

25  
201

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE  
PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN LA  
HEMOLINFA DEL ALACRAN  
*Cetruroides limpidus limpidus* KARSCH”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**Q U I M I C O**

P R E S E N T A :

**RICARDO CANEK RODRIGUEZ DE VEGA CUELLAR**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F. FEBRERO 3 - 1999.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

270198



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Jurado asignado

Presidente: Prof. Ruth Román Palacios  
Vocal: Prof. Ernestina Cervera Flores  
Secretario: Prof. Lourival Domingos Possani Postay  
1er. suplente: Prof. Homero Hernández Montes  
2o. suplente: Prof. Lucía Hernández Garciadiago

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Reconocimiento Molecular  
y Bioestructura, Instituto de Biotecnología -  
UNAM. Cuernavaca Morelos, México.

Asesor:

Dr. Lourival Domingos Possani Postay



Sustentante:

Ricardo Canek Rodríguez de la Vega Cuéllar



El presente trabajo fue financiado en parte por los donativos de Howard Hughes Medical Institute 75197-52107 y de DGAPA-UNAM IN217997. Durante el periodo final el sustentante recibió beca-crédito para estudios de posgrado CONACyT No. 124433.

Los M. en C. Fernando Zamudio y Timoteo Olamendi realizaron la secunciación y la cuantificación cromatográfica de aminoácidos de los péptidos; El análisis por espectrometría de masas se llevo a cabo en el laboratorio del Dr. Brian Martin del National Institute of Mental Health (EE.UU.); Para las purificaciones finales se contó con la asesoría del Sr. Fredy Coronas; Muchas de las discusiones que definieron buena parte de este escrito, así como la primera revisión del original se deben al IBq. Alfredo Torres.

Regla de Muir

"Si tratamos de aislar algo, lo encontraremos asociado a todo lo que existe en el universo"

Para mi MADRE:  
ésto es sólo una de mis partes

## **Agradecimientos:**

Es imposible justificar este escrito sin la participación de un montón de externos y paisajes, concientes y no. Así es que lo que sigue es un recuento de las razones del por qué están leyendo esto.

En primer lugar a quienes siempre me han empujado dándome razones de orgullo y presunción, esa no tan pequeña corte de los milagros que significan mis hermanos: Héctor por la honestidad infranqueable; Stalin por las posibilidades siempre abiertas; Teresa por las pasiones compartidas; Nora por el privilegio de verte crecer; Camila por mostrarnos que si la historia nuestra hubiese tenido otros paisajes el resultado no sería tan distinto y Cecilia por venir a comprobar que en esta familia mandan las mujeres por simple mayoría de votos. Siguen, sin seguirlos, los dos grandes ejemplos sobre los cuales se soportan casi todas mis seguridades, mis padres: Ma. Teresa y Héctor Ricardo.

A las cercanías voluntarias e insensatas que justifican, y muchas veces posibilitan, los esfuerzos: Iván y Fidel por ser siempre parámetros; Edmundo y Venus por ser las primeras personas que me enseñaron los otros caminos; Acely por mi carrera y por mucho más; la CURP y sobre todo las interferencias, proyectadas o reales, de las que aún hoy me enorgullesco (Inti, León, Jorge, Ricardo, Gabriel y Luís David); Gabriela por lo que todavía me sorprende; Enrique Ruíz, Luís Olguín y Norma Ortega por las transferencias y eso de "llevar la esperanza a lugares inverosímiles". Jimena y Selene por..., por qué.

A las razones y a quienes hacen lo que quizá también me correspondería: Cárdenas por diez años de esperanzas y por el fabuloso verano del 97; el EZLN por la experiencia extraordinaria e incalificable que mucho tiempo creí vedada, en particular a Moises por las anécdotas que seguiré contando y por el catalejo que habré de obsequiarle; todos aquellos que entienden que el sueño puede no ser el mismo pero que todos tenemos derecho a soñarlo.

A mis maestros (docentes y alumnos) en la Facultad y el Instituto de Química: Alejandro Baeza por los algoritmos; José Manuel Méndez Stivalet por los ánimos; Juan José Zúñiga y Gustavo por su pasión por enseñar; Homero Hernández por el primer curso donde aprendí algo; Raymundo Cea por el aforismo; Luís Miguel Trejo por los exámenes; Miguel Castro por la clase de Unión Química; Fautsch Zapata por los encuentros; Sergio Zepeda, Juan *Barbachano*, Luís Villanueva, Mauro e Isaías por mostrarme que el esfuerzo es apenas una condición; Alejandra, Roberto, Barbarín y Adela por el tiempo dedicado; Javier Siqueiros (UAEM) por su ayuda absolutamente incondicional.

A quienes, en ocasiones sin saberlo, hicieron esto posible: Elvira Santos y Alenka de la coordinación de la carrera de Química, por la continuidad; Raúl Garza y Gloria de la SAAE, por las posibilidades; Melchor Araujo director de la FCQel de la UAEM, por la accesibilidad; los miembros del jurado revisor, profesores Ruth Román, Ernestina Cervera, Homero Hernández y Lucía Hernández; la Asociación de Químicos e Ingenieros Químicos generaciones 40 - 42 por mi primera beca; el CONACyT por seguirme manteniendo; el IBt por ser el espacio ideal para ejercer la endogamia; (pero si por supuesto) la UNAM por ser ese lugar sin dimensiones donde se forjan mucho más que profesionales.

A la gente en Cuernavaca que hace que ese lugar valga la pena: Lourival D. Possani por aceptarme y aguantarme en su laboratorio; Alfonso, Renaud y Alfredo por recibirme y mantenerme en el IBt; Raymundo, Rodrigo, Gabriela Cosío, Bárbara, Patricia y Víctor porque en el mundo hay muchas otras razones; Consuelo, Jesús, Liliana, Fernando, Adriana, Fredy, Martha, Cipriano y Fernando Zamudio quienes entienden que el laboratorio es algo más que camaradas hacinados en un espacio siempre estrecho; Gabriel Gasque por las increíbles coincidencias.

A Vanesa por todo lo que me es presente y futuro, gracias.

## Índice

<b>I Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>II Generalidades .....</b>	<b>2</b>
<b>II.1 Péptidos antimicrobianos .....</b>	<b>2</b>
<i>II.1.i Péptidos lineales alfa helicoidales .....</i>	<i>3</i>
Cecropinas y péptidos relacionados; Péptidos lineales de la piel de anfibios	
<i>II.1.ii Péptidos con alto contenido de ciertos aminoácidos .....</i>	<i>6</i>
Péptidos antimicrobianos ricos en prolina; Especies peptídicas ricas en glicina	
<i>II.1.iii Péptidos antimicrobianos con un puente disulfuro .....</i>	<i>9</i>
<i>II.1.iv Péptidos con dos o más puentes disulfuro .....</i>	<i>11</i>
Péptidos antimicrobianos con dos puentes disulfuro; Péptidos antimicrobianos con tres puentes disulfuro; Péptidos antimicrobianos con cuatro puentes disulfuro	
<b>II.2 Mecanismos de actividad .....</b>	<b>18</b>
<i>II.2.i Péptidos lineales alfa helicoidales .....</i>	<i>18</i>
<i>II.2.ii Péptidos con alto contenido de ciertos aminoácidos .....</i>	<i>20</i>
<i>II.2.iii Péptidos antimicrobianos con un puente disulfuro .....</i>	<i>21</i>
<i>II.2.iv Péptidos antimicrobianos con dos o más puentes disulfuro .....</i>	<i>22</i>
<b>II.3. Alacranes .....</b>	<b>24</b>
<i>II.3.i Biología .....</i>	<i>24</i>
<i>II.3.ii Toxinas de alacrán .....</i>	<i>25</i>
<b>III Antecedentes .....</b>	<b>26</b>
<b>IV Objetivos .....</b>	<b>28</b>
General; Particulares	
<b>V Materiales y métodos experimentales .....</b>	<b>28</b>
<i>V.1 Colección y mantenimiento de organismos .....</i>	<i>28</i>
<i>V.2 Obtención y conservación de la hemolinfa .....</i>	<i>28</i>
<i>V.3 Purificación de los péptidos antimicrobianos .....</i>	<i>29</i>
Prepurificación; Purificación	
<i>V.4 Ensayos biológicos .....</i>	<i>29</i>
Halos de inhibición; Actividad hemolítica	
<i>V.5 Caracterización química .....</i>	<i>30</i>
<b>VI Resultados .....</b>	<b>31</b>
<i>VI.1 Obtención de la hemolinfa .....</i>	<i>31</i>
<i>VI.2 Purificación de los componentes activos .....</i>	<i>31</i>
<i>VI.3 Ensayos biológicos .....</i>	<i>34</i>
<i>VI.4 Caracterización .....</i>	<i>34</i>
<b>VII Discusión .....</b>	<b>36</b>
<b>VIII Perspectivas .....</b>	<b>41</b>
<b>IX Referencias .....</b>	<b>41</b>

## Índice de tablas y figuras

<b>Fig. III.1</b>	Secuencias y estructuras de péptidos de la familia $\alpha\beta$ -EC ....	27
<b>Fig. VI.1</b>	Cromatograma de la hemolinfa total en CLAE .....	32
<b>Fig. VI.2</b>	Prepurificación de la hemolinfa total.....	33
<b>Fig. VI.3</b>	Purificación de las fracciones HCII - I 1 y - I 2 .....	33
<b>Fig. VI.4</b>	Ensayo de inhibición de crecimiento bacteriano .....	34
<b>T. VI.1</b>	Bioensayos de las fracciones de HCII .....	35
<b>T. VI.2</b>	Cuantificación de aminoácidos de las fracciones de HCII. ....	35
<b>Fig.VI.5</b>	Secuencias N-terminales de HCII - I 1, - I 2a y - I 2b.....	36
<b>Fig. VII.1</b>	Comparación de las secuencias de HCII - I 2a y - I 2b....	38

## Abreviaciones utilizadas<sup>a</sup>

A, Ala	Alanina
$\alpha\beta$ -EC	Motivo estructural $\alpha/\beta$ estabilizado por cisteínas
AcCN	Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )
AP	Péptido antimicrobiano (siglas en inglés)
Asx	Aspártico o asparagina
C, Cis	Cisteína
C	Género <i>Centruroides</i>
cDNA	ADN recombinante (siglas en inglés)
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
cm	Centímetros
D, Asp	Ácido aspártico
DC	Dicroísmo Circular
DO	Densidad Óptica a 600 nm
E, Glu	Ácido glutámico
F, Fen	Fenilalanina
G, Gli	Glicina
Glx	Glutámico o glutamina
H, His	Histidina
HCII	Hemolinfa de <i>C. limpidus limpidus</i>
I, Ile	Isoleucina
IR	Infrarrojo
K, Lis	Lisina
kDa	Kilodalton
L, Leu	Leucina
LB	Medio Luria-Bertiani
M, Met	Metionina
mg	Miligramos

---

µg	Microgramos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
N, Asn	Asparagina
nm	Nanómetros
P, Pro	Prolina
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (siglas en inglés)
pH	Potencial de Hidrógeno
Q, Gln	Glutamina
R, Arg	Arginina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
r.m.s.d.	Desviación promedio de mínimos cuadrados (siglas en inglés)
S, Ser	Serina
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturante en geles de poliácridamida (siglas en inglés)
sp.	Especies de un mismo género
T, Tre	Treonina
TFA	Ácido trifluoroacético (siglas en inglés)
TM	Marca registrada (siglas en inglés)
UA	Unidades de Absorbancia a 280 nm por mililitro
UV	Ultravioleta
V, Val	Valina
W, Trp	Triptofano
X, Xaa	Cualquier aminoácido
xg	X-veces la fuerza de gravedad
Y, Tir	Tirosina
Z, pGlu	Ácido piroglutámico

\* Otras abreviaciones se indican en el texto

## I Resumen

Durante las pasadas dos décadas se han descrito una serie de compuestos antimicrobianos de naturaleza peptídica aislados de diversas fuentes biológicas, incluyendo artrópodos, anfibios, mamíferos y plantas. La efectividad de algunos de estos péptidos contra ciertos microorganismos de importancia clínica, la necesidad de nuevos antibióticos, su papel en la llamada inmunidad innata, así como los mecanismos mediante los cuales actúan, han provocado un creciente interés científico en la descripción de nuevos péptidos antimicrobianos. En orden de comprobar la presencia de compuestos similares en alacranes americanos se tomó como modelo a la especie mexicana *Centruroides limpidus limpidus* Karsch, para lo cual se dipuso de la hemolinfa de 500 organismos. La hemolinfa se centrifugó para eliminar restos celulares y el sobrenadante se aciduló con TFA para obtener un extracto con entre 4 y 5 unidades de pH. Dicha muestra se sometió a una serie de extracciones sólido-líquido en cartuchos Sep-Pack C<sub>18</sub>, aumentando en pasos sucesivos la hidrofobicidad del disolvente. El material así separado se refraccionó utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), con una columna C<sub>4</sub> semipreparativa y las fracciones sometidas a pruebas cualitativas para identificar propiedades de inhibición de crecimiento contra una cepa silvestre de *Bacillus subtilis*. Se obtuvieron seis fracciones positivas que eluyen entre 35 y 50 % de acetonitrilo. La purificación final se realizó en CLAE con una columna C<sub>18</sub> analítica. Se logró aislar tres péptidos activos, para los cuales se determinó el peso molecular, 5104, 4806 y 4847 Da, y la secuencia N-terminal de aminoácidos por degradación Edman automatizada. La estructura primaria de los péptidos activos de 4.8 kDa difiere en únicamente un residuo. El análisis de homología de secuencia demostró que pertenecen a un nuevo grupo de la familia de los péptidos antimicrobianos con dos o más puentes disulfuro.

## **II Generalidades**

### **II.1 Péptidos antimicrobianos**

Todos los organismos superiores poseen sistemas no adaptativos de defensa contra invasiones patogénicas (Medzhitov y Jeneway 1997); parte importante de dichos sistemas la constituyen moléculas peptídicas con función microbicida, llamadas nominalmente péptidos antimicrobianos (AP's), algunas de las cuales se han aislado y caracterizado bioquímica, farmacológica e inmunológicamente a profundidad en una variedad de plantas, artrópodos, anfibios y mamíferos, incluido el hombre (para revisiones calificadas ver: Hoffmann y Hetru 1992; Ganz y Lehrer 1994; Barra y Simmaco 1995; Boman 1995; Broekaert et al., 1995; Maloy y Kari 1995; Nicolas y Mor 1995). Aparte de la recientemente caracterizada importancia de su función biológica en la inmunidad innata (Oullette y Selsted 1996; Hoffmann et al., 1996; Dimopoulos et al., 1997; Goldman et al., 1997; Barra et al., 1998; Ferrandon et al., 1998), los péptidos antimicrobianos se han estudiado extensivamente por dos razones fundamentales: a) La utilidad de los AP's para estudiar, con un sistema relativamente simple, las interacciones de reconocimiento proteína-lípido, ya que estos constituyen el blanco primario de los péptidos antimicrobianos (revisado en Bechinger 1997; Matsuzaki 1998; ver más adelante), y; b) La necesidad de nuevos antibióticos que, sin provocar efectos tóxicos en el organismo infectado, no generen resistencia en los patógenos (Cohen 1992); de hecho, la efectividad de algunos AP's contra ciertos patógenos de importancia médica los ha convertido en modelos utilizados para la generación de organismos transgénicos resistentes a invasiones patogénicas (Gwadz et al., 1989; Rodríguez et al., 1995; Yarus et al., 1996; Okamoto et al., 1998; Shahabuddin et al., 1998), o para su uso directo como agentes terapéuticos (Maloy y Kari 1995; Hancock y Lehrer 1998; Yeaman et al., 1998) e incluso como terapia génica para controlar la proliferación de tejidos degenerativos (Winder et al., 1998).

De acuerdo con la clasificación utilizada, originalmente propuesta por H.G. Boman en su revisión del tema de 1995, pueden identificarse cuatro grupos de péptidos con propiedades antimicrobianas, a saber: i) Péptidos lineales, sin cisteínas con o sin regiones que rompan la

estructura secundaria; ii) Péptidos lineales con altas proporciones de ciertos aminoácidos; iii) Péptidos con un enlace disulfuro y; iv) Péptidos con dos o más puentes disulfuro con presencia de hojas- $\beta$ . En el Anexo I se presentan las secuencias de aminoácidos de varios miembros de cada una de estas familias, así como los organismos de donde se extraen y el plegamiento que adoptan. Los grupos de las familias i, iii y iv se presentan alineados por el programa PileUp (GCG Inc.TM).

### II.1.1 *Péptidos lineales alfa helicoidales*

Cecropinas y péptidos relacionados

En 1981 el grupo de H.G. Boman en la universidad de Estocolmo reportó el aislamiento de dos especies peptídicas que demostraron poseer propiedades antibacterianas, a las cuales se les denominó cecropinas, ya que habían sido aisladas de la hemolinfa de larvas de *Hyalophora cecropia* (Steiner et al., 1981). Durante la década de los ochenta se describieron un buen número de péptidos análogos a cecropinas en diferentes especies de insectos (revisado por Cociancich et al., 1994) y un sólo caso en mamíferos, en intestino de puerco (Lee et al., 1989).

Las cecropinas son especies peptídicas lineales y desordenadas en disolución acuosa, de entre 3 y 4 kD, que poseen ciertos residuos invariables que se distribuyen a lo largo de toda la estructura primaria (Boman 1995). Se han hecho estudios sobre la estructura de las cecropinas, primero por Dicroísmo Circular (DC; Steiner 1982) y después con Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN- $^1\text{H}$ ; Holak et al., 1988; Boisbouvier et al., 1998). Ambos trabajos demostraron que las cecropinas adoptan, en soluciones no acuosas que aumentan las interacciones de puentes de hidrógeno intramoleculares y, se propone, mimetizan el ambiente en la membrana celular (Sönnichsen et al., 1992), una estructura de dos hélices  $\alpha$  unidas por un segmento corto que rompe con la continuidad de la hélice, esta región corresponde a la secuencia intermedia Gly-Pro-Ala en las cecropinas clásicas. Estudios estructurales con RMN- $^1\text{H}$  sobre la cecropina P1 (proveniente de intestino de cerdo) mostraron que ésta se ordena en solución como una sola hélice, con un segmento moderadamente flexible que involucra a la secuencia Ser-Glu-Gly (Sipos et al., 1992). De acuerdo con predicciones teóricas y resultados de los análisis estructurales, las hélices de las cecropinas

presentan dos caras, una netamente hidrofóbica y otra hidrofílica. La anfipaticidad de las hélices se ha propuesto como la responsable de la actividad microbicida de las cecropinas (Boman et al., 1991).

Las cecropinas, como la mayoría de los péptidos antimicrobianos, no tienen una marcada especificidad de blancos, por el contrario se ha demostrado que matan en concentraciones similares a una variedad de cepas bacterianas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Algunas variantes sintéticas de cecropinas han demostrado ser capaces de matar protozoarios, tales como los causantes de la malaria (*Plasmodium* sp; Boman et al., 1989; Rodríguez et al., 1995).

Otros grupos de péptidos antimicrobianos alfa helicoidales se han aislado de insectos, algunos de ellos estrechamente emparentados con las cecropinas como las bactericidinas de *Manduca sexta* (Dickinson et al., 1988), las sarcotoxinas I de *Sarcophaga peregrina* (Okada y Miyazawa 1985). Otros, como el caso de la andropina, encontrada en conductos seminales de *Drosophila melanogaster*, no muestran homologías significativas, pero podrían tener estructuras muy similares (Semakovlis et al., 1991).

#### Péptidos lineales de la piel de anfibios

Varias familias de péptidos antimicrobianos se han encontrado en la piel de diversos anfibios; las primeras especies reportadas fueron las bombininas (Csordas y Michl 1969), aisladas de la piel de algunas especies del género *Bombina*; típicamente contienen entre 25 y 27 residuos de aminoácidos, presentan un extremo carboxilo terminal altamente conservado y requieren de amidación del último residuo para ser activas (Nicolas y Mor 1995). Algunas bombininas, como las BLP's 1 a 3 y la bombinina H, además de ser antibacterianas, muestran también propiedades hemolíticas (Gibson et al., 1991; Mignogna et al., 1993). En especies del género *Litoria*, ranas arbóreas de Australia, se ha descrito la presencia de una familia de antibióticos peptídicos llamados caerinas (Stone, et al., 1992; Steinborner et al., 1997), las cuales poseen un plegamiento tridimensional similar a las cecropinas de insecto (Wong et al., 1997). Sin embargo, los péptidos alfa helicoidales originarios de piel de anfibios más estudiados pertenecen a las familias de magaininas y dermaseptinas.

Las magaininas son antibióticos peptídicos presentes en la piel de la especie *Xenopus leavis*, presentan de 23 a 26 aminoácidos (Bevins y Zasloff 1990), estructuralmente forman una hélice  $\alpha$  anfipática moderadamente torsionada en el centro (Marion et al., 1988, Gesell et al., 1997). Se han realizado una gran variedad de estudios sobre la relación estructura-función de las magaininas, en los cuales se ha determinado que la región amino terminal es la responsable de la actividad microbicida (revisado por Maloy y Kari 1995). El estudio del espectro de actividad de las magaininas y sus derivados (principalmente los desarrollados por la empresa Magainin Pharmaceuticals Inc.), se ha extendido. Se han reportado efectos tóxicos contra hongos y protozoarios, así como cierta actividad contra algunas células cancerosas (Cruciani et al., 1991). Algunos de los análogos desarrollados presentan también actividad hemolítica, por lo general a concentraciones superiores de las necesarias para el desarrollo de la actividad antimicrobiana (Maloy y Kari 1995). Adicionalmente se ha demostrado que la mezcla de las magaininas 2 y PGLa, muestra un cierto grado de sinergismo (Westerhoff et al., 1995). Aparte; en hemocitos, células del torrente sanguíneo del protocordado *Styela clava*, se han encontrado cuatro variantes de antibióticos peptídicos llamados clavaninas, éstas presentan un 56 % de similitud con las magaininas de *X. leavis*, por lo que se han descrito como análogos funcionales y estructurales de estas últimas (Lee et al., 1997).

Las dermaseptinas se han aislado exclusivamente en miembros de la familia Hylidae (*Phyllomedusa* sp; Mor et al., 1991 y 1994; Batista C.V., Possani L.D. y Bloch C. Jr., manuscrito en preparación). Siete secuencias reportadas, de entre 28 y 34 aminoácidos, muestran que este grupo de péptidos antimicrobianos se encuentra altamente conservado, así como la relación existente entre las dermaseptinas y las ceratotoxinas de insectos (Marchini et al., 1993) y la pleurocidina del pez *Pleuronectes americanus* (Cole et al., 1997). Estudios basados en Dicroísmo Circular y predicciones estructurales han determinado que las dermaseptinas podrían formar una sola hélice  $\alpha$  anfipática (Mor y Nicolas 1994), lo cual se ha comprobado por RMN-<sup>1</sup>H al menos para el caso de la ceratotoxina A, uno de los análogos de las dermaseptinas en

insectos (Ragona et al., 1996). Como en el caso de las magaininas, se ha demostrado que la región amino terminal es la responsable de la actividad antimicrobiana, dado que análogos truncados con los primeros 16 ó 18 aminoácidos han demostrado ser incluso más eficientes que los péptidos nativos (Mor y Nicolas 1994b; Coote et al., 1998). Las dermaseptinas muestran diferencias en cuanto a los microorganismos que son capaces de matar (Nicolas y Mor 1995; Gosh et al., 1997; Coote et al., 1998); la mayoría posee también actividad hemolítica, algunas dentro del rango microbicida (Seberwal y Nagaraj 1994; Nicolas y Mor 1995). Adicionalmente se ha demostrado que la mezcla de las dermaseptinas encontradas en una misma especie, posee actividad microbicida incrementada hasta en un factor de 100 sobre la actividad reportada para los péptidos aislados (Mor et al., 1994b).

#### **II. 1.ii Péptidos con alto contenido de ciertos aminoácidos**

La familia más heterogénea de antibióticos de naturaleza peptídica es la correspondiente a los lineales con alto contenido de ciertos aminoácidos. Esta familia es también la menos estudiada; las investigaciones se han centrado en la descripción de las estructuras primarias y poco se sabe de sus arreglos tridimensionales o mecanismos de actividad. En función de la secuencia de aminoácidos podemos identificar dos grupos dentro de esta familia, a saber: péptidos ricos en prolina y, usualmente, arginina, y proteínas ricas en glicina (Cociancich et al., 1994). El término "ricos en" corresponde a que el porcentaje de estos aminoácidos se encuentra muy por encima de sus porcentajes típicos de aparición en proteínas.

##### **Péptidos antimicrobianos ricos en prolina**

Se han aislado especies peptídicas ricas en prolina de insectos como la apidaecina y la abaecina de abejas (Casteels et al., 1989 y 1990), la formaecina de hormiga (Mackintosh et al., 1998), la lumbricina de gusanos de tierra (Cho et al., 1998) y la drosocina (Bulet et al. 1993) y la metchnikowina de *D. melanogaster* (Levashina et al., 1995); en mamíferos las bactericinas de neutrófilos bovinos (Frank et al., 1990), el denominado PR-39 de intestino de puerco (Agerberth et al., 1991) y la indolicidina también de neutrófilos de bovinos (Selsted et al., 1992); y dos casos en crustáceos, el CmBLP de cangrejo, el cual muestra simi-

litudes importantes con las bactericinas de mamíferos (Schnap et al., 1996) y las panaeidinas de camarón (Destoumieux et al., 1997). En insectos se ha demostrado que la biosíntesis de estos péptidos está inducida por invasiones bacterianas (Bulet et al., 1993, Levashina et al., 1998; para una revisión sobre la inducibilidad de los péptidos antimicrobianos en insectos ver Gillespie et al., 1997), mientras que los originarios de mamíferos son componentes constitutivos de las células de donde se han aislado (Nicolas y Mor 1995).

Los péptidos antimicrobianos ricos en prolina presentan pesos moleculares de entre 2 y 4 kDa. Se han identificado dos patrones de secuencia repetitivos, éstos son Pro-Arg-Pro y Pro-Pro (Boman 1995), los cuales se cree son los responsables del posible plegamiento de hélice de poli-L-prolina tipo II (Cabiaux et al., 1994; Falla et al., 1996). Algunos miembros de este grupo presentan características inusuales, tal es el caso de la drosocina y las formaecinas, las cuales presentan una substitución O-glicosídica en un residuo de treonina; dicha substitución, N-acetilgalactosamina-galactosa, es esencial para la actividad microbicida (Bulet et al., 1993; Mackintosh et al., 1998); la indolicidina, la cual contiene, además de una alta proporción de Pro, un alto contenido de triptofano, 5 en una molécula con 13 aminoácidos, de hecho la más alta conocida para cualquier especie peptídica (Selsted et al., 1992), y; las panaeidinas de camarón que presentan un segmento amino terminal rico en prolinas y un C-terminal rico en cisteínas con tres puentes disulfuro, por lo que se han propuesto como híbridos funcionales de dos familias de péptidos antimicrobianos (ver más adelante; Destoumieux et al., 1997).

Mientras que la mayoría de los péptidos ricos en prolina de insectos actúan fundamentalmente contra bacterias Gram-negativas (Meister et al., 1997), algunos, como el caso de la metchnikowina (nombrada así en honor de E. Metchnikow, quien a finales del siglo pasado estudio la "respuesta inmune" de los insectos), no parecen tener actividad contra éstas, sino contra bacterias Gram-positivas y hongos (Levashina et al., 1995). Los miembros de este grupo provenientes de mamíferos actúan con-

tra ambos tipos de bacterias y algunos hongos (Falla et al., 1996), aunque también presentan ciertos efectos en la expresión genética de células de mamífero (Chan y Gallo 1998).

Especies peptídicas antimicrobianas ricas en glicina

Esta clase forma un grupo altamente heterogéneo (Meister et al. 1997), que actúa fundamentalmente contra bacterias Gram-negativas. Los pesos moleculares van desde los 8 hasta los 30 kDa; inclusive el porcentaje de glicina, que define la clasificación de este subgrupo, es muy variado, de 10 a 21 %.

Los primeros miembros reportados de esta familia, llamados atacinas, se encontraron en la hemolinfa de *H. cecropia*, identificándose seis componentes altamente relacionados (Hultmark et al., 1983). Más recientemente se ha logrado determinar la secuencia de aminoácidos, a partir de clonas de cDNA, para varios miembros de esta familia (Boman et al., 1991), comprobándose que existen sólo dos precursores a nivel del RNA, que pueden identificarse como formas básicas y ácidas de la atacina, y que entre los miembros de cada clase la diferencia fundamental es una modificación post-traducciona que implica el procesamiento enzimático de una parte del carboxilo terminal, además de que en las formas básicas el amino terminal se encuentra ciclizado (Cociancich et al., 1994). Otras atacinas se han aislado de *Bombyx mori* (Sugiyama et al., 1995) y *Drosophila* (Åsling et al., 1995) y otras proteínas ricas en glicina con actividad similar en larvas de especies del género *Hyalophora* (Axén et al., 1997). Adicionalmente, en la hemolinfa de *S. peregrina*, se han encontrado péptidos ricos en glicina constitutivos, que poseen actividad antimicótica (Iijima et al., 1993). Péptidos similares se han descrito en larvas de algunos coleópteros (revisado en Hoffman et al., 1996) y abejas (Casteels et al., 1993), todos éstos presentan un inusual contenido de glicina, superior al 40 %.

Por último, mencionaremos a las dipterocinas y las sarcotoxinas II. Las llamadas sarcotoxinas II provienen de larvas de *S. peregrina* (Ando et al., 1987), contienen entre 250 y 280 residuos de aminoácido, y presentan dos dominios, un N-terminal rico en Pro y un dominio C-terminal ( 80 residuos) rico en glicinas altamente conservado que se encuentra invariablemente amidado (Cociancich et al., 1994). Las dipterocinas son péptidos

inducibles de 9 kDa, encontrados en *Phormia terranova* (Dimarcq et al., 1990) y *S. peregrina* (Ishikawa et al., 1992), que presentan dos segmentos diferenciados por homologías con dos grupos distintos de péptidos antimicrobianos, un amino terminal similar a péptidos ricos en prolina, que también presenta una glicosilación, y un carboxilo terminal rico en glicinas. Se ha descrito a las sarcotoxinas II y las dipterocinas como híbridos funcionales de estos dos grupos (Cociancich et al., 1994).

### **II.1.iii Péptidos antimicrobianos con un puente disulfuro**

Los péptidos antimicrobianos con un puente disulfuro representan un grupo altamente homogéneo. Salvo una interesante excepción, la thanatina del insecto *Podisus maculiventris*, todos los miembros de este grupo han sido aislados de la piel de especies de la familia Ranidae. Su característica principal, que define la naturaleza de este grupo de antibióticos, es la presencia de una asa en el carboxilo terminal, estabilizada por un puente disulfuro entre la cisteína que termina con la secuencia y otra en posición -7 con respecto a ésta.

Según la propuesta de D. Barra y M. Simmaco (1995), se pueden identificar cuatro grupos en esta familia, la diferenciación se hace en función de las características estructurales y la actividad de los péptidos. Cronológicamente, primero se aislaron las brevininas tipo -1 y -2 de la especie *Rana brevipoda porsa* (Morikawa et al., 1992). En éstas se identificó el patrón de secuencia que después se comprobaría común a todo un grupo de péptidos antimicrobianos. Las diferencias entre ambos tipos de brevininas se ubican en el tamaño característico (25 y 35 aminoácidos, respectivamente), la secuencia del amino terminal y el espectro de actividad. Las brevininas de tipo 1 son ligeramente más hidrofóbicas, característica que se cree responsable de la capacidad de éstas para lisar células sanguíneas (Barra y Simmaco 1995). Se han aislado brevininas de otras especies del género *Rana*, tales como las brevininas 1e y 2e de *R. esculenta* (Simmaco et al., 1994), la ranalexina de *R. catesbeiana* (Clark et al., 1994) y las gaegurinas -2 y -6 de *R. rugosa* (Park et al., 1994). Estudios con variantes sin cisteínas de la gaegurina-6 sugieren que éstas no son indispensables para la actividad microbicida, ya que cuando son reemplazadas por serinas presentan las mismas cualidades antimicrobianas que el péptido nativo (Suh

et al., 1996), afirmación también válida para la brevinina-1e y la ranalexina reducidas (Kwon et al., 1998; Vignal et al., 1998). La estructura de las brevininas se había predicho como una hélice alfa que terminaría en el asa carboxilo terminal (Clark et al., 1994), lo cual se ha comprobado para el derivado sin cisteínas de la gaegurina-6 (Suh et al., 1996), y la ranalexina sintética (Vignal et al., 1998).

Las otras subfamilias se han denominado esculentinas -1 y -2; éstas se han aislado de *R. esculenta* (Simmaco et al., 1993) y *R. rugosa* (Park et al., 1994), difieren de las brevininas en el espectro de actividad y el tamaño (de entre 38 y 45 residuos de aminoácidos). Sin embargo, el estudio de ambos grupos ha demostrado que poseen similitudes importantes; de hecho, en el análisis de las secuencias codificantes para todos los miembros de este grupo se han encontrado identidades de 50 a 90 % entre los péptidos señal (revisado en Barra y Simmaco 1995). En la región líder del gene se presentan dos zonas diferenciadas, una codificante para aminoácidos predominantemente hidrofóbicos, seguida de una netamente ácida (72 % de los residuos), característica común a varios precursores, y un sitio de procesamiento enzimático completamente conservado, inmediatamente anterior a la secuencia determinada como el péptido activo (pre-pro-K-R-péptido maduro). Los datos de la organización de los genes de las brevininas y las esculetinas, hacen suponer que ambas familias provienen de un solo gen que se duplicó y mutó para eficientar la defensa de los organismos contra patógenos. Esta estructura genómica también se encuentra en otros péptidos bioactivos de la piel de especies de otras familias de anfibios (Hylidae), como el caso de las dermorfinas y deltorfinas, péptidos opioides neuroactivos (Daly et al., 1992; Morikawa et al., 1992) y las dermaseptinas (Amiche et al., 1994; Charpentier et al., 1998).

En insectos se ha descrito la existencia de lo que parece ser un análogo acortado de las brevininas de tipo I (Fehlbaum et al., 1996), este péptido, denominado thanatina, contiene 21 aminoácidos y la región de mayor identidad es el extremo carboxilo terminal. Presenta el asa definida por las cisteínas, con dos modificaciones importantes; la primera es la posición relativa de los residuos que establecen el puente disulfuro (1:-8 en vez de 1:-7, contando desde el extremo carboxilo), y

la presencia de una extensión de tres aminoácidos después de la cisteína terminal. Dichas modificaciones representan un importante factor de diferencia con los péptidos de esta familia originarios de ranas; a nivel estructural la thanatina presenta un plegamiento en forma de pasador beta, en claro contraste con el reportado para otros miembros de esta familia y similar al reportado para péptidos con dos puentes disulfuro (ver más adelante), del residuo 8 hasta el carboxilo terminal (Mandard et al., 1998). Sin embargo, el disolvente donde se realizaron las determinaciones estructurales fue agua, en vez de una mezcla de ésta con algún agente inductor para la formación de hélices  $\alpha$ , por lo que no puede descartarse la posibilidad de que el amino terminal, al encontrarse en un medio más hidrofóbico como la membrana de las células blanco, forme una estructura secundaria del tipo de la reportada para la ranalexina. La thanatina ataca, en concentraciones similares a las fisiológicas, tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas y hongos filamentosos (Fehlbaum et al., 1996).

#### **II. I. iv Péptidos con dos o más puentes disulfuro**

##### **Péptidos antimicrobianos con dos puentes disulfuro**

La primera especie peptídica descrita de esta familia fue la taquiplesina, aislada del cangrejo *Tachyplesus tridentatus*; este péptido de 17 residuos demostró poseer actividad microbicida contra un amplio espectro de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, así como contra hongos (Nakamura et al., 1988). El arreglo tridimensional de la taquiplesina ha sido determinado por RMN- $^1\text{H}$  (Kawano et al., 1990); la estructura refiere a la de un pasador  $\beta$ , que consiste en una hoja  $\beta$  antiparalela de dos hebras, que comenzaría con el residuo número 3, una de las cisteínas, hasta el 8, donde se encuentra una vuelta tipo  $\beta$ -I, para continuar con la segunda hebra, desde el residuo 11 hasta el carboxilo terminal. Se han aislado otras taquiplesinas, tres del cangrejo *Limulus polyphemus* (Miyata et al., 1989), y una más de la hemolinfa del alacrán *Leiurus quinquestratus* (Ehret-Sabatier et al., 1996).

Dentro de los péptidos microbicidas encontrados en leucocitos de cerdo se ha caracterizado un grupo con dos puentes disulfuro denominado protegrinas. Éstas contienen de 16 a 18 residuos de aminoácidos, su espectro de actividad, antibacteriano (Kokryakov et al., 1993) y antimicótico (Cho

et al., 1998b), está más relacionado con las defensinas de mamífero (ver más adelante), que con las taquiplesinas. De hecho análisis de homología de secuencia, demuestra que ambas familias encontradas en mamíferos están estrechamente emparentadas (similitudes > 40 % en 18 aminoácidos sobrelapados; Korkyakov et al., 1993). Se ha determinado la estructura de la protegrina-1 por RMN <sup>1</sup>H, ésta, al igual que las taquiplesinas, adopta un plegamiento en forma de una hoja  $\beta$  de dos hebras estabilizada por los puentes disulfuro (Aumelas et al., 1996).

En diversas especies de plantas se han encontrado péptidos antimicrobianos con dos puentes disulfuro que no presentan relaciones estructurales con los dos grupos arriba descritos; aquí presentamos dos ejemplos. En semillas de *Impatiens balsamina*, se ha encontrado una serie de péptidos antimicóticos altamente similares entre sí, derivados de un solo precursor de alto peso molecular, éstos se han denominado Ib-AMP 1 a 4, los cuales contienen 20 residuos, cuatro de ellos cisteínas en posiciones invariables, involucradas en la formación de dos puentes disulfuro (Tailor et al., 1997). La estructura del Ib-AMP 1 fue recientemente investigada por métodos de Dicroísmo Circular y RMN-<sup>1</sup>H. En ese trabajo se presenta evidencia de que la estructura no está compuesta por hélices  $\alpha$  u hojas  $\beta$ , sino por elementos estructurales menos definidos del tipo de las vueltas  $\beta$  (Patel et al., 1998). Por otra parte en granos de maíz se ha descrito la presencia de un péptido microbicida de 4 kDa con dos puentes disulfuro, denominado MBP-1, que presenta, en pruebas de DC, un alto carácter alfa helicoidal (Duvick et al., 1992).

#### Péptidos antimicrobianos con tres puentes disulfuro

Una parte importante del sistema inmune de mamíferos la constituyen las células fagocíticas del tipo de los macrófagos y los neutrófilos, en éstos se encuentran presentes una serie de péptidos antimicrobianos de amplio espectro, donde el grupo principal lo constituyen las llamadas defensinas "clásicas" y las  $\beta$ -defensinas.

Cronológicamente se aislaron primero las defensinas de macrófagos de conejo (Selsted et al., 1983); la estructura primaria, determinada en el mismo trabajo, de 33 aminoácidos, demostró la presencia de seis cisteínas involucradas en tres puentes disulfuro, así como

un alto contenido de residuos de arginina. Se han encontrado miembros de este grupo en diversos tipos celulares y especies, incluyendo gránulos de neutrófilos en humanos, conejos y ratas, macrófagos alveolares en conejos, y células epiteliales de la pared del intestino delgado en ratones y humanos (revisado en Ganz y Lehrer 1994). Estas defensinas "clásicas" poseen actividad microbicida contra un amplio espectro de bacterias, micobacterias, hongos y algunos virus encapsulados (revisado en Lehrer et al., 1993). Otras actividades se han reportado para las defensinas, tales como la capacidad de contribuir positivamente a la lisis mediada por neutrófilos de células tumorales, la reparación de tejidos dañados, la inducción del crecimiento celular, así como el bloqueo reversible del receptor de la hormona adenocorticotropina (revisado en Ganz y Lehrer 1994).

Las cisteínas se encuentran en un arreglo consenso determinado como ... -Cis 1-Xaa-Cis2-(Xaa)<sub>4</sub>-Cis3-(Xaa)<sub>7</sub>-Gli-Xaa-Cis4-(Xaa)<sub>9</sub>-Cis5-Cis6-Xaa- ... unidas en relación 1-6, 2-4 y 3-5. El plegamiento tridimensional se ha determinado por RMN-<sup>1</sup>H para NP-1, NP-5 y HNP-2 (Pardi et al., 1988 y 1992) y por difracción de rayos X para HNP-3 (Hill et al., 1991). La estructura está dominada por tres hebras que conforman una hoja β, estabilizada por los disulfuro. La celda unitaria del cristal de HNP-3 está compuesta por dos moléculas de defensina formando un dímero estabilizado por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas intermoleculares. Esta asociación se ha utilizado para proponer modelos del posible mecanismo de actividad de las defensinas de mamífero (Hill et al., 1991).

Las β-defensinas se han encontrado en leucocitos de pollo (Harwig 1994), tejidos epiteliales humanos (Bensch et al., 1995; Harder et al., 1997; Bals et al., 1998) y en neutrófilos (Selsted et al., 1993) y tráquea de bovinos (Diamond et al., 1991). Difieren de las defensinas clásicas en su longitud (de 38 a 42 residuos), estructura primaria, espectro de actividad (exclusivamente contra bacterias) y arreglo de disulfuros, el cual se encuentra en una relación ... -Cis 1-(Xaa)<sub>4</sub>-Gli-Xaa-Cis2-(Xaa)<sub>4</sub>-Cis3-Pro-(Xaa)<sub>6</sub>-Gli-Xaa-Cis4-(Xaa)<sub>6</sub>-Cis5-Cis6-Xaa- ...; los puentes se establecen entre 1-5, 2-4 y 3-6. A pesar del arreglo diferente de las cisteínas, la estructura de las β-defensinas es muy similar a la de las defensinas clásicas (Zimmermann et al., 1995).

En insectos se han descrito una variedad de péptidos con tres puentes disulfuros, a los cuales se les denomina defensinas de insecto. Los primeros miembros reportados de esta clase se aislaron de las secreciones de una línea celular embrionica de *S. peregrina* (Matsuyama y Natori 1988), los autores propusieron el nombre de sapecinas; éstas contienen alrededor de 40 residuos y seis cisteínas arregladas en una disposición 1-4, 2-5 y 3-6 de la secuencia ...-Cis1-(Xaa)<sub>n</sub>-Cis2-(Xaa)<sub>3</sub>-Cis3-(Xaa)<sub>n</sub>-Gli-Xaa-Cis4-(Xaa)<sub>n</sub>-Cis5-Xaa-Cis6-... (Kuzuhara et al., 1990). Unos meses después del reporte de las sapecinas, el grupo de J.A. Hoffman del CNRS francés, describió el hallazgo de otro péptido antimicrobiano con tres pares de cisteínas en la hemolinfa de moscas inmunizadas (Lambert et al., 1989); aunque la identidad entre la especie reportada en este trabajo, llamada defensina A, y la sapecina es mayor al 90 %, y el arreglo de disulfuros idéntico (Lepage et al., 1991), los autores ignoraron el trabajo de los japoneses en la discusión y propusieron el nombre de defensinas de insecto para esta subclase de péptidos antimicrobianos. Se han encontrado defensinas de insecto en una variedad de especies de las familias Díptera (Matsuyama y Natori 1988; Lambert et al., 1989; Dimarcq et al., 1994; Chalk et al., 1994), Coleóptera (Moon et al., 1994), Heminóptera (Cateels-Josson et al., 1994), Paleóptera (Bulet et al., 1992) y Hemíptera (Cociancich et al., 1994b). En artrópodos de la clase Arachnida y Moluscos se han descrito péptidos homólogos de las defensinas de insectos (Cociancich et al. 1993; Charlet et al., 1996; Ehret-Sebatier et al., 1996; Hubert et al., 1996). Las defensinas de insecto actúan fundamentalmente contra bacterias Gram-positivas; sin embargo efectos microbicidas contra bacterias Gram-negativas (revisado en Hoffmann y Hetru 1992) y protozoarios también se han reportado (Shahabuddin et al., 1998).

La primera propuesta sobre el plegamiento tridimensional de las defensinas de insecto la hicieron H. Hanzawa et al., en 1990. Ellos realizaron la determinación estructural de la sapecina de *S. peregrina* por RMN-<sup>1</sup>H; los resultados representaban una resolución muy pobre, en la que sólo se podían identificar los patrones de estructura secundaria.

Años después, el grupo de Hoffmann realizó determinaciones de estructura con el mismo método para la defensina A de *P. terranova*; la calidad del modelo mejoró pero no sustancialmente (Bonmatin et al., 1992). Fue hasta 1995 que se obtuvo un modelo bien resuelto, en el cual se observan claramente todos los elementos que configuran la estructura tridimensional de las defensinas de insecto (Cornet et al., 1995). Las defensinas de insecto presentan un patrón estructural que se conoce como  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteínas ( $\alpha/\beta$ -EC), el cual consiste en dos elementos de estructura secundaria definidos (una hélice  $\alpha$  de los residuos 16-23 y una hoja  $\beta$  antiparalela de dos o tres hebras, 27 a 31 y 34 a 38 en el caso de la DefA, estructuradas en forma de "pasador") que se encuentran unidos y estabilizados por dos disulfuros, correspondientes a los pares 2-5 y 3-6, el tercer par de cisteínas (1-4) une la primera hebra  $\beta$  con el asa amino terminal. De cualquier forma, la estructura de las defensinas de insecto es altamente dependiente del ambiente en que se encuentre, lo cual podría tener implicaciones en el mecanismo de actividad (Maget-Dana et al., 1995). El motivo estructural de las defensinas de insecto lo adoptan péptidos con muy diversa función tales como las toxinas de alacrán (que actúan sobre canales iónicos), las tioninas gama y las defensinas de plantas (grupos de péptidos antimicrobianos con cuatro puentes disulfuro, ver más adelante) y el edulcorante brazeína encontrado en frutos de *Pentadiplandra brazzana* (Caldwell et al., 1998). A nivel de secuencia estos grupos sólo conservan seis residuos de cisteína en una disposición y arreglo de disulfuros invariables.

Se han encontrado otros péptidos antimicrobianos con tres puentes disulfuro que no presentan relación con el grupo de las defensinas, aquí mencionaremos tres ejemplos: 1) La NK-lisina es un polipéptido de 8 kDa encontrado en el intestino de puerco (Andersson et al., 1995), presenta similitudes importantes, a nivel de estructura primaria, con los péptidos formadores de poro del patógeno humano *Entamoeba histolítica*, conocidos como amebaporos (Leippe 1995), así como con dos proteínas putativas, de actividad y distribución desconocida, identificadas en el genoma humano (Boman 1995). Recientemente se ha determinado la estructura de la NK-lisina, la cual presenta un plega-

miento globular constituido por 5 hélices alfa enroscadas (Liepinsh et al., 1997). El espectro de actividad de la NK-lisina se ha comprobado contra algunas cepas de *E. coli* y del hongo *Candida albicans*, así como contra líneas de células tumorales (Boman 1995). 2) En granos de *Macadamia integrifolia*, se encontró un péptido de 8 kDa denominado MiAMP1, capaz de inhibir a concentraciones nanomolares el crecimiento de un buen número de hongos que afectan a plantas, así como contra algunas bacterias (Marcus et al., 1997). 3) Las panaeidinas del camarón *Panaeus vannamei* presentan un dominio C-terminal entrecruzado por seis puentes disulfuro y ejercen una actividad bacteriostática similar a la de los péptidos ricos en prolina (de hecho poseen un dominio rico en este aminoácido, ver arriba), y en contraste con el mecanismo propuesto para otros péptidos antimicrobianos con tres puentes disulfuro (Destoumieux et al., 1997).

#### Péptidos antimicrobianos con cuatro puentes disulfuro

Los miembros de este grupo de polipéptidos de 5 kDa han sido identificados, salvo una excepción encontrada en *D. melanogaster*, en plantas de diversas familias. Los primeros reportes correspondieron al aislamiento de péptidos producidos por trigo, con función similar a las tioninas  $\alpha$  y  $\beta$  de plantas (revisado en Florack y Stiekema 1994), por lo cual se designaron tioninas gama (Colilla et al., 1990). Posteriormente se demostró que la estructura de estos péptidos aislados de trigo no está, en forma alguna, relacionada con las tioninas  $\alpha$  y  $\beta$  típicas (revisado en Broekaert et al., 1995). Se han descrito compuestos estructuralmente similares a las tioninas gama, algunos con función distinta (llamados defensinas de plantas), en una variedad de especies de plantas, incluyendo rábano, castaña, cebada, papa y sorgo (Terras et al., 1993; también ver la revisión de Broekaert et al., 1995).

En función de la secuencia de aminoácidos y los blancos de este grupo se distinguen como tioninas gama, que tienen una función microbicida bastante inespecífica, y defensinas de plantas, que atacan a una amplia variedad de hongos (Broekaert et al., 1995). Con respecto del espectro de actividad, se divide a las defensinas de plantas en dos grupos, sin que ésto pueda asociarse a un patrón de secuencia; los morfogénicos que actúan contra hongos similares a los productores de la penicilina y, los no morfogénicos que lo hacen más efectivamente

contra patógenos típicos de plantas como *Leptosphaeria maculans* (Cammune et al., 1992; Broekaert et al., 1995).

Las tioninas gama y las defensinas de plantas contienen 4 pares de cisteínas arregladas en disposición 1-8, 2-5, 3-6 y 4-7, sobre una secuencia consenso ... -Cis1-(Xaa)<sub>n</sub>-Gli-Xaa-Cis2-(Xaa)<sub>n</sub>-Cis3-(Xaa)<sub>3</sub>-Cis4-(Xaa)<sub>3</sub>-Glu-(Xaa)<sub>n</sub>-Gli-Xaa-Cis5-(Xaa)<sub>n</sub>-Cis6-Xaa-Cis7-(Xaa)<sub>n</sub>-Cis8 (Nitti et al., 1995), relación idéntica a la que presentan las toxinas de cadena larga de alacranes (Courad y Jover 1984). Dado que los puentes disulfuro intermedios guardan la misma relación que en las defensinas de insecto, se esperaba que el plegamiento resultara equivalente, lo cual efectivamente se demostró cuando se resolvieron las estructuras de las tioninas  $\gamma$  I-H, I-P y Sl $\alpha$ 1, provenientes de cebada, trigo y sorgo respectivamente (Bruix et al., 1993; Bloch et al., 1998), y de la defensina Rs-AFP1 de *Raphanus sativus* (Fant et al., 1998). Entre ambos tipos de antibióticos se pueden ubicar pocas diferencias a nivel del plegamiento global que adoptan; sin embargo las regiones que corresponden a las asas y giros que unen los segmentos con estructura secundaria definida sí presentan un importante grado de divergencia tanto a nivel de secuencia como en el arreglo tridimensional (Fant et al., 1998). A diferencia de las defensinas de insecto, los péptidos antimicrobianos  $\alpha\beta$ -EC originarios de plantas presentan, en el amino terminal, una tercera hebra de la hoja beta, característica que comparten con algunas toxinas de alacranes y la brazeína.

En *Drosophila* se ha encontrado un péptido homólogo de las defensinas de plantas (similitud cercana al 40 %); este péptido llamado drosomicina, que fue el primer antimicótico reportado en insectos (Fehlbaum et al. 1994), establece el mismo patrón de disulfuros (Michaut et al., 1996) y adopta idéntico plegamiento tridimensional que sus análogos en plantas (Landon et al., 1997). Aparte; se han descrito una serie de péptidos antimicrobianos similares a la heveína, la proteína responsable de las reacciones alérgicas al latex. Ésta contiene 43 residuos, ocho de ellos cisteínas, y presenta una estructura dominada por una hoja  $\beta$  antiparalela de dos hebras centrales unidas por puentes disulfuro a los extremos N y C terminales de la proteína (Rodríguez et al., 1986; Andersen et al., 1993), el plegamiento global,

que se conoce como dominio de unión a quitina, lo presentan proteínas muy variadas como la aglutinina de germen de trigo (Wright 1987 y 1989), la lectina de ortiga (Beintema y Peumans 1992) y los péptidos antimicrobianos Ac-AMP 1 y 2 de amaranto (Broekaert et al., 1992; Martins et al., 1996) y Pn-AMP 1 a 3 de semillas de *Pharbitis nit/L* (Koo et al., 1998), los cuales presentan una marcada actividad antimicótica, similar a la que desarrollan las tioninas  $\gamma$  (Koo et al., 1998).

## **II.2 Mecanismos de actividad**

### **II.2.1 Péptidos lineales alfa helicoidales**

Todos los miembros de la superfamilia de los péptidos antimicrobianos alfa helicoidales poseen una característica estructural común, esta es la naturaleza anfipática de las hélices que los conforman. La cara polar de las hélices contiene, invariablemente, residuos básicos que le confieren una carga neta positiva que puede interactuar electrostáticamente con las cargas negativas de los fosfatos en los fosfolípidos (Nakajima et al., 1987; Christensen et al., 1988; Matsuzaki et al., 1995 y 1997). Dicha interacción es inespecífica, como lo demuestra el hecho de que análogos sintéticos con exclusivamente aminoácidos D conservan las mismas propiedades en pruebas biofísicas y en su función microbiciada (Bessalle et al., 1990; Wade et al., 1990), y sólo depende de la abundancia de lípidos ácidos en la membrana blanco (Nakajima et al., 1987; Matsuzaki et al., 1995; Wang et al., 1998) y la concentración de colesterol (Christensen et al., 1988; Matsuzaki et al., 1995; Tytler et al., 1995). Ambos factores se han propuesto como las razones de la especificidad por membranas microbianas, toda vez que representan diferencias claras con las membranas de los hospederos. Funcionalmente el reconocimiento entre los péptidos antimicrobianos y las membranas celulares podría aumentar la concentración local del péptido sobre sus blancos; además se ha propuesto como el primer paso del mecanismo mediante el cual éstos matan a las células sobre las que actúan.

La actividad microbiciada se atribuye claramente al efecto lítico que desarrollan esta clase de péptidos (Nakajima et al., 1987; Christensen et al., 1988; Westerhoff et al., 1989; Boman et al., 1993), aunque otros efectos, como el desacoplamiento de la respiración que resulta de la disipación del sistema bio-

lógico de generación de energía asociado a membranas (Westerhoff et al., 1989; Hugosson et al., 1994) y la pérdida de  $K^+$  citoplásmico (Matsuzaki et al., 1997b), también se han registrado y propuesto como coadyuvantes en la función antibiótica; aunque bien pueden considerarse como consecuencias del efecto lítico.

Sin embargo, la relación entre lisis y la función microbicida no está del todo esclarecida. Se han propuesto dos mecanismos generales para explicarla (revisado en Bechinger 1997; Matsuzaki 1998): el primero consiste en que la cara hidrofóbica de los péptidos, después de que éstos se asocian a las membranas bacterianas, internas o externas, formando agregados, penetra en la bicapa lipídica, en un primer momento paralelamente a ésta (Ludtke et al., 1994 y 1996; Matsuzaki et al., 1994 y 1996), para después introducirse, cuando la concentración local del péptido llega a un valor límite (Ludtke et al., 1994; Jo et al., 1998), a la fase hidrofóbica de la membrana y formar canales aniónicos voltaje-dependientes sobre membranas tanto artificiales como naturales (Christensen et al., 1988, Cruciani et al., 1991; Ludtke et al., 1994 y 1996; Matsuzaki et al., 1995 y 1997; Lockey y Ourth 1996; Jo et al., 1998; Wenk y Seelig 1998). Estos canales podrían estar formados por multímeros del péptido (Agawa et al., 1991; Durell et al., 1992) o complejos supramoleculares que involucrarían a fosfolípidos de la membrana (Ludtke et al., 1996; Matsuzaki et al., 1998a). Al menos para el caso de la magainina 2, en una tercera etapa, el péptido puede translocarse hacia el lado citoplásmico de la membrana posibilitando alguna función intracelular (Matsuzaki et al., 1996).

El segundo mecanismo se conoce como "tipo carpeta", originalmente fue propuesto por Y. Pouny et al. (1992), estudiando la interacción de derivados fluorescentes de la dermaseptina A con membranas sintéticas. Posteriormente, con base en experimentos espectrofluorométricos, de reflectancia difusa de IR y RMN en disolución y fase sólida, este modelo se ha propuesto para la cecropina B2, el PGLa, la cecropina P1, la magainina 2, la caerina 1.1. y el Shiva-3 (Bechinger et al., 1993 y 1998; Gazit et al., 1994, 1995 y 1996; Hirsh et al., 1996; Wong et al., 1997; Boisbouvier et al., 1998). El mecanismo consiste en que los péptidos asociados paralela e inespecíficamente a la membrana, la rigidizan provocando una variación en el potencial de membra-

na, seguida de la interrupción de la bicapa. La concentración del péptido en la superficie de la membrana de las células blanco, que se ha reconocido como un factor fundamental que media la actividad microbicida (Silvestro et al., 1997), podría además favorecer alguno de ambos tipos de mecanismo (Ludtke et al., 1994 y 1996), como se ha comprobado para el caso de la alameticina, un antibiótico alfa helicoidal de origen micótico (He et al., 1995).

### **II.2.ii Péptidos con alto contenido de ciertos aminoácidos**

Como ya se mencionó esta familia presenta un alto grado de heterogeneidad, incluso entre aquellos miembros de cualquiera de los dos grupos en que se divide; de hecho, dadas las marcadas diferencias químicas entre éstos, no es de esperarse un mecanismo común. Sin embargo, como se verá más adelante, el análisis de la información reportada demuestra que el mecanismo es diferente del lítico descrito para otras clases de péptidos antimicrobianos y que actúan fundamentalmente afectando mecanismos celulares de biosíntesis de proteínas y/o ácidos nucleicos.

Para los miembros de las especies ricas en prolina originarios de mamíferos se han estudiado los mecanismos de acción de las bacterenicinas, el PR-39 y la indolicidina. Las bacterenicinas inducen un aumento en la permeabilidad de la membrana con el subsecuente decremento de la respiración celular, además de incrementar la pérdida de metabolitos e inhibir la biosíntesis de proteínas y ARN (Skerlavaj et al., 1990). El PR-39 interfiere el crecimiento de bacterias pero no provoca lisis en éstas, disminuye la síntesis de proteínas e induce la degradación de la maquinaria proteica para la síntesis del ADN (Boman et al., 1993). La indolicidina ejerce su actividad mediante la represión de la síntesis de ADN (Subbalakshmi et al., 1996; Subbalakshmi y Sitaram 1998); aunque otros autores registran un incremento de la corriente transmembranal, que asocian a la capacidad de formar poros con la consecuente permeabilización de la membrana interna de bacterias (Falla et al., 1996). Para el caso de los péptidos ricos en prolina provenientes de insectos poco se ha estudiado al respecto, sólo existe evidencia de que análogos de apidaecina con ex-

clusivamente aminoácidos D no son activos, por lo que se cree, al menos para este caso, que el mecanismo de acción puede estar asociado a la presencia de receptores membranales quirales (Casteels y Tempst 1994).

El mecanismo de actividad de los péptidos antimicrobianos ricos en glicina permanece desconocido, únicamente se ha estudiado el efecto de las atacinas sobre la membrana externa de bacterias (Engström et al., 1984), dicho efecto se ha descrito como bacteriostático, esto es que el efecto antibacteriano se ejerce mediante una represión del crecimiento, a través de impedir la síntesis de algunas proteínas de la membrana externa de la bacteria, reprimiendo específicamente la expresión de los genes de la familia *omp* (Carlsson et al., 1991). Resultados similares se han descrito para la actividad de la gloverina (Axén et al., 1997).

### **II.2.iii Péptidos antimicrobianos con un puente disulfuro**

El grupo de Zasloff observó la relación estructural de los péptidos antimicrobianos con un puente disulfuro con la polimixina (Clark et al., 1994), un antibiótico de origen bacteriano que presenta una región hidrofóbica compuesta por una cadena hidrocarbonada y una región polar peptídica en forma de asa con cargas positivas (revisado en Storm et al., 1977); en base a lo cual propusieron un mecanismo análogo al observado para la polimixina, en donde el asa positiva interactuaría con los fosfolípidos negativos de la membrana y la región hidrofóbica, que estaría formando una hélice  $\alpha$ , penetraría en la membrana causando la disrupción de la misma (Clark et al., 1994).

Sin embargo estudios sobre el espectro de actividad de la thanatina, el análogo de las brevininas encontrado en insectos, hacen suponer que el mecanismo microbicida no está dirigido a la membrana citoplásmica y que de hecho varios mecanismos podrían estar involucrados, dado que análogos con exclusivamente aminoácidos D, en función del microorganismo que se pruebe, no presentan comportamientos consistentes (Fehlbaum et al., 1996). En el único trabajo realizado sobre la interacción de un miembro de esta familia con membranas sintéticas se demostró que la ranalexina se orienta paralelamente a la membrana sin sufrir cambios conformacionales importantes, sugiriendo un meca-

nismo similar al tipo carpeta propuesto para los péptidos alfa helicoidales y diferente del aceptado para la polimixina (Vignal et al., 1998).

#### **II.2.iv Péptidos antimicrobianos con dos o más puentes disulfuro**

Las taquiplesinas permeabilizan la membrana externa, pero no la interna, de bacterias Gram-negativas de manera similar a lo reportado para el modelo de formación de poros de los péptidos alfa helicoidales, estos, se asocian electrostáticamente con los fosfolípidos de la membrana, para después introducirse perpendicularmente a ésta y formar poros moderadamente selectivos a aniones y, como último paso, translocarse hacia el espacio intermembranal; en el proceso la estructura de hoja  $\beta$  podría desestabilizarse para favorecer una conformación más anfipática (Matsuzaki et al., 1991; Ohta et al., 1992; Park et al., 1992; Oishi et al., 1997). El efecto microbicida está asociado al segundo paso de este mecanismo, para el cual la presencia de los puentes disulfuro del péptido nativo se ha demostrado como indispensable (Matsuzaki et al., 1997c). Las protegrinas permeabilizan membranas celulares, en un proceso análogo al demostrado para las taquiplesinas (Mangoni et al., 1996); además, estudios de RMN han demostrado que las protegrinas dimerizan en presencia de micelas de fosfolípidos, varios dímeros podrían formar complejos macromoleculares orientados perpendicularmente a la membrana (Roumestand et al., 1998).

Las defensinas de mamíferos permeabilizan secuencialmente las membranas externa e interna de bacterias (Lehrer et al., 1989), lo cual se ha asociado con la capacidad de formar poros en bicapas lipídicas artificiales y naturales (Kagan et al., 1990; Wimley et al., 1994, Lencer et al., 1997) y la promoción de la fusión y la lisis de vesículas de fosfolípidos (Fujii et al., 1993). El modelo del poro de defensinas está basado en la naturaleza dimérica que presentan las defensinas de humano (Hill et al., 1991); en éste los dímeros de defensina se asociarían electrostáticamente con la membrana, para después conformar un hexámero de dímeros transmembranal que formaría un poro de 25 Å (Wimley et al., 1994). Sin embargo se ha demostrado que las defensinas de conejo no dimerizan en solución (Pardi et al., 1988), lo cual impide la formación de poros estables pero no la lisis de vasículas unilamelares (Hristova et al., 1996), sugiriendo un mecanismo microbicida distinto a la formación de cana-

les, el cual podría ser similar al "tipo carpeta" propuesto para los péptidos antimicrobianos alfa helicoidales además de análogo a la primera interacción de los péptidos con la membrana blanco (Hill et al., 1991).

Las defensinas de insectos, a concentraciones superiores a un valor crítico, depolarizan la membrana interna de bacterias necesariamente viables, inducen la pérdida de  $K^+$  y ATP citoplásmicos e inhiben la respiración (Cociancich et al., 1993b); los efectos anteriores, de acuerdo con experimentos de patch-clamp, se asocian a la capacidad de formar poros en liposomas gigantes (Cociancich et al., 1993b) y bicapas sintéticas (Hirakura et al., 1996). Recientemente esta hipótesis se ha validado con experimentos que demuestran que las defensinas pueden insertarse en bicapas lipídicas y formar complejos de estequiometría definida con los fosfolípidos de la membrana, cuando existe un potencial transmembranal mínimo (Maget-Dana y Ptak 1997). Adicionalmente se ha presentado evidencia sobre la capacidad de la sapecina B, de *S. peregrina*, para bloquear canales de potasio activados por calcio (Shimoda et al., 1994; Kim et al., 1994; Suzuki et al., 1997). Recientemente se ha propuesto que la región carboxilo terminal, la hoja  $\beta$ , es la responsable de la función microbicida (Lee et al., 1998), sin embargo los datos sobre los que se soporta tal afirmación, contradicen los resultados obtenidos con la región que forma la hélice  $\alpha$  en la sapecina B, donde se muestra que este fragmento es activo contra un amplio espectro de bacterias y hongos (Yamada y Natori 1994; Hirakura et al., 1996).

Para el caso de los provenientes de plantas ya se mencionó que se distinguen en defensinas y tioninas  $\gamma$ . En particular las primeras se diferencian por su capacidad de cambiar la morfología de las células blanco; sin embargo, hay evidencia de que los mecanismos de actividad son similares, por ejemplo Rs-AFP2 y Dm-AMP1, respectivamente pertenecientes al grupo morfogénico y no morfogénico, inducen de forma equivalente la salida de  $K^+$  citoplasmático, la entrada de  $Ca^{2+}$  y la alcalinización del medio donde se cultivan las células sometidas a la prueba (Thevissen et al., 1996). También se ha demostrado que mutaciones en regiones específicas, precisamente donde se presentan las

ayores diferencias estructurales con la tioninas  $\gamma$ , alteran sensiblemente la actividad de Rs-AFP2; en particular mutantes donde se rempazan algunos aminoácidos conservados en las defensinas de plantas por los correspondientes en la tionina SI $\alpha$ 2, anulan la actividad antimicótica (De Samblanx et al., 1997).

Dadas las diferencias en la actividad morfogénica, se creía posible la existencia de un mecanismo que involucrara la interacción de los péptidos con receptores específicos. Evidencia en favor de lo anterior se ha presentado para el caso de las membranas microsomales y de la hifa de *Neurospora crassa* cuando se trata con Hs-AFP1 o Rs-AFP2, ambas defensinas morfogénicas (Thevissen et al., 1997). La teoría del receptor membranal puede estar apoyada por la evidencia de que, a diferencia de otros péptidos antimicrobianos, la defensina PTH1 de papa no causa el rompimiento o la fusión significativa de membranas sintéticas, ésto en claro contraste con la actividad lítica reportada para la tionina TH $\alpha$  de rábano, un antibiótico peptídico estructuralmente homólogo a las tioninas  $\gamma$  de plantas (Caaveiro et al., 1997).

### II.3. Alacranes

#### II.3.1 Biología

Los alacranes pertenecen a uno de los órdenes de artrópodos terrestres más antiguos que se conocen, existen registros fósiles que datan del periodo Silúrico (Kjellesville-Waering 1986). Taxonómicamente los alacranes pertenecen al Reino Animalia (Subreino Metazoa), Phylum Arthropoda (Subphylum Chelicerata), Clase Arachnidae y al Orden Scorpionidae. Se reconocen 6 Familias, a saber; Buthidae, Bothriuridae, Chactidae, Diplocentridae, Scorpionidae y Vejovidae. Todas las especies peligrosas al humano pertenecen a la familia Buthidae, de los géneros *Androctonus* sp., *Buthus* sp., *Leiurus* sp., *Mesobuthus* sp. y *Parabuthus* sp., en África y Medio Oriente, *Cetruides* sp., en México y el sur de Estados Unidos, y *Tityus* sp. en América del Sur (Keegan H.L., 1980). En México se encuentran 8 especies de importancia médica, de las cuales los *C. limpidus limpidus*, *C. limpidus tecomanus* y el *C. infamatus* son los responsables del 80 % de los casos de picaduras (Possani et al., 1992; Dehesa-Davila y Possani 1994).

### II.3.ii Toxinas de alacrán

El componente principal del veneno de los alacranes lo constituyen las toxinas, péptidos neurotóxicos con actividad antagonista de canales iónicos; aunque también se encuentran algunas enzimas y moléculas de bajo peso molecular (Possani 1984). Las toxinas son una de las herramientas más utilizadas en el estudio de canales iónicos (Miller 1995); dependiendo del tipo de canal que afectan, se reconocen como específicas para canales de potasio (Carbone et al., 1982), de sodio (Jover et al., 1980), cloro (DeBin et al., 1993) o calcio (Valdivia y Possani 1998). Todas, salvo las específicas para calcio, adoptan un motivo estructural invariable conocido como  $\alpha/\beta$  estabilizado por cisteínas (Fontecilla-Camps et al., 1980; Bontems et al., 1991; Lippens et al., 1995; Delepierre et al., 1997; Oren et al., 1998), el cual, como se ha visto, comparten con las defensinas de insecto y plantas, las tioninas  $\gamma$  y la brazeína.

Las toxinas bloqueadoras de canales de potasio, de acuerdo con sus características estructurales, se dividen en 9 familias (Miller 1995; Selisko et al., 1998). Están constituidas por entre 30 y 40 residuos de aminoácidos, contienen 6 u 8 cisteínas en un arreglo consenso ... -Cis1-(Xaa)<sub>n</sub>-Cis2-Xaa3-Cis3-(Xaa<sub>3</sub>-Tre-Gli-Cis4)-(Xaa)<sub>n</sub>-Cis4(5)-(Xaa)<sub>n</sub>-Cis5(6)-Xaa-Cis6(7)-(Xaa<sub>2</sub>-Cis8)- ..., los puentes disulfuro se establecen entre 1-4(5), 2-5(6), 3-6(7) y (4)-(8) (para una revisión reciente ver Possani et al., 1998). Las toxinas que afectan los canales de sodio presentan una longitud de 60 a 70 aminoácidos, se reconocen dos familias que afectan a mamíferos; las toxinas  $\alpha$  que retardan la inactivación y las toxinas  $\beta$  que modifican la dependencia a voltaje del mecanismo de activación de los canales (revisado en Couraud y Jover 1984). Sin embargo existen toxinas dirigidas contra canales de sodio específicas contra crustáceos e insectos que no pertenecen a ninguno de esos grupos, en una clasificación general se pueden dividir en depresantes (Benkhalifa et al., 1997) y excitatorias (Borchani L., et al., 1996), aunque otras toxinas contra insectos o crustáceos con actividades diferentes también han sido reportadas (Lebreton et al., 1994; Selisko et al., 1996; García et al., 1997). Éstas poseen 4 puentes disulfuro, tres de los cuales son homólogos a las toxinas bloqueadoras de canales de potasio, el cuarto, como el caso de la brazeína y las defensinas y tioninas gama de plantas, se establece entre las cisteínas adicionales en posiciones relativas (1) y (8).

### III Antecedentes

En la hemolinfa de alacranes del viejo mundo, en las especies *Leiurus quinquestratus hebreus* y *Androctonus australis* Hector, ambos de la familia Buthidae, se ha descrito la existencia de péptidos similares a defensinas y taquiplesinas (Cociancich et al. 1993; Ehret-Sabatier et al. 1996). Como se puede ver en la figura III. 1a las defensinas de alacranes tienen una estrecha relación con la encontrada en el insecto *Aeschna cyanea* (identidad > 80%), que pertenece al orden Paleóptera Odonata, uno de los más antiguos en insectos. Lo anterior marca un claro contraste con las demás defensinas de insecto, encontradas en especies de órdenes que, por lo general, se cree evolucionaron 100 millones de años después que el Paleóptera (Bulet et al., 1992). Adicionalmente, la estructura primaria también muestra diferencias con las defensinas de insecto clásicas y está más emparentada con las toxinas de alacrán; en particular el asa amino terminal contiene el mismo número de residuos en ambos tipos de péptido, mientras que las defensinas clásicas poseen una extensión en esta zona (Hoffmann y Hetru 1992). A nivel estructural lo anterior provoca que el extremo N-terminal se encuentre en orientaciones opuestas en las defensinas de insecto y las toxinas (ver Fig. III. 1b). Las mismas observaciones pueden hacerse para el caso de la defensinas de los moluscos *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis*, sin embargo estas últimas poseen cuatro puentes disulfuro en vez de tres (Charlet et al., 1996; Hubert et al., 1996).

En el laboratorio tenemos caracterizados dos antibióticos peptídicos originarios de alacranes de familias distintas a la Buthidae, *Pandinus Imperator* (Scorpionidae) y *Hadrurus aztecus* (Vejovidae); sin embargo éstos componentes se encuentran formando parte de los venenos de ambas especies y, hasta el momento, no hay reportes de la presencia de compuestos con actividad similar en la hemolinfa de alacranes americanos. Con objeto de comprobar la presencia de compuestos con dichas características en alacranes del "Nuevo Mundo", se planteó el proyecto de identificar y caracterizar las fracciones peptídicas de la hemolinfa del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*, buscando una posible función microbicida. Los resultados de dicho proyecto se reportan en el presente trabajo.

a)

DefLq	GFGCPLNQGA-----CHRHCRSITRR-GGYCAGFFKQTCTCYRN
DefAa	GFGCPFNQGA-----CHRHCRSITRR-GGYCAGLFKQTCTCYRN
DefAc	GFGCPLDQMQ-----CHRHCQITIGRSSGGYCSGPLKLTCTCYR
DefUg	GFGCPNNYQ-----CHRHC <sup>u</sup> KSIPGR <sup>u</sup> CGGYCGGXHRLRCTCYR <sup>u</sup>
DefA	ATCLLSGTGINHSACA <sup>u</sup> AHCLLRGNR-GGYCNG--KGVCVCRN
Dmyn <sup>1</sup>	DCLSGRYKPCAVWDNET----CRRVCKEEG-RSSGHCSPSLK--CWCE <sup>u</sup>
TGps	KICPRPSAGFKGPCMSNKN-----CAQVCQ <sup>u</sup> QEGWG-GGNCDGPFRR-CKCIR <sup>u</sup> Q <sup>u</sup>
Chtx	ZFTNVSCTTSKE-----CWSVCQRLHNTSRG <sup>u</sup> KCMN--KK-CPCYS

b)

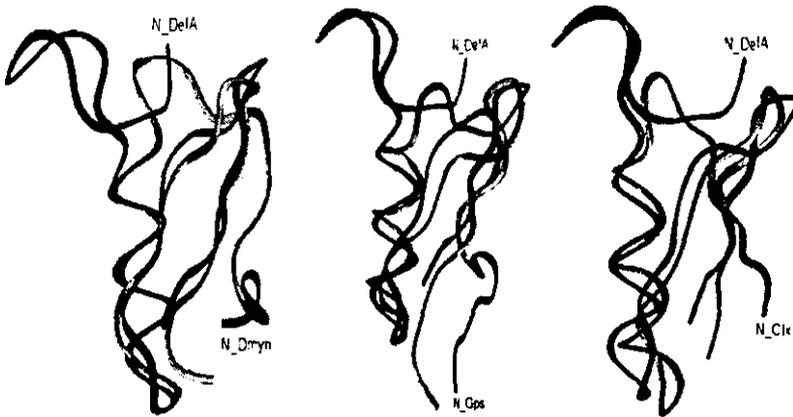


Figura III.1

a) Alineamiento de péptidos de la familia  $\alpha/\beta$ -EC. Las primeras cinco secuencias corresponden respectivamente a las defensinas encontradas en las especies *L. quinquestratus* (Scorpionidae), *A. australis* (Scorpionidae), *A. cyanea* (Paleóptera), *M. galloprovincialis* (Gasteropoda), *P. terranove* (Díptera). Las últimas tres son: Drosomicina de *D. melanogaster* (Dmyn), Tionina  $\gamma$ 1-p de trigo (TGps) y Caribdotoxina de *L. quinquestratus* (Chtx). b) Superimposición de las estructuras tridimensionales de péptidos de la familia  $\alpha/\beta$ -EC (grises) con la DefA de *P. terranove* (negro). Izquierda: Dmyn (r.m.s.d. 1.04). Centro: T $\gamma$ 1-P (r.m.s.d. 1.35). Derecha: Chtx (r.m.s.d. 1.39). Las estructuras corresponden a las depositadas en el Brockheaven-PDB (Bernstein et al., 1977); las superimposiciones se calcularon con el programa LSQman (Kleywegt 1996); la representación gráfica se generó en el programa Insigh II (Biosym TM).

## **IV Objetivos**

### **General**

Identificar, purificar y caracterizar las fracciones peptídicas responsables de la actividad microbicida de la hemolinfa del alacrán *C. limpidus limpidus*.

### **Particulares**

- i. Verificar las propiedades microbicidas de las fracciones peptídicas
- ii. Identificar los péptidos responsables de la actividad anti-microbiana
- iii. Aislar los componentes activos
- iv. Caracterizar químicamente los péptidos activos
- v. Comparar la estructura primaria contra el banco SwissProt para identificar posibles homologías

## **V Materiales y métodos experimentales**

### **V.1 Colección y manutención de organismos**

#### **Alacranes**

Los alacranes de la especie *Centruroides limpidus limpidus* Karsch, fueron colectados en el área de Iguala, Guerrero. En el laboratorio se alimentaron a base de larvas de tenebrios y agua.

#### **Microrganismos**

Las cepas de bacterias utilizadas fueron *Bacillus subtilis* aislado clínico, *Staphylococcus aureus* aislado clínico, *Escherichia coli* 109 y *Kliebsiella pneumoniae* 9, disponibles en la biblioteca de microrganismos del Instituto Nacional de Salud Pública. Se mantuvieron en cajas de medio Agar-LB a 4 °C. Para usarlas en los experimentos de inhibición de crecimiento, se incubaron en medio LB (Luria-Bertiani) líquido a 37 °C, hasta alcanzar la 0.6 unidades de DO, para posteriormente diluir en el medio hasta la densidad óptica deseada. El medio líquido LB es rico en nutrientes, contiene por cada litro: 10 g de Bacto triptona (Difco TM), 10 g NaCl y 5 g de Extracto de levadura (Difco TM); el pH se ajusta a 7 con NaOH 5 N. El medio agar-LB contiene además 15 g de Bacto agar (Difco TM).

### **V.2 Obtención y conservación de la hemolinfa**

La hemolinfa se obtuvo mediante punción y extracción individual directa de la unión del segundo y tercer artejos del pedipalpo del alacrán

y se diluyó en una parte de agua acidificada con 0.1 % de TFA (Aldrich TM), por dos de hemolinfa. Esta suspensión se centrifugó por media hora a 15,000  $\times g$  en una ultracentrífuga Optima TL (Beckman TM). El sobrenadante, que en adelante se denominará extracto, se almacenó a -20 °C hasta el proceso de purificación.

### **V.3 Purificación de los péptidos antimicrobianos**

#### **Prepurificación**

Se probaron dos metodologías, en la primera se utilizó una columna (0.6 x 80 cm) de filtración molecular empacada con Sephadex G-50 medio (Pharmacia TM), como eluyente se utilizó un amortiguador de acetatos (AcCOOH/ACONa) 20 mM, pH 4.7. En la segunda se usaron cartuchos Sep-Pack de fase reversa C<sub>18</sub> (Waters TM) equilibrados con agua (0.12 % de TFA), sobre los cuales se aplicó el sobrenadante de la centrifugación descrita y se eluyeron tres fracciones sucesivas con 5 mL de acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN Fisher TM) acidificado con 0.1 % de TFA, al 10, 45 y 80 %.

#### **Purificación**

La estrategia experimental se adaptó de la propuesta por C. Hetru y P. Bulet (1997). Se inyectó el extracto o las fracciones obtenidas de los procesos de prepurificación en una columna C<sub>4</sub> semipreparativa (Vydac TM), equilibrada con agua acidificada (0.12 % de TFA) y se eluyó por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) con un gradiente hidrofóbico lineal de 0 hasta 60 % de CH<sub>3</sub>CN acidificado (0.1 % TFA), en un cromatógrafo Waters 1600 (Waters TM) acoplado a un detector de UV Waters 6400 (Waters TM). El perfil de elución se monitoreó a 230 nm. Las fracciones que demostraron poseer actividad antimicrobiana se sometieron a una recromatografía en una columna C<sub>18</sub> analítica (Vydac TM), con un gradiente hidrofóbico lineal de 25 a 50 % de CH<sub>3</sub>CN acidificado como en el párrafo anterior.

### **V.4 Ensayos biológicos**

#### **Halos de inhibición**

La técnica utilizada fue el ensayo cualitativo propuesto por H. Steiner et al. (1981). Se adicionaron cantidades conocidas del extracto, las fracciones de cromatografía o los péptidos puros, en filtros colocados sobre placas de 4 mL con agar-LB, las cuales contienen 50  $\mu$ L de una dilución 1:300 de bacterias viables de un cultivo crecido a 0.6 DO

(densidad óptica a 600 nm). Se incubaron por entre 8 y 12 horas a 37 °C y se verificó la presencia de zonas de inhibición de crecimiento.

#### Actividad hemolítica

Se siguió una adecuación del método reportado por P. Felhlbaum et al. (1994), utilizando sangre humana fresca lavada tres veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4 y centrifugada cada vez a 900  $\times$ g durante 15 minutos, el paquete celular de la última centrifugación se resuspendió al 0.5 % en PBS. Se incubaron, una hora a 37 °C, 195  $\mu$ L de esta suspensión con 5  $\mu$ L de una disolución de los péptidos aislados, para obtener una concentración final de 100  $\mu$ g/mL de los componentes ensayados. Después de la incubación se centrifugó la muestra por 2 minutos a 900  $\times$ g y se leyó la absorbancia de 100  $\mu$ L del sobrenadante a 541 nm. Se utilizó PBS como control negativo (0 % de hemólisis) y una solución al 1 % del detergente Triton X-100 como control positivo (100 % de hemólisis).

#### V.5 Caracterización química

Las cuantificaciones de proteína se realizaron siguiendo una modificación del método de M.M. Bradford (1976), utilizando reactivos BioRad TM con el protocolo sugerido por la compañía. Los geles de electroforesis se hicieron siguiendo la técnica SDS-PAGE, utilizando geles al 12.5 % de un estándar con 30 % de acrilamida y 0.8 % de bis-acrilamida (Laemli 1970). La determinación de la estructura primaria se realizó en un microsecuenciador ProSequencer 6400 (MilliGen-Biosearch), siguiendo los protocolos de la compañía Millipore, se utilizaron membranas de adsorción (CD Immobilon, Millipore TM) o de unión covalente (DITC, Millipore TM). Para la cuantificación cromatográfica de aminoácidos se siguió el método de hidrólisis ácida y derivatización con ninhidrina (Moore y Stein 1963; Simpson et al., 1976), utilizando un analizador automatizado Beckman 6300. El coeficiente de absortividad molar aparente se calculó en base a los datos de concentración absoluta que se obtienen del análisis de aminoácidos (Benson et al., 1975). Los pesos moleculares se determinaron en un espectrómetro de masas Voyager MALDI-TOF (Perseptive Biosystems TM) del grupo del Dr. B. Martin del NIMH de Bethesda, Maryland, en Estados Unidos.

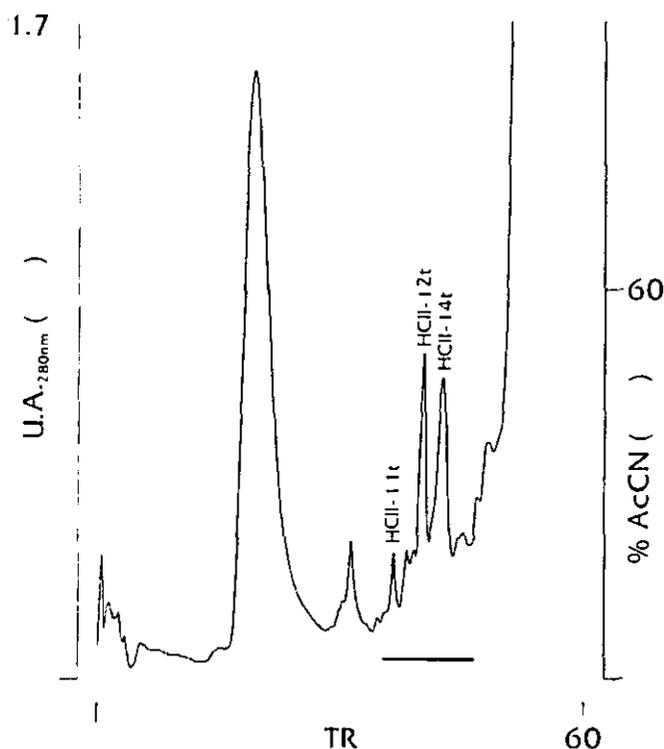
## VI Resultados

### VI.1 Obtención de la hemolinfa

Se dispuso de 500 especímenes de *C. limpidus limpidus*, de los cuales se obtuvieron aproximadamente 7  $\mu\text{L}$  de hemolinfa cruda, la cual se diluyó en agua acidificada para completar 10.5  $\mu\text{L}$  de muestra. La hemolinfa se centrifugó en las condiciones descritas, tras lo cual el extracto recuperado se sometió a dos análisis; uno para cuantificar proteína y otro para detectar propiedades antibacterianas. La concentración de proteína total fue de 24.15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , lo que representa un 15 % del peso seco de la hemolinfa cruda liofilizada. El ensayo cualitativo antibacteriano resulto positivo contra una cepa silvestre de *B. subtilis*, en éste se utilizaron aproximadamente 24  $\mu\text{g}$  de proteína total del extracto.

### VI.2 Purificación de los componentes activos

En una primera aproximación se observaron 6 fracciones de la cromatografía de alta resolución directa del extracto que registraban actividad positiva. Estas fracciones fueron arbitrariamente denominadas HCII -11, -12a, -12b, -13, -14 y -15 (ver Fig. VI.1); sin embargo se presentaban problemas metodológicos con este procedimiento, por lo que fue necesario implementar pasos de prepurificación. Se ensayaron dos estrategias, la primera utilizando una columna de filtración molecular (0.9 x 80 cm, Sephadex G-50 medio, Pharmacia TM), de la cual se obtuvieron tres fracciones (Fig. VI.2a); sin embargo, ninguna presentó habilidades microbicidas en los ensayos cualitativos y en el refraccionamiento no se logró identificar el perfil de CLAE observado para la hemolinfa total. La siguiente metodología se adaptó de la reportada en la mayoría de los artículos donde se identifican esta clase de péptidos en la hemolinfa de artrópodos (revisado en Hetru y Bulet 1997). Dicha técnica consiste en la utilización de cartuchos de intercambio sólido-líquido, sobre un soporte de resina  $\text{C}_{18}$  (Sep-Pack, Waters TM), como un paso de prepurificación. Se eligieron tres concentraciones de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , al 10, 45 y 80 %. Las fracciones así obtenidas resultaron, respectivamente, correspondientes a 36, 3.7 y 0.46 % de la proteína total; el resto de la proteína (60 %) no se retiene en la columna. Las fracciones de 45 y 80 % presentaron actividades de inhibición de crecimiento contra la cepa de *B. subtilis* utilizada.



**Fig. VI.1**

Cromatograma de CLAE del extracto. Columna  $C_4$  semipreparativa, gradiente hidrofóbico lineal de 0 a 60 % de AcCN en 60 minutos. La barra indica actividad positiva de las fracciones.

En el refraccionamiento se utilizó una columna  $C_4$  para cromatografía de alta eficiencia. En el correspondiente a la muestra eluida en 45 % de la prepurificación con cartuchos, se identificó el perfil de CLAE registrado en la zona donde se observaron las fracciones activas de la hemolinfa total (35 - 50 %  $CH_3CN$ , ver Fig. VI.2b). La purificación final se realizó por CLAE usando una columna  $C_{18}$  analítica. Únicamente para los casos de HClI - 11, - 12a y - 12b se obtuvieron cromatogramas donde se observaba un sólo pico principal (ver Fig. VI.3a), respectivamente corresponden al 0.007, 0.049 y 0.042 % de la proteína total del extracto. La pureza de las fracciones así aisladas se comprobó por medio de electroforesis desnaturalizante; en los tres casos se observó una sola banda (ver Fig. VI.3b).

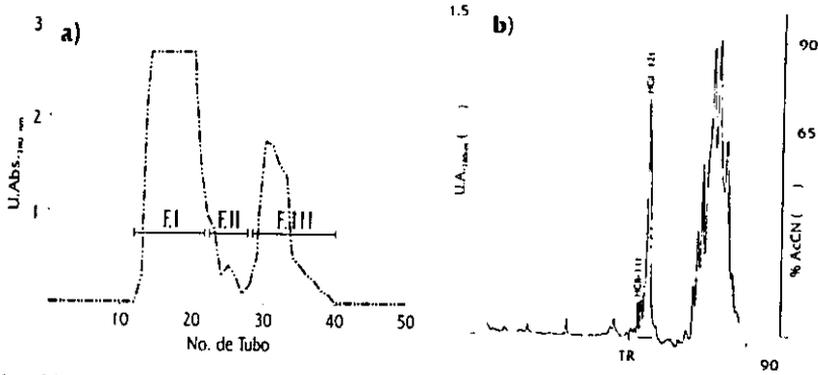


Fig. VI.2

Cromatogramas de las prepurificaciones. a) Perfil de la filtración en Sephadex G-50 medio en una columna de 0.8 x 80 cm, eluyente AcOOH/AcOONa 50 mM pH 4.7. b) CLAE de la fracción eluida con 45 % de AcCN de la extracción en cartuchos SepPack C<sub>18</sub>, la barra indica actividad positiva.

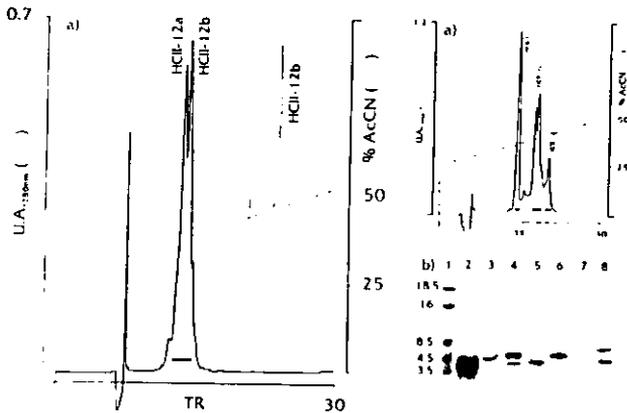
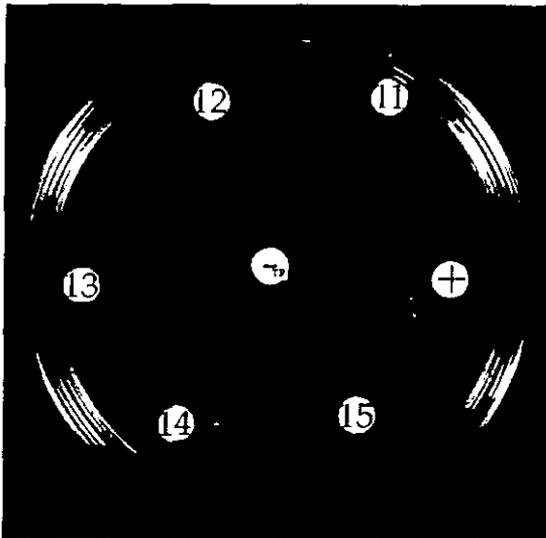


Fig. VI.3

Purificación de las subfracciones HCl-11, -12a y -12b. a) Cromatogramas de CLAE para el refraccionamiento de HCl-11 total (arriba a la derecha) y -12 total (izquierda). Gradiente hidrofóbico lineal de 25 a 50 % de AcCN en 30 minutos, columna C<sub>18</sub> analítica. Recuadro: Purificación final de HCl-12b. La barra indica actividad positiva de las fracciones. b) Electroforesis desnaturalizante en un gel de poliacrilamida al 15 %. Carril 1: Marcadores de peso molecular; Carril 2: Pi-3 (4 kDa); Carril 3: HCl-12b; Carril 4: HCl-12tot; Carril 5: HCl-12a; Carril 6: HCl-11; Carril 7: HCl-13tot; Carril 8: HCl-14tot.

### VI.3 Ensayos biológicos

Los ensayos cualitativos contra *B. subtilis* resultaron positivos para la hemolinfa total y las fracciones de 45 % y 80 % de la prepurificación en cartuchos de extracción sólido-líquido, así como para muestras semipuras (antes de CLAE C<sub>18</sub>) de HCII - 11, -12a, -12b, -13, -14 y -15 (ver Fig. VI.4). Para la hemolinfa total se utilizaron 50  $\mu$ L del extracto (60  $\mu$ g de proteína total); para las fracciones de la prepurificación 0.01 UA resuspendidas en 10  $\mu$ L de agua bidestilada; y para las subfracciones de CLAE C<sub>4</sub> 0.005 UA resuspendidas en 10  $\mu$ L de agua bidestilada. La actividad contra otros microorganismos así como la actividad hemolítica se resumen en la Tabla VI.1.



**Fig. VI.4**

Ensayo de inhibición de crecimiento contra una cepa silvestre de *B. subtilis*. Los números corresponden a las fracciones semipuras de HCII. Se utilizaron 2  $\mu$ g de carbemicilina como control positivo (+) y agua como control negativo (-).

### VI.4 Caracterización

Para las fracciones que se logró purificar a homogeneidad (HCII - 11, -12a y -12b), se determinaron la composición de aminoácidos (Tabla VI.2), el peso molecular, el coeficiente de absortividad molar y la estructura primaria del extremo amino terminal (Figura VI.5).

**Tabla VI. 1.** Actividad antibacteriana de las fracciones de HCII

	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli 109</i>	<i>S.aureus</i>	<i>K.pneu.109</i>	Eritrocitos
HCII- 11	+ <sup>a</sup>	+	-	n.d. <sup>b</sup>	< 5 %
HCII- 12t	++	+	++	+	-
HCII- 12a	n.d.	-	+	-	-
HCII- 12b	++	-	+	-	-
HCII- 13t	++	-	-	-	-
HCII- 14t	+++	-	++	-	-
HCII- 15t	+	-	+	n.d.	< 5 %

<sup>a</sup> Determinado cualitativamente por el diámetro generado por cantidades equivalentes de los péptidos o las fracciones. <sup>b</sup> No ensayado.

**Tabla VI. 1.** Composición de aminoácido de las fracciones de HCII - 12a y -12b

Aminoácido	HCII- 12a		HCII- 12b	
	nmol	Enteros	nmol	Enteros
Asx	5.7	6 (3) <sup>a</sup>	5.9	6 (3) <sup>a</sup>
Tre	1.7	2 (1)	1.7	2 (1)
Ser	2.7	3 (1)	2.6	3 (1)
Glx	5.5	5 (4)	5.9	6 (5)
Pro	2.2	2 (1)	1.6	2 (1)
Gli	4	4 (1)	4.1	4 (1)
Ala	2.6	3 (2)	2.5	3 (2)
Val	1.7	1 (1)	1.5	1 (1)
Met	0.8	1	1.3	1 (1)
Ile	1.4	1 (1)	1.5	1 (1)
Leu	2.8	3 (2)	2.5	2 (1)
Tir	0.9	1	1.1	1 (1)
Fen	1.0	1 (1)	0.9	1 (1)
His	1.5	1 (1)	1.5	1 (1)
Lis	2.3	2 (2)	2.3	2 (3) <sup>b</sup>
Arg	1.8	2 (3) <sup>b</sup>	1.9	2 (3) <sup>b</sup>
		$\Sigma = 42 (27)^c$		$\Sigma = 42 (30)^c$

<sup>a</sup>Los numeros entre paréntesis corresponden a los residuos identificados por la secuenciación. <sup>b</sup> El método utilizado comúnmente subestima el número de residuos básicos (Simpson et al., 1976). <sup>c</sup> Se consideran tres residuos de cisteína, identificados en la secuenciación, que no se detectan con la técnica utilizada.

Fracción	Secuencia N-terminal	P.M.	$\epsilon$ M <sup>1</sup> cm <sup>-1</sup>
HC11-11	GVL <sup><b>L</b></sup> LS <sup><b>S</b></sup> FDVE EYVNTIGNXG ...	5104	n.d. <sup>a</sup>
HC11-12a	DTACQPSRAR ELEKDKPFVI HLXDEXG...	4806	32154
HC11-12b	DTACQPSRAR ELEKDKPFVI HECDEXGKYM...	4847	37313

**Fig.VI.5**

Estructuras primarias N-terminales, pesos moleculares y coeficientes de absortividad molar aparente de las fracciones puras HC11-11, -12a y -12b. <sup>a</sup>No determinado. La negritas señalan la diferencia encontrada entre las subfracciones de HC11-12.

## VII Discusión

Las características biológicas de muchos microorganismos han permitido que éstos desarrollen mecanismos conocidos como de resistencia a los antibióticos. Los problemas de terapéutica que lo anterior provoca se han intentado resolver mediante varias estrategias, una de ellas la formulación de nuevas especies químicas cada vez más agresivas para los parásitos; desafortunadamente dicha agresividad conlleva, frecuentemente, efectos adversos en la población que los consume (Cohen 1992).

Recientemente ha sido descrita una amplia batería de antibióticos peptídicos naturales que actúan como nivel primario de defensa en una gran variedad de organismos superiores, incluyendo plantas y animales. Estos compuestos, llamados nominalmente péptidos antimicrobianos, han sido objeto de un creciente interés científico por tres razones fundamentales: la efectividad de algunos contra ciertos patógenos de importancia médica, la función biológica de la actividad microbicida y su papel en la inmunidad innata, y; su utilidad como modelo para estudiar las interacciones lípido-proteína (Boman 1995; Nicolas y Mor 1995).

En el presente trabajo reportamos la identificación, el aislamiento y la caracterización parcial de tres componentes peptídicos con propiedades microbicidas, encontrados en la hemolinfa del alacrán *C. limpidus limpidus*. Se identificaron como positivas en total seis fracciones de la fuente biológica; sin embargo las restantes o bien no pudieron ser subfraccionadas para obtener péptidos puros, o no se contó con el material suficiente para realizar los ensayos para la caracterización.

Fracción	Secuencia N-terminal	P.M.	$\epsilon M^1 cm^{-1}$
HC11-11	GVLSSFDVE EYVNTIGNXG ...	5104	n.d. <sup>a</sup>
HC11-12a	DTACQRSRAR ELEKDKPFVI HLXDEXG...	4806	32154
HC11-12b	DTACQRSRAR ELEKDKPFVI HECDEXGKYM...	4847	37313

**Fig.VI.5**

Estructuras primarias N-terminales, pesos moleculares y coeficientes de absorptividad molar aparente de las fracciones puras HC11 - 11, -12a y -12b. <sup>a</sup> No determinado. La negritas señalan la diferencia encontrada entre las subfracciones de HC11-12.

## VII Discusión

Las características biológicas de muchos microorganismos han permitido que éstos desarrollen mecanismos conocidos como de resistencia a los antibióticos. Los problemas de terapéutica que lo anterior provoca se han intentado resolver mediante varias estrategias, una de ellas la formulación de nuevas especies químicas cada vez más agresivas para los parásitos; desafortunadamente dicha agresividad conlleva, frecuentemente, efectos adversos en la población que los consume (Cohen 1992).

Recientemente ha sido descrita una amplia batería de antibióticos peptídicos naturales que actúan como nivel primario de defensa en una gran variedad de organismos superiores, incluyendo plantas y animales. Estos compuestos, llamados nominalmente péptidos antimicrobianos, han sido objeto de un creciente interés científico por tres razones fundamentales: la efectividad de algunos contra ciertos patógenos de importancia médica, la función biológica de la actividad microbicida y su papel en la inmunidad innata, y; su utilidad como modelo para estudiar las interacciones lípido-proteína (Boman 1995; Nicolas y Mor 1995).

En el presente trabajo reportamos la identificación, el aislamiento y la caracterización parcial de tres componentes peptídicos con propiedades microbicidas, encontrados en la hemolinfa del alacrán *C. limpidus limpidus*. Se identificaron como positivas en total seis fracciones de la fuente biológica; sin embargo las restantes o bien no pudieron ser subfraccionadas para obtener péptidos puros, o no se contó con el material suficiente para realizar los ensayos para la caracterización.

Las características comunes de los péptidos antimicrobianos, tamaño y naturaleza catiónica, nos permitieron ensayar diversas técnicas para el aislamiento de los componentes responsables de la actividad antibacteriana observada en la hemolinfa total de *C. limpidus limpidus*. De las dos metodologías utilizadas, la extracción sólido-líquido en cartuchos SepPack, tomada de la propuesta de C. Hetru y P. Bulet (1997), ofreció mejores resultados ya que permitió separar una fracción donde se presenta casi toda la actividad microbicida; mientras que la filtración en gel ensayada no logró generar fracciones donde pudieramos identificar los péptidos activos, ésto debido a la inespecificidad de las interacciones en el proceso de exclusión molecular y al elevado número de componentes presentes en la hemolinfa; además de que el amortiguador seleccionado para la elución, pudo haber desnaturalizado algunos componentes, toda vez que no fue posible resuspender totalmente las fracciones y es probable que los péptidos de interés se hayan precipitado durante el proceso de filtración en la columna.

Los péptidos aislados poseen características análogas a otros antibióticos peptídicos previamente reportados, como lo es el peso molecular relativamente bajo y la abundancia de residuos básicos; sin embargo, el análisis de similitudes de secuencias no presentó homología con ninguna de las familias de péptidos antimicrobianos descritas; en particular, tampoco presentan similitud con los péptidos encontrados en otras especies de alacranes (ver Figura VII. 1a y VII. 1b). Dos de los componentes descritos en este trabajo, HCII- 12a y HCII- 12b, muestran similitudes del 32 y 35 %, respectivamente, con la región N-terminal de un péptido antimicrobiano encontrado en maíz, el MBP- 1. Este antibiótico, que no tiene homólogos reportados hasta la fecha, tiene un peso molecular de 4.1 kDa, ataca a ciertos patógenos comunes del maíz y se cree que adopta una estructura compuesta fundamentalmente por hélices  $\alpha$  (Duvick et al., 1992).

A pesar de las similitudes, los péptidos de la hemolinfa de *C. limpidus limpidus* no pueden catalogarse de homólogos al MBP- 1, dado que los pesos moleculares y la composición de aminoácidos son claramente distintos; adicionalmente es de esperarse que la similitud final,

cuando este disponible la secuencia completa de HCII -12a y -12b, será significativamente menor a la encontrada en la zona que incluye el análisis (sólo 20 aminoácidos sobrelapados). Por otra parte, predicciones teóricas con 4 protocolos distintos, SOPMA (Geourjon y Delage 1995), GOR (Garnier et al., 1996), BCM PSSP (Baylor College) y PREDATOR (Argos' group), coinciden en que la estructura estaría compuesta tanto por hélices  $\alpha$  como hojas  $\beta$ , mientras que los mismos análisis aplicados al MBP-1 coinciden con los resultado obtenidos por DC (datos no presentados). De cualquier forma, las predicciones no deben tomarse como concluyentes, ya que se realizan en base a únicamente 31 aminoácidos de moléculas que contienen entre 45 y 47 residuos, además de que no se consideraron las posibles constricciones ocasionadas por los puentes disulfuro.

<b>a)</b>	10	20	30	P.M.
HC11-12a	DTAC <b>Q</b> RSRAR	ELEKDKPFVI	HLXDEXG...	4806
MBP-1	RSRGE <b>C</b> R <b>R</b> Q <b>C</b> LR	RHE-G <b>Q</b> PWET	Q <b>E</b> CMRRCRRR G	4127
HC11-12b	DTAC <b>Q</b> RSRAR	ELEKDKPFVI	HECDEXG <b>K</b> YM ...	4847
<b>b)</b>	10			
Tq-I	KWCRFVCYRG	ICYRKCR		2263
Pg-1	RGGRLCYCRR	RFCVCVGR		2154
<b>c)</b>		10	20	30
DefLq		GFGCPL <b>N</b> Q <b>G</b> A <b>C</b> H	RHCRSITRRG	GYCAGFFK <b>Q</b> T CTCYRN
DefAa		GFGCPFN <b>Q</b> G <b>A</b> C <b>H</b>	RHCRSITRRG	GYCAGLFK <b>Q</b> T CTCYRN
Butinina (Aa)		SIVPIRCS <b>N</b> R-D <b>C</b> R	RFCGF---RG	GRCTYA-R <b>Q</b> - CLCGY
Androctina (Aa)		RSVCRQILICRRR	GGCYKCTNRPY	

**Fig. VII.1**

a) Alineamiento de secuencias de las fracciones de HCII-2 con el MBP-1 de maíz y pesos moleculares. En negritas se presentan los aminoácidos conservados y subrayados aquellos posibles remplazos conservativos. La numeración corresponde a las fracciones de HCII-12. b) Secuencias y pesos moleculares de los péptidos antimicrobianos con dos puentes disulfuro. Tq-1: Taquiplesina I de *T. tridentatus*. Pg-1: Protegrina 1 de leucocitos de cerdo. c) Secuencias de péptidos antimicrobianos encontrados en los alacranes *L. quinquestratus* (Lq) y *A. australis* (Aa).

Ahora bien, dos de los componentes (HCII- 12a y HCII- 12b) están estrechamente emparentados entre sí, así lo demuestra el patrón casi idéntico en CLAE y el que sólo presentan un aminoácido cambiado en su estructura primaria (Leu22 para 12a y Glu22 para 12b, ver figura VI.5); estos mismos poseen al menos cuatro cisteínas que establecerían dos puentes disulfuro, lo que los convierte en un nuevo grupo de la familia de los péptidos antimicrobianos con dos o más puentes disulfuro, el mismo al que pertenecen defensinas y taquiplesinas, los dos tipos de antibióticos peptídicos que se han descrito en alacranes.

Si se comprueba la presencia de dos enlaces Cys-Cys, es posible que HCII- 12a y HCII- 12b adopten un plegamiento similar al que presentan taquiplesinas y protegrinas, en contraste con el propuesto para el MBP- 1. Lo anterior como consecuencia de la disposición de las cisteínas, identificadas en el extremo N-terminal y la parte central (y si la cuarta cisteína se ubica cercana al C-terminal), más semejante a la que guardan taquiplesinas y protegrinas que a la correspondiente al MBP- 1 (ver figura VII.1b). Además la disposición de las cisteínas centrales permite que los residuos intermedios (Asp-Glu) formen una vuelta tipo  $\gamma$ , un elemento estructural común en un buen número de proteínas (Rose et al., 1985). Adicionalmente, HCII - 12a y - 12b podrían compartir otra característica importante con los grupos de péptidos antimicrobianos con dos puentes disulfuro; ésta se refiere a la naturaleza anfipática del pasador beta, ya que, según la cuantificación cromatográfica de aminoácidos, harían falta por secuenciar 13 residuos, de los cuales al menos 9 son de naturaleza no polar (ver tabla VI.2).

Por otra parte, en ensayos cualitativos, HCII- 12a y HCIII- 12b demostraron poseer propiedades antibacterianas diferentes, tanto a nivel de los microorganismos que son capaces de matar, como en la efectividad con que lo hacen (esto último determinado por el diámetro del halo de inhibición que generan cantidades equivalentes de ambos componentes). Además, los mismos ensayos mostraron que la mezcla de HCII- 12a y HCII- 12b (HCII- 12tot) es más eficiente contra especies Gram negativas como *E. coli* y *K. pneumoniae*, que los péptidos aislados, lo cual sugiere que podrían actuar sinérgicamente. Este fenómeno se ha

observado en otras combinaciones de péptidos provenientes de una misma fuente biológica, como las magaininas (Vaz Gomes et al., 1993; Westerhoff et al., 1995), dermaseptinas (Mor et al., 1994b) y algunos péptidos originarios de plantas (Cammune et al., 1994). Para el caso de las especies alfa helicoidales el sinergismo puede estar asociado a tres motivos: a) Que los péptidos se asocien en forma de oligómeros heteromoleculares y que, de esta forma, penetren más efectivamente en la membrana (Vaz Gomes et al., 1993), o; b) Que los canales formados por combinaciones de los péptidos sean fisicoquímicamente más estables en el ambiente celular (Westerhoff et al., 1995; Matsuzaki et al., 1998b), o bien; c) Que la asociación tipo carpeta sea más eficiente cuando se presenta una mezcla de especies peptídicas similares pero no idénticas (Mor et al., 1994b). La cooperatividad heteromolecular registrada entre tioninas, defensinas y otros antibióticos originarios de plantas, parece más ser debida a una combinación de los efectos individuales de cada una de las especies peptídicas (Cammune et al., 1994).

Por último, la estrecha relación entre ambos péptidos puede derivarse de la duplicación de la secuencia genómica codificante, como estrategia adaptativa para optimizar la defensa del alacrán contra invasiones patogénicas. Esta misma estrategia evolutiva se ha propuesto para explicar las estrechas similitudes de otros grupos de péptido antimicrobianos (Barra y Simmaco 1995; Nicolas y Mor 1995; Liu et al., 1997). De hecho se ha demostrado que muchos grupos de péptido antimicrobianos, tanto estructuralmente relacionados (como la magaininas 1 y 2 (Terry et al., 1988), las atacinas (revisado en Bomai et al., 1991), las brevininas y esculentinas (Simmaco et al., 1994) y la Ib-AMP (Tailor et al., 1997)), como no relacionados (los casos de la catelicidinas bovinas, que son precursores de al menos siete péptidos antimicrobianos de tres familias diferentes (Zanetti et al., 1995; Storic et al., 1996; Skerlavaj et al., 1996), las defensinas, clásicas y beta, de humanos (Liu et al., 1997) y las secuencias prepro de brevininas esculentinas, temporinas, dermaseptinas y dermorfinas (revisado en Barra et al., 1995)), poseen estructuras genómicas únicas o estrechamente emparentadas.

## VIII Perspectivas

En este trabajo se presenta la caracterización parcial de tres componentes antimicrobianos encontrados en la hemolinfa del alacrán mexicano *C. limpidus limpidus*. Además se identificaron otras tres fracciones peptídicas que poseen actividades microbicidas; desafortunadamente, dichas fracciones representan una pobre proporción con respecto a la proteína total de la hemolinfa, por lo que el trabajo de caracterización no pudo ser llevado a cabo. Con base a lo anterior se plantean los siguientes pendientes de este trabajo:

- 1.- Terminar la caracterización de las subfracciones HCII - 11, -12a y -12b, esto es: completar la secuencia, corroborar la estructura secundaria por métodos de DC, establecer el espectro de actividad y determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias.
- 2.- Caracterizar las subfracciones activas de HCII -13 y -14

## IX Referencias

- Agawa Y., Lee S., Ono S., Aoyagi H., Ohno M., Taniguchi T., Anzai K. y Kirino Y. (1991), Interaction with phospholipid bilayers, channel formation, and antimicrobial activity of basic amphiphilic alpha-helical peptides of various chain lengths. *J. Biol. Chem.*, 266: 20218-20222
- Agerberth B., Lee J.-Y., Bergman T., Carlquist M., Boman H.G., Mutt V. y Jörnvall H. (1991), Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur. J. Biochem.*, 202: 849-854
- Amice M., Ducancel F., Mor A., Boulain J.C., Menez A. y Nicolas P. (1994), Precursor of peptide antibiotics dermaseptin b and adenoregulin have extensive sequence identities with precursors of opioid peptides dermorphin, dermenkephalin and deltorphins. *J. Biol. Chem.*, 269: 17847-17852
- Andersen N.H., Cao B., Rodríguez-Romero A. y Arreguín B. (1993), Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. *Biochemistry*, 32: 1407-1423
- Andersson M., Gunne H., Agerberth B., Boman A., Bergman T., Sillard R., Jörnvall H., Mutt V., Olsson B., Wigzell H., Boman H.G. y Gudmundsson G.H. (1995), NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumor activity. *EMBO J.*, 14: 1615-1625
- Ando K., Okada M. y Natori S. (1987), Purification of sarcotoxin II, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *Biochemistry*, 26: 226-230
- Åsling B., Dushay M.S. y Hlutmark D. (1995), Identification of early genes in *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25: 511-518

- Aumelas A., Mangoni M., Roumestand C., Chiche L., Despaux E., Grassy G., Calas B. y Chavanieu A. (1996), Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur. J. Biochem.*, 237: 575-583
- Axén A., Carlsson A., Engström Å. y Bennich H. (1997), Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora pupae*. *Eur. J. Biochem.*, 247: 614-619
- Bals R., Wang X., Wu Z., Freeman T., Bafna V., Zasloff M. y Wilson J.M. (1998), Human beta-defensin salt sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest.*, 102: 874-880
- Barra D. y Simmaco M. (1995), Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *TIBTECH*, 13: 205-209
- Barra D., Simmaco M. y Boman H.G. (1998), Gene-encoded antibiotics and innate immunity. Do 'animalcules' have defence budgets?. *FEBS Lett.*, 430: 130-134
- Bechinger B., Zasloff M. y Opella S.J. (1993), Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Prot. Sci.*, 2: 2077-2084
- Bechinger B. (1997), Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membr. Biol.*, 156: 197-211
- Bechinger B., Zasloff M. y Opella S.J. (1998), Structure and dynamics of the antibiotic peptide PGLa in membrane by solution and solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys. J.*, 74: 981-987
- Beintema J.J. y Peumans W.J. (1992), The primary structure of stinging nettle (*Urtica dioica*) agglutinin. A two domain member of hevein family. *FEBS Lett.*, 299: 131-134
- Benkhalifa R., Stankiewicz M., Lapied B., Turkov M., Zilberberg N., Gurevitz M. y Pelhate M. (1997), Refined electrophysiological analysis suggests that a depressant toxin is a sodium channel opener rather than a blocker. *Life Sci.*, 61: 819-830
- Bensch K.W., Raida M., Magert H.J., Schullz-Knapp P. y Forssmann G.W. (1995), HBD-1: a novel beta defensin from human plasma. *FEBS Lett.*, 396: 319-322
- Benson A.M., Suruda A.J. y Talalay P. (1975), Concentration dependent association of (delta)-3-ketoesterol isomerase of *Pseudomonas testosteroni*. *J. Biol. Chem.*, 250: 276-280
- Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B., Meyer E.F. Jr., Brice M.D., Rodger J.E., Kennard O., Shimanouchi T. y Tasumi M. (1977), The PDB: A computer based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.*, 112: 535-542
- Bessalle R., Kapitkosky A., Gorea A., Shalit I. y Fridkin M. (1990), All D-magainin: chirality, antimicrobial reactivity and proteolytic resistance. *FEBS Lett.*, 274: 151-155
- Bevins C.L. y Zasloff M. (1990), Peptides from frog skin. *Annu. Rev. Biochem.*, 59:395-414
- Bloch Jr. C., Patel S.U., Baud F., Zvelebil M.J.J.M., Carr M.D., Sadler P.J. y Thornton J.M. (1998), 1H NMR structure of an antifungal gamma-thionin protein Slalfa I: Similarity to scorpion toxins. *Proteins*, 32: 334-349
- Boisbouvier J., Prochnicka-Chalufour A., Nieto A.R., Torres J.A., Nanard N., Rodríguez M.H., Possani L.D. y Delepierre M. (1998), Structural information on a cecropin-like synthetic peptide, Shiva-3 toxic to the sporogonic development of *plasmodium berghei*. *Eur. J. Biochem.*, 257: 263-273

- Boman H.G., Wade D., Boman I.A., Wählin B. y Merrifield R.B. (1989), Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Lett.*, 259: 103-106
- Boman H.G., Faye I., Gumundsson G.H., Lee J.-Y. y Lidholm D.-A. (1991), Cell-free immunity in *Cecropia*: A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.*, 201: 23-31.
- Boman H.G., Agerberth B. y Boman A. (1993), Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immun.*, 61: 2978-2984
- Boman H.G. (1995), Peptides antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 13: 61-92.
- Bonmatin J.-M., Bonnat J.-L., Gallet X., Vovelle F., Ptak M., Reichhart J. M., Hoffmann J.A., Keppi E., Legrain M. y Achstetter T. (1992), Two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR study of recombinant insect defensin A in water: resonance assignments, secondary structure and global folding. *J. Biomol. NMR*, 2: 235-256
- Bontems F., Roumestand C., Gilquin B., Menez A. y Toma F. (1991), Refined structure of charybdotoxin: a common motifs in scorpion toxins and insect defensin. *Science*, 254: 1521-1523
- Borchani L., Mansuelle P., Stankiewicz M., Grolleau F., Cestele S., Karoui H., Lapied B., Rochat H., Pelhate M. y el Ayeb M. (1996), A new scorpion venom toxin paralytic to insects that affects Na<sup>+</sup> channel activation. Purification, structure, antigenicity and mode of action. *Eur. J. Biochem.*, 241: 525-532
- Bradford M.M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 7: 248-254
- Broekaert W.F., Mariën F., Terras F.R.G., De Boelle M.F.C., Proost P., van Damme J., Dillen J., Claeys M., Rees S.B., Vanderleyden J. y Cammune B.P.A. (1992), Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, 4308-4314
- Broekaert W.F., Terras F.R.G., Cammune B.P.A. y Osborn R.W. (1995), Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.*, 108: 1353-1358
- Bruix M., Jiménez M.A., Santoro J., González C., Colilla F.J., Méndez E. y Rico M. (1993), Solution structure of gamma I-H and gamma I-P from barley and wheat endosperm determined by <sup>1</sup>H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry*, 32: 715-724
- Bulet P., Cocinacich S., Reuland M., Sauber F., Bischoff R., Hégy G., van Dorselaer A., Hetru C. y Hoffman J.A. (1992), A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of dragonfly *Aeschna cyanea* (Palaeoptera, Odonata). *Eur. J. Biochem.*, 209: 977-984
- Bulet P., Dimarcq J.-L., Hetru C., Lageux M., Charlet M., Hégy G., van Dorselaer A. y Hoffmann J.A. (1993), A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries a O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.*, 268: 14893-14897
- Caaveiro J.M.M., Molina A., González-Mañas J.M., Rodríguez-Palenzuela P., García-Olmedo F. y Goñi F.M. (1997), Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes. *FEBS Lett.*, 410: 338-342

- Cabiaux V., Agerberth B., Johansson J., Hombl F., Goormaghtigh E. y Ruyschaert J.-M. (1994), Secondary structure and membrane interaction of PR-39: a Pro-Arg-rich antibacterial peptide. *Eur. J. Biochem.*, 224: 1019-1027
- Caldwell J.E., Abildgaard F., Dzakula Z., Ming D., Hellenkant G. y Markeley J.L. (1998), Solution structure of the thermostable sweet-testing protein brazzein. *Nat. Struct. Biol.*, 5: 427-431
- Cammune B.P.A., de Bolle M.F.C., Terras F.R.G., Proost P., van Damme J., Rees S.B., Vanderleyden J. y Broekaert W.F. (1992), Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* seeds. *J. Biol. Chem.*, 267: 2228-2233
- Cammune B.P.A., de Bolle M.F.C., Schoofs H.M., Terras F.R.G., Thevissen K., Osborn R. W., Rees S. B., y Broekaert W.F. (1994), Gene-encoded antimicrobial peptides from plants. *Ciba Found. Symp.*, 186: 91-101
- Carbone E., Wanke E., Prestipino G., Possani L. D. y Maelicke A. (1982), Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296: 90-91
- Carlsson A., Engström P., Palva E.T. y Bennich H. (1991), Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with the omp gene transcription. *Infect. Immun.*, 59: 3040-3045
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M. y Tempst P. (1989), Apiadecins antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.*, 8: 2387-2391
- Casteels P., Ampe C., Riviere R., van Dame J.-C., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Vaeck M. y Tempst P. (1990), Isolation and characterization of abeacin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.*, 187: 381-386
- Casteels P., Amps C., Jacobs F. y Tempst P. (1993), Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.*, 268: 7044-7054
- Casteels P. y Tempst P. (1994), Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non pore-forming mechanism involving stereospecificity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 199: 339-345
- Casteels-Jonsson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P. y Tempst P. (1994), Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem.*, 269: 28569-28575
- Chalk R., Towson H., Natori S., Desmond H. y Ham P.J. (1994), Purification of an insect defensin from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 24: 403-410
- Chan Y.R. y Gallo R.L. (1998), PR-39: a syndecan-inducing antimicrobial peptide binds and affects p130Cas. *J. Biol. Chem.*, 273: 28978-28985
- Charlet M., Chernysh S., Philippe H., Hetru C., Hoffman J.A. y Bulet P. (1996), Innate immunity: isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* 271: 21808-21813
- Charpentier S., Amiche M., Mester J., Vouille V., Le Caer J.-P., Nicolas P. y Delfou A. (1998), Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptin B, a family of skin antibiotics. *J. Biol. Chem.*, 273: 14690-14697

- Cho J.Y., Park C.B., Yoon Y.G. y Kim S.C. (1998a), Lumbricin I, a novel prolin-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochem. Biophys. Acta*, 1408: 67-76
- Cho Y., Turner J.S., Dinh N-H. y Lehrer R.I. (1998b), Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 66: 2486-2493
- Christensen B., Fink J., Merrifield R.B. y Mauzerall A.D. (1988), Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5072-5076
- Clark D.P., Durell S., Maloy W.L. y Zasloff M. (1994), Ranalexin: A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J. Biol. Chem.*, 269: 10849-10855
- Cociancich S., Goyffon M., Bontems F., Bulet P., Menez A. y Hoffman J.A. (1993), Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensin and scorpion toxins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 194: 17-22.
- Cociancich S., Ghazi A., Hetru C., Hoffmann J.A. y Letellier L. (1993b), Insect defensin, an inducible antibacterial peptide forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.*, 268: 19239-19245
- Cociancich S., Hetru C. y Hoffmann J.A. (1994), The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitol. Today*, 10: 132-139
- Cocinacich S., Dupont A., Hégy G., Lanot R., Holder F., Hetru C., Hoffman J.A. y Bulet P. (1994b), Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem. J.*, 300: 567-575
- Cohen M.L. (1992), Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*, 257: 1050-1055
- Cole A.M., Weis P. y Diamond G. (1997), Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.*, 272: 12008-12013
- Colilla F.J., Rocher A. y Méndez E. (1990), Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polipeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.*, 270: 191-194
- Coote P.J., Holyoak C.D., Bracey D., Ferdinando D.P. y Pearce J.A. (1998), Inhibitory action of a truncated derivative of the amphibian skin peptide dermaseptin s3 on *Sacharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 2160-2170
- Cornet B., Bonmatin J-M., Hetru C., Hoffmann J.A., Ptak M. y Vovelle F. (1995), Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure*, 3: 435-448
- Courad F. y Jover E. (1982), Mechanism of action of scorpion toxins. En: Handbook of natural toxins. Vol. 2: 659-673. Tu A.T. ed. Marcel Dekker Inc., Nueva York
- Cruciani R.A., Barker J.L., Zasloff M., Chen H.C. y Colaminici O. (1991), Antibiotic magainins cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3792-3796
- Csordas A. y Michl H. (1969), Primary structure of two oligopeptides of the toxin of *Bombina variegata*. *Toxicon*, 7: 103-108
- Daly W.J., Caceres J., Moni W.R., Gusovski F., Moos M., Seamon B.K., Milton K. y Myers W.C. (1992), Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: identification of a peptide that interacts with an adenosin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10960-10963

- DeBin J.A., Maggio J.E. y Strichartz G.R. (1993), Purification and characterization of chlorotoxin from scorpion *Leiurus quinquestratus*. *Am. J. Physiol.*, 264: 361-369
- Dehesa-Davila M. y Possani L.D. (1994), Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon*, 32: 1015-1018
- Delepiepierre M., Prochnicka-Chalufour A. y Possani L.D. (1997), A novel potassium channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*: A <sup>1</sup>H NMR analysis using a nano-NMR probe. *Biochemistry*, 36: 2649-2658
- De Samblanx G.W., Goderis J.J., Thevissen K., Raemeker R., Fant F., Borremans F., Acland D.P., Osborn R.W., Patel S. y Broekaert W.F. (1997), Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. *J. Biol. Chem.*, 272: 1171-1179
- Destoumieux D., Bulet P., Loew D., van Dorsselaer A., Rodríguez J. y Bachère E. (1997), Panaeidins: a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.*, 272: 28398-28406
- Diamond G., Zasloff M., Eck H., Bresseur M., Malloy W.L. y Bevins C.L. (1991), Tracheal antibiotic peptide, a novel cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3952-3957
- Dickinson L., Russell V. y Dunn P.E. (1988), A family of bacteria-regulated, cecropin D-like peptides from *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 263: 19424-19429
- Dimarcq J.-L., Zachary D., Hoffman J.A., Hoffman D. y Reichhart J.-M. (1990), Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipterin, in *Phormia terranova*. *EMBO J.*, 9: 2507-2515
- Dimarcq J.-L., Hoffman D., Meister M., Bulet P., Lanot R., Reichhart J.-M. y Hoffman J.A. (1994), Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. *Eur. J. Biochem.*, 221: 201-209
- Dimopoulos G., Richman A., Muller H.M. y Kafatos F.C. (1997), Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 11508-11513
- Durell S.R., Raghunathan G. y Guy H.R. (1992), Modeling the ion channel structure of cecropin. *Biophys. J.*, 63: 1623-1631
- Duvick J.P., Rood T., Rao A.G. y Marshak D.R. (1992), Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Biol. Chem.*, 267: 18814-18820
- Ehret-Sabatier L., Loew D., Goyffon M., Fehlbaum P., Hoffman J.A., van Dorsselaer J. y Bulet P. (1996), Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.*, 271: 29537-29544.
- Engström P., Carlsson A., Engström Å., Tao Z.-J. y Bennich H. (1984), The antibacterial effect of attacins from the silk worm moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 3: 3347-3351
- Falla T.J., Karunarante D.N. y Hancock R.E. (1996), Mode of action of the antimicrobial peptide indolicin. *J. Biol. Chem.*, 271: 19298-19303
- Fant F., Vranken W., Broekaert W. y Borremans F. (1998), Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* protein 1 by <sup>1</sup>H NMR. *J. Mol. Biol.*, 279: 257-270

- Fehlbaum P., Bulet P., Michaut I., Lagueux M., Broekaert W.F., Hetru C. y Hoffmann J.A. (1994), Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.*, 269: 33159-33163
- Fehlbaum P., Bulet P., Chernysh S., Briand J-P., Roussel J-P., Letellier L., Hetru C. y Hoffmann J.A. (1996). Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1221-1225
- Ferrandon D., Jung A.C., Criqui M., Lemaitre B., Uttenweiler J.S., Michaut L., Reichart J. y Hoffmann J.A. (1998), A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J.*, 17: 1217-1227
- Florack D.E.A. y Stiekema W.J. (1994), Thionins: properties, possible biological roles and mechanism of action. *Plant Mol. Biol.*, 26: 25-37
- Fontecilla-Camps J. C., Almasy R. J., Suddath F. L., Watt D. D. y Bugg C. E. (1980), Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6496-6500
- Frank R.W., Gennaro R., Schneider K., Przybylski M. y Romeo D. (1990), Amino acid sequences of two proline-rich bactenecins: antimicrobial peptides of bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 265: 18871-18874
- Fujii G., Selsted M.E. y Eisenberg D. (1993), Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Prot. Sci.*, 2: 1301-1312
- Ganz T. y Lehrer R.I. (1994), Defensins. *Curr. Op. Immunol.*, 6: 584-589.
- García C., Becerril B., Selisko B., Delepierre M. y Possani L.D. (1997), Isolation, characterization and comparison of a novel crustacean toxin with mammalian toxin from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116B: 315-322
- Garnier J., Gibrat J.F. y Robson B. (1996), GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.*, 266: 540-553
- Gazit E., Lee W-J., Brey P.T. y Shai Y. (1994), Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry*, 33: 10681-10692
- Gazit E., Boman A., Boman H.G. y Shai Y. (1995), Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 34: 11479-11488
- Gazit E., Miller I.R., Biggin P.C., Sansom M.S.P. y Shai Y. (1996), Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J. Mol. Biol.*, 258: 860-870.
- Gesell J., Zasloff M. y Opella S.J. (1997), Two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR experiments show magainin antibiotic peptide is an alpha helix in dodecylphosphocholine micelles, dodecylsulphate micelles, and trifluoroethanol/water solutions. *J. Biomol. NMR*, 9: 127-135
- Gibson B.W., Dazhi T., Mandrell R., Kelly M. y Spindel E.R. (1991), Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the asian toad, *Bombina orientalis*. *J. Biol. Chem.*, 266: 23103-23111
- Geourjon C. y Delage G. (1995), SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.*, 11: 681-684
- Gillespie J.K., Kanost M.R. y Trenczek T. (1997), Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 611-643

- Goldman M.J., Anderson G.M., Stolzenberg E.D., Kari U.P., Zasloff M. y Wilson J.M. (1997), Human beta-defensin-1 is a salt sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 88: 553-560
- Gosh J.K., Shaool D., Guillaud P., Cicéron L., Mazier D., Kustanovich I., Shai Y. y Mor A. (1997), Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. *J. Biol. Chem.*, 272: 31609-31616
- Gwatz R.W., Kaslow D., Lee J.-Y., Maloy W. L., Zasloff M. y Miller L.H. (1989), Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infect. Immun.*, 59: 2628-2633
- Hancock R.E.W. y Lehrer R.I. (1998), Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotech.*, 16: 82-88
- Hanzawa H., Shimada I., Kuzuhara T., Komano H., Kohda D., Inafaki F., Natori S. y Arata Y. (1990), <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance study of the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin. *FEBS Lett.*, 269: 413-420
- Harder J., Bartels J., Christophers E. y Schröder J.-M. (1997), A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387: 861
- Harwig S.S.L., Swiderek K.M., Kokryakov V.N., Tan L., Lee T.D., Panyutich E.A., Aleshina G.M., Shamova O.V. y Lehrer R.I. (1994), Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes. *FEBS Lett.*, 342: 281-285
- He K., Ludtke S.J. y Huang H.W. (1995), Antimicrobial peptide pores in membranes detected by neutron in-plane scattering. *Biochemistry*, 34: 15614-15618
- Hetru C. y Bulet P. (1997), Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *Meth. Mol. Biol.*, 78: 35-49
- Hill C.P., Yee J., Selsted M.E. y Eisenberg D. (1991), Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*, 251: 1481-1485
- Hirakura Y., Alvarez-Bravo J., Kurata S., Natori S. y Kirino Y. (1996), Selective interaction of synthetic antimicrobial peptides derived from sapecin B with lipid bilayers. *J. Biochem. (Tokio)*, 120: 1130-1140
- Hirsh D.J., Hammer J., Maloy W.L., Blazyk J. y Scheafer J. (1996), Secondary Structure and location of magainin analogue in synthetic phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 35: 12733-12741
- Hoffmann J.A. y Hetru C. (1992), Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol. Today*, 13: 411-415
- Hoffmann J.A., Reichhart J.-M. y Hetru C. (1996), Innate immunity in higher insects. *Curr. Op. Immunol.*, 8: 8-13
- Holak T.A., Engström A., Kraulis P.J., Lindeberg G., Bennich H., Jones T.A., Gronenborn A.M. y Clore G.M. (1988), The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*, 27: 7620-7629
- Hristova K., Selsted M.E. y White S. (1996), Interactions of monomeric rabbit neutrophil defensins with bilayers: comparison with dimeric human defensin HNP-2. *Biochemistry*, 35: 11888-11894
- Hubert F., Noël T. y Roch P. (1996), A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.*, 240: 302-306
- Hugosson M., Andreu D., Boman H.G. y Glaser E. (1994), Antibacterial peptides and mitochondrial presequences affect mitochondrial coupling, respiration and protein import. *Eur. J. Biochem.*, 223: 1027-1033

- Hultmark D., Engström Å., Andersson K., Steiner H., Bennich H. y Boman H.G. (1983), Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.*, 2: 571-576
- Iijima R., Kurata S. y Natori S. (1993), Purification, characterization and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *J. Biol. Chem.*, 268: 12055-12061
- Ishikawa M., Kubo T. y Natori S. (1992), Purification and characterization of a dipterin homologue from *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochem. J.*, 287: 573-578
- Jo E., Blazyk J. y Boggs J.M. (1998), Insertion of magainin into the lipid bilayer detected using lipid photolabels. *Biochemistry*, 37: 13791-13799
- Jover E., Couraud F. y Rochat H. (1980), Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95: 1607-1614
- Kagan B.L., Selsted M.E., Ganz T. y Lehrer R.I. (1990), Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 210-214
- Kawano K., Yoneya T., Miyata T., Yoshikawa K., Tokunaga F., Terada Y. y Iwanaga S. (1990), Antimicrobial peptide, tachyplesin-1, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*) - NMR determination of the beta-sheet structure. *J. Biol. Chem.*, 265: 15365-15367
- Kim J.I., Iwai H., Kurata S., Takashi M., Masuda K., Shimada I., Natori S., Arata Y. y Sato K. (1994), Synthesis and characterization of sapecin B. *FEBS Lett.*, 342: 189-192
- Kleywegt G.J. (1996), Use of non-crystallographic symmetry in protein structure refinement. *Acta Cryst.*, 52D: 842-847
- Kjellevig-Waering N.E. (1986), Scorpions fossils. *Paleontographica Americana*. 55: 1-287
- Kokryakov V.N., Harwing S.S.L., Payutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V., Korneva H.A. y Leherer R.I. (1993), Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.*, 327: 231-236
- Koo J.C., Lee S.Y., Chun H.J., Cheong Y.H., Choi J.S., Kawabata S-I., Miyagi M., Tsunasawa S., Ha K.S., Bae D.W., Han C-D., Lee B.L. y Cho M.J. (1998), Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochem Biophys. Acta*, 1382: 80-90
- Kuzuhara T., Nakajima Y., Matsuyama K. y Natori S. (1990), Determination of the disulfide array in sapecin, an antibacterial peptide of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J. Biochem. (Tokio)*, 107: 514-518
- Kwon M-Y., Hong S-Y. y Lee K-H. (1998), Structure-activity analysis of brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1387: 239-248
- Laemli U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*, 227: 680-685
- Lambert J., Keppe E., Dimarcq J-L., Wicker C., Reichhart J.M., Dunbar B., Lapage P., van Dorsselaer A., Hoffmann J.A., Fothergill J. y Hoffmann A. (1989), Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 262-266

ESTA TIRADA NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Landon C., Sodano P., Hetru C., Hoffmann J.A. y Ptak M. (1997), Solution structure of drosomycin, the first inducible antitungal protein from insects. *Prot.Sci.*, 6: 1878-1884
- Lebreton F., Delepierre M., Ramírez A.N., Balderas C. y Possanni L.D. (1994), Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsh. *Biochemistry*, 33: 11135-11149
- Lee I.H., Zhao C., Cho Y., Harwig S.S.L., Cooper E.L. y Lehrer R.I. (1997), Clavanins alfa-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Lett.*, 400: 158-162
- Lee J.-Y., Boman A., Sun C., Andersson M., Jürnvall H., Mutt V. y Boman H.G. (1989), Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9159-9162
- Lee K.H., Hong S.Y., Oh J.E., Kwoan M.Y., Yoon J.H., Lee J.H., Lee B.L. y Moon H.M. (1998), Identification and characterization of the antimicrobial peptide corresponding to C-terminal beta-sheet domain of tenecin 1, an antibacterial protein of the larvae of *Tenebrio molitor*. *Biochem. J.*, 334: 99-105
- Lehrer R.I., Barton A., Daher K.A., Harwig S.S.L., Ganz T. y Selsted M.E. (1989), Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J.Clin. Invest.*, 84: 553-561
- Lehrer R.I., Lichtenstein A.K. y Ganz T. (1993), Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 11: 105-128
- Leippe M. (1995), Ancient weapons: NK-lysin is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell*, 83: 17-18
- Lencer W.I., Cheung G., Strohmeier G.R., Currie M.G., Ouillette A.J., Selsted M.E. y Madara J.L. (1997), Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 8585-8589
- Lepage P., Bitsch F., Roecklin D., Keppl E., Dimarcq J.-L., Rechhart J.-M., Hoffmann J.A., Roitsch C. y van Dorsselaer A. (1991), Determination of disulfide bridges in natural and recombinant insect defensin A. *Eur. J. Biochem.*, 196: 735-742
- Levashina E.A., Ohresser S., Bulet P., Reichhart J.-M., Hetru C. y Hoffmann J.A. (1995), Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur. J. Biochem.*, 233: 694-700
- Levashina E.A., Ohresser S., Lemaitre B. y Imler J.-L. (1998), Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the *Drosophila* antimicrobial peptide metchnikowin. *J. Mol. Biol.*, 278: 515-527
- Liepinsh E., Andersson M., Ruyschaert J.-M. y Otting G. (1997), Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat. Struct. Biol.*, 4: 793-795
- Lippens G., Najib J., Wodak S.J. y Tartar A. (1995), NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. *Biochemistry*, 34: 13-21
- Liu L., Zhao C., Heng H.H.Q. y Ganz T. (1997), The human bee-defensin and alfa-defensins are encoded by adjacent genes: two families with different disulfide topology share a common ancestry. *Genomics*, 43: 316-320
- Lockey T.D. y Ourth D.D. (1996), Formation of pores in *Escherichia coli* cell membranes by a cecropin isolated from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.*, 236: 263-271

- Ludtke S.J., He K., Wu Y. y Huang H.W. (1994), Cooperative membrane insertion of magainin correlated with its cytolytic activity. *Biochem. Biophys. Acta*, 1190: 181-184
- Ludtke S.J., He K., Heller W.T., Harroun T.A., Yang L. y Huang H.W. (1996), Membranes pores induced by magainin. *Biochemistry*, 35: 13723-13728
- Mackintosh J.A., Veal D.A., Andrew J. Beattie A.J. y Gooley A.A. (1998), Isolation from an ant *Myrmecia gulosa* of two inducible O-glycosylated proline-rich antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.*, 273: 6139-6143
- Maget-Dana R., Bonmatin J.M., Hetru C., Ptak M. y Maurizot J.C. (1995), The secondary structure of the insect defensin A depends on its environment. A circular dichroism study. *Biochimie*, 77: 240-244
- Maget-Dana R. y Ptak M. (1997), Penetration of the insect defensin A into phospholipid monolayers and formation of defensin A-lipid complexes. *Biophys. J.*, 73: 2527-2533
- Maloy W.L. y Kari U.P. (1995), Structure-activity on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, 37: 105-122
- Mandard N., Sodano P., Labbe H., Bonmatin J-M., Bulet P., Hetru C., Ptak M. y Vovelle F. (1998), Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *Eur. J. Biochem.*, 256: 404-410
- Mangoni M.E., Aumelas A., Charnet P., Roumestand C., Chiche L., Despaux E., Grassy G., Calas B. y Chavanieu A. (1996), Change in membrane permeability induced by protegrin 1: implications of disulphide bridges for pore formation. *FEBS Lett.*, 383: 93-98
- Marchini D., Giordano P.C., Amons R., Bernini L.F. y Dellai R. (1993), Purification and primary structure of ceratotoxin-a and ceratotoxin-b, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 5: 591-598
- Marcus J.P., Goulter K.C., Green J.L., Harrison S.J. y Manners J.M. (1997), Purification, characterization and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. *Eur. J. Biochem.*, 244: 743-749
- Marion D., Zasloff M. y Bax A. (1988), A two dimensional NMR study of the antimicrobial peptide magainin 2. *FEBS Lett.*, 227: 21-26
- Martins J.C., Maes D., Loris R., Papermans H.A.M., Wyns I., Willem R. y Verheyden P. (1996), <sup>1</sup>H NMR study of the solution structure of Ac-AMP2 a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*. *J. Mol. Biol.*, 258: 322-333
- Matsuzaki K., Fuui M., Fujii N. y Miyajima K. (1991), Interactions of an antimicrobial peptide tachyplesin I, with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1070: 259-264
- Matsuzaki K., Murase O., Tokuda H., Funakoshi S., Fujii N. y Miyajima K. (1994), Orientational and agregational states of magainin 2 in phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 33: 3342-3349
- Matsuzaki K., Sugishita K-I., Fujii N. y Miyajima K. (1995), Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, 34: 3423-3429
- Matsuzaki K., Murase O., Fujii N. y Miyajima K. (1996), An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*, 35: 11361-11368

- Matsuzaki K., Nakamura A., Murase O., Sugishita K-I., Fujii N. y Miyajima K. (1997a), Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge. *Biochemistry*, 36: 2104-2111
- Matsuzaki K., Sugishita K-I., Harada M., Fujii N. y Miyajima K. (1997b), Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacterias. *Biochim. Biophys. Acta*, 1327: 119-130
- Matsuzaki K., Yoneyama S., Fuji N., Miyajima K., Yamada K-I., Kirino Y. y Anzai K. (1997c), Membrane permeabilization of a cyclic antimicrobial peptide tachyplesin I, and its linear analog. *Biochemistry*, 36: 9799-9806
- Matsuzaki K. (1998), Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptide. *Biochem. Biophys. Acta*, 1376: 391-400
- Matsuzaki K., Sugishita K-I., Ishibe N., Ueha M., Nakata S., Miyajima K. y Epand R.M. (1998a), Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry*, 37: 11856-11863
- Matsuzaki K., Mitami Y., Akada K.Y., Muase O., Yoneyama S., Zasloff M. y Miyajima K. (1998b), Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa. *Biochemistry*, 37: 15144-15153
- Matsuyama K. y Natori S. (1988), Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, a embryonic cell line of *Sarcophaga pergrina*. *J. Biol. Chem.*, 263: 17112-17116
- Meister M., Lemaitre B. y Hoffmann J.A. (1997), Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *BioEssays*, 19: 1019-1026
- Medzhitov R. y Janeway C.A. (1997), Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91: 295-298
- Michaut L., Fehlbaum P., Moniatte M., van Dorsselaer A., Reichhart J-M. y Bulet P. (1996), Expression in yeast of active recombinant drosomycin, an antifungal peptide from *Drosophila* and secondary structure determination. *FEBS Lett.*, 395: 6-10
- Mignogna G., Simmaco M., Kreil G. y Barra D. (1993), Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina orientalis*. *EMBO J.*, 12: 4829-4832
- Miller C. (1995), The charibdotoxin family of channel-blocking peptides. *Neuron*, 15: 5-10
- Miyata T., Tokunaga F., Yoneyama T., Yoshikawa K., Iwanaga S., Niwa M., Takao T. y Shimonishi Y. (1989), Antimicrobial peptides isolated from horseshoe crab, tachyplesin-2, and polyphemusins 1 y 2: chemical structures and biological activity. *J. Biochem. (Tokio)*, 106: 663-668
- Moon H.J., Lee S.Y., Kurata S., Natori S. y Lee B.L. (1994), Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein from larvae of the coleopteran, *Tenebrio molitor*. *J. Biochem. (Tokio)*, 116: 53-58
- Moore S. y Stein W.H. (1963), Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Meth. Enzymol.*, 6: 819-871
- Mor A., Nguyen V-H., Delfour A., Migliore-Samur D. y Nicolas P. (1991), Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry*, 30: 8824-8830
- Mor A., Amiche M. y Nicolas P. (1994), Structure, synthesis and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry*, 33: 6642-6650

- Mor A., Hani H. y Nicolas P. (1994b), The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganism. *J. Biol. Chem.*, 269: 31635-31641
- Mor A. y Nicolas P. (1994), Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *Eur. J. Biochem.*, 219: 145-154
- Mor A. y Nicolas P. (1994b), The N-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.*, 269: 1934-1939
- Morikawa N., Hagiwara K.I. y Nakajima T. (1992), Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 189: 184-190
- Nakajima Y., Qu X-M. y Natori S. (1987), Interaction between liposomes and sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J. Biol. Chem.*, 262: 1665-1669
- Nakamura T., Furanaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S., Niwa M., Takao T. y Shimonishi Y. (1988), Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). *J. Biol. Chem.*, 263: 16709-16713
- Nicolas P. y Mor A. (1995), Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 277-304
- Nitti G., Orru S., Bloch Jr. C., Morhy L., Marino G. y Pucci P. (1995), Amino acid sequence and disulphide-bridge pattern properties of three gamma-thionins from *Sorghum bicolor*. *Eur. J. Biochem.*, 228: 250-256
- Ohta M., Ito H., Masuda K., Tanaka S., Arakawa Y., Wacharotayankun R. y Kato N. (1992), Mechanisms of antibacterial action of tachyplesins and polyphemusins, a group of antimicrobial peptides isolated from horseshoe crab hemocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36: 1460-1465
- Oishi O., Yamashita S., Nishimoto E., Lee S., Sugihara G. y Ohno M. (1997), Conformations and orientations of aromatic amino acids of tachyplesin I in phospholipid membranes. *Biochemistry*, 36: 4352-4359
- Okada M. y Miyazawa S. (1985), Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *J. Biol. Chem.*, 260: 7174-7177
- Okamoto M., Mitsuhashi I., Ohshima M., Natori S. y Ohashi Y. (1998), Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol.*, 39: 57-63
- Oren D.A., Froy O., Kleinberger-Doron N., Gurevitz M. y Shaanan B. (1998), An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alpha helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure*, 6: 1095-1104
- Ouellete A.J. y Selsted M.E. (1996), Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.*, 10: 1280-1289
- Patel S.U., Osborn R., Rees S. y Thorton J.M. (1998), Structural studies of *Impatiens balsamina* antimicrobial protein (IB-AMP1). *Biochemistry*, 37: 983-990
- Pardi A., Hare d.R., Selsted M.E., Morrison R.D., Bassolino D.A. y Bach II A.C. (1988), Solution structures of the rabbit neutrophil defensin NP-5. *J. Mol. Biol.*, 201: 625-636
- Pardi A., Zhang X.L., Selsted M.E., Skalicky J.J. y Yip P.F. (1992), NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 2. Three-dimensional structures of rabbit NP-2 and human HNP-1. *Biochemistry*, 31: 11357-11364

- Park J.M., Jung J-E. y Lee B.J. (1994), Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog, *Rana rugosa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 205: 948-954
- Park N.G., Lee S., Oishi O., Aoyagi H., Iwanaga S., Yamashita S. y Ohno M. (1992), Conformation of tachyplesin I from *Tachyplesus tridentatus* when interacting with lipid matrices. *Biochemistry*, 31: 12241-12247
- Possani L.D. (1984), Structure of scorpion toxin. En: Handbook of natural toxins. Vol. 2: 513-550. Tu A.T. ed. Marcel Dekker Inc., Nueva York
- Possani L.D., Calderon E.S.A., Olamendi T.P., Dehesa-Davila M. y Gurrola G.B. (1992), Protección contra el alacranismo. En: Vacunas, ciencia y salud. Escobar A., Valdespina J.L. y Sepúlveda J. ed., Secretaria de Salud. México
- Possani L.D., Selisko B. y Gurrola G.B. (1998), Structure and function of scorpion toxins affecting K<sup>+</sup>-channels. En: Perspectives in drug design. Darbon H. y Sebatier J.M. ed., Kluwer Academic Publishers. Holanda
- Pouny Y., Rapaport D., Mor A., Nicolas P. y Shai Y. (1992), Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31: 12416-12423
- Ragona L., Molinari H., Zetta L., Longhi R., Marchini D., Dallai R., Bernini L.F., Lozzi L., Scarselli M. y Niccolai N. (1996), CD and NMR structural characterization of ceratotoxins, natural peptides with antimicrobial activity. *Biopolymers*, 39: 653-664
- Rodríguez A., Tablero M., Barragán B., Lara P., Rangel M., Arreguín B., Possani L. y Soriano-García M. (1986), Crystallization of hevein: a protein from latex of *Hevea brasiliensis* (rubber tree). *J. Cryst. Growth*, 76: 710-714
- Rodríguez M.C., Zamudio F., Torres J.A., González-Cerón L., Possani L.D. y Rodríguez M.H. (1995), Effect of a cecropin-like synthetic peptide (shiva-3) on the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *Exp. Parasitol.*, 80: 596-604
- Rose G.D., Girasch L.M. y Smith J.A. (1985), Turns in peptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, 37: 1-109
- Roumestand C., Louis V., Aumelas A., Calas B. y Chavanieu A. (1998), Oligomerization of protegrin-1 in the presence of DPC micelles. A proton high-resolution NMR study. *FEBS Lett.*, 241: 263-267
- Schnap D., Kemp G.D. y Smith V.J. (1996), Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from hemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur. J. Biochem.*, 240: 532-539
- Seberwal G. y Nagaraj R. (1994), Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: Facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. *Biochim. Biophys. Acta*, 1197: 109-131.
- Selisko B., García C., Becerril B., Delepierre M. y Possani L.D. (1996), An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann cDNA, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants. *Eur. J. Biochem.*, 242: 235-242
- Selisko B., García C., Becerril B., Gómez-Lagunas F., Garay C. y Possani L.D. (1998), Cobatoxins 1 and 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann constitute a subfamily of potassium-channel-blocking scorpion toxins. *Eur. J. Biochem.*, 254: 468-479

- Selsted M.E., Brown D.M., DeLange R.J. y Lehrer R.I. (1983), Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J. Biol. Chem.*, 258: 14458-14459
- Selsted M.E., Novotny M.J., Norris W.L., Tang Y.Q., Smith W. y Cullor J.S. (1992), Indolicin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 267: 4292-4295
- Selsted M.E., Tang Y.Q., Morris W.L., McGuire P.A., Novotny M.J., Smith W., Henschen A.H. y Cullor J.S. (1993), Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 268: 6641-6648
- Semakovlis Ch., Kysten P., Kimbrell D.A., Engström Å. y Hultmark D. (1991), The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.*, 10: 163-169
- Shahabuddin M., Fields L., Bulet P., Hoffmann J.A. y Miller L.H. (1998), Plasmodium gallinaceum: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. *Exp. Parasitol.*, 89: 103-112
- Shimoda M., Takagi H., Kurata S., Yoshioka T. y Natori S. (1994), Inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channel by sapecin B, an insect antibacterial protein. *FEBS Lett.*, 339: 59-62
- Silvestro L., Gupta K., Weiser J.N. y Axelsen P.H. (1997), The concentration-dependent membrane activity of cecropin A. *Biochemistry*, 36: 11452-11460
- Simmaco M., Mignogna G., Barra D. y Bossa F. (1993), Novel antimicrobial peptides from skin secretions of the European frog *Rana esculenta*. *FEBS Lett.*, 324: 6641-6648
- Simmaco M., Mignogna G., Barra D. y Bossa F. (1994), Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*: Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *J. Biol. Chem.*, 269: 11956-11961
- Simpson R.J., Neuberger M.R. y Liu T-Y. (1976), Complete amino acid analysis of proteins from a single hydrolysate. *J. Biol. Chem.*, 246: 1936-1940
- Sipos D., Andersson M. y Ehrenberg A. (1992), The structure of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 in solution, determined by proton-NMR. *Eur. J. Biochem.*, 209: 163-169
- Skerlavaj B., Gennaro R., Bagella L., Merluzzi I., Risso A. y Zanetti M. (1996), Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. *J. Biol. Chem.*, 271: 28375-28381
- Sönnichsen F.D., van Eyk J.E., Hodges R.S. y Sykes B.D. (1992), Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochemistry*, 31: 8790-8798
- Steinborner S.T., Waugh R.J., Bowie J.H., Wallace J.C., Tayler M.J. y Ramsay S.L. (1997), New caerin antibacterial peptides from the skin glands of the tree frog *Litoria xanthomera*. *J. Pep. Sci.*, 3: 181-185
- Steiner H., Hultmark D., Engström A., Bennich H. y Boman H.G. (1981), Sequence and specificity of two novel antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292: 246-248
- Steiner H. (1982), Secondary structure of the cecropins; antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Lett.*, 137: 283-287
- Storici P., Tossi A., Lenarcic B. y Romeo D. (1996), Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursors of antimicrobial peptides. *Eur. J. Biochem.*, 238: 769-776

- Storm D.R., Rosenthal K.S. y Swanson P.E. (1977), Polymyxin and related peptides antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.*, 46: 723-763
- Subbalakshmi C., Krishnakumari V., Nagaraj R. y Sitaram N. (1996), Requeriments for antibacterial and haemolytic activities in the bovin neutrophil derived 13-residues peptide indolicidin. *FEBS Lett.*, 395: 48-52
- Subbalakshmi C. y Sitaram N. (1998), Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 160: 91-96
- Sugiyama M., Kuniyoshi H., Kotani E., Tani K., Kadono-Okuda K., Kato Y., Yamamoto M., Shimabakuro M., Chwdhury S., Xu J., et al. (1995), Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25: 385-392
- Suh J.-Y., Lee K.-H., Chi S.-W., Hong S.-Y., Choi B.-W., Moon H.-M. y Choi B.-S. (1996), Unusually stable helical kink in the antimicrobial peptide - A derivative of gaegurin. *FEBS Lett.*, 392: 309-312
- Suzuki M., Hirono M., Kawahara K. y Yoshioka T. (1997), Sapcecin B, a novel fly toxin blocks macroscopic currents in the GH3 rat pituitary cell line. *Am. J. Physiol.*, 273: C289-C296
- Taylor R.H., Acland D.P., Attenborough S., Cammune B.P.A., Evani I.J., Osborn R.W., Ray J.A., Rees S.B. y Broekaert W.F. (1997), A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 272: 24480-24487
- Terras F.R.G., Torrenkens S., van Leuven F., Osborn R.W., Vanderleyden J., Cammue B.P.A. y Broekaert W.F. (1993), A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett.*, 316: 233-240
- Terry A.S., Poulter L., Williams D.H., Nutkins J.C., Giovannini M.G., Moore C.H. y Gibson B.W. (1988), The cDNA sequence coding for prepro-PGS (prepro-magainins) and aspects of the processing of this prepro-polypeptide. *J. Biol. Chem.*, 263: 5745-5751
- Thevissen K., Ghazi A., de Samblanx G.W., Brownie C., Osborn R.W. y Broekaert W.F. (1996), Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.*, 271: 15018-15025
- Thevissen K., Osborn R.W., Acland D.P. y Broekaert W.F. (1997), Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *J. Biol. Chem.*, 272: 32176-32181
- Tytler E.M., Anantharamaiah G.M., Walker D.E., Mishra V.K., Palgunachari M.N. y Segrest J.P. (1995), Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry*, 34: 4393-4401
- Valdivia H.H. y Possani L.D. (1998), Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. *Trends Cardiovas. Med.*, 8: 111-118
- Vaz Gomes A., de Waal A., Berden J.A. y Westerhoff H.V. (1993), Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes. *Biochemistry*, 32: 5365-5372
- Vignal E., Chavanieu A., Roch P., Chiche L., Grassy G., Calas B. y Aumelas A. (1998), Solution structure of the antimicrobial peptide ranalexin and a study of its interaction with perdeuterated dodecylphosphocholine micelles. *Eur. J. Biochem.*, 253: 221-228
- Wade D., Boman A., Wählin B., Drain C.M., Andreu D., Boman H.G. y Merrifield R.B. (1990), All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4761-4765

- Wang W., Smith D.K., Moulding K. y Chen H.M. (1998), The dependence of membrane permeability by the antibacterial peptide cecropin B and its analogs, CB-1 y CB-3, on liposomes of different composition. *J. Biol. Chem.*, 273: 27438-27448
- Wenk M.R. y Seelig J. (1998), Magainin 2 amide interaction with lipid membrane. calorimetric detection of peptide binding and pore formation. *Biochemistry*, 37: 3909-3916
- Westerhoff H.V., Juretic D., Hendler R.W. y Zasloff M. (1989), Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6597-6601
- Westerhoff H.V., Zasloff M., Rosner J.L., Hendler R.W., De Waal A., Vaz Gomes A., Jongsma A.P.M., Riethorst A. y Juretic D. (1995), Functional synergism of the magainins PGLa and magainin 2 in Escherichia coli, tumor cells and liposomes. *Eur. J. Biochem.*, 228: 257-264
- Wimley W.C., Selsted M.E. y White S.H. (1994), Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Prot. Sci.*, 3: 1362-1373
- Winder D., Günzburg W.H., Erfle V. y Salmons B. (1998), Expression of antimicrobial peptides has an antitumor effect in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 242: 608-612
- Wong H., Bowie J.H. y Carver J.A. (1997), The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *Eur. J. Biochem.*, 247: 545-557
- Wright C.S. (1987), Refinement of the crystal structure of wheat germ agglutinin isolectin 2 at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 194: 501-529
- Wright C.S. (1989), Comparison of the refined crystal structure of two wheat germ isolectins. *J. Mol. Biol.*, 209: 475-487
- Yamada K. y Natori S. (1994), Characterization of the antimicrobial peptide derived from saprocin B, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Biochem. J.*, 298: 623-628
- Yarus S., Rosen J.M., Cole A.M. y Diamond G. (1996), Production of active bovine tracheal antimicrobial peptide in milk of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 14118-14121
- Yeaman M.R., Bayer A.S., Koo S.P., Foss W. y Sullman P.M. (1998), Platelet Microbicidal proteins and Neutrophil defensins disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *J. Clin. Inv.*, 101: 178-187
- Zanetti M., Gennaro R. y Romeo D. (1995), Cathelicidins: a novel protein family with common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.*, 374: 1-5
- Zimmermann G.R., Legault P., Selsted M.E. y Pardi A. (1995), Solution structure of the neutrophil beta-defensin 1: the peptide fold of the beta-defensin is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry*, 34: 13663-13671

AP	Secuencia	Organismos	Estructura		
<b>Grupo i</b>					
Cecropinas					
CEC1_CERCA	GWLKMGKKI ERVG-QHTRDA TIQTIAVAQQ AANVAATARG	Insectos, 1 caso en mamíferos	2 hélices alfa unidas por un segmento corto desordenado		
CEC2_CERCA	GWLKMGKKI ERVG-QHTRDA TIQGLGIAQQ AANVAATARG				
CECD_ANTPE	W--NPFKEL ERAG-QRVRDA IISAGPAVAT VAQATALAK				
CECD_HYACE	PW--NPFKEL ESVG-QRVRDA VISAGPAVAT VAQATALAKGK				
CEC5_MANSE	PW--NPFKEL ERAG-QRVRDA VISAA-AVAT VGQAAAIARGG				
CECB_HYACE	FW--FVFKKI EKMG-RNIRNG IVKAGPAIAV LGEAKALG				
CEC4_BOMMO	RW--YIFKKI ESVG-QNIRDG IVKAGPAVAV VGQAAT				
CECA_TRINI	RW--KFFKKI ESVG-QNIRDG IIKAGPAVAV VGQAASITGK				
CECA_HYACE	KW--FLFKKI ESVG-QNIRDG IIKAGPAVAV VGQATQIAKG				
CEC1_PIG	SWLSKTAKKL ENSAKKRISG IATAIQGGPR				
Dermaseptinas					
DMS2_PHYBI	GLW-SKIKEV GKEAAKAAK AAGKAALGAV SEAVGEQ	Anfibios, <i>Phylomedusas</i> sp.	1 hélice alfa torsionada al centro		
DMS5_PHYSA	GLW-SKIKTA GKSVAKAAK AAVKAVTNAV				
DMS1_PHYSA	ALWKTMLKKL GTMALHAGKA AL-GAAADTI SQGTQ				
DMS2_PHYSA	ALWFTMLKKL GTMALHAGKA AL-GAAANTI SQGTQ				
DERM_PHYSA	ALWKTMLKKL GTMALHAGKA AL-GAAADTI SQ-TQ				
DMS1_PHYBI	AMWKDVLKKI GTVALHAGKA AL-GAVADTI SQGEQ				
DMS3_PHYSA	ALWKNMLKGI GKL---AGKA AL-GAVKKLV GAES				
DMS4_PHYSA	ALWMTLLKKV LKAAAKALNA VLVGANA				
<b>Grupo ii</b>					
Atacinas					
ATTB_HYACE	QAGALTINSD GTSGAVVKVP ITGNENHKFS ALGSVDLTNQ MKLGAATAGL AYDNVNGHGA TLTKTHIPGF GDKMTAAGKV NLFHNDNHDF SAKAFATKMN PNIPQVPNFN TVGAGVDYMF KDKIGASANA AHTDFINRND YSLGGKLNLF KTPTTSLDFN AGWKKFDTPF FKSSWEPSTS FSFSKY F	Insectos			

<b>Grupo iii</b>			
Brevininas			
BR1E_RANES	FLPLLAGLAA NFLPKIFCKI TRKC		Anfibios,
BR1_RANBP	FLPVLAGIAA KVPVPAFCKI TKKC		Rana sp.
BR1A_RANES	FLPAIFRMAA KVVPTIICSI TKKC		
BR1B_RANES	VIPFVASVAA E.MOHVYCAA SRKC		
BR2D_RANES	GILDSLKLN A----KNAG- QILLNKASCKL SGQC		
BREE_RANES	GIFDKLKNF A----KGVA- QSLLNKASCKL SGQC		
BR2B_RANES	GILDTLKNL AKTAGKGAL- QGLVKMASCKL SGQC		
BR2F_RANES	GIMDTLKNL AKTAGKGAL- QSLVKMASCKL SGQC		
BR2E_RANES	GIMDTLKNL AKTAGKGAL- QSLLNKASCKL SGQC		
BR2A_RANES	GILDTLKNL AISAAGKAA- QGLVNKASCKL SGQC		
BR2C_RANES	GILLDKLKN FAKTAGKGV L QSLLNTASCKL SGQC		
BR2_RANBP	GLLDSLKGF AATAGKGV L- QSLLSTASCKL AKTC		
Esculentinas			
ES1A_RANES	GIFSKLAGKK IKNLLISGLK NVGKEVGMDV VRTGIDIAGC KIRGEC		Anfibios,
ES1B_RANES	GIFSKLAGKK LKNLLISGLK NVGKEVGMDV VRTGIDIAGC KIRGEC		Rana sp.
ES1_RANES	GIFSKLGRKK IKNLLISGLK NVGKEVGMDV VRTGIDIAGC KIRGEC		
ES2A_RANES	G ILSLVKGVAK LAGKGLAKEG GKFGLELIAC KIAKQC		
ES2B_RANES	G IFSLVKGA AK LAGKGLAKEG GKFGLELIAC KIAKQC		
<b>Grupo iv</b>			
Taquiplesinas			
TAC1_TACGI	KWCFRVCYRG ICYRRCR		Artrópodos
TAC3_TACGI	KWCFRVCYRG ICYRRCR		
TAC2_TACTR	PWCFRVCYRG ICYRRCR		
Protegrinas			
PG1_PIG	PGGRLCYCRR RFCVCVGR		Mamíferos
PG2_PIG	PGGRLCYCRR RFCICVG		
			Hélice $\alpha$ amino ter nal, asa C <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> ,
			Hélice $\alpha$ amino ter nal, asa C <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> ,
			Hoja beta de dos hebras
			Hoja beta de dos hebras

PG3_PIG	RGGGLCYCRR RFCVCVGR		
PG5_PIG	RGGRLCYCRP RFCVCVGR		
PG4_PIG	RGGRLCYCRG WICFCVGR		
Defensinas alfa		Mamiferos	Hoja beta de tres hebras
DEF1_Conejo	GICACPFPRFC PMSERFSGYC RVNGARYVRC CSRR		
DEF1_Ratón	VCYCPSPGC KGRERMNGTC RKGHLLYTLC CR		
DEF1_Rata	TCYCPPTRC GFRERLSGAC GYRGRIYPLC CR		
DEFN_Humano	ACYCPIPAC IAGERRYGTC IYQGRWAF C		
Defensinas beta		Mamiferos	Hoja beta de tres hebras
BD01_Bovino	DFAS-CHTNG GICLPNRCPG HMIQIGICFR PRVKCCRSW		
BD01_Humano	DHYN-CVSSG GQCLYSACPI FTKIQGTCYR GKAKCKK		
TAP_Bovino	NPVS-CVVRNK GICVPIRCPG SMKQIGTCVG RAVKCCRKK		
AMP1_Pollo	GRKSDCFRKS GFCAFLKPCS LTLISGKCSR FYL-CCKRIR		
Defensinas de artrópodos		Artrópodos, dos casos en moluscos	$\alpha/\beta$ -EC
DEF1_AESCY	GFGCPL---- -----DCMQ CHRHCQTITG RSGGYCSGPEL KLTCTCYR		
DEF1_MYTGA	GFGCP----- -----NNYQ CHRHCKSIPG RCGGYCGGXH RLRCTCYRC		
DEF4_LEIQH	GFGCPL---- -----NOGA CHRHCRSIR- RGGGYCAGFF KQTCTCYRN		
DEF1_PROTE	ATCDLL--- -ESTGINHSA CAAHCLL-RG NRGGYCNG-- KGVCVCPN		
DEF1_DROME	ATCDLL--- SPW-NWNHTA CAGHCIA-KG FKGGYCND-- KAVCVCRN		
DEFA_ZOPAT	FTCDVLGFE IAGTKLNSAA CGAHCLAL-G RGGGYCNS-- KSVCVCR		
DEF1_ALLDI	VTCDLLSFE AFGFAANHSL CAAHCLAI-G RGGGSCE--- RGVCICRR		
DEF1_PALPR	ATCDALSFS SPWLTVNNSA CAIHCLT-KG YKGGRCVN-- -TICNCRN		
DEF1_PYRAP	ATCDILSFQ SQWVTPNHAG CALHCVI-KG YKGGQCKI-- -TVCHCRP		
DEF1_APIME	VTCDLLSFK GQ---VNSA CAANCLSL-G KAGGHCEK-- VG-CICPKTSF KDLWDKRFG		

Defensinas de plantas		Plantas, 1 caso en insectos	$\alpha\beta$ -EC
Rs-AFP1	QKLCERPSGTW SGVCHNNA-- -CKNQCINLE KKARHGSCYN VFPAHKCICY FPC		
Dm-AMP1	ELCEKASKTW SGNCGNTGH- -CDNQCXSWE GAA-HGACHV RKGKHMCFY FNC		
DMYN_DROME	DCLSGRYKG --PCAVWDNE TCRRVCKEEG RS--SGHCS- PS--LKCWC- EGC		
Hs-AFP1	DGVKLCDVPSGTW SGKCGSSSK- -CSQQCKDRE HFAYGGACHY QFPSVKCFCK FQC		
Tioninas gama		Plantas	$\alpha\beta$ -EC
THG1_WHEAT	KICRRRSAGF KGPCM--SNK NCAQVCQEG WG--GGNCDG PF--RRCKCI RQC		
THG2_WHEAT	KVCRQRSAGF KGPCV--SDK NCAQVCLQEG WG--GGNCDG PF--RRCKCI PQC		
THG_HORVU	RICRRRSAGF KGPCV--SNK NCAQVCMQEG WG--GGNCDG PF--RRCKCM RRC		