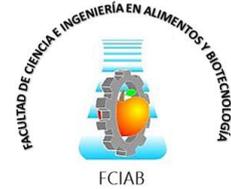




UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Obtención del péptido antimicrobiano aedesina por medio de un sistema de autoescisión mediado por inteina, utilizando un sistema de expresión en *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo la obtención de título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Autor: Dimitri Serge Mejía Bonilla

Tutor: Ph.D. Mario Daniel García Solís

Ambato - Ecuador

Septiembre - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

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

Ambato, 21 de julio de 2023

PhD. Mario Daniel García Solís

C.I. 1103605471

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Dimitri Serge Mejía Bonilla, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Dimitri Serge Mejía Bonilla

C.I. 1804580551

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

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

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.



Dimitri Serge Mejía Bonilla

C.I. 1804580551

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

Presidente del tribunal

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

C.I. 1803160272

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

C.I. 1804256905

Ambato, 25 de agosto del 2023

AGRADECIMIENTO

A mis padres por la confianza ciega que han brindado en mi proceso académico, a mis hermanos quienes son mi ejemplo a seguir, a Martina y Mary por traer risas a nuestra familia, y a Dayanna por ser mi apoyo y motivación. A mis abuelitos y a Jared agradezco la paciencia, ayuda y comprensión. A toda mi familia correspondo el afecto brindado.

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato por permitirme instruirme para ser un excelente profesional. A todos los docentes que han sabido orientar el proceso educativo sin importar las adversidades. De manera especial quiero mostrar mi gratitud a la Dra. Liliana Cerda y en particular a mi tutor Dr. Mario García por brindarme todo su apoyo, ser una guía y una fuente de inspiración para mi superación personal.

Agradezco a Andrea, Fernanda y Duda por la paciencia y predisposición en la enseñanza, y destaco la aportación de Kerly por ser una compañera incondicional. A mis amigos de laboratorio quienes siempre compartieron risas, conocimientos y anécdotas. Finalmente, a todos los amigos que pude formar en estos años quienes me ayudaron a salir adelante y me motivaron a conseguir mis objetivos, especialmente a Luis, Josue, Mary y Vivian.

Gracias a todos por ser parte de esta etapa. Esto solo es el comienzo.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN EJECUTIVO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Infecciones bacterianas	2
1.1.2 Péptidos antimicrobianos	5
1.1.3 Cecropinas.....	14
1.1.4 Métodos de obtención de péptidos.....	19
1.1.5 Sistema de autoescisión mediado por inteina.....	22
1.2 Objetivos	26
1.2.1 Objetivo general	26
1.2.2 Objetivos específicos	26
CAPÍTULO II	27
2. METODOLOGÍA	27
2.1. Materiales	27
2.1.1. Equipos de laboratorio	27
2.1.3. Reactivos de laboratorio	28
2.1.4. Insumos de laboratorio.....	29
2.1.5. Materiales de escritorio.....	29
2.2. Métodos	30

2.2.1. Diseño del vector de expresión de la proteína recombinante His_tag-inteina-aedesina.....	30
2.2.2. Evaluación de las condiciones de expresión de la proteína recombinante en <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	30
2.2.3. Purificación del péptido antimicrobiano mediante cromatografía líquida de proteínas.....	32
CAPÍTULO III.....	34
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
3.1 Construcción del plásmido	34
3.2 Transformación.....	35
3.3 Ensayo de expresión de la PF	37
3.4 Expresión y purificación del péptido antimicrobiano	40
3.4.1 Purificación de la construcción Histag_inteina_aedesina.....	40
3.4.2 Desalado.....	43
3.4.3 Ensayo de autoescisión mediado por inteina	44
3.4.4 Purificación del péptido antimicrobiano	51
CAPÍTULO IV.....	54
3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
4.1. Conclusiones	54
4.2. Recomendaciones.....	55
4. MATERIAL DE REFERENCIA.....	56

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1. <i>Diversidad estructural de los AMPs.</i>	9
Figura 2. <i>Diferencia en la conformación de membranas de tipo animal y bacteriana.</i>	12
Figura 3. <i>Representación de los distintos tipos de interacción posibles entre los péptidos con la membrana celular.</i>	14
Figura 4. <i>Representación de la aedesina, la cual exhibe una estructura de α hélice.</i>	16
Figura 5. <i>Distribución de aminoácidos del AMP aedesina.</i>	17
Figura 6. <i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de la aedesina mediante un microscopio electrónico.</i>	18
Figura 7. <i>Esquema del proceso de empalme de la inteina para la obtención de proteínas maduras.</i>	24
Figura 8. <i>Construcción del plásmido para la PF.</i>	35
Figura 9. <i>Ensayo de expresión del péptido antimicrobiano.</i>	38
Figura 10. <i>Cromatograma correspondiente a la purificación de la proteína recombinante</i>	43
Figura 11. <i>Cromatograma del desalado del péptido por filtración en gel.</i>	44
Figura 12. <i>Ensayo de optimización de condiciones para la autoescisión de la inteina</i>	48
Figura 13. <i>Resultado de la obtención del AMP aedesina usando una columna de afinidad.</i>	53

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1. <i>Descripción de los principales mecanismos de transferencia horizontal de genes en bacterias</i>	5
Tabla 2. <i>Características de los principales AMPs obtenidos de diversas fuentes.</i>	6
Tabla 3. <i>Resumen de los principales parámetros fisicoquímicos y estructurales de diversos AMPs con α hélice.</i>	16
Tabla 4. <i>Equipos de laboratorio</i>	27
Tabla 5. <i>Instrumentos de laboratorio</i>	27
Tabla 6. <i>Reactivos de laboratorio</i>	28
Tabla 7. <i>Insumos de laboratorio</i>	29
Tabla 8. <i>Materiales de escritorio</i>	29
Tabla 9. <i>Formulación del caldo lisogenia (LB).</i>	30

RESUMEN EJECUTIVO

Los antibióticos han mejorado significativamente el estilo de vida de las personas desde su implementación. No obstante, en la actualidad, el uso indiscriminado de estos medicamentos ha generado una crisis sanitaria debido a la resistencia antimicrobiana. La tendencia actual muestra un aumento en la cantidad de cepas resistentes que no pueden ser tratadas con los antibióticos convencionales, lo que ha llevado a la necesidad de desarrollar una nueva generación de antibióticos. Una de las alternativas más prometedoras es la aplicación de péptidos antimicrobianos, entre los cuales destaca la aedesina.

El presente proyecto de investigación se centra en la implementación de una estrategia de purificación para la aedesina. Esta estrategia consiste en un sistema autoescindible mediado por inteína, el cual posee una condición de prohibición que inhabilita el autocorte en presencia de altas concentraciones de sal. Para la expresión se usó un sistema heterólogo de síntesis en *E. coli* BL21.

En conclusión, la síntesis en bacterias ofrece varias ventajas en comparación con otros métodos de obtención de péptidos. Además, la estrategia utilizada para la purificación de la aedesina ha demostrado ser efectiva. Sin embargo, todavía existen desafíos que deben superarse, como la toxicidad del péptido y la expresión basal. A pesar de estos inconvenientes, la exitosa expresión y purificación de la aedesina la posicionan como un candidato interesante para su análisis en estudios clínicos futuros.

Palabras clave: resistencia antimicrobiana, péptidos antimicrobianos, purificación de proteínas, sistema autoescindible, cromatografía líquida.

ABSTRACT

Antibiotics have significantly improved people's lifestyle since their implementation. However, at present, the indiscriminate use of these drugs has generated a health crisis due to antimicrobial resistance. The current trend shows an increase in the number of resistant strains that cannot be treated with conventional antibiotics, which has led to the need to develop a new generation of antibiotics. One of the most promising alternatives is the application of antimicrobial peptides, among which aedesin stands out.

The present research project focuses on the implementation of a purification strategy for aedesin. This strategy consists of an intein-mediated self-cleavable system, which possesses a prohibition condition that disables self-cleavage in the presence of high salt concentrations. A heterologous system of synthesis in *E. coli* BL21 was used for expression.

In conclusion, synthesis in bacteria offers several advantages compared to other methods of obtaining peptides. Furthermore, the strategy used for the purification of aedesin has proven to be effective. However, there are still challenges to be overcome, such as peptide toxicity and basal expression. Despite these drawbacks, the successful expression and purification of aedesin position it as an interesting candidate for analysis in future clinical studies.

Key words: antimicrobial resistance, antimicrobial peptides, protein purification, self-expendable system, liquid chromatography.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) forman parte de la inmunidad innata de una gran cantidad de organismos, los cuales los defienden de una amplia gama de infecciones. Actualmente, son una de las alternativas más llamativas para sustituir la aplicación de antibióticos para el tratamiento de infecciones (**Kumar et al., 2018; Zhang et al., 2021**). Complementariamente, **Shanmugaraj et al., (2021)** establece que los AMPs poseen varias ventajas en comparación con antibióticos convencionales para el tratamiento contra patógenos resistentes, por lo que se podrían establecer como una nueva generación de antimicrobianos en el futuro.

Los AMPs poseen un gran potencial para el tratamiento de enfermedades (**Shanmugaraj et al., 2021**). Actualmente, el estudio de los AMPs se centra en el tratamiento clínico de infecciones por bacterias patógenas, reducción de inflamación y cicatrización de heridas. Sin embargo, es necesario aumentar su estudio para comprender de mejor manera su mecanismo de acción y características estructurales, de esta manera reducir su citotoxicidad y aumentar su estabilidad (**Zhang et al., 2021**).

El mecanismo antimicrobiano de los AMPs consiste en la neutralización de objetivos intracelulares mediante el ataque a la membrana bacteriana por traslocación. Los AMPs pueden afectar a varios objetivos de la membrana lo que también les confiere actividad sobre bacterias resistentes (**Shanmugaraj et al., 2021; Zhang et al., 2021**). La producción de AMPs en sistemas heterólogos es un mecanismo que ofrece varias ventajas en comparación a otros métodos de síntesis de péptidos. Los sistemas bacterianos son los más usados debido a su fácil manipulación, elevada densidad celular y tasas de crecimiento aceleradas (**Shanmugaraj et al., 2021**).

La expresión de AMPs usando bacterias, como sistema de expresión heterólogo, a menudo implica varios desafíos; por ende, es necesario implementar mecanismos que permitan reducir la toxicidad de los péptidos y ofrezcan un buen rendimiento (**Amarantog et al., 2021; Prabhala et al., 2022**). Los mecanismos de empalme de proteínas han demostrado tener una alta efectividad y su aplicación ha sido exitosa en la síntesis de AMPs. Adicionalmente, los mecanismos de empalme de péptidos han sido ampliamente estudiados (**Amaranto et al., 2021; Elleuche & Pöggeler, 2010; Sarmiento & Camarero, 2019**).

La aedesina es un AMP que pertenece a la familia de las cecropinas, cuyas características estructurales están bien caracterizadas. Es uno de los péptidos más destacados gracias a su capacidad antimicrobiana frente a una amplia variedad de cepas multirresistentes (**Godreuil et al., 2014**). En la presente investigación se busca sintetizar la aedesina mediante un sistema autoescindible, variando condiciones de pH, temperatura y tiempo, para posteriormente estandarizar las mejores condiciones para la síntesis de este con el fin de emplear este péptido como un AMP.

1.1.1 Infecciones bacterianas

1.1.1.1 Resistencia antimicrobiana

Los antibióticos han mejorado el estilo de vida de las personas. Son el medicamento más recetado para tratar todo tipo de infecciones (**Jabbarin et al., 2023**). Sin embargo, el abuso de estos medicamentos ha generado una crisis sanitaria, que se traduce en un incremento en la tasa de mortalidad y mayor tiempo de hospitalización (**Agyeman et al., 2022**).

La resistencia antimicrobiana se da cuando los microorganismos tienen la capacidad de resistir a fármacos específicos, los cuales antes eran efectivos para tratar las infecciones causadas por estos (**Jabbarin et al., 2023**). La resistencia a los antibióticos se clasifica acorde con el patrón de sensibilidad de los microorganismos a los distintos antibióticos (**Asri et al., 2021**). De acuerdo con **Agyeman et al., (2022)**, los microorganismos MDR (del inglés multi-drug resistant) son los que provocan un

mayor problema de seguridad para el médico y paciente. Los MDR generan infecciones que no pueden ser tratadas por múltiples fármacos y son resistentes a al menos un agente de tres o más clases de antibióticos diferentes (**Adler et al., 2016**).

A criterio de **Jabbarin et al., (2023)**, la principal razón del apareamiento de cepas resistentes radica en el uso inapropiado de los antibióticos. Complementariamente, la OMS determina que el 50 % de los medicamentos recetados no son adecuados para tratar la enfermedad del paciente (**Agyeman et al., 2022**). En países en vías de desarrollo, la venta libre de muchos antibióticos conduce a su administración errónea por parte de los pacientes (**Haque et al., 2016; Kose & Colak, 2021; Thriemer et al., 2013**).

El mal uso de los antibióticos tiene graves implicaciones debido al apareamiento de cepas multirresistentes (**Jabbarin et al., 2023**). A criterio de **Kakoullis et al., (2021)**, la mayor tasa de mortalidad producto de infecciones por microorganismos MDR está dada por *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp y *Enterococcus* spp. En Ecuador, se ha detectado la presencia de genes de resistencia a antibióticos como colistina (antibiótico usado como última alternativa para tratar infecciones causadas por bacterias multiresistentes) (**Albán et al., 2020**). Así mismo, **Hernández-Alomía et al., (2023)** reporta la presencia de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos en el transporte público en Quito.

Las infecciones causadas por *S. aureus* con resistencia a metilicina o de *Enterococcus* spp. con resistencia a vancomicina implican un desafío en hospitales (**Terreni et al., 2021**). Además, las infecciones nosocomiales se intensificaron en la pandemia COVID-19. En Guayaquil se reportó la presencia de un brote de *K. pneumoniae* BLEE (del inglés, Extended-Spectrum B-Lactamase) en unidades de cuidados intensivos con pacientes infectados con SARS-CoV-2 (**Gómez et al., 2022**).

La tendencia actual es que cada vez existan más cepas resistentes que no pueden ser tratadas, esta crisis se intensifica debido a que el desarrollo de nuevos antibióticos es lento (**Agyeman et al., 2022**). Por lo tanto, es necesario buscar alternativas a los antibióticos tradicionales, las cuales sean rentables para producirse a nivel industrial, su producción sea amigable con el medio ambiente y mantengan su rendimiento.

1.1.1.2 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Los mecanismos de resistencia de las bacterias surgen debido a presiones selectivas, en donde las bacterias se adaptan a las condiciones ambientales (**Becerra et al., 2009; Kakoullis et al., 2021**). Acorde con **Habboush & Guzman., (2022)**, la resistencia a los antimicrobianos puede ser intrínseca o adaptativa.

La resistencia intrínseca de las bacterias se refiere a las características genéticas o fisiológicas que pueden tener las bacterias, sin necesidad de haber estado expuestas a un antibiótico específico (**Ahmad et al., 2023; Habboush & Guzman, 2022**). La resistencia adquirida se lleva a cabo por procesos que involucran selección natural (**Andersson & Hughes, 2014**). Por ejemplo, mutaciones en la topoisomerasa IV y ADN girasa pueden dar paso a la resistencia de *S. aureus* y *Enterococcus* spp frente a fluroquinolonas. Asimismo, ambas cepas presentan metilaciones que generan resistencia contra tetraciclinas, clindamicina, entre otros antibióticos (**Kakoullis et al., 2021**).

La transferencia genética horizontal (TGH), es un proceso que genera en las bacterias resistencia a los antibióticos, consiste en que las bacterias adquieren material genético de otras bacterias que ya tienen previamente resistencia a los antimicrobianos o de otros microorganismos presentes en el medio ambiente (**Ahmad et al., 2023; Andersson & Hughes, 2014; Habboush & Guzman, 2022**). La conjugación, la transformación y la transducción son los principales mecanismos para la TGH (Tabla 1) (**Ahmad et al., 2023; Redondo-Salvo et al., 2020**). Elementos como los transposones (Tn) o los integrones, se relacionan con estos mecanismos debido a que

favorecen la integración de material genético mediante transposición (**Emamalipour et al., 2020**).

Tabla 1. Descripción de los principales mecanismos de transferencia horizontal de genes en bacterias

Mecanismo	Definición	Referencias
Transformación	Las bacterias acoplan el material genético que se encuentra presente en el entorno. Esta asimilación es directa y depende de regulación transcripcional que activa la expresión de genes que captan el ADN. La transformación no favorece la transferencia de genes de resistencia a antibióticos en comparación con los otros mecanismos.	(Emamalipour et al., 2020; Sun et al., 2019).
Conjugación	Las bacterias acoplan la información mediante plásmidos, los cuales provienen de otra célula. Los plásmidos pueden estar integrados por elementos móviles como Tn y secuencias de inserción.	(Ahmad et al., 2023; Emamalipour et al., 2020).
Transducción	Las bacterias pueden acoplar el material genético por medio de una infección por virus bacteriófagos.	(Ahmad et al., 2023; Choudhuri, 2014).

Otros mecanismos implican el desarrollo de sistemas *efflux* los cuales impiden que el agente antimicrobiano pueda ejercer su función al no encontrar un blanco intracelular (**Becerra et al., 2009**). También pueden incluir la formación de biopelículas o la tolerancia fenotípica, estos mecanismos forman parte de la resistencia adaptativa (**Orazi & O’Toole, 2020**).

1.1.2 Péptidos antimicrobianos

1.1.2.1 Origen y función de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos destacan por su ubicuidad en todas las formas de vida, se diferencian por su composición de aminoácidos, estructura, función biológica, mecanismo de acción, y origen (**Kumar et al., 2018; Pasupuleti et al., 2012; Raheem & Straus, 2019; Zhang et al., 2021**). La actividad biológica del péptido depende de su conformación, la influencia de cofactores, y la interacción con el entorno (**Kumar et al., 2018**).

A pesar de que hay varios tipos de péptidos con funciones biológicas diversas, la capacidad antimicrobiana resalta sobre las demás funciones (**Kumar et al., 2018**). Naturalmente, el origen de los AMPs surge por las condiciones del entorno y a las limitaciones celulares de los organismos. Esto se explica por el hecho de que la producción de péptidos requiere de menos tiempo y energía que la síntesis de anticuerpos, que forman parte de la inmunidad adquirida (**Kumar et al., 2018; Mohammed et al., 2017**).

Los organismos que poseen únicamente sistema inmunitario innato dependen significativamente de los péptidos para controlar diversas infecciones (**Raheem & Straus, 2019**). Se han encontrado AMPs en todas las especies de insectos e invertebrados marinos estudiados. En ciertas especies de invertebrados marinos, los AMP pueden expresarse de manera constitutiva, lo que respalda su importancia en las funciones biológicas de los organismos (Tabla 2) (**Kumar et al., 2018; Pasupuleti et al., 2012**).

La regulación y actividad de los AMPs está mediada por enzimas proteolíticas, las mismas que se encargan de la escisión de varios péptidos, como las catelicidinas (**Kumar et al., 2018**). Estas enzimas someten a propéptidos a un procesamiento proteolítico para obtener un péptido bioactivo maduro (**Cole & Nizet, 2016; Mohammed et al., 2017**). Las enzimas proteolíticas se clasifican según su grupo funcional en el sitio activo, en: aspártico proteasas, cisteína proteasa, serina proteasas y metaloproteasas (**Rao et al., 1998**).

Tabla 2. *Características de los principales AMPs obtenidos de diversas fuentes.*

Nombre	Fuente	Actividad contra bacterias	Actividad antimicrobiana	Referencias
Cecropina A	Polilla	<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)	Se dirige a la membrana formando poros	(Fenner, 2020)
LL-37	Catelicidina humana hCAP18	<i>S. aureus</i>	Afecta a la capa lipídica de la membrana	(Shurko et al., 2018)
Nisina	Lactococcus lactis	<i>Streptococcus mutans</i>	Ataca específicamente a la bicapa lipídica de la membrana del patógeno.	(Lorenzón et al., 2018)
Magainin 2	Piel de rana con garras africana	<i>E. coli</i>	Perturba a la membrana, su mecanismo es en forma de poro toroidal.	(Zhao et al., 2020)
Temporina B	Piel de rana	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Afecta a la capa lipídica de la membrana	(Piras et al., 2015)

1.1.2.2 Clasificación y estructura de los AMP

Los AMPs poseen diversidad estructural bien definida, y se clasifican en: estructura α helicoidal, estructura de lámina β , extendidos y en bucle estabilizado (Figura 1) **(Boparai & Sharma, 2020; Diamond et al., 2009; Reinhardt & Neundorf, 2016)**.

Los AMPs poseen una diversidad estructural bien definida, se clasifican en: α helicoidal, lámina β , extendidos y en bucle estabilizado (Figura 1) **(Boparai & Sharma, 2020; Diamond et al., 2009; Reinhardt & Neundorf, 2016)**.

Los AMPs con una estructura α helicoidal, son de corta longitud y organización lineal simple, a menudo son ricos en aminoácidos como la lisina, alanina, prolina, entre otros. Sin embargo, carecen de cisteína ya que no forman enlaces disulfuro intramoleculares (Figura 1 A), esto se debe a que los puentes disulfuro se forman a partir de la oxidación de dos grupos tioles de residuos de cisteína **(Kumar et al., 2018; Raheem & Straus,**

2019). La ausencia de enlaces disulfuro aporta estabilidad a los AMPs dado que no altera su conformación. Entre los péptidos más representativos con esta estructura está la magainina, las aureínas, catelicidinas, entre otros **(X. Li et al., 2022; Reinhardt & Neundorf, 2016).**

A diferencia de los péptidos α hélice, los AMPs con una estructura de lámina β si pueden formar entre 2 o 4 puentes disulfuro (Figura 1 B) **(X. Li et al., 2022; Sultana et al., 2021).** Su estructura es rígida, su conformación es estable, y no sufren cambios estructurales significativos en entornos acuosos **(Diamond et al., 2009).** Los péptidos representativos con esta estructura son las defensinas, protegrinas, bactericinas, entre otros **(Kumar et al., 2018).**

La estructura extendida forma estructuras secundarias irregulares y atípicas, los péptidos y lípidos de membrana que conforman esta estructura se pueden unir mediante enlaces no covalentes como puentes de hidrogeno o fuerzas de Van der Waals **(X. Li et al., 2022).** Su secuencia primaria es rica en aminoácidos como: prolina, triptófano, histidina, etc. Los AMPs más conocidos con esta estructura son la indolicina, bactenicinas y α -1 purotionina (Figura 1 C) **(Reinhardt & Neundorf, 2016; Sultana et al., 2021).** Su actividad antimicrobiana se caracteriza por atacar objetivos intracelulares, ya que pueden penetrar a la membrana celular **(X. Li et al., 2022).**

La estructura de los AMPs en bucle se caracteriza por presentar horquillas o lazos, estas se interconectan por al menos un enlace disulfuro. Estas estructuras son variables, presentan una alta estabilidad, y en general pocos péptidos poseen esta estructura, como los dodecapéptidos y taquiplesinas (Figura 1 D) **(Diamond et al., 2009; Reinhardt & Neundorf, 2016).**

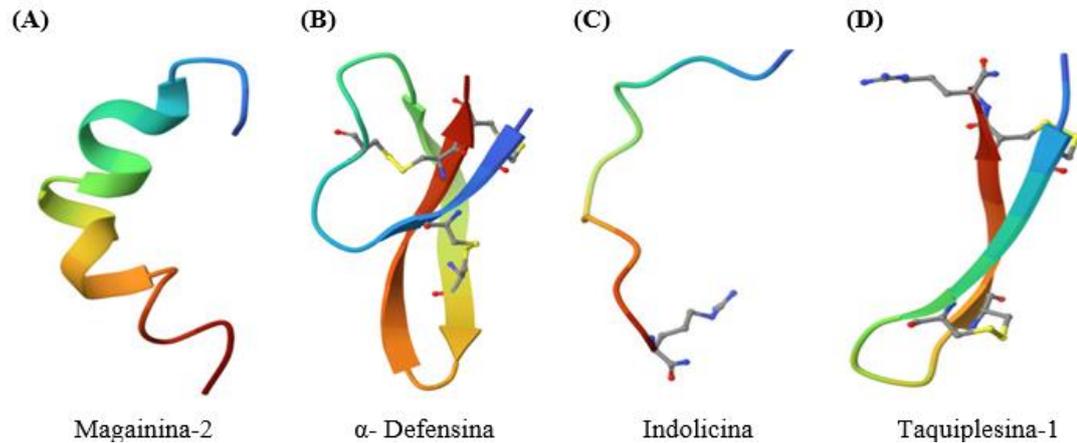


Figura 1. *Diversidad estructural de los AMPs.*

Fuente: (UniProt, 2023)

Se presenta la diversidad estructural de las diferentes estructuras de AMPs. (A) Representa a la magainina-2 con una disposición en α hélice (B) Es un AMP que presenta una estructura de lámina β denominado α defensina 4 de *Homo sapiens*, esta estructura permite la formación de enlaces disulfuro. (C) La indolicina posee una estructura extendida, pertenece a un AMP corto de origen bovino (D) Corresponde a la Taquiplesina- 1, esta estructura presenta lazos.

1.1.2.3 Principales características de los AMP

Los AMPs poseen varias características en común dado que la mayoría posee un carácter hidrofóbico, una carga neta positiva y un alto contenido de residuos hidrofóbicos. La carga de los péptidos puede variar de +2 a +9 aproximadamente; sin embargo, en algunos péptidos puede ir hasta +13. La carga depende de la composición de aminoácidos del péptido y la misma es fundamental para la interacción con la membrana bacteriana (Kumar et al., 2018; Zhang et al., 2021). La naturaleza catiónica de los péptidos se relaciona con los residuos como: lisina y arginina (Kumar et al., 2018). A pesar de que cada péptido presenta una carga específica, varios autores relacionan que un aumento en la carga puede mejorar la actividad antimicrobiana (Gagnon et al., 2017; Hani et al., 2009; Kumar et al., 2018).

De acuerdo con Kumar et al., (2018), en el caso de la magainina 2, un aumento en la carga de +3 a +5 puede mejorar su capacidad antimicrobiana; no obstante, al aumentar la carga a +7, se obtiene una pérdida total de la actividad antimicrobiana **Kumar et al. (2018)**. La disminución de la actividad antimicrobiana puede deberse a interacciones fuertes entre el péptido y la membrana, lo que imposibilita la traslocación del péptido (**Yeaman & Yount, 2003**).

Por otro lado, la hidrofobicidad es la característica más importante al momento de atacar a bacterias patógenas, se determina por el porcentaje de residuos hidrofóbicos presentes; sin embargo, un mayor número de estos residuos no influye en la actividad antimicrobiana del péptido (**Kang et al., 2019**). Acorde a lo descrito por **Kumar et al. (2018)**, el porcentaje de hidrofobicidad de los residuos es del 50% y está constituido en su mayoría por: cisteína, arginina, valina, leucina, alanina, metionina, entre otros.

La anfipaticidad es una característica común entre los AMPs (**Kang et al., 2019; Pasupuleti et al., 2012; Zhang et al., 2021**). A criterio de **Kumar et al. (2018)**, la anfipaticidad se define como la abundancia relativa entre los residuos hidrofílicos e hidrofóbicos del péptido. **Kumar et al. (2018)**, sugiere que las características de los péptidos como anfipaticidad, carga neta e hidrofobicidad influyen según la secuencia peptídica única.

En plantas, los AMP ricos en residuos de cisteína suelen ser estables ya que forman enlaces disulfuro. En contraste, **Kim et al. (2019)** ha informado que el cambio de un solo residuo influye de gran manera en el comportamiento del péptido. Un cambio de un residuo por triptófano genero una mayor cationicidad y mejoro la actividad antimicrobiana (**Kim et al., 2019; Kim et al., 2019**). Además, se ha demostrado que un truncamiento en el extremo N-terminal de la aureína 2.2 resulta en la pérdida de su actividad antimicrobiana y la inducción de su capacidad inmunomoduladora (**Kim et al., 2019; Kumar et al., 2018**).

Otra característica importante de los AMPs es el ángulo polar, el cual ayuda a determinar la capacidad del péptido por penetrar en la membrana bacteriana. Existen características estructurales que se repiten en los diferentes péptidos pertenecientes a un mismo grupo. Particularmente, los péptidos cuya estructura es α -hélice están amidados en el extremo C-terminal dado que esta le confiere una mayor actividad electrostática que favorece a la actividad antimicrobiana (**Felício et al., 2017; Zhang et al., 2021**). En contraste, la mayoría de los péptidos con una lámina β poseen residuos de cisteína y forman enlaces disulfuro. Finalmente, los péptidos de cadena extendida son ricos en residuos como la prolina, siendo las catelicidinas los péptidos más importantes de esta categoría.

1.1.2.4 Modo de acción de los péptidos

Todos los mecanismos de los AMPs involucran interacción directa del péptido con la membrana celular. Existen dos maneras en las que los péptidos pueden afectar a la membrana (**Fjell et al., 2011**). La primera es la vía mediada por receptores, la cual impide la homeostasis debido a que los péptidos se colocan en los receptores de proteínas de la membrana celular. Por otra parte, la vía no mediada por receptores se basa en que el péptido tiene un efecto directo contra la membrana celular, insertándose en esta y lisándola (**Kim et al., 2019; Kumar et al., 2018**).

Los AMPs tienen una fuerte afinidad por unirse a fosfolípidos con carga negativa, la membrana bacteriana está constituida por una mezcla de fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos (**Kim et al., 2019; Kumar et al., 2018; Zhang et al., 2021**). Los fosfolípidos más conocidos son: cardiolipina (CL), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidiglicerol (PG) (**Kim et al., 2019**). Las membranas de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas comparten ciertos fosfolípidos aniónicos como el PG. La membrana lipídica de las Gram-positivas posee una elevada cantidad de PE zwitteriónico (**Kim et al., 2019; Kumar et al., 2018**). La abundancia de fosfatidilserina (PS) y la sobreexpresión de biomoléculas, pueden aumentar la carga negativa y mejorar la interacción con un AMP (**Kumar et al., 2018**).

La efectividad de unión del péptido a la membrana va a depender del origen de esta, los AMP presentan una mayor efectividad cuando los fosfolípidos con carga negativa se encuentran en la parte externa de la membrana. Por ejemplo, la membrana animal está constituida externamente por fosfolípidos zwitteriónicos y componentes neutros como el colesterol, mientras que la membrana bacteriana contiene lípidos cargados negativamente como el PG y la cardiolipina (Figura 2). Por consiguiente, la interacción de los AMP va a ser mejor con las membranas bacterianas (**Kumar et al., 2018**).

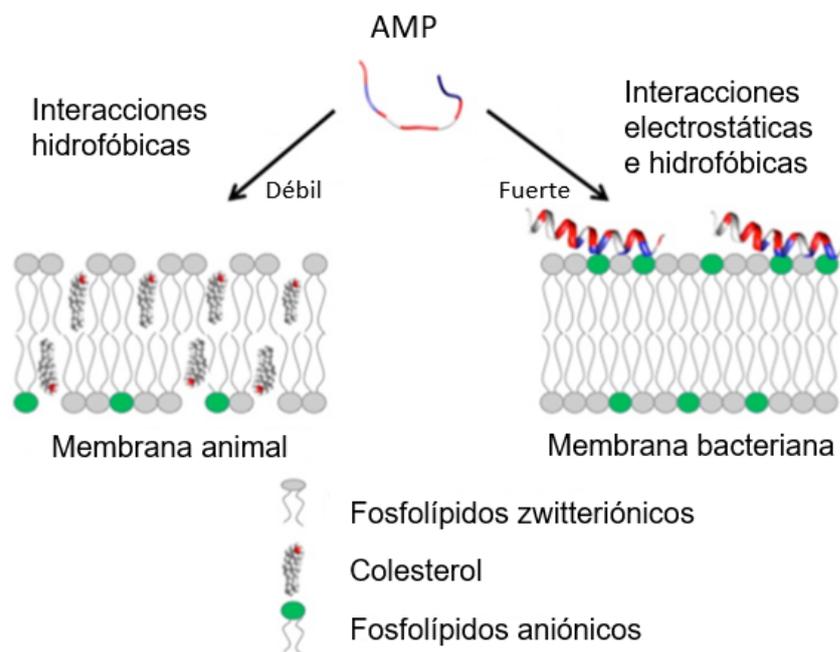


Figura 2. Diferencia en la conformación de membranas de tipo animal y bacteriana.

Fuente: Modificado de **Kumar et al., (2018)**

La vía no mediada por receptores implica la interacción directa entre los AMPs y la membrana. Estas interacciones se explican según 4 modelos, estos son: modelo poro duela barril, modelo poro toroidal, modelo de tapete y modelo de agregados (Figura 3) (**Kumar et al., 2018**). El modelo poro duela barril y el modelo poro toroidal comparten la característica de que pueden formar poros. En el modelo poro duela barril el péptido interacciona paralelamente y luego se inserta perpendicularmente en la membrana (Figura 3 A), los AMPs que comparten este modelo son la alamethicin y la pardaxin.

En el modelo de poro toroidal, no existe interacción entre péptidos y se lleva a cabo un proceso que induce la curvatura de la bicapa lipídica (Figura 3 B) (**Kumar et al., 2018; Zhang et al., 2021**). A criterio de **Kumar et al. (2018)**, esta interacción genera que los péptidos que se ensamblan actúen de manera distinta acorde con la composición lipídica, algunos AMPs que pueden formar poros toroidales son la magainina, aureina 2.2 entre otros (**Hani et al., 2009**).

La principal diferencia entre los modelos formadores de poro, está en que el modelo poro de barril mantiene la disposición hidrófoba e hidrófila de los lípidos, mientras que en el modelo poro toroidal se altera la disposición hidrófoba e hidrófila de la bicapa (**Kumar et al., 2018; Zhang et al., 2021**). A pesar de que los péptidos transmembrana actúan contra la bicapa lipídica, algunos péptidos pueden dirigirse a componentes intracelulares. No se ha dilucidado si el péptido mantiene la misma efectividad o modo de acción cuando afecta a los componentes intracelulares, pero se mantiene cierta capacidad antimicrobiana (**Kumar et al., 2018**).

Los modelos que no forman poros como mecanismo principal de interacción son el modelo de tapete y el de agregados. En el modelo de tapete aumenta la concentración umbral de los péptidos hasta que se cubre la superficie de la membrana (Figura 3 C). Cuando la cantidad de AMPs es adecuada, estos interaccionan con la membrana y la alteran de diferentes maneras, incluso formando pequeños poros; algunos AMPs que comparten este modelo son las cecropinas, la LL-37 y aureína 1.2 (**Boparai & Sharma, 2020; Hani et al., 2009; Zhang et al., 2021**).

El modelo de formación de agregados implica interacciones en la superficie de la membrana que provocan el colapso de esta en forma de micelas o vesículas (Figura 3 D). Esto sucede ya que los AMPs interaccionan con los fosfolípidos formando estos agregados lipídicos que impiden que la membrana funcione adecuadamente (**Zhang et al., 2021**).

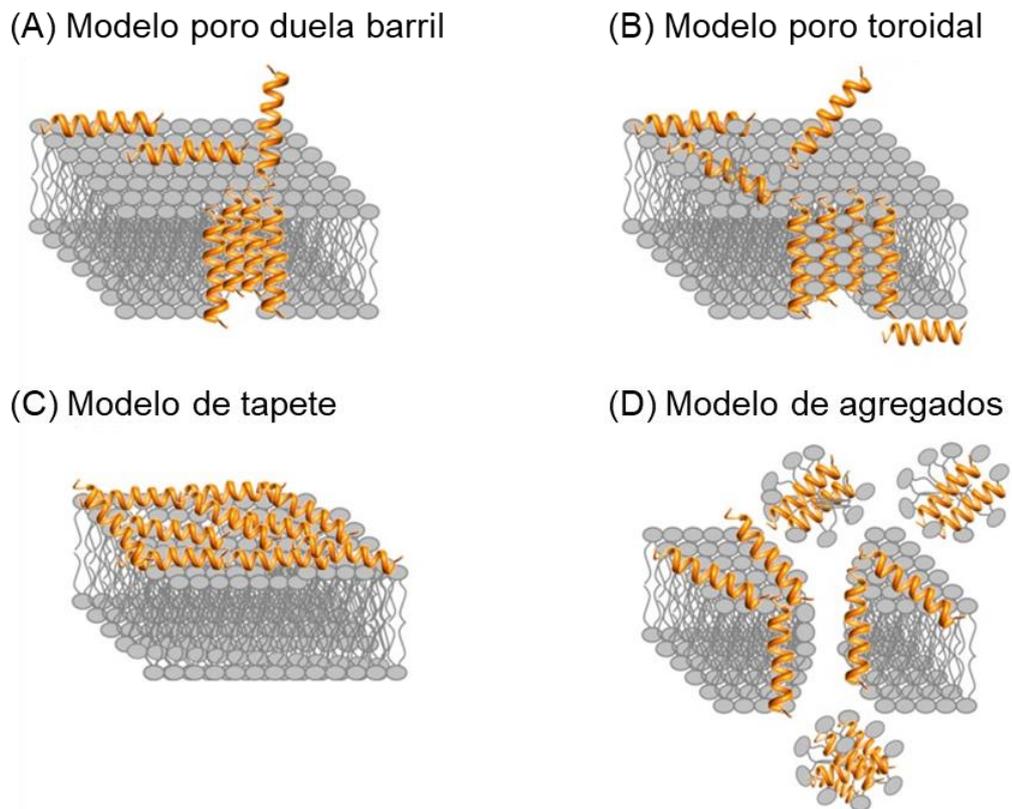


Figura 3. Representación de los distintos tipos de interacción posibles entre los péptidos con la membrana celular.

Fuente: Modificado de **Kumar et al., (2018)**

1.1.3 Cecropinas

1.1.3.1 Características

En 1981, Hans Boman descubrió la presencia de moléculas benéficas en la hemolinfa de la polilla de seda (*Hyalophora cecropina*) a las que denominaría cecropinas. Posteriormente, las cecropinas se establecen como uno de los grupos más grandes que conforman a los péptidos. Las diversas funciones y características de los péptidos, los convierten en opciones viables para tratar múltiples enfermedades (**Kumar et al., 2018; Zhang et al., 2021**).

Las cecropinas son péptidos catiónicos que se dividen en tres grupos principales: cecropinas A, B y D, siendo el grupo A el más extenso y común. La mayoría de las cecropinas comparten una composición similar, poseen un extremo N-terminal con una fuerte carga positiva y un extremo C-terminal hidrofóbico con carga negativa. La

interacción entre el péptido y la membrana se da gracias a esta carga fuerte del extremo N-terminal con la carga negativa de los fosfolípidos aniónicos de la membrana. El modelo de acción de la cecropina es en forma de tapete, en donde aumenta la concentración de péptidos generando poros en la membrana (Aslam et al., 2022; Gadwala et al., 2021; Rom Park et al., 2021).

1.1.3.2 Estudios de actividad antimicrobiana

Se ha comprobado la actividad antibacteriana de cecropinas tanto para Gram- positivas como Gram- negativas. La cecropina B destaca frente a las otras dado que posee una mejor actividad antimicrobiana, seguida de la cecropina A (**Rom Park et al., 2021**). En varias investigaciones se ha identificado actividad antibacteriana de cecropinas frente a bacterias como *Porphyromonas gingivalis* o *S. aureus*, mediante alteraciones en la superficie celular (**Cole & Nizet, 2016**). Cecropinas como la magainina presentaron actividad contra un amplio espectro de bacterias, tanto Gram- positivas como Gram-negativas, hongos, levaduras y virus. Este péptido fue de los primeros en probarse de manera clínica, sin embargo, todos los ensayos clínicos fueron descartados (**Hani et al., 2009**).

1.1.3.3 Características de la aedesina

La aedesina es un AMP similar a la cecropina aislada de las glándulas salivales del mosquito *Aedes aegypti* que previamente habían sido infectadas por el virus del dengue. Su efectividad ante bacterias multirresistentes se ha evaluado obteniendo resultados beneficiosos, por lo que se ha establecido en un AMP de gran interés (**Godreuil et al., 2014**). La aedesina posee una carga positiva y estructura lineal la cual contiene 36 aminoácidos (Figura 4), el modelo de interacción de la aedesina con la membrana es en forma de tapete (Figura 3 C) al igual que las cecropinas. Además, contiene dominios anfipáticos para facilitar la interacción con los ácidos grasos.



Figura 4. Representación de la aedesina, la cual exhibe una estructura de α hélice.

Fuente: (Godreuil et al., 2014)

El estudio de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la aedesina determina que es de los mejores AMPs. El índice de Boman indica el grado de afinidad del péptido por otras proteínas, el valor menor (-1941) correspondiente a la aedesina establece que tendrá la mejor interacción con la bicapa lipídica (Tabla 3). El índice alifático indica la presencia de residuos alifáticos del AMP, la cual es moderadamente alta, pero es menor a la de la Aureina- 2.2 (Tabla 3). Finalmente, el valor de -0,022 de hidrofobicidad de la aedesina determina que existe una ligera afinidad del AMP por el agua, mientras que la Aureina- 2.2 es el AMP que presenta una alta hidrofobicidad (Tabla 3), un valor elevado de hidrofobicidad indica una disminución en la especificidad respecto a la bicapa lipídica

Tabla 3. Resumen de los principales parámetros fisicoquímicos y estructurales de diversos AMPs con α hélice.

Parámetros	Índice de Boman	Índice alifático	Hidrofobicidad
AMPs			
Aedesina	-1941	108.33	-0.022
Magainina-2	-9.64	72.17	0.083
Aureina- 2.2	16.19	158.13	1.238
Buforin-1	-120.4	62.56	-0.992

Nota. Los valores de los parámetros evaluados fueron obtenidos del DRAMP (del inglés Database of Antimicrobial Peptides)

Respecto a su composición, se observa que la lisina es el residuo predominante lo que se puede asociar a una actividad antimicrobiana adecuada (Figura 5). Además, dado que no contiene cisteína en su estructura no puede formar enlaces disulfuro; sin embargo, posee 7 residuos de glicina los cuales pueden aportar estabilidad al péptido dado que es un aminoácido neutro (Figura 5). La distribución de residuos corresponde a la de un AMP de hélice α debido a la carencia de péptidos como triptófano o histidina los cuales son propios de la estructura extendida, y de cisteína la cual es propia de AMPs en bucle extendido (Figura 1 C y D).

Una de las principales ventajas del uso de aedesina es su estabilidad ante gradientes elevados de sal, dado que la mayoría de AMPs tienden a perder su capacidad antimicrobiana cuando se someten a concentraciones salinas elevadas. La aedesina mantiene una actividad fuerte cuando es sometida a $MgCl_2$ y $CaCl_2$, a una concentración de 1 mM, así mismo frente a NaCl 150 mM (Godreuil et al., 2014).

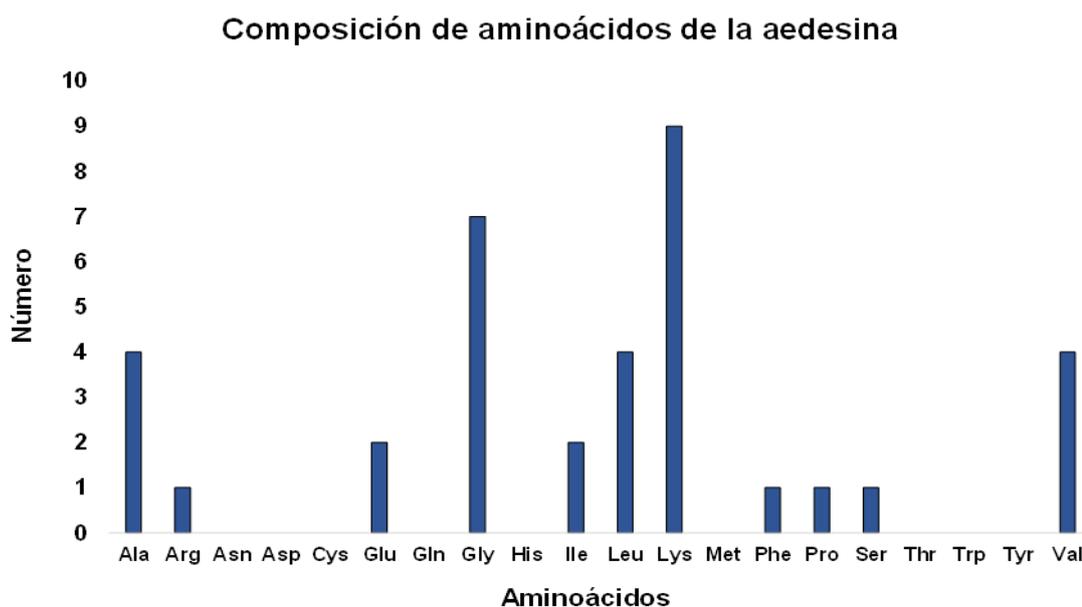


Figura 5. Distribución de aminoácidos del AMP aedesina.

Fuente: (Godreuil et al., 2014)

La actividad antimicrobiana de la Aedesina ha sido evaluada mediante la medición de la concentración mínima inhibitoria (MIC) aplicando el método de microdilución en caldo, frente a cepas bacterianas MDR (del inglés Multidrug-Resistant), de: *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *k. pneumoniae* (Figura 6 B y 6 D). Además, se ha determinado que la Aedesina es efectiva contra bacterias Gram negativas con resistencia a los carbapenems, cefalosporinas, fluoroquinolonas, y monobactámicos (Godreuil et al., 2014).

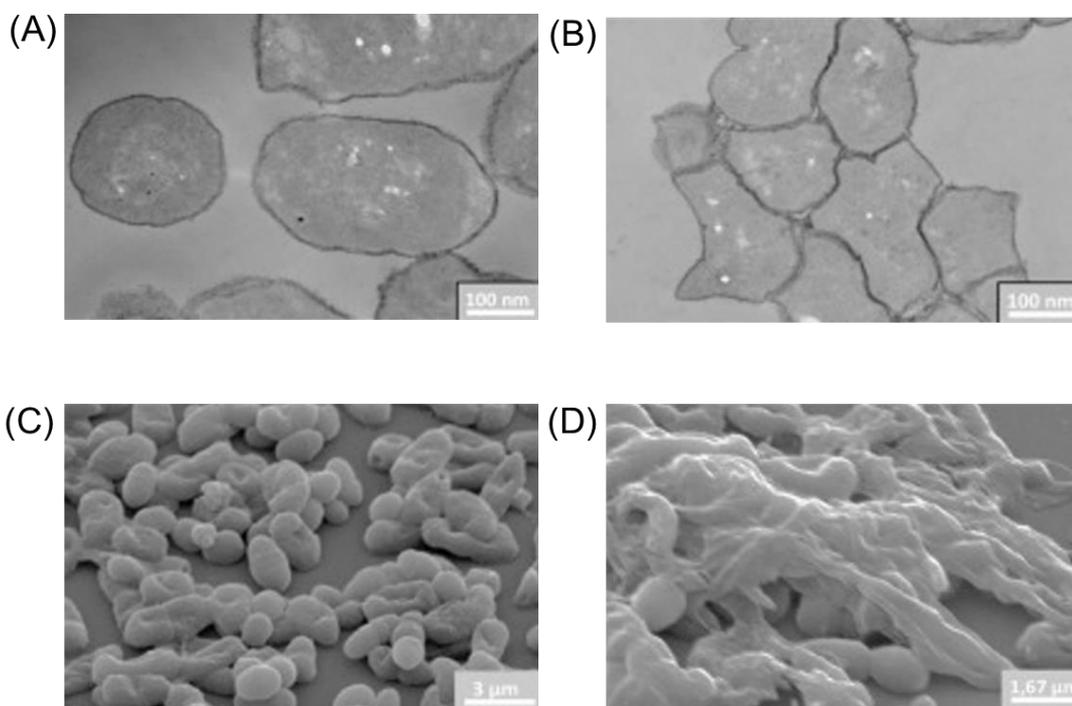


Figura 6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la aedesina mediante un microscopio electrónico.

Fuente: Modificado de Kumar et al., (2018)

En donde (A y C) muestran *E. coli* sin aplicar ningún tratamiento, mientras que (B y D) muestran el efecto posterior al tratamiento de aedesina durante 2 horas a 37 °C.

1.1.4 Métodos de obtención de péptidos

Las ventajas de los AMP son diversas, se relacionan a una buena biodisponibilidad, baja acumulación en el organismo, capacidad de industrialización, posible actividad en condiciones fisiológicas, entre otros (**Akbarian et al., 2022; Godreuil et al., 2014; Lemaire et al., 2021**). Actualmente, existen varios métodos que permiten la obtención de AMPs, considerando que cada AMP es distinto debido a su composición de aminoácidos, la síntesis de algunos péptidos puede ser diversa e involucrar distintas estrategias para su obtención (**Akbarian et al., 2022; Chandrudu et al., 2013**).

En la actualidad se emplean tres métodos para la síntesis de péptidos de manera extendida, estos son: aislamiento de fuentes naturales mediante enzimas, síntesis química, y la expresión heteróloga (**Deng et al., 2017; Hoelscher et al., 2022**). A criterio de **Deng et al., (2017)**, este último método es el más llamativo dado que presenta una alta eficiencia, un proceso de extracción simple, periodos de producción cortos y a un bajo costo.

1.1.4.1 Síntesis química

Entre los principales métodos de obtención de AMP está el de síntesis de péptidos en fase sólida (SPSS) (**Chandrudu et al., 2013**). Este proceso está mediado por grupos protectores como el fluorenilmetoxicarbonilo (FMOC), los cuales son claves en el proceso (**Akbarian et al., 2022; Conibear et al., 2018**). Adicionalmente, requiere de un soporte que puede ser una resina de poliestireno, hidroximetileno, entre otras. Estas resinas facilitan la adición de aminoácidos uno por uno (**Chandrudu et al., 2013**).

El método de síntesis de la fase en solución (SPS), de manera similar al SPSS, acopla a los aminoácidos de manera individual. Sin embargo, la principal ventaja de este método se relaciona con la pureza, debido a que los productos intermedios se pueden purificar (**Akbarian et al., 2022; Chandrudu et al., 2013**). No obstante, el tiempo de reacción es la principal limitante ya que se requiere purificaciones en cada etapa. Otro factor negativo a considerar es la síntesis lateral de intermedios (**Chandrudu et al., 2013; Kent, 2019**). A pesar de los desafíos que conlleva la producción química, este

método ha sido ampliamente utilizado y, en consecuencia, varios péptidos terapéuticos se han comercializado (**Chandrudu et al., 2013**).

1.1.4.2 Síntesis en sistemas heterólogos

Según **Shanmugaraj et al., (2021)**, los péptidos antimicrobianos conformarán la próxima generación de antibióticos. No existe un consenso que establezca que método de producción es mejor. Todos los péptidos comparten características generales, pero estructuralmente pueden variar considerablemente (**Wu et al., 2022**). Es decir que un método de producción de péptidos puede ser mejor en ciertos péptidos que en otros. En contraste, **Hoelscher et al., (2022)** menciona que el uso de sistemas heterólogos en combinación con estrategias que impliquen métodos transgénicos son la mejor estrategia a nivel comercial.

1.1.4.2.1 Síntesis en eucariotas

Los sistemas heterólogos que usan plantas poseen características importantes en la producción de péptidos, estas son: la seguridad de síntesis, escalabilidad y rapidez para la producción (**Shanmugaraj et al., 2021**). No obstante, la mayor ventaja de este método está en que permite que se lleven a cabo modificaciones posteriores a la traducción. Estas se encargan de estabilizar al péptido (debido a que mejoran el plegamiento de proteínas), optimizan la capacidad antimicrobiana y la especificidad contra patógenos (**Bednarska et al., 2017; Shanmugaraj et al., 2021**).

Las estrategias para la producción de proteínas recombinantes en plantas son: expresión estable, expresión transitoria y los cultivos celulares en suspensión (**Shanmugaraj et al., 2021**). El primer método consiste en la inserción de un gen en el núcleo mediante técnicas de transformación genética, como la transformación por *Agrobacterium* o la biobalística (**Lacroix & Citovsky, 2020; Shanmugaraj et al., 2021; Ziemienowicz, 2014**). La expresión transitoria esta mediada por virus vegetales y por *Agrobacterieum*. Mientras que los cultivos y suspensión incluyen condiciones controladas con medios de crecimiento simples (**Shanmugaraj et al., 2021**). Adicionalmente, los péptidos sintetizados pueden servir para proteger a los cultivos y

pueden proveer protección frente a enfermedades que afecten a las plantas (**Shanmugaraj et al., 2021**).

1.1.4.2.2 Síntesis en bacterias

Con respecto al uso de bacterias como sistema heterólogo, es importante solucionar los problemas relacionados con la actividad bactericida del péptido (**Hoelscher et al., 2022; Shanmugaraj et al., 2021**). Además, en algunos casos el plegamiento de la proteína no es el ideal debido a la carencia de modificaciones postraduccionales. Sin embargo, los procedimientos de estos sistemas están establecidos, lo que favorece a la expresión y manipulación (**Shanmugaraj et al., 2020**).

La expresión heteróloga de péptidos usando bacterias, como *E. coli*, es óptima en la mayoría de los casos. Sin embargo, algunos péptidos similares a la lassomicina presentan una mejor expresión en *Bacillus subtilis* (**Cheng & Hua, 2020**). En contraste **Viel et al., (2021)** menciona que, para la expresión de péptidos, como la mersacidina, *E. coli* ofrece varias ventajas dado que no poseen muchas proteasas extracelulares en comparación con *B. subtilis*. Por lo tanto, el sistema de expresión dependerá del péptido y los problemas de expresión que presente.

El proceso de expresión puede mejorar si se incluyen promotores constitutivos o inducibles (**Cheng & Hua, 2020; Hoelscher et al., 2022**). También se puede realizar una fusión del péptido a proteínas de transporte como la SUMO (del inglés "Small Ubiquitin-like Modifier") o la glutatión S-transferasa (GST) (**Hoelscher et al., 2022**). En pasos posteriores a la expresión y purificación, es posible escindir la etiqueta por medio de proteasas, lo cual aumenta la solubilidad del péptido y su estabilidad (**Hoelscher et al., 2022; Panavas et al., 2009**).

Acorde con **Hoelscher et al., (2022)**, el uso de plantas es mejor para la producción a nivel industrial, dado que es más rentable y permite la síntesis de más producto. Complementariamente, **Shanmugaraj et al., (2021)** afirma que el método de cultivo

celular en suspensión con plantas es el más eficaz en comparación con el sistema bacteriano. Sin embargo, el uso de bacterias y levaduras son los que se emplean con mayor frecuencia debido a su alta tasa de generación celular, fácil manipulación y la densidad celular adecuada **(Egelkrou et al., 2012; Shanmugaraj et al., 2021)**.

1.1.5 Sistema de autoescisión mediado por inteína

La purificación de proteínas puede incluir varias técnicas. En el auge de la biotecnología moderna, el uso de etiquetas de afinidad ha sido útil para poder obtener una alta pureza de las proteínas **(Iwai et al., 2006; Ramirez et al., 2013; Zhang et al., 2020)**. No obstante, el uso de inteína como alternativa para la purificación de proteínas es prometedora **(Ramirez et al., 2013)**.

Las inteínas o también conocidas como dominios de empalme, son dominios de proteínas que favorecen a la obtención de proteínas maduras por medio de un proceso conocido como empalme de proteínas. Las inteínas son altamente diversas en su secuencia debido a la gran cantidad de variantes que hay, por ende, poseen una baja homología de secuencia **(Pavankumar, 2018; Sarmiento & Camarero, 2019)**. Sin embargo, existen aminoácidos altamente conservados que se encuentran en los extremos N y C terminal de la inteína representados por (I_N y I_C) respectivamente. Los aminoácidos que constituyen los extremos de la inteína son esenciales en el proceso de autocatálisis de la misma **(Elleuche & Pöggeler, 2010; Pavankumar, 2018; Sarmiento & Camarero, 2019; Shemella et al., 2007)**.

El proceso de empalme implica la autocatálisis de la inteína, en donde se forman dos fragmentos llamados exteínas. Finalmente, los fragmentos N y C de la exteína se unen mediante enlaces peptídicos, lo que resulta en la formación de la proteína madura funcional (Figura 7) **(Amaranto et al., 2021; Elleuche & Pöggeler, 2010; Pavankumar, 2018; Sarmiento & Camarero, 2019)**. La escisión de la inteína se puede catalizar en ambientes ácidos o reductores. Sin embargo, pueden conservar cierta actividad a pH neutro lo cual puede afectar en el rendimiento **(Ramirez et al., 2013)**.

Varias investigaciones concuerdan que el mecanismo de empalme de inteínas comprende 4 pasos complementarios. El primer paso consiste en una reacción de esterificación entre el aminoácido presente en la posición +1 de la I_N (cisteína o serina) y el último aminoácido de la N-exteína (Figura 7). Esta reacción se lleva a cabo mediante un ataque nucleofílico en donde se produce un cambio de acilo NS que rompe el enlace peptídico existente (**Amarantog et al., 2021; Prabhala et al., 2022**). El segundo paso consiste en una reacción de trans-esterificación en la cual interviene el primer aminoácido de la C-exteína (cisteína, serina y treonina) con el último de la N-exteína. Esta reacción da como resultado un intermedio tioéster ramificado mediante un enlace éster, se denomina ramificado dado que la N-exteína pasa a formar parte del grupo lateral (**Amarantog et al., 2021; Prabhala et al., 2022**).

El tercer paso es el más importante e incluye un proceso de ciclación del último aminoácido de la I_C . Esta reacción implica la separación del intermedio tioéster ramificado formado en el paso 2 de la inteína a través de la formación de un anillo de succinimida que puede escindir el enlace peptídico entre la C-exteína y la inteína (**Topilina & Mills, 2014**). Finalmente, se produce otro ataque nucleofílico con un cambio de acilo SN, este cambio de acilo permite reconstituir el enlace amida (Figura 7) (**Prabhala et al., 2022**).

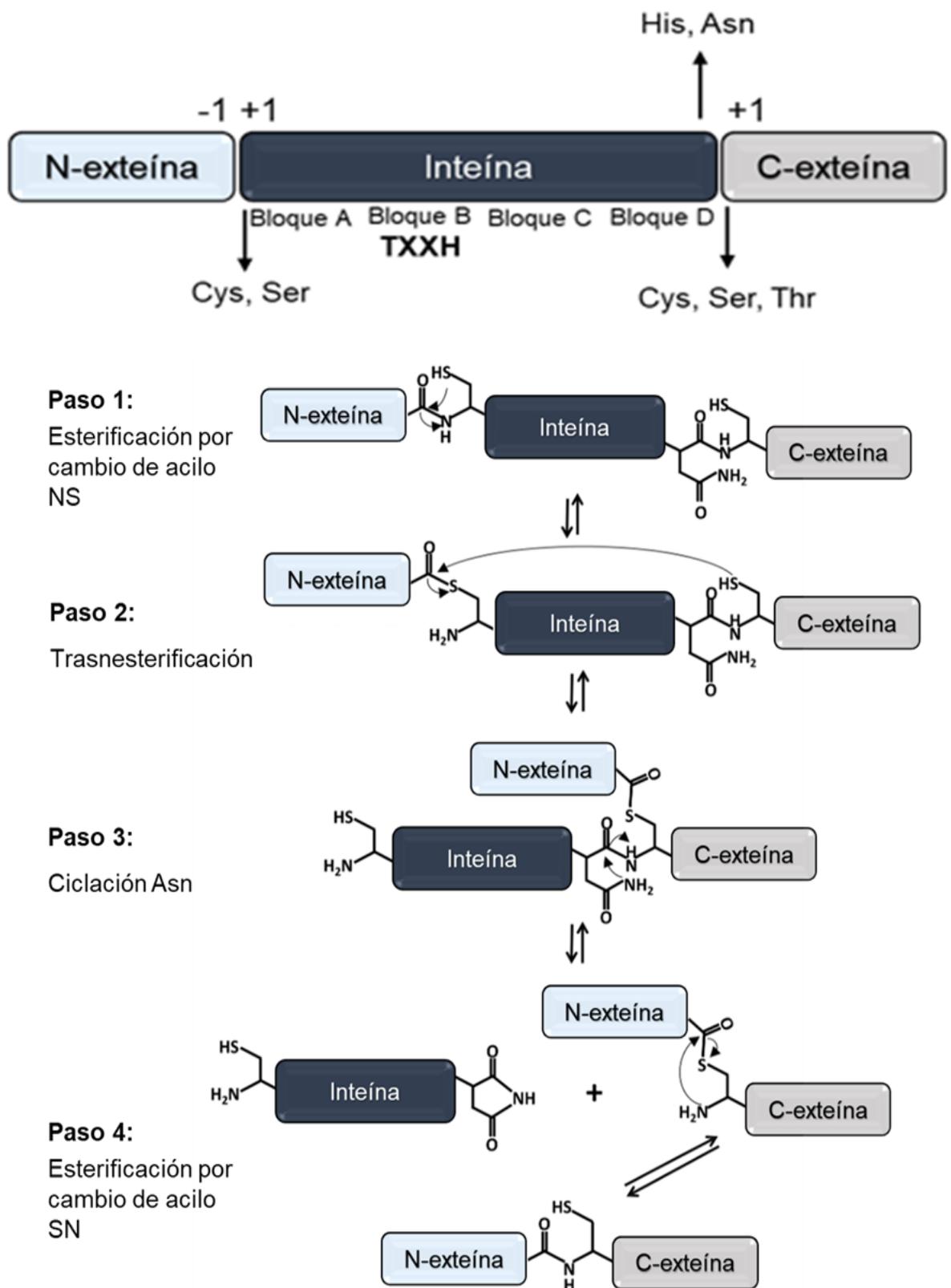


Figura 7. Esquema del proceso de empalme de la inteína para la obtención de proteínas maduras.

Fuente: Modificado de Sarmiento & Camarero, (2019)

La inteína posee dos maneras distintas para realizar el autoempalme, estos son en cis y trans (**Elleuche & Pöggeler, 2010; Ramirez et al., 2013**) . El autoempalme en cis ocurre cuando la inteína que se encuentra dentro de la proteína precursora (es decir que requiere de un precursor para ser activa) se escinde. Esto conlleva a que los fragmentos flanqueantes de la proteína precursora se puedan unir por acción de la inteína (**Elleuche & Pöggeler, 2010; Iwai et al., 2006**).

Además, una inteína puede encontrarse en dos cadenas polipeptídicas separadas, y generar una sola cadena polipeptídica (**Iwai et al., 2006**). A este proceso se lo conoce como autoempalme en trans, y se genera cuando la inteína se encuentra en una proteína distinta a la precursora. En donde, la inteína se une a la proteína precursora actuando como enzima proteolítica generando la escisión y posteriormente la unión de los extremos (**Elleuche & Pöggeler, 2010; Iwai et al., 2006**).

Las inteínas en cis y trans se pueden encontrar tanto de manera natural como sintética (**Iwai et al., 2006**). Para obtener los mejores rendimientos de purificación de proteínas, se han desarrollado nuevas estrategias, como la activación de genes en plantas transgénicas o el etiquetado isotópico, las cuales están en línea con la aplicación de inteínas en cis y trans (**Chin et al., 2003; Otomo et al., 1999**). Estas técnicas son especialmente útiles en la producción de proteínas para estudios estructurales o aplicaciones terapéuticas.

La ingeniería de inteínas también se ha utilizado para la producción de proteínas de fusión, la síntesis de péptidos y otros compuestos de interés en la industria farmacéutica y biotecnológica (**Banki & Wood, 2005**). El uso de inteínas puede resultar ventajoso a nivel industrial, debido a que no requiere de proteasas para su eliminación (**Ramirez et al., 2013**). Aún son necesarias estrategias para poder optimizar el grado de escisión in vivo de la inteína. Sin embargo, el estudio de las inteínas y su aplicación se ha convertido en una alternativa importante dentro de la investigación para la obtención de AMPs.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Obtener el péptido antimicrobiano aedesina mediante un sistema de autoescisión mediado por la inteina.

1.2.2 Objetivos específicos

- Diseñar el vector de expresión de la proteína recombinante His_tag-inteina-aedesina.
- Evaluar las condiciones de expresión de la proteína recombinante en *E. coli* BL21 (DE3).
- Purificar el péptido antimicrobiano mediante cromatografía líquida de proteínas.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Para la presente investigación científica se empleó los equipos, instrumentos e insumos de laboratorio, reactivos, y material de escritorio descritos en las Tablas 4 a 8.

2.1.1. Equipos de laboratorio

Tabla 4. *Equipos de laboratorio*

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

2.1.2. Instrumentos de laboratorio

Tabla 5. *Instrumentos de laboratorio*

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

2.1.3. Reactivos de laboratorio

Tabla 6. *Reactivos de laboratorio*

DETALLE	CANTIDAD
Acilamida	100 g
Agar - Agar	50 g
Agua destilada	1 L
Alcohol al 70 – 96%	3 L
Ampicilina	100 mg
Azul de coomassie	100 g
Buffer TRIS 20	100 mL
Cloruro de sodio	500 g
Extracto de levadura	500 g
Glicerol	100 mL
IPTG (isopropil-B-tiogalactopiranosido)	1 g
Marcador de proteína	1 mL

DETALLE	CANTIDAD
SDS (Dodecilsulfato sódico)	25 g
Triptona	500 g

2.1.4. Insumos de laboratorio

Tabla 7. *Insumos de laboratorio*

DETALLE	CANTIDAD
Cinta adhesiva 1	1
Cinta de autoclave 1	1
Guastes de nitrilo 1 caja	1 caja
Mascarillas 1 caja	1 caja
Papel aluminio 2	2
Papel film 1	1
Papel filtro 1	1
Parafilm 1	1

2.1.5. Materiales de escritorio

Tabla 8. *Materiales de escritorio*

DETALLE	CANTIDAD
Calculadora 1	1
Computadora 1	1
Cuaderno 1	1
Esferos 2	2
Lápices 2	2
Rotuladores 2	2

DETALLE	CANTIDAD
Tijera 1	1
Calculadora 1	1

2.2. Métodos

2.2.1. Diseño del vector de expresión de la proteína recombinante His_tag-inteina-aedesina

Se obtuvo la secuencia del péptido aedesina usando la base de datos de Uniprot (**UniProt, 2023**). Posteriormente, se realizó la síntesis y clonación del gen en el vector de expresión pET-11b(+), mediante los servicios de la empresa GeneUniversal, similar a lo realizado previamente (**Wu et al., 2022**). El plásmido cuenta con una cola de histidinas y la aedesina ubicadas en los extremos N- y C-terminal de la inteina, respectivamente.

2.2.2. Evaluación de las condiciones de expresión de la proteína recombinante en *E. coli* BL21 (DE3)

2.2.2.1. Transformación de células competentes

La transformación de células competentes se llevó a cabo utilizando el protocolo estándar de choque térmico (**Rahimzadeh et al., 2016**). En primer lugar, se resuspendió el plásmido sintetizado en agua purificada hasta alcanzar una concentración de 100 ng/μL. A continuación, las células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) se incubaron en hielo durante 30 minutos. Luego se añadió 1 μL de plásmido a las células y se incubaron durante otros 30 minutos. Después se realizó un baño termostático a 42 °C durante 90 segundos, seguido de una incubación en hielo durante 2 minutos. Posteriormente se añadió 900 μL de caldo LB y se incubó a 37 °C con agitación a 230 rpm durante 1 hora. Finalmente, se inocularon 50 y 200 μL en placas que contenían caldo LB con ampicilina (0,1 mg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

Tabla 9. Formulación del caldo lisogenia (LB).

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

Fuente: (Tuttle et al., 2021)

2.2.2.2. Ensayo de expresión del péptido antimicrobiano

Se usó como referencia el trabajo de **Wu et al., (2022)** para realizar dicho ensayo. Se realizó un inóculo inicial de las células transformadas en 60 mL de caldo LB con ampicilina (0,1 mg/mL) y se incubó a 37 °C con agitación a 230 rpm durante 24 horas. Posteriormente, se tomó 5 mL de dicho inóculo y se colocó en 45 mL de caldo LB con ampicilina (0,1 mg/mL), este paso se repitió 6 veces en matraces diferentes. Los 6 matraces se incubaron a 37 °C con agitación a 230 rpm hasta que se obtuvo una DO_{600} entre 0,6 y 0,8. Alcanzado este valor, se indujo la expresión de la proteína con 0,4 mM de IPTG a tres matraces y se incubaron a temperatura ambiente con agitación de 230 rpm hasta alcanzar las 4, 8 y 24 horas. Los tres matraces restantes (sin inducción con IPTG) también fueron evaluados a los mismos periodos de tiempo. Posteriormente se centrifugó los cultivos a 3910 g durante 20 minutos, y se almacenó el pellet en refrigeración (-20 °C). Se almacenó el pellet obtenido de 1 mL de los matraces utilizando la centrifuga a 15.000 g durante 1 minuto y se congelaron.

El nivel de expresión de la proteína de fusión (PF) se evaluó mediante SDS-PAGE, en donde se comprobó la expresión del péptido mediante su peso molecular estimado con relación al marcador de peso molecular. (**Sambrook, 2012**). Se utilizaron las muestras de los tubos eppendorf y se cargaron en el gel de poliacrilamida al 12% (peso/volumen), junto con el marcador de peso molecular. Las condiciones de corrida fueron a 120 V durante 45 minutos. Finalmente, se tiñó el gel con azul de Coomassie y se visualizó mediante ChemiDoc. La concentración del péptido obtenida bajo las

condiciones de cada ensayo se estimó mediante la intensidad de la banda observada en el gel.

2.2.2.3. Expresión del péptido antimicrobiano

La expresión del péptido se llevó a cabo de manera similar a la establecida por **Wu et al., (2022)**. Se realizó un inóculo inicial de 50 mL en caldo LB con ampicilina (0,1 mg/mL) y se incubó a 37 °C con agitación a 230 rpm durante 24 horas. Posteriormente, se transfirió el inóculo inicial a 950 mL de caldo LB con ampicilina (0,1 mg/mL) y se incubó a 37 °C con agitación a 230 rpm hasta que alcanzó una DO_{600} entre 0,6 y 0,8. Luego, se indujo la expresión de la proteína con 0,4 mM de IPTG y se incubó a temperatura ambiente con agitación de 230 rpm por el tiempo definido en el ensayo de expresión (apartado 2.2.2.2.). Se centrifugó el cultivo a 9223 g, a una temperatura de 4 °C durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se congeló el pellet de células obtenido hasta su posterior utilización.

2.2.3. Purificación del péptido antimicrobiano mediante cromatografía líquida de proteínas

La purificación del péptido antimicrobiano se realizó de forma similar a lo publicado previamente (**Cordones, 2023; Wu et al., 2022**) con ciertas modificaciones, como se detalla a continuación.

2.2.3.1. Lisis celular

El pellet de células fue descongelado y resuspendido en un buffer de lisis (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, 0,5% de Triton X-100 y PMSF 1 mM, pH 8.5). Posteriormente, las células fueron lisadas por sonicación, la cual consistió en 10 ciclos de trabajo constante de 10 s con pausas de 10 s (**Wingfield, 2014**). El lisado celular fue separado por centrifugación a 21130 g a 4 °C durante 45 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se descartó el precipitado.

2.2.3.2. Cromatografía líquida de proteínas

El sobrenadante obtenido de la lisis celular fue filtrado usando un filtro jeringa de 0,45 μm y cargado en una columna cromatográfica de afinidad Ni-NTA, previamente equilibrada con tampón fosfato de sodio 20 mM, imidazol 40 mM, NaCl 150 mM, pH 8.5, el cual también fue usado para cargar y lavar la muestra. La proteína fue separada empleando el tampón fosfato de sodio 20 mM, imidazol 400 mM, NaCl 150 mM, pH 8.5, mediante una elución isocrática (**Wu et al., 2022**).

La enzima fue colectada en fracciones de 1 mL. Las fracciones que contenían la mayor concentración de proteína se unieron y cargaron en una columna PD-10 que había sido previamente equilibrada con una solución de 20 mM fosfato pH 7.0. La enzima desalinizada se colectó en fracciones de 1 mL y las fracciones que contenían la mayor concentración de proteína se unieron para luego realizar los ensayos de autoescisión. La pureza de la enzima en los distintos pasos de la purificación se analizó mediante SDS-PAGE (**Sambrook, 2012**).

2.2.3.3. Ensayo de autoescisión de la inteína

Se tuvieron en cuenta las condiciones del ensayo previamente publicado por **Wu et al. (2022)**, para la autoescisión de la inteína. Se variaron las condiciones de pH y temperatura para determinar las condiciones óptimas de autoescisión. Se utilizó un tampón fosfato 20 mM con un rango de pH de 5.0 a 10.0 y se evaluó la autoescisión a diferentes temperaturas entre 25-45 °C en un período de tiempo de 72 horas.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Construcción del plásmido

La construcción de la PF consistió de la inteína flanqueada por una cola de histidinas y la Aedesina en sus extremos N- y C-terminal respectivamente (Wu et al., 2022). Se adicionó una metionina en el extremo N-terminal para clonar la PF al inicio del marco de lectura abierto del sitio de clonación múltiple del vector de expresión. Esto permitió, adicionalmente, incluir el sitio de restricción *NdeI* en el extremo 5' de la construcción (Figura 8).

(A)

```
1 atg cac cat cac cat cac cat gcc atg ggc ctg agc tat gaa acc gaa att ctg acc gtg 60
1 M H H H H H H A M G L S Y E T E I L T V 20
61 gaa tat ggc ctg ctg ccg att ggt aaa att gtg gaa aaa cgc atc gaa tgt act gtt tat 120
21 E Y G L L P I G K I V E K R I E C T V Y 40
121 agc gtt gat aat aat ggc aat att tat acc cag ccg gtg gca cag tgg cac gat cgc ggc 180
41 S V D N N G N I Y T Q P V A Q W H D R G 60
181 gaa cag gaa gtg ttt gaa tat tgt ctg gaa gat ggt agc ctg att cgc gca acc aaa gac 240
61 E Q E V F E Y C L E D G S L I R A T K D 80
241 cat aaa ttt atg act gtt gat ggt cag atg ctg ccg att gat gaa att ttt gaa cgt gaa 300
81 H K F M T V D G Q M L P I D E I F E R E 100
301 ctg gat ctg atg cgc gtt gat aat ctg ccg aat atc aaa att gcg acc cgt aaa tat ctg 360
101 L D L M R V D N L P N I K I A T R K Y L 120
361 ggc aaa cag aat gtg tat ggc att ggc gtt gaa cgc gac cat aat ttt gcg ctg aaa aat 420
121 G K Q N V Y G I G V E R D H N F A L K N 140
421 ggc ttc att gct tct aat ggt ggg ctg aag aag tta gga aag aaa tta gag ggt gcg ggc 480
141 G F I A S N G G L K K L G K K L E G A G 160
481 aag cgc gta ttc aaa gca tct gaa aaa gcc tta cca gta gtt gtc ggg att aaa gcg att 540
161 K R V F K A S E K A L P V V V G I K A I 180
541 ggg aaa 546
181 G K 182
```

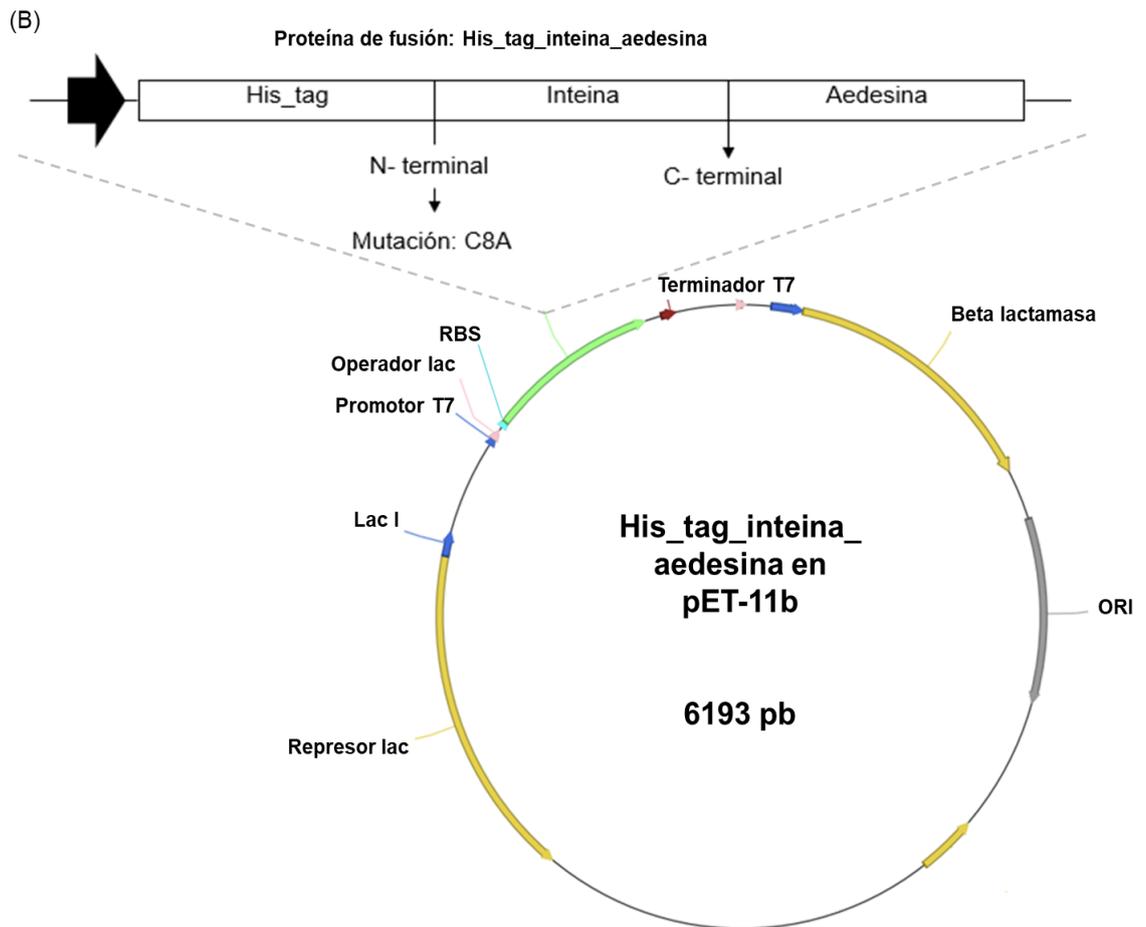


Figura 8. Construcción del plásmido para la PF.

(A) Presenta la secuencia de la PF His_tag_inteina_aedesina con su respectivo código de codones de tres letras, la parte subrayada de verde corresponde a la cola de histidinas, la inteína se subrayó de celeste, y finalmente la aedesina se presenta subrayada de amarillo. Además, el aminoácido encerrado corresponde a la mutación realizada (C8A), mientras que subrayada de rojo se encuentra la región conservada TXXH (B) La construcción del plásmido para la expresión del péptido incluye un gen de resistencia a la ampicilina y un promotor T7 inducible por IPTG que contiene la PF.

3.2 Transformación

La transformación del plásmido en el vector de expresión, siguiendo el protocolo convencional de choque térmico, presentó diversos desafíos, especialmente en la obtención de colonias transformadas. Los factores que están involucrados con el nulo crecimiento de transformantes son varios, pueden ser: ineficiencia de las células

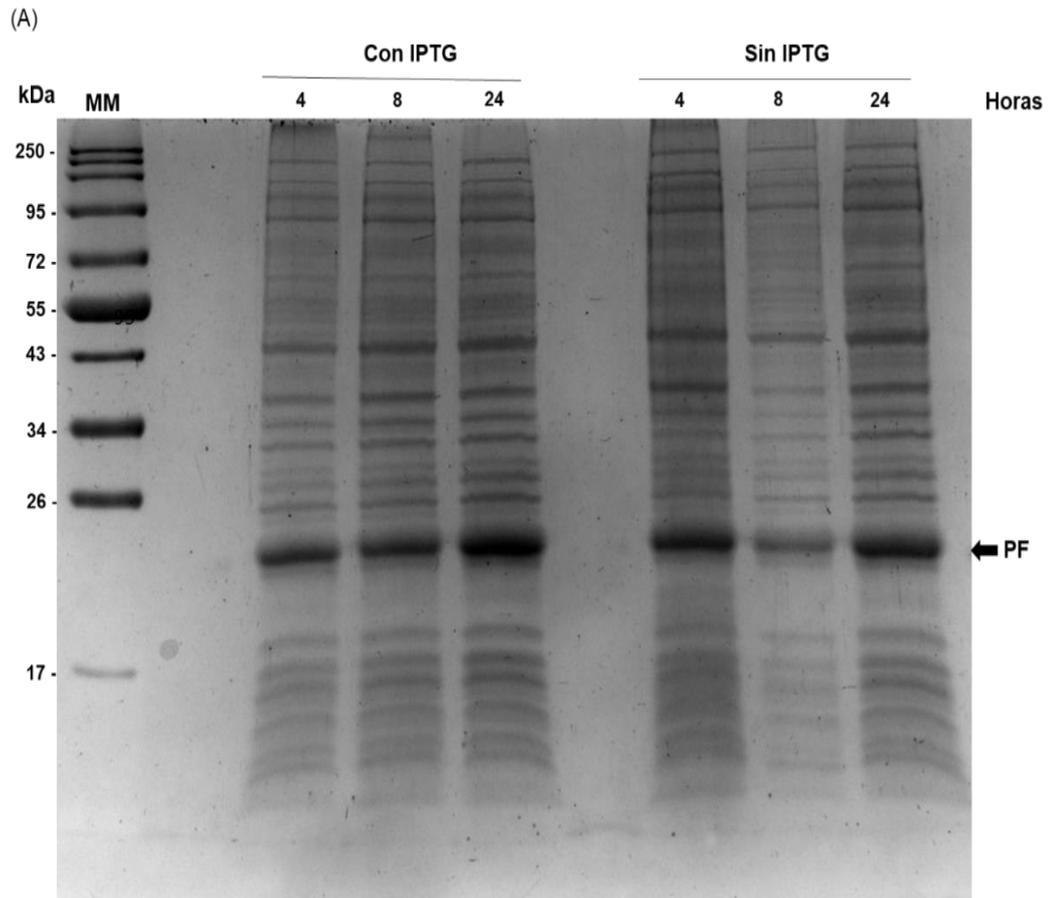
competentes, cantidad de ADN subóptima, proteína clonada tóxica para la célula competente, concentración de antibiótico inadecuada, mal diseño del plásmido, entre otros **(Hoelscher et al., 2022)**. La mayoría de estos factores se pudieron descartar gracias a varios ensayos de transformación en diferentes células competentes (*E. coli* BL21 DE3, *E. coli* BL21 TF2 y *E. coli* DH5 α) y usando controles. El resultado de la transformación resulto positivo en células TF2 y DH5 α ya que se obtuvieron colonias transformadas y un nulo crecimiento de células BL21 DE3.

Existen varias estrategias para lograr la expresión de la proteína minimizando la toxicidad de la misma **(Lee et al., 2013; Rosano & Ceccarelli, 2014)**. Además, diversas investigaciones sugieren que el control y ajuste de variables, como: fuerza del promotor, presencia de ARN T7 exógenas, fuerza del RBS y la afinidad del operador con el represor, son claves para evitar la muerte celular. La fuerza del promotor puede ocasionar muerte celular en el caso de que llegue a ocupar muchos recursos celulares, debido a una alta tasa de transcripción. El vector BL21 DE3 es muy eficiente y permite la sobreexpresión de proteínas; sin embargo, esto puede provocar que se exceda el límite de expresión de la célula, afectando la viabilidad celular **(Shis & Bennett, 2014)**.

El crecimiento de los transformantes se puede deber a la presencia de la proteasa Lon en la célula hospedadora, esta proteasa se encarga de mejorar la estabilidad proteica y eliminar algunas proteínas mal plegadas. Por lo tanto, puede reducir la toxicidad de las proteínas expresadas **(Ching et al., 2019; Choi et al., 2022; Voos & Pollecker, 2020)**. Además, la proteasa Lon puede eliminar proteínas reguladoras (reguladores xenogénicos) ya que puede eliminar silenciadores como la proteína estructuradora nucleoide estable al calor (H-NS), la cual se puede unir a segmentos de ADN e impedir que la polimerasa pueda sintetizar dicho segmento **(Ching et al., 2019; Voos & Pollecker, 2020)**

3.3 Ensayo de expresión de la PF

En la Figura 9 A, el análisis SDS-PAGE de la proteína recombinante exhibe un patrón de bandas similar en todos los carriles que contienen la muestra (Carril 3-5 y 7-9). El patrón de bandas se debe mantener uniforme en los carriles para descartar algún tipo de contaminación o variabilidad biológica. La proteína recombinante posee una masa molecular de 20 kDa, por lo que coincide con la banda que se encuentra entre la posición de los 17 y 26 kDa correspondientes al marcador molecular. La presencia de bandas en los carriles donde no se indujo a las células con IPTG corresponden a fugas (expresión basal) e involucran un problema en la expresión de proteínas (**Hoelscher et al., 2022**).



(B)

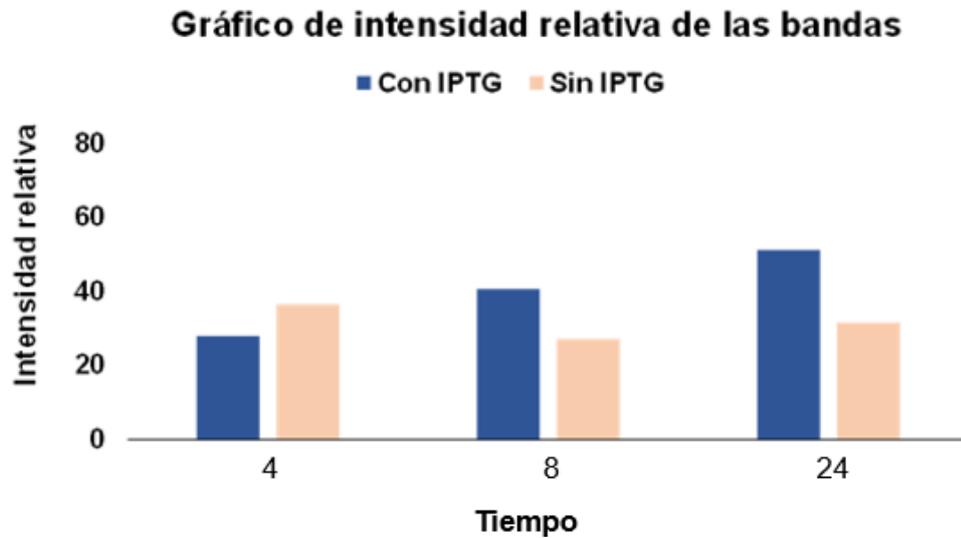


Figura 9. *Ensayo de expresión del péptido antimicrobiano.*

(A) Análisis SDS-PAGE del gel elaborado al 12 %, en el cual se puede comprobar la expresión de la proteína recombinante His_tag_inteina_aedesina en *E. coli* TF2. Se distingue en el Carril 1: Marcador de peso molecular (1kDa), Carril 2: sin cargar, Carril 3-5: con inducción de 0,4 mM de IPTG en periodos de tiempo de 4, 8 y 24 horas respectivamente, Carril 6: sin cargar, Carril 7-9: sin inducción de IPTG en periodos de tiempo de 4, 8 y 24 horas respectivamente. PF: Proteína de fusión de 20,54 kDa. (B) Intensidad relativa de las bandas correspondientes al ensayo de expresión evaluado previamente.

La presencia de fugas en vectores de expresión inducibles es un evento que se ha observado en otras investigaciones que buscan la síntesis de AMPs, independientemente del vector que se usó. Por ejemplo, se ha observado expresión basal de proteínas recombinantes en plantas de tabaco transplastómicas, en las cuales se insertó la secuencia del péptido en un transgén PT7 (Hoelscher et al., 2022).

Tal como se observa en la Figura 9 B, la expresión es similar cuando se adiciona IPTG como cuando no. La expresión basal puede ser atribuida principalmente a las altas tasas de transcripción impulsadas por el promotor T7, es decir que hay acumulación

de la polimerasa ARN de T7 antes de colocar el IPTG (**Shis & Bennett, 2014**). También puede darse cuando se lleva a cabo la transcripción del transgén PT7, sin la presencia de la polimerasa específica. Esto ocurre ya que el promotor T7 puede promover la unión de otras polimerasas disponibles o de factores de transcripción, generando expresión basal (**Hoelscher et al., 2022**).

Esta capacidad del promotor permite que se obtengan grandes cantidades de expresión o sobreexpresión de proteínas (**Passalacqua et al., 2020; Shis & Bennett, 2014**). A pesar de que, **Passalacqua et al., (2020)** afirma que existe una alta precisión en la transcripción debido a la alta especificidad entre la polimerasa T7 y el promotor, todavía se puede dar lugar a la expresión basal (**Hoelscher et al., 2022**).

Un factor diferencial en la tasa de expresión basal es la selección inadecuada de un RBS (del inglés ribosome binding site). Como se puede apreciar en la Figura 8 B, el plásmido contiene un RBS el cual se relaciona con la eficiencia de traducción. El RBS es un segmento rico en adeninas y timinas que se encuentra unos nucleótidos antes del codón de inicio de traducción y facilita la unión al ribosoma para que se lleve a cabo la traducción de manera adecuada (**Hu et al., 2012; Omotajo et al., 2015**). Según la conformación de bases nitrogenadas un RBS puede ser fuerte o débil; sin embargo, cuando se usa un RBS fuerte los niveles de expresión basal pueden incrementar lo que conduce a muerte celular si la proteína es tóxica (**Lee et al., 2013**).

Otra posible causa de la expresión basal es la carencia de fuentes de carbono y energía fáciles de asimilar por la bacteria. Por ejemplo, cuando la bacteria hospedadora no dispone de suficiente glucosa para obtener energía, tiende a aumentar la cantidad de adenosín monofosfato. Posteriormente, el adenosín monofosfato tiende a sufrir un proceso de ciclación mediado por la enzima adenilato ciclasa generando un (cAMP) el cual forma un complejo con la proteína CAP. El complejo entre la adenosín monofosfato y el cAMP tiene un efecto positivo en la transcripción dado que estimula la ARN polimerasa T7 (**Francis & Page, 2010; Rosano & Ceccarelli, 2014**). Caso contrario, cuando hay disponibilidad de glucosa en el medio, la bacteria usa la glucosa

reduciendo los niveles de cAMP, por lo tanto, no se forma el complejo. Es decir que, al suplementar de glucosa (0,5-1)% al medio, se puede favorecer a la reducción de la expresión basal dado que no se estimula a la ARN polimerasa al proceso de transcripción (**Rosano & Ceccarelli, 2014; Tahara et al., 2020**).

Existe una relación directamente proporcional entre el tiempo de inducción y la cantidad de proteína recombinante obtenida. No está definido un periodo de tiempo en el que se deba incubar al péptido después de la inducción con IPTG, sin embargo, la mayoría de las investigaciones emplean de 4-6 horas (**Shis & Bennett, 2014; Sima et al., 2020**). En contraste, a criterio de **Sivashanmugam et al., (2009)**, la selección del tiempo de incubación dependerá de cada péptido, dado que no todos los péptidos se pueden expresar de manera eficiente.

El ensayo de expresión de la proteína con los distintos periodos de tiempo sugiere que el mejor tiempo de incubación fue de 24 horas, ya que en dicho carril se observa una banda más grande en comparación con las bandas de 4 y 8 horas de incubación (Figura 9 A). Un mayor tiempo de incubación se puede asociar con una tasa de síntesis lenta, degradación de la proteína recombinante por acción de proteasas, formación de cuerpos de inclusión (los cuales provocan la proteína tarde más tiempo en plegarse adecuadamente) y la inestabilidad de la proteína recombinante (**Gräslund et al., 2008; Sivashanmugam et al., 2009**).

3.4 Expresión y purificación del péptido antimicrobiano

3.4.1 Purificación de la construcción Histag_inteina_aedesina

La purificación de proteínas a menudo involucra varios pasos y estrategias cromatográficas (**Z. Li et al., 2022**). En la presente investigación se purificó la proteína recombinante mediante un sistema FPLC (del inglés fast protein liquid chromatography), utilizando una columna de afinidad (Ni-NTA) acoplada a con un equipo ÄKTA Start (**Acharya et al., 2019**). Este esquema permitió la purificación del péptido, como se puede observar en la Figura 10. La proteína eluyó en un solo pico cuando aplicando una elución isocrática. Los resultados obtenidos se asemejan a los

reportados por **Cordones, (2023)**, quien purificó un péptido similar a una cecropina, mediante una estrategia de purificación similar a la utilizada en la presente investigación.

En la Figura 10 se observan dos picos que llegan hasta las 2000 mAU, valor que corresponde al límite de detección ultravioleta visible (UV-Vis) a 280 nm del equipo. Además, los picos presentan volumen de retención distintos dado que muestran las diferentes etapas de purificación. El pico (A) muestra la etapa de carga de muestra en la columna de afinidad, y que constó de aproximadamente 23 mL. Este pico usualmente es ancho y continuo dado que se detectan todo tipo de proteínas y moléculas capaces de absorber luz a 280 nm (Figura 10). Posteriormente, se puede notar una reducción en la lectura de absorbancia, la cual se produce durante la fase de lavado. Esta etapa sirve para eliminar las proteínas no deseadas y proteínas unidas a la columna mediante interacciones no específicas y débiles. Usualmente, esta etapa se observa como una meseta. Estos datos concuerdan con los resultados presentados por **Cordones, (2023)**, dado que se observa un pico similar en la etapa de carga y lavado de la muestra. Sin embargo, en dicha investigación se observa un volumen de retención mayor en comparación con el obtenido (Figura 10) debido a que la muestra inicial en dicho ensayo fue de aproximadamente 38 mL.

Finalmente, en la Figura 10, se observa un pico (B) que posee una alta concentración y un volumen de retención corto. Este pico es resultado del proceso de elución de la PF, en el que se utiliza un buffer con una concentración elevada de imidazol. La formación de este pico también está acorde con lo reportado en otras investigaciones (**Cordones, 2023**).

La retención del péptido de interés en la columna se logra debido a la presencia de residuos de histidina en la PF. Estos residuos de histidina poseen un anillo aromático de imidazol que contiene dos átomos de nitrógeno con electrones libres. Los electrones libres tienen la capacidad de formar enlaces con los metales, permitiendo así su

retención en el sistema cromatográfico (**Bornhorst & Falke, 2000; Kessler & Raja, 2022**).

La columna contiene una resina de níquel- ácido nitrilotriacético (Ni^{2+} - NTA), la misma que forma un enlace covalente coordinado con electrones libres del nitrógeno presente en el anillo aromático imidazol de la histidina en la PF (**Bornhorst & Falke, 2000; Kessler & Raja, 2022; Liao et al., 2013**). El enlace formado es fuerte y permite inmovilizar al péptido de interés unido al ion metálico de transición (Ni^{2+}), para posteriormente poder visualizar el pico correspondiente en las etapas posteriores de purificación (**Bornhorst & Falke, 2000**).

El proceso de elución de la PF se lleva a cabo usando imidazol, el cual es compuesto un análogo de la histidina. Cuando el imidazol está presente en concentraciones elevadas actúa como un competidor de la histidina por el (Ni^{2+}) presente en la columna. Este proceso tiene lugar dado que el enlace coordinado entre la cola de histidinas y el metal de transición se separa, de esta manera la PF no tiene ningún impedimento y eluye a través de la columna (**Bornhorst & Falke, 2000; Kessler & Raja, 2022**). Durante esta etapa se detecta su absorbancia en el cromatograma, la cual se visualiza como un pico con un volumen de retención corto pico (B). Finalmente, se recogen las fracciones correspondientes en donde se encuentra la PF.

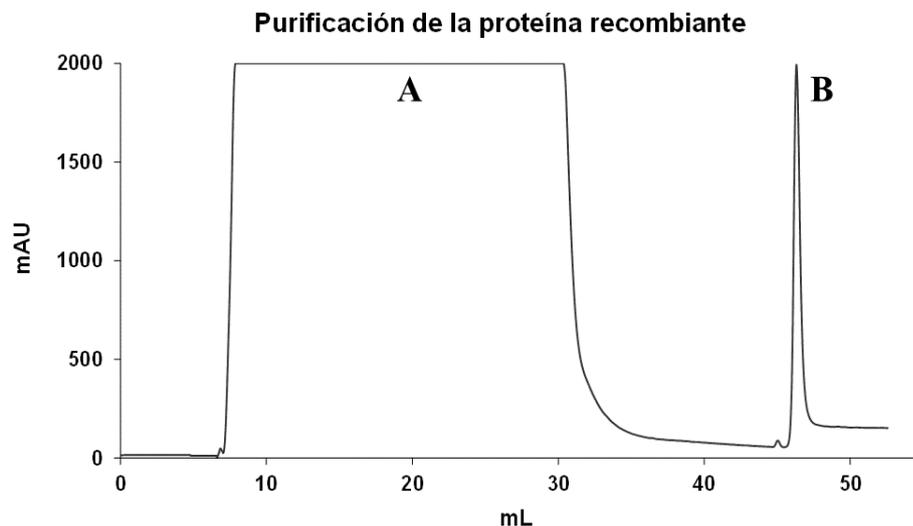


Figura 10. *Cromatograma correspondiente a la purificación de la proteína recombinante*

3.4.2 Desalado

El proceso de eliminación de sales (desalado) mediante cromatografía de filtración en gel se realizó usando una columna PD-10 (**Du et al., 2022**). Esta columna permite la separación de sales mediante el principio de exclusión molecular. En la columna se cargaron 2,5 mL de muestra correspondientes a las fracciones 5, 6, 7 obtenidas previamente durante la cromatografía de afinidad.

En la Figura 11, las fracciones 2, 3 y 4, obtenidas durante el desalado, presentan una mayor concentración. Esto se debe a que, en la cromatografía de exclusión por tamaño las moléculas con un mayor tamaño son las que fluyen primero a través de la columna. Posteriormente, las sales y moléculas de menor tamaño eluyen de la columna dado que estas moléculas interactúan con las perlas presentes en la resina (**Costa et al., 2014; Du et al., 2022**). Es importante destacar que este tipo de columna no afecta la actividad biológica de la PF, y la recolección de las fracciones se realiza en función del tiempo de elución deseado (**Z. Li et al., 2022**).

No obstante, al analizar las fracciones, se observa que la concentración máxima de las fracciones analizadas es baja (2,40 mg/mL) en comparación con el análisis de desalado de otros péptidos similares a la cecropina, en donde se cuantificó una concentración máxima superior a 9,50 mg/mL (**Cordones, 2023**). Esta diferencia se relaciona directamente con la cantidad de muestra empleada inicialmente.

En la investigación de **Cordones, (2023)**, la cantidad de biomasa inicial fue de 6,34 g. En la presente investigación, la cantidad de biomasa empleada fue 3.8 g. Los rendimientos obtenidos en cada uno de estos trabajos fueron 1,50 y 0.63 mg/mL.g de biomasa, respectivamente. Esto sugiere que la expresión de la PF tiene ciertas limitaciones que posiblemente están relacionadas a la inhibición de la expresión del péptido antimicrobiano como medida de protección de la integridad celular.

Es importante destacar que las fracciones analizadas presentan una concentración inicial de sales de 150 mM y se espera que los rendimientos de desalinización de las fracciones superen el 90%, según la información proporcionada por el fabricante. Según **Wu et al., (2022)**, la inteína inicia su autoescisión a concentraciones bajas de sal, es decir que la concentración de sal es determinante en el control de este mecanismo (condición de prohibición). Por lo tanto, es importante mantener una alta concentración de sales en los pasos iniciales de purificación para evitar el autocorte de la inteína (**A. S. Aranko et al., 2021; Wu et al., 2022**).

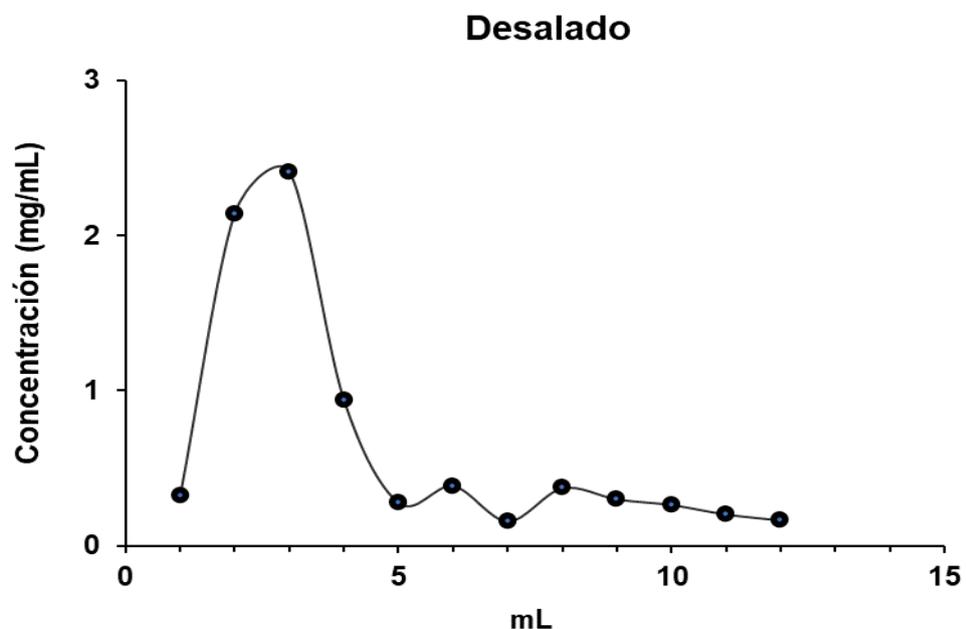


Figura 11. Cromatograma del desalado del péptido por filtración en gel.

3.4.3 Ensayo de autoescisión mediado por inteína

Se han encontrado inteínas en la subunidad α de proteínas, en muchas bacterias (**Pavankumar, 2018; Sarmiento & Camarero, 2019**). Particularmente, se ha evidenciado la presencia de regiones de empalme en polimerasas III las cuales intervienen en la replicación de cianobacterias como *Nostoc Punctiforme* (*Npu DnaE*). Esta proteína ha demostrado tener un efecto positivo en la purificación de proteínas,

puesto que es altamente activa y presenta gran afinidad de los fragmentos divididos (Carvajal-Vallejos et al., 2012; Ramirez et al., 2013).

Como se puede apreciar en la Figura 8 A, la posición I_N está constituida por el péptido alanina, habitualmente en este extremo se encuentran residuos como cisteína o serina (Elleuche & Pöggeler, 2010; Pavankumar, 2018; Sarmiento & Camarero, 2019; Topilina & Mills, 2014). Este cambio se debe a que la inteína presenta una mutación en esa región para cambiar el residuo original (cisteína) por una alanina (Figura 8 B). La mutación en este extremo se constituye como una estrategia para la purificación del péptido (Amarantog et al., 2021; Prabhala et al., 2022). Mientras que en la posición I_C , el residuo que se encuentra en la última posición es la asparagina, el cual corresponde con los residuos conservados, dado que generalmente son histidina y asparagina (Elleuche & Pöggeler, 2010; Pavankumar, 2018; Sarmiento & Camarero, 2019; Topilina & Mills, 2014).

La secuencia de la inteína contiene regiones conocidas como motivos de corte y empalme. Estos motivos constan de regiones cortas de aminoácidos, las regiones más significativas que constituyen a la inteína son las A, B, F y G. La secuencia de aminoácidos TXXH (treonina- X- X- histidina) es altamente conservada en las inteínas y se encuentra en el bloque B (Pavankumar, 2018). Como se puede ver en la Figura 8 A, esta región se encuentra subrayada de rojo y la complementan los aminoácidos lisina y aspartato.

El uso de proteínas portadoras (inteínas), se considera una de las mejores alternativas para la purificación de péptidos. (Sarmiento & Camarero, 2019). Varias investigaciones sugieren que la capacidad de autocatálisis de la inteína se lleva a cabo bajo ciertas condiciones, como: pH, temperatura, estrés oxidativo y el uso de biomoléculas específicas (generalmente un grupo tiol). La variación de estas condiciones permite generar una autoescisión controlada de la inteína (Amaranto et al., 2021; Elleuche & Pöggeler, 2010; Pavankumar, 2018; Prabhala et al., 2022; Sarmiento & Camarero, 2019; Volkmann et al., 2009). Por consiguiente, en el

presente ensayo se evaluó el efecto de diferentes variables en la actividad autocatalítica de la inteína, para optimizar las condiciones más favorables de autocorte.

El ensayo de autoescisión de la inteína, evaluado mediante SDS-PAGE, indica la presencia de una banda de aproximadamente 17 kDa en todos los geles (Figura 12 A, B y C). Esta banda corresponde al complejo formado entre la cola de histidinas y la inteína, debido a que el peso molecular de la inteína es de aproximadamente 16 kDa y el de la cola de histidinas es de 0,9 kDa.

Los geles correspondientes a la Figura 12 B y C, indican la presencia de bandas que están aproximadamente a 20 kDa, las cuales corresponden a la PF sin cortar. Además, se observa la presencia de bandas que están por debajo de los 20 kDa, las cuales pertenecen a cortes inespecíficos de la inteína. Estos resultados son consistentes con la investigación realizada por **Cordones, (2023)**, quien evaluó el impacto de la variación del pH y la temperatura en un periodo de 72 horas. En aquel ensayo se detalla el impacto desfavorable del incremento de la temperatura, puesto que provoca cortes inespecíficos de la inteína.

Para identificar la temperatura adecuada para autoescisión de la PF, se evaluaron tres temperaturas de incubación distintas (25, 34, 45 °C). En donde se comprobó que la temperatura óptima de autoescisión de la inteína es 25 °C, dado que a esta temperatura no se observan cortes inespecíficos, a diferencia de las otras temperaturas. Estos resultados se complementan con la investigación realizada por **Cordones, (2023)**, quien reporta que existen cortes inespecíficos conforme aumenta la temperatura.

En contraste, **Wu et al., (2022)** señala que la mejor temperatura para la autodegradación de la inteína es a 55 °C. Además, menciona que la tasa de autoescisión incrementa conforme aumenta la temperatura, mientras que la menor tasa de autoescisión se obtiene a 4 °C. Sin embargo, en dicha investigación no se evidencian bandas que representen cortes inespecíficos de la inteína independientemente del pH

evaluado. En otra investigación, se reporta que a pesar de que la autocatálisis de la inteína se lleva de manera adecuada a bajas temperaturas, los rendimientos obtenidos son muy bajos. Adicionalmente, se establece que el rango de temperatura que más promueve al corte es de 37-50 °C (**Carvajal-Vallejos et al., 2012**).

Se conoce que una alta tasa de escisión de la inteína reduce el tiempo de corte. En la investigación de **Ramirez et al., (2013)**, se evaluó la efectividad de autoescisión de la inteína en el extremo C terminal. La mejor temperatura para la escisión fue de 37 °C, y se llevó a cabo en 1 hora. Mientras que las muestras que se incubaron a una menor temperatura (25 °C) muestran una escisión en 4 o 5 horas. En ambos casos, el porcentaje de recuperación obtenido fue superior al 80% (**Ramirez et al., 2013**).

Para evaluar la influencia del pH se sometió a la PF a distintos valores de pH, los cuales van desde el 5 a 10 con intervalos de 1. Dicho intervalo se seleccionó en base a otros estudios. Según los resultados obtenidos y presentados en la Figura 12, no se puede establecer si el pH ejerce una influencia en el autocorte. Sin embargo, se puede observar que el pH tiene un efecto en la especificidad de reacción de la inteína, especialmente a elevada temperatura. Los resultados muestran que la presencia de cortes inespecíficos disminuye considerablemente a pH de 5, 7 y 10. Finalmente, en la Figura 12 C se observa un corte inespecífico en todos los carriles. Un entorno ácido puede favorecer al proceso de autoescisión; sin embargo, en conjunto con una alta temperatura puede provocar la formación de estos cortes inespecíficos.

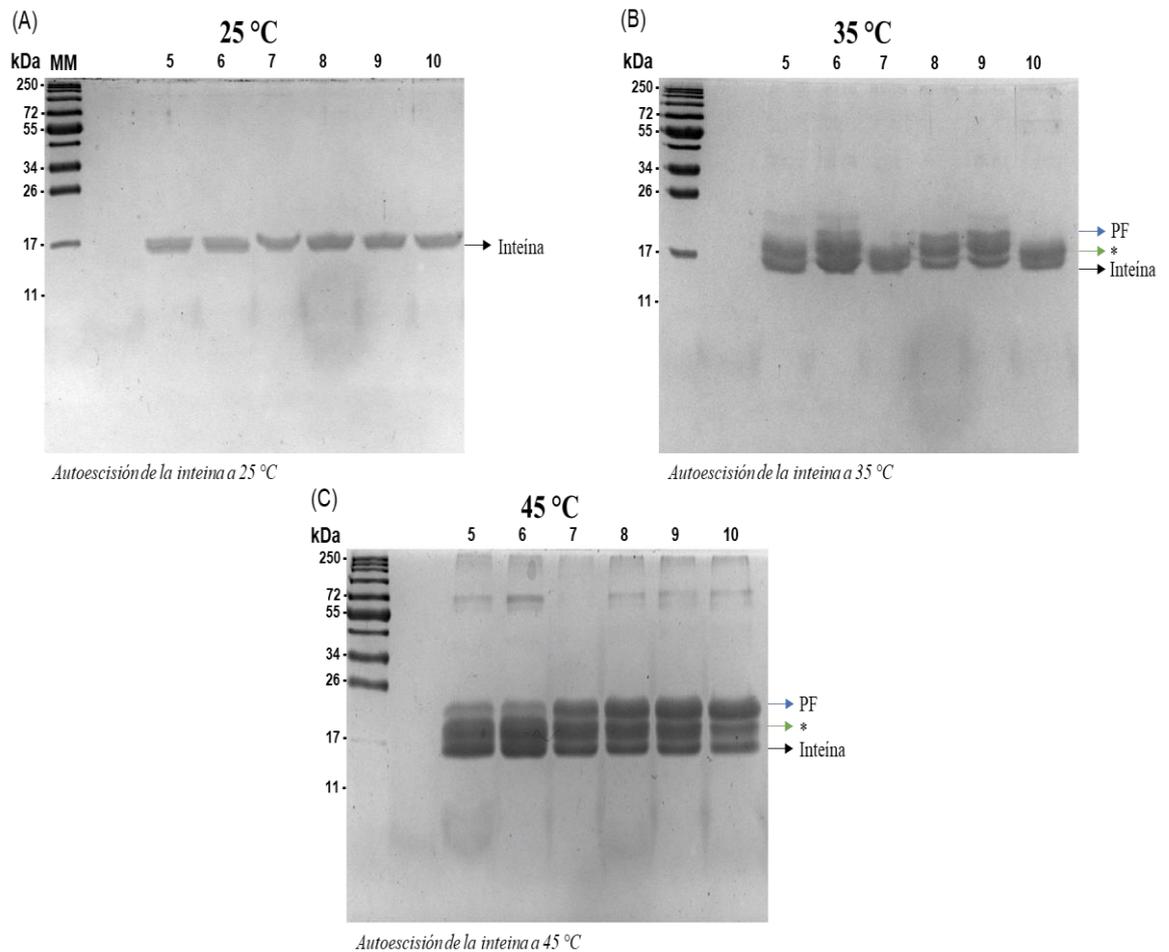


Figura 12. *Ensayo de optimización de condiciones para la autoescisión de la inteína.*

Ensayo de autoescisión a 25 °C. (B) Ensayo de autoescisión a 35 °C. (C) Ensayo de autoescisión a 55 °C. En todos los ensayos el pH usado va de 5 a 10 en un intervalo de 1. La flecha de color verde representa a un autocorte inespecífico de la inteína

Por lo tanto, las mejores condiciones observadas implican un pH de 10, a 25 °C, dado que aparentemente a esta temperatura el efecto del pH es similar en todos los casos (Figura 12 A). De la misma manera, **Cordones, (2023)** menciona que a un pH ácido el rendimiento de autoescisión disminuye considerablemente. Esta observación difiere con otras investigaciones, donde se concluyó que un pH superior al neutro puede provocar una disminución en la eficiencia de la reacción (**Carvajal-Vallejos et al., 2012**). Complementariamente, en otras investigaciones en donde se usa a la inteína con la mutación puntual en I_N , el mejor pH es 6 (**Carvajal-Vallejos et al., 2012**).

La gran cantidad de PF sin cortar (Figura 12 B y C) se relaciona a que probablemente era necesario un mayor tiempo de incubación, para generar el autocorte completo de la proteína portadora (**Cordones, 2023; Wu et al., 2022**). La formación de puentes disulfuro intramoleculares puede alterar la estructura de las proteínas y que no se lleve a cabo el corte de la inteína o que suceda de manera ineficiente. La PF cuenta con dos aminoácidos cisteína, por ende, se pueden formar puentes disulfuro motivo de estrés oxidativo del aminoácido (**Pavankumar, 2018**).

En la Figura 12 C, se observa claramente que la intensidad de las bandas correspondientes a los cortes inespecíficos es directamente proporcional con un aumento en la temperatura de incubación de la columna. Además, se evidencia que la intensidad de bandas correspondientes a los cortes inespecíficos es muy similar a la de la inteína. Esto sugiere que la autocatálisis de la inteína se puede llevar a cabo en ambos extremos o dentro de la secuencia, lo cual se puede explicar por la presencia de alguna región conservada que tenga una gran cantidad de aminoácidos como histidinas o asparigina, y pueda inducir la ciclación del aminoácido.

El proceso de empalme de la inteína se lleva a cabo en 4 pasos, todos los pasos dependen de los aminoácidos específicos conservados que constituyen a la secuencia. Es decir que un cambio en un aminoácido conservado en los extremos I_N o I_C puede alterar o inhabilitar el proceso de autocatálisis (**Elleuche & Pöggeler, 2010; Pavankumar, 2018; Prabhala et al., 2022**). La mutación planteada involucra la supresión de los pasos 1, 2, y 4. Es decir que la formación del compuesto tioéster lineal se suprime, y tampoco ocurre la reacción de transesterificación para generar el intermedio ramificado. Sin embargo, se puede dar el paso 3, que involucra la ciclación de la asparigina, de esta manera se puede llevar a cabo la autocatálisis de la inteína específicamente en I_C (**Carvajal-Vallejos et al., 2012**).

Aún se deben considerar limitaciones al momento de emplear esta estrategia, como las altas tasas de PF en donde la inteína no se corta o a la escisión espontánea en la inteína en los procesos de expresión y purificación de la proteína recombinante (**Sarmiento & Camarero, 2019; Volkmann et al., 2009**). Estos cortes que se produjeron en la inteína tienen importantes implicaciones en el proceso de purificación del péptido y se relacionan a varios factores.

Como se mencionó anteriormente, la PF cuenta con una mutación en I_N (C8A), la cual inhibe el corte de la inteína en el extremo I_N . Sin embargo, la presencia del residuo alanina no elimina por completo la posibilidad de que se lleve a cabo un corte en este extremo (**Amaranto et al., 2021; Sarmiento & Camarero, 2019**). **Sarmiento & Camarero, (2019)**, reporta que se puede llevar a cabo un corte en el extremo I_N a pesar de que la alanina este en la posición +1 de la inteína, puesto que ocurre una reacción en donde se genera directamente un intermedio tioéster ramificado. Adicionalmente, otros autores mencionan que los compuestos tioéster se pueden escindir mediante procesos de hidrolisis o de tiolisis, independientemente de la ciclación de la asparigina (**Topilina & Mills, 2014**). Además, compuestos como el ditiotreitól (DTT) pueden promover la formación de un enlace tioéster que provoque una escisión N terminal mediante un ataque nucleofílico, por la influencia de un grupo tiol (**Amaranto et al., 2021; Ramirez et al., 2013**).

Cómo se mencionó anteriormente, el proceso habitual de corte de la inteína con la mutación puntual implica que se lleve a cabo directamente el paso de la ciclación del aminoácido conservado. Sin embargo, **Pavankumar, (2018)** sugiere que posterior al proceso de ciclación puede darse la formación de un intermedio tioéster ramificado en un proceso de transesterificación, lo que también podría causar cortes inespecíficos de la inteína (**Elleuche & Pöggeler, 2010**).

En este caso, el proceso de transesterificación se puede llevar a cabo de manera tardía o directamente no se realiza, lo cual implica dos escenarios. Cuando la transesterificación no se lleva a cabo, se produce un corte en I_C generando que el

péptido de interés fluya a través de la columna, dado que al no estar unido a la cola de afinidad no tiene electrones libres que puedan interactuar con el Ni^{2+} presente en la resina de la columna. Mientras que, si se lleva a cabo el proceso de transesterificación de manera tardía, se generará un compuesto tioéster ramificado entre la cisteína del primer aminoácido de la C exteína con I_N . Por consiguiente, el péptido formará un enlace éster con la cola de afinidad, y posteriormente un enlace peptídico producto de un cambio de acilo S por N. Lo cual genera que la inteína eluya a través de la columna, mientras que el complejo de histidinas-aedesina se quede en la resina.

En la investigación de **Cordones, (2023)**, se reportan cortes inespecíficos, los cuales pueden ocurrir por la presencia de asparagina en la secuencia de la cecropina, la cual podría generar una ciclación inesperada. Sin embargo, la aedesina no posee aminoácidos como la asparagina o cisteína que provoquen una reacción de ciclación y, por lo tanto, se dé un corte en el péptido. Caso contrario, la presencia de residuos como treonina o histidina que están presentes la región conservada TXXH de la aedesina pueden favorecer la formación de un intermedio tioésterlineal, lo cual puede generar cortes inespecíficos en la inteína (**Sarmiento & Camarero, 2019**).

3.4.4 Purificación del péptido antimicrobiano

Se puede observar en la Figura 13 A dos picos (A y B) los cuales se obtienen de fases distintas de la purificación del péptido. El primer pico corresponde a la etapa de lavado de la columna con buffer fosfato pH 10 y contiene las fracciones (1, 2, 3). Mientras que el segundo pico (B) corresponde a la etapa de elución con imidazol 400 mM, en la que se observan las fracciones (8, 9, 10).

En la Figura 13 B, se puede observar la presencia de la inteína cortada en el carril 2, esto se debe a que esta banda corresponde a una muestra sometida a las mejores condiciones de autoescisión de la inteína (pH 10 a 25 °C) la cual sirve como un control. Además, se determina que la autoescisión de la inteína fue adecuada y completa, ya que se puede observar una pequeña banda correspondiente al péptido en el mismo carril.

En los carriles 3, 4, 5 se cargaron las fracciones 1, 2 y 3 respectivamente, estas fracciones corresponden con la etapa de lavado de la PF dentro de la columna de afinidad (Figura 13 A). En estos carriles, solo se observa la presencia de la aedesina en aproximadamente 3 kDa, esto se debe a que solo va a eluir el péptido antimicrobiano, dado que esta etapa solo se realiza con tampón fosfato a pH 10. El resto de la PF permanece unida a la columna debido a las interacciones de afinidad con la matriz, por lo que no se observa en estos carriles.

En los carriles 6, 7 y 8 se cargaron las fracciones 8, 9 y 10 respectivamente. En estos carriles se observa la presencia de bandas que aparentemente se encuentran a 19 kDa (Figura 13 A). Estas bandas pueden pertenecer a un corte inespecífico de la inteína, que al momento de eluir con el buffer correspondiente contenía una pequeña porción de la aedesina. En dichos carriles se observa que la mayor intensidad de banda es en el carril 6. Este resultado corresponde con los valores obtenidos en el cromatograma, en donde esta fracción es la que tiene la mayor absorbancia, mientras que en el carril 8 casi no se visualiza los cortes inespecíficos en el gel. Sin embargo, si se puede identificar la presencia de la aedesina en todas las fracciones.

Finalmente, en el carril 9 se observa una banda que esta por los 20 kDa la cual corresponde a la PF sin corte (Figura 13 A). Debajo de dicha banda se observa la presencia de una pequeña banda que corresponde a un corte inespecífico de la inteína. Precisamente esta muestra resulta ser de importancia dado que la misma no fue sometida al desalado. Es decir que la condición de prohibición de la inteína puede no tener un efecto estrictamente inhibitorio en la autocatálisis de la inteína. Esto sugiere la acción descontrolada de autocorte se puede deber al manejo de la muestra y que la autoescisión es promovida por cambios abruptos en la temperatura ya que esta muestra se encontraba almacenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

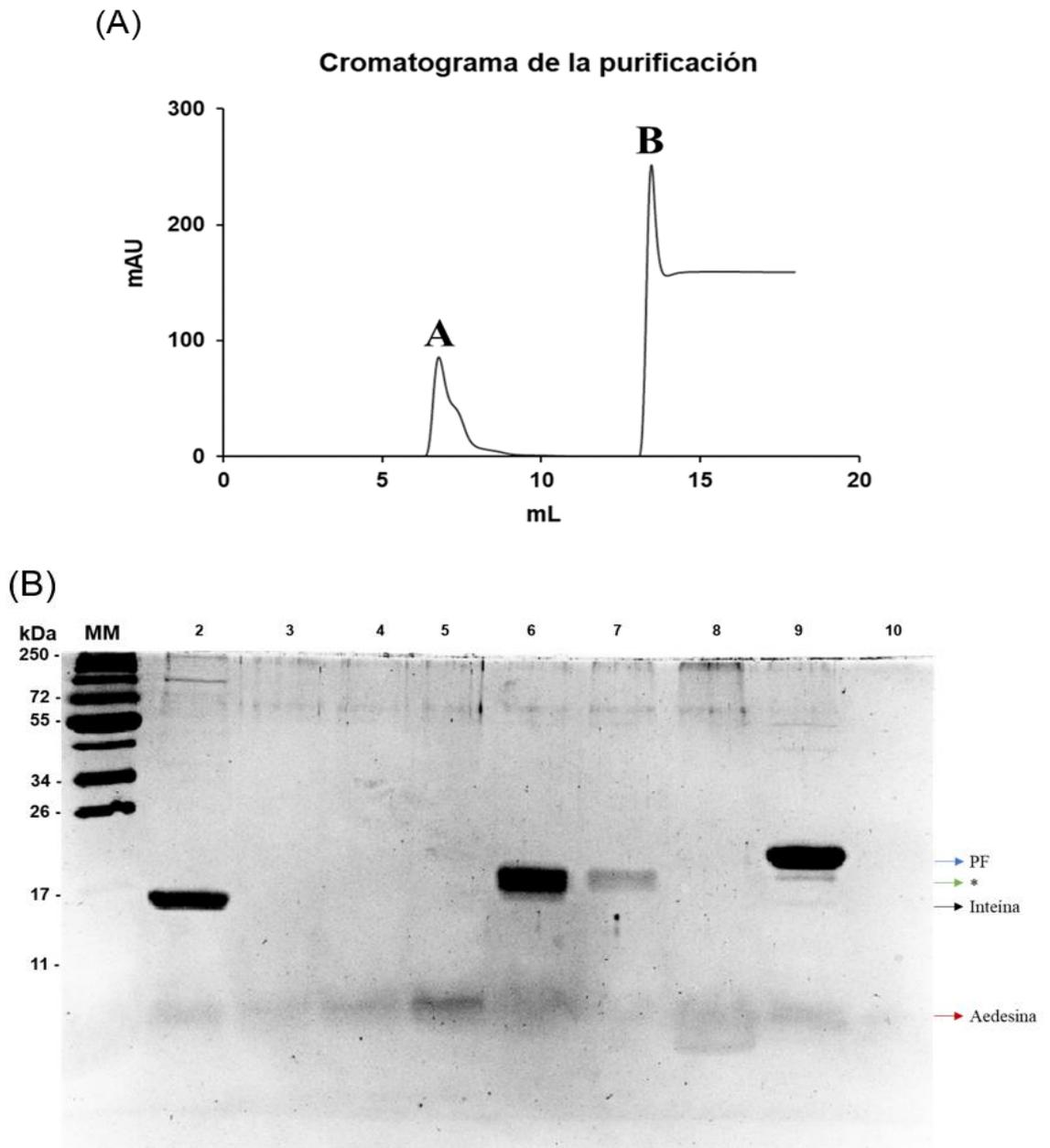


Figura 13. Resultado de la obtención del AMP aedesina usando una columna de afinidad.

(A) Cromatograma de purificación de la aedesina (B) Análisis SDS-PAGE del gel elaborado al 12 %. Se visualiza en el Carril 1: Marcador de peso molecular (1kDa), Carril 2: Control 1 correspondiente a la muestra que evalúa las condiciones de autoescisión (pH 10 a 25 °C), Carril 3-5: Fracciones 1, 2, 3 respectivamente, Carril 6-8: Fracciones 8, 9, 10 respectivamente, Carril 9: Control 2 correspondiente a una fracción anterior al desalado. (*) proteína de aproximadamente 19 kDa.

CAPÍTULO IV

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se diseñó un vector de expresión que permite la expresión y purificación del péptido antimicrobiano aedesina. La estrategia empleada, se basó en la autocatálisis de la inteína en el extremo C-terminal y el uso de una cola de histidinas como etiqueta de afinidad, demostró ser exitosa en la obtención de la aedesina. Además, se comprobó que la condición de prohibición de la inteína funciona, y está determinada por la concentración de sales presente en la muestra. A pesar de que se observan cortes inespecíficos de la inteína, la purificación mediante este método resultó ser efectiva, estableciéndose como una prometedora alternativa para la síntesis de péptidos antimicrobianos.
- Se evaluó que las mejores condiciones de expresión de la proteína recombinante se dan a 24 horas posterior a la inducción con 0,4 mM de IPTG a temperatura ambiente mediante un ensayo de expresión. Aunque el rendimiento de generación de biomasa es aceptable, es necesario superar limitaciones relacionadas con la expresión basal y la fuerte toxicidad del péptido sobre las células competentes.
- Se purificó de manera eficiente a la aedesina usando un sistema FPLC en tres etapas, haciendo uso de cromatografía de afinidad y de filtración en gel para el desalado. Además, se estandarizó las condiciones de autoescisión de la inteína, las cuales son pH 10 y 25 °C, las cuales limitan la formación de cortes inespecíficos de la inteína, siendo la temperatura el factor determinante en el autocorte. A pesar de que la aedesina se purificó correctamente, la presencia de proteína sin cortar sugiere que otros factores están afectando a la especificidad de autoescisión. Adicionalmente, se comprobó que la mutación del primer

aminoácido de la inteína no siempre puede inhibir el corte en el extremo N-terminal.

4.2. Recomendaciones

- Evaluar la influencia de otras mutaciones en la inteína que pueden ayudar a mejorar el corte de la misma y permitan reducir el tiempo de escisión de la inteína.
- Experimentar con distintas condiciones que pueden catalizar el proceso de autoescisión de la proteína portadora. Además, investigar la influencia de estas condiciones antes y después de la etapa de desalado, para mejorar el rendimiento de corte y comprobar la condición de prohibición de la inteína.
- Implementar diferentes estrategias de diseño de plásmidos que permitan la expresión de la proteína de fusión haciendo uso de otro tipo de inductor distinto al IPTG.

4. MATERIAL DE REFERENCIA

- Acharya, D., Sullivan, M. J., Duell, B. L., Eveno, T., Schembri, M. A., & Ulett, G. C. (2019). Physical extraction and fast protein liquid chromatography for purifying flagella filament from uropathogenic *Escherichia coli* for immune assay. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2019.00118/BIBTEX>
- Adler, A., Katz, D., & Marchaim, D. (2016). The Continuing Plague of Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 347–375. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2016.02.003>
- Agyeman, W., Bisht, A., Gopinath, A., Cheema, A. H., Chaludiya, K., Khalid, M., Nwosu, M., Konka, S., & Khan, S. (2022). A Systematic Review of Antibiotic Resistance Trends and Treatment Options for Hospital-Acquired Multidrug-Resistant Infections. *Cureus*, 14(10). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.29956>
- Ahmad, N., Joji, R. M., & Shahid, M. (2023). Evolution and implementation of One Health to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1952. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.1065796/BIBTEX>
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbali, S., & Uversky, V. (2022). Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS23031445>
- Albán, M. V., Núñez, E. J., Zurita, J., Villacís, J. E., Tamayo, R., Sevillano, G., Villavicencio, F. X., & Calero-Cáceres, W. (2020). Canines with different pathologies as carriers of diverse lineages of *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and clinically relevant β -lactamases in central Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 182–183. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2020.05.017>
- Amaranto, M., Vaccarello, P., Correa, E., Barra, J., & Godino, A. (2021). Novel intein-based self-cleaving affinity tag for recombinant protein production in *Escherichia*

- coli. *Journal of Biotechnology*, 332, 126–134.
<https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2021.04.003>
- Andersson, D., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7), 465–478.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>
- Aranko, A. S., Iwai, H., D'andrea, L. D., & De Rosa, L. (2021). The inducible intein-mediated self-cleaving tag (IIST) system: a novel purification and amidation system for peptides and proteins. *Molecules* 2021, 26.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26195948>
- Aranko, S., & LastNameIwai, H. (2021). The Inducible Intein-Mediated Self-Cleaving Tag (IIST) System: A Novel Purification and Amidation System for Peptides and Proteins. *Molecules*, 26(19). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26195948>
- Aslam, M. Z., Firdos, S., Li, Z., Wang, X., Liu, Y., Qin, X., Yang, S., Ma, Y., Xia, X., Zhang, B., & Dong, Q. (2022). Detecting the Mechanism of Action of Antimicrobial Peptides by Using Microscopic Detection Techniques. *Foods* 2022, Vol. 11, Page 2809, 11(18), 2809.
<https://doi.org/10.3390/FOODS11182809>
- Asri, N. A., Ahmad, S., Mohamud, R., Hanafi, N. M., Zaidi, N. F., Irekeola, A. A., Shueb, R. H., Yee, L. C., Noor, N. M., Mustafa, F. H., Yean, C. Y., & Yusof, N. Y. (2021). Global Prevalence of Nosocomial Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics*, 10(12).
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10121508>
- Banki, M., & Wood, D. (2005). Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-32>
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., & Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(2), 70–76.
- Bednarska, N. G., Wren, B. W., & Willcocks, S. J. (2017). The importance of the glycosylation of antimicrobial peptides: natural and synthetic approaches. *Drug*

Discovery Today, 22(6), 919–926.
<https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2017.02.001>

Boparai, J., & Sharma, P. (2020). Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications. *Protein and Peptide Letters*, 27(1), 4.
<https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>

Bornhorst, J., & Falke, J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245–254. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8)

Carvajal-Vallejos, P., Pallissé, R., Mootz, H. D., & Schmidt, S. R. (2012). Unprecedented rates and efficiencies revealed for new natural split inteins from metagenomic sources. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(34).
<https://doi.org/10.1074/JBC.M112.372680>

Chandrudu, S., Simerska, P., & Toth, I. (2013). Chemical Methods for Peptide and Protein Production. *Molecules*, 18(4), 4373.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES18044373>

Cheng, C., & Hua, Z. C. (2020). Lasso Peptides: Heterologous Production and Potential Medical Application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.571165/FULL>

Ching, C., Yang, B., Onwubueke, C., Lazinski, D., Camilli, A., & Godoy, V. (2019). Lon protease has multifaceted biological functions in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 201(2). https://doi.org/10.1128/JB.00536-18/SUPPL_FILE/JB.00536-18-S0001.PDF

Choudhuri, S. (2014). Fundamentals of Molecular Evolution. *Bioinformatics for Beginners*, 27–53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410471-6.00002-5>

Cole, J. N., & Nizet, V. (2016). Bacterial evasion of host antimicrobial peptide defenses. *Microbiology Spectrum*, 4(1).
<https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0006-2015>

Conibear, A., Watson, E., Payne, R., & Becker, C. (2018). Native chemical ligation in protein synthesis and semi-synthesis. *Chemical Society Reviews*, 47(24), 9046–

9068. <https://doi.org/10.1039/C8CS00573G>

- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: The novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00063/BIBTEX>
- Deng, T., Ge, H., He, H., Liu, Y., Zhai, C., Feng, L., & Yi, L. (2017). The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems. *Protein Expression and Purification*, 140, 52–59. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2017.08.003>
- Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., & Kisich, K. (2009). The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Current Pharmaceutical Design*, 15(21), 2377. <https://doi.org/10.2174/138161209788682325>
- Du, M., Hou, Z., Liu, L., Xuan, Y., Chen, X., Fan, L., Li, Z., & Xu, B. (2022). Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.1028691>
- Egelkrou, E., Rajan, V., & Howard, J. (2012). Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Science*, 184, 83–101. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2011.12.005>
- Elleuche, S., & Pöggeler, S. (2010). Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 479–489. <https://doi.org/10.1007/S00253-010-2628-X/FIGURES/2>
- Emamalipour, M., Seidi, K., Zununi Vahed, S., Jahanban-Esfahlan, A., Jaymand, M., Majdi, H., Amoozgar, Z., Chitkushev, L., Javaheri, T., Jahanban-Esfahlan, R., & Zare, P. (2020). Horizontal gene transfer: from evolutionary flexibility to disease progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 229. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00229/BIBTEX>
- Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C., & Franco, O. L. (2017). Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in Chemistry*, 5(Feb). <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2017.00005>

- Fenner, A. (2020). Antimicrobial peptide derived from moths can eradicate UPEC biofilms and could offer a novel therapeutic option. *Nature Reviews*, *17*(4), 191. <https://doi.org/10.1038/S41585-020-0309-9>
- Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E., & Schneider, G. (2011). Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery* *2012 11:1*, *11*(1), 37–51. <https://doi.org/10.1038/nrd3591>
- Francis, D., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*, *61*(1), 5241. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PS0524S61>
- Gadwala, M., Vootla, S., & Tewary, P. (2021). Immune mechanism in silkworm *Bombyx mori* L. *Methods in Microbiology*, *49*, 115–141. <https://doi.org/10.1016/BS.MIM.2021.04.006>
- Gagnon, M. C., Strandberg, E., Grau-Campistany, A., Wadhvani, P., Reichert, J., Bürck, J., Rabanal, F., Auger, M., Paquin, J. F., & Ulrich, A. S. (2017). Influence of the Length and Charge on the Activity of α -Helical Amphipathic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry*, *56*(11), 1680–1695. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.6B01071>
- Godreuil, S., Leban, N., Padilla, A., Hamel, R., Luplertlop, N., Chauffour, A., Vittecoq, M., Hoh, F., Thomas, F., Sougakoff, W., Lionne, C., Yssel, H., & Missé, D. (2014a). Aedesin: structure and antimicrobial activity against multidrug resistant bacterial strains. *PLoS One*, *9*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0105441>
- Godreuil, S., Leban, N., Padilla, A., Hamel, R., Luplertlop, N., Chauffour, A., Vittecoq, M., Hoh, F., Thomas, F., Sougakoff, W., Lionne, C., Yssel, H., & Missé, D. (2014b). Aedesin: Structure and Antimicrobial Activity against Multidrug Resistant Bacterial Strains. *PLoS ONE*, *9*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0105441>
- Gómez, B., Pazmiño, J., Quinde, G., LastNameLastNameViejó, J., Amaguaña, M., Neira, É., Rodríguez, F., Montaña, L., & Pazmiño, K. (2022). Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Patient with SARS-Cov-2 Pneumonia in an

- Intensive Care Unit in Guayaquil, Ecuador: A Case Report. *The American Journal of Case Reports*, 23, e936498-1. <https://doi.org/10.12659/AJCR.936498>
- Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H. W., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., ... Gunsalus, K. C. (2008). Protein production and purification. *Nature Methods*, 5(2), 135. <https://doi.org/10.1038/NMETH.F.202>
- Habboush, Y., & Guzman, N. (2022). Antibiotic Resistance. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
- Hani, K., Zairi, A., Tangy, F., & Bouassida, K. (2009). Dermaseptins and Magainins: Antimicrobial Peptides from Frogs' Skin—New Sources for a Promising Spermicides Microbicides—A Mini Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/452567>
- Haque, M., Rahman, N., Zulkifli, Z., & Ismail, S. (2016). Antibiotic prescribing and resistance: knowledge level of medical students of clinical years of University Sultan Zainal Abidin, Malaysia. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 12, 413. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S102013>
- Hoelscher, M., Forner, J., Calderone, S., Krämer, C., Taylor, Z., Loiacono, F. V., Agrawal, S., Karcher, D., Moratti, F., Kroop, X., & Bock, R. (2022). Expression strategies for the efficient synthesis of antimicrobial peptides in plastids. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33516-1>
- Hu, Y., Feng, L., Li, Y., Zhang, Y., Lu, P., Rayner, S., & Chen, S. (2012). Ribosomal Binding Site Switching: An Effective Strategy for High-Throughput Cloning Constructions. *PLoS ONE*, 7(11), 50142. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0050142>
- Iwai, H., Züger, S., Jin, J., & Tam, P.-H. (2006). Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from *Nostoc punctiforme*. *FEBS Letters*, 580(7), 1853–1858. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.02.045>
- Jabbarin, H., Nawajah, I., & Hejaz, H. (2023). Knowledge, Attitude, Awareness, and

Perceptions among Physicians toward Antibiotic Resistance in Hospitals in South Palestine. *Avicenna Journal of Medicine*, 13(1), 49. <https://doi.org/10.1055/S-0043-1764374>

Kakoullis, L., Papachristodoulou, E., Chra, P., & Panos, G. (2021). Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. *Antibiotics*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10040415>

Kang, X., Dong, F., Shi, C., Liu, S., Sun, J., Chen, J., Li, H., Xu, H., Lao, X., & Zheng, H. (2019). DRAMP 2.0, an updated data repository of antimicrobial peptides. *Scientific Data*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/S41597-019-0154-Y>

Kent, S. (2019). Novel protein science enabled by total chemical synthesis. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 28(2), 313. <https://doi.org/10.1002/PRO.3533>

Kessler, A., & Raja, A. (2022). Biochemistry, histidine. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538201/>

Kim, I. S., Lee, S. H., Kwon, Y. M., Adhikari, B., Kim, J. A., Yu, D. Y., Kim, G. Il, Lim, J. M., Kim, S. H., Lee, S. S., Moon, Y. S., Choi, I. S., & Cho, K. K. (2019). Effects of C-Terminal Residues of 12-Mer Peptides on Antibacterial Efficacy and Mechanism. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 29(11), 1707–1716. <https://doi.org/10.4014/JMB.1907.07061>

Kim, J., Jacob, B., Jang, M., Kwak, C., Lee, Y., Son, K., Lee, S., Jung, I. D., Jeong, M. S., Kwon, S. H., & Kim, Y. (2019). Development of a novel short 12-meric papiliocin-derived peptide that is effective against Gram-negative sepsis. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-40577-8>

Kose, A., & Colak, C. (2021). Knowledge and Awareness of Physicians About Rational Antibiotic Use and Antimicrobial Resistance Before and After Graduation: A Cross-Sectional Study Conducted in Malatya Province in Turkey. *Infection and Drug Resistance*, 14, 2557. <https://doi.org/10.2147/IDR.S317665>

Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and

Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1).
<https://doi.org/10.3390/BIOM8010004>

Lacroix, B., & Citovsky, V. (2020). Biolistic Approach for Transient Gene Expression Studies in Plants. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2124, 125.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_6

Lee, J. M., Lee, J., Kim, T., & Lee, S. K. (2013). Switchable gene expression in *Escherichia coli* using a miniaturized photobioreactor. *PLoS ONE*, 8(1).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0052382>

Lemaire, M., Ménard, O., Cahu, A., Nogret, I., Briard-Bion, V., Cudennec, B., Cuinet, I., Le Ruyet, P., Baudry, C., Dupont, D., Blat, S., Deglaire, A., & Le Huërou-Luron, I. (2021). Addition of Dairy Lipids and Probiotic *Lactobacillus fermentum* in Infant Formulas Modulates Proteolysis and Lipolysis With Moderate Consequences on Gut Physiology and Metabolism in Yucatan Piglets. *Frontiers in Nutrition*, 8, 615248. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.615248/FULL>

Li, X., Zuo, S., Wang, B., Zhang, K., & Wang, Y. (2022). Antimicrobial mechanisms and clinical application prospects of antimicrobial peptides. *Molecules*, 27(9).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES27092675>

Li, Z., Huang, X., Tang, Q., Ma, M., Jin, Y., & Sheng, L. (2022). Functional properties and extraction techniques of chicken egg white proteins. *Foods*, 11(16).
<https://doi.org/10.3390/FOODS11162434>

Liao, S. M., Du, Q. S., Meng, J. Z., Pang, Z. W., & Huang, R. B. (2013). The multiple roles of histidine in protein interactions. *Chemistry Central Journal*, 7.
<https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-44>

Lorenzón, E. N., Nobre, T. M., Caseli, L., Cilli, E. M., da Hora, G. C., Soares, T. A., & Oliveira, O. N. (2018). The “pre-assembled state” of magainin 2 lysine-linked dimer determines its enhanced antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 167, 432–440. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.04.034>

Mohammed, I., Said, D. G., & Dua, H. S. (2017). Human antimicrobial peptides in ocular surface defense. *Progress in Retinal and Eye Research*, 61, 1–22.
<https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2017.03.004>

- Omotajo, D., Tate, T., Cho, H., & Choudhary, M. (2015). Distribution and diversity of ribosome binding sites in prokaryotic genomes. *BMC Genomics*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1808-6>
- Orazi, G., & O'Toole, G. A. (2020). "It takes a village": Mechanisms underlying antimicrobial recalcitrance of polymicrobial biofilms. *Journal of Bacteriology*, *202*(1). <https://doi.org/10.1128/JB.00530-19/ASSET/0F8376E5-D9B2-44B7-A59C-4C9BA89F1F73/ASSETS/GRAPHIC/JB.00530-19-F0002.JPEG>
- Panavas, T., Sanders, C., & Butt, T. (2009). SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Methods in Molecular Biology*, *497*, 303–317. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-566-4_20/COVER
- Passalacqua, L., Dingilian, A., & Lupták, A. (2020). Single-pass transcription by T7 RNA polymerase. *RNA*, *26*(12), 2062–2071. <https://doi.org/10.1261/RNA.076778.120/-/DC1>
- Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology*, *32*(2), 143–171. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>
- Pavankumar, T. (2018). Inteins: Localized Distribution, Gene Regulation, and Protein Engineering for Biological Applications. *Microorganisms* *2018*, *6*(1). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS6010019>
- Piras, A. M., Maisetta, G., Sandreschi, S., Gazzarri, M., Bartoli, C., Grassi, L., Esin, S., Chiellini, F., & Batoni, G. (2015). Chitosan nanoparticles loaded with the antimicrobial peptide temporin B exert a long-term antibacterial activity in vitro against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in Microbiology*, *6*(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00372>
- Prabhala, S., Gierach, I., & Wood, D. (2022). The evolution of intein-based affinity methods as reflected in 30 years of patent history. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2022.857566>
- Raheem, N., & Straus, S. K. (2019). Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions. *Frontiers in Microbiology*, *10*.

<https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02866>

- Ramirez, M., Valdes, N., Guan, D., & Chen, Z. (2013). Engineering split intein DnaE from *Nostoc punctiforme* for rapid protein purification. *Protein Engineering Design and Selection*, 26(3), 215–223. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/GZS097>
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 62(3), 597. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998>
- Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2020). Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nature Communications*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17278-2>
- Reinhardt, A., & Neundorff, I. (2016). Design and application of antimicrobial peptide conjugates. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/IJMS17050701>
- Rom Park, A., Woong Kim, S., Young Kim, S., & Kwon, K.-C. (2021). *Expression of Antimicrobial Peptide (AMP), Cecropin B, in a Fused Form to SUMO Tag With or Without Three-Glycine Linker in Escherichia coli and Evaluation of Bacteriolytic Activity of the Purified AMP*. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09797-1>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00172>
- Sarmiento, C., & Camarero, J. A. (2019). Biotechnological applications of protein splicing. *HHS Public Access*. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190208110416>
- Shanmugaraj, B., Bulaon, C. J., Malla, A., & Phoolcharoen, W. (2021). Biotechnological Insights on the Expression and Production of Antimicrobial Peptides in Plants. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4032, 26(13), 4032.

<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26134032>

- Shanmugaraj, B., Malla, A., & Phoolcharoen, W. (2020). Emergence of Novel Coronavirus 2019-nCoV: Need for Rapid Vaccine and Biologics Development. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(2). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9020148>
- Shemella, P., Pereira, B., Zhang, Y., Van Roey, P., Belfort, G., Garde, S., & Nayak, S. (2007). Mechanism for intein c-terminal cleavage: a proposal from quantum mechanical calculations. *Biophysical Journal*, 92(3), 847–853. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.092049>
- Shis, D. L., & Bennett, M. R. (2014). Synthetic biology: the many facets of T7 RNA polymerase. *Molecular Systems Biology*, 10(7), 745. <https://doi.org/10.15252/MSB.20145492>
- Shurko, J. F., Galega, R. S., Li, C., & Lee, G. C. (2018). Evaluation of LL-37 antimicrobial peptide derivatives alone and in combination with vancomycin against *S. aureus*. *The Journal of Antibiotics*, 71(11), 971–974. <https://doi.org/10.1038/S41429-018-0090-7>
- Sima, S., Shafiee, F., & Jahanian-Najafabadi, A. (2020). Expression and one step intein-mediated purification of biologically active human G-CSF in *Escherichia coli*. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 2861–2869. <https://doi.org/10.1007/S11033-020-05404-8>
- Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., & Li, Q. (2009). Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 18(5), 936. <https://doi.org/10.1002/PRO.102>
- Sultana, A., Luo, H., & Ramakrishna, S. (2021). Antimicrobial peptides and their applications in biomedical sector. *Antibiotics*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10091094>
- Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y., & Knapp, C. (2019). Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 10(AUG), 1933. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01933/BIBTEX>

- Tahara, N., Tachibana, I., Takeo, K., Yamashita, S., Shimada, A., Hashimoto, M., Ohno, S., Yokogawa, T., Nakagawa, T., Suzuki, F., & Ebihara, A. (2020). Boosting auto-induction of recombinant proteins in *Escherichia coli* with glucose and lactose additives . *Protein and Peptide Letters*, 28(10), 1180. <https://doi.org/10.2174/0929866528666210805120715>
- Terreni, M., Taccani, M., & Pregnolato, M. (2021). New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: latest research developments and future perspectives. *Molecules*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26092671>
- Thriemer, K., Katuala, Y., Batoko, B., Alworonga, J. P., Devlieger, H., Van Geet, C., Ngbonda, D., & Jacobs, J. (2013). Antibiotic Prescribing in DR Congo: A Knowledge, Attitude and Practice Survey among Medical Doctors and Students. *PLoS ONE*, 8(2), 55495. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0055495>
- Topilina, N. I., & Mills, K. V. (2014). Recent advances in in vivo applications of intein-mediated protein splicing. *Mobile DNA*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-5-5/FIGURES/6>
- Tuttle, A. R., Trahan, N. D., & Son, M. S. (2021). Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains. *Current Protocols*, 1(1), e20. <https://doi.org/10.1002/CPZ1.20>
- UniProt. (2023). *CECD - AAEL000598-PA - Aedes aegypti (Yellowfever mosquito) | UniProtKB* | *UniProt*. https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q17NR1/entry#subcellular_location
- Volkman, G., Sun, W., & Liu, X. Q. (2009). Controllable protein cleavages through intein fragment complementation. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 18(11). <https://doi.org/10.1002/PRO.249>
- Voos, W., & Pollecker, K. (2020). The mitochondrial Lon protease: novel functions off the beaten track? *Biomolecules* , 10(2), 253. <https://doi.org/10.3390/BIOM10020253>
- Wu, C. L., Chih, Y. H., Hsieh, H. Y., Peng, K. L., Lee, Y. Z., Yip, B. S., Sue, S. C., & Cheng, J. W. (2022). High Level Expression and Purification of Cecropin-like Antimicrobial Peptides in *Escherichia coli*. *Biomedicines*, 10(6).

<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10061351>

- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55. <https://doi.org/10.1124/PR.55.1.2>
- Zhang, L., Li, X., Zhan, N., Sun, T., Li, J., & Shan, A. (2020). Maltose Induced Expression of Cecropin AD by SUMO Technology in *Bacillus subtilis* WB800N. *The Protein Journal*, 39(4), 383–391. <https://doi.org/10.1007/S10930-020-09908-X/TABLES/3>
- Zhang, Q. Y., Yan, Z. Bin, Meng, Y. M., Hong, X. Y., Shao, G., Ma, J. J., Cheng, X. R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C. Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8(1), 48. <https://doi.org/10.1186/S40779-021-00343-2>
- Zhao, M., Qu, Y., Liu, J., Mai, S., & Gu, L. (2020). A universal adhesive incorporating antimicrobial peptide nisin: effects on *Streptococcus mutans* and saliva-derived multispecies biofilms. *Odontology*, 108(3), 376–385. <https://doi.org/10.1007/S10266-019-00478-8/METRICS>
- Ziemienowicz, A. (2014). Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 95–102. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2013.10.004>