



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR
Licenciatura en Ciencias: Área terminal en Bioquímica y Biología Molecular

Estabilidad y biodistribución del péptido antimicrobiano HBD3M en ratón

TESIS

QUE PRESENTA:

ODALIS SABINE OZUNA GAMA

Para obtener el Título de

LICENCIADA EN CIENCIAS

Director de tesis

M.C. Marco Antonio Ibarra Valencia

Instituto de Biotecnología de la UNAM

Comité Tutorial:

Dra. María Angélica Santana Calderón (Presidente)

Dr. José Raúl Arredondo Peter (Secretario)

M.C. Marco Antonio Ibarra Valencia (Vocal)

Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete (Suplente)

Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo (Suplente)

Agradecimientos

Principalmente a mi familia, a mi abuelita (aunque ya no esté físicamente), por enseñarme a siempre luchar por lo que quiero. A mis hermanos Pablo y Francisco, mi cuñada Yesenia, y mis pequeños sobrinos, que me enseñan constantemente a no dejar de asombrarme. Sobre todo, a Minerva, mi madre, por su apoyo infinito y por ser un ejemplo a seguir en todos los aspectos para mí.

A Marco Ibarra por ser más que un tutor, un amigo, por su paciencia, innumerables consejos y todas sus enseñanzas.

Al Dr. Gerardo Corzo por brindarme la oportunidad de ser parte del laboratorio y siempre incluirme.

Al Dr. Ivan Arenas, la Dra. Herlinda Clement y a todos mis compañeros de laboratorio, por su ayuda constante, sus consejos, palabras de aliento y las risas compartidas.

A la Dra. Verónica Rojo León y al Dr. Christopher Wood del Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada del IBT, por su paciencia y su asesoramiento.

A la Dra. Elizabeth Mata y al técnico Sergio González del bioterio por ser tan atentos y siempre mostrar disponibilidad ante mis dudas.

A mis amigos de licenciatura por todos los buenos momentos dentro y fuera del ámbito educativo.

Esta investigación fue realizada en el laboratorio del Dr. Gerardo Corzo gracias al financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), número IT200321, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al proyecto de investigación denominado "Venenos y antivenenos", número 303045.

Contenido

Abreviaturas.....	i
Índice de Figuras.....	ii
Índice de Tablas.....	iii
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. Péptidos antimicrobianos.....	2
1.2. Modelos de acción de los péptidos antimicrobianos.....	3
1.3. Péptidos de defensa del huésped.....	5
1.4. Defensinas.....	6
1.4.1. HBD3.....	7
1.5. Uso <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de los péptidos de defensa.....	7
1.6. Estudio de estabilidad de los péptidos de defensa.....	8
1.7 Biodistribución.....	9
2. Antecedentes.....	10
2.1. HBD3M.....	10
3. Justificación.....	13
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivo general.....	13
6. Objetivos particulares.....	13
7. Esquema de trabajo.....	14
8. Metodología.....	15
8.1. Animales.....	15
8.2. Cepas bacterianas.....	15
8.3. Transformación, expresión y purificación de la β -defensina recombinante.....	15
8.3.1. Cuantificación del péptido.....	16
8.4. Recolección de muestras fisiológicas.....	16
8.4.1. Obtención de orina de ratones CD1.....	16

8.4.2 Obtención de plasma de ratones CD1	16
8.5. Incubación en orina y plasma	17
8.5.1. Antibiograma	17
8.6. Marcaje de HBD3M con Alexa Flúor.....	17
8.6.1. Determinación de la concentración de péptido-fluoróforo	18
8.7. Pruebas de biodistribución	18
8.7.1. Visualización <i>in vivo</i>	18
8.7.2. Determinación de vías de excreción.....	19
8.7.3. Visualización <i>ex vivo</i>	19
8.7.4. Procesamiento de imágenes y cuantificación de fluorescencia	19
8.8. Análisis estadístico	19
9. Resultados.....	20
9.1. Transformación, expresión y purificación de HBD3M recombinante	20
9.2. HBD3M permanece en la orina después de 24 h.....	22
9.3 HBD3M permanece en el plasma después de 24 h.....	25
9.4. HBD3M tiene actividad contra <i>P. aeruginosa</i>	27
9.5 Marcaje de HBD3M con Alexa Flúor 750.....	28
9.6 HBD3M es estable a nivel sistémico durante 4 h.....	31
9.7. HBD3M se almacena principalmente en el hígado y los riñones.....	34
9.8 HBD3M es eliminado vía urinaria.....	36
10. Discusión	37
11. Conclusiones	42
12. Perspectivas	43
Bibliografía.....	44
Anexos.....	49

Abreviaturas

A: Absorbancia

ACN: Acetonitrilo

AMP: Péptido antimicrobiano

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GnCl: Cloruro de guanidino

HBD: β -defensina humana

HDP: Péptidos de defensa del huésped

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

IC₅₀: Concentración inhibidora media máxima

IMAC-NiNTA: Cromatografía de afinidad a metal inmovilizado – Níquel agarosa

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

MDR: Agentes resistentes a múltiples fármacos

MH: Mueller-Hinton

MIC: Concentración mínima inhibitoria

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NIR: Infrarrojo cercano

nm: Nanómetros

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: Tampón fosfato salino

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

ROI: Región de interés

SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SH: Grupos sulfhidrilo

TFA: Ácido trifluoroacético

TLRs: Receptores tipo Toll

UFC: Unidades formadoras de colonias

Índice de Figuras

Fig. 1. Estructuras representativas de las seis clases principales de AMP.....	3
Fig. 2. Modelos de interacción de los AMP con membranas	5
Fig. 3. Alineamiento de β defensinas con los puentes disulfuro característicos	6
Fig. 4. Farmacocinética de las diferentes vías de administración	10
Fig. 5. Estructura terciaria de HBD3M.....	11
Fig. 6. SDS-PAGE al 15% de proteínas de células M15 transformadas	21
Fig. 7. SDS-PAGE al 15% de las fracciones recuperadas de la purificación por afinidad a níquel.....	21
Fig. 8. Perfil cromatográfico de HBD3M	21
Fig. 9. SDS-PAGE al 15% de la purificación por HPLC de HBD3M	22
Fig. 10. Cromatogramas control de HBD3M y orina	23
Fig. 11. Cromatogramas del péptido incubado en orina	24
Fig. 12. HBD3M permanece en la orina después de 24 h.....	24
Fig. 13. Cromatogramas control de HBD3M y plasma	25
Fig. 14. Cromatogramas del péptido incubado en el plasma	26
Fig. 15. HBD3M permanece en el plasma después de 24 h.....	27
Fig. 16. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en medio solido MH	28
Fig. 17. Marcaje de HBD3M con Alexa Flúor 750	29
Fig. 18. Gel SDS-PAGE al 15% de las fracciones marcadas que se recuperaron de la purificación por HPLC del marcaje.....	30
Fig. 19. Biodistribución de AF750 en ratones.....	31
Fig. 20. Biodistribución de HBD3M marcada con AF750 en ratones.....	32
Fig. 22. Principales regiones en las que se concentra HBD3M.....	34
Fig. 23. Visualización <i>ex vivo</i> en órganos de ratones CD1	35
Fig. 24. Evaluación de fluorescencia <i>ex vivo</i> en órganos.....	35
Fig. 25. Excreción de HBD3M+AF750 por vía urinaria	36
Fig. 26. Excreción de HBD3M en la orina de ratones CD1	36

Índice de Tablas

Tabla 1. Factores que influyen en la actividad antimicrobiana de los AMP.....	8
Tabla 2. Resumen de la MIC reportada para HBD3M.....	11
Tabla 3. Datos de absorbancia de las purificaciones de HBD3M +Alexa Flúor 750.....	30

Resumen

El problema de salud pública relacionado con el creciente número de bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR) ha llevado al desarrollo de nuevas terapias, entre las que se encuentran los péptidos antimicrobianos (AMP) naturales o sintéticos. Los AMP de origen humano resultan de particular interés por sus características antimicrobianas e inmunomoduladoras. Entre estos péptidos se encuentran las β -defensinas humanas (HBD). En nuestro laboratorio se desarrolló la variación recombinante de la β -defensina humana 3, denominada HBD3M, la cual cuenta con la inserción de una cola de histidinas y una metionina al inicio de su secuencia para facilitar su purificación. Se ha determinado que HBD3M actúa sobre la membrana bacteriana y en el citosol de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 y aislados clínicos de la misma bacteria provenientes de úlceras de pie diabético. De igual forma, presenta sinergia con diferentes antibióticos, muestra baja toxicidad contra células eucariotas, baja susceptibilidad de generar resistencia y no es hemolítica. Sin embargo, entre las principales limitaciones de su uso terapéutico se encuentran su baja estabilidad en fluidos biológicos, además de su rápido aclaramiento a nivel sistémico. En este trabajo se analizó la estabilidad y biodistribución de HBD3M en fluidos y en modelos murinos, respectivamente, para determinar la viabilidad de su uso a nivel *in vivo*. Los ensayos *in vitro* sugieren que HBD3M es estable por 24 horas en el plasma y la orina, además de que su incubación en el plasma retiene su actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa*. Los ensayos de biodistribución *in vivo* mostraron que HBD3M se distribuye a nivel sistémico por 4 horas y que se acumula en: el hígado, el riñón, la vejiga y los testículos. Finalmente, los ensayos *ex vivo* mostraron que las principales regiones de acumulación peptídica son el hígado y el riñón, además de que la principal vía de excreción es la urinaria. Con los datos obtenidos se propone que HBD3M es un antimicrobiano de vida corta cuando es administrado vía intravenosa y se espera contribuir al análisis de péptidos antimicrobianos dentro de organismos vivos, para así proponer mejores estrategias terapéuticas.

1. Introducción

1.1. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos, o AMP, por sus siglas en inglés, están presentes en todas las formas de vida en la Tierra. Han evolucionado a la par de su hospedero, porque le brindan protección ante una diversa gama de microorganismos patógenos como bacterias Gram positivas, Gram negativas, protozoos, hongos y virus (Corzo *et al.*, 2001; Lazzaro *et al.*, 2020; Seyfi *et al.*, 2020). El incremento del interés en su estudio y desarrollo se da ante la aparición de bacterias multirresistentes a antibióticos (MDR, por sus siglas en inglés), que representan un problema de salud global crítico. De hecho, en 2018 se reportaron 4, 849 AMP nuevos, de los que 4, 256 son de origen natural y 593 son sintéticos. Además de que, en 2019 ya se contaba con 34 péptidos en etapa preclínica y 27 en ensayos clínicos (Koo *et al.*, 2019).

Los AMP son péptidos pequeños, de 5 a 50 residuos de aminoácidos, con masa molecular de 2 a 9 kDa. Generalmente son catiónicos, anfipáticos y ricos en lisina, histidina y arginina, aunque también se han reportado AMP aniónicos en plantas (da Cunha *et al.*, 2017; Lei *et al.*, 2019; Patelet *et al.*, 2017; Pen *et al.*, 2020). Se sintetizan de 3 maneras distintas: 1) ribosómica o traduccional; 2) ensamblados por péptidos sintasas no ribosomales (NRPS) y 3) los denominados péptidos crípticos sintetizados por la escisión proteolítica de proteínas más grandes con funciones diversas (De Cesare *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2017). Se pueden clasificar de acuerdo a su estructura secundaria, la cual puede ser: α -helicoidal, el grupo más grande que representa más del 40% de todos los AMP; bucle extendido con estructura secundaria indefinida; bucles- β ; cíclicos estabilizados con enlaces cisteína-cisteína; láminas- β con estructura anfipática rígida, debido a sus enlaces disulfuro y mixtos, los cuales combinan láminas- β con α -hélices (**Fig. 1**) (Baxter *et al.*, 2017; Koo *et al.*, 2019; Mookherjee *et al.*, 2020; Seyfi *et al.*, 2020; Yasir *et al.*, 2018).

Gracias a sus características fisicoquímicas y anfipáticas son solubles en ambientes lipídicos y acuosos (Lazzaro *et al.*, 2020). Además de que su carga positiva les permite unirse a membranas bacterianas en conformación α -helicoidal y/o láminas- β , para después sufrir cambios conformacionales tras alcanzar un umbral de concentración sobre dichas membranas (Kumar *et al.*, 2018).

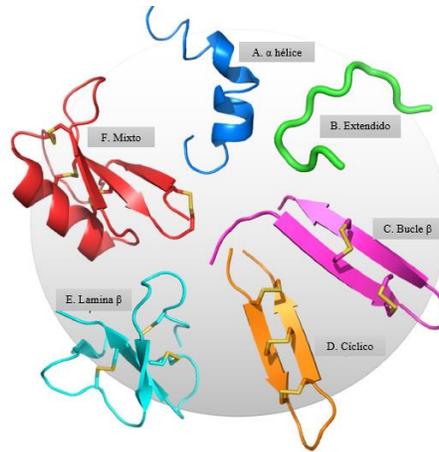


Fig. 1. Estructuras representativas de las seis clases principales de AMP. Modificado de Baxter *et al.* (2017).

La interacción inicial con las bacterias Gram negativas se da por la presencia de fosfatos aniónicos en los lipopolisacáridos (LPS) de la bicapa lipídica bacteriana o en la pared celular de peptidoglicano y también por los fosfolípidos de la membrana citoplasmática. Mientras que, en las bacterias Gram positivas la interacción se da a través de la capa de peptidoglicano (da Cunha *et al.*, 2017; de la Fuente *et al.*, 2017). Si bien, la asociación de los AMP con los fosfolípidos de membrana es crucial, esta no debe ser extremadamente fuerte, ya que el péptido no se translocaría al interior de la membrana (Kumar *et al.*, 2018). Es por esto que dichas uniones casi no ocurren con membranas de células eucariotas, ya que estas contienen fosfolípidos de carga neutra como: fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y colesterol (Lei *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2017).

1.2. Modelos de acción de los péptidos antimicrobianos

Los AMP presentan dos vías de acción, la disruptiva y la no disruptiva (da Cunha *et al.*, 2017; Lei *et al.*, 2019). La primera incluye al modelo de barril, en el que los péptidos se agregan de manera paralela a la membrana para luego insertarse perpendicularmente sobre ella, las regiones hidrófobas del péptido interactúan con los grupos acilo de las cadenas de fosfolípidos en el interior de ésta, dicha estructura induce la agregación de más péptidos y por ende la expansión del poro, la alameticina es un claro ejemplo de este mecanismo (Bahar *et al.*, 2013; Bastos *et al.*, 2018; Magana *et al.*, 2020). En el modelo de carpeta los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa, cuando su concentración aumenta forman micelas que colapsan a la membrana, ejemplos de este mecanismo de acción son la cecropina y la aureina (Bahar *et al.*, 2013; Brogden, 2005; Magana *et al.*, 2020). En el modelo de poro toroidal las cabezas polares de los AMP interactúan con las regiones polares de los lípidos de la membrana, esto ocasiona dobleces que tensan a la

membrana y la rompen, la magainina, protegrina y melitina siguen este mecanismo de acción (Bastos *et al.*, 2018; Brogden, 2005; Lei *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). El modelo de poro toroidal desordenado dobla la membrana de forma aleatoria sin que los péptidos pierdan su posición paralela, con lo que se generan un poro inclinado, la mayoría de los péptidos se localizan en la cara externa del poro y no en el interior, los análogos de magainina y la melitina pueden actuar de esta forma (Magana *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2011). La formación del poro induce la pérdida de moléculas intracelulares como iones, material genético, metabolitos o bloquean la respiración celular acoplada a la membrana, llevando así a la muerte celular (Bastos *et al.*, 2018; Lei *et al.*, 2019).

Existen también los modelos no disruptivos, tales como el de intermediario-no-bicapa, que desplaza proteínas de la membrana periférica esenciales para los procesos metabólicos y de biosíntesis bacteriana, esto ocurre con la Gramicidina S (Magana *et al.*, 2020; Wenzel *et al.*, 2014). Otro tipo de modelo es el de adelgazamiento o engrosamiento de la membrana, en el que el grosor de la membrana se modifica por la presencia de AMP sin que el péptido se transloque al interior ni abra poros, la catelicidina LL-37 es un ejemplo de este mecanismo de acción (Magana *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2011; Sochacki *et al.*, 2011). Los AMPs también son capaces de reorientar lípidos oxidados membranales, ya que se asocian a membranas que contienen fosfatidilcolina oxidada y modifican su estructura por la unión de los grupos aldehído lipídico y amino peptídico (Epanand *et al.*, 2008; Magana *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2011). Por otro lado, el péptido puede asociarse con pequeños aniones presentes en la bicapa, con lo que promueven su salida y con esto la pérdida de cargas negativas del interior celular. Finalmente, en el modelo de electroporación molecular, la acumulación extracelular de péptido aumenta el potencial de membrana y facilita su traslocación al citoplasma (**Fig. 2**) (Magana *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2011).

También se tiene conocimiento de que ciertos péptidos actúan contra moléculas intracelulares, para así interrumpir la síntesis de ADN, ARN, proteínas, biosíntesis de membrana, así como procesos enzimáticos y metabólicos (Bahar *et al.*, 2013; Hale *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2017; Lei *et al.*, 2019; Mookherjee *et al.*, 2020). Si bien, los mecanismos de acción de los AMP no se han descrito por completo, se sugiere que no son excluyentes entre sí, ya que un péptido puede presentar uno o más mecanismos simultáneos que contribuyan en su efecto antibacteriano (Biswaro *et al.*, 2018; da Cunha *et al.*, 2017).

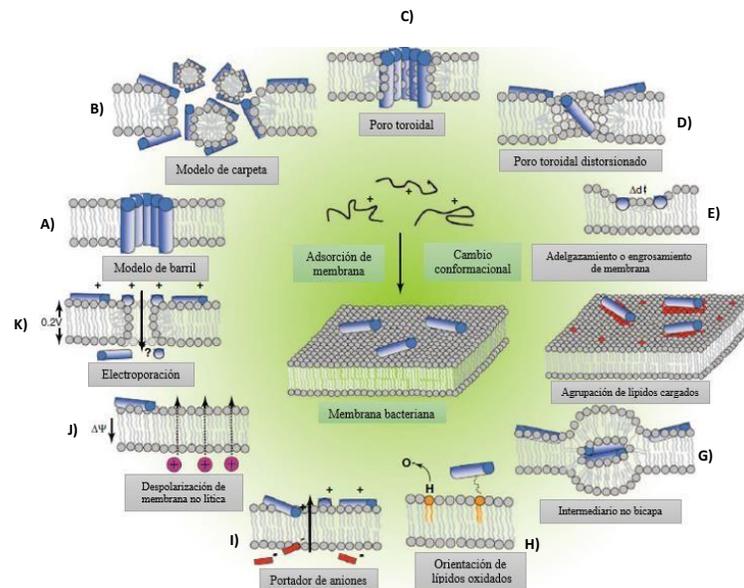


Fig. 2. Modelos de interacción de los AMP con membranas. **A)** Modelo de barril; **B)** Modelo de carpeta; **C)** Modelo de poro toroidal; **D)** Modelo de poro toroidal distorsionado; **E)** Modelo de adelgazamiento/engrosamiento de la membrana; **F)** Modelo de agrupamiento de lípidos cargados; **G)** Modelo intermediario no bicapa; **H)** Modelo de orientación de lípidos oxidados; **I)** Modelo de portador de aniones; **J)** Modelo de despolarización de membrana no lítica y **K)** Modelo de electroporación. Modificado de Nguyen *et al.* (2011).

1.3. Péptidos de defensa del huésped

Los AMP también se conocen como “Péptidos de defensa del huésped” (HDP, por sus siglas en inglés), ya que estimulan la proliferación de fibroblastos, linfocitos, células endoteliales, vasculares, cicatrización, quimiotaxis, liberación de prostaglandinas, activación de trampas extracelulares de neutrófilos y del complemento, además de que modifican la señalización por endotoxinas, modulación de citocinas proinflamatorias e interacción con la microbiota mucosa e intestinal (Lei *et al.*, 2019; Mookherjee *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020). El inicio de estas actividades depende de su sitio de acción, concentración y del ambiente en el que se haya inducido la respuesta inmunológica. La regulación de la expresión de los HDP ocurre principalmente al identificar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los tipo Toll (TLRs) y la activación de NF-kB (Campoverde *et al.*, 2017; Mookherjee *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019).

Se ha delimitado el uso del término “péptido antimicrobiano” cuando se examina la actividad antimicrobiana general y “péptido de defensa del huésped” cuando se hace referencia a la actividad antiinfecciosa modulada por la respuesta inmune (Fjell *et al.*, 2012). En mamíferos se han descrito dos familias principales HDP: las defensinas y las catelicidinas (Pen *et al.*, 2020).

1.4. Defensinas

Son péptidos de defensa catiónicos, no glicosilados, ni acilados en sus cadenas laterales y poco susceptibles a generar resistencia bacteriana (Bastos *et al.*, 2018; Corrales *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Las defensinas incluyen tres familias: α , β y θ que difieren en tamaño y disposición de los enlaces disulfuro de los residuos de cisteína. Estos enlaces proporcionan estabilidad estructural y minimizan su degradación por proteasas (Ahmed *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2018). Se han identificado α defensinas en neutrófilos y en las células de Paneth del intestino delgado, las β defensinas se han identificado en células epiteliales y las θ -defensinas se han identificado como derivados cíclicos de α -defensinas aisladas de leucocitos de macacos Rhesus y babuinos olivos (Hata *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2017).

A nivel teórico, se han identificado 36 miembros de la familia de las β defensinas humanas (HBD) pero sólo se han confirmado experimentalmente seis: HBD1-6 (Fig. 3) (de Paula *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2019). Se expresan de forma constitutiva (HBD1) o inducible (HBD2-4). Actúan contra la membrana microbiana (HBD2, HBD3) o sobre fagolisosomas (HBD1) (Ageitos *et al.*, 2017; Corrales *et al.*, 2010). Las HBD1-3 se han aislado de plasma, boca, pulmones, páncreas, riñón y útero, HBD4 se ha aislado de tiroides, pulmón, riñón, estómago, testículos y útero, mientras que HBD5 y HBD6 se ha aislado solo del epidídimo (Khurshid *et al.*, 2018). El miembro más relevante de esta familia es HBD3, dada su resistencia a sales y amplio espectro de acción (Ageitos *et al.*, 2017).

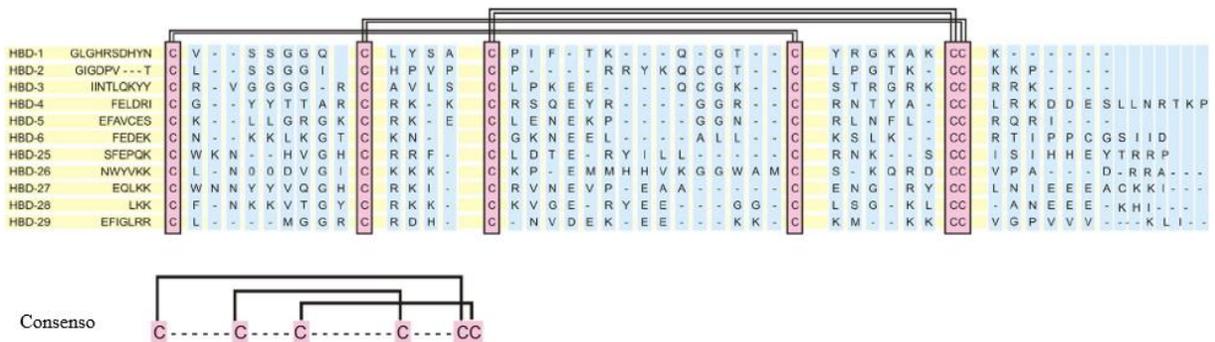


Fig. 3. Alineamiento de β defensinas con los puentes disulfuro característicos. Se muestran las cisteínas en color rosa. Modificado de Khurshid *et al.*, (2018).

1.4.1. HBD3

La β -defensina humana 3, HBD3, es un péptido catiónico de 45 aminoácidos con carga neta de +11 a pH 7. Cuenta con tres láminas- β antiparalelas y un bucle helicoidal corto ubicado en la región N-terminal del péptido. La mayoría de los residuos cargados están ubicados cerca de la región C-terminal. Los puentes disulfuro Cis-Cis son importantes en la estabilización de su estructura terciaria (de Paula *et al.*, 2018; Mücke *et al.*, 2020; Sudheendra *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2003). Ha sido aislada de queratinocitos, epitelio gastrointestinal, aparato respiratorio, lesiones de psoriasis, músculo y corazón. Su síntesis es inducida por el factor de necrosis tumoral- α e interferón- γ (Corrales, 2013). Presenta actividad contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y es esencial en la protección contra patógenos respiratorios (Ageitos *et al.*, 2017; Mücke *et al.*, 2020). Se ha observado que HBD3 interactúa con receptores tipo Toll o de quimiocinas, ya sea para inhibir la quimiotaxis o para promoverla. Además, induce la expresión de coestimuladores en células presentadoras de antígeno, antagoniza la activación de CXCR4 y tiene efecto quimioatrayente de células HEK-193 y monocitos de sangre periférica mediante su interacción con CCR2, lo cual contribuye a su papel inmunológico (López, 2020).

El interés actual en la HBD3 se enfoca en su efecto antibacteriano, sinergia con AMP y antibióticos, baja toxicidad y escasa susceptibilidad de generar resistencia. Lo que la vuelve una alternativa interesante en el desarrollo de fármacos antimicrobianos, pero se requiere de su estudio en sistemas complejos y funcionales (de la Fuente *et al.*, 2017; Lazzaro *et al.*, 2020; Phoenix *et al.*, 2013; Wang, 2015; Yeaman *et al.*, 2003).

1.5. Uso *in vitro* e *in vivo* de los péptidos de defensa

El estudio *in vitro* de los HDP ha tenido un amplio desarrollo a través de los años, principalmente en ambientes controlados y con sistemas para la evaluación de actividades antiproliferativas, citotóxicas, antioxidantes y antimicrobianas (Acevedo *et al.*, 2013). Las ventajas que ofrecen estos sistemas incluyen la manipulación de diferentes parámetros como: temperatura, aireación, pH, luz, tiempo de crecimiento y nutrientes, por lo que permiten estudiar etapas individuales de un proceso y aislar un gran número de muestras. Las pruebas *in vitro* son relativamente fáciles de mantener, rápidas y de bajo costo (Acevedo *et al.*, 2013; Marañón *et al.*,

2016). Además de que son cruciales para obtener información sobre la disponibilidad del sustrato, actividad y velocidad de degradación microbológica, entre otros factores (Acevedo *et al.*, 2013).

Por otro lado, los modelos *in vivo* permiten evaluar en organismos complejos la actividad y el nivel de respuesta hacia los HDP. Los ratones son el modelo más usado en estos bioensayos, dado que cuentan con un sistema inmunológico similar al del humano y pueden infectarse por patógenos similares. Además, son económicos y fáciles de mantener (Bauer *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2011; Mestas *et al.*, 2004). Cabe mencionar que los ratones cuentan con homólogos de HBD2 y HBD3 que presentan actividad antibacteriana y quimiotáctica (Röhrl *et al.*, 2010).

Los ensayos *in vitro* entregan resultados cuantitativos que deben de ser interpretados cuidadosamente, ya que uno de los desafíos principales de éstos es extrapolar dichos resultados a sistemas vivientes, los cuales pueden variar debido a las condiciones fisiológicas y cambios metabólicos no predecibles (**Tabla 1**). A pesar de esto, ambos sistemas se complementan en el desarrollo de nuevos fármacos. Es por ello que en 2005 la Organización Panamericana de la Salud validó la alta correlación entre los ensayos de toxicidad *in vitro* e *in vivo* (Acevedo *et al.*, 2013; Mercer *et al.*, 2020).

Tabla 1. Factores que influyen en la actividad antimicrobiana de los AMP.

<i>In vitro</i>	pH y fuerza iónica, temperatura, tipo/ composición de medio, concentración de nutrientes, tampón bicarbonato (NaHCO ₃), iones metálicos, sal (NaCl), sinergia / antagonismo con otros antimicrobianos, tamaño del inóculo, fase de crecimiento (p. ej., biopelículas persistentes, esporas, variantes de colonias pequeñas y otras variantes fenotípicas), efectos de carga, solubilidad, material de laboratorio, proteólisis, macromoléculas biológicas (p. ej., proteína, ADN), concentración de oxígeno, interacciones mono / polimicrobianas.
<i>In vivo</i>	Modelos animales de infección, farmacocinética, farmacodinámica, interacciones metabólicas, polifarmacia (interacciones fármaco-fármaco), formulación y entrega, infecciones polimicrobianas.
<i>Ex vivo</i>	Matrices biológicas, células mamíferas, patógenos intracelulares, interfaz líquida o sólida, modelos de infección.

1.6. Estudio de estabilidad de los péptidos de defensa

Todos los AMP presentan una conformación nativa en solución o cuando interactúan con otra molécula (Romero *et al.*, 2018). Para comprobar si un péptido es estable o no, de forma *in*

vitro, se realizan ensayos que someten al péptido a condiciones de estrés. La mayoría de los AMP son activos en condiciones no fisiológicas, pero su efecto se reduce al interactuar con fluidos complejos como plasma, suero, saliva, orina y esputo. Por ejemplo, concentraciones altas de NaCl bloquean sus sitios de unión en la membrana bacteriana, de igual forma, proteínas aniónicas como la albúmina o polisacáridos como los glucosaminoglicanos se unen a ellos o a la superficie bacteriana, ocultando así dichos sitios de unión, lo que reduce su biodisponibilidad. Adicionalmente, pueden verse afectados por las proteasas que circulan por el medio (Braff *et al.*, 2005; Maisetta *et al.*, 2008). Es por esto que es importante evaluar su estabilidad en modelos que asemejen las condiciones *in vivo*, por ejemplo, mediante análisis de biodistribución peptídica.

1.7 Biodistribución

Los estudios de biodistribución son esenciales para determinar la localización de los péptidos en diversos modelos, evaluar su presencia en tejidos específicos e identificar las principales vías de excreción (Meibohm, 2019). Dichos estudios pueden abordarse mediante el análisis de fluorescencia de moléculas pequeñas desarrolladas para imágenes de rojo lejano (FR) o infrarrojo cercano (NIR), mismas que se propagan a través del tejido vivo sin interactuar con la autofluorescencia del modelo de estudio (Achilefu, 2004; Vasquez *et al.*, 2011). Es así que la obtención de imágenes no invasivas de animales pequeños puede proporcionar un panorama más amplio que permita estudios en el entorno complejo de un organismo vivo (Zelmer *et al.*, 2013).

Otro factor a considerar en la biodistribución peptídica es la vía de administración, por ejemplo, la vía intravenosa es la que proporciona mayor velocidad de absorción y permite obtener concentraciones plasmáticas de forma instantánea, por otro lado, la vía intramuscular presenta retardo del proceso de la absorción, mientras que la vía oral es lenta y tiene un elevado índice de desnaturalización por el pH estomacal, inestabilidad enzimática, mala permeabilidad a través de la barrera epitelial y espesor de la capa mucosa. La vía rectal presenta irrigación irregular y absorción errática (**Fig. 4**) (Maya, 2007; Tyagi *et al.*, 2018). Previamente, se reportó que HBD3M no es hemolítica, lo cual posibilita su aplicación intravenosa (Corrales *et al.*, 2013). Como se puede observar, las características de biodistribución son propiedades importantes que pueden influir en el desarrollo de nuevas terapias (Davenport *et al.*, 2020; Vasquez *et al.*, 2011).

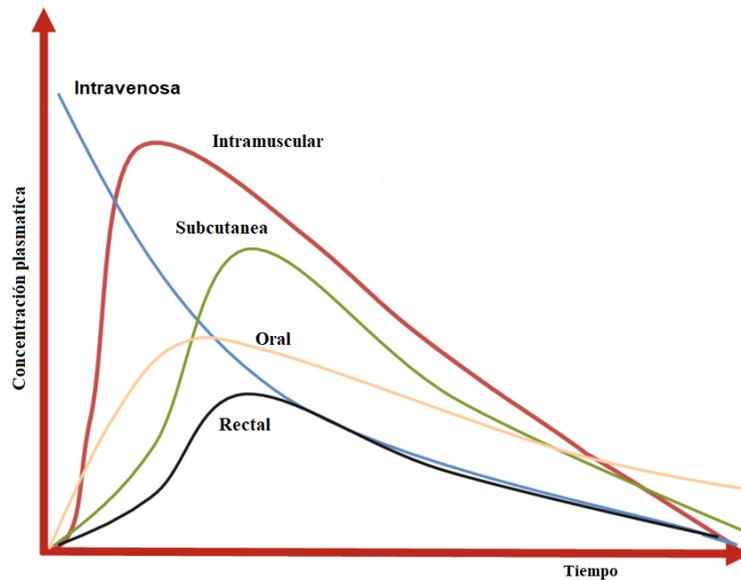


Fig. 4. Farmacocinética de las diferentes vías de administración. En la imagen se muestran las concentraciones que puede adquirir un fármaco desde que es administrado (fase de distribución) hasta que es excretado (fase de eliminación) (Martínez *et al.*, 2018).

2. Antecedentes

2.1. HBD3M

Generalmente, los péptidos antimicrobianos naturales presentan una vida media corta, por lo que es necesario sintetizar AMP análogos de acción prolongada. La expresión heteróloga en bacterias es una técnica eficaz para este fin debido a su bajo costo y facilidad de uso (Corrales, 2013; Esposito *et al.*, 2006; Lei *et al.*, 2019; Rai *et al.*, 2001). Corrales (2013) evaluó la expresión recombinante y actividad antimicrobiana de la defensina HBD3M, la cual consta de la secuencia de HBD3 más la adición de una cola de histidinas, una región reconocida por el factor Xa (serin proteasa de mamífero), una metionina y dos regiones para corte por *BamHI* y *PstI* (**Fig. 5**). Es así que HBD3M se compone de 62 aminoácidos, tiene carga +15, masa molecular de 7, 146.3 Da en condiciones reducidas, 7, 139 Da en condiciones oxidadas y pI teórico de 10.26. En la **Tabla 2** se resume la concentración mínima inhibitoria (MIC) de HBD3M contra diferentes cepas bacterianas, donde se observa su actividad antimicrobiana principalmente contra las bacterias Gram negativas. Corrales (2013) obtuvo valores de IC₅₀ de 0.4, 0.5 y 0.7 μM contra *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente, además probó que HBD3M no es hemolítico contra eritrocitos humanos. También demostró que en estado oxidado, es quimiotáctica hacia células THP-1, sin embargo, este estado oxidado, no influye con sus características antimicrobianas.

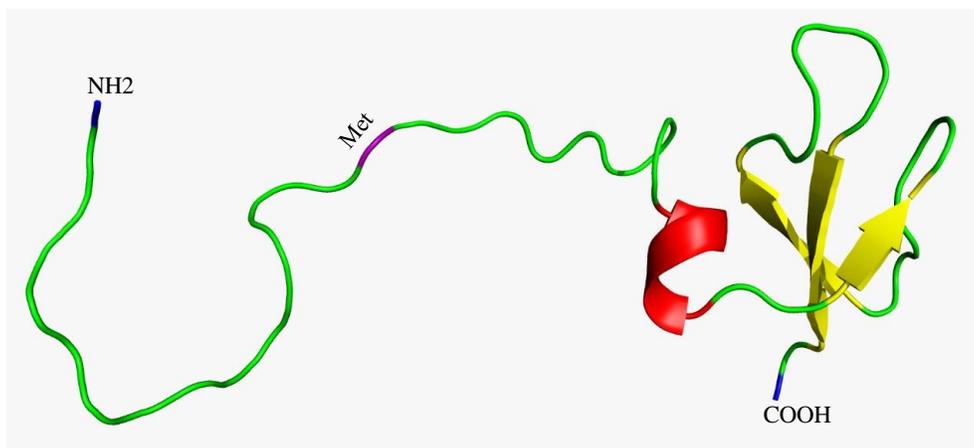


Fig. 5. Estructura terciaria de HBD3M. Esta defensina está conformada por tres hojas β antiparalelas (amarillo), una alfa hélice (rojo), un bucle helicoidal corto ubicado en la región amino-terminal del péptido (verde). Se señala además el extremo N- y C-terminal (azul) y la metionina que se encuentra antes del inicio de la secuencia de HBD3 (morado). Modificado de López (2020).

Tabla 2. Resumen de la MIC reportada para HBD3M.

Cepa	MIC (μ M)	Método	Referencia: (Corrales <i>et al.</i> , 2013)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	5	Medio sólido	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	5		

Cepas	MIC (μ g/ml)	Método	Referencia: (Callejaz, 2018)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UPD3*	125	Dilución seriada	
<i>Staphylococcus aureus</i> UPD13*	>250 (no inhibió)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	125		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213;	>250 (no inhibió)		

Cepas	MIC (μ g/ml)	Método	Referencia: (Ibarra, 2017)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UPD3*	>250 (no inhibió)	Dilución seriada	
<i>Staphylococcus aureus</i> UPD13*	>250 (no inhibió)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	140		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 21293	140		

*Cepas obtenidas de pacientes con úlcera de pie diabético de la Clínica Hiperbárica.

Ibarra (2017) determinó mediante marcaje de péptido con fluoróforo su distribución en el citoplasma y la membrana de *S. aureus* ATCC29213 y *P. aeruginosa* ATCC 17853, sugiriendo la formación de conglomerados y con esto un mecanismo de acción de tipo carpeta. Callejas (2018) observó un efecto sinérgico con Amoxicilina contra *P. aeruginosa* UPD3 y efecto aditivo con sulfametoxazol y vancomicina, contra las cepas de *S. aureus* ATCC 21293 y UPD13 no se encontró ninguna combinación con un efecto sinérgico ni *in vitro*, ni *in vivo*. López (2020) mediante modelado *in silico* de interacciones de HBD3M con los receptores inmunitarios CCR2,

resalta que la naturaleza de dicha interacción se debe a fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas por residuos hidrofóbicos, catiónicos y aniónicos. Este autor reportó también que la cola de histidinas no interfiere en el acoplamiento con dicho receptor. Cabe mencionar que todos estos ensayos evalúan al péptido en un modelo aislado *in vitro*. Falta estudiar su integridad en diferentes fluidos biológicos de manera *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Así como evaluar su estabilidad y biodistribución, nos permite proponer modelos de lo que pasaría en una administración real y determinar la viabilidad de su uso a nivel sistémico.

3. Justificación

Existe una crisis hospitalaria ante la aparición de agentes multirresistentes a fármacos (MDR) (Koo *et al.*, 2019; Mwangi *et al.*, 2019). Los antibióticos son cada vez más obsoletos y se ha optado por el diseño de fármacos con base en los péptidos de defensa de la familia de las β -defensinas. Tal es el caso de la β -defensina humana 3 recombinante, HBD3M, la cual es considerada como un posible agente antimicrobiano dada su ausencia de efecto hemolítico, efecto antibacteriano y quimiotáctico, además de su baja propensión a generar resistencia (Corrales, 2013). Como ya se ha indicado en otros péptidos, estos se acumulan principalmente en el hígado y los riñones (Faure *et al.*, 2009; Vasquez *et al.*, 2011). Sin embargo, para que HBD3M sea considerada como un fármaco, es indispensable garantizar su eficacia. Es por ello que es necesario conocer su estabilidad peptídica y biodistribución en sistemas *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Este estudio permitirá comprender la influencia del entorno sobre la actividad antimicrobiana de HBD3M, su distribución en diferentes órganos y las vías por las que se excreta, cuando es administrada vía intravenosa, lo cual determinará su viabilidad como agente terapéutico.

4. Hipótesis

El péptido HBD3M se mantendrá estable en orina, plasma y en el torrente sanguíneo después de ser administrado vía intravenosa.

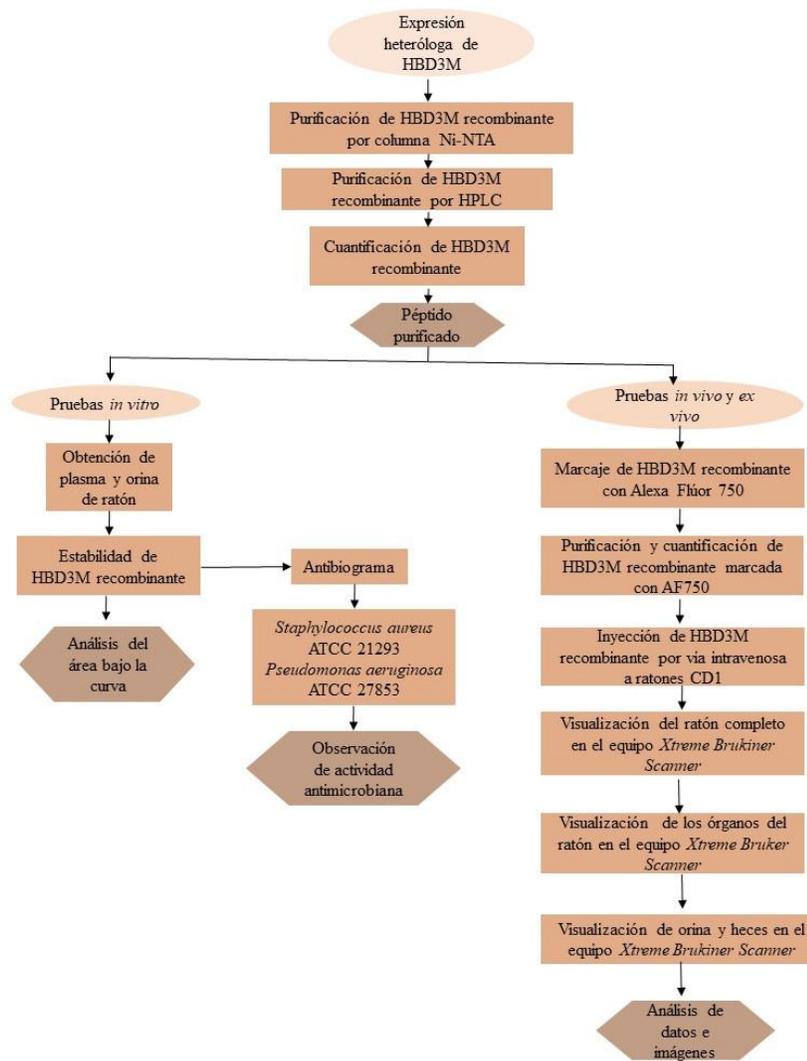
5. Objetivo general

Determinar la estabilidad y la biodistribución del péptido HBD3M de manera *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* en un modelo murino.

6. Objetivos particulares

- * Determinar la estabilidad de HBD3M en el plasma y la orina a diferentes intervalos de tiempo.
- * Evaluar el mantenimiento del efecto antimicrobiano de HBD3M en contacto con el plasma y la orina.
- * Describir la biodistribución de HBD3M en un modelo murino.
- * Analizar la acumulación de HBD3M en diferentes órganos de ratón.
- * Determinar las vías de excreción de HBD3M en ratón.

7. Esquema de trabajo



8. Metodología

8.1. Animales

El plasma y la orina se obtuvieron de ratones CD-1 machos (*Mus musculus domesticus*) albinos con peso de 20-25 g. Los ratones se mantuvieron en un cuarto aislado a 21-25 °C con ciclos de luz oscuridad de 12:12 h, en jaulas con disponibilidad de alimento y agua. Se siguieron los procedimientos establecidos del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM con base en la NOM-062-ZOO-1999 y las recomendaciones de Mourelle, (2013) para el correcto manejo de los animales.

8.2. Cepas bacterianas

Se usaron las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 21293 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, mismas que se mantuvieron en glicerol al 30 % a -20 °C.

8.3. Transformación, expresión y purificación de la β -defensina recombinante

Para obtener al péptido se incubó 1 μ L (50 ng) de plásmido pQE30 con 100 μ l de células *E. coli* M15, durante 25 s en baño María a 42 °C y luego 5 min en hielo, después se agregó 1 ml de medio SOC y se incubó a 37 °C por 1 h. Posteriormente, las células transformadas se sembraron en caja con agar LB + ampicilina (80 μ g/ml) por 12 h a 37 °C. Después de esto, se sembraron por estriado 5 clonas por separado en placas nuevas de agar LB + ampicilina (80 μ g/ml) durante 12 h. De éstas, se hicieron precultivos de todas las clonas en caldo LB+(80 μ g/ml) ampicilina. Se tomaron 500 μ l de células de dicho medio y se centrifugaron por 5 min a 2, 415 g, el botón celular se resuspendió en agua y se tomaron 20 μ l para cargar un gel SDS-PAGE. La cepa de la que se recuperó más contenido proteínico se inoculó en 3ml de medio LB + 6 μ l de ampicilina (80 μ g/ml) a 37 °C toda la noche. Después, se pasó este inóculo a un matraz con 50 ml de medio LB + 50 μ l de ampicilina (80 μ g/ml) a 37 °C durante 2 horas. Este medio se pasó a un matraz con 1 litro de medio LB + 1ml de ampicilina y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO600 nm de 0.7-0.8, entonces se añadió 1 mM de IPTG y se incubó 8 horas a 30 °C. Después, se centrifugó el medio por 15 min a 5, 378 g a 4°C, se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 10 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8, el cual se pasó por la prensa de French para la lisis celular. El contenido obtenido se centrifugó 15 min a 12, 096 g a 4 °C. El sobrenadante se guardó y el botón se solubilizó en 5-10 ml de cloruro de guanidinio 6 M-Tris-HCl 50 mM pH 8 y se dejó en agitación toda la

noche a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se pasó por cromatografía de afinidad en columna Ni-NTA(QuaGen) con solución de equilibrio (cloruro de guanidinio 6M- Tris-HCl 50 mM pH8), solución de lavado (50 mM Tris HCl pH8 + 25 mM imidazol) y la solución de elución (Tris-HCl 50 mM pH8 + 400 mM imidazol) como lo indica el fabricante. Cada fracción colectada se analizó por SDS-PAGE para identificar en cual se encuentra HBD3M recombinante. Las fracciones colectadas se purificaron por cromatografía en fase reversa utilizando una columna C18 (C₁₈-HPLC, 10 x 250mm, Vydac, EUA) con gradiente de la solución A: agua con 0.1% de TFA (ácido trifluoroacético) y la solución B: acetonitrilo con 0.1% de TFA a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

8.3.1. Cuantificación del péptido

El rendimiento de la expresión de HBD3M se midió calculando la cantidad de proteína purificada mediante el espectrofotómetro, ya que la absorbancia registrada en él se relaciona con la concentración de la sustancia por la ley de Lambert-Beer, que se resume con la ecuación:

$$A = \epsilon d c$$

dónde:

A: Absorbancia del péptido a 280nm

ϵ : Coeficiente de extinción molar (HBD3M; 0.469 g/l)

d: Distancia óptica (anchura de la celda que contiene la disolución de la sustancia), se expresa en cm

c: Concentración del absorbente, se expresa en g/l.

8.4. Recolección de muestras fisiológicas

8.4.1. Obtención de orina de ratones CD1

Se usó la técnica de recolección de orina con intervención moderada. Para esto, se sostuvo al ratón y se indujo la micción haciendo presión transabdominal sobre la vejiga de forma manual para superar la presión normal de la uretra. Las muestras se colectaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

8.4.2 Obtención de plasma de ratones CD1

Se usó la técnica de punción cardiaca, la cual es un procedimiento terminal que permite la extracción de grandes volúmenes de sangre. El ratón se anestesió y se sostuvo manualmente. Con

una aguja de 1ml se pinchó lateralmente en un ángulo de 30° entre el espacio intercostal hacia el punto del latido cardíaco, después de que se completó la extracción se sacrificó al animal. La sangre se vertió en un tubo con EDTA para evitar su coagulación. La muestra se centrifugó a 2, 415 g x 10 min, se recolectó el plasma y se almacenó a -20°C hasta su uso.

8.5. Incubación en orina y plasma

El péptido HBD3M se incubó en la orina y el plasma durante 12, 18 y 24 h a 37 °C. Como control se consideraron los grupos: 100 µg de péptido, 50 µl de orina, 50 µl de plasma y como muestra problema la combinación 100 µg de péptido + 50 µl de orina o plasma. Después, se agregaron 450 µl de acetonitrilo al 60% + TFA al 0.1% y se centrifugaron a 2, 415 g x 5 min. Se recolectó el sobrenadante y se pasó por cromatografía en fase reversa (C18-HPLC, 10 x 250mm, Vydac, EUA) con solución A: agua con 0.1% de TFA (ácido trifluoroacético) y la solución B: acetonitrilo con 0.1% de TFA a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se recolectaron los picos pertenecientes a HBD3M y se hicieron 3 réplicas de cada condición.

8.5.1. Antibiograma

La evaluación de la actividad antimicrobiana del péptido después de incubarlo en orina y plasma permitirá evaluar si conserva su efecto antimicrobiano. El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas. El antibiograma se inició con un preinóculo de las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus* en 3 ml de caldo Müller-Hinton (MHB) toda la noche a 37 °C. Posteriormente, se ajustó el inóculo a una DO600 nm de 0.08-0.13, $\approx 1.5 \times 10^6$ bacterias/ml, tras esto, con un hisopo estéril se esparció a las bacterias en placas con agar Mueller-Hinton y después se agregaron 10 µL de: HBD3M pura (100 µg), HBD3M previamente incubada en la orina y el plasma 24 h diluida en caldo MHB, Ceftriaxona (1.1 µg/ml) para *S. aureus* y Gentamicina (13.1 µg/ml) para el caso de *P. aeruginosa*, las placas se incubaron a 37 °C por 18 h. Finalmente, se observó el diámetro de la zona de inhibición. Se hicieron 3 réplicas de cada condición.

8.6. Marcaje de HBD3M con Alexa Flúor

Para visualizar la distribución de la defensina en tiempo real, se marcó al péptido con el fluoróforo Alexa flúor 750 (AF750), que tiene un máximo de absorción a 749 nm y de emisión a 775 nm. La base del fluoróforo es el grupo éster succinimidílico de AF750, el cual se une al amino

épsilon de las lisinas del péptido. Para el marcaje se siguió el protocolo de *Molecular Probes*, que es disolver 1 mg de péptido en 1 ml de tampón de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 8.3 y 5 mg de fluoróforo en 0.5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Después, se agregó lentamente la solución del fluoróforo a la solución del péptido y se incubó 2 h a temperatura ambiente con agitación continua. Tras esto, se purificó el péptido marcado por HPLC en columna C18 de fase reversa (C18-HPLC, 10 x 250mm, Vydac, EUA) con las condiciones previamente mencionadas. Los grupos considerados fueron: HBD3M + fluoróforo, fluoróforo en DMSO, péptido + tampón de bicarbonato y el tampón de bicarbonato. Las fracciones colectadas se corrieron en SDS-PAGE para corroborar su identidad.

8.6.1. Determinación de la concentración de péptido-fluoróforo

Para determinar la concentración de péptido conjugado se midió la absorbancia a 280 nm y a 750 nm en el nanodrop y se utilizó la fórmula:

$$A_{\text{protein}} = A_{280} - A_{\text{max}}[\text{CF}]$$

donde:

A_{280} = Absorbancia del péptido

A_{max} o A_{750} = Absorbancia a la longitud de emisión de Alexa Flúor 750

CF = Factor de corrección dado por el fabricante.

Una vez conocido el valor de A_{protein} , se usó este para conocer la concentración de HBD3M marcada con AF750 siguiendo la Ley de Lambert Beer, mencionada anteriormente.

8.7. Pruebas de biodistribución

8.7.1. Visualización *in vivo*.

Para las pruebas *in vivo* se usaron ratones CD1 con peso de 20-25 g siguiendo los cuidados antes mencionados. El péptido marcado se inyectó en relación 5 mg/kg en la vena caudal en 200 μ l de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄: 1.8 mM). Se tomaron en cuenta las condiciones: PBS + fluoróforo (AF750), péptido marcado (HBD3M + AF750) y PBS. Inmediatamente después de la inyección se anestesió a los ratones con isoflurano al 2% a un flujo de 1 ml/min y se escanearon en un equipo de espectrometría *In-vivo Xtreme Bruker Scanner* con detección de fluorescencia y refractancia en posición ventral y dorsal. Se tomaron imágenes a los tiempos 0, 0.5, 1, 2 y 4 h para observar la distribución del péptido marcado dentro del ratón.

8.7.2. Determinación de vías de excreción

Durante el experimento de biodistribución se colectaron muestras de orina y heces en tubos Eppendorf. Las heces se diluyeron en PBS y se colocaron en el equipo *Xtreme Bruker Scanner* para detectar la emisión de fluorescencia. Como controles se consideraron las muestras de ratón inyectado solo con PBS.

8.7.3. Visualización *ex vivo*

Al finalizar la visualización, se sacrificó a los animales y se extrajo: corazón, estómago, intestino, pulmón, hígado, riñones, testículos, vejiga y bazo. Estos órganos se colocaron en una caja Petri de vidrio para tomar imágenes de fluorescencia en el equipo *Xtreme Bruker Scanner*, con los que se determinó si el péptido marcado se acumuló en dichos órganos. Todas las pruebas de biodistribución se realizaron en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada que se localiza en el IBt de la UNAM bajo la supervisión de la doctora Verónica Rojo León.

8.7.4. Procesamiento de imágenes y cuantificación de fluorescencia

Las imágenes de fluorescencia obtenidas por el sistema *Xtreme Bruker Scanner* se procesaron con el programa Fiji. Para esto, se seleccionaron las regiones de interés (ROI), y se cuantificó la intensidad de fluorescencia con la función “medición múltiple”, que calcula los valores máximos y mínimos de la intensidad de grises y el valor promedio de los mismos (Galeana, 2020). Los datos obtenidos se analizaron con el programa GraphPad Prism Versión 6 (Prism, La Jolla, CA). Para la comparación de las imágenes se ajustó el histograma de cada una, después se les asignó un filtro (LUT, 16_colors), que agrega un gradiente de colores asociado a la intensidad de los píxeles (intensidad de fluorescencia). Se eliminó el ruido de fondo utilizando la función matemática de sustracción y se añadió la escala correspondiente (1cm = 10,000 μ m). Esto permitió visualizar la biodistribución en los ratones. Para la generación de las gráficas se cuantificó la intensidad de los píxeles y se reportaron como unidades de intensidad de fluorescencia.

8.8. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante ANOVA bidireccional de comparación múltiple. Todos los análisis se realizaron con Excel y GraphPad Prism Versión 6 (Prism, La Jolla, CA). Los datos se mostraron como medias \pm SEM y aquellos con valores de $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ y $P < 0.0001$, respectivamente, se consideraron estadísticamente significativos.

9. Resultados

9.1. Transformación, expresión y purificación de HBD3M recombinante

La HBD3M se expresó en células *E. coli* M15 transformadas con el plásmido pQE30 (Corrales, 2013). Estas células pasaron por un primer proceso de selección, en el que se eligió a las cepas que crecieran en un medio suplementado con ampicilina, lo cual denotaría su transformación con el plásmido pQE30. Después, se seleccionaron colonias aisladas de cada cepa, se lisaron y el contenido se corrió en un gel SDS-PAGE al 15%. En la **Fig. 6** se puede observar la banda representativa de HBD3M, la cual aparenta un tamaño mayor a 10 kDa. Esta anomalía está relacionada a la carga del péptido, tal y como se ha observado en otros péptidos recombinantes con un alto contenido de aminoácidos básicos (Alvarado *et al.*, 2021). Sin embargo, la masa molecular fue corroborada mediante espectrometría de masas.

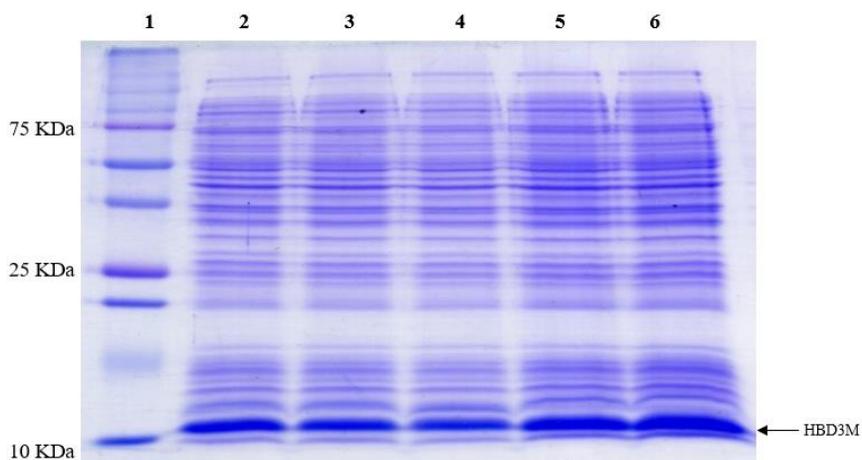


Fig. 6. SDS-PAGE al 15% de proteínas de células M15 transformadas. *Carril 1:* Marcador de masa molecular; *Carril 2:* clona 1; *Carril 3:* clona 2; *Carril 4:* Clona 3; *Carril 5:* clona 4; *Carril 6:* clona 5.

Posteriormente, la HBD3M producida por clona 5, la cual indirectamente produjo más, por el grosor de banda en el SDS-PAGE, fue purificada parcialmente utilizando una columna de Niquel-Agarosa (QuaGen). Las eluciones de dicha purificación se observaron en un gel SDS-PAGE al 15%. En la **Fig. 7** se muestra dicho gel y se señala la posición de HBD3M por su presencia arriba de la marca proteica de los 10 kDa.

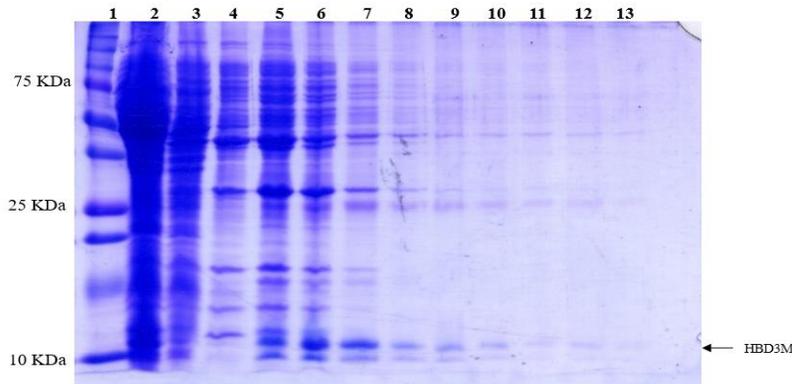


Fig. 7. SDS-PAGE al 15% de las fracciones recuperadas de la purificación parcial por afinidad a níquel. *Carril 1:* Marcador de masa molecular; *Carril 2:* Recirculante; *Carril 3:* Lavados 20 mM de imidazol; *Carril 4-13:* Elusión 400 mM de imidazol.

Las fracciones de los carriles 7 a 10 se mezclaron y se fraccionaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando una columna semipreparativa de fase reversa C18 (10 x 250mm, Vydac, EUA) con gradiente creciente de acetonitrilo (ACN) más 0.1% de TFA de 20% a 60% en 40 min con un flujo de 1 ml/min (**Fig. 8**). Se colectó la fracción del minuto 18-22 (33-37% de ACN).

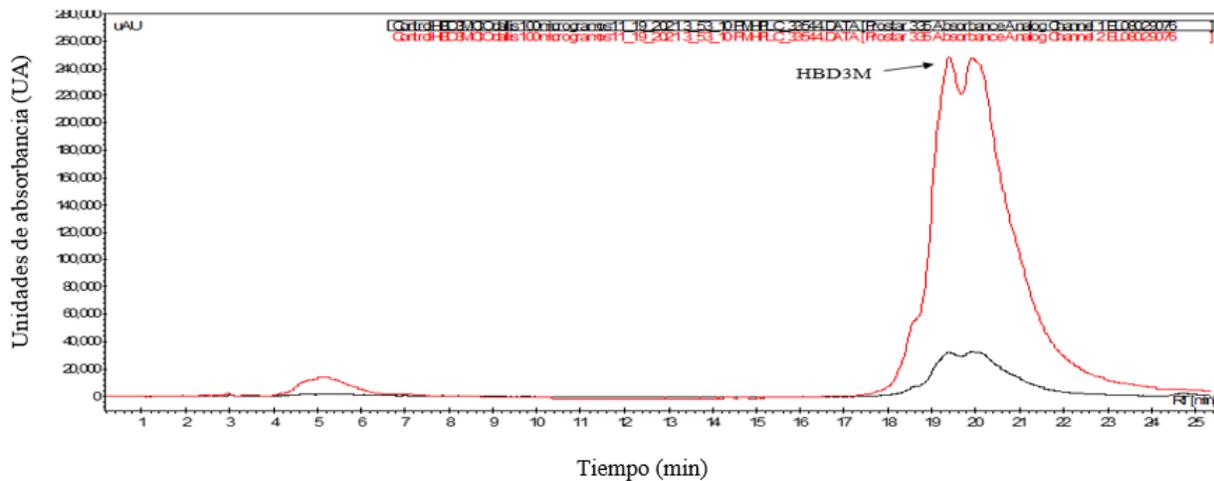


Fig. 8. Perfil cromatográfico de HBD3M. Cromatograma obtenido por HPLC en columna C18 de fase reversa, método usado: 20% a 60% de solución B en 40 min con un flujo de 1 ml/min Solución B: CH₃CN + TFA al 0.1%). Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

El perfil cromatográfico de HBD3M muestra más de una fracción; esto es debido a que la defensina presenta más de una isoforma estructural por los arreglos de sus 3 puentes disulfuro. Para los fines del proyecto no fue requerida la reducción del péptido, ya que el tipo de isoforma no influye en su actividad antimicrobiana (Corrales, 2013). Posteriormente, las muestras recolectadas por HPLC se observaron en un gel SDS-PAGE al 15% (**Fig. 9**), en el que se

observaron bandas definidas arriba de 10 kDa. Si bien, se observa un menor número de contaminantes, hay bandas de menor peso molecular de la defensina, esto podría deberse a la presencia de las isoformas estructurales de HBD3M que interactúan de manera distinta con el SDS. Esto ya se ha observado con anterioridad en el laboratorio.

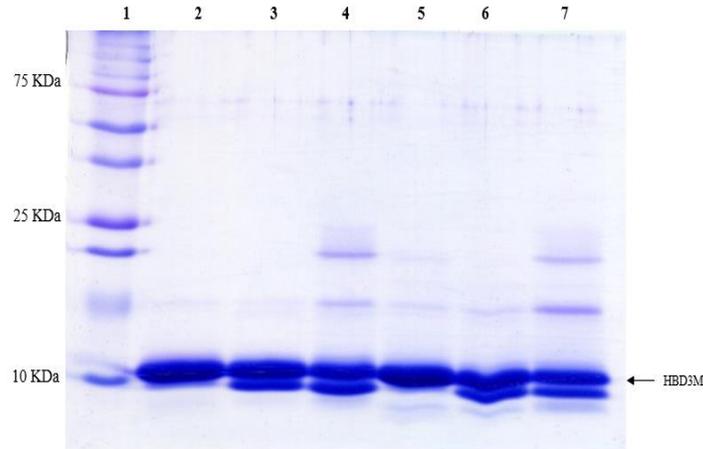
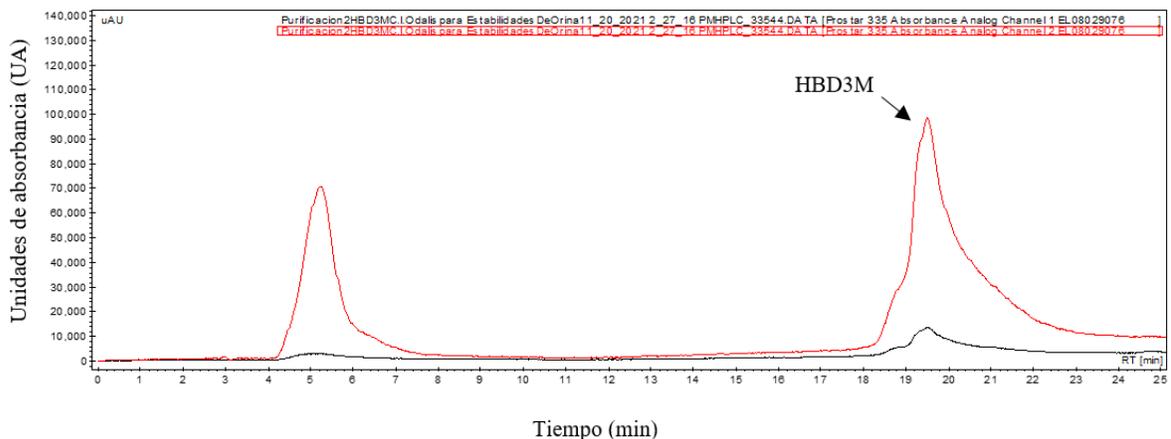


Fig. 9. SDS-PAGE al 15% de la purificación por HPLC de HBD3M. *Carril 1:* Marcador de masa molecular; *Carril 2-7:* 10 µg de HBD3M recuperada tras ser purificada por HPLC, en el tiempo de retención: 18-22 min con porcentaje de acetonitrilo de 33-37%.

9.2. HBD3M permanece en la orina después de 24 h.

Para este ensayo se incubaron 100 µg de HBD3M en 50 µl de orina de ratones CD1 machos de 20-25 g de peso. Como controles se usaron 50 µl de orina sin péptido y 100 µg de péptido diluido en agua *MilliQ*. Los cromatogramas controles se muestran en la **Fig. 10**. Las incubaciones se hicieron durante 12, 18 y 24 h. Cumpliéndose estos tiempos, se trató a las muestras con ACN 60% + TFA 0.1% para precipitar a las proteínas, el sobrenadante se analizó por HPLC en columna C18 de fase reversa (**Fig. 11**). Cada muestra se corrió por triplicado, anexos 1, 2 y 4.

A)



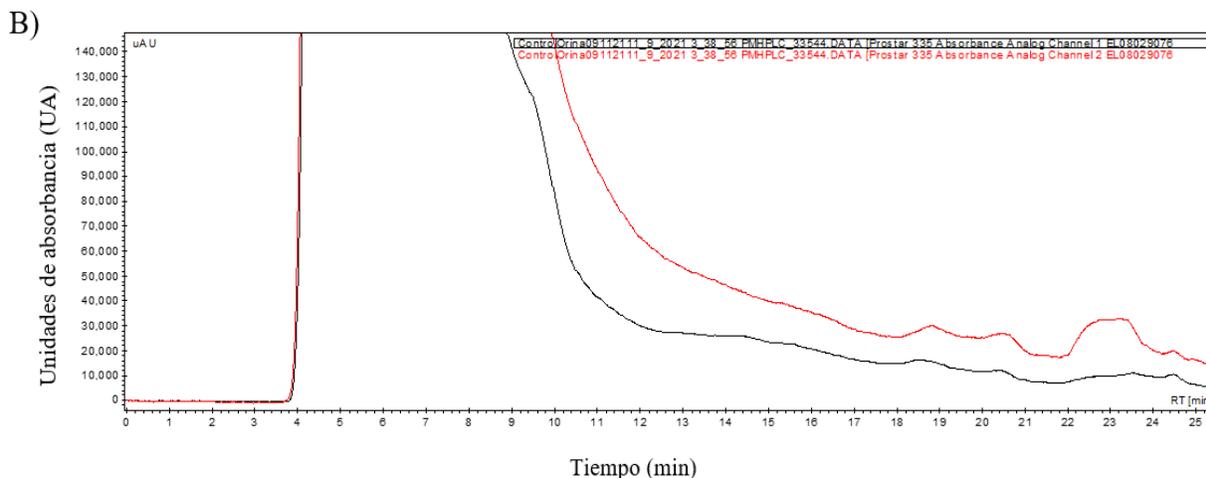
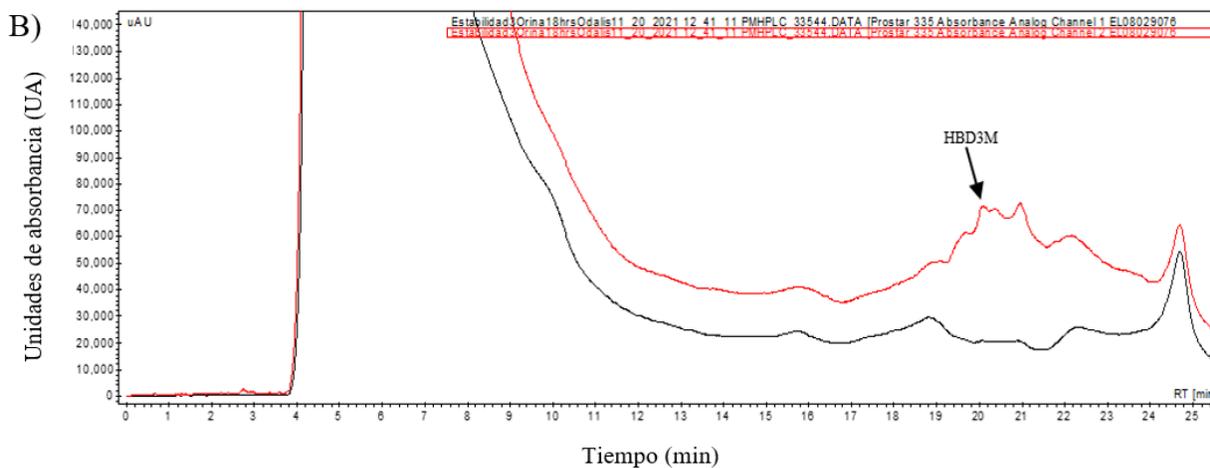
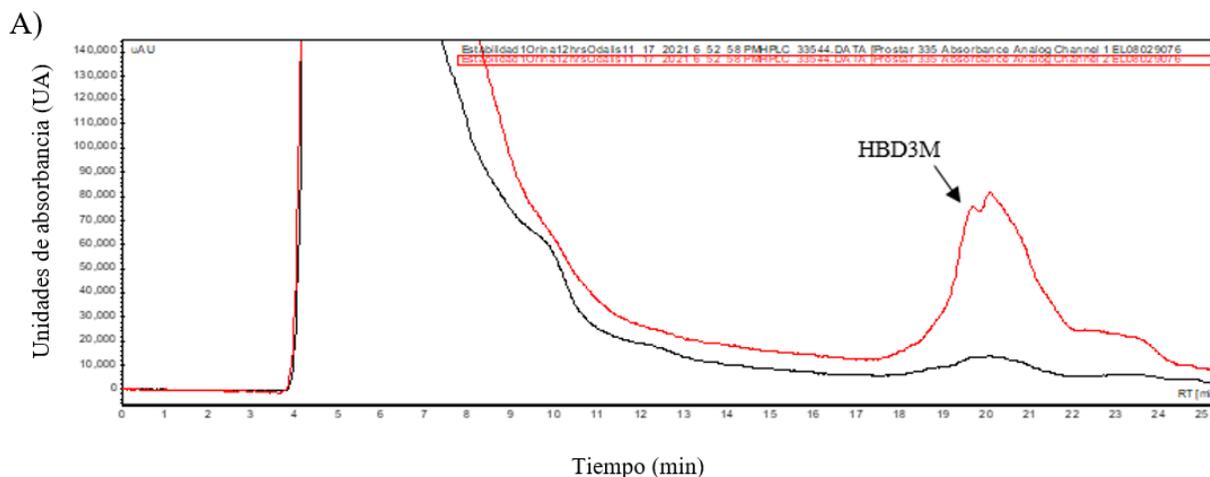


Fig. 10. Cromatogramas control de HBD3M y orina. Cromatograma obtenido por HPLC en columna C18 de fase reversa con 80-20% de solución A-B (Solución A: H₂O + TFA 0.1% y Solución B: CH₃CN + TFA 0.1%) flujo 1 ml/min. A) Control de HBD3M (100 µg); B) Control de orina (50 µl). Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.



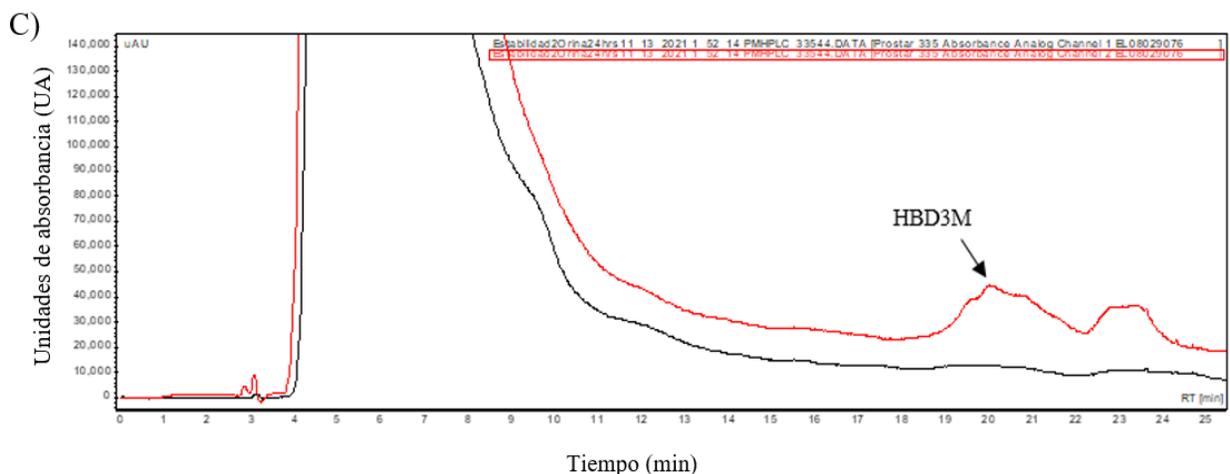


Fig. 11. Cromatogramas del péptido incubado en orina. Se muestra la incubación de HBD3M en orina (100 μg + 50 μl) al tiempo A) 12 h. B) 18 h. C) 24 h. Cromatograma obtenido por HPLC en columna C18 de fase reversa, método usado 80-20% de solución A-B (Solución A: H₂O + TFA 0.1% y Solución B: CH₃CN + TFA 0.1%) flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

En la **Fig. 12** se muestran los valores correspondientes al área bajo la curva entre el minuto 19-20 con porcentaje de acetonitrilo del 34-35 % de las diferentes incubaciones. La medición del área bajo la curva está relacionada con la concentración de péptidos presente en la muestra, la presencia del pico perteneciente a HBD3M se observa aun a las 24 h, pero con una ligera reducción de su valor inicial, lo cual puede referir a que cierta proporción de la defensina es degradada o que se une a algún componente presente en la orina. Con esto, se sugiere que después de 24 horas el péptido es estable en orina.

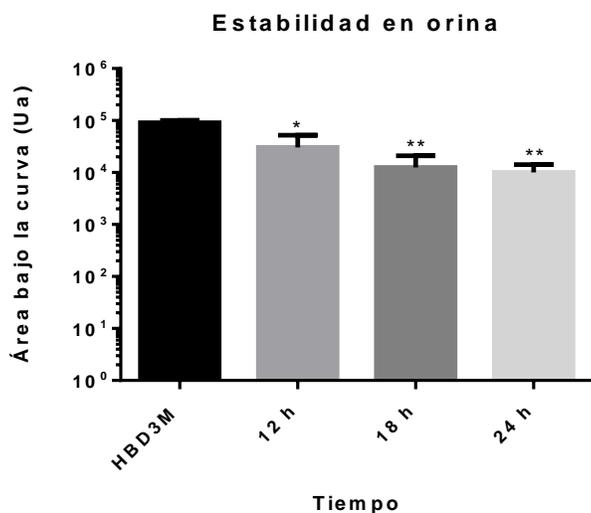


Fig. 12. HBD3M permanece en la orina después de 24 h. Se calculó el área bajo la curva de la absorbancia a 230 nm de los picos de HBD3M (100 μg) obtenidos por HPLC antes y después de ser incubados en orina a diferentes tiempos. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con desviación estándar, $P < 0.05 = *$ y $P < 0.01 = **$.

9.3 HBD3M permanece en el plasma después de 24 h.

Se incubaron 100 µg de HBD3M con 50 µl de plasma. La sangre completa se obtuvo por punción cardiaca de ratones CD1 machos de 20-25 g de peso. Como controles se usaron 50 µl de plasma sin péptido y 100 µg de péptido diluido en agua *MilliQ*. Los cromatogramas controles se muestran en la **Fig. 13**. El tiempo para las estabilidades fue de 12, 18 y 24 h. Cumpliéndose el tiempo de incubación se trató a las muestras como ya se describió y el sobrenadante se analizó mediante HPLC en columna C18 de fase reversa (**Fig. 14 y 15**). En la **Fig. 15** se muestran los valores correspondientes a las diferentes incubaciones, donde el área bajo la curva se analizó como se describió anteriormente, considerando únicamente el pico entre el minuto 19 y 20 con porcentaje de acetonitrilo del 34-35 %. Se muestran los triplicados en los anexos 1, 3 y 5.

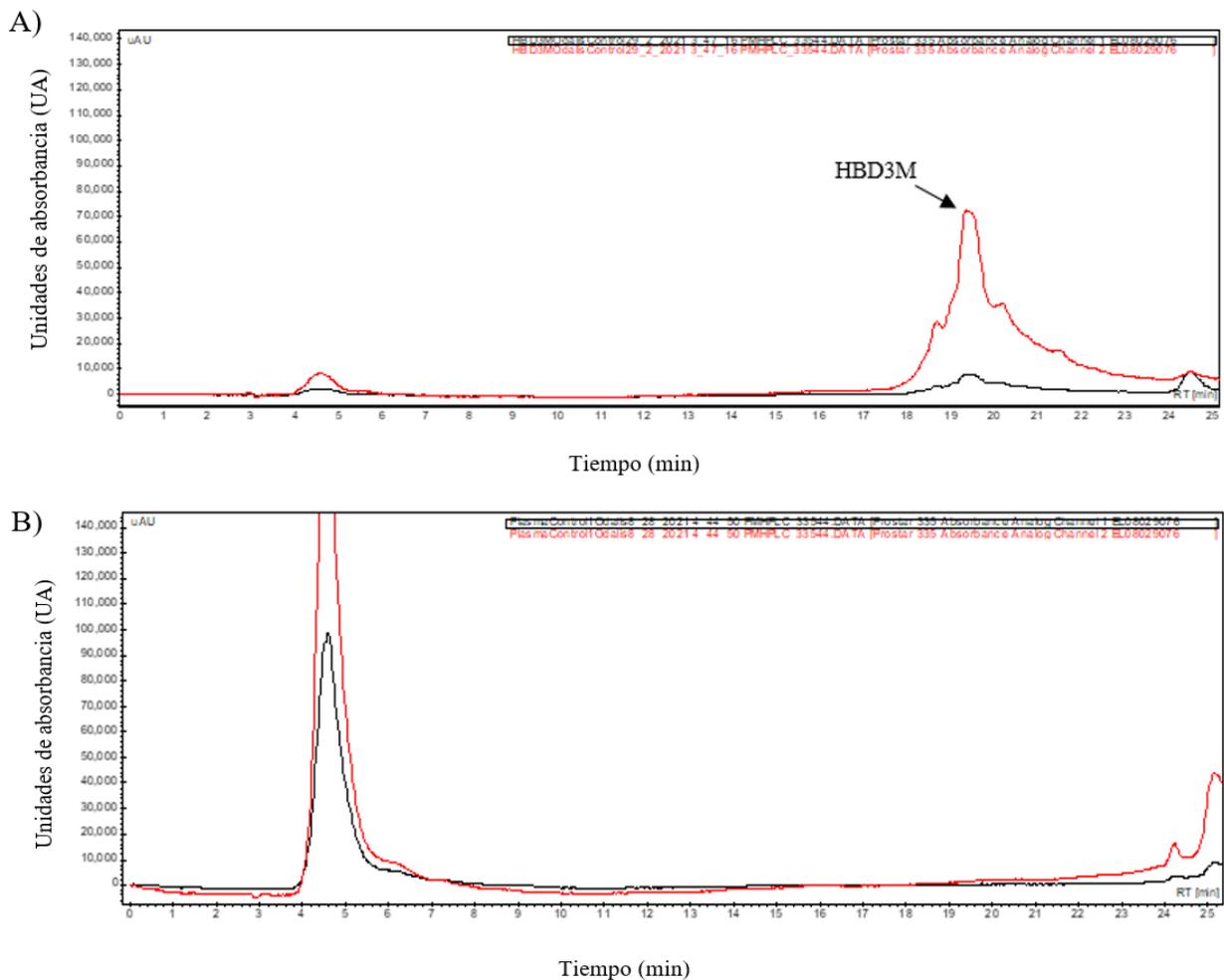


Fig. 13. Cromatogramas control de HBD3M y plasma. Cromatograma obtenido por HPLC en columna C18 de fase reversa, método usado 20-80% de solución H₂O + TFA 0.1% y solución CH₃CN+ TFA 0.1%) flujo 1mL/min. A) Control de HBD3M (100µg); B) Control de plasma (50µl). Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

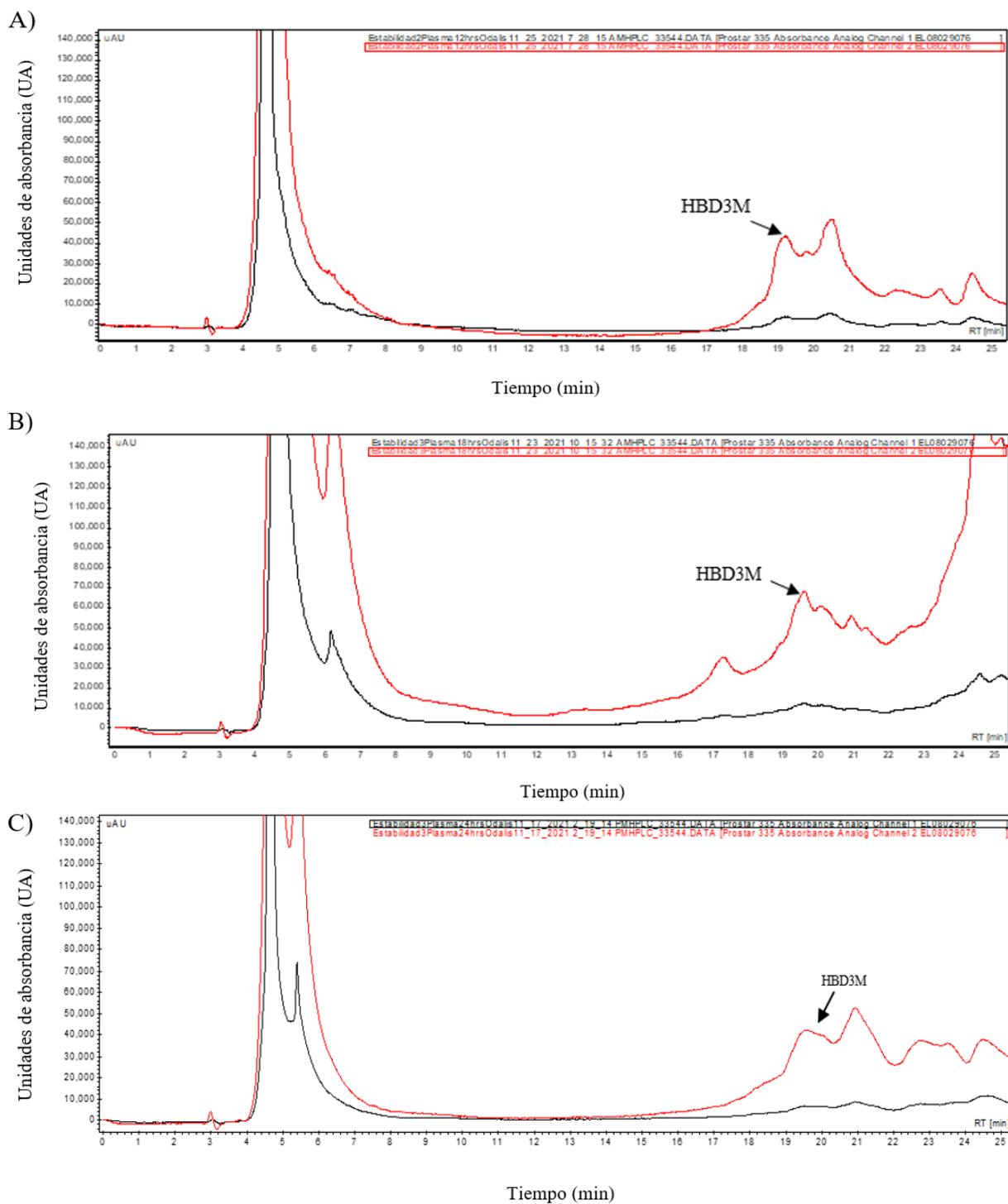


Fig. 14. Cromatogramas del péptido incubado en el plasma. Se muestra la incubación de HBD3M en plasma (100 μg + 50 μl) al tiempo A) 12 h. B) 18 h. C) 24h. Cromatograma obtenido por HPLC en columna C18 de fase reversa, método usado 80-20% de solución H₂O + TFA 0.1% y CH₃CN + TFA 0.1%, flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

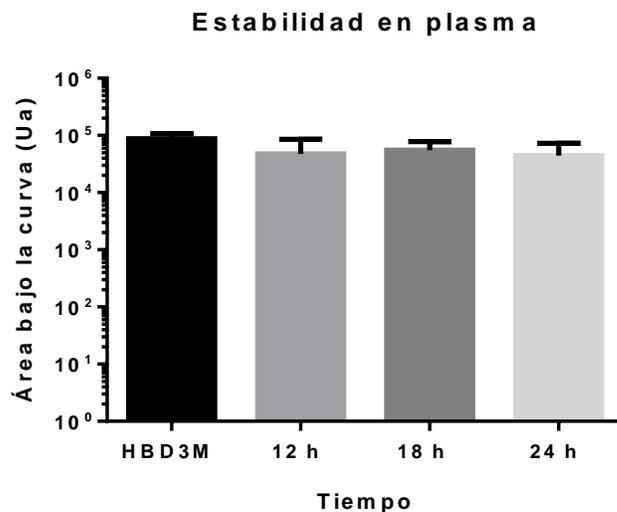


Fig. 15. HBD3M permanece en el plasma después de 24 h. Se calculó el área bajo la curva de la absorbancia a 230 nm de los picos de HBD3M (100 µg) obtenidos por HPLC antes y después de ser incubados en plasma a diferentes tiempos. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con desviación estándar.

Tanto en los cromatogramas como en la gráfica es posible apreciar que tras 24 h el péptido permanece en plasma, la presencia de varios picos que no corresponden al tiempo de interés se atribuyen a que posiblemente la defensina es degradada o que se une a algún componente presente en el plasma. A pesar de esto, aún se recupera gran parte de la muestra de HBD3M en el tiempo de retención esperado, por consiguiente, se sugiere que el péptido es estable en este medio.

9.4. HBD3M tiene actividad contra *P. aeruginosa*.

Se decidió probar la actividad antimicrobiana posterior a los ensayos de estabilidad, para determinar si el péptido mantiene su efecto antibacteriano. Para esto, se inoculó por siembra masiva a las cepas *S. aureus* ATCC 21293 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 en placas con agar Mueller-Hinton y se les aplicó una gota de 10 µl de PBS con HBD3M (100 µg) o HBD3M incubada en orina y plasma por 24h. Como control se usó Ceftriaxona para *S. aureus* y Gentamicina para *P. aeruginosa*. Esta placa se incubó por 18 h a 37°C. Posteriormente, se observó la inhibición o decremento del crecimiento bacteriano en las zonas en las que se aplicaron las muestras.

En la **Fig. 16-A**, se observa que HBD3M no inhibe el crecimiento de *S. aureus* en ninguna de las condiciones probadas. Para *P. aeruginosa* (**Fig. 16-B**), HBD3M (100 µg) y HBD3M incubada en orina muestran reducción del crecimiento bacteriano. Por otro lado, HBD3M incubada

en plasma sí formó un halo de inhibición bien definido, lo cual denota actividad antimicrobiana. Los experimentos por triplicado están contenidos en el anexo 6.

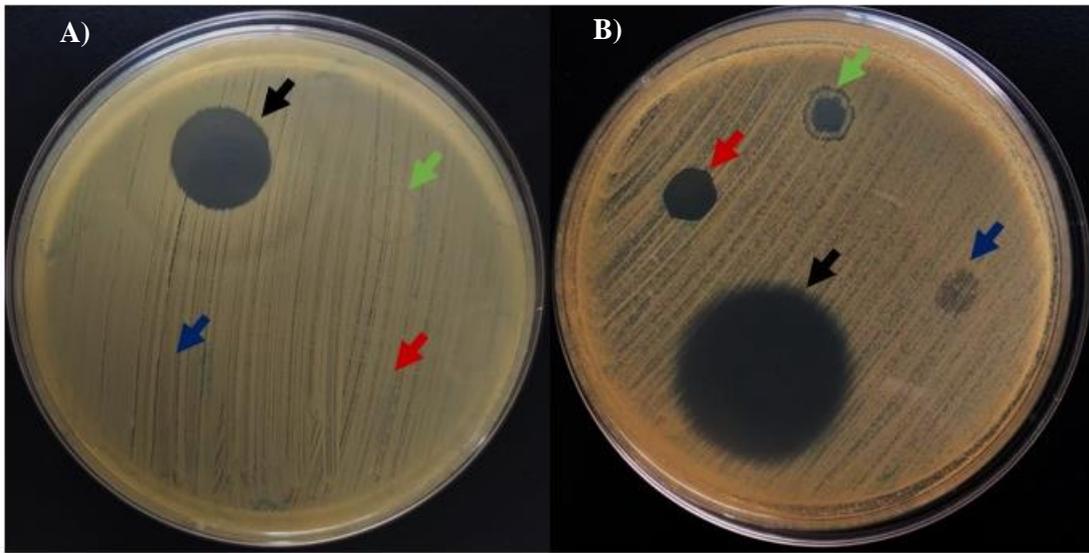
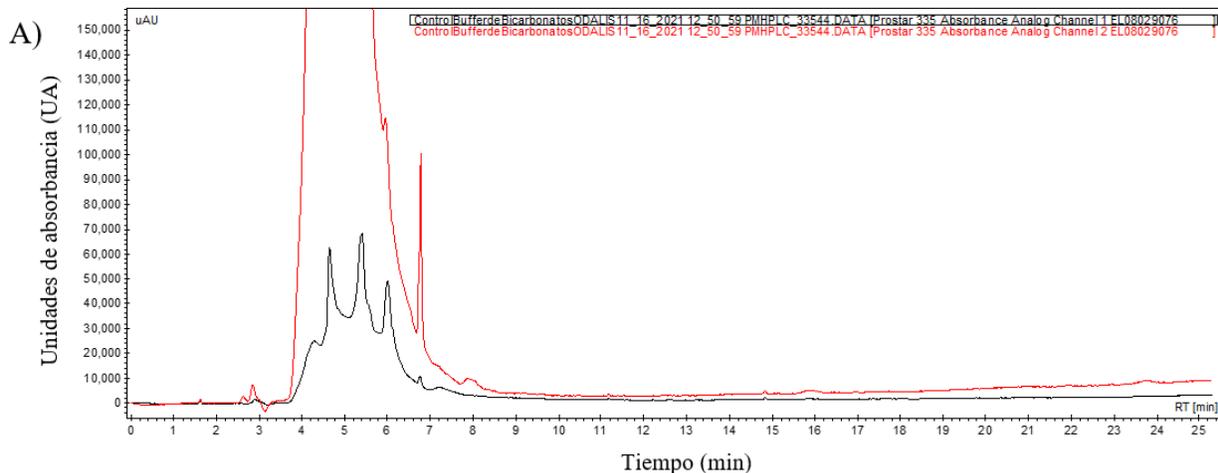


Fig. 16. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en medio sólido MH. Se determinó la actividad de HBD3M contra la cepa de referencia *S. aureus* (A) y *P. aeruginosa* (B). Flecha verde: 100µg de HBD3M; Flecha roja: HBD3M incubada en plasma; Flecha azul: HBD3M incubada en orina; Flecha negra: Ceftriaxona (1.1 mg/ml) para *S. aureus* y Gentamicina (13.1 mg/ml) para *P. aeruginosa*.

9.5 Marcaje de HBD3M con Alexa Flúor 750

Para determinar la localización de HBD3M en los ensayos de biodistribución es necesario el marcaje del péptido con el fluoróforo Alexa Flúor 750, el cual se llevó a cabo según el manual de Molecular Probes, seguido de su purificación por HPLC en las condiciones antes descritas. Como parte de la validación del marcaje en la **Fig. 17** se muestra el perfil cromatográfico de las condiciones consideradas.



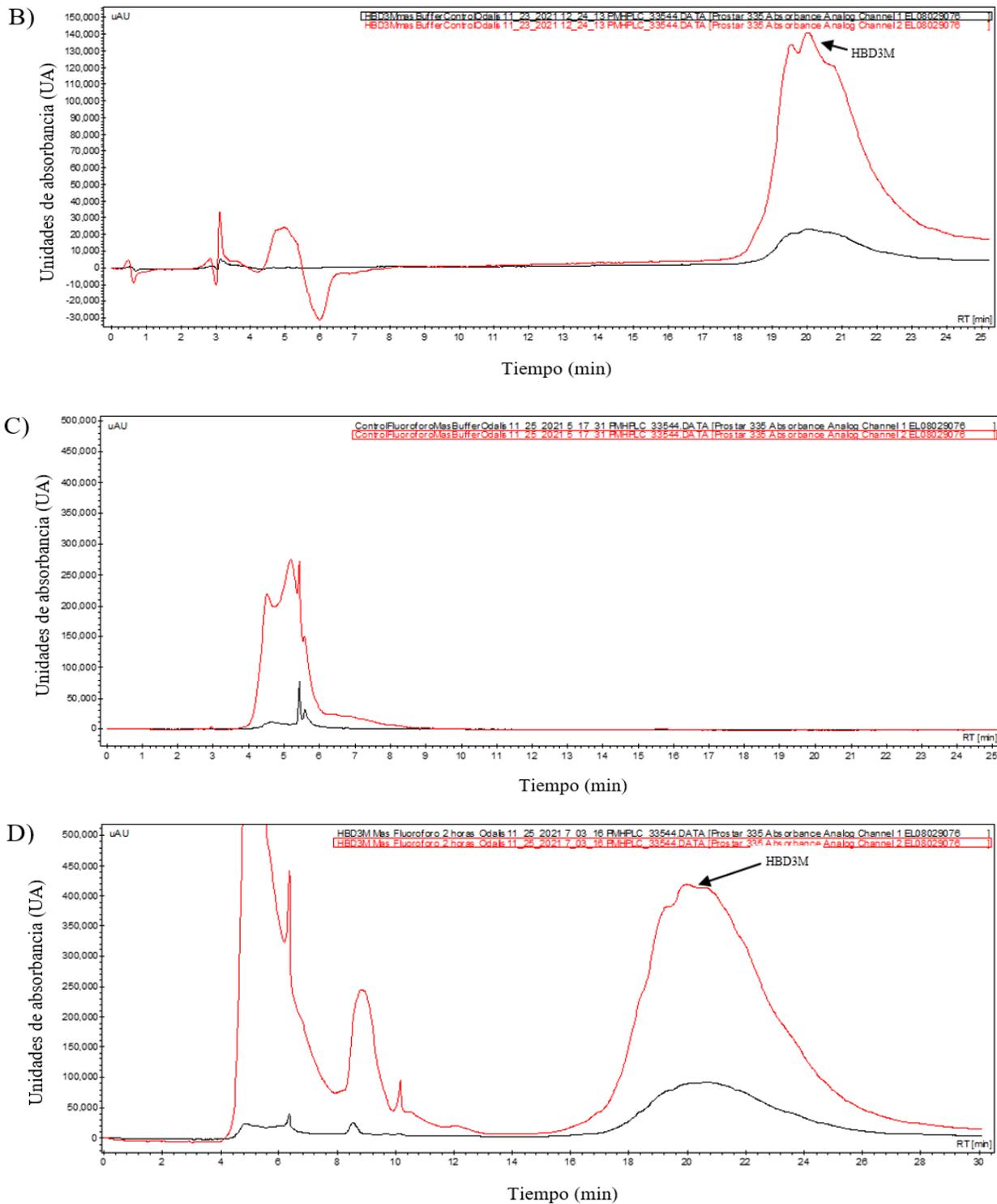


Fig. 17. Marcaje de HBD3M con Alexa Flúor 750. Se muestra los cromatogramas de A) Tampón de bicarbonatos; B) HBD3M (100µg) + Tampón de bicarbonatos; C) Alexa Flúor 750 y D) HBD3M+ Alexa Flúor 750. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna C18 de fase reversa, método usado 80-20% de solución H₂O + TFA al 0.1% y CH₃CN + TFA al 0.1%, flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

Se colectaron las fracciones pertenecientes al tiempo de retención del minuto 18 al 24 con porcentaje de acetonitrilo del 33-39%, se les secó para eliminar la presencia de ACN, se disolvieron en agua *MiliQ*. Para determinar si el péptido se encontraba puro, se hizo un gel SDS-PAGE al 15% de las diferentes purificaciones del conjugado, se usó HBD3M sin marcar como control. La masa molecular de Alexa Flúor 750 (AF750) es de 1, 300 Da, pero al unirse al péptido pierde el anillo succinil, el peso esperado del conjugado, HBD3M+AF750, es entonces de 8, 331.3 Da. En la **Fig. 18** se observa la banda correspondiente a HBD3M (carril 2) y a HBD3M+AF750 (carriles 3-5). El ancho de las bandas se debe a la cantidad de muestra cargada (100 µg). Para corroborar el marcaje se midió la absorbancia de la muestra (pico 1: HBD3M+ AF750-1, pico2: HBD3M+ AF750-2, pico 3: HBD3M+ AF750-3) a 280 nm y 749 nm en el Nanodrop. Con estos valores se calculó la cantidad de HBD3M marcado con AF750 (**Tabla 3**).

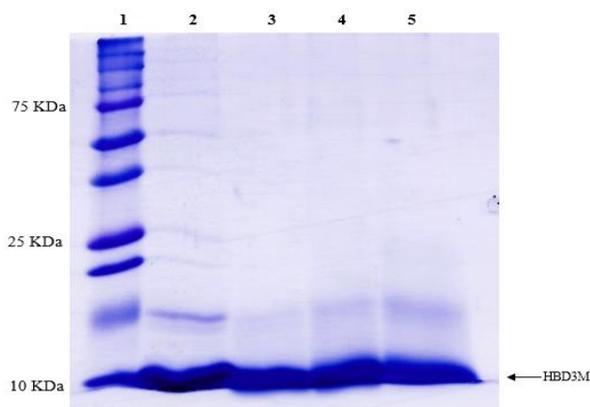


Fig. 18. Gel SDS-PAGE al 15% de las fracciones marcadas que se recuperaron de la purificación por HPLC del marcaje. *Carril 1:* Marcador de masa molecular; *Carril 2:* 100 µg de HBD3M sin marcar; *Carril 3-5:* 100 µg de HBD3M + Alexa Flúor 750.

Tabla 3. Datos de absorbancia de las purificaciones de HBD3M +Alexa Flúor 750. Se consideraron los valores A_{280nm} para medir la absorbancia del péptido y A_{max} , valor máximo de excitación a 749nm para medir la absorbancia correspondiente al fluoróforo, Factor de corrección (C.F.) propio del fabricante y el valor de concentración obtenido dado en µg/µl del conjugado.

Absorbancia (DO)				
Purificación	A_{280nm}	A_{Max}	C.F.	Concentración µg/µl
HBD3M+ AF750-1	1.9	-0.21	0.04	4.2
HBD3M+ AF750-2	2.8	0.03	0.04	5.9
HBD3M+ AF750-3	3.1	0.03	0.04	6.6

9.6 HBD3M es estable a nivel sistémico durante 4 h

Los ensayos de biodistribución se realizaron en ratones CD1 machos de peso entre 20-25g, considerando las condiciones, AF750, HBD3M + AF750 y PBS. Los roedores fueron observados por fluorescencia con el sistema de análisis *In-vivo Xtreme Bruker Scanner* en posición ventral y dorsal. Cada experimento se realizó por triplicado (anexo 7).

En la **Fig. 19** se observa la distribución de AF750. Las imágenes dinámicas inician tras la administración intravenosa del fluoróforo. La señal que se observa después de haber administrado el tratamiento, definida aquí como tiempo cero (0 h), proviene de cola, patas traseras y delanteras, testículos, vejiga y hocico. Tras media hora (0.5 h) se observa una señal más localizada en la vejiga, los testículos, la cola, las patas delanteras, traseras y tenuemente en el hígado, la señal en estas regiones se mantiene constante después de 1h, finalmente, a las 2 y 4 h, la fluorescencia se observa en cola, patas delanteras y traseras, además de testículos y vejiga.

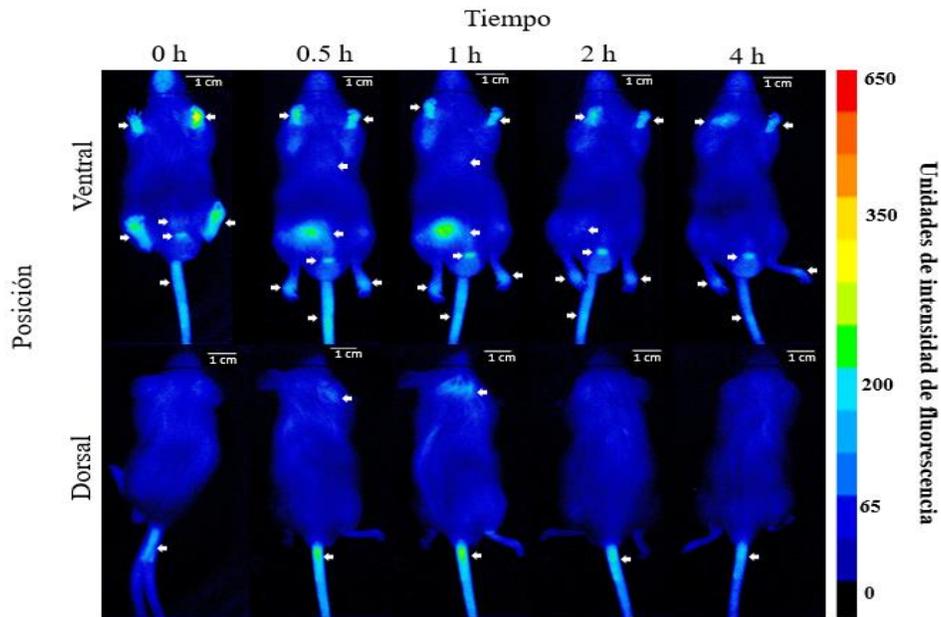


Fig. 19. Biodistribución de AF750 en ratones. Imágenes en tiempo real de cuerpo completo de ratones CD1 al tiempo 0, 0.5, 1, 2 y 4 h en posición ventral y dorsal. La barra del lado derecho muestra las unidades de intensidad de fluorescencia. Con flechas blancas se señalan las zonas en las que se presentó mayor intensidad de fluorescencia.

En la **Fig. 20**, se observa la biodistribución de HBD3M + AF750 a los mismos tiempos que en el experimento anterior. Desde el inicio (0 h), se observa fluorescencia en: cola, patas traseras y delanteras, además de orejas, testículos, vejiga, hígado y hocico. Tras 0.5 h la señal continúa siendo intensa en las regiones antes mencionadas, pero existe señal más localizada en testículos,

hígado, riñones y vejiga, donde se observa la mayor intensidad de fluorescencia. Este patrón se mantiene 1 h después de la inyección. A las 2 y 4 h solo se observa señal en la vejiga y tenuemente en el hígado.

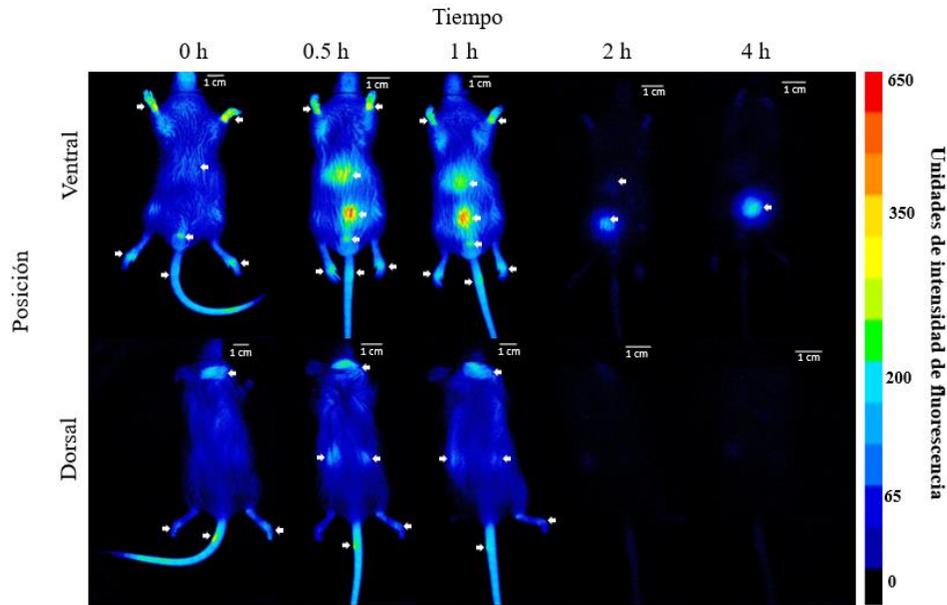


Fig. 20. Biodistribución de HBD3M marcada con AF750 en ratones. Imágenes en tiempo real de cuerpo completo de ratones CD1 a los tiempos 0, 0.5, 1, 2 y 4 h en posición ventral y dorsal. La barra del lado derecho muestra las unidades de intensidad de fluorescencia. Con flechas blancas se señalan las zonas en las que se presentó mayor intensidad de fluorescencia.

En la **Fig. 21** se observan los ratones inyectados con PBS, los cuales no recibieron ninguna molécula fluorescente y por tanto no emiten señal a la longitud de onda analizada.

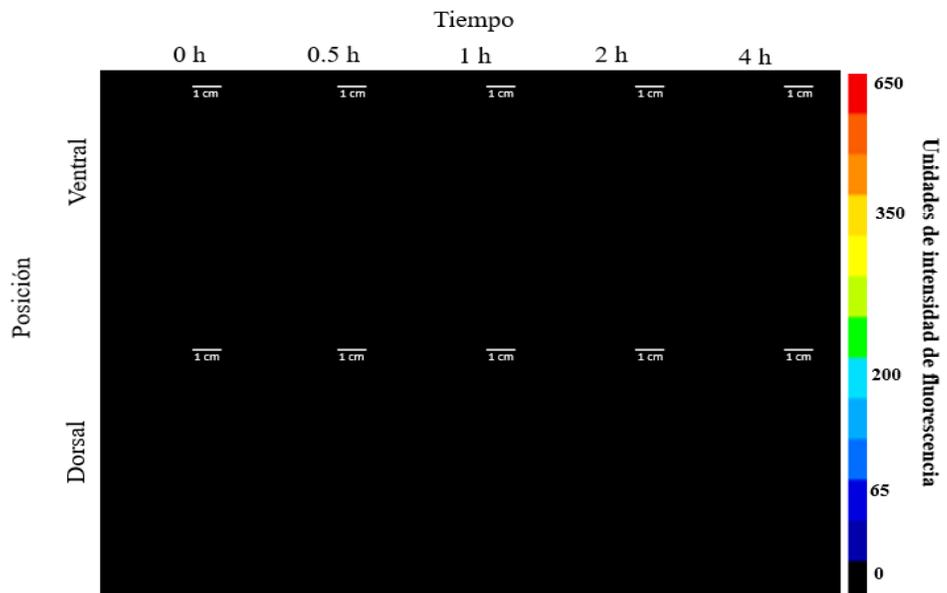
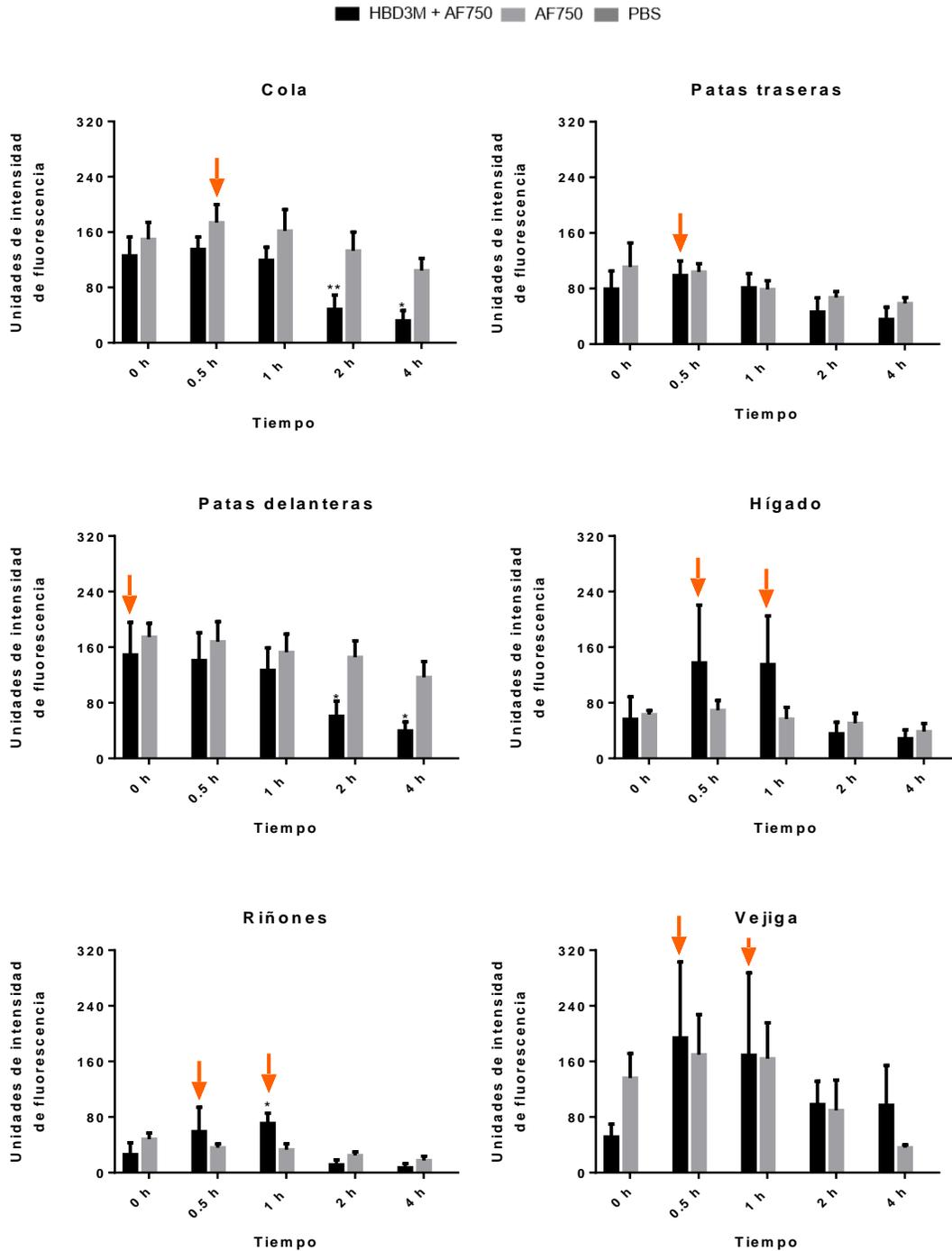


Fig. 21. Administración de PBS en ratones. Imágenes en tiempo real de cuerpo completo de ratones CD1 al tiempo 0, 0.5, 1, 2 y 4 h en posición ventral y dorsal. La barra del lado derecho muestra las unidades de intensidad de fluorescencia.

Mediante análisis de imagen de los ensayos de biodistribución (**Fig. 22**), se obtuvieron los valores de intensidad de fluorescencia de las regiones de interés. Para HBD3M + AF750 se observó mayor intensidad de fluorescencia a las 0.5 y 1 h. Se realizaron 3 réplicas de cada condición, los datos del experimento con PBS no se observan dado que todos sus valores son iguales a cero, valor esperado al ser el control negativo.



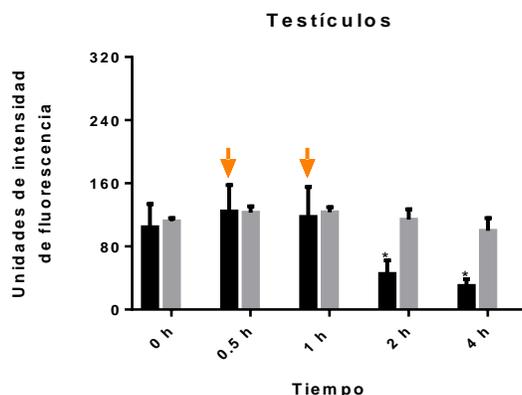


Fig. 22. Principales regiones en las que se concentra HBD3M. Mediante análisis de imagen se calculó la intensidad de fluorescencia de: Cola; Patas traseras; Patas delanteras; Hígado; Riñones; Vejiga y Testículos a diferentes tiempos. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. Se señala con una flecha el momento de mayor intensidad de señal. $P < 0.05 = *$ y $< 0.01 = **$.

9.7. HBD3M se almacena principalmente en el hígado y los riñones.

Los datos obtenidos de manera *in vivo* proporcionaron evidencia de la distribución del péptido HBD3M. Para determinar la localización específica en órganos se sacrificó a los ratones, al finalizar la visualización y se colectaron: pulmones, corazón, intestino, testículos, estómago, bazo, páncreas, hígado y riñones, estos se colocaron en cajas Petri para ser visualizados en el sistema *In-vivo Xtreme Bruker scanner*. Las imágenes generadas se analizaron con el software Fiji para determinar la intensidad de emisión de fluorescencia de cada órgano de los tres grupos de trabajo (**Fig. 23**). El principal grupo del que se observó emisión de fluorescencia fue el que recibió HBD3M + AF750, de este grupo, los órganos que mayor señal emitieron fueron: hígado y riñones. De igual forma, se observó emisión, aunque en menor intensidad, en el estómago, intestino, bazo y páncreas.

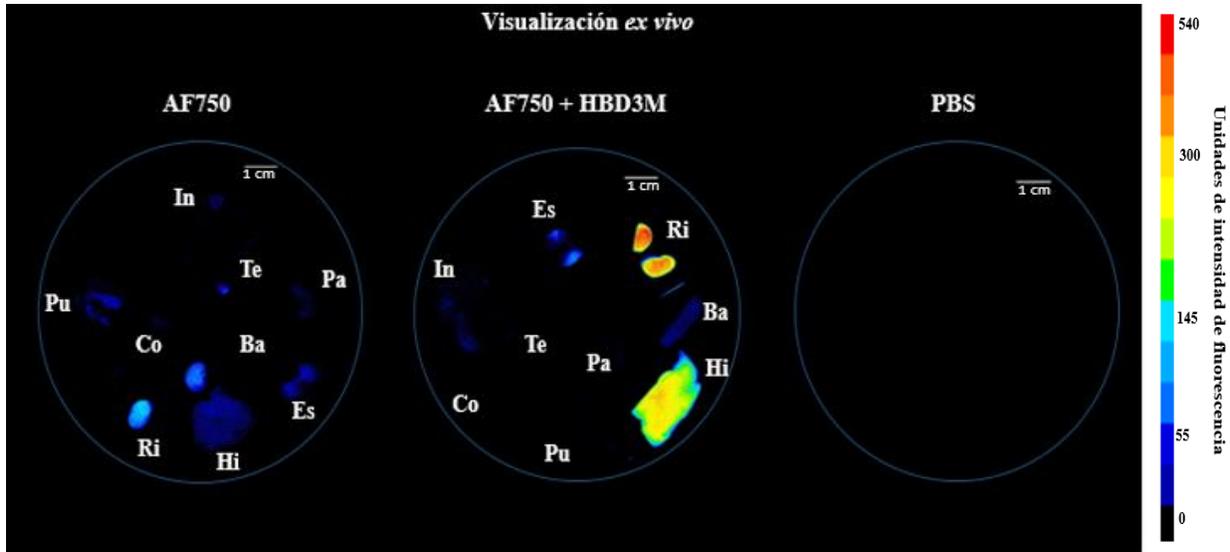


Fig. 23. Visualización *ex vivo* en órganos de ratones CD1. Fluorescencia de órganos posteriores al tratamiento. Se muestra los órganos recolectados de ratones inyectados con AF750 (izquierda), inyectados con AF750+HBD3M (centro) e inyectados con PBS (derecha). Cada órgano se identificó por sus iniciales: pulmones (**Pu**), corazón (**Co**), intestino (**In**), testículos (**Te**), estómago (**Es**), bazo (**Ba**), páncreas (**Pa**), hígado (**Hi**) y riñones (**Ri**). La barra del lado derecho muestra las unidades de intensidad de fluorescencia.

Los datos de la intensidad de fluorescencia de órganos se ilustran en la **Fig. 24** donde se aprecia la elevada intensidad de señal en hígado y riñones de HBD3M + AF750, además de la inespecificidad del AF750 en comparación con HBD3M + AF750, que mostró acumulación distinta en cada órgano. Las réplicas de este experimento se muestran en el Anexo 8.

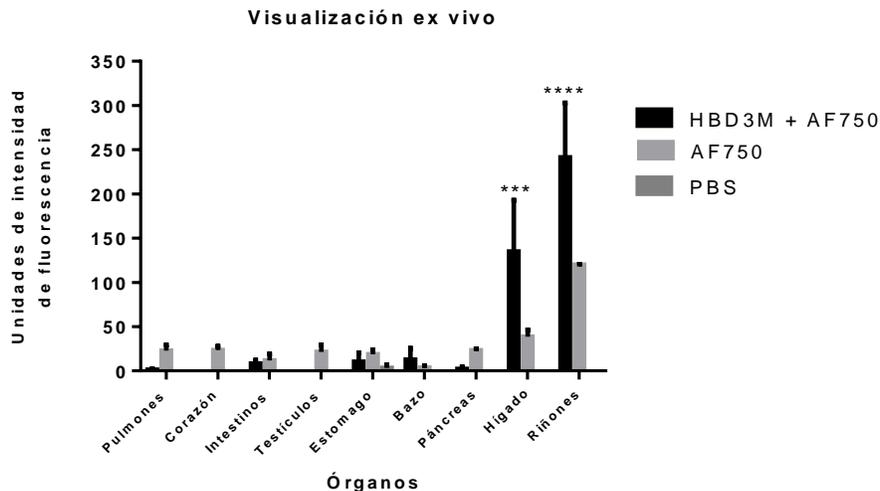


Fig. 24. Evaluación de fluorescencia *ex vivo* en órganos. Se midió la intensidad de fluorescencia promedio de los órganos de los ratones CD1 en los que se observó emisión posterior a la disección. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar. $P < 0.001 = ***$ y $P < 0.0001 = ****$.

9.8 HBD3M es eliminado vía urinaria

Durante la extracción de órganos se recolectó orina de la vejiga del ratón y se almacenó en tubos Eppendorf. Se observó intensidad de fluorescencia tanto en la condición AF750 y HBD3M + F750, no fue así en los ratones que recibieron PBS (**Fig. 25**). Finalmente se diluyeron las heces en PBS obtenida a lo largo del experimento y se analizaron de la misma manera, pero no se encontró emisión del fluoróforo (anexo 9).

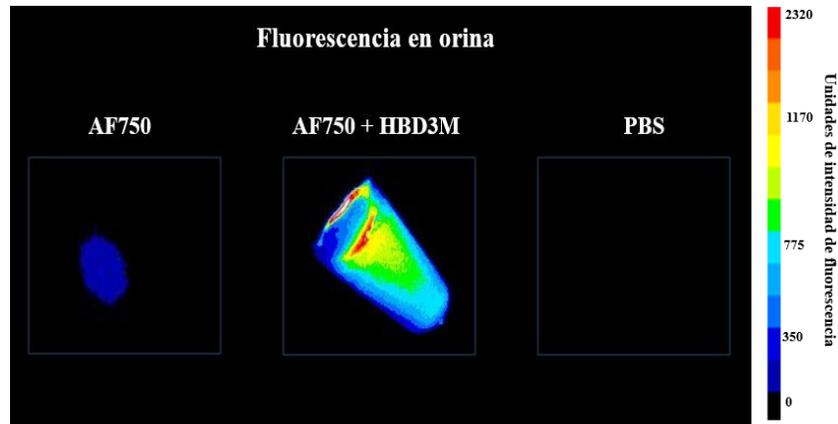


Fig. 25. Excreción de HBD3M+AF750 por vía urinaria. Orina obtenida al finalizar el experimento de visualización *in vivo* de ratones CD1. Se observa orina de ratones que recibieron AF750 (izquierda), HBD3M + AF750 (centro) y PBS (centro). La barra del lado derecho muestra las unidades de intensidad de fluorescencia.

En la **Fig. 26** se muestra la emisión de fluorescencia promedio que se obtuvo de las muestras de orina post-visualización *in vivo*. HBD3M + AF750 presentó mayor intensidad de fluorescencia que AF750, pero sin diferencia significativa.

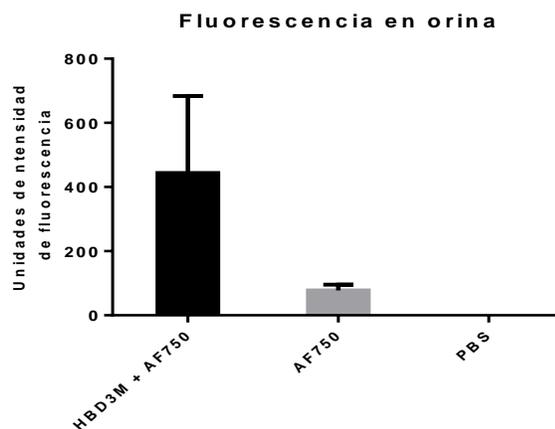


Fig. 26. Excreción de HBD3M en la orina de ratones CD1. Se observa la intensidad de fluorescencia promedio de las muestras de orina recolectadas después de 4 h de los grupos AF750, HBD3M + AF750 y PBS. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

10. Discusión

Los AMP son moléculas prometedoras para el tratamiento de infecciones bacterianas por su alta eficacia y selectividad, su variedad de dianas y su baja acumulación en tejidos. Tienen una amplia diversidad química y biológica, además de que son fáciles y rápidos de sintetizar (Boöttger *et al.*, 2017). Sin embargo, son fácilmente degradados por proteasas presentes en células, tejidos y fluidos corporales. Esto proporciona tasas de degradación rápida y previene su acumulación. Dicha inestabilidad evita su acción terapéutica, ya que ésta requiere de tiempos de circulación prolongados (Boöttger *et al.*, 2017; Cavaco *et al.*, 2021; Fa *et al.*, 2006).

Según lo establecido en Cavaco *et al.* (2021), los péptidos más estables son aquellos que tienen un pI mayor o igual a 10 y un alto porcentaje de residuos apolares, dos o más tirosinas y no más de un residuo de triptófano. La β -defensina humana recombinante HBD3M, cuenta con 13 aminoácidos no polares, 2 tirosinas, ningún triptófano y un pI teórico de 10.26, por lo que, se puede sugerir que HBD3M es un péptido resistente a la proteólisis. Se ha descrito además, que algunos AMP se auto-asocian en condiciones hidrófobas y se vuelven insolubles, lo que resulta en la pérdida de actividad y el aumento de la citotoxicidad (Mercer *et al.*, 2020). Por otro lado, se deben considerar factores como el pH, el cual afecta los estados de protonación de los grupos funcionales de la membrana celular, lo que modifica la interacción del péptido con ella (Baxter *et al.*, 2017; Heymich *et al.*, 2021; Mercer *et al.*, 2020). Es por esto que evaluar la estabilidad peptídica contribuye a formular estrategias eficaces para la aplicación terapéutica de los péptidos antimicrobianos en modelos vivos. En este proyecto se estudió la interacción del péptido antimicrobiano HBD3M a nivel *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* con plasma y orina de ratones CD1 durante diferentes lapsos de tiempo, además de su distribución cuando es administrado vía intravenosa.

Siguiendo el protocolo de Galeana (2020), se cuantificó el área bajo la curva de las fracciones correspondientes a los tiempos 19-20 min, dado que es el tiempo en el que eluye HBD3M. Se observó que el péptido se mantuvo estable cuando se le incubó en orina por 24 h (**Fig. 11**), aunque, su área se redujo de manera significativa con respecto al control (**Fig. 12**). Por otro lado, el área de HBD3M incubada en plasma por 24 h solo se reduce ligeramente, sin llegar a ser significativo (**Fig. 15**). Con esto se sugiere que HBD3M es estable en plasma y orina hasta por 24 horas, aunque en diferente proporción. La orina en sí no es un ambiente hostil para la presencia de proteínas, de hecho, los roedores machos tienen en ella proteínas de función quimiosensorial o inmunitarias

(Cavaggioni, *et al.*, 2000; Hui *et al.*, 2017), es probable que estas moléculas sean el ruido de fondo que se observa en el cromatograma control de orina (**Fig. 10-B**). Por otro lado, se sabe que HBD3M está presente en la sangre, y por ende en el plasma, ya que es expresada por células epiteliales e inmunitarias (Fruitwala *et al.*, 2019). Es con esto que se podría explicar que HBD3M pueda mantenerse en ambos medios durante cierto tiempo.

El mantenimiento de HBD3M en la orina y el plasma supera al de otros péptidos de defensa, como es el caso del péptido Pin2[G] (Galeana, 2020) el cual solo se puede recuperar tras 2 h de incubación en orina y 12 h en plasma. Por otra parte, Fázio *et al.*, (2006) reportó que la gomesina, aislada de hemocitos de *Acanthoscurria gomesiana*, y sus análogos mantienen más del 80% de su integridad cuando se incuban por 48 h en el suero, lo cual se asocia con la rigidez que brindan los puentes disulfuro a su estructura. En contraste, Boöttger *et al.*, (2017) reportaron que el análogo de apidaecina, Api88, tiene valores de estabilidad sérica muy bajos (<5 min en suero de ratón), pero las variantes Api134 y Api137 resisten hasta 4 y 6 h, respectivamente. Benincasa *et al.*, (2010) reportaron que el péptido Bac7 se degrada completamente tras 8 h de incubación en el suero. Mientras que, Jin *et al.*, (2016) reportaron que el péptido ZY13 puede incubarse en el plasma humano por 6 h sin perder su actividad antimicrobiana. Con esto se concluye que, comparado con otros péptidos de defensa, HBD3M es un candidato terapéutico con buena estabilidad en el plasma y la orina.

Si bien HBD3M parece ser estable en el plasma y la orina, aún era necesario determinar si el efecto antimicrobiano se mantenía tras estar en estos medios. Para determinar esto se hicieron antibiogramas con las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 21293 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. En la **Fig.16-A** no se observa inhibición del crecimiento de *S. aureus* cuando se agrega HBD3M, tal y como había sido reportado con anterioridad por Callejas (2018) e Ibarra, (2017). En cambio, el crecimiento de *P. aeruginosa* decreció cuando se agregó la HBD3M pura y la incubada en la orina, aunque sin llegar a presentar una inhibición total. Sin embargo, cuando se usa el péptido incubado en el plasma sí se logra inhibir el crecimiento bacteriano. Es así que se puede sugerir que el incubar a HBD3M en el plasma mantiene su actividad contra *P. aeruginosa*.

Ya Maisetta (2005) reportó que la saliva y el suero disminuyen la actividad antimicrobiana de HBD3 contra *Acinetobacter actinomycetemcomitans* esto, posiblemente, se deba a la interacción con proteínas séricas, salivales, proteasas o a que los fluidos interactúan con la superficie de la bacteria enmascarando los sitios clave para la unión del péptido. En otro estudio, Maisetta (2006),

determinó el efecto bactericida de HBD3 contra aislados clínicos multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Acinetobacter baumannii*, pero también observó que su actividad en el suero se inactiva contra bacterias Gram negativas y se reduce contra bacterias Gram positivas, también demostró que HBD3 es insensible a las concentraciones fisiológicas de NaCl. Finalmente, Benincasa *et al.*, (2010) determinaron que la actividad de Bac7 (10 µM) incubado en 66% de plasma o suero murino durante 1 h reduce su actividad hacia *Salmonella entérica* serovar Typhimurium.

Otro factor que puede influir en la pérdida de la actividad antimicrobiana de HBD3M es el propio medio Mueller Hinton que, si bien es el recomendado por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) porque en él crecen bien la mayor parte de las bacterias patógenas y no contiene timina o timidina, que inhiben el efecto de ciertos fármacos (Taroco *et al.*, 2006), también presenta elevada fuerza iónica por el almidón en su composición, el cual cuenta con carga negativa, por lo que probablemente interactúa con los péptidos y decrece su actividad antimicrobiana (Corrales, 2013).

Aún con esto, diversos grupos siguen estudiando el efecto de los péptidos antimicrobianos en medio Mueller-Hinton, como es el caso de Singh *et al.*, (2019) quienes determinaron el efecto antimicrobiano de Mastoparán contra 30 muestras de *S. aureus* en medio Mueller-Hinton. Más tarde, Shah (2021) evaluó, por la misma técnica, la actividad antimicrobiana de otra clase de Mastoparán, Polybia MP-1, frente a 20 aislados de *P. aeruginosa* y determinó que es capaz de inhibir el crecimiento de 18 de los aislados, 5 de ellos MDR, por lo que el uso de antibiogramas con agar Mueller Hinton sigue siendo un método fiable para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos.

Tras determinar que HBD3M es estable en la orina y el plasma y que mantiene su efecto antimicrobiano, se observó su distribución en un modelo murino. Para ello, se marcó al péptido HBD3M con el fluoróforo Alexa Fluor 750 (AF750) y se administró por inyección en la vena caudal de ratones CD1. De esto se observó que HBD3M (**Figs. 19-22**), se distribuye a nivel sistémico por 4 h y que se acumula en regiones como: hígado, riñones, vejiga y testículos, principalmente a las 0.5 y 1 h. La rápida biodistribución se debe a que el conjugado (péptido + fluoróforo) se administró vía intravenosa, por lo cual el péptido se distribuye en el cuerpo del ratón de manera inmediata (Maya, 2007). Por otro lado, se conoce que, generalmente, los péptidos se

concentran en órganos de metabolismo intenso como hígado, riñones, tejido gastrointestinal y sangre, como fue este el caso (Hancock *et al.*, 1999; Maya, 2007; Meng *et al.*, 2018).

Comparable con los resultados de Vasquez *et al.*, (2011), quienes observaron en el hígado la mayor intensidad de fluorescencia por gramo de tejido, seguido de los riñones, los pulmones, el corazón y el cerebro después de la inyección de cuatro agentes marcados con fluorescencia. También en Benincasa *et al.*, (2010) investigaron la actividad del péptido antimicrobiano Bac7 etiquetado con Alexa flúor 680 en fluidos biológicos y en modelos *in vivo*, usando un modelo de ratón infectado con *S. typhimurium*. El conjugado Bac7-Alexa680 muestra fluorescencia en el riñón y luego en la vejiga 1, 3 y 5 h después de la inyección. En Peterson (2016), ponen a prueba a Alexa Flúor 750 como herramienta de marcaje para estudios en modelos *in vivo* y *ex vivo* en ratón, el fluoróforo estaba unido al anticuerpo bioespecífico EIBS y observó que EIBS-750 se eliminó rápidamente de la sangre y se retuvo en gran medida en el hígado, como en este caso.

La estabilidad de HBD3M *in vivo* fue menor que lo establecido en los ensayos de estabilidad *in vitro*, posiblemente por la activación de enzimas y proteínas que degradan o se unen a la defensina (Benincasa *et al.*, 2010). Por otro lado, es bien sabido que los ratones eliminan los fármacos más rápido que los humanos (Benincasa *et al.*, 2010). Esto explicaría el rápido aclaramiento peptídico pasadas tan solo 4 h después de la inyección. Por último, se observó una alta emisión de fluorescencia en el hígado y los riñones, lo que indicaría que HBD3M se acumula principalmente en estos (**Figs. 23 y 24**). Estos resultados brindan una posible comprensión del destino metabólico del péptido.

Como ya se menciona en Faure *et al.*, (2009), la acumulación de péptido en el hígado y el bazo es generalmente atribuida a su captación por el sistema reticuloendotelial. Mientras que la presencia de fluorescencia en los demás órganos se puede atribuir a que son de alta perfusión. Por otro lado, resulta interesante la fluorescencia observada en el estómago de los ratones a los que se administró PBS, lo cual se podría atribuir a la autofluorescencia de este órgano.

Finalmente, antes de sacrificar a los ratones se colectó la orina y las heces y se observó la intensidad de fluorescencia en estas muestras (**Fig. 25 y 26**). Si bien no hubo emisión de fluorescencia en las heces, sí hubo en la orina. Con esto se puede proponer que las principales regiones de acumulación de HBD3M son el hígado y el riñón, además de que la principal vía de excreción es la urinaria. Cabe mencionar que no observar fluorescencia en las heces podría indicar que la vía gástrica no es parte del sistema de eliminación de HBD3M, lo que resulta favorable,

dado que se conoce que el principal factor que limita la aplicación sistémica de AMP es su sensibilidad a la digestión proteolítica por enzimas del huésped en la mucosa intestinal y el tubo gastrointestinal (Mwangi *et al.*, 2019).

Esto es comparable a lo ocurrido en Brunetti *et al.*, (2016), donde tanto SET-M33L y SET-M33L-PEG se eliminaron, principalmente, a través de la orina, aunque ellos no descartan la metabolización hepática, pues se observa en SET-M33L-PEG una mayor acumulación en el intestino delgado después de 1 a 2 h, en consonancia con su prolongado aclaramiento plasmático, concluyendo que los péptidos suelen ser más estables en la sangre fresca y menos estables en el suero. HBD3M muestra mayor tiempo de circulación que lo reportado por Koo *et al.*, (2019) con el péptido lineal de 5 aminoácidos SGX942, el cual mostró una semivida plasmática de menos de 10 min o en Faure *et al.*, (2009) quien al inyectar vía por intravenosa nanopartículas recubiertas por PEG250-COOH, observó su acumulación en los riñones y la vejiga por solo 15 min, aunque su otro péptido PEG2000-COOH, se mantiene en la vejiga por 1 h. Sin embargo, HBD3M presenta menor tiempo en comparación a los péptidos comerciales daptomicina, oritavancin, dalbavancin, telavancin, y colistin reportados en Chen *et al.*, (2020), cuya semivida de eliminación fue de 8-9 h, 14 días, 8 h, 195.4 h y 5 h, respectivamente. Esta acumulación peptídica en el hígado y los riñones y su excreción en la orina es una cualidad compartida con otros AMP.

Actualmente, se busca mejorar la biodistribución de los AMP, así como su selectividad por células microbianas, al tiempo que se reduce su citotoxicidad, aumenta su estabilidad y minimiza la degradación proteolítica (Zhao *et al.*, 2016). Como hemos visto, los ensayos de biodistribución permiten cuantificar los cambios temporales de concentración de la molécula de interés en diferentes tiempos y los principales sitios de acumulación en órganos (Achilefu, 2004; Peterson *et al.*, 2016; Vasquez *et al.*, 2011). HBD3M es un buen candidato para tratamientos a nivel sistémico, dado que se distribuye por todo el cuerpo y al final sea posiblemente metabolizado por el hígado y los riñones, para luego ser excretado en la orina orina. Sin embargo, su distribución en un modelo de infección o bajo alguna condición que altere el metabolismo del modelo de investigación, sigue sin conocerse. Continuar con esta línea permitirá desarrollar metodologías que mejoren la aplicación de moléculas como los AMP a sistemas de infección bacteriana y fortalecer la defensa ante la batalla en contra de los organismos MDR.

11. Conclusiones

- A nivel *in vitro*, se observó que HBD3M parece ser estable en el plasma y la orina durante 24 h.
- La incubación de HBD3M en la orina y el plasma no modifica su actividad antimicrobiana contra *S. aureus*.
- La incubación de HBD3M en la orina decreció el efecto contra *P. aeruginosa*.
- HBD3M incubado en el plasma mantiene su efecto antimicrobiano contra *P. aeruginosa*.
- HBD3M + AF750 se distribuye por 4 h a nivel sistémico en el modelo murino.
- La fluorescencia en ratones que reciben el conjugado HBD3M + AF750 se localiza, principalmente, en la vejiga, el hígado, los testículos y los riñones.
- HBD3M parece acumularse en el hígado y los riñones y ser excretada en la orina.

12. Perspectivas

- Establecer periodos de incubación peptídica con otros fluidos, como es la sangre completa.
- Realizar cinéticas de biodistribución de HBD3M + AF750 en órganos a diferentes periodos de tiempo.
- Hacer ensayos histológicos que permitan identificar la presencia de HBD3M en diferentes tejidos.
- Analizar la actividad de HBD3M en modelos de infección hepática o de vías urinarias, dado que son los principales órganos de acumulación.
- Optimizar la vida media en esta vía de administración.

Bibliografía

- Acevedo Fernández, J. J., Angeles Chimal, J. S., Rivera, H. M., Petricevich López, V. L., Nolasco Quintana, N. Y., Collí Magaña, D. Y., & Santa-Olalla Tapia, J. (2013). Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. *Bioactividad de Péptidos Derivados de Proteínas Alimentarias*, *April*, 29–82. <https://doi.org/10.3926/oms.38>
- Achilefu, S. (2004). Lighting up tumors with receptor-specific optical molecular probes. *Technology in Cancer Research and Treatment*, *3*(4), 393–409. <https://doi.org/10.1177/153303460400300410>
- Ageitos, J. M., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., & Villa, T. G. (2017). Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology*, *133*, 117–138. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.018>
- Ahmed, A., Siman-Tov, G., Hall, G., Bhalla, N., & Narayanan, A. (2019). Human Antimicrobial Peptides as Therapeutics for Viral Infections. *Viruses*, *11*(8), 704. <https://doi.org/10.3390/v11080704>
- Alvarado, D., Cardoso-Arenas, S., Corrales-García, L.-L., Clement, H., Arenas, I., Montero-Dominguez, P. A., Olamendi-Portugal, T., Zamudio, F., Csoti, A., Borrego, J., Panyi, G., Papp, F., & Corzo, G. (2021). A Novel Insecticidal Spider Peptide that Affects the Mammalian Voltage-Gated Ion Channel hKv1.5. *Frontiers in Pharmacology*, *11*(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.563858>
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, *6*(12), 1543–1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Bastos, P., Trindade, F., da Costa, J., Ferreira, R., & Vitorino, R. (2018). Human Antimicrobial Peptides in Bodily Fluids: Current Knowledge and Therapeutic Perspectives in the Postantibiotic Era. *Medicinal Research Reviews*, *38*(1), 101–146. <https://doi.org/10.1002/med.21435>
- Bauer, M. E., & Shafer, W. M. (2015). On the in vivo significance of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*(11), 3101–3111. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2015.02.012>
- Baxter, A. A., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Kvansakul, M., & Hulett, M. D. (2017). Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(20), 3809–3825. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2604-z>
- Benincasa, M., Pelillo, C., Zorzet, S., Garrovo, C., Biffi, S., Gennaro, R., & Scocchi, M. (2010). The proline-rich peptide Bac7(1-35) reduces mortality from Salmonella typhimurium in a mouse model of infection. *BMC Microbiology*, *10*(1), 178. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-178>
- Biswaro, L. S., da Costa Sousa, M. G., Rezende, T. M. B., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2018). Antimicrobial Peptides and Nanotechnology, Recent Advances and Challenges. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00855>
- Boöttger, R., Hoffmann, R., & Knappe, D. (2017). Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLoS ONE*, *12*(6), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178943>
- Braff, M. H., Bardan, A., Nizet, V., & Gallo, R. L. (2005). Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *Journal of Investigative Dermatology*, *125*(1), 9–13. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23587.x>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, *3*(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Brunetti, J., Falciani, C., Roscia, G., Pollini, S., Bindi, S., Scali, S., Arrieta, U. C., Gomez-Vallejo, V., Quercini, L., Ibba, E., Prato, M., Rossolini, G. M., Llop, J., Bracci, L., & Pini, A. (2016). In vitro and in vivo efficacy, toxicity, bio-distribution and resistance selection of a novel antibacterial drug candidate. *Scientific Reports*, *6*(January), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep26077>
- Callejaz, A. (2018). *Evaluación de la eficacia de una beta defensina humana recombinante en combinación con antibióticos contra bacterias de interés clínico*.
- Campoverde, C., Milne, D. J., Estévez, A., Duncan, N., Secombes, C. J., & Andree, K. B. (2017). Ontogeny and modulation after PAMPs stimulation of β -defensin, hepcidin, and piscidin antimicrobial peptides in meagre (*Argyrosomus regius*). *Fish & Shellfish Immunology*, *69*, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.026>
- Cavaco, M., Valle, J., Flores, I., Andreu, D., & A. R. B. Castanho, M. (2021). Estimating peptide half-life in serum from tunable, sequence-related physicochemical properties. *Clinical and Translational Science*, *14*(4), 1349–1358. <https://doi.org/10.1111/cts.12985>
- Cavaggioni, A., & Mucignat-Caretta, C. (2000). Major urinary proteins, alpha (2U)-globulins and aphrodisin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, *1482*, 218–228.
- Chen, C. H., & Lu, T. K. (2020). Development and Challenges of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. *Antibiotics*, *9*(1), 24. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>

- Corrales-García, L. L., Possani, L. D., & Corzo, G. (2010). Expression systems of human β -defensins: Vectors, purification and biological activities. *Amino Acids*, *40*(1), 5–13. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0493-7>
- Corrales-García, L., Ortiz, E., Castañeda-Delgado, J., Rivas-Santiago, B., & Corzo, G. (2013). Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*. *Protein Expression and Purification*, *89*(1), 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.02.007>
- Corrales, L. (2013). *β -defensinas humanas: Expresión heteróloga y actividad biológica*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S., & Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical Journal*, *359*(1), 35. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590035>
- da Cunha, N. B., Cobacho, N. B., Viana, J. F. C., Lima, L. A., Sampaio, K. B. O., Dohms, S. S. M., Ferreira, A. C. R., de la Fuente-Núñez, C., Costa, F. F., Franco, O. L., & Dias, S. C. (2017). The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discovery Today*, *22*(2), 234–248. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.10.017>
- Dai, T., Kharkwal, G. B., Tanaka, M., Huang, Y. Y., Bil de Arce, V. J., & Hamblin, M. R. (2011). Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence*, *2*(4). <https://doi.org/10.4161/viru.2.4.16840>
- Davenport, A. P., Scully, C. C. G., de Graaf, C., Brown, A. J. H., & Maguire, J. J. (2020). Advances in therapeutic peptides targeting G protein-coupled receptors. *Nature Reviews Drug Discovery*, *19*(6), 389–413. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0062-z>
- De Cesare, G. B., Cristy, S. A., Garsin, D. A., & Lorenz, M. C. (2020). Antimicrobial peptides: A new frontier in antifungal therapy. *MBio*, *11*(6), 1–21. <https://doi.org/10.1128/mBio.02123-20>
- de la Fuente-Núñez, C., Silva, O. N., Lu, T. K., & Franco, O. L. (2017). Antimicrobial peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies. *Pharmacology and Therapeutics*, *178*, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.04.002>
- de Paula, V. S., & Valente, A. P. (2018). A Dynamic Overview of Antimicrobial Peptides and Their Complexes. *Molecules*, *23*(8), 2040. <https://doi.org/10.3390/molecules23082040>
- Eband, R. M., Rotem, S., Mor, A., Berno, B., & Eband, R. F. (2008). Bacterial Membranes as Predictors of Antimicrobial Potency. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(43), 14346–14352. <https://doi.org/10.1021/ja8062327>
- Faure, A.-C., Dufort, S., Jossierand, V., Perriat, P., Coll, J.-L., Roux, S., & Tillement, O. (2009). Control of the in vivo Biodistribution of Hybrid Nanoparticles with Different Poly(ethylene glycol) Coatings. *Small*, *5*(22), 2565–2575. <https://doi.org/10.1002/sml.200900563>
- Fázio, M. A., Oliveira, V. X., Bulet, P., Miranda, M. T. M., Daffre, S., & Miranda, A. (2006). Structure-activity relationship studies of gomesin: Importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. *Biopolymers*, *84*(2), 205–218. <https://doi.org/10.1002/bip.20396>
- Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, *11*(1), 37–51. <https://doi.org/10.1038/nrd3591>
- Fruitwala, S., El-Naccache, D. W., & Chang, T. L. (2019). Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *88*, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.023>
- Hale, J. D. F., & Hancock, R. E. W. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *5*(6), 951–959. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.6.951>
- Hancock, R. E., & Chapple, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *43*(6), 1317–1323. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1317>
- Hata, T. R., & Gallo, R. L. (2008). Antimicrobial Peptides, Skin Infections, and Atopic Dermatitis. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, *27*(2), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.sder.2008.04.002>
- Hernández, Galeana, Leticia, M. (2020). *Análisis de la farmacocinética y biodistribución del péptido antimicrobiano Pin2[G] aislado del escorpión Pandinus imperator en un modelo murino*.
- Heymich, M.-L., Srirangan, S., & Pischetsrieder, M. (2021). Stability and Activity of the Antimicrobial Peptide Leg1 in Solution and on Meat and Its Optimized Generation from Chickpea Storage Protein. *Foods*, *10*(6), 1192. <https://doi.org/10.3390/foods10061192>
- Hui, C.-Y., Guo, Y., Zhang, W., Yang, X.-Q., Gao, C.-X., & Yang, X.-Y. (2017). Isolation and characterization of antimicrobial peptides from healthy male urine. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *30*(2), 363–367. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28649057>
- Ibarra, M. (2017). *Acción de péptidos antimicrobianos en infecciones tópicas en animales modelo*. Universidad Nacional Autónoma de México.

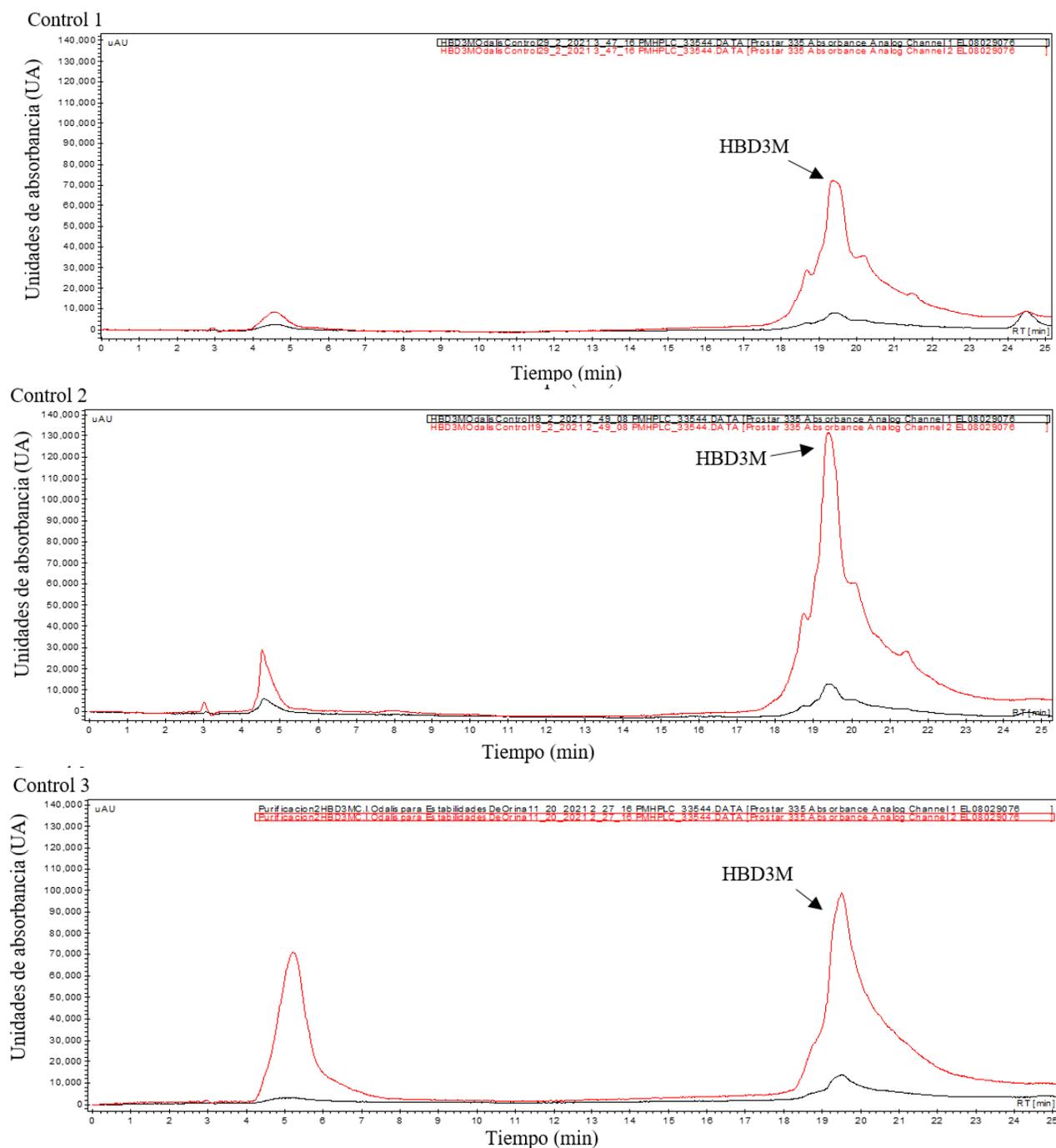
- James Singh, R., Shrivastava, S., Nal, S., Shah, P., Gogoi, P., Srivastava, S., Hussain, S., Bisht, D., Kodape, S., Khandare, R., & Singh, R. K. (2019). Biophysical Characterization of Chemically Synthesized Antimicrobial Peptide ‘Mastoparan’ and Evaluation of its Activity on *Staphylococcus aureus* Isolated from Mastitic Milk. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(11), 368–374. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.811.046>
- Jin, G., & Weinberg, A. (2019). Human antimicrobial peptides and cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 88, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.04.006>
- Jin, L., Bai, X., Luan, N., Yao, H., Zhang, Z., Liu, W., Chen, Y., Yan, X., Rong, M., Lai, R., & Lu, Q. (2016). A Designed Tryptophan- and Lysine/Arginine-Rich Antimicrobial Peptide with Therapeutic Potential for Clinical Antibiotic-Resistant *Candida albicans* Vaginitis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(5), 1791–1799. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01264>
- Kang, H.-K., Kim, C., Seo, C. H., & Park, Y. (2017). The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of Microbiology*, 55(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6452-1>
- Khurshid, Z., Zafar, M. S., Naseem, M., Khan, R. S., & Najeeb, S. (2018). Human Oral Defensins Antimicrobial Peptides: A Future Promising Antimicrobial Drug. *Current Pharmaceutical Design*, 24(10), 1130–1137. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180403114615>
- Koo, H. B., & Seo, J. (2019). Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Peptide Science*, 111(5). <https://doi.org/10.1002/pep.2.24122>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J., & Straus, S. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Lazzaro, B. P., Zasloff, M., & Rolff, J. (2020). Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science*, 368(6490), eaau5480. <https://doi.org/10.1126/science.aau5480>
- Lei, J., Sun, L. C., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., & He, Q. Y. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7), 3919–3931.
- López, A. (2020). *Identificación in silico de Interacciones de Péptidos Antimicrobianos con Receptores Inmunitarios*. Universidad Autonoma del Estado de Morelos.
- Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A. L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A., Giulianotti, M. A., Apidianakis, Y., Bradfute, S., Ferguson, A. L., Cherkasov, A., Seleem, M. N., Pinilla, C., de la Fuente-Nunez, C., Lazaridis, T., Dai, T., Houghten, R. A., Hancock, R. E. W., & Tegos, G. P. (2020). The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(9), e216–e230. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3)
- Maisetta, G., Batoni, G., Esin, S., Florido, W., Bottai, D., Favilli, F., Florio, W., & Campa, M. (2006). In Vitro Bactericidal Activity of Human β -Defensin 3 against Multidrug-Resistant Nosocomial Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(2), 806–809. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.2.806-809.2006>
- Maisetta, G., Batoni, G., Esin, S., Raco, G., Bottai, D., Favilli, F., Florio, W., & Campa, M. (2005). Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to Bactericidal Activity of Human β -Defensin 3 in Biological Fluids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 1245–1248. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.1245-1248.2005>
- Maisetta, G., Di Luca, M., Esin, S., Florio, W., Brancatisano, F. L., Bottai, D., Campa, M., & Batoni, G. (2008). Evaluation of the inhibitory effects of human serum components on bactericidal activity of human beta defensin 3. *Peptides*, 29(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.10.013>
- Marañón, M., Pérez, L., Font, O., & Moya, A. (2016). Modelos y ensayos para el estudio de la angiogénesis. *MEDISAN*, 20(1), 102–110.
- Martínez, M. F., & Quiñones, L. A. (2018). Relationship Between Pharmacokinetics and Pharmacogenomics and Its Impact on Drug Choice and Dose Regimens. In A. Talevi & P. A. M. Quiroga (Eds.), *ADME Processes in Pharmaceutical Sciences* (Issue January, pp. 169–202). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99593-9_8
- Maya, J. D. (2007). Farmacocinética: absorción y distribución. *Medwave*, 7(4). <https://doi.org/10.5867/medwave.2007.04.3449>
- Meibohm, B. (2019). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Therapeutic Peptides and Proteins. In D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, & B. Meibohm (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology* (pp. 105–137). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00710-2_6
- Meng, F., Wang, J., Ping, Q., & Yeo, Y. (2018). Quantitative Assessment of Nanoparticle Biodistribution by Fluorescence Imaging, Revisited. *ACS Nano*, 12(7), 6458–6468. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02881>
- Mercer, D. K., Torres, M. D. T., Duay, S. S., Lovie, E., Simpson, L., von Köckritz-Blickwede, M., de la Fuente-Nunez, C., O’Neil, D. A., & Angeles-Boza, A. M. (2020). Antimicrobial Susceptibility Testing of Antimicrobial Peptides to Better Predict Efficacy. *Frontiers in*

- Cellular and Infection Microbiology*, 10(July), 1–34. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00326>
- Mestas, J., & Hughes, C. C. W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology*, 172(5), 2731–2738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- Mookherjee, N., Anderson, M. A., Haagsman, H. P., & Davidson, D. J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(5), 311–332. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0058-8>
- Mourelle, C., Herrero, E., & Ricca, M. (2013). Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. *Spei Domus*, 9(19), 39–47. <https://doi.org/10.16925/sp.v9i19.708>
- Mücke, P. A., Ostrzinski, A., Hammerschmidt, S., Maaß, S., & Becher, D. (2020). Proteomic adaptation of streptococcus pneumoniae to the antimicrobial peptide human beta defensin 3 (Hbd3) in comparison to other cell surface stresses. *Microorganisms*, 8(11), 1–9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111697>
- Mwangi, J., Hao, X., Lai, R., & Zhang, Z.-Y. (2019). Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance. *Zool. Res.*, 40(6), 488–505. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062>
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Patel, S., & Akhtar, N. (2017). Antimicrobial peptides (AMPs): The quintessential ‘offense and defense’ molecules are more than antimicrobials. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95(July), 1276–1283. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.042>
- Pen, G., Yang, N., Teng, D., Mao, R., Hao, Y., & Wang, J. (2020). A Review on the Use of Antimicrobial Peptides to Combat Porcine Viruses. *Antibiotics*, 9(11), 801. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110801>
- Peterson, N. C., Wilson, G. G., Huang, Q., Dimasi, N., & Sachsenmeier, K. F. (2016). Biodistribution analyses of a near-infrared, fluorescently labeled, bispecific monoclonal antibody using optical imaging. *Comparative Medicine*, 66(2), 90–99.
- Phoenix, D. A., Dennison, S. R., & Harris, F. (2013). Antimicrobial Peptides: Their History, Evolution, and Functional Promiscuity. *Antimicrobial Peptides*, 1–37. <https://doi.org/10.1002/9783527652853.ch1>
- Rai, M., & Padh, H. (2001). Expression systems for production of heterologous proteins. *Current Science*, 80(9), 1121–1128.
- Röhl, J., Yang, D., Oppenheim, J. J., & Hehlhans, T. (2010). Human β -Defensin 2 and 3 and Their Mouse Orthologs Induce Chemotaxis through Interaction with CCR2. *The Journal of Immunology*, 184(12), 6688–6694. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903984>
- Romero Romero, S., Fernández Velasco, D. A., & Costas, M. (2018). Estabilidad termodinámica de proteínas. *Educación Química*, 29(3), 3. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2018.3.64699>
- Seyfi, R., Kahaki, F. A., Ebrahimi, T., Montazersaheb, S., Eyvazi, S., Babaeipour, V., & Tarhriz, V. (2020). Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(3), 1451–1463. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09946-9>
- Shah, P., Shrivastava, S., Singh, R. J., Gogoi, P., Saxena, S., Srivastava, S., Kumar, N., & Gaur, G. K. (2021). Synthetic Antimicrobial Peptide Polybia MP-1 (Mastoparan) Inhibits Growth of Antibiotic Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolates From Mastitic Cow Milk. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(4), 2471–2486. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10266-0>
- Sochacki, K. A., Barns, K. J., Bucki, R., & Weisshaar, J. C. (2011). Real-time attack on single Escherichia coli cells by the human antimicrobial peptide LL-37. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(16), E77–E81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101130108>
- Sudheendra, U. S., Dhople, V., Datta, A., Kar, R. K., Shelburne, C. E., Bhunia, A., & Ramamoorthy, A. (2015). Membrane disruptive antimicrobial activities of human β -defensin-3 analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 91, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.021>
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica, Oficina Del Libro FEFMUR, Uruguay*, 36(1), 665–668.
- Tyagi, P., Pechenov, S., & Anand Subramony, J. (2018). Oral peptide delivery: Translational challenges due to physiological effects. *Journal of Controlled Release*, 287, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.032>
- Vasquez, K. O., Casavant, C., & Peterson, J. D. (2011). Quantitative Whole Body Biodistribution of Fluorescent-Labeled Agents by Non-Invasive Tomographic Imaging. *PLoS ONE*, 6(6), e20594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020594>
- Wang, G. (2015). Improved Methods for Classification, Prediction, and Design of Antimicrobial Peptides. In *Computational Peptidology* (Vol. 1268, pp. 43–66). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2285-7_3
- Wang, J., Dou, X., Song, J., Lyu, Y., Zhu, X., Xu, L., Li, W., & Shan, A. (2019). Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post

- feeding antibiotic era. *Medicinal Research Reviews*, 39(3), 831–859. <https://doi.org/10.1002/med.21542>
- Wenzel, M., Chiriac, A. I., Otto, A., Zweytick, D., May, C., Schumacher, C., Gust, R., Albada, H. B., Penkova, M., Kramer, U., Erdmann, R., Metzler-Nolte, N., Straus, S. K., Bremer, E., Becher, D., Brotz-Oesterheld, H., Sahl, H.-G., & Bandow, J. E. (2014). Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), E1409–E1418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319900111>
- Wu, Z., Hoover, D. M., Yang, D., Boulègue, C., Santamaria, F., Oppenheim, J. J., Lubkowski, J., & Lu, W. (2003). Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human β -defensin 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8880–8885. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533186100>
- Yang, M., Zhang, C., Zhang, M. Z., & Zhang, S. (2018). Beta-defensin derived cationic antimicrobial peptides with potent killing activity against gram negative and gram positive bacteria. *BMC Microbiology*, 18(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1190-z>
- Yasir, M., Willcox, M., & Dutta, D. (2018). Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials*, 11(12), 2468. <https://doi.org/10.3390/ma11122468>
- 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>
- Zelmer, A., & Ward, T. H. (2013). Noninvasive fluorescence imaging of small animals. *Journal of Microscopy*, 252(1), 8–15. <https://doi.org/10.1111/jmi.12063>
- Zhang, C., & Yang, M. (2020). The Role and Potential Application of Antimicrobial Peptides in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 11(May), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00859>
- Zhao, C., Fernandez, A., Avlonitis, N., Vande Velde, G., Bradley, M., Read, N. D., & Vendrell, M. (2016). Searching for the Optimal Fluorophore to Label Antimicrobial Peptides. *ACS Combinatorial Science*, 18(11), 689–696. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.6b00081>

Anexos

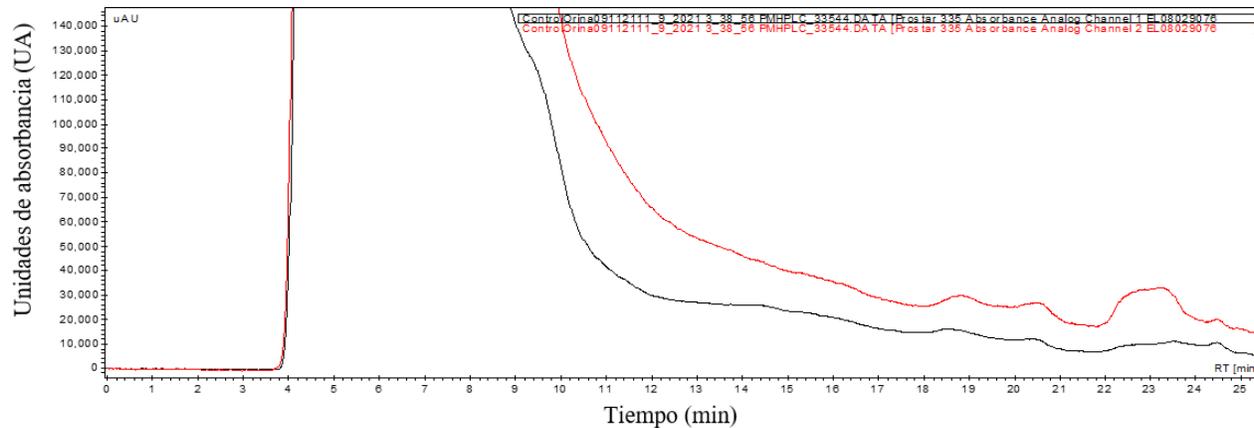
Anexo 1. Triplicado de controles de HBD3M



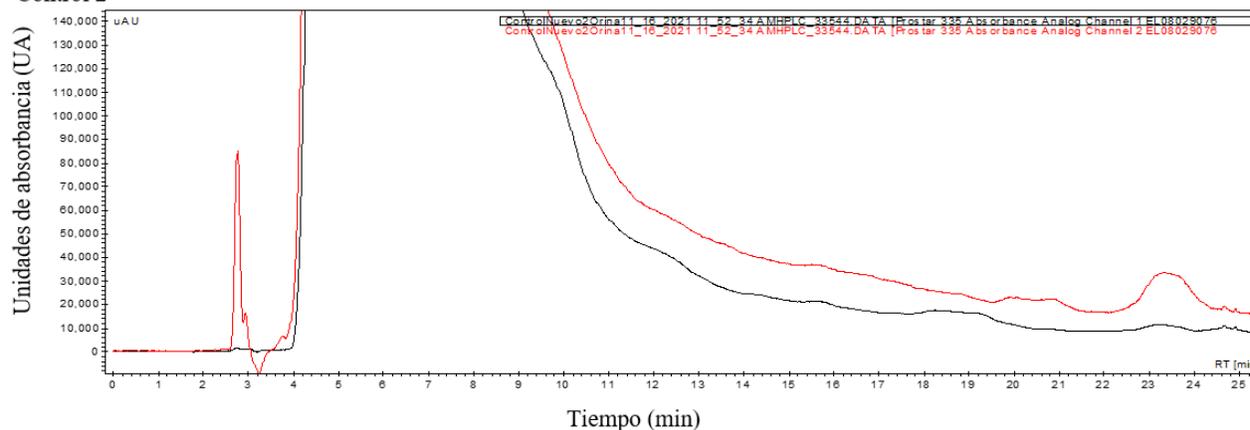
Cromatograma de los controles de HBD3M. Se muestran los cromatogramas de HBD3M (100 µg). Se hizo HPLC en columna C18 de fase reversa Vydac 218TP (C18, 4.6 x 250 mm). Gradiente de 80-20% de H₂O + TFA al 0.1% (A) y acetonitrilo + TFA al 0.1% (B). Flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

Anexo 2. Triplicado de controles de orina

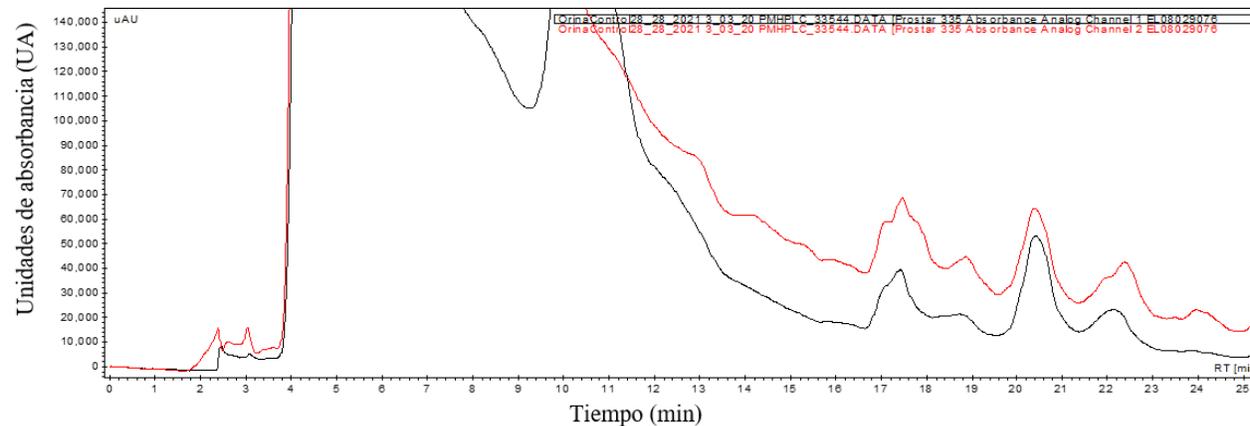
Control 1



Control 2

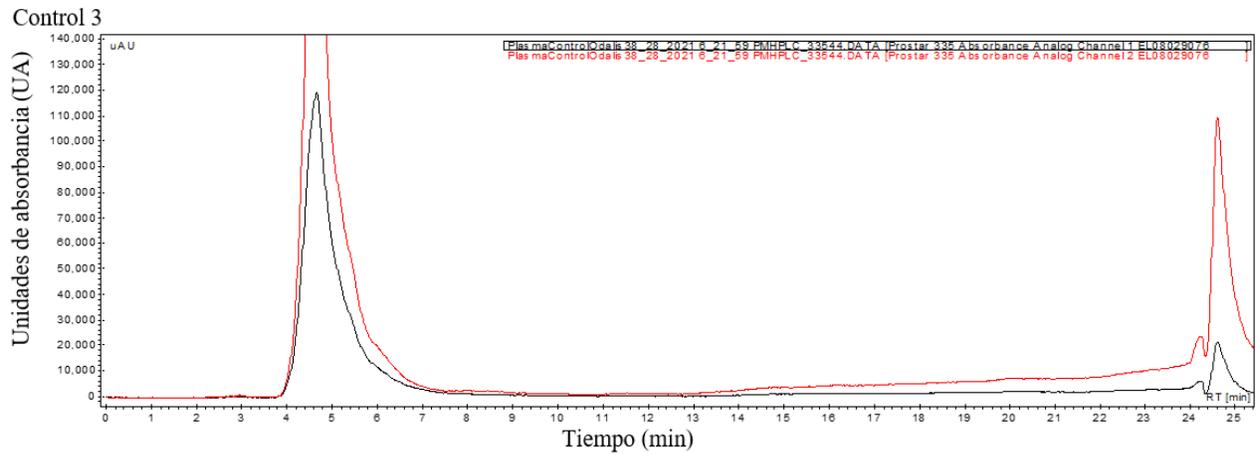
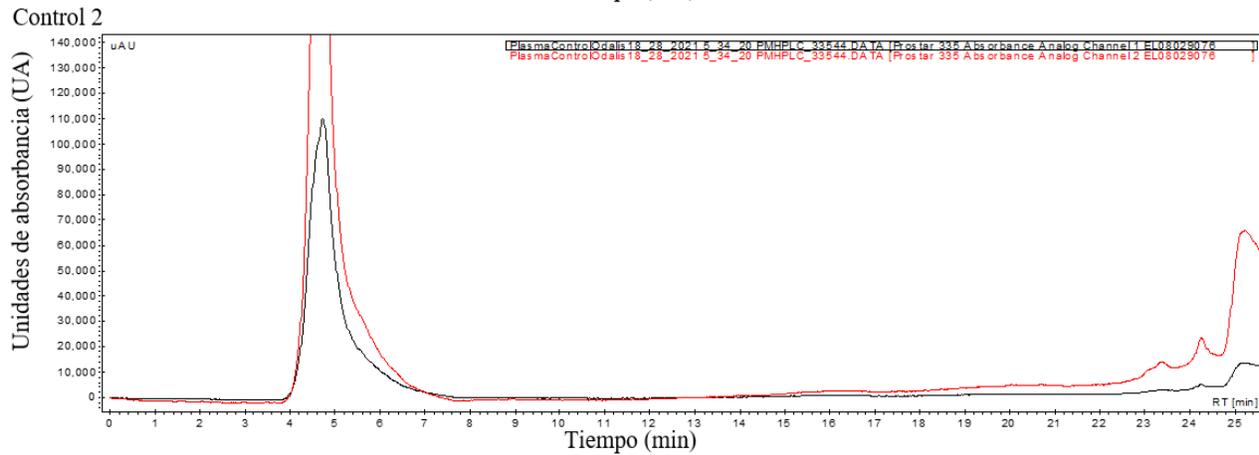
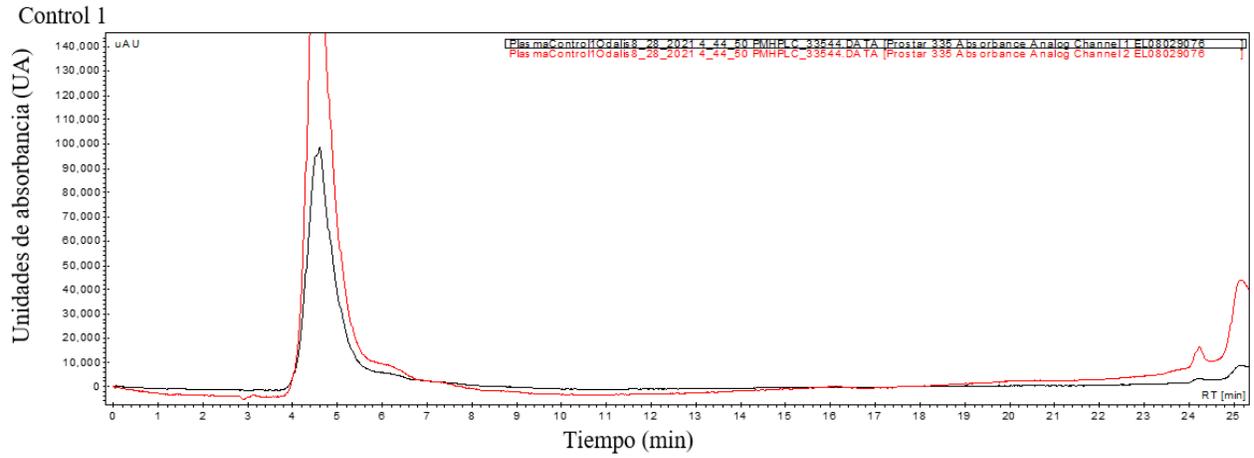


Control 3



Cromatograma de los controles de orina. Se muestran los cromatogramas de orina (50 μ l). Se hizo HPLC en columna C18 de fase reversa Vydac 218TP (C18, 4.6 x 250 mm). Gradiente de 80-20% de H₂O + TFA al 0.1% (A) y acetonitrilo + TFA al 0.1% (B). Flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro).

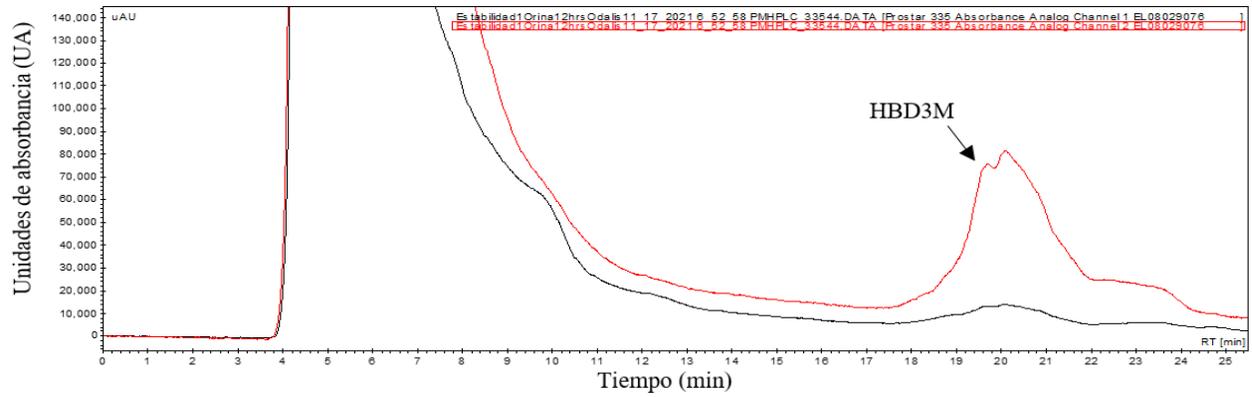
Anexo 3. Triplicado de controles de plasma



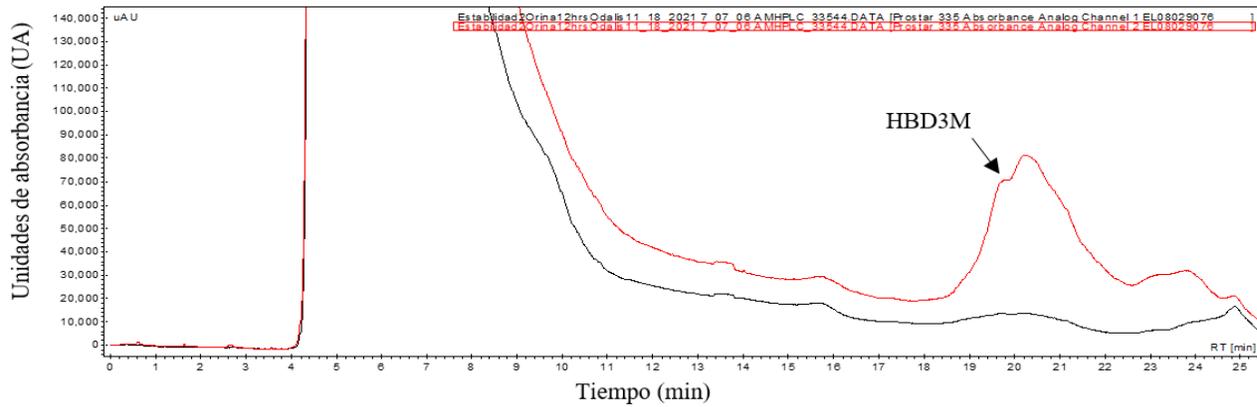
Cromatograma de los controles de plasma. Se muestran los cromatogramas de plasma (50 μ l). Se hizo HPLC en columna C18 de fase reversa Vydac 218TP (C18, 4.6 x 250 mm). Gradiente de 80-20% de H₂O + TFA al 0.1% (A) y acetonitrilo + TFA al 0.1% (B). Flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro).

Anexo 4: Estabilidad de HBD3M en orina

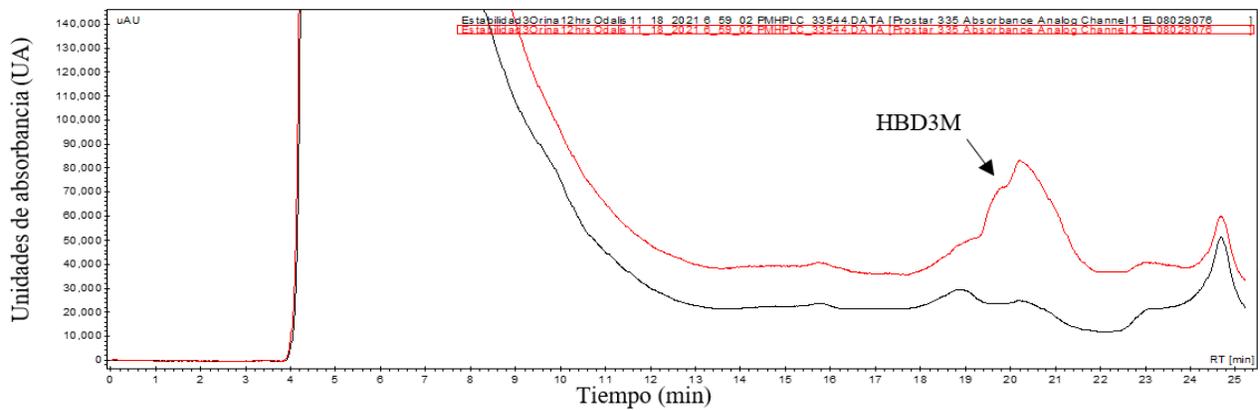
1)



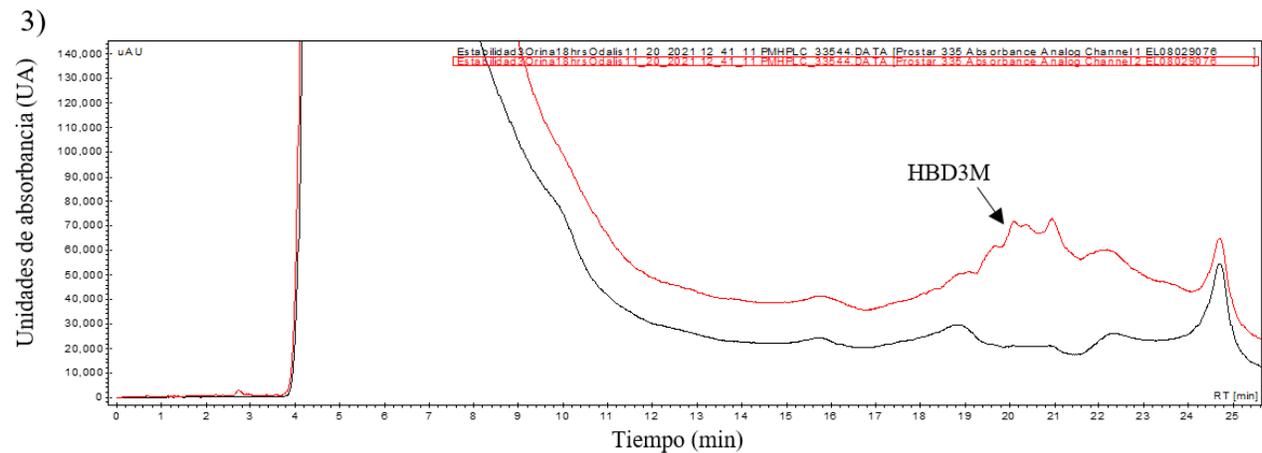
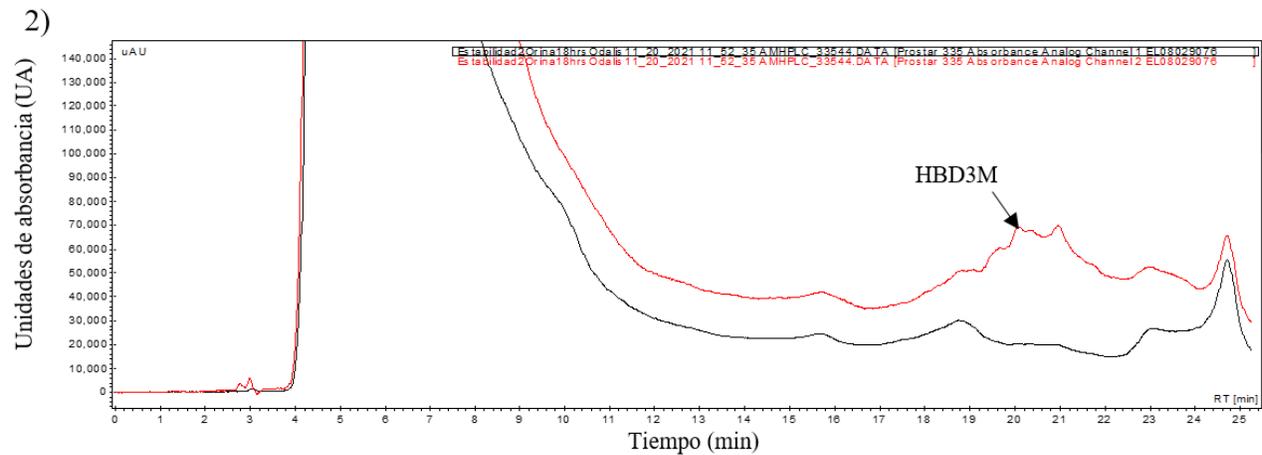
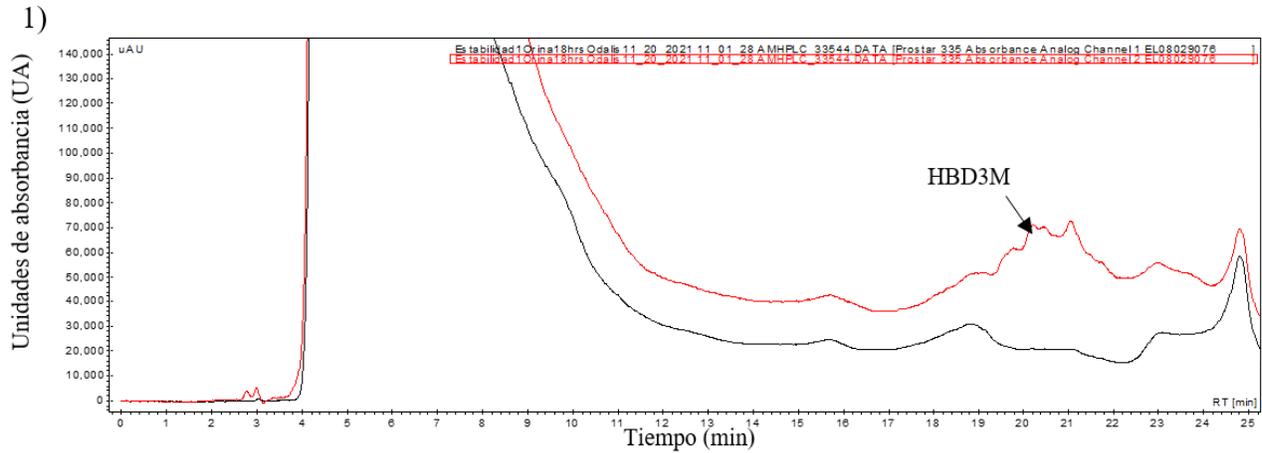
2)



3)

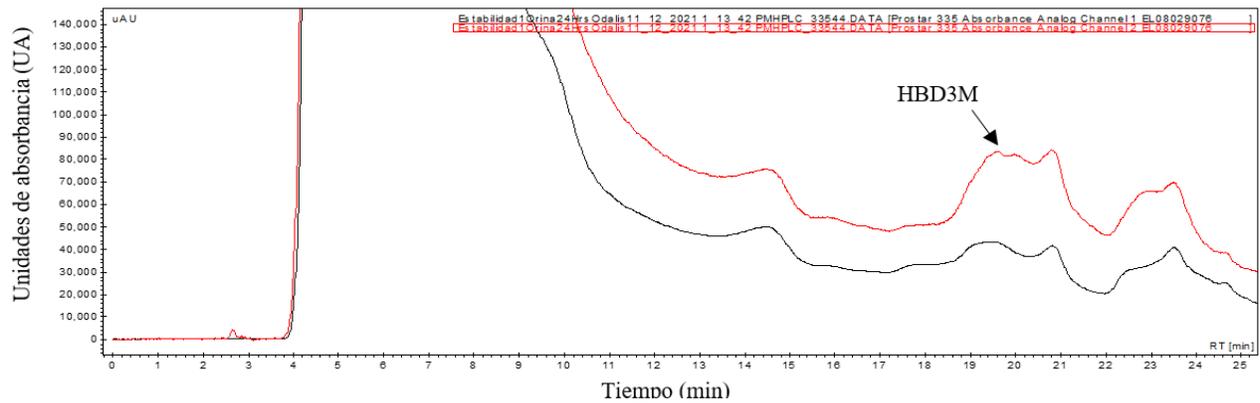


Cromatograma de HBD3M incubado en orina por 12 h. Se muestra la incubación de HBD3M en orina al tiempo 12 h (100 μg + 50 μl). Se hizo HPLC en columna C18 de fase reversa Vydac 218TP (C18, 4.6 x 250 mm). Gradiente de 80-20% de H_2O + TFA al 0.1% (A) y acetonitrilo + TFA al 0.1% (B). Flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

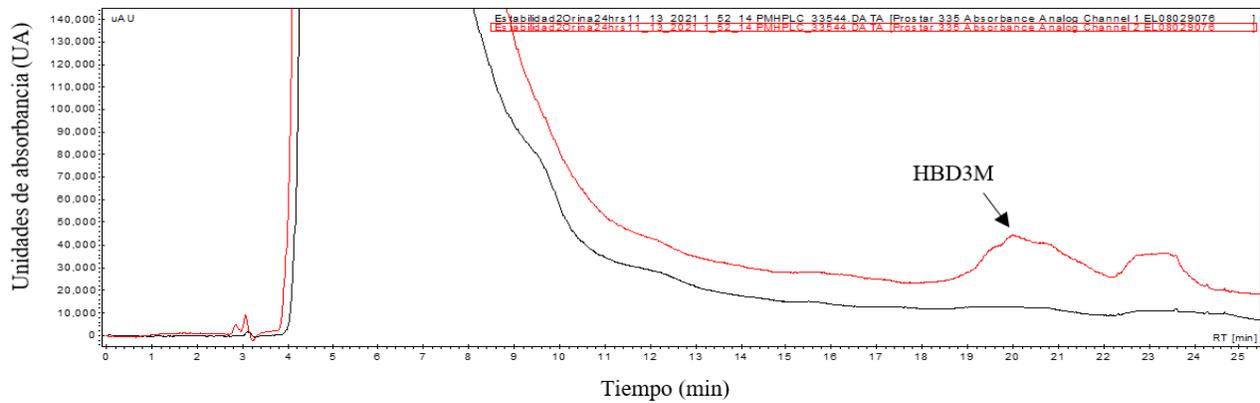


Cromatograma de HBD3M insubado en orina por 18 h. Se muestra la incubación de HBD3M en orina al tiempo 18 h (100 μg + 50 μl). Se hizo HPLC en columna C18 de fase reversa Vydac 218TP (C18, 4.6 x 250 mm). Gradiente de 80-20% de H_2O + TFA al 0.1% (A) y acetonitrilo + TFA al 0.1% (B). Flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

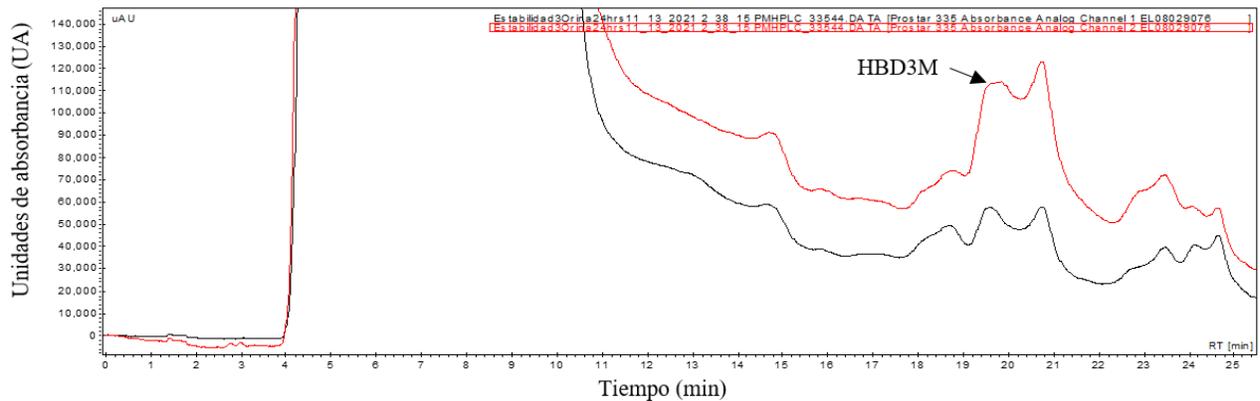
1)



2)



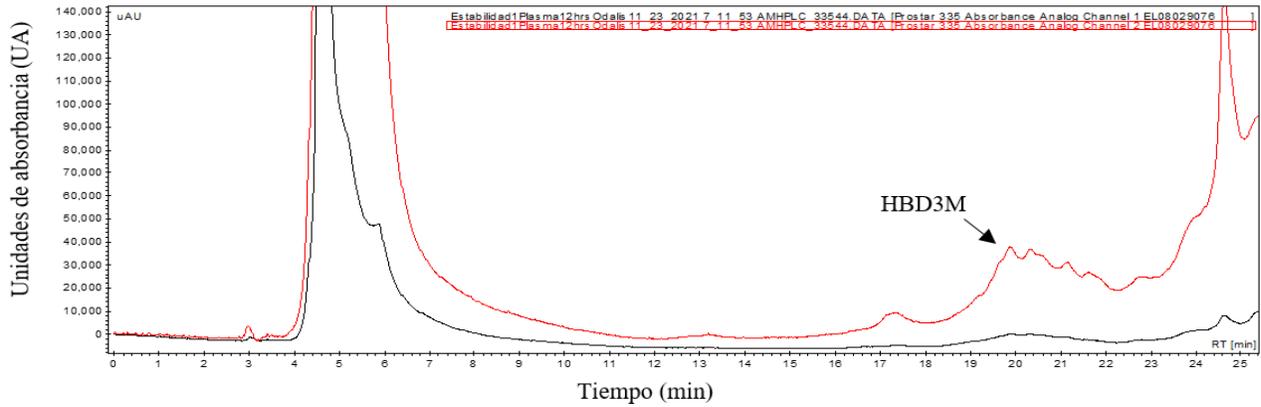
3)



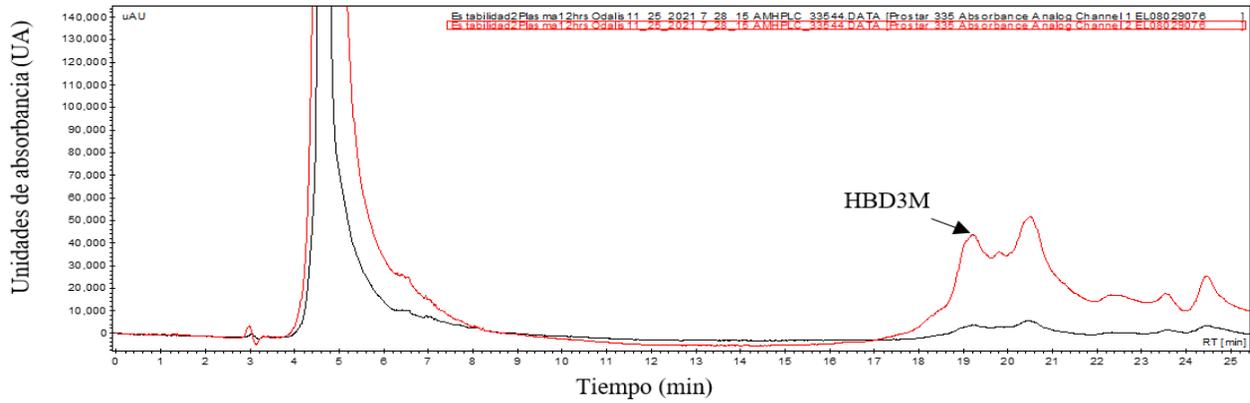
Cromtograma de HBD3M incubado en orina por 24 h. Se muestra la incubación de HBD3M en orina al tiempo 24 h (100 μg + 50 μl). Se hizo HPLC en columna C18 de fase reversa Vydac 218TP (C18, 4.6 x 250 mm). Gradiente de 80-20% de H₂O + TFA al 0.1% (A) y acetonitrilo + TFA al 0.1% (B). Flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

Anexo 5: Estabilidades de HBD3M en plasma

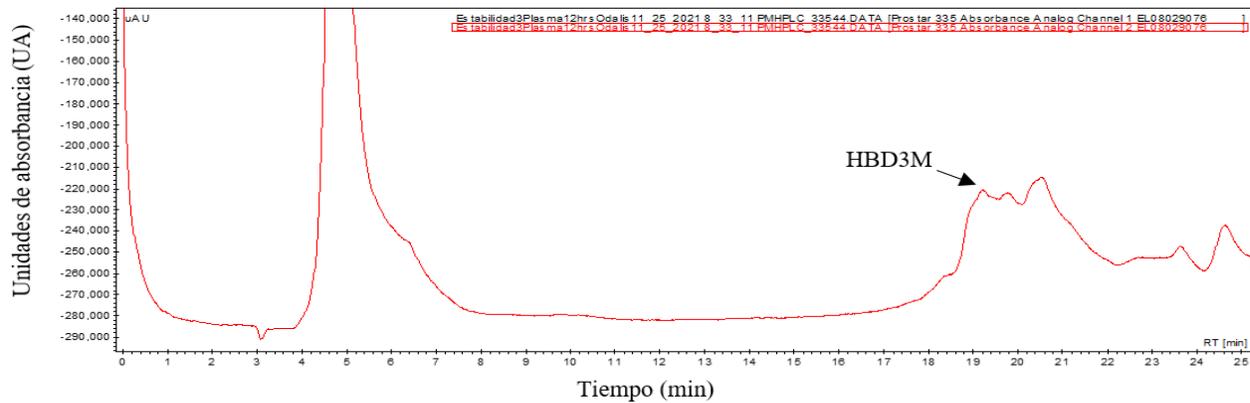
1)



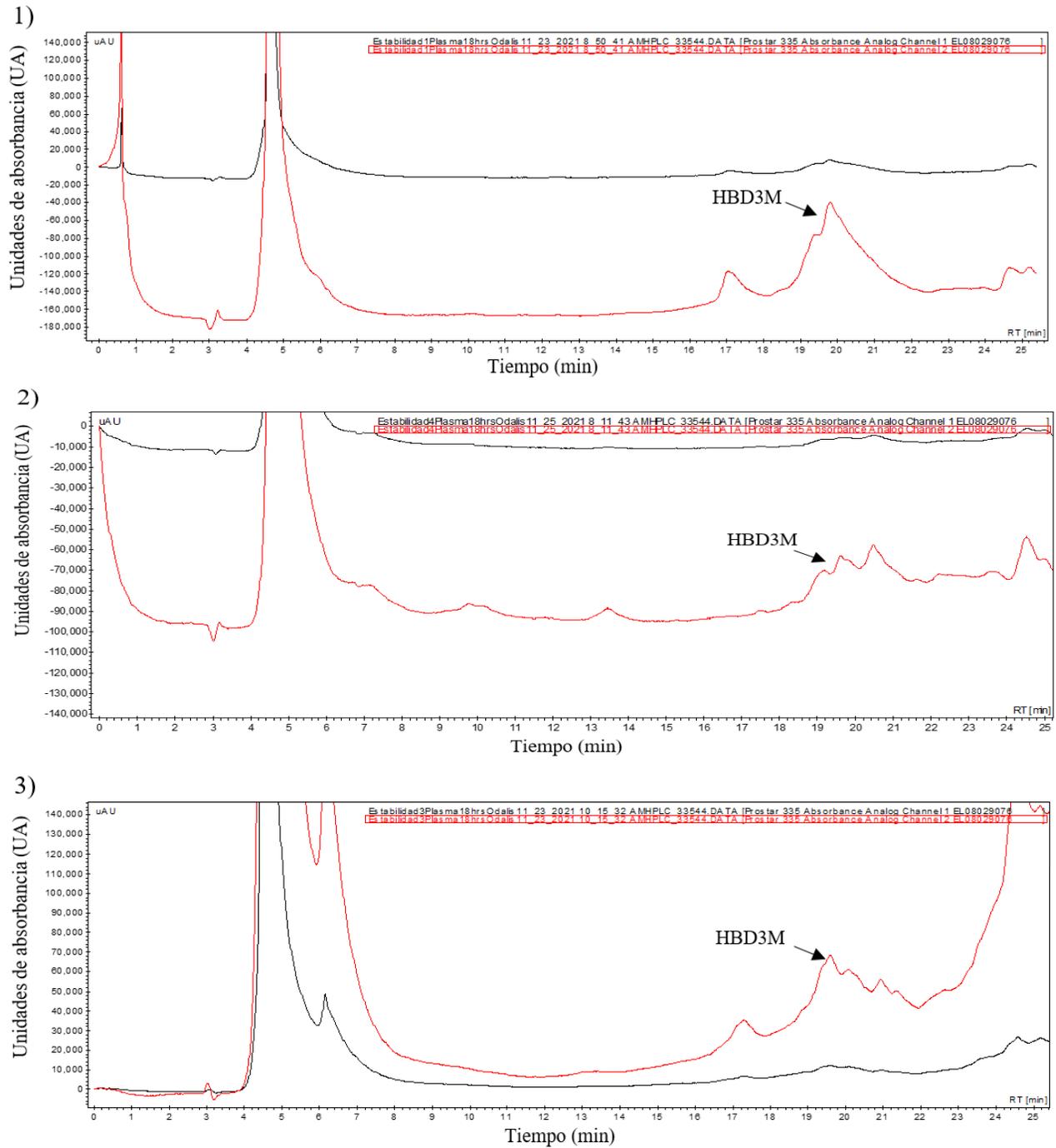
2)



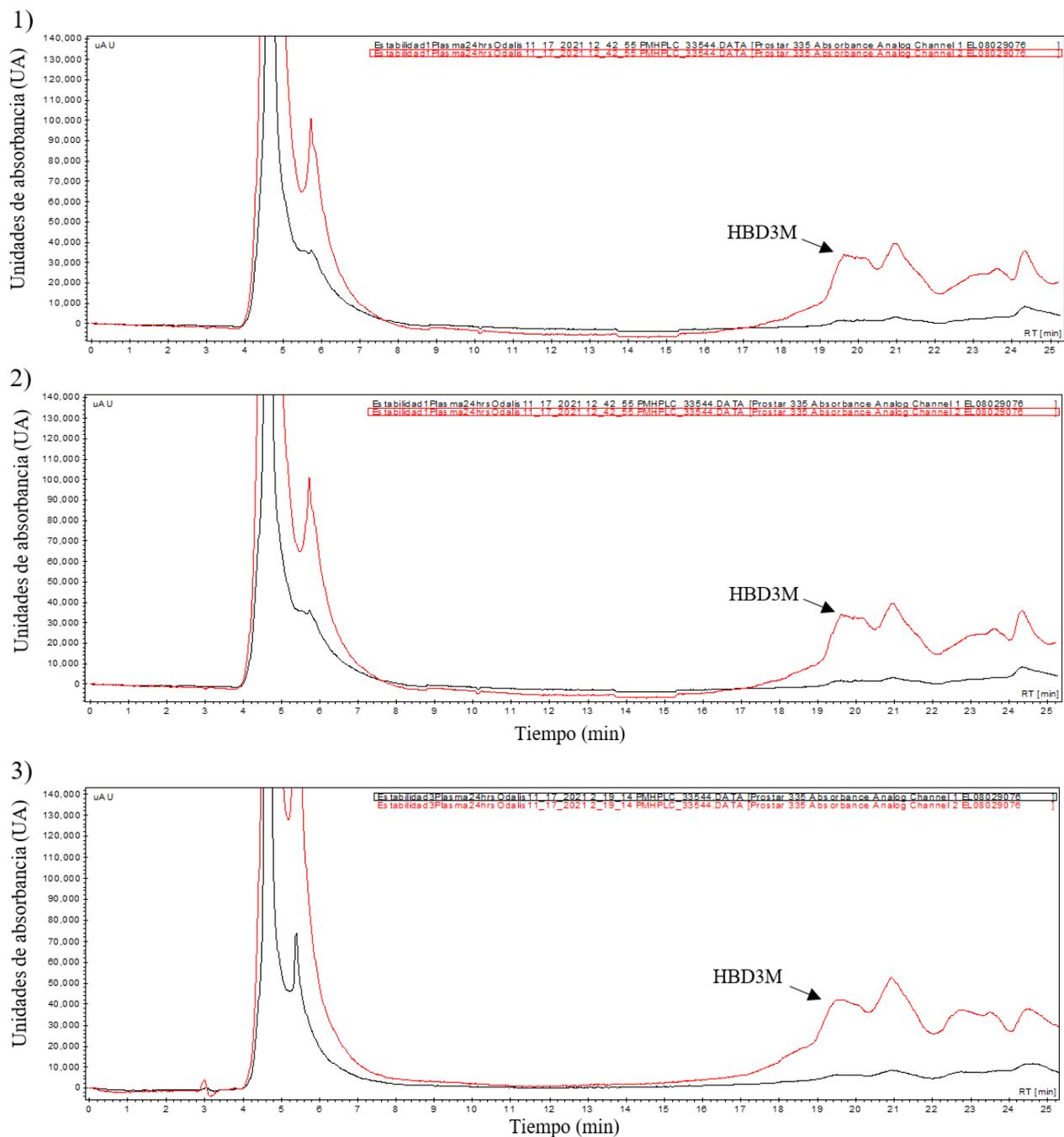
3)



Croatoograma de HBD3M incubado en plasma por 12 h. Se muestra la incubación de HBD3M en plasma al tiempo 12 h (100 μg + 50 μl). Se hizo HPLC en columna C18 de fase reversa Vydac 218TP (C18, 4.6 x 250 mm). Gradiente de 80-20% de H₂O + TFA al 0.1% (A) y acetonitrilo + TFA al 0.1% (B). Flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

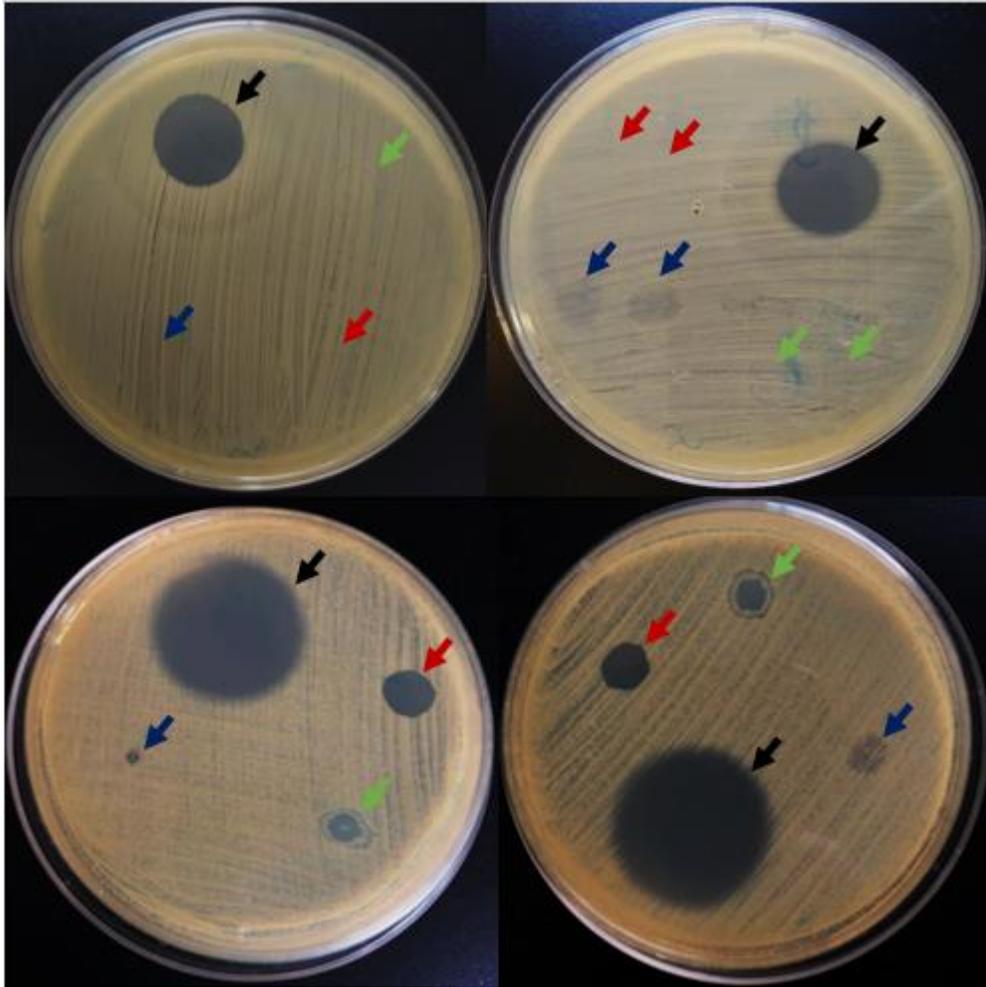


Cromatograma de HBD3M incubado en plasma por 18 h. Se muestra la incubación de HBD3M en plasma al tiempo 18 h (100 μg + 50 μl). Se hizo HPLC en columna C18 de fase reversa Vydac 218TP (C18, 4.6 x 250 mm). Gradiente de 80-20% de H₂O + TFA al 0.1% (A) y acetonitrilo + TFA al 0.1% (B). Flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.



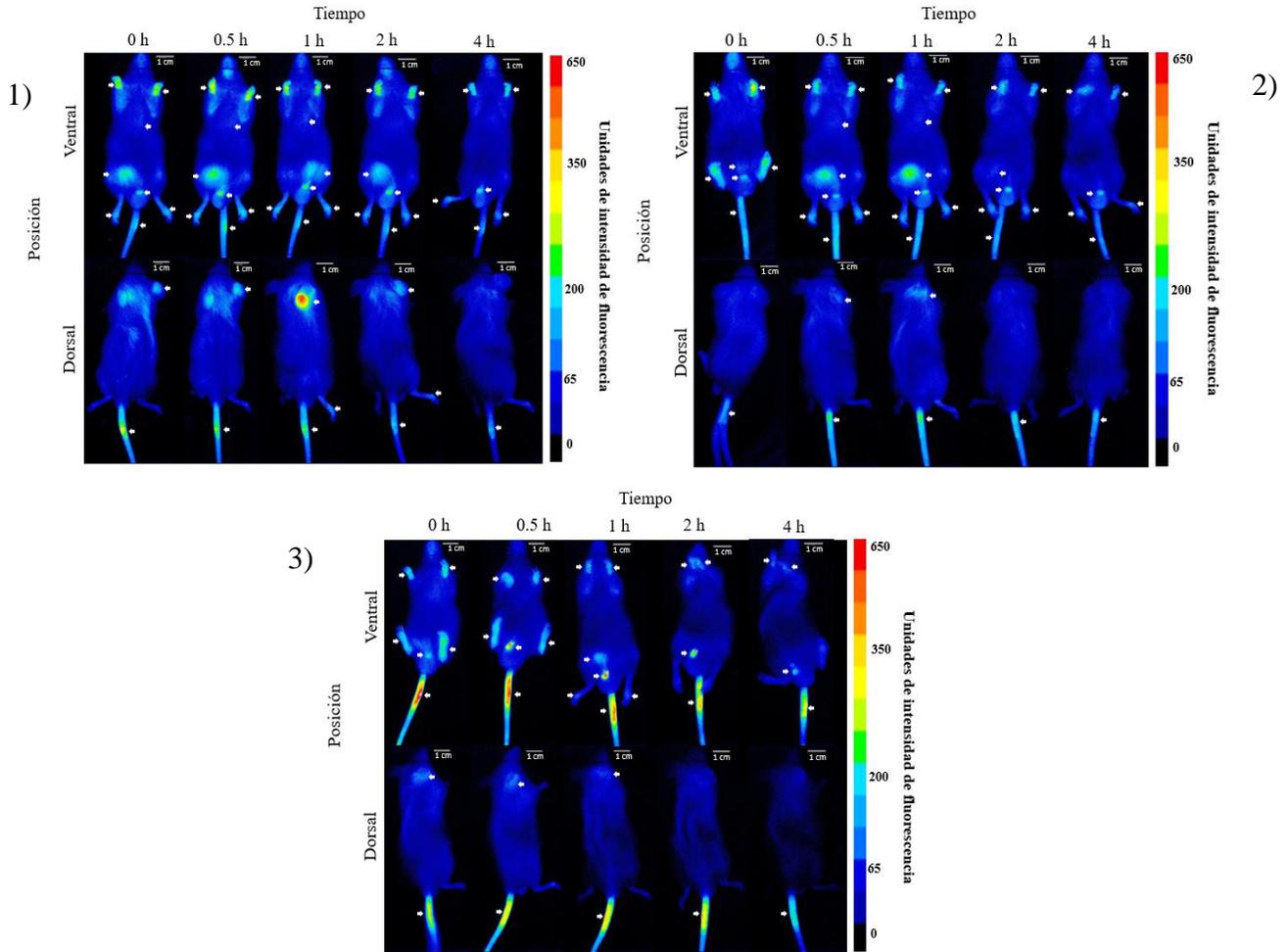
Cromatograma de HBD3M incubado en plasma por 24 h. Se muestra la incubación de HBD3M en plasma al tiempo 24 h (100 μg + 50 μl). Se hizo HPLC en columna C18 de fase reversa Vydac 218TP (C18, 4.6 x 250 mm). Gradiente de 80-20% de H_2O + TFA al 0.1% (A) y acetonitrilo + TFA al 0.1% (B). Flujo 1 ml/min. Absorbancia a 230 nm (rojo) y a 280 nm (negro). Se señala con una flecha a las fracciones correspondientes a HBD3M.

Anexo 6: Antibiogramas

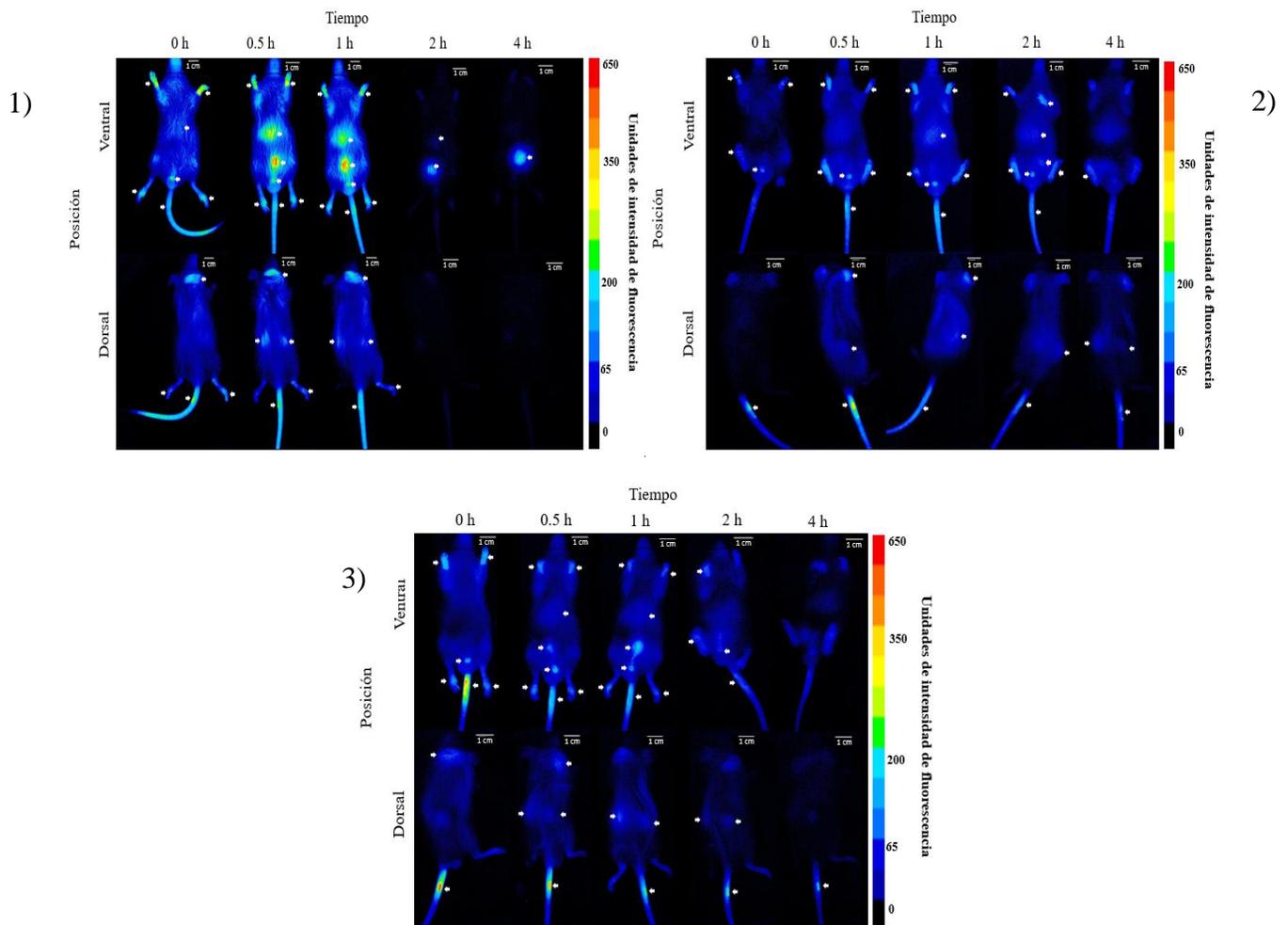


Prueba de susceptibilidad antimicrobiana en medio solido MH. Se determinó la actividad de HBD3M contra la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* (**superior**) y *Pseudomonas aeruginosa* (**inferior**). Flecha verde: 100µg de HD3M; Flecha roja: HBD3M incubada en plasma; Flecha azul: HBD3M incubada en orina; Flecha negra: Ceftriaxona [1.1 mg/ml] para *S. aureus* y Gentamicina [13.1 mg/ml] para *P. aeruginosa*.

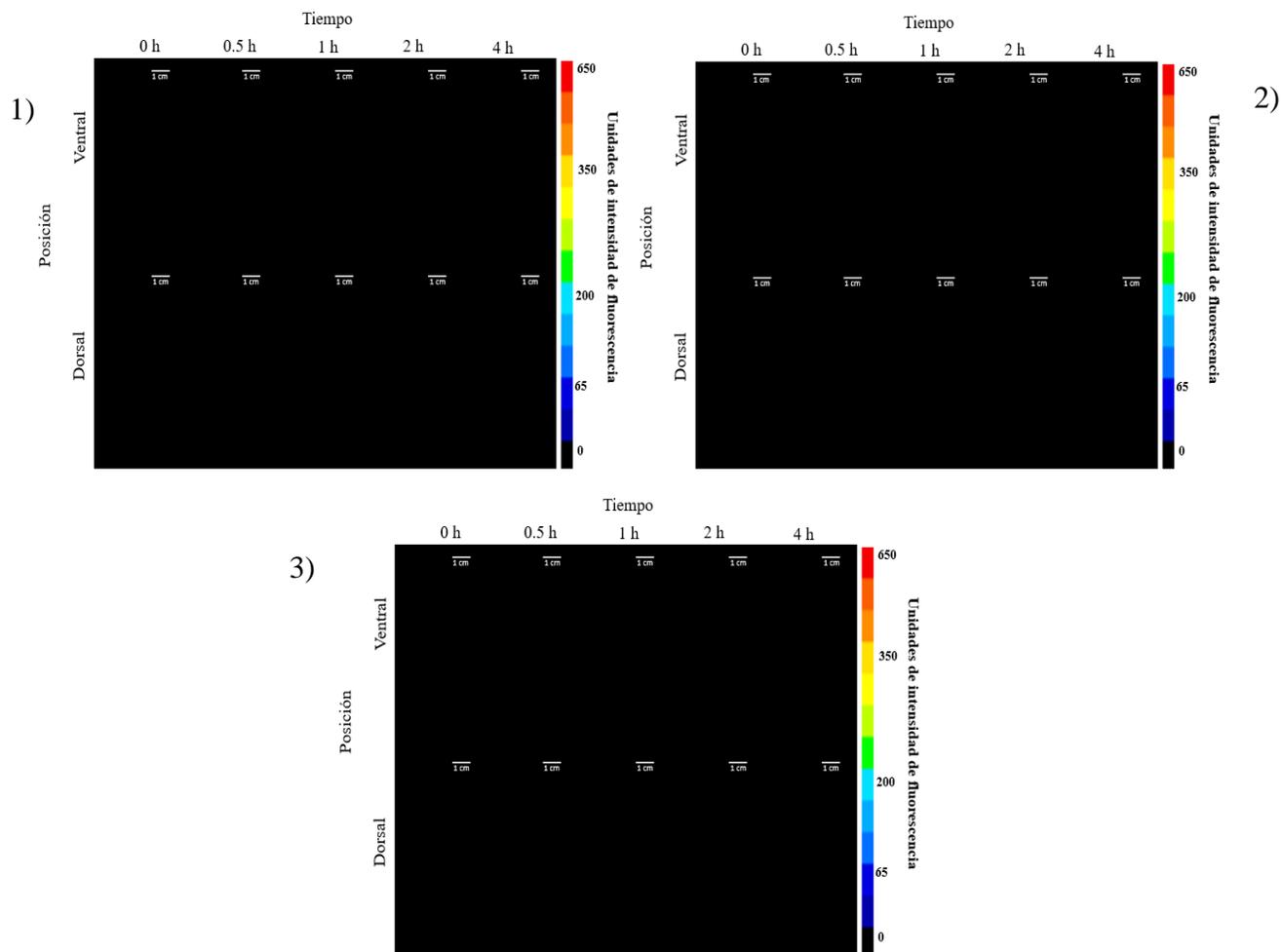
Anexo 7: Biodistribución en ratón



Biodistribución de AF750 en ratones. Imágenes en tiempo real de cuerpo completo de ratones CD1 al tiempo 0, 0.5, 1, 2 y 4 h en posición ventral y dorsal. Los experimentos por triplicado se enumeran como 1,2 y 3. La barra del lado derecho muestra las unidades de intensidad de fluorescencia. Con flechas blancas se señalan las zonas en las que se presentó mayor intensidad de fluorescencia.

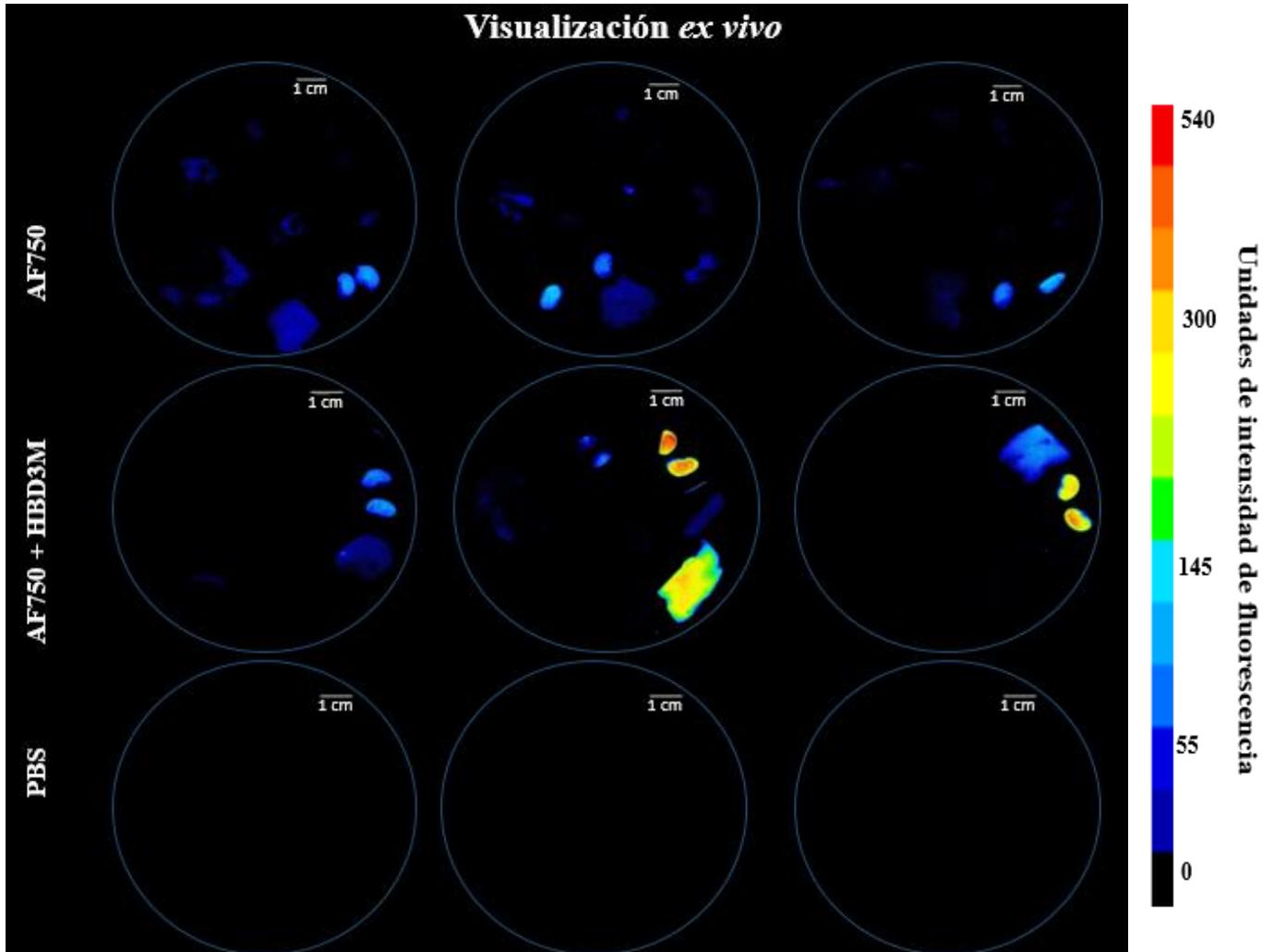


Biodistribución de HBD3M + AF750. Imágenes en tiempo real de cuerpo completo de ratones CD1 al tiempo 0, 0.5, 1, 2 y 4 h en posición ventral y dorsal. Los experimentos por triplicado se enumeran como 1,2 y 3. La barra del lado derecho muestra las unidades de intensidad de fluorescencia. Con flechas blancas se señalan las zonas en las que se presentó mayor intensidad de fluorescencia.



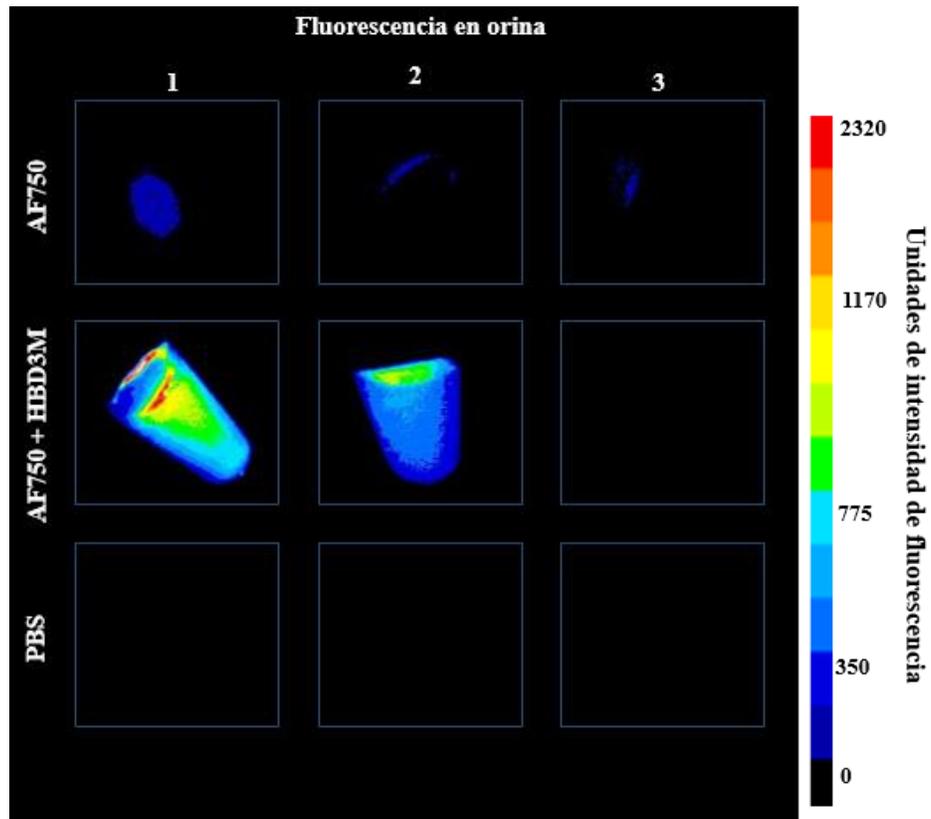
Administración de PBS. Imágenes en tiempo real de cuerpo completo de ratones CD1 al tiempo 0, 0.5, 1, 2 y 4 h en posición ventral y dorsal. Los experimentos por triplicado se enumeran como 1,2 y 3. La barra del lado derecho muestra las unidades de intensidad de fluorescencia.

Anexo 8: Ensayo *ex vivo*, acumulación en órganos



Visualización de fluorescencia *ex vivo* en órganos. Registro de fluorescencia de órganos una vez finalizado el análisis *in vivo*. Se muestran las 3 réplicas de los órganos recolectados de ratones inyectados con AF750 (superior), AF750 + HBD3M (centro) o con PBS (inferior). Cada órgano se identificó por sus iniciales: pulmones (Pu), corazón (Co), intestino (In), testículos (Te), estomago (Es), bazo (Ba), páncreas (Pa), hígado (Hi) y riñones (Ri). La barra del lado derecho muestra las unidades de intensidad de fluorescencia.

Anexo 9: Ensayo *ex vivo*, vía de eliminación de HBD3M



Excreción de HBD3M en orina. Imágenes de fluorescencia en orina de los ratones CD1 analizados. AF750 (superior), HBD3M + AF750 (centro) y PBS (inferior). La barra del lado derecho muestra las unidades de intensidad de fluorescencia.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **ODALIS SABINE OZUNA GAMA** con número de matrícula **10002832** cuyo título es:

“Estabilidad y biodistribución del péptido antimicrobiano HBD3M en ratón”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 17 de mayo del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN
DR. JOSÉ RAÚL ARREDONDO PETER
DR. MARCO ANTONIO IBARRA VALENCIA
DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE
DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO

(PRESIDENTE).
(SECRETARIO).
(VOCAL).
(SUPLENTE).
(SUPLENTE).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARCO ANTONIO IBARRA VALENCIA | Fecha:2022-05-17 10:27:12 | Firmante

v0cNbjb+RCv5UaxRdbKNG6wVBz76d01fuTzKdVgoB9o/bahEX3pbQU/J1u4eH5K/keLR4aHRFqf662lu2c6FpAQvpmGylwCWOwA02Augwo3bSj8ltj4X/fPc526nQ5mH0zBK16YJGgWSb+8rnwYBMs+nxtE5EAOEXmQW8ApqQ07goVARd5seEZIxWXeVNXnMBh5rTm0al3ejlpCXcwOs2YvPMvKCo/Aqc/zv1ONdd2ACoMGNs4JUsBtAxO8+6/sYe+Hf0aFHxr3PFSgaPUHf0RwXFaQcXrY7EbC0JGSexhMD1h7Djaw41KgyexVBi0ztIDhaFKWVtZjgWwExyA==

GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE | Fecha:2022-05-17 10:47:24 | Firmante

RZSbTCad8930MCJNALoX2ZvnfUfH0+FmmVsSg69W8FroGbUQ+Yp4qwwVbXyXpdmliqdvb1cmkkW13C2NUfuQOeN6d7VesqUzGJoXcSMB6H2YatUycDqVD+DuKTlc0mDvB9Nm4uDQIONISqxMPWyNCsl/a9KxyBxqGIWqz3LLZF8svm9xzanSW4us+hBYDPwQJuJctECI4x/3M5gW/jPB04m/LAJGh5Br9VByCQOH6JLy87JvnJUiHAB+mOiPJ5xogWm4S0G9XjMMAHQGN082042Zngs9nsd+OUWgey+qHJ2EzZf6Y863byvtlLP1/Gg53x1Kil1H1iRW2NlalUew==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2022-05-19 19:47:19 | Firmante

SNyIrlMHYRLwmCgPz953CdOxm1HD5dZ18ynd/o2plA5Ik4bZUXxDgUKTBorR/WzWTFDfnad79/ppjFL6FZUTE4gffd9xuzgJvyU89ttxyMgc+aCSHfmxGH74Y+3F/BAVQKMBHs1R uXKOK0w7BTNyKFxFyixokwzmMPFXTSNqShArM2la1iavxWeZpYr5aSCHcmNvdNA9q3IKYZxYyWDL3S3KImzrHgSlBphIAHAKVhQP014Ew7FhbHzieqztDap8swx6Vcsk9CTk4bbRg8jtGsnuPojQTK9+r4SmaOJDQx88zwZjeGd5hJX9SEp103/SpqSpLEA7TPjNrKMrPGTYw==

JOSE RAUL ARREDONDO PETER | Fecha:2022-05-20 12:50:36 | Firmante

e1P2I8/48rxioHEKaWnBrKN/9Yc9KY92QPTwIC7N6g1I36/2fqNPqirZv2p0+SQkia+O1Fj7BZscr+BMqUnf5/Z6G4C1mKUKRTYanb9oE0V/kVWITFR0M+opikh+X15ZQjCRA9cAp1QUe3dGFkaFcpQazMouZL05aCAIPN74isLbzHAHq5/zQNBGXOJyM7NWj3g/UICjED8eYb2krcZbRY/zegYKy8aZjJKbuchBcs5pWACZGZpBU9hndAyW1rlrdZKfnyck3yPmNzODxmn52Hf3NPXayLYP6OKVeQjD+u66z0mtmF7uJvcbv+Eejo6eKwJQ4GeKtlZhVbqQ==

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2022-05-26 17:40:17 | Firmante

jPY+k7zsXifyGwdh6fRyqYJ1LsfQr4g6Nx2b3t56vrlJ2Jli3I7gYvvr0bsujlOg8H4updcJmL0RHZUzHdJEfdclmEX7PUNSF4oP2itGhupokRjOGIE92BR+O3BQ6Vn1vCCBgG4qaQvxxfI0n/4JDlRkljXII0PjfhqxOBwa+CyMK2PyTBjvfyayLsEbWbJqs/PKYFT3R6AIQJuofz8Q0i2GPEOngDjogw8fnTRbePRXvSPWUVwGALIQJ6ki67MbAFcyMnYgqYAx20xX4NRiKEj0f/D4nFMDPIINtyAz97yyv84N+k3bDAftz8ZBq81wYKh6faeBb9KkppShNgRw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[PuHlgXDSv](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/04eSvdvt88HHgd36WNbMHZcK5kcXiZyc>

