejor resolución de proteínas y péptidos de bajo peso molecular. Para ello se empleó un gel al 15%, con el objetivo de verificar la eficiencia del corte enzimático y observar la separación de las bandas correspondientes a SmbP (9.8 kDa) y escigonadina (11.27 kDa)

4.3.8 Preparación del gel de Tricine (SDS-PAGE).

Para el análisis de proteínas y péptidos de bajo peso molecular se utilizó un sistema Tricine-SDS-PAGE, que permite una mejor resolución de proteínas pequeñas en comparación con el sistema SDS-PAGE convencional. Se preparó un gel de resolución al 15% utilizando una solución de acrilamida al 30%.

La mezcla para el gel de resolución al 15% se preparó combinando 2.500 mL de acrilamida al

30%, 2.300 mL de buffer de resolución, 0.145 mL de agua destilada, 3 μ L de TEMED y 50 μ L de persulfato de amonio (APS). La solución se mezcló suavemente y se vertió entre las placas de vidrio del sistema de electroforesis hasta alcanzar la altura deseada. El gel se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Posteriormente se preparó el gel de apilamiento al 4%, mezclando 0.660 mL de acrilamida al 30%, 0.760 mL de buffer de apilamiento, 3.420 mL de agua destilada, 5 μ L de TEMED y 150 μ L de APS. Esta mezcla se vertió sobre el gel de resolución previamente polimerizado y se colocó el peine para formar los pocillos. El gel se dejó solidificar por completo antes de su uso.

Para la preparación de las muestras se mezclaron 10 μ L de muestra proteica con 10 μ L de buffer de carga (Sample Buffer 2X) en un microtubo. La mezcla se incubó a 80 °C durante 3 minutos para favorecer la desnaturalización de las proteínas.

Posteriormente, las muestras se cargaron en los pocillos del gel utilizando 3.5 μ L de muestra por pocillo.

La electroforesis se llevó a cabo utilizando buffer de corrida tricina compuesto por 100 mM Tris, 100 mM tricina y 0.1% (p/v) SDS. Este buffer se preparó disolviendo 12.1 g de Tris base, 17.9 g de tricina y 1 g de SDS en 1 L de agua desionizada, sin necesidad de ajustar el pH. Aplicando inicialmente 100 V durante aproximadamente 20–30 minutos para permitir el apilamiento de las proteínas. Posteriormente, el voltaje se incrementó a 125 V, manteniendo la corrida hasta completar la separación de las bandas proteicas

4.3.9 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el Departamento de Patología Clínica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, ubicado en Monterrey, Nuevo León.

La actividad antimicrobiana del constructo SmbP-escigonadina se evaluó frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Acinetobacter baumannii* resistente a los carbapenémicos (CRAB) mediante el método de dilución en microplaca, con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC).

Las colonias frescas de los aislados clínicos se cultivaron en agar LB e incubaron a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se seleccionaron 3-4 colonias aisladas de la placa y se suspendieron en solución salina estéril, ajustando la turbidez de la suspensión bacteriana a 0.5 en la escala de McFarland.

Una vez ajustada la densidad celular, las suspensiones bacterianas se diluyeron en caldo Mueller-Hinton (MH). Posteriormente, se realizó una dilución 1:100, agregando 100 µL de la suspensión bacteriana a 9.9 mL de medio estéril, con el objetivo de obtener una concentración final aproximada de 5×10^5 UFC/mL.

La concentración inicial del péptido escigonadina se preparó a 8 µM, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas para obtener las concentraciones finales de 8 µM, 4 µM, 2 µM, 1 µM, 0.5 µM y 0.25 µM.

Las pruebas se realizaron en placas de microtitulación estériles de 96 pozos, en las cuales se distribuyeron las diferentes concentraciones del constructo junto con el inóculo bacteriano correspondiente. Cada pozo contenía el volumen adecuado de medio de cultivo, la suspensión

bacteriana y la concentración correspondiente del péptido recombinante.

Durante el ensayo se incluyeron controles positivos y negativos, así como un blanco, con el fin de validar los resultados obtenidos. El control positivo consistió en pozos que contenían el inóculo bacteriano en el medio correspondiente, sin la adición del péptido, con el objetivo de confirmar la viabilidad y el crecimiento normales de las bacterias. El control negativo estuvo compuesto por medio estéril sin inóculo bacteriano, lo que permitió verificar la ausencia de contaminación en el sistema. Por su parte, el blanco consistió en pozos que contenían únicamente el medio de cultivo, utilizados para ajustar la lectura de absorbancia en el lector de microplacas. Los valores de absorbancia obtenidos para cada tratamiento se normalizaron respecto al control de crecimiento, considerado como el 100 % de crecimiento bacteriano. El porcentaje de crecimiento relativo se calculó mediante la ecuación:

$$\text{Crecimiento relativo (\%)} = (\text{Absorbancia del tratamiento} / \text{Absorbancia del control de crecimiento}) \times 100$$

Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Posteriormente, el crecimiento bacteriano se evaluó mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm con un lector de microplacas.

La actividad antimicrobiana de la escigonadina se determinó a partir de la reducción del crecimiento bacteriano en comparación con el control de crecimiento. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como promedio $\pm$ desviación estándar.

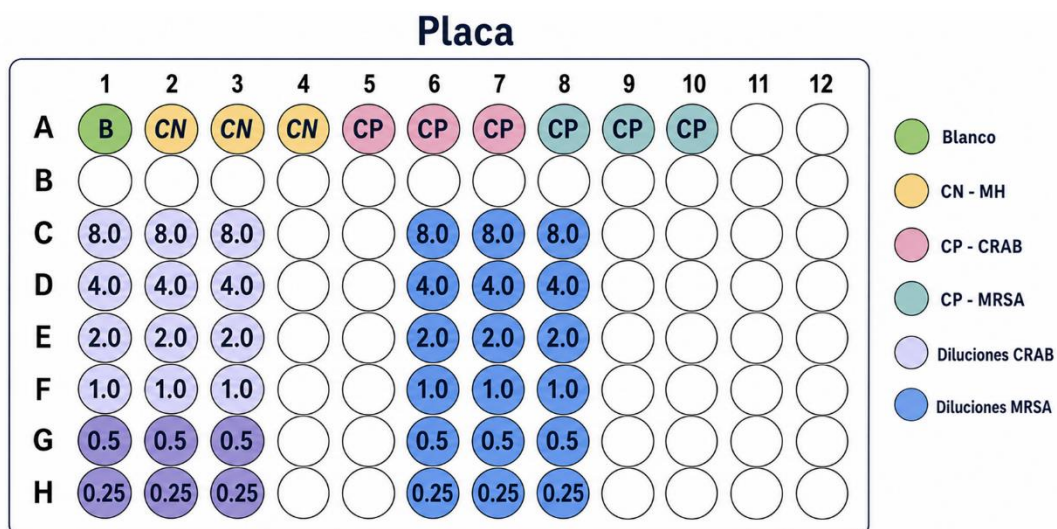


Figura 4. Diseño de la placa de microdilución utilizada para la determinación de la actividad antimicrobiana de escigonadina recombinante frente a (CRAB) y (MRSA). Se incluyeron controles negativos (CN), controles positivos (CP), blanco de medio (B) y diluciones seriadas del péptido en concentraciones de 8.0 a 0.25 μ M, evaluadas por triplicado

CAPITULO 5

5. Resultados

5.1 Transformación y expresión del constructo recombinante SmbP-escigonadina

La obtención del constructo recombinante SmbP-escigonadina comenzó con la transformación de células competentes de *Escherichia coli* SHuffle. Posteriormente, las bacterias fueron sembradas en medio LB suplementado con kanamicina, observándose el crecimiento de colonias bajo condiciones de selección. Este resultado confirmó la incorporación exitosa del plásmido recombinante y permitió la obtención de clones viables para los ensayos posteriores de expresión proteica.

Para evaluar la producción de la proteína recombinante, las células transformadas fueron cultivadas en medio LB con kanamicina, incubadas inicialmente a 37 °C e inducidas posteriormente con IPTG. Tras la inducción, los cultivos se mantuvieron a 25 °C para favorecer la expresión del constructo SmbP-escigonadina, la cual fue analizada mediante SDS-PAGE.

En la Figura 5 se muestra el perfil electroforético correspondiente a la expresión a pequeña escala. El carril 1 corresponde al control de la cepa *E. coli* SHuffle, mientras que el carril 2 corresponde al marcador de peso molecular. En los carriles del 3 al 6, correspondientes a las muestras inducidas, se observa una banda intensa alrededor de 21.1 kDa, consistente con el peso molecular teórico de la proteína de fusión SmbP-escigonadina.

La ausencia de esta banda en el control y su presencia en las muestras inducidas indican que la expresión del constructo fue exitosa. Asimismo, la intensidad de la banda observada sugiere una producción adecuada de la proteína recombinante en las condiciones de cultivo empleadas.

Para confirmar la consistencia del sistema, se realizó un segundo análisis (Figura 5), en el que se observa nuevamente una banda definida cercana a 21 kDa en los carriles correspondientes a las muestras inducidas (del 8 al 10), mientras que los controles (del 2 y del 7) no presentan dicha señal. En conjunto, estos resultados demuestran que la transformación de *E. coli* SHuffle fue exitosa y que las condiciones de inducción empleadas permitieron la expresión reproducible del constructo SmbP-escigonadina, lo que permitió continuar con las etapas posteriores de purificación y caracterización del péptido.

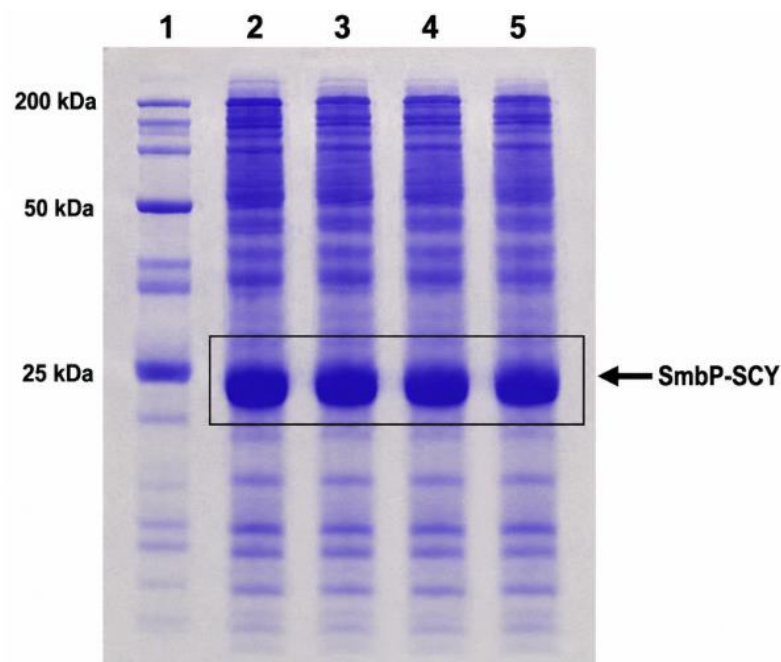


Figura 5. Microexpresión de SmbP-SCY en *E. coli* SHuffle en SDS-PAGE al 15%. Donde se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular, y del carril 2 al 5 la expresión a pequeña escala de SmbP-SCY.

5.1.2 Expresión a gran escala y purificación del constructo SmbP-escigonadina

Una vez confirmada la expresión del constructo SmbP-escigonadina a pequeña escala, se procedió a escalar el proceso de producción a un volumen total de 1 L de cultivo, con el objetivo de obtener una mayor cantidad de proteína recombinante para su posterior purificación y caracterización.

Bajo las mismas condiciones previamente establecidas, las células de *E. coli* SHuffle transformadas fueron cultivadas en medio LB suplementado con kanamicina, incubadas inicialmente a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial, seguidas de la inducción con IPTG y una incubación posterior a 25 °C. Estas condiciones favorecieron la producción de la proteína recombinante, lo que permitió obtener una biomasa suficiente para los procesos de purificación.

La purificación de la proteína de fusión se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), aprovechando la presencia de la etiqueta de histidinas en el constructo. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la Figura 6, donde se observa un incremento notable en la absorbancia a 254 nm durante la fase de elución, lo que indica la liberación de proteínas retenidas en la columna.

Durante la etapa de elución, realizada con un buffer que contenía 200 mM de imidazol, se registró un pico bien definido, lo que sugiere la recuperación de la proteína recombinante con afinidad por la resina. Este comportamiento es característico de proteínas que presentan etiquetas de histidina, ya que el imidazol compite con los iones metálicos de la columna por los sitios de unión.

Con el fin de analizar con mayor detalle la fracción correspondiente al pico de elución, se generó el cromatograma mostrado en la Figura 7, donde se observa un máximo de absorbancia en un volumen aproximado de 1.4175 mL, con un valor cercano a 1922 mAu. Este pico indica la concentración de proteína en dicha fracción, lo que sugiere una elución eficiente del constructo SmbP-escigonadina.

En conjunto, estos resultados evidencian que el sistema de expresión a gran escala permitió obtener **SmbP-Escigonadina** cantidades suficientes de proteína recombinante y que la estrategia de purificación por IMAC resultó efectiva para su recuperación. Esto permitió continuar con las etapas posteriores de la diálisis, la digestión enzimática y la evaluación funcional del péptido.

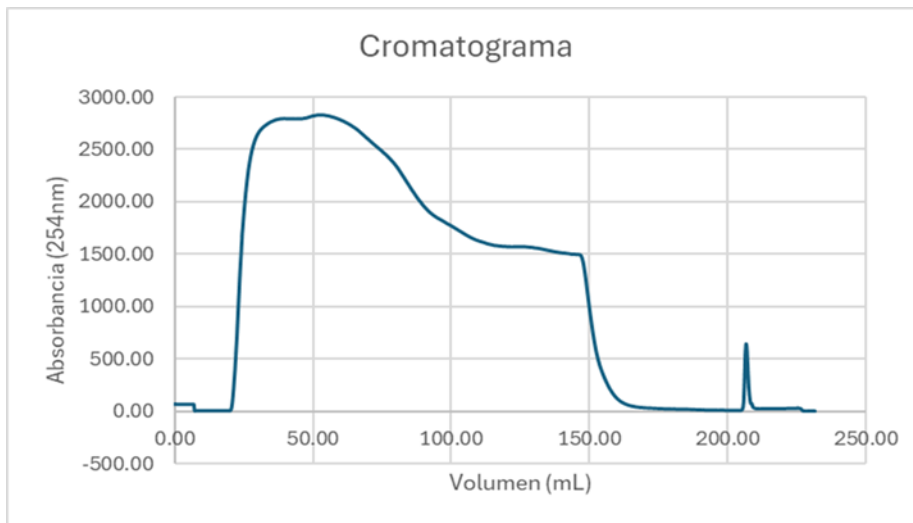


Figura 6. Cromatograma de purificación por IMAC de SmbP-escigonadina (21kDa) expresado en *E. coli* SHuffle. Elución en un solo paso con una solución amortiguadora de imidazol a 200 mM.

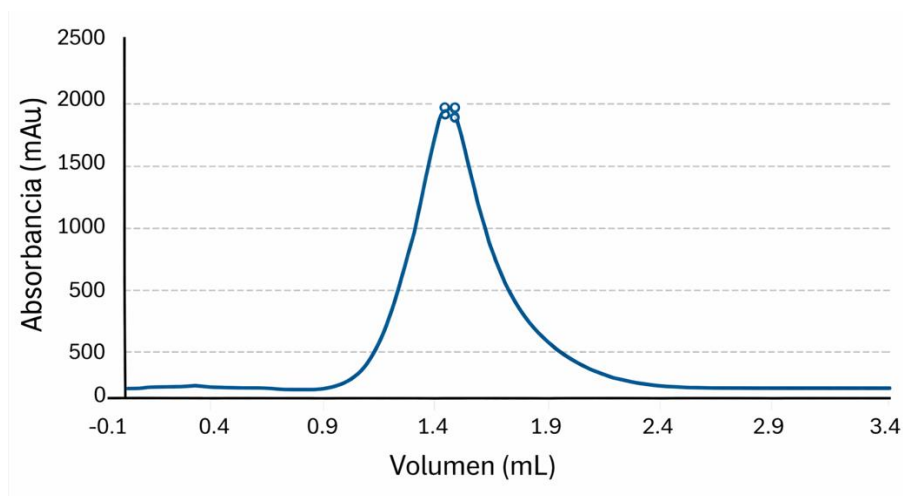


Figura 7. Cromatograma de elución correspondiente a SmbP-escigonadina. Se observa un pico principal de elución a un volumen de aproximadamente 1.4175 mL, con una absorbancia máxima cercana a 1922.33 mAU, lo que indica la presencia predominante de la proteína de interés.

5.1.3 Análisis de la purificación del constructo SmbP-Escigonadina mediante SDS-PAGE

Con el fin de evaluar la eficiencia del proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad, las diferentes fracciones obtenidas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%.

En la Figura 8, el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 al lisado total y el carril 3 a la fracción de percolado. En los carriles del 4 al 10, correspondientes a las fracciones de elución, se observa una banda intensa alrededor de 21.1 kDa, consistente con el peso molecular esperado de la proteína de fusión SmbP-escigonadina.

La disminución de la intensidad de esta banda en la fracción de percolado, en comparación con las fracciones de elución, sugiere que una proporción importante de la proteína recombinante se unió

a la resina durante la cromatografía. Asimismo, la presencia de la banda de interés en múltiples fracciones de elución indica que el proceso permitió recuperar la proteína de forma progresiva.

Estos resultados indican que la estrategia de purificación mediante IMAC fue efectiva para la recuperación del constructo SmbP-escigonadina, lo que permitió obtener fracciones enriquecidas en la proteína de interés, que se utilizaron para los procesos posteriores de diálisis y digestión enzimática.

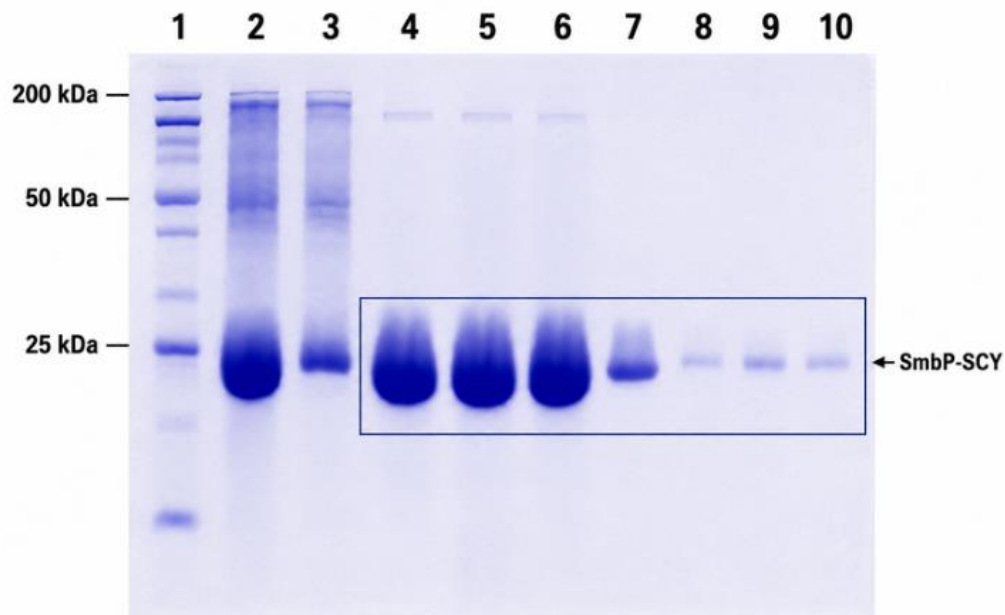


Figura 8. Gel de SDS-PAGE al 15% después de la purificación en IMAC. En el 1º carril observamos el marcador de peso molecular; en el 2º carril, la lisis total; en el 3º carril, la fracción percolada; y en los carriles del 4 al 10, las fracciones correspondientes a la elución.

5.1.4 Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.

La concentración de la proteína recombinante obtenida tras el proceso de purificación se determinó mediante el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La curva de calibración se construyó en un rango de concentraciones de 0.5 a 1.35 mg/mL, a partir de mediciones de absorbancia a 595 nm.

Las absorbancias se corrigieron respecto al blanco, que presentó un valor de cero, por lo que no fue necesario realizar ajustes adicionales en los datos experimentales. A partir de los valores promedio de las tres réplicas, se generó la curva estándar de BSA, observándose una relación lineal entre la concentración de proteína y la absorbancia.

El análisis de regresión lineal permitió obtener la ecuación $y = 0.8348x + 0.1239$, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9822$, lo que indica una adecuada correlación entre ambas variables dentro del rango evaluado.

A partir de esta ecuación, las concentraciones de las muestras problema se determinaron mediante interpolación lineal, lo que permitió estimar de manera confiable la cantidad de proteína recombinante obtenida tras la purificación. El análisis reveló una concentración promedio de 6.893mg de proteína recombinante purificada, evidenciando un rendimiento satisfactorio del proceso de producción y purificación.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia réplica 1	Absorbancia réplica 2	Absorbancia réplica 3	Promedio de absorbancia
0.50	0.525	0.525	0.525	0.525000

0.60	0.678	0.678	0.678	0.678000
0.70	0.696	0.696	0.701	0.697667
0.80	0.798	0.803	0.797	0.799333
0.90	0.826	0.826	0.826	0.826000
1.15	1.054	1.054	1.059	1.055667
1.25	1.214	1.214	1.214	1.214000
1.35	1.248	1.248	1.249	1.248333

Tabla 1. Datos de la curva de calibración estándar de BSA.

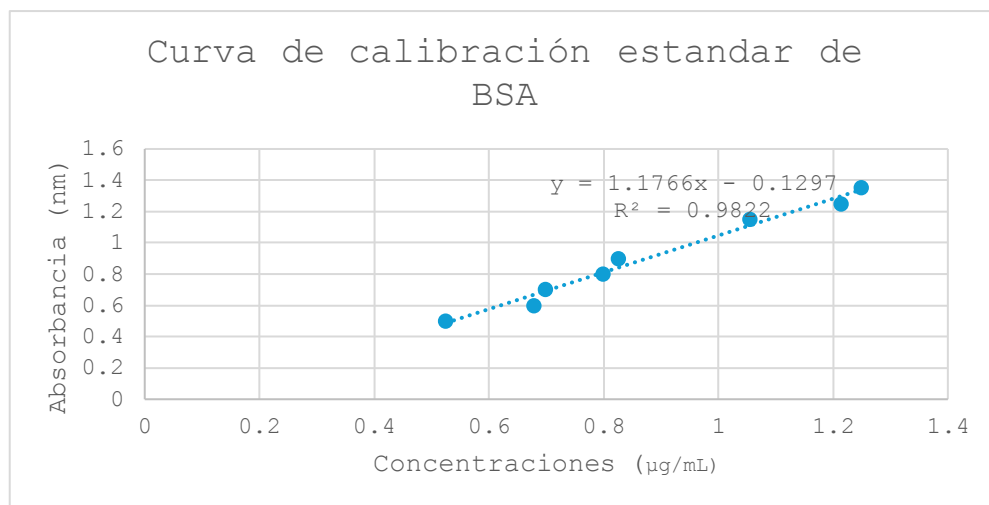


Figura 9. Curva estándar de BSA obtenida mediante el método de Bradford. Relación entre la concentración de albúmina sérica bovina (BSA) y la absorbancia a 595 nm. Los datos corresponden al promedio de tres mediciones independientes. La línea representa el ajuste de regresión lineal ($y = 0.8348x + 0.1239$; $R^2 = 0.9822$).

5.1.5 Análisis del péptido escigonadina libre mediante SDS-PAGE en geles de Tricina.

La obtención del péptido escigonadina libre se confirmó mediante el análisis por Tricina SDS-PAGE tras la digestión enzimática del constructo SmbP-escigonadina y su posterior purificación en una columna de gravedad con resina Ni-IMAC.

Como se observa en la Figura 11, correspondiente al gel posterior al proceso de digestión, se evidencia la aparición de una banda con un peso molecular aproximado de 11.27 kDa, consistente con el tamaño esperado del péptido escigonadina libre. En los carriles correspondientes a las fracciones digeridas (3) se observa una disminución de la intensidad de la banda del constructo completo (21 kDa), junto con la presencia de bandas de menor peso molecular, lo que sugiere un corte enzimático eficaz.

Asimismo, las fracciones de elución (carriles 4 al 7) muestran la presencia del péptido de interés, lo que indica que el proceso de purificación permitió recuperar el producto tras la digestión. Por otro lado, las fracción de lavado 8 presentan una menor intensidad de señal, lo que sugiere la eliminación de proteínas no específicas.

Los resultados obtenidos confirman que el proceso de digestión enzimática fue efectivo para liberar el péptido escigonadina a partir del constructo recombinante, y que la purificación mediante columna de gravedad con resina Ni-IMAC permitió aislar el péptido de interés.

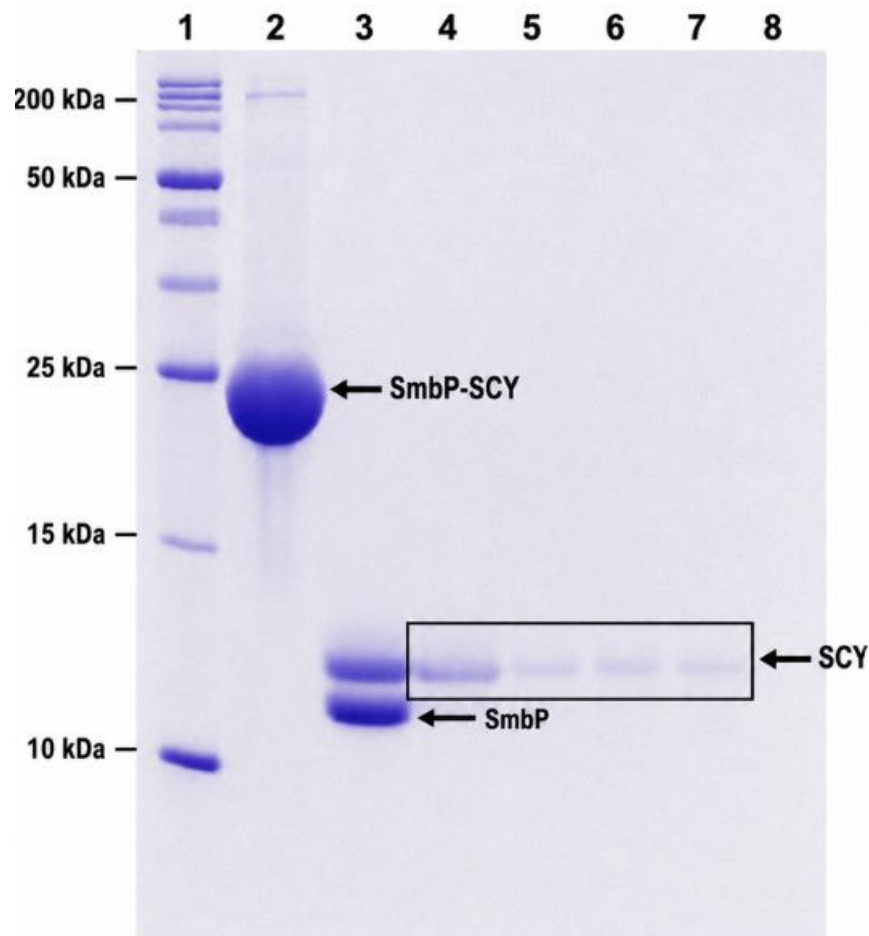


Figura 10. Análisis por SDS-PAGE de tricina del corte enzimático del constructo SmbP-escigonadina. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. El 2 carril corresponde a la muestra posterior a diálisis. El carril 3 corresponde a la digestión enzimática. Del carril 4 al 7 corresponde a la muestra digerida. El carril 8 corresponde a la fracción de lavado. Se observa la presencia de una banda alrededor de 11.27 kDa, correspondiente al péptido escigonadina libre, así como la disminución de la banda del constructo completo (21 kDa), lo que indica el corte enzimático.

5.1.6 Actividad antimicrobiana del péptido escigonadina libre

La actividad antimicrobiana del péptido escigonadina libre, obtenido tras la digestión del constructo SmbP-escigonadina y su posterior separación, fue evaluada frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) mediante ensayos de microdilución en placa.

Para evaluar el efecto antimicrobiano de la escigonadina libre, los valores de absorbancia obtenidos fueron normalizados respecto al control negativo (bacterias sin tratamiento), el cual se consideró como el 100 % de crecimiento. El porcentaje de crecimiento relativo se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Crecimiento relativo (\%)} = \left(\frac{\text{Absorbancia del tratamiento}}{\text{Absorbancia del control negativo}} \right) \times 100$$

Donde la absorbancia del tratamiento corresponde a cada concentración evaluada del péptido y la absorbancia del control negativo representa el crecimiento bacteriano máximo en ausencia de tratamiento.

Como se muestra en la Figura 12, correspondiente a CRAB, el tratamiento con el péptido libre provocó una disminución casi total del crecimiento bacteriano en todas las concentraciones evaluadas. Los valores de crecimiento relativo fueron inferiores al 3%, lo que evidencia una inhibición altamente eficiente incluso a las concentraciones más bajas. Asimismo, el análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas en comparación con el control negativo (***; $p < 0.001$).

En contraste, la respuesta observada en MRSA Figura 12, evidenció una reducción significativa del crecimiento bacteriano en todas las concentraciones evaluadas (***, $p < 0.001$); sin embargo, el efecto fue parcial. El crecimiento relativo se mantuvo entre el 24% y el 42%, lo que indica que, aunque el péptido ejerce un efecto inhibitorio claro, no logra suprimir por completo la proliferación bacteriana bajo las condiciones analizadas. Además, se observó un comportamiento dependiente de la concentración, en el que las concentraciones más altas del péptido generaron una mayor inhibición del crecimiento.

En conjunto, los resultados evidencian que la liberación del péptido escigonadina a partir del constructo recombinante permite recuperar su actividad biológica, destacando una elevada eficacia frente a CRAB y una actividad moderada frente a MRSA. Esta diferencia en susceptibilidad sugiere que la estructura de la pared celular bacteriana podría influir en la interacción del péptido, favoreciendo su acción sobre bacterias Gram negativas.

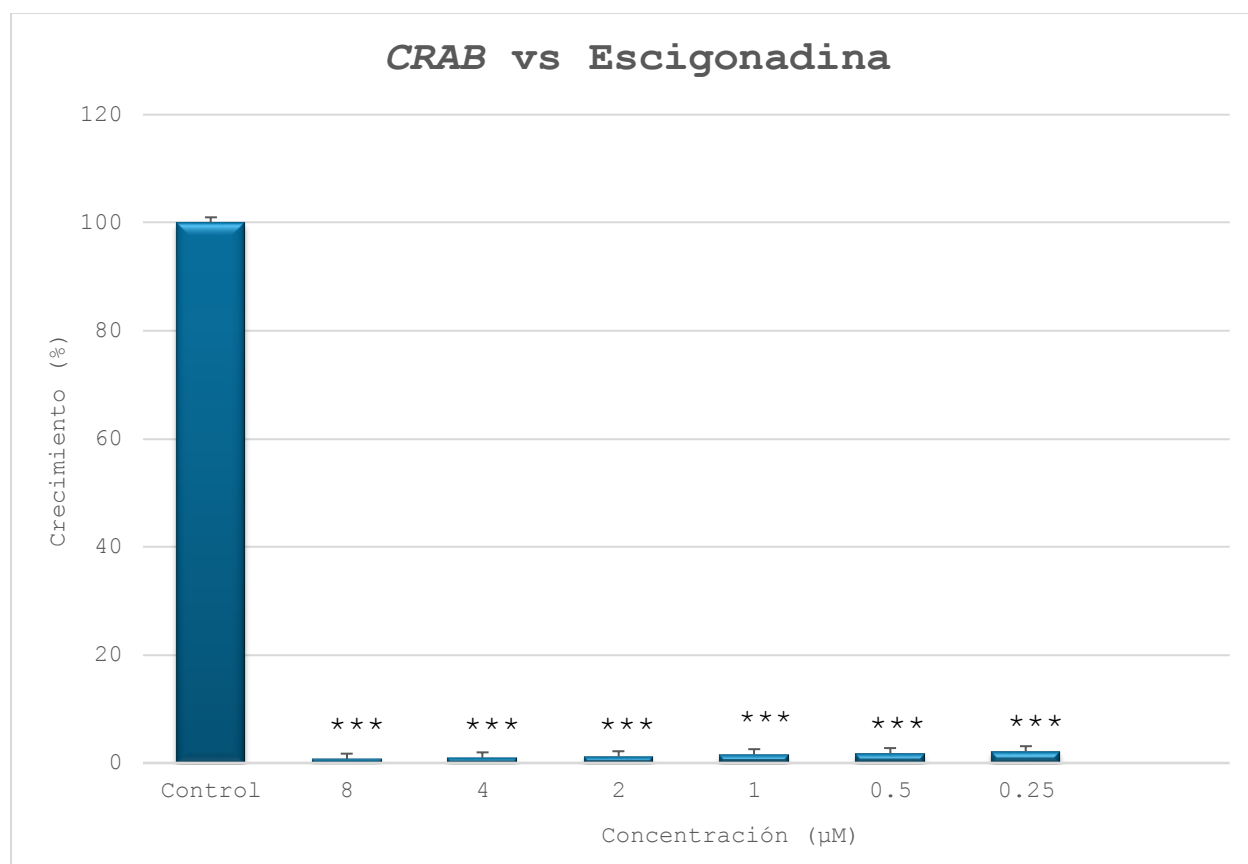


Figura 11. Actividad antimicrobiana del péptido escigonadina frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB). Los datos representan el crecimiento relativo (%) respecto al control (100%) como promedio $\pm$ desviación estándar ($n = 3$). Evaluado mediante *t*-test. Significancia (***) $p < 0.001$ vs. control negativo.

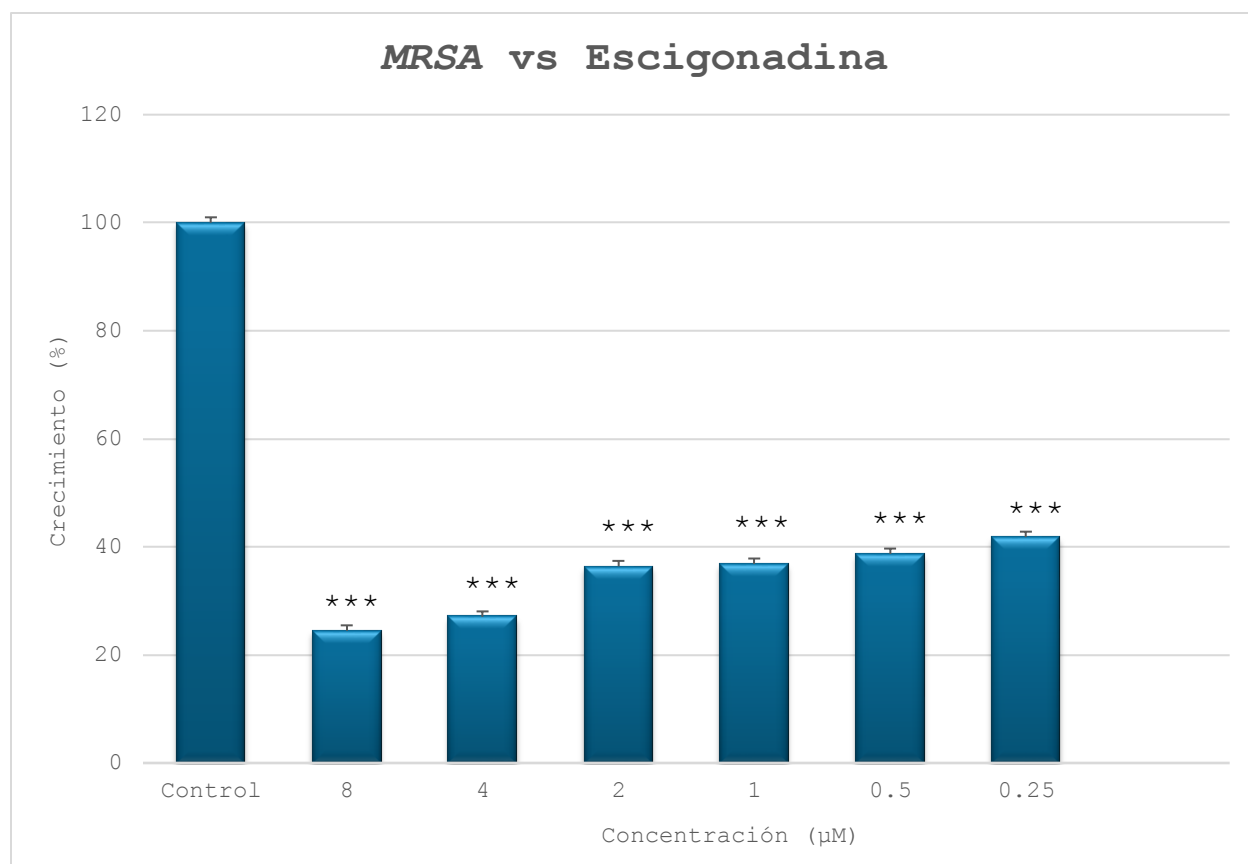


Figura 12. Actividad antimicrobiana del péptido escigonadina libre frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Los datos representan el crecimiento relativo (%) respecto al control (100%) como promedio $\pm$ desviación estándar (n=3). Evaluado mediante *t*-tes. Significancia (***) $p < 0.001$ vs control negativo.

CAPITULO 6

6. Discusión

La producción del constructo recombinante SmbP-escigonadina en *Escherichia coli* SHuffle permitió obtener una proteína de fusión con el peso molecular esperado, lo que confirma la eficiencia del sistema de expresión empleado. Este resultado concuerda con lo reportado para esta cepa, la cual ha sido diseñada para favorecer la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma, una condición esencial para el correcto plegamiento y la estabilidad de proteínas que contienen este tipo de estructuras [18]. En este sentido, el uso de *E. coli* SHuffle constituye una estrategia adecuada para la expresión de péptidos antimicrobianos estructuralmente complejos, como la escigonadina.

Asimismo, el empleo de proteínas de fusión, como SmbP, contribuyó significativamente a mejorar la solubilidad y la estabilidad del péptido durante su expresión. Diversos estudios han demostrado que las etiquetas de fusión no solo incrementan el rendimiento de producción, sino que también protegen a los péptidos frente a la degradación proteolítica y reducen su toxicidad para la célula hospedadora [10,14]. En concordancia con estos reportes, los resultados obtenidos sugieren que SmbP actuó como un elemento estabilizador eficaz, facilitando la obtención del constructo recombinante en condiciones adecuadas para su purificación posterior.

La purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) permitió la recuperación selectiva del constructo recombinante, como se evidenció tanto en el perfil cromatográfico como en los análisis por SDS-PAGE. Este método se basa en la interacción específica entre los residuos de histidina y iones metálicos, lo que permite una purificación

altamente selectiva de proteínas recombinantes [14,37]. La detección del constructo en múltiples fracciones de elución sugiere un proceso eficiente, aunque con una liberación progresiva característica de sistemas dependientes de gradiente de imidazol, lo cual es consistente con lo descrito en sistemas de purificación similares.

Posteriormente, la digestión enzimática permitió liberar el péptido escigonadina en su forma libre, lo cual fue confirmado mediante Tricina SDS-PAGE. La aparición de una banda correspondiente al peso esperado (11.27 kDa), acompañada de la disminución de la banda del constructo completo (21 kDa), evidencia un proceso de escisión eficiente. Este paso resulta crítico, ya que se ha reportado que la actividad biológica de los péptidos antimicrobianos puede verse comprometida cuando permanecen fusionados a proteínas portadoras, recuperándose únicamente tras su liberación [10,17]. Por lo tanto, la eficiencia de la digestión enzimática constituye un factor determinante para la evaluación funcional del péptido.

Desde el punto de vista funcional, el péptido escigonadina libre mostró una elevada actividad antimicrobiana frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB), evidenciada por una inhibición prácticamente total del crecimiento bacteriano en todas las concentraciones evaluadas. Este comportamiento es consistente con el mecanismo de acción descrito para los péptidos antimicrobianos, que interactúan con la membrana bacteriana mediante interacciones electrostáticas y componentes hidrofóbicos, lo que provoca su desestabilización, la formación de poros y la eventual lisis celular [9,24,38]. Además, se ha descrito que los AMPs pueden presentar mecanismos multifactoriales que incluyen la alteración de procesos intracelulares, lo que contribuye a su elevada eficacia [34,40].

La alta susceptibilidad observada en *A. baumannii* puede explicarse en parte por la composición de su membrana externa, rica en lipopolisacáridos, lo que favorece la interacción con péptidos

antimicrobianos, especialmente aquellos con regiones anfipáticas capaces de insertarse en la bicapa lipídica [19,20,39]. Este hallazgo es consistente con estudios recientes que indican que los AMPs mantienen actividad frente a bacterias Gram negativas multirresistentes, incluso cuando estas presentan resistencia a múltiples antibióticos convencionales [33,41].

En contraste, la actividad observada frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) fue menor, mostrando una inhibición significativa pero parcial del crecimiento bacteriano. Aunque se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las concentraciones evaluadas, la presencia de crecimiento residual indica una menor susceptibilidad. Este comportamiento puede atribuirse a la estructura de la pared celular de bacterias Gram positivas, caracterizada por una gruesa capa de peptidoglicano que actúa como barrera física y limita la difusión del péptido hacia la membrana citoplasmática [21,22].

Esta diferencia en la susceptibilidad entre bacterias Gram negativas y Gram positivas ha sido ampliamente documentada, destacando que la eficacia de los péptidos antimicrobianos depende en gran medida de la arquitectura de la envoltura bacteriana, así como de las propiedades fisicoquímicas del péptido, incluyendo su carga, hidrofobicidad y estructura secundaria [9,28,32]. No obstante, es importante señalar que los AMPs pueden ejercer efectos adicionales más allá de la disrupción de membrana, tales como la inhibición de procesos metabólicos esenciales o la modulación de la respuesta inmune del hospedador, lo que amplía su potencial terapéutico [29,36].

Un aspecto relevante de este estudio es que la actividad antimicrobiana se observó únicamente tras la liberación del péptido escigonadina, lo que resalta la importancia del proceso de digestión enzimática en la obtención de moléculas funcionales. Este fenómeno ha sido descrito en diversos sistemas recombinantes, donde las proteínas de fusión actúan principalmente como herramientas de expresión y estabilización, pero deben ser removidas para permitir la interacción directa del

péptido con su blanco biológico [10,17]. Esto refuerza la importancia de optimizar tanto la expresión como los procesos de escisión para garantizar la funcionalidad del producto final.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la escigonadina libre presenta una actividad antimicrobiana significativa, particularmente frente a bacterias Gram negativas como *A. baumannii*, y en menor medida frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus*. Estos hallazgos se alinean con la tendencia actual en el desarrollo de péptidos antimicrobianos como alternativas terapéuticas frente a la creciente crisis de resistencia antimicrobiana, destacando su amplio espectro de acción, rapidez bactericida y menor propensión a inducir resistencia en comparación con los antibióticos convencionales [1,3,34,37].

Adicionalmente, los resultados obtenidos aportan evidencia experimental que respalda el uso de estrategias recombinantes basadas en proteínas de fusión y sistemas de expresión optimizados como herramientas viables para la producción de péptidos antimicrobianos funcionales. En este sentido, la escigonadina se posiciona como un candidato prometedor para futuras investigaciones orientadas al desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas dirigidas contra patógenos multirresistentes de relevancia clínica

CAPITULO 7

7. Conclusiones

- Se expresó el constructo recombinante SmbP-escigonadina en *Escherichia coli* SHuffle como sistema de producción, obteniéndose una proteína de fusión estable bajo condiciones de inducción controladas.
- El uso de la etiqueta de fusión SmbP permitió la purificación eficiente del constructo mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), lo que facilitó la recuperación selectiva de la proteína recombinante.
- El análisis por SDS-PAGE confirmó la presencia de una banda característica cercana a 21 kDa, correspondiente al peso molecular esperado del constructo SmbP-escigonadina.
- La cuantificación mediante el método de Bradford evidenció la obtención de proteína recombinante en cantidades adecuadas para su posterior procesamiento y evaluación funcional.
- La digestión enzimática permitió la liberación del péptido escigonadina libre, lo cual fue corroborado mediante SDS-PAGE con Tricine, donde se observó una banda correspondiente a 11.27 kDa.
- La purificación posterior mediante una columna de gravedad con resina Ni-IMAC permitió mejorar la pureza del péptido tras la digestión, lo que facilitó su análisis biológico.
- El péptido escigonadina libre presentó una actividad antimicrobiana altamente eficaz frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB), mostrando una inhibición casi completa del crecimiento bacteriano en todas las concentraciones evaluadas.

- Frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), el péptido mostró una actividad significativa pero incompleta, evidenciando un efecto dependiente de la concentración.
- Se observó una diferencia en la respuesta antimicrobiana del péptido escigonadina libre frente a *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), lo que evidencia una mayor inhibición del crecimiento bacteriano en la cepa CRAB bajo las condiciones evaluadas.
- Los resultados obtenidos indican que la escigonadina presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias clínicamente relevantes, destacando una mayor eficacia frente a *A. baumannii* en comparación con *S. aureus* dentro del rango de concentraciones evaluado

CAPITULO 8

8. Perspectivas a futuro

- Evaluar la citotoxicidad en células eucariotas para determinar su seguridad biológica.
- Optimizar la producción del péptido mediante estrategias de expresión a mayor escala que mejoren el rendimiento.
- Analizar el efecto del péptido en combinación con antibióticos convencionales para identificar posibles efectos sinérgicos frente a bacterias resistentes.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del péptido escigonadina frente a un mayor número de aislados clínicos multirresistentes para confirmar su espectro de acción.

CAPITULO 9

9. Disposición de residuos generados

Tabla 2. De los manejos de residuos generados durante el presente estudio, de acuerdo con los lineamientos establecidos en el Programa Institucional para el Manejo y Gestión de Residuos de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

RESIDUO	COLECTOR
Solución buffer TGS (Tris glicina SDS)	“A” Soluciones salinas de pH 6-8, soluciones de: sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y bases inorgánicas
Solución buffer TAE (Tris acetato EDTA)	
RbCl, CaCl ₂ , NaCl, MgCl ₂ , MnCl ₂ , KAc, glicerol	
Sacarosa, Tris-HCl, EDTA	
Buffer de equilibrio (Tris-HCl, NaCl)	
Buffer de elución (Tris-HCl, NaCl, Imidazol)	“G” Combinaciones orgánicas sólidas
Agarosa	
Poliacrilamida	Colorantes y Lugol
Azul de Coomassie	
Cristal Violeta	Esterilizados Basura normal
Medios de cultivo	

CAPITULO 10

10. Referencias:

1. World Health Organization. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2023. Geneva: WHO; 2023.
2. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318–327. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
3. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States 2023. Atlanta: CDC; 2023.
4. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(12):1057–1098. doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9
5. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238–250. doi:10.1038/nrmicro1098
6. Hancock REW, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006;24(12):1551–1557. doi:10.1038/nbt1267
7. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2003;55(1):27–55. doi:10.1124/pr.55.1.2

8. Peng H, Yang M, Huang WS, et al. Soluble expression and purification of scygonadin in *Escherichia coli* and antimicrobial activity analysis. *Protein Expr Purif.* 2010;70(1):109–115. doi:10.1016/j.pep.2009.09.013
9. Talapko J, Škrlec I, Alebić T, et al. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and clinical applications. *Antibiotics* (Basel). 2022;11(10):1417. doi:10.3390/antibiotics11101417
10. Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Expr Purif.* 2011;80(2):260–267. doi:10.1016/j.pep.2011.08.001
11. Gómez-Lugo JJ, et al. Expression and purification of recombinant proteins tagged with SmbP and CusF3H+. *Methods Mol Biol.* 2021;2178:121–131. doi:10.1007/978-1-0716-0775-6_11
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI standard M07. 11th ed. 2022.
13. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5:172. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
14. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility and purification in *E. coli*. *Front Microbiol.* 2014;5:63. doi:10.3389/fmicb.2014.00063
15. Narayan M. Disulfide bonds in protein folding and stability. *FEBS J.* 2012;279(13):2272–2282. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x
16. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density cultures. *Protein Expr Purif.* 2005;41(1):207–234. doi:10.1016/j.pep.2005.01.010

17. Gómez-Lugo JJ, Casillas-Vega NG, et al. High-yield expression and purification of scygonadin using SmbP. *Microorganisms*. 2024;12(2):278. doi:10.3390/microorganisms12020278
18. Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, et al. SHuffle: *E. coli* strain for disulfide bond formation. *Microb Cell Fact*. 2012;11:56. doi:10.1186/1475-2859-11-56
19. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(3):538–582. doi:10.1128/CMR.00058-07
20. Antunes LCS, Visca P, Towner KJ. Evolution of *Acinetobacter baumannii* as a global pathogen. *Pathog Dis*. 2014;71(3):292–301. doi:10.1111/2049-632X.12129
21. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, et al. *Staphylococcus aureus*: epidemiology and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603–661. doi:10.1128/CMR.00134-14
22. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance in *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(9):629–641. doi:10.1038/nrmicro2200
23. Otto M. MRSA virulence and spread. *Cell Microbiol*. 2012;14(10):1513–1521. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01832.x
24. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415(6870):389–395. doi:10.1038/415389a
25. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):491–511. doi:10.1128/CMR.00056-05
26. Wang G, Mishra B, Epand RF. Antimicrobial peptide mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(6):2160–2172. doi:10.1016/j.bbamem.2013.08.018

27. Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. Designing antimicrobial peptides. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(1):37–51. doi:10.1038/nrd3591
28. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: emerging therapeutics. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:194. doi:10.3389/fcimb.2016.00194
29. Hancock REW, Haney EF, Gill EE. Immunology of host defence peptides. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(5):321–334. doi:10.1038/nri.2016.29
30. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals.* 2013;6(12):1543–1575. doi:10.3390/ph6121543
31. Lei J, Sun L, Huang S, et al. Antimicrobial peptides and clinical applications. *Am J Transl Res.* 2019;11(7):3919–3931.
32. Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP. Host defence peptides. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(5):311–332. doi:10.1038/s41573-019-0044-y
33. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial peptides: classification, design and applications. *Front Microbiol.* 2020;11:582779. doi:10.3389/fmicb.2020.582779
34. Magana M, Pushpanathan M, Santos AL, et al. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(9):e216–e230. doi:10.1016/S1473-3099(20)30327-3
35. di Somma A, Moretta A, Canè C, et al. Antimicrobial peptides: a new hope in biomedical fields. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:453. doi:10.3389/fcimb.2020.00453
36. Mishra B, Wang G. Antimicrobial peptides in addressing antimicrobial resistance. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3601. doi:10.3390/ijms23073601

37. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial peptides: diversity and therapeutic potential. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1087. doi:10.3390/ijms24021087
38. Sahoo BR. Role of antimicrobial peptides in membrane disruption. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2023;1865(2):184083. doi:10.1016/j.bbamem.2022.184083
39. Yasir M, Dutta D, Willcox MDP. Mode of action of antimicrobial peptides against Gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(5):511. doi:10.3390/antibiotics10050511
40. Mourtada R, Herce HD, Yin DJ, et al. Design of potent antimicrobial peptides. *Nat Biomed Eng.* 2022;6:627–641. doi:10.1038/s41551-022-00891-2
41. de la Fuente-Núñez C, Silva ON, Lu TK, Franco OL. Antimicrobial peptides: role in combating resistance. *Trends Microbiol.* 2023;31(3):233–245. doi:10.1016/j.tim.2022.09.008
42. Zhang L, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Current Biology.* 2016;26(1):R14–R19. doi:10.1016/j.cub.2015.11.017