

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE PÉPTIDOS  
ANTIMICROBIANOS SINTÉTICOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA  
DERIVADOS DEL INVERTEBRADO MARINO *CENCHRITIS MURICATUS*  
(GASTROPODA: LITTORINIDAE)**

**ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana

**AUTORES PRINCIPALES:** Anselmo J. Otero González y Carlos López Abarrategui; Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

**OTROS AUTORES:** Octavio Luiz Franco (Centro de Análisis Proteómico y Bioquímico, Universidad Católica de Brasilia y Departamento de Biotecnología, Universidad Católica Dom Bosco, Mato Grosso del Sur, Brasil); Simoni Campos Dias (Centro de Análisis Proteómico y Bioquímico, Universidad Católica de Brasilia, Brasil); Annia Alba Menéndez (Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba; Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, La Habana, Cuba); Alberto del Monte Martínez (Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba); María Bárbara Lugo Alvarez (Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba); Melaine González García (Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba); Edilso Reguera Ruiz (Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Legaria, Instituto Politécnico Nacional, México DF, México); Hilda Garay Pérez (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba); Osvaldo Reyes Acosta (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba); Daniel García Rivera (Director del Centro de Productos Naturales, CPN, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba); Fidel Morales Vicente (Departamento de Química General y CPN, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba); Michael Starnbach (Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Médica de Harvard, Boston, Estados Unidos); Ludger Wessjohann (Director general del Instituto Leibniz de Bioquímica de las Plantas y jefe del departamento de Química Biorgánica, Halle (Saale), Alemania).

**COLABORADORES:** Christine McBeth (Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Médica de Harvard, Boston, Estados Unidos, Centro “Fraunhofer” de Innovation (CMI), Bioquímica de Proteínas, Diagnóstico de patógenos, Boston, Massachusetts, Estados Unidos). Zhenyu J. Sun y Gregory Heffron (Departamento de Química Biológica y Farmacología Molecular, Laboratorio de RMN, Universidad Médica de Harvard, Boston, Estados Unidos). Diego O. Nolasco (Centro de Análisis Proteómico y Bioquímico, Universidad Católica de Brasilia, Brasil e Instituto Massachusetts de Tecnología, MIT, Boston, EEUU). Wolfgang Brandt (Instituto Leibniz de Bioquímica de las Plantas, Departamento de Química Biorgánica, Halle (Saale), Alemania). Beatriz Simas Magalhaes, Daniel Amaro Sousa, Mariana D. Cherobim, Osmar N. Silva, Caroline D Pereira y Loiane A. Lima (Centro de Análisis Proteómico y

Bioquímico, Universidad Católica de Brasilia, Brasil). Ludovico Migliolo y Simone Maria-Neto (Departamento de Biotecnología, Universidad Católica Dom Bosco, Mato Grosso del Sur, Brasil). Viviana Figueroa Espí, Linnavel Jiménez Hernández y Osvaldo Estévez-Hernández (Instituto de Materiales y Reactivos, IMRE, Universidad de La Habana, Cuba). Santi M. Mandal (Departamento de Microbiología, Laboratorio de Investigaciones de anti- infecciosos,, Universidad de Vidyasagar, Midnapore, India). Mónica García Villarino (Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba). Joao ARG Barbosa (Departamento de Biología Celular, Laboratorio de Biofísica, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Brasilia (UnB), Brasilia, Brasil. Rosana Falcão: Centro Nacional de Investigaciones en Recursos Genéticos y Biotecnología CENARGEN), Corporación Brasileira de Investigaciones en Agricultura, EMBRAPA, Brasilia, Brasil). Ilka M. Vasconcelos y José T.A. Oliveira (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Federal de Ceará, Fortaleza, Brasil. Maysa P. Costa, Carolina R. Costa y Maria R.R. Silva (Instituto de Patología Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Brasil). Javier San Juan Galán (Laboratorio de Micología, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, La Habana, Cuba). Daniela F. Muñoz y Yarelys E. Augusto (Centro de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana).

**AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:**

Anselmo J. Otero González, Lic. Microbiología, Dr.Cs. Laboratorio de Inmunoanalítica y Péptidos Antimicrobianos, Centro de Estudios de Proteínas (CEP),  
Facultad de Biología, Universidad de La Habana  
Calle 25 entre J e I, Vedado, Municipio Plaza CP 10400, La Habana, Cuba  
Teléfono 7832 4830  
FAX: 7832 1321  
Correo electrónico: [aotero@fbio.uh.cu](mailto:aotero@fbio.uh.cu)

**RESUMEN:**

Antecedentes: Los péptidos antimicrobianos forman parte de la inmunidad innata de vertebrados e invertebrados contra el reto de microorganismos invasores entre los cuales los hongos constituyen un capítulo pendiente en la terapia anti- infecciosa debido a la escasez de antifúngicos convencionales, desarrollo de resistencia y su toxicidad inherente. Los invertebrados marinos además de estar sometidos al reto de los microorganismos propios de su ambiente, reciben la influencia de los desechos humanos con la consiguiente carga de microorganismos patógenos al hombre y fauna asociada. Teniendo en cuenta la inducibilidad de los péptidos antimicrobianos y la extraordinaria diversidad de estos organismos en muestras costas resultó interesante investigar, en ellos, la presencia de esas moléculas antimicrobianas. **Problema que se ha resuelto según objetivos propuestos:** Se ha identificado un péptido con actividad antifúngica *in vitro* con perspectivas en la terapia anti- infecciosa. Resultados: De un total de 15 especies muestreadas de la zona costera de La Habana, los correspondientes extractos fueron evaluados para actividad antimicrobiana y el molusco

*Cenchritis muricatus* (Gastropoda: Littorinidae) fue seleccionado por su amplio espectro de actividad y por la relativa facilidad de su colecta en la costa. El péptido sintético hidrofílico Cm-p5 (SRSELIVHQLRF) fue derivado bioinformáticamente a partir del péptido Cm-p1 cuya secuencia que fue obtenida a partir de un fragmento tríptico de una fracción cromatográfica del extracto total del molusco. Cm-p5 presentó un incremento significativo en su actividad fungistática contra el patógeno humano *Candida albicans* con una concentración mínima inhibitoria de 10 µg/mL y la mitad de la concentración máxima efectiva de 1.146 µg/mL mientras demostró muy baja toxicidad frente a células de mamíferos. Cm-p5 fue caracterizado estructuralmente mediante Dicroísmo Circular y Resonancia Magnética Nuclear que revelaron una estructura en alfa-hélice en condiciones membrano-miméticas y una tendencia a estructura aleatoria en solución acuosa. Estudios con modelaje molecular *in silico* asociaron a Cm-p5 a la fosfatidilserina abundante en membrana plasmática de hongos. Un estudio de calorimetría de titulación isotérmica utilizando fosfolípidos en monofases demostró que Cm-p5 tuvo una alta afinidad por fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, solo moderada interacción con fosfatidilcolina, muy poca interacción con ergosterol y ninguna con la quitina. La adhesión de Cm-p5 conjugado a isotiocianato de fluoresceína a células vivas de *C. albicans* fue confirmada mediante microscopía de fluorescencia. En un exigente modelo de candidiasis sistémica en ratón inducida por vía retro orbital, la administración intraperitoneal de Cm-p5 no fue capaz de disminuir la carga de *C. albicans* en riñón debido probablemente a un deficiente acceso del péptido al órgano, su baja anfipaticidad, su alta hidrofiliidad y susceptibilidad a proteólisis, para lo cual lo se considerarán modificaciones protectoras para favorecer su tránsito sistémico. Se ha informado sobre la actividad antimicrobiana de diferentes tipos de nanopartículas. Especialmente nanopartículas magnéticas se han explorado para aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades físico-químicas. En este sentido nanopartículas de ferrita manganeso modificadas con ácido cítrico utilizadas han sido caracterizadas en este estudio por microscopía electrónica de alta resolución confirmando la formación de nanocristales de aproximadamente 5 nm de diámetro. Estas nanopartículas fueron capaces, intrínsecamente, de inhibir *in vitro* el crecimiento de la levadura patógena *Candida albican* con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 250 µg/mL pero no inhibieron el crecimiento *in vitro* de la bacterias Gram-negativa *Escherichia coli* ni la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Finalmente el péptido antifúngico Cm-p5 fue conjugado con las nanopartículas de ferrita manganeso modificadas con ácido cítrico mostrando una actividad anti *Candida albicans* superior a los componentes de la conjugación por separado. Este conjugado no exhibió toxicidad en una línea celular de macrófago *in vitro* a las concentraciones en en que mostró su actividad antifúngica. Cm-p5 está siendo utilizado por el Centro de Productos Naturales de la UH para generar análogos más activos. La propuesta está apoyada por 6 artículos científicos principales (10 complementarios) en revistas de reconocido impacto internacional. Avals: Consejo Científico e institución, Facultad de Biología, UH, Cuba; Universidad Católica de Brasilia, Brasil; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba; Instituto Politécnico Nacional, CICATA\_IPN, México, Centro de Productos Naturales, UH, Cuba; Universidad Médica de Harvard, Boston, EEUU; Instituto de Bioquímica de las Plantas, Halle, Alemania.

## COMUNICACIÓN CORTA

Antecedentes: Los antibióticos convencionales, desde su aparición e introducción, han sido las drogas más utilizadas en la terapia de las enfermedades infecto-contagiosas. A pesar de su amplio uso en medicina y veterinarios, estos fármacos presentan desventajas como la resistencia que desarrollan los microorganismos a su actividad, incluidos los de última generación. Este cuadro se agrava con el uso indiscriminado de estos medicamentos por médicos y pacientes, la creciente población de individuos natural y artificialmente inmunocomprometidos, a la alta tasa de envejecimiento en la población, así como el aumento de los viajes transcontinentales, entre otros factores. La situación actual es comprometida porque existen cepas microbianas resistentes a los principales antibióticos que cubren a las infecciones más importantes. Por otra parte solamente se han introducido en la terapia anti-infecciosa tres nuevas clases de antibióticos en los últimos 40 años. Por estas razones se hace imperiosa la búsqueda y el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas para las infecciones.

Esta tendencia ha sido encaminada hacia la búsqueda de moléculas naturales antimicrobianas a partir de invertebrados entre otras fuentes. Estos animales carecen de inmunidad adquirida, por lo que su sistema de defensa innato se basa en los mecanismos celulares de los hemocitos y en una gran variedad de moléculas antimicrobianas estereoespecíficas de relativamente pequeño peso molecular llamadas péptidos antimicrobianos o, en un concepto más amplio, péptidos de defensa del hospedero. Dentro de este gran grupo de organismos, los moluscos son el segundo grupo más numeroso del reino animal y se encuentran prácticamente en todo tipo de ecosistemas. Su mayor diversidad la alcanzan en los ecosistemas marinos. Estos organismos constituyen un reservorio natural de moléculas con potencialidades terapéuticas. Diferentes moléculas proteicas como las dolabelinas con potentes efectos antimicrobianos y antineoplásicos, se han obtenido del molusco gástrópodo *Dolabella auricularia* así como la dolastatina 15 que ha sido probada en ensayos clínicos en pacientes con cáncer en diferentes formulaciones. A partir de estos organismos se han aislado varios péptidos antimicrobianos, fundamentalmente a partir de bivalvos marinos. Estas moléculas presentan un amplio espectro de acción, pueden ser antibacterianas, antiparasitarias, antifúngicas y antivirales. Además, constituyen una atractiva alternativa o complemento terapéutico porque presentan una elevada afinidad y selectividad por los patógenos muchas veces independiente de la virulencia y en general tienen potente actividad antimicrobiana *in vitro* contra cepas multi resistentes a los antibióticos convencionales. Recientemente se ha detectado actividad anticancerígena en péptidos antimicrobianos aislados de organismos superiores. Estas moléculas pueden actuar como moduladores de la respuesta innata, adyuvantes efectivos o alarminas, reguladores de la respuesta adaptativa y promotores de la reparación de heridas. Los invertebrados marinos y sobre todo los de plataforma además de estar sometidos a reto de los microorganismos propios de su ambiente, reciben, frecuentemente, la influencia de los desechos humanos con la consiguiente carga de microorganismos patógenos al hombre y fauna asociada. Teniendo en cuenta que los péptidos antimicrobianos pueden ser moléculas inducibles y además la extraordinaria diversidad de estos organismos en las costas resultó interesante investigar, en ellos, la

presencia de esas moléculas antimicrobianas. Se especula e investiga hoy día si los péptidos antimicrobianos de invertebrados marinos pueden tener acción inmunomoduladora efectiva en vertebrados superiores (1). No existen informes anteriores de péptidos antimicrobianos aislados a partir del molusco costero *Cenchritis muricatus* (Gastropoda: Littorinidae). Como antecedentes de este molusco González y cols (2), aislaron y caracterizaron inhibidores de la enzima elastasa de neutrófilos humanos (CmPI-I-III), y para uno de ellos, CmPI-II se realizó la secuenciación completa y la subsecuente modelación 3D (3).

**Resultados:** De un total de 15 especies muestreadas de la zona costera de La Habana, los correspondientes extractos fueron evaluados con respecto a su actividad antimicrobiana y el molusco *Cenchritis muricatus* (Gastropoda: Littorinidae) fue seleccionado por su amplio espectro de actividad contra bacterias y hongos y por la relativa facilidad de su colecta en la costa (4). Se obtuvo la secuencia (SRSELIVHQR) que generó el péptido sintético Cm-p1|. Esta secuencia fue obtenida a partir de un análisis de espectrometría de masas realizada a un fragmento tríptico de la fracción cromatográfica en fase reversa eluida con metanol del extracto total del molusco (5). El péptido sintético hidrofílico Cm-p5 (SRSELIVHQR) fue derivado bioinformáticamente a partir de un antecedente directo en el péptido Cm-p1 cuya secuencia que fue obtenida a partir de un análisis de espectrometría de masas realizada a un fragmento tríptico de una fracción cromatográfica del extracto total del molusco *C. muricatus*. Cm-p5 presentó un incremento significativo en su actividad fungistática contra el patógeno humano *Candida albicans* con una concentración mínima inhibitoria de 10 µg/mL y la mitad de la concentración máxima efectiva de 1.146 µg/mL mientras demostró muy baja toxicidad frente a células de mamíferos. Cm-p5 fue caracterizado estructuralmente mediante Dicroísmo Circular y Resonancia Magnética Nuclear (Fig 1) que revelaron una estructura en alfa -hélice en condiciones miméticas de membrana plasmática y una tendencia de estructura aleatoria en solución acuosa (6). Estudios adicionales empleando modelaje molecular in silico asociaron a Cm-p5 a la fosfatidilserina, fosfolípido típico de membrana plasmática de hongos. Un estudio de calorimetría de titulación isotérmica utilizando constituyentes de membrana plasmática en monofases demostró que Cm-p5 tuvo una alta afinidad por fosfolípidos de membrana plasmática de hongos (fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina), solo moderada interacción con un fosfolípido abundante en membrana de mamíferos (fosfatidilcolina), muy poca interacción con el esteroles de membrana de hongos (ergosterol) y ninguna con la quitina, componente de la pared de estos microorganismos. La adhesión de Cm-p5 a células vivas de *C. albicans* fue confirmada mediante microscopía de fluorescencia con el péptido conjugado a isotiocianato de fluoresceína. En un exigente modelo de candidiasis sistémica en ratón inducida por vía retro orbital, la administración intraperitoneal de Cm-p5 no fue capaz de disminuir la carga de *C. albicans* en riñón debido probablemente a un deficiente acceso del péptido al órgano, su baja anfipaticidad, su alta hidrofiliidad y susceptibilidad a proteólisis, lo cual apunta a su próxima evaluación en modelos de candidiasis local y su inoculación in situ así como, alternativamente, considerar modificaciones protectoras para favorecer su tránsito sistémico (7). Se ha informado sobre la actividad antimicrobiana de diferentes tipos de nanopartículas. Especialmente nanopartículas magnéticas se han explorado para aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades físico-químicas. En este sentido

nanopartículas de ferrita manganeso modificadas con ácido cítrico han sido caracterizadas en este estudio por microscopía electrónica de alta resolución confirmando la formación de nanocristales de aproximadamente 5 nm de diámetro. Estas nanopartículas fueron capaces, intrínsecamente, de inhibir in vitro el crecimiento de la levadura patógena *Candida albicans* con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 250 µg/mL pero no inhibieron el crecimiento in vitro de las bacterias Gram- negativa *Escherichia coli* ni la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Finalmente el péptido antifúngico Cm-p5 fue conjugado con las nanopartículas de ferrita manganeso modificadas con ácido cítrico mostrando una actividad anti *Candida albicans* superior a los componentes de la conjugación por separado.(Fig 2). Este conjugado no exhibió toxicidad en una línea celular de macrófago in vitro a las concentraciones en que mostró su actividad antifúngica (8). Cm-p5 ha sido seleccionado como compuesto modelo para la generación de análogos y derivados con el objetivo de mejorar y ampliar su actividad biológica (9). **Conclusión:** El péptido sintético Cm-p5 constituye una molécula prometedora en como posible fármaco en la terapia anti fúngica como complemento o sustituto de los antifúngicos actuales escasos y tóxicos.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

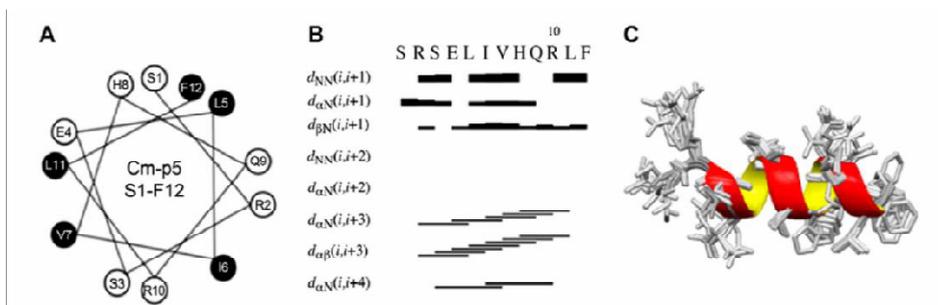
1. Otero-González AJ, Simas Magalhães B, Garcia-Villarino M, López-Abarrategui C, Amaro Sousa D, Campos Dias S, Luiz Franco O. (2010) Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *FASEB Journal*, 24, 1320-1334.
2. Gonzalez, Y. y cols. Purification and partial characterization of human neutrophil elastase inhibitors from the marine snail *Cenchritis muricatus* (Mollusca). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007, 146:506-13.
3. Gonzalez, Y. y cols. Characterization and comparative 3D modeling of CmPI-II, a novel "non-classical" Kazal-type inhibitor from the marine snail *Cenchritis muricatus* (Mollusca) *Biol Chem* 2007, 388:1183-94.
4. Carlos López-Abarrategui, Annia Alba . Menéndez , Loiane A. Lima<sup>1</sup>, Simone Maria-Neto, Ilka M. Vasconcelos, Jose T. A. Oliveira, Simoni C. Dias, Anselmo J. Otero-Gonzalez and Octavio L. Franco (2012) Screening of antimicrobials from Caribbean sea animals and isolation of bactericidal proteins from the littoral mollusk *Cenchritis muricatus*. *Current Microbiology* , 64: 501-505.
5. López-Abarrategui, C., Alba-Menéndez, A., Silva, ON, Reyes- Acosta, O., Vasconcelos, IM., Abreu de Oliveira, JT., Migliolo, L., Costa, MP, Costa, CR., Silva, MRR, Garay, HE, Dias, SC, Franco, OL and Otero-González, AJ. (2012) Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie*, 94: 968-974.
6. Sun, Z.J., Heffron, G., Mcbeth, C., Wagner, G., Otero-González, A.J., Starnbach, M.N. (2014) Solution structure of a potent antifungal peptide Cm-p5 derived from *C. muricatus*. Deposito PDB: 2014-05-14, Status HPUB, entrance code 2MP9.
7. López-Abarrategui C, McBeth C, Zhen-Yu JS Heffron G, García M, Alba- Menéndez A, Migliolo L, Reyes-Acosta O, Campos-Dias S, Brandt W, Porzel A, Wessjohann L, Starnbach M, Franco OL and Otero-González AJ (2015). Cm-p5: an antifungal hydrophilic

peptide derived from the coastal mollusk *Cenchritis muricatus* (Gastropoda: Littorinidae). *FASEB Journal*, 29(8): 3315-25.

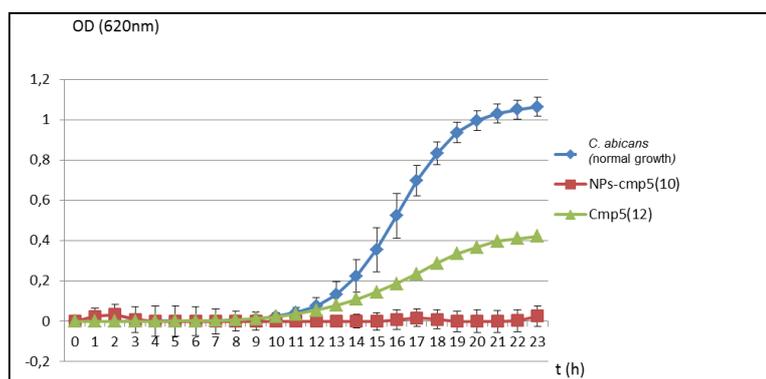
8. Lopez-Abarr tegui C, Figueroa-Espi V, Lugo-Alvarez MB, Pereira CD, Garay H, Barbosa JARG, Falcão R, Jiménez-Hernández L, Estévez-Hernández O, Reguera E, Franco OL, Campos Dias S and Otero-Gonzalez AJ (2016) The intrinsic antimicrobial activity of citric acid-coated manganese ferrite nanoparticles is enhanced after conjugation with the antifungal peptide Cm-p5. *International Journal of Nanomedicine*, 11: 3849-3857.

9. Morales F, Garay HE, Muñoz DF, Augusto YE, Otero-González AJ, Reyes Acosta O, García Rivera D (2015) Aminocatalysis-Mediated on-Resin Ugi Reactions: Application in the Solid-Phase Synthesis of N-Substituted and Tetrazolo Lipopeptides and Peptidosteroids. *Organic Letters* 17 (11), pp 2728–2731.

### Figuras referenciadas en el trabajo



**Figura 1:** **A:** Proyección Schiffer-Edmundson del péptido Cm-p5. Residuos hidrofílicos en blanco, hidrofóbicos en negro. **B:** Distancias NOE involucradas en el esqueleto atómico indicando la estructura en hélice-  $\alpha$  del péptido en TFE 40% (d2) / 60% D2O. **C:** Diez estructuras de RMN superimpuestas para mostrar las hélice- $\alpha$  en formato de cintas.



**Figura 2:** El conjugado Cm-p5 nanopartículas magnéticas inhibe el crecimiento de *C. albicans in vitro* con respecto al péptido sin conjugar.