

Informe final publicable de proyecto Péptidos antimicrobianos vegetales. Microorganismos blanco y modos de acción

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156473

Fecha de cierre de proyecto: 01/02/2024

CECCHETTO, Gianna (Responsable Técnico - Científico)

RAMOS, María Fernanda (Investigador)

POGGIO RIVAS, Martina (Investigador)

PÉREZ GONZÁLEZ, Mauro (Investigador)

ALBORÉS MALÁN, Silvana Victoria (Investigador)

BARRACO VEGA, Mariana (Investigador)

CASTRO ROSAS, Roberto (Investigador)

DA ROSA CORREA, Gabriela (Investigador)

DANS PUIGGRÓS, Pablo Daniel (Investigador)

ESTEVEZ, María Belén (Investigador)

RODRÍGUEZ DECUADRO, Susana Beatriz (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA \\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS \\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA

Resumen del proyecto

El aumento de resistencia a antimicrobianos es una amenaza importante a nivel global para la salud humana y animal, y para la conservación de alimentos. Como consecuencia, aumenta la necesidad de encontrar nuevas biomoléculas de control y/o diagnóstico. Nuestro objetivo se centró en la búsqueda y evaluación de defensinas vegetales, familia de péptidos antimicrobianos (AMP), producidos como defensa por los seres vivos que ha cobrado interés por sus propiedades fisicoquímicas y sobre todo porque al tener modos de acción multiobjetivo generan baja resistencia. Para aumentar la posibilidad de encontrar moléculas diferentes buscamos en plantas nativas inexploradas: ibirapitá y congorosa. El tamizaje de secuencias transcriptomas identificadas implicó estudios teóricos de redundancia, estructura, predicción de dominios activos y de exportación y su validación experimental (clonado), reduciéndose a 20 defensinas típicas y 5 atípicas. Seis defensinas, representantes de diferentes motivos activos, fueron producidas en *E.coli*, se incluyó además EcgDf1 previamente identificada en ceibo. Como primer criterio para definir una posible aplicación se identificaron los microorganismos que inhiben. Enfrentados a 20 patógenos, bacterias y hongos de interés clínico o agronómico, encontramos tres defensinas EcgDf1, PdDf11 y MiDf6 con amplio perfil de inhibición de fitopatógenos relevantes en la conservación de frutas poscosecha y dos, PdDf3 y PdDf10, con perfil complementario a las anteriores; excelentes candidatas para el desarrollo de formulaciones simples o combinadas. En el área clínica, seis defensinas presentaron perfiles de interés para diferentes patógenos. Focalizados en el diagnóstico de infecciones, demostramos que péptidos parciales con únicamente el motivo β -core GxCx6C, retienen la capacidad de unión al microorganismo blanco (afectan componentes de pared celular, membrana plasmática y ácidos nucleicos) y mejora la estabilidad en plasma. Los derivados β -core de dos defensinas, son evaluados como radiotrazadores (Radioquímica F.Química-CUDIM) con muy buenos resultados y otros tres fueron seleccionados para estudios futuros.

Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas / Microbiología y Biología Molecular

Palabras clave: *infecciones / moléculas de diagnóstico / defensinas/esnaquinas /*

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

El aumento de la resistencia antimicrobiana es una amenaza importante a nivel global para la salud humana y animal. La efectividad de medicamentos antimicrobianos, requeridos para medidas tanto preventivas como curativas, se ha puesto en riesgo debido su uso sistemático y/o excesivo y pocos productos de reemplazo están en estudio actualmente. En particular, las infecciones oportunistas, lejos de estar erradicadas, continúan siendo motivo de preocupación en los organismos de salud pública a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, OMS). La detección y localización precisa de la infección y la inflamación en una etapa temprana es de vital importancia para el manejo del paciente, sin embargo, aún hoy el diagnóstico preciso puede ser difícil e insume tiempo. A través de la medicina nuclear, se podría contribuir a un diagnóstico preciso y precoz de infecciones. Técnicas como la tomografía de emisión de fotón único (SPECT) y la tomografía por emisión de positrones (PET), proporcionan información bioquímica/fisiológica que permite la detección de cambios sutiles de procesos fisiológicos en etapas muy tempranas y anteriores a los cambios morfológicos. Estas técnicas consisten en administrar de forma sistémica un trazador radiactivo emisor gamma, cuya radiación de alto poder de penetración puede ser detectado externamente. Para ello, es necesario contar con radiofármacos blanco-específicos que puedan ser usados en toma de decisiones en terapia y seguimiento de tratamientos.

En este escenario, los péptidos antimicrobianos (AMP) emergen como posibles agentes terapéuticos innovadores. Son componentes del sistema inmune innato de todos los organismos vivos, contribuyendo al principal mecanismo de defensa durante etapas iniciales de infección y complementan en animales, al sistema inmune adaptativo (1,2). Promueven una respuesta relativamente rápida con bajo costo energético lo que se asocia a su estructura genética y proteica (3). A nivel clínico, un alto número de patentes documenta que, en muchos casos, los AMP muestran acción incrementada contra bacterias resistentes a antibióticos. Diferentes aplicaciones terapéuticas, desde administración tópica hasta tratamientos sistémicos de infecciones, así como para el control de enfermedades de transmisión alimentaria, son desarrolladas por varias compañías biotecnológicas que evalúan AMP de origen natural como sintéticos (4,5). Menos se ha avanzado respecto a tratamientos de infecciones fúngicas.

La necesidad de descubrir nuevas especies químicas estables y con baja o nula toxicidad, conduce a buscar en otras fuentes naturales. Las plantas superiores han demostrado ser una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos, por presentar actividad farmacológica per se, como por ser fuente de descubrimiento de nuevas moléculas para el desarrollo de drogas (antihipertensivos, analgésicos, citotóxicos, antiinflamatorios). Entre los AMP vegetales conocidos se observa amplia actividad biológica (6-12). Es creciente el interés por estas moléculas para el desarrollo de fármacos con acción antibiótica y antiinflamatoria, dado que no sólo presentan actividad contra fitopatógenos, sino también contra patógenos humanos, siendo además importantes efectores durante la inflamación y cicatrización de heridas (7,13).

En particular, el interés en defensinas vegetales se evidencia por el creciente número de patentes sobre éstas y sus posibles aplicaciones: uso médico como agente antimicrobiano, endulzante, diseño de proteínas de novo, proteínas con nuevas funciones, sistemas de expresión y purificación en bacterias y levaduras (14). Es importante resaltar que las defensinas vegetales analizadas respecto a su actividad frente a células de mamíferos mostraron no tener efecto tóxico (viabilidad de células endoteliales de vena umbilical humana, fibroblastos de músculos y piel, y capacidad de promover lisis de eritrocitos) (15). Un par de ejemplos de actividad contra patógenos humanos: - reducción de la formación de biofilms de *C. albicans* por HsAFP1 (6,16,17); - inhibición de la actividad transcriptasa reversa del virus VIH (15,12). Si bien se consideraba que las defensinas vegetales tenían actividad sólo contra patógenos fúngicos, estudios posteriores resaltan su importancia en el tratamiento de infecciones bacterianas y contra células cancerígenas (18).

Las defensinas constituyen una superfamilia conservada desde bacterias a mamíferos, con un péptido maduro básico (45-54 aminoácidos), rico en cisteínas que forman puentes disulfuro dando una estructura terciaria compacta (19,20). Esta estructura normalmente confiere resistencia a variaciones de temperatura y pH (12). A pesar de su tamaño relativamente pequeño, que impone limitaciones al repertorio de estructuras que pueden adoptar, muestran una alta variabilidad en sitios no conservados que explica la diversidad de blancos y modos de acción. Los estudios más recientes sobre su modo de acción apuntan a la interacción con componentes de membranas y paredes celulares de hongos, como esfingolípidos y glucosilceramidas. (20,21). Luego de la interacción con la célula blanco, las defensinas o bien permanecen en la superficie celular e inducen la muerte celular a través de la inducción de una cascada de señales ó son internalizadas e interactúan con dianas intracelulares (ADN, ARN, proteínas). En última instancia, todas conducen a la ruptura de la membrana plasmática, pero esto puede deberse a la interacción directa con lípidos específicos de la membrana o la perturbación de la membrana causada indirectamente por producción de especies reactivas de oxígeno, inducción de muerte celular, etc. (18, 22).

En este contexto, el objetivo general fue la búsqueda de AMP de tipo defensinas de origen vegetal como forma de identificar nuevas moléculas bioactivas contra microorganismos patógenos, para futuros desarrollos de fármacos eficaces en el diagnóstico, eventualmente control de infecciones y de preservantes de alimentos, en particular (frutas en postcosecha). Es importante señalar que para encontrar nuevas moléculas debe buscarse en fuente naturales nuevas, no exploradas previamente; en nuestro caso se eligió las plantas nativas, *Peltophorum dubium* (ibirapitá) y *Maytenus ilicifolia* (congorosa).

Alcanzar este objetivo implicó una primer etapa: - ensamblar y analizar transcriptomas de semillas germinadas de cada especie vegetal. –Depurar y catalogar las secuencias identificadas en base a estudios teóricos de redundancia, de predicción de estructura tridimensional, dominios activos y dominios de exportación, y a estudios experimentales de validación por clonado, reduciéndose a 20 defensinas típicas y 5 atípicas. – Construir siete microorganismos recombinantes, uno por con cada péptido seleccionado como representante/s de diferentes motivos activos, y producir cada péptido partir de estos microorganismos. – Determinar el perfil antimicrobiano de cada péptido, evaluando la actividad inhibitoria del crecimiento de una selección de 20 patógenos, bacterias y hongos de interés clínico o agronómico-alimentario. Con estos datos, se definió cuáles péptidos presentan interés para las diferentes áreas de aplicación.

En la segunda etapa se trabajó con péptidos de interés clínico para diagnóstico de infecciones por imagenología. El desarrollo de un radiofármaco es un largo proceso que inicia con moléculas candidatas y sigue con el marcado radiactivo y evaluación, debiendo cumplir con determinados requerimientos durante procesos de mercado (eficiencia), del complejo resultante (fisicoquímicos) y durante su aplicación *in vivo* en modelos animales (perfil farmacocinético y captación en lesiones, etc.) para después ser considerados candidatos para pasar a las etapas preclínicas. De ahí la importancia de la elección de las moléculas de partida, que además de su principal característica de unirse específicamente al blanco, deben en lo posible ser de fácil obtención, como forma de reducir costos. Nuestros resultados previos con la defensina EcgDf1, nuestra primer candidata para el desarrollo de un radiofármaco, mostraron bajos rendimientos de producción lo que dificulta el desarrollo posterior. Por esta razón buscamos reducir el tamaño de los péptidos candidatos. Esta etapa implicó: - identificar la mínima región de la defensina capaz mantener la capacidad de unión al microorganismo blanco, con el fin de facilitar su síntesis por predicción de motivos de actividad y estudios estructurales. – generar derivados similares a partir de las demás defensinas seleccionadas y variantes. – caracterizar péptidos generados respecto a retención de actividad, efecto sobre membrana plasmática de microorganismos blanco, capacidad de interaccionar con otros componentes celulares. En este punto es importante resaltar que un radiotrazador no requiere tener actividad antimicrobiana, la condición indispensable es la capacidad y especificidad de unión a su célula blanco. Por lo tanto, la actividad se evalúa únicamente como indicativo de su capacidad de unión previo a la optimización del radiomarcado; la visualización de actividad antimicrobiana, por mínima que sea, es un excelente indicio de su capacidad de unión; sin embargo, la ausencia de actividad no indica que no pueda unirse.

Este estudio, entonces permitió generar conocimiento sobre recursos genéticos de dos plantas nativas de nuestra región, en particular sobre la dotación de AMP de la familia de defensinas, clasificar los péptidos en función de su estructura y motivos activos, y catalogar representantes de los distintos grupos en función de su capacidad de inhibir patógenos de interés clínico o alimentario. Por otra parte, permitió avances sustanciales en el diseño de péptidos, derivados de defensinas con actividad contra patógenos humanos relevantes y su caracterización estructural y funcional. Como resultado, se comenzó con el desarrollo de las primeras etapas de evaluación como posibles radiotrazadores para el diagnóstico temprano de infecciones producidas por los patógenos oportunistas *C.albicans* y *A.niger*, con tres candidatos (colaboración con Radioquímica F. Química y CUDIM): dos derivados de EcgDf1 (Terán et al., 2022, Osorio et al., aceptado Chemical Biology & Drug Design), y el tercero, derivado de la defensina MiDf6, cuyo complejo radiomarcado presentó muy buenos parámetros fisicoquímicos y bioquímicos y está en evaluación biológica *in vitro* para luego pasar, en caso de cumplir con los parámetros requeridos, a modelo animal. La demostración de que péptidos parciales que abarquen únicamente el motivo ?-core retienen la capacidad de unión a microorganismos blanco, es un aporte importante para el diseño de nuevos derivados de defensinas y variantes (con pequeñas modificaciones). De hecho, otros derivados y variantes, están siendo caracterizados con el objetivo de seleccionar candidatos específicos para los demás patógenos analizados,

que pasarán a la etapa de marcado y evaluación como radiotrazadores. Finalmente, hoy disponemos de cuatro nuevas defensinas con perfiles de actividad contra microorganismos que deterioran frutos (naranjas, manzanas, uvas, tomates) durante su conservación poscosecha complementarios y que son estables a bajas temperaturas. Estas defensinas, potenciales candidatas para el desarrollo de preservantes de alimentos (en cámara y envasada) en formulaciones simples o combinadas, serán desafiadas respecto a su efectividad sobre fruta para luego estudiar otras características requeridas que atañen a la inocuidad alimentaria. A partir de este proyecto, se consolidaron dos líneas de trabajo con AMP, con una serie de moléculas candidatas para aplicaciones clínicas o aplicaciones agroalimentarias.

Metodología/Diseño del estudio

Validación biológica de transcriptos. Se trabajó sobre secuencias transcriptómicas de semilla germinadas de ibirapitá y congorosa, previamente generadas. Se compararon los contigs obtenidos a partir de los diferentes ensamblados a nivel de secuencia nucleotídica y peptídica. Los genes se amplificaron por PCR con primers específicos para cada contig, a partir de ADN genómico extraído mediante el método CTAB (23) o ADNc sintetizado usando MMLV (Invitrogen) y ARN extraído con Plant RNAeasy Mini Kit (Qiagen). Los primers se diseñaron con Primer4 (24). Los amplicones se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa, purificaron, clonaron en vector pGEM-Teasy (Promega Corporation, USA.) y secuenciaron (Macrogen Inc. Corea). Se ensayaron diferentes condiciones de amplificación (T annealing, t elongación, DMSO, polimerasas), diferentes concentraciones y métodos de purificación del ADN molde para minimizar inhibiciones por componentes fenólicos remanentes en muestras vegetales. Se descartaron aquellas secuencias no confirmadas.

Análisis de secuencias peptídicas. Las secuencias se analizaron mediante Expasy-Prot-Param tool (<http://web.expasy.org/protparam/>), SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), AMPA (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa>, 25), CAMP (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>) y Blast, para determinar sus parámetros, secuencia señal, dominios relacionados a la actividad antimicrobiana (usando fraccionamientos de 20, 15, 10 y 7 residuos) y similitud con proteínas depositadas. Se descartaron aquellas secuencias sin péptido señal de excreción o redundantes.

Modelado de estructura tridimensional. Se utilizó AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) previamente validado contra datos cristalográficos o RMN de 35 estructuras de defensinas (Figura 1). Simulaciones de muestreo aumentado por T-REMD (Temperature-Replica Exchange Molecular Dynamics), usando la maquinaria del programa AMBER20 en el Centro Nacional de Supercomputación – ClusterUY. Se corrieron 12 réplicas simultáneas usando los campos de fuerza para proteínas, agua e iones estado del arte y en el rango de temperaturas entre 270 y 600 K. Cada sistema molecular simulado requiere del 90% de todo el poder de cálculo en GPUs de ClusterUY durante al menos una semana. Se basa en la simulación simultánea de un péptido en medio fisiológico en un rango de temperaturas que permita explorar eficientemente la superficie de energía libre del péptido y por ende, identificar los valles en dicha superficie que se relacionan con sub-estados conformacionales más o menos estables de acuerdo a la profundidad del pozo de energía. La profundidad y tamaño del pozo de energía también determina la población de estructuras en ese específico sub-estado y así los diferentes sub-estados pueden caracterizarse y la energía relativa entre ellos cuantificarse. Utilizando EcgDf1 como referente, se combinaron todas las trayectorias de las simulaciones corridas y se calculó la raíz cuadrada del desvío cuadrático medio de todos los átomos del sistema con respecto a la estructura plegada de EcgDf1.

Obtención de péptidos. Las secuencias correspondientes a péptidos maduros se subclonaron en el vector de expresión pET32, fusionadas al gen de la tiorredoxina y a una etiqueta histidina (Histag) por Restriction-Free Cloning (26) o síntesis (GenScript) (Figura 2). Los péptidos se produjeron en *E. coli* Rosetta-gami - IPTG

(isopropil-B-Dtiogalactosidase); se purificaron por cromatografía de afinidad IMAC-Ni²⁺ en columnas de Chelating Sepaharose (General Electric), digirieron con enteroquinasa (EkMax, Invitrogen) para liberar la tiorredoxina; cuantificaron por Bradford (proteínas recombinante) y Colorimetric Peptide Assay (Thermo Fisher Scientific, defensinas) y visualizaron por SDS-PAGE 15% usando PageRuler Low (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos parciales, fueron producidos por síntesis química (CPC Scientific Peptide Partners, Corea).

Actividad antimicrobiana. Se evaluó por el método de diluciones sucesivas (27) por microespectrofotometría (595 nm, 28) por triplicado, determinando la concentración inhibitoria mínima y porcentajes de inhibición intermedios IC₅₀, IC₉₀. Microorganismos: - de interés clínico *Acinetobacter* sp, *Enterobacter cloacae*, *Enterococo* sp, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* (bacterias), *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Paecilomyces variotii* (hongos); - de interés agroalimentario: *Xanthomonas translucens*, *Xanthomonas vesicatoria* (bacterias), *Alternaria alternata*, *Botritis cinerea*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum*, *Phyllosticta citricarpa*, *Rhizopus* sp (hongos); - interés académico: *Phanerochaete chrysosporium* (Basidiomycota degradador de madera, representante de la otra División del reino Fungi sobreino Dykaria).

Efecto sobre células blanco:

- interacción péptido-célula por Microscopía Raman Confocal (29) con láser de 532 nm y objetivo 100X. Las muestras se trataron en las condiciones y concentraciones determinadas por la actividad de cada péptido. El tratamiento de datos se hizo con MATLAB. Asignación de bandas a partir de bibliografía (30-33)
- permeabilización de membrana plasmática se visualizó mediante el agregado de Sytox Green y observación al microscopio de fluorescencia para análisis de imágenes (34). Las muestras se trataron con diluciones seriadas en el entorno de la CIM de cada par péptido-microorganismo.
- Interacción con ADN por dicroísmo circular, colaboración con la Dra. Natalia Álvarez (F. Química Udelar) y el Dr. Luis Felipe Mendes (USP, Brasil), se analizó usando diluciones seriadas (35).

Resultados, análisis y discusión

La búsqueda y tamizaje mediante estudios teóricos de redundancia de secuencias, estructura y predicción de dominios activos y de exportación, y estudios experimentales de validación por clonado, reduciéndose a 20 defensinas típicas y 5 atípicas. El péptido maduro, en todas las secuencias de ambas especies, se ubica en un único exón y se clasifican en dos grupos:

- defensinas típicas (Figura 3A) muestra mayor diversidad de motivos ?-core GXCXnC (n = 3-6,8-10) que ibirapitá (n = 4-6, 8-9), en ambas el más abundante es n=6. En algunos casos existe conservación interespecie (PdDf4 y MidDf5) e intraespecie (MidDf7 y 9; PdDf8 y 9) con 94-96% identidad y 98-100% similitud; las variaciones predominan en Nterm alejadas del ?-core. Los péptidos PdDf12 y MiDf8, podrían tener alteraciones en la región ?? (Nterm) y en particular PdDf12 carece de la Cys Cterm, estos elementos si bien no afectarían directamente los dominios activos, en general son responsables de la estabilidad de la estructura y por lo tanto podrían afectar la actividad por desplazamiento hacia conformeros inactivos.
- defensinas atípicas (Figura 3B) con rearreglos de Cys "atípicos" y ausencia de motivo ?-core. El rearreglo CX7-8CX3CX6CX8CX1CX3CX9C está presente en tres (MiDf12, PdDf13 y PdDf14), subgrupo que se caracteriza además por una secuencia adicional en el extremo Cterm (llamadas defensinas largas).
- Otras dos secuencias de congorosa (Figura 3C), con 6 y 12 Cys, parecen ser producto de rearreglos genómicos sin capacidad inhibitoria significativa.

A través de péptidos representantes de diferentes motivos activos de defensinas típicas y atípicas, producidas en forma recombinante en *E. coli*, se demostró que todos son funcionales teniendo actividad contra alguno de los patógenos ensayados y que los dímeros y multímeros formados por defensinas típicas

son activos (Figura 4).

Se definieron las defensinas candidatas a posibles preservantes de fruta durante la poscosecha, almacenamiento en cámaras desde la cosecha hasta el consumidor, en base al perfil de fitopatógenos que inhiben (Tabla 1): EcgDf1, PdDf11 y MiDf6 con amplio perfil de inhibición de fitopatógenos y PdDf3 y PdDf10, con perfil complementario a las anteriores. Éstas pasan a ensayos de actividad en fruta, de toxicidad, etc., con miras al desarrollo de formulaciones simples o combinadas.

En el área clínica, focalizados en el diagnóstico de infecciones por imagenología, demostramos que péptidos parciales que abarquen el motivo activo ?-core, retienen la capacidad de unión a microorganismos blanco, requisito indispensable de un radiotrazador, aun cuando su actividad antimicrobiana disminuya varios órdenes o nula (no detectada). Esta observación resulta de comparación de derivados cortos (21, 14 y 10 aminoácidos) de la defensina de ceibo (Figura 5). Como esperado EcgDf1(21), tiene actividad del orden de la proteína de fusión Trx-EcgDf1 (Figura 6A,C), mientras que los derivados más pequeños retienen actividad (muy disminuida), resultados que concuerdan con la identificación de una población, si bien minoritaria, con conformación cercana (~3 Å) a la estructura plegada "activa" en EcgDf1(21), mientras que la mayoría de las estructuras predichas para los péptidos más pequeños estarían lejos de la conformación "activa" (Figura 7). Estos estudios también muestran que EcgDf1(21) en su versión oxidada formaría un único puente SS (Cys5-Cys6), resultando en una única población lejana a la conformación "activa" (~9 Å) no aportando a aumentar la actividad, pero presentan limitaciones para explicar la actividad retenida en los péptidos de 10 y 14 residuos. El mantener cierta actividad es un buen indicio de que la unión a microorganismos blanco no fue comprometida. Otro punto clave, es la estabilidad durante la aplicación, esto es la estabilidad en plasma a 37°C. Los resultados indican que el péptido de 10 residuos se mantiene estable durante el tiempo analizado (Figura 8), los de 21 y 14 residuos muestran degradación con fraccionamientos en dos o varios sitios, respectivamente. En base a estos resultados se continuó trabajando con derivados de 10 aminoácidos.

En este punto, se seleccionaron EcgDf1(10), por los resultados específicos obtenidos, y MiDf6(10), secuencia del mismo subgrupo (?-core GXCX6C) más distante de la anterior para avanzar en la generación de radiotrazadores de diagnóstico de infecciones por C albicans y A. niger, obteniéndose buenos resultados respecto a la estabilidad frente al radio marcado (NOTA-Galio, NOTA-Tecnecio), la unión a microorganismos blanco y otras propiedades fisicoquímicas relevantes (colaboración Área Radiofarmacia).

Del análisis de las secuencias de 10 residuos correspondientes a motivos ?-core GXCX6C, grupo mayoritario en ambas especies vegetales, se obtuvo:

- EcgDf1(10) tiene mayor actividad frente a A. niger y C. albicans que los demás péptidos (Figura 6B,D). PdDf1_P4 y PdDf6_P2 presentan un IC90 de aproximadamente 1 mM para C. albicans, mientras que MiDf6_P1 y PdDf4/ PdDf5/ MiDf5_P3 no tienen actividad en el rango de concentraciones analizadas (1- 3.900 ?M). El comportamiento frente a A. niger es un poco diferente observándose el siguiente orden: PdDf6 > MiDf6 = PdDf6 > MiDf5, PdDf4 y PdDf5 que a la máxima concentración analizada alcanzan 80, 65-70 y 35% de inhibición respectivamente.

- Las simulaciones estructurales, no acompañan completamente los resultados de actividad. Teniendo en cuenta las limitaciones del análisis estructural por T-REMD al trabajar con secuencias cortas, se usó EcgDf21 como andamio sustituyendo únicamente aquellos residuos de interés: - MiDf6, tres sustituciones H2K, R4H y F6L; - MiDf5, única sustitución H2N, esta secuencia representa además a PdDf4 y PdDf5; - PdDf6, doble sustitución H2R y R8H; - MiDf7, H2D única diferencia (numeración interna al ?-core G1X2C3X4G5X6R7X8R9C10). Todas las variantes muestran una sub-población entre aproximadamente 2 y 3.5 Å de la conformación activa de referencia (Figura 9), destaca MiDf5 cuya conformación más visitada es la que conserva perfectamente el motivo de hojas ? y loop, esta conformación es mucho menos visitada por las sustituciones MiDf7, PdDf6 y finalmente MiDf6 en orden de mayor a menor presencia del motivo plegado activo.

- Respecto a los blanco de acción los resultados de actividad, efecto sobre membrana por SYTOX Green

(Figura 10), ADN por dicroísmo circular (Figura 11) y otros componentes celulares por espectroscopía Raman Confocal (Figura 12), indican que con excepción de MiDf5(10)_P3, permeabilizan las membranas de uno o ambos microorganismos; afectan en diferentes grados la estructura del ADN y los espectros RAMAN asociados diferentes componentes de la pared celular, membrana y ácidos nucleicos. El efecto sobre el estado de oxidación del citocromo C podría estar asociado a la óxido-reducción de las cisteínas de los péptidos.

Estas características indicarían blancos subcelulares de unión, lo que habilita a continuar con la evaluación de características radioquímicas, siendo importante determinar la eficiencia y especificidad de unión. Claramente, MiDf5(10)_P3 no sería la candidato de elección porque al no permeabilizar la membrana, probable causa de la pérdida de actividad, podría tener dificultad de acceder a blancos intracelulares; se debe tener en cuenta que si bien los espectros RAMAN indican que puede acceder a sus blancos intracelulares, las condiciones experimentales son totalmente diferentes a las de aplicación de un radiofármaco a nivel del medio como de la relación cantidad de péptido/microorganismo. En el caso de MiDf6(10), se observó efecto sobre membrana (Figura 10) por lo cual la disminución de actividad parece estar asociada a otro/s factor/es. Algunos resultados, como que los derivados de EcgDf1 distorsionen el ADN mientras que la defensina completa no (Figura 11), abren nuevas interrogantes sobre los mecanismos. Para profundizar en aspectos básicos del comportamiento de las defensinas y péptidos derivados y sus blancos de acción, se continuará con la caracterización de nuevas variantes (algunas ya diseñadas y adquiridas, Figura 5) y de las defensinas completas.

Conclusiones y recomendaciones

Este trabajo constituye un gran avance en la búsqueda de nuevos agentes de diagnóstico o de control. Se recorrió todo el camino desde el análisis de la dotación génica de las especies vegetales fuentes de nuevos metabolitos, pasando por la caracterización, selección y modificación de péptidos candidatos, algunos de cuales pasaron a la etapa de generación y evaluación de radiotradores de infecciones por *C. albicans* y *A. niger* en humanos.

Se dispone de un listado variado de defensinas de origen vegetal, 18 típicas y 3 atípicas, entre las cuales uno representante de cada grupo mostró tener actividad antimicrobiana contra una serie de patógenos de interés clínico o agroalimentario, quedando el resto como reservorio para futuros estudios.

A partir de los perfiles de microorganismos inhibidos, se seleccionaron cinco candidatos a ser desafiados para el desarrollo de conservantes de alimentos en formulaciones simples o combinadas.

A fines clínicos de diagnóstico por imagenología molecular, se demostró para defensinas del grupo mayoritario, la secuencia del motivo β -core (10 residuos) es suficiente para mantener la unión al microorganismo a diagnosticar sorteando los problemas de degradación en plasma.

Los derivados de 10 residuos de las defensinas EcgDf1 y MiDf6, están en evaluación como radiotrazadores en colaboración con Radioquímica F. Química y CUDIM. Otros tres péptidos fueron evaluados y cumplen con los requisitos para los mismos estudios.

Como blancos subcelulares de acción se identificaron diferentes componentes de pared celular y de membrana plasmática, así como ácidos nucleicos.

Las metodologías implementadas y adecuadas a los microorganismos y/o a los péptidos, durante este estudio, son la base para la continuación del trabajo.

Referencias bibliográficas

- 1 Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. 2005. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* 77, 451–459
- 2 Brown KL, Hancock RE. 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 24–30
- 3 Zasloff, M. 2002. Antimicrobial Peptide from multicellular organism. *Nature*, 415: 389-395.
- 4 Tonarelli G, Simonetta A. 2013. Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos. *FABICIB* 17, 137-177
- 5 Shah, DM, Read, ND. 2013. Antifungal peptides come of age. *Fungal Biology Reviews*, 26:107-108.
- 6 Thevissen, K, Warnecke, DC, Francois, IE, Leipelt, M, Heinz, E, Ott, C, Zahringer, U, Thomma, BP, Ferket, KK, Cammue, BP. 2004. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 3900-3905.
- 7 Thevissen, K, Kristensen, HH, Thomma, BP, Cammue, B, Francois, IE. 2007. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug discovery today*, 12: 966-971.
- 8 Lobo, DS, Pereira, IB, Fragel-Madeira, L, Medeiros, LN, Cabral, LM, Faria, J. 2007. Antifungal Pisum sativum defensin 1 interacts with Neurospora crassa cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry-US* 46: 987–96.
- 9 Benko-Iseppon, AM, Galdino, SL, Calsa JrT, Kido, EA, Tossi, A, Belarmino, LC, Crovella, S. 2010. Overview on Plant Antimicrobial Peptides. *Current Protein Peptide Science*, 11: 181-188.
- 10 Nahirñak, V, Almasia, NI, Fernandez, PV, Hopp, H E, Estevez, JM, Carrari, F, Vazquez-Rovere, C 2012 a. Potato snakin-1 gene silencing affects cell division, primary metabolism, and cell wall composition. *Plant physiology*, 158: 252-263.
- 11 Nahirñak, V, Almasia, NI, Hopp, HE, Vazquez-Rovere, C. 2012 b. Snakin/GASA proteins: Involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. *Plant signaling & behavior*, 7: 1004-1008.
- 12 Hegedüs, N, Marx, F. 2012. Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal biology reviews*. 26:132-145
- 13 Sathoff AE, Velivelli S, Shah DM, Samac DA. 2019. Plant Defensin Peptides have Antifungal and Antibacterial Activity Against Human and Plant Pathogens. *Phytopathology*, 109: 402-408.
- 14 Yang, Y-F y Lyu, P-C. 2008. The protein of plant defensin family and their application beyond plant disease control. *Recent Patents on DNA and Gene Sequences*, 2:214-218
- 15 Carvalho, AO, Gomes, VM. 2009. Plant defensins-prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30:1007-1020.
- 16 Thevissen, K, de Mello Tavares, P, Xu, D, Blankenship, J, Vandenbosch, D, Idkowiak-Baldys, J, Govaert, G, Bink, A, Rozental, S, de Groot, PW, Davis, TR, Kumamoto, CA, Vargas, G, Nimrichter, L, Coenye, T, Mitchell, A, Roemer, T, Hannun, YA, Cammue, BP. 2012 The plant defensin RsAFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 84:166-80.
- 17 Vriens, K, Cools TL, Harvey PJ, Craik DJ, Spincemaille P, Cassiman D, Braem A, Vleugels J, De Coninck B, Cammue BPA, Thevissen K. 2015 Synergistic activity of the plant defensin HsAFP1 and caspofungin against *Candida albicans* biofilms and planktonic cultures. *PloS one* 10,e0132701.
- 18 Sathoff AE, Samac DA. 2019. Antibacterial activity of plant defensins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32: 507-514.
- 19 Thomma, BP, Cammue, BP; Thevissen, K. Plant defensins. 2002. *Planta*, 216: 193–202.
- 20 De Coninck, B, Cammue, B, Thevissen, K. 2013. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal biology Reviews*. 26: 109-120

- 21 Spelbrink, RG, Dilmac, N, Allen, A, Smith, TJ, Shah, DM, Hockerman, GH. 2004. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiology*, 135: 2055–6.
- 22 Parisi K, Shafee TMA, Quimbar P, Weerden NL Van Der, Bleackley MR, Anderson MA. 2018. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Semin Cell Dev Biol*. 88:107-118
- 23 Doyle, J. (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW, Eds. *Molecular Techniques in Taxonomy*, Springer, Berlin, Heidelberg, 283-293.
- 24 Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. 365-386.
- 25 Torrent M, Tommaso P Di, Pulido D, Nogués MV, Notredame C, Boix E, Andreu D. 2012. AMPA: an automated web server for prediction of protein antimicrobial regions. *Bioinformatics* 28, 130–131.
- 26 Van Den Ent, F, Löwe, J. 2006. RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 67: 67-74.
- 27 Tiozzo, E, Rocco, G, Tossi, A, Romeo, D. 1998. Wide-spectrum antibiotic activity of synthetic, amphipathic peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249: 202–206.
- 28 Broekaert WF, Terras FR, Cammue B, Vanderleyden J, (1990). An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters* 69, 55-59.
- 29 Athamneh AIM, Alajlouni RA, Wallace RS, Seleem MN, Sengera RS. 2014. Phenotypic Profiling of Antibiotic Response Signatures in *Escherichia coli* Using Raman Spectroscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 1302-1314.
- 30 De Gelder J, De Gussem K, Vandenabeele P, Moens L. 2007. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.* 38: 1133–1147.
- 31 Li H, Cao Y, Lu F. 2021. Differentiation of different antifungals with mechanisms using dynamic surface-enhanced Raman spectroscopy combined with machine learning. *J. Innov. Opt. Health Sci.* 14(4): 2141002
- 32 Pezzotti G, Kobara M, Nakaya T, Imamura H, Miyamoto N, Adachi T, et al. 2022. Raman Spectroscopy of Oral Candida Species: Molecular-Scale Analyses, Chemometrics, and Barcode Identification. *International Journal of Molecular Sciences*. 23: 5359.
- 33 Chao Y, Zhang T. 2012. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: From initial attachment to mature biofilm. *Anal Bioanal Chem*. 404: 1465–1475.
- 34 El-Mounadi, K, Islam, KT, Hernández-Ortiz, P, Read, ND, Shah, DM. 2016. Antifungal mechanisms of a plant defensin MtDef4 are not conserved between the ascomycete fungi *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology*

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)