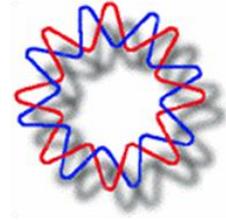




**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Diseño de Nuevos Péptidos
Sintéticos Antimicrobianos**

T E S I S

**Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Bioquímicas**

P R E S E N T A

Q.F.B. Lorenzo Sánchez Vásquez

Director del Trabajo

Dra. Georgina Gurrola Briones

Laboratorio del Dr. Lourival D. Possani P.

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CÓMITE TUTORAL

Dra. María Alejandra Bravo de la Parra

Dra. Georgina Gurrola Briones

Dr. Jesus Silva Sánchez

Invitado: Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Se agradece a los miembros del comité tutorial por sus comentarios y sugerencias a lo largo de la realización del presente trabajo.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Lourival Possani del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Georgina Gurrola Briones.

Este trabajo fue financiado parcialmente por recursos recibidos de DGAPA-UNAM #IN204110 concedido al Dr. Lourival Possani y la beca CONACyT con el no. de apoyo 290564 otorgada a Lorenzo Sánchez Vásquez.

Parte de este trabajo fue presentado en:

**XXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica
7 al 10 de Noviembre del 2010
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas**

Asimismo, fue aceptada la solicitud de registro ante:

**Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI)
Nuevo Péptido Antibiótico Híbrido y sus Variantes
Patente Mexicana con número de folio MX/E/2011/044744**

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ABREVIATURAS.....	10
ABREVIATURAS.....	10
1. RESUMEN.....	11
2. INTRODUCCIÓN	13
2.1. <i>Antibióticos</i>	13
2.2. <i>Clasificación</i>	15
2.3. <i>Resistencia bacteriana a antibióticos</i>	17
3. ANTECEDENTES.....	21
3.1 <i>Péptidos antimicrobianos</i>	21
3.2 <i>Modificaciones postraduccionales de los péptidos antimicrobianos</i>	22
3.3. <i>Mecanismo de acción</i>	23
3.4. <i>Resistencia microbiana a los péptidos antimicrobianos</i>	27
3.5. <i>Distribución natural y actividad biológica de los péptidos antimicrobianos</i>	28
3.6. <i>Péptidos antimicrobianos derivados de alacrán</i>	30
3.7. <i>Desarrollo de los péptidos antimicrobianos como potenciales fármacos antimicrobianos</i> 32	
3.8. <i>Aplicaciones clínicas y futuras perspectivas</i>	35
4. JUSTIFICACIÓN	38
5. HIPÓTESIS	38
6. OBJETIVOS	39
6.1 <i>Objetivo General</i>	39
6.2. <i>Objetivos Particulares</i>	39
7. METODOLOGÍA.....	40
7.1. <i>Diseño de los péptidos antimicrobianos</i>	40
7.2. <i>Síntesis química y purificación de los péptidos</i>	40
7.3. <i>Determinación de la masa molecular</i>	42
7.4. <i>Cuantificación de proteína</i>	43
7.5. <i>Evaluación de la actividad antimicrobiana</i>	43
7.6. <i>Ensayos de concentración mínima inhibitoria</i>	43
7.7. <i>Evaluación de la actividad antiparasitaria</i>	44

7.8. Determinación de la actividad hemolítica	44
7.9 Determinación de la estructura secundaria	45
7.10. Ensayos de viabilidad celular	46
7.11 Determinación de la liberación de calceína	46
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
8.1. Diseño de los péptidos sintéticos	48
8.2. Síntesis química y purificación	51
8.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana	52
8.4. Re-diseño, síntesis química y purificación de los nuevos derivados sintéticos	54
8.5. Ensayos de actividad biológica	61
8.6. Determinación de la estructura secundaria.	71
8.7. Evaluación de la viabilidad celular.....	74
8.8. Determinación de la liberación de calceína	76
9. CONCLUSIONES.....	82
10. PERSPECTIVAS.....	84
11. REFERENCIAS	85
12. APÉNDICE.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Mecanismos generales de resistencia a los antibióticos
- Tabla 2. Ejemplos de péptidos antimicrobianos de acuerdo a su clasificación general.
- Tabla 3. Resumen de péptidos antimicrobianos y su mecanismo de acción.
- Tabla 4. Ejemplos y propiedades generales de los péptidos antimicrobianos
- Tabla 5. Resultado del análisis de los parámetros fisicoquímicos de los derivados propuestos.
- Tabla 6. Resultado del análisis de los parámetros fisicoquímicos de los nuevos derivados propuestos.
- Tabla 7. Resultado del análisis de los parámetros fisicoquímicos de los péptidos derivados de la secuencia 1, así como de la secuencia 4 y la modificación de la misma.
- Tabla 8. Parámetros relacionados con el tiempo de retención.
- Tabla 9. Resultados de la prueba de inhibición del crecimiento bacteriano por los PAMs.
- Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria de los péptidos contra bacteria multirresistentes.
- Tabla 11. Actividad hemolítica de los péptidos.
- Tabla 12. Comparación de los péptidos parentales contra los péptidos F1A, F1B, P18K y P18K3N en los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano.
- Tabla 13. Valores de helicidad de los péptidos antimicrobianos.
- Tabla 14. Fosfolípidos más frecuentes en las membranas celulares.
- Tabla 15. Porcentajes de liberación de calceína en liposomas compuestos por PC: PG (1:3 mol: mol).
- Tabla 16. Porcentajes de liberación de calceína en liposomas compuestos por PC: Chl (7:3 mol: mol).

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *E. coli*.

Gráfica 2. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *E. cloacae*.

Gráfica 3. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *K. pneumoniae*.

Gráfica 4. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

Gráfica 5. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *A.baumannii*.

Gráfica 6. CMI de los PAMs contra diferentes cepas.

Gráfica 7. Determinación de la inhibición de formación de oocinetos.

Gráfica 8. Espectro de dicroísmo circular de los diferentes péptidos sintéticos usando como amortiguador TFE 60%.

Gráfica 9. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células HEK 293 e incubando por 24 h con PAMs.

Gráfica 10. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células COS 7 e incubando por 24 h con PAMs.

Gráfica 11. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células HEK 293 e incubando por 48 h con PAMs.

Gráfica 12. Ensayos de liberación de calceína de los péptidos antimicrobianos. La composición de los liposomas es PC: Chl (7:3 mol: mol).

Gráfica 13. Ensayos de liberación de calceína de los péptidos antimicrobianos. La composición de los liposomas es PC: PG (1:3 mol: mol).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Surgimiento de los antibióticos a través del tiempo.

Figura 2. Estructura de algunos antibióticos naturales y sintéticos.

Figura 3. Principales blancos de acción de antibióticos.

Figura 4. Mecanismos de acción de los PAMs.

Figura 5. Mecanismo de la síntesis química de péptidos por el método de Merrifield en fase sólida.

Figura 6. Alineamiento de secuencias de PAMs.

Figura 7. Comparación de las secuencias vejovina nativa y con la eliminación en el extremo amino terminal.

Figura 8. Alineamiento de hadrurina y variantes.

Figura 9. Alineamiento de vejovina, hadrurina y secuencia consenso.

Figura 10. Secuencia consenso y péptidos propuestos.

Figura 11. Cromatograma de la purificación por HPLC fase reversa y determinación del peso molecular por espectrometría de masas del péptido tres.

Figura 12. Ensayos de actividad antimicrobiana del péptido tres.

Figura 13. Secuencias parentales y nuevos derivados propuestos.

Figura 14. Secuencia 1, fragmentos derivados a partir de la misma (F1-F5), así como la secuencia 4 (P18K) y la modificación de la secuencia 4 (P18K3N).

Figura 15. Anfipaticidad de los péptidos.

Figura 16. Purificación del fragmento 1.

Figura 17. Purificación del fragmento 2.

Figura 18. Purificación del fragmento 3.

Figura 19. Purificación del fragmento 4.

Figura 20. Purificación del fragmento 5.

Figura 21. Purificación de la secuencia 4 y 4m.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	KCN	Cianuro de potasio
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cepas Modelo)	LB	Luria-Bertani medio de cultivo
BSA	Bovine Serum Albumine (Albumina de suero de bovino)	LPS	Lipopolisácaridos
CaCl₂	Cloruro de calcio	MDR	Multi-drug resistant (Actividad multirresistente)
CD	Circular Dicroism (Dicroísmo circular)	MIC	Minimum Inhibitory Concentration (Concentración Mínima Inhibitoria)
CMI	Concentración mínima inhibitoria	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
CMC	Carboximetilcelulosa	MRSA	Meticillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina)
COS 7	CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material	PAMs	Péptidos antimicrobianos (Antimicrobial peptides)
DHF	Dihidrofolato	PBP	Penicillin Binding Protein (Proteína de unión a penicilina)
DHP	Dihidropteroato	PBS	Amortiguador salino de fosfatos
DIPEA	Diisopropiletilamina	PC	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfolina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media	PM	Peso molecular
DMF	Dimetilformamida	RP-HPLC	Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa)
DO	Densidad óptica	rpm	Revoluciones por minuto
DTT	Ditiotreitól	SUV	Small Unilamellar Vesicles (Vesículas Unilamelares Pequeñas)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)	TFA	Ácido trifluoro acético
ESBL	Enterobacterias productoras de β -lactamasas de amplio espectro	TFE	Trifluoroetanol
FDA	Food and Drug Administration (Agencia de Alimentos y Medicamentos)	THF	Tetrahidrofolato
Fmoc	N-(9-fluorenil)metoxicarbonil	TR	Tiempo de retención
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio	UFC	Unidades formadoras de colonia
HBTU	Hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio	UV	Ultravioleta
HEK 293	Human Embryonic Kidney 293 cells	VRE	Vancomycin resistant <i>Enterococcus faecium</i> (<i>E. faecium</i> resistente a vancomicina)
HEPES	Ácido (N-2-hidroxietilo)-1-piperazinetansulfónico		
HOBT	N-hidroxibenzotriazol		
KCl	Cloruro de potasio		

1. RESUMEN

En los últimos 40 años hemos sido testigos de la escasa cantidad de nuevas clases de antibióticos aceptados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) para combatir infecciones bacterianas, que aunado al fenómeno emergente de la multiresistencia farmacológica requiere de novedosas estrategias para encontrar nuevos compuestos con una eficiente actividad antimicrobiana. Los péptidos antimicrobianos son un grupo diverso de moléculas que participan en la activación del sistema inmune de varios organismos. Debido a su amplio espectro, su actividad antimicrobicida efectiva y su particular modo de acción, los péptidos antimicrobianos (PAMs) tienen el potencial para desarrollar valiosos agentes antimicrobianos.

En el presente trabajo se estudiaron un grupo de trece péptidos sintéticos, diseñados a partir de las secuencias de los PAMs hadrurina y vejovina, aislados del veneno de los alacranes *Hadrurus gertschi* y *Vaejovis mexicanus*, respectivamente. Los análogos se sintetizaron químicamente por el método de Merrifield en fase sólida. Del total de los 13 derivados sintéticos, al menos cuatro (F1A, F1B, P18K y P18K3N) presentan una actividad antibiótica por debajo de 50 μM en cepas bacterianas multiresistentes de los géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Streptococcus* y *Salmonella*. De estos PAMs sintéticos se evaluó la actividad hemolítica, los cuáles lograron a 50 μM una hemólisis inferior al cuatro por ciento en todos los péptidos probados. Asimismo, se realizaron ensayos antiparasitarios, valorando el porcentaje de inhibición en la formación de oocitos en *P. berghei* y se determinó que estos cuatro péptidos sintéticos producían un porcentaje de inhibición >40% a 5 μM y >80% a 25 μM .

Por otra parte, se determinó la estructura helicoidal de los cuatro PAMs sintéticos F1A, F1B, P18K y P18K3N, además de los péptidos F2A, F2B, F3A y F3B mediante espectroscopía de dicroísmo circular. Los resultados revelaron bandas características de los péptidos con estructura α -helicoidal, dos bandas negativas a 222 y 208 nm y una positiva a 193 nm, lo que establece una estructura altamente conservada para los ocho péptidos sintéticos. Posteriormente, en aquellos péptidos con mayor actividad antimicrobiana y menor actividad hemolítica se midió el porcentaje de viabilidad celular en las líneas celulares COS 7 (24 h) y HEK 293 (24 y 48 h). Estos resultados no mostraron efectos citotóxicos con respecto al control, a excepción de la línea celular HEK 293 a 48 h, con una supervivencia >85% con 50 μM del péptido. Adicionalmente, como una forma de analizar la eficiencia de interacción de los péptidos a membranas procariotas y eucariotas, se midió la eficiencia de liberación del fluoróforo calceína de liposomas previamente cargados con éste. A manera de aproximación de una membrana procariota se emplearon liposomas compuestos por PC: PG en una proporción

molar 1:3 y para el sistema eucariota PC: Chl en una proporción molar 7:3. Se observó que en el sistema eucariota a 25 μ M se alcanza un porcentaje inferior al 33% de liberación, por el contrario en el modelo de membrana procariota para esta misma concentración hay una liberación de calceína >66% en todos los péptidos probados. Por lo anterior, se comprueba la preferencia de estos péptidos a membranas cargadas negativamente, como es el caso de las membranas de las bacterias y de los parásitos. Debido a los resultados obtenidos los péptidos F1A, F1B, P18K y P18K3N tienen el potencial para ser desarrollados como nuevos agentes antimicrobianos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Antibióticos

Desde un punto de vista médico, la historia de la humanidad podría ser analizada tomando como referencia la lucha contra las enfermedades infecciosas, ya que hasta principios del siglo XX éstas fueron la principal causa de muerte en el mundo. El ingreso en la práctica clínica de fármacos como las sulfas y la penicilina, durante las décadas de los 30' y 40' respectivamente, causó un sorprendente impacto en el tratamiento de dichas afecciones, disminuyendo de manera asombrosa su mortalidad. Después de la introducción exitosa de la penicilina, siguió una etapa de monitoreo intensivo de agentes antibacteriales, enfocados en la búsqueda de nuevos antibióticos que dió lugar al desarrollo de la estreptomycin, el cloramfenicol, la tetraciclina, la eritromicina, la rifampicina, la vancomicina y la cefalosporina entre los años 1940 y 1960 (Figura 1) [1].

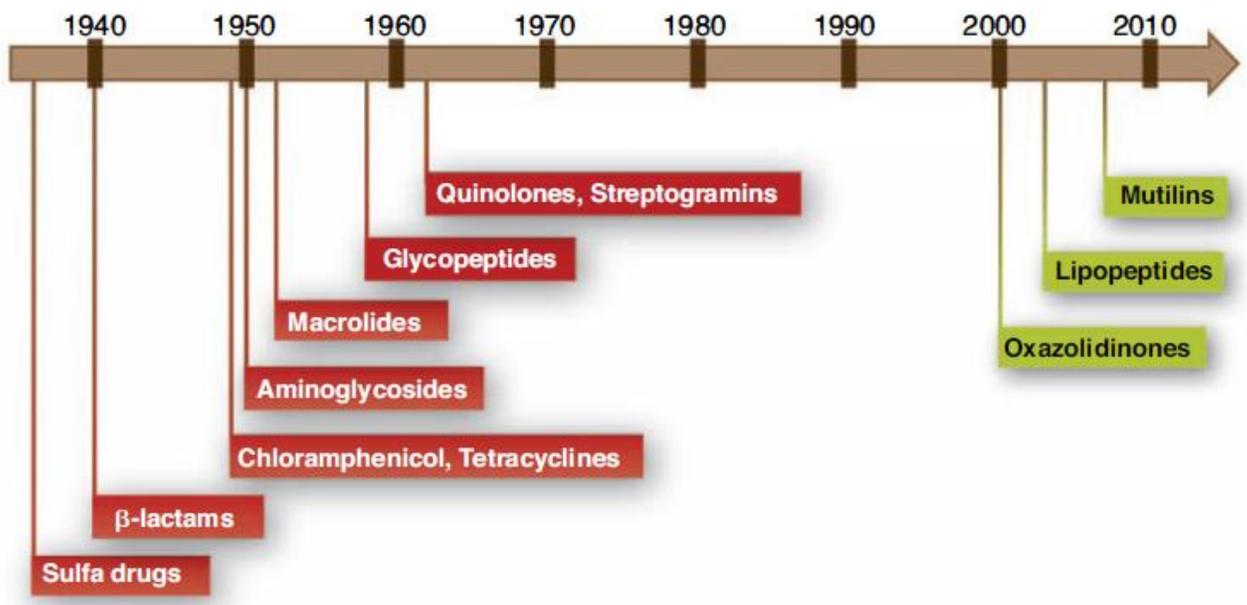


Figura 1. Surgimiento de los antibióticos a través del tiempo. Modificado de [2].

Al período en el cual los médicos no solamente previnieron, sino también controlaron de manera eficiente las infecciones bacterianas se le conoce como época de oro de los antibióticos.

En la actualidad, contrario a este optimismo, las enfermedades causadas por organismos patógenos son la tercera causa de muerte en países desarrollados, a nivel mundial [1].

Los antibióticos se encuentran entre los medicamentos que más se consumen en México, y representan el segundo lugar en ventas de farmacias a nivel nacional. Estudios conducidos en servicios de salud de nuestro país concluyen que alrededor del 70% de los pacientes con infecciones respiratorias y diarreicas agudas reciben recetas de antibióticos, justificándose su uso solamente en un 10 a 15% de los casos, ya que la mayoría de estas infecciones son causadas por virus y no por bacterias. De igual manera, entre 70% y 80% de las recomendaciones que los empleados de farmacias dan a sus clientes, incluyen antibióticos de forma inadecuada. Para destacar las consecuencias de este elevado consumo de antibióticos en el país, es importante mencionar que el mayor número de reportes de reacciones adversas a medicamentos (40%) en la población mexicana se atribuye al consumo excesivo e innecesario de antibióticos [3].

Los antibióticos, cuyo significado literal es “en contra de la vida”, son compuestos químicos producidos por actinomicetos, y otros hongos o bacterias que interfieren con alguna estructura o proceso bacteriano esencial sin ocasionar acción alguna o efectos mínimos a las concentraciones empleadas sobre células eucariotas del hospedero. Los antibióticos pueden ejercer uno de dos efectos sobre la bacteria: bacteriostático ó bactericida. Los agentes bacteriostáticos evitan el crecimiento de las células bacterianas (p. ej. cloramfenicol), mientras que los agentes bactericidas las exterminan (p. ej. penicilina). A pesar de que el término “antibiótico” fue introducido por Waksman en 1942 para denotar a las sustancias químicas producidas por microorganismos, modificaciones a la estructura química de productos naturales han dado lugar a una amplia variedad de agentes antibacteriales semisintéticos como los antibióticos β -lactámicos y los macrólidos (Figura 2), lo que distingue a los antibióticos de los agentes antibacteriales los cuáles son totalmente sintéticos [1].

(i) *Inhibidores de la biosíntesis de la pared celular bacteriana.* Dentro de este grupo se encuentran los antibióticos β -lactámicos o carbapenémicos, caracterizados por tener un anillo de cuatro miembros (anillo β -lactámico), y los glicopéptidos como la vancomicina.

(ii) *Inhibidores de la síntesis de proteínas.* Dentro de este grupo se encuentran los productos que bloquean selectivamente las subunidades del ribosoma bacteriano, los aminoglicósidos y tetraciclinas actúan sobre la subunidad 30S, mientras que en la subunidad 50S ejercen su efecto los macrólidos.

(iii) *Inhibidores de la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN).* Un ejemplo de este grupo lo representan las quinolonas ya que impiden la actividad ADN girasa o de la topoisomerasa.

(iv) *Inhibidores en la biosíntesis del ácido fólico, elemento esencial en el metabolismo de aminoácidos y purinas (indispensables para la biosíntesis de ácidos nucleicos).* Un ejemplo de este tipo de inhibidores son las sulfonamidas y la trimetoprima [4].

(v) Por último, podría mencionarse a los péptidos antimicrobianos que son responsables de interferir con la integridad de la membrana celular y de los que se hablará más adelante.

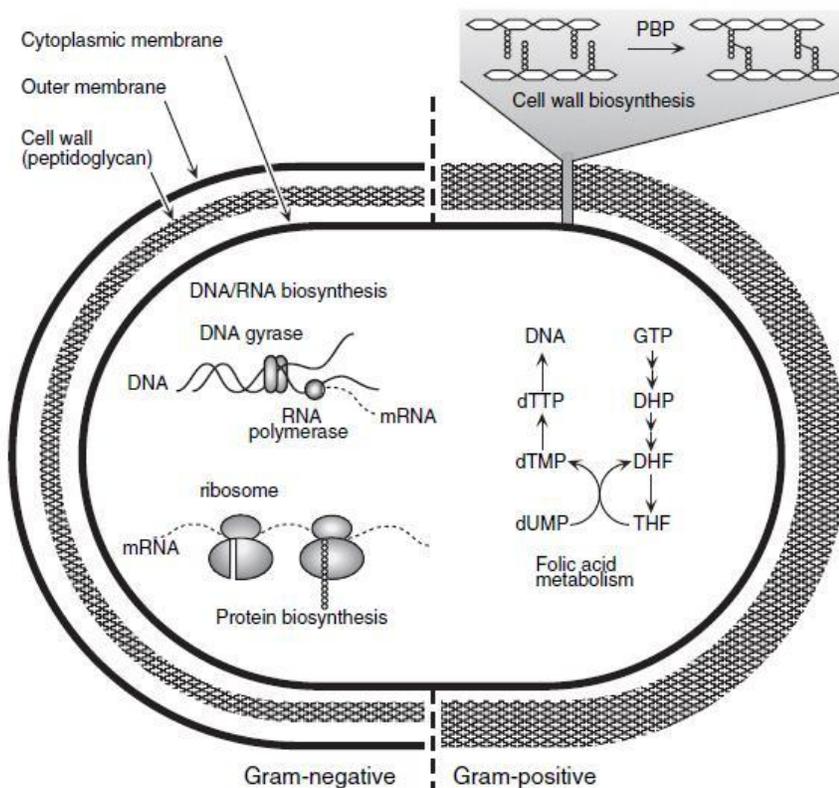


Figura 3. Principales blancos de acción de antibióticos. PBP=proteínas de unión a penicilina, DHP=dihidropteroato, DHF=dihidrofolato, THF=tetrahidrofolato [1].

2.3. Resistencia bacteriana a antibióticos

El abuso en el consumo de antibióticos y una mala administración en el tratamiento médico aunado a la fisiología y genética propia de las bacterias, ha traído como consecuencia el surgimiento de especies microbianas resistentes a esta clase de fármacos [6, 7]. Los principales organismos patógenos en los que se ha observado actividad multiresistente (MDR, del inglés multidrug resistant) son:

- *Staphylococcus aureus resistente a meticlina (MRSA)*: A pesar de la reciente introducción de agentes antibacteriales para el tratamiento de infecciones ocasionadas por MRSA es común enfrentarse a pacientes con enfermedad invasiva debido a este patógeno. Por lo que, nuevas clases de fármacos son necesarias ya que las existentes presentan toxicidad limitante, en especial en pacientes quirúrgicos de alto riesgo o en aquellos dependientes de diálisis. Desafortunadamente, estudios a la fecha aún no demuestran la eficacia para este tipo de antibióticos [8].
- *Enterococcus faecium resistente a vancomicina (VRE)*: Identificado como la tercera causa de infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo, el VRE continúa siendo un problema significativo de salud en los Estados Unidos de América (E. U. A.). Se ha reportado un incremento continuo en la frecuencia de resistencia a la vancomicina siendo de ~60% en el 2009. Pese a esta alta incidencia no hay información significativa que demuestre la eficacia de nuevos medicamentos, tales como linezolid, daptomicina y tigeciclina, en el tratamiento y tolerancia de estas infecciones [8].
- *Enterobacterias productoras de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL)*: Las infecciones ocasionadas por ESBL continúan incrementándose tanto en severidad como en frecuencia. El número de organismos y enzimas que presentan resistencia cruzada a diferentes clases de antimicrobianos está en aumento, ocasionando que sea más difícil elegir la terapia más indicada. Un meta-análisis realizado de 1996-2003 basado en 16 estudios demostró que las infecciones ocasionadas por ESBL están asociadas a un inicio tardío de una terapia eficaz [8].
- *Acinetobacter baumannii resistente a carbapenémicos*: La incidencia de infección causada por *A. baumannii* continúa aumentando a nivel mundial, estudios recientes obtenidos de pacientes de las unidades de cuidados intensivos de los E. U. A. han demostrado un incremento en la mortalidad del 26-68%, así como, un aumento de la morbilidad y duración de la estancia en estas unidades. Aunque, hay informes que reportan el uso de tigeciclina como un avance contra las infecciones causadas por este patógeno, en la actualidad no se pueden identificar compuestos candidatos eficaces para el tratamiento de *A. baumannii* multiresistente [8].
- *Pseudomonas aeruginosa multiresistente*: Las tasas de infección debido a *P. aeruginosa* están en constante aumento en el mundo, asimismo, se ha reportado incrementos en la

resistencia a carbapenémicos, quinolonas y recientemente a aminoglucósidos y polimixinas. Los pacientes en riesgo son aquellos en unidades de cuidados intensivos que dependen del respirador y personas con fibrosis quística. Hasta la fecha, no hay antimicrobianos en fase de desarrollo clínico en dirección a resolver el tema de resistencia a carbapenémicos o MDR que ofrezcan una menor toxicidad alternativa a las polimixinas [8].

En nuestro país, en un estudio descriptivo retrospectivo hecho en seis hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México se reportó que los géneros de bacterias Gram negativas resistentes a los antibióticos estaban representados por: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* y *Xanthomonas*. Los cuales presentaron mayor resistencia contra: amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, ceftazidima, cefalotina, ampicilina y trimetoprima-sulfametoxazol, principalmente. El mismo estudio reportó que los géneros Gram positivos más resistentes fueron: *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, los cuales presentaron resistencia contra: penicilina, ampicilina, eritromicina, gentamicina, cefalotina y ciprofloxacina. Respecto a la resistencia por grupo de antibióticos, los β -lactámicos y las cefalosporinas tuvieron el mayor número de cepas resistentes seguidas de los aminoglucósidos y las quinolonas [9].

Los mecanismos de resistencia antibiótica de mayor importancia se resumen en la Tabla 1. Este fenómeno puede ser descrito y caracterizado, ya sea de manera pasiva como resultado de mecanismos innatos preexistentes o activa mediante la adquisición de material genético.

Tabla 1. Mecanismos generales de resistencia a los antibióticos [10].

Mecanismo	Ejemplo(s)
Incremento en el flujo hacia el medio extracelular.	Tetraciclinas (ej. gen <i>tetA</i>). Quinolonas (ej. gen <i>norA</i>).
Disminución de la permeabilidad de la membrana externa de bacilos Gram negativos por cambio en canales proteicos.	β -lactamas (ej. genes <i>ompF</i> , <i>oprD</i>). Quinolonas (ej. gen <i>ompF</i>).
Disminución en el transporte membranal. Inactivación de la droga (reversible o irreversible).	Aminoglucósidos (decremento). β -lactamas (β -lactamasas). Aminoglucósidos (modificación enzimática). Cloramfenicol (inactivación enzimática).
Modificación del blanco de acción del antibiótico.	Quinolonas (modificación de girasas). Rifampicina (unión a ADN polimerasa). β -lactamas (cambios en gen PBP). Macrólidos (metilación ARNr).
Evitar el blanco de acción del antibiótico.	Glicopéptidos (genes <i>vanA</i> , <i>vanB</i>). Trimetoprima (cadenas deficientes en timidina).

La resistencia innata se caracteriza por la presencia de barreras fisiológicas tales como: la membrana externa de bacterias Gram negativas, la expresión de bombas de flujo hacia el exterior celular y mutaciones de los blancos de acción de los antibióticos [6].

Por otra parte, el proceso activo implica un cambio en el ADN bacteriano lo que da como resultado la aparición de nuevas características, como la adquisición de genes de resistencia a antibióticos [11]. Este tipo de resistencia puede ser adquirida de dos maneras: ya sea como resultado de adquisición de material extracromosomal por conjugación y recombinación homóloga integrándose al cromosoma o debido a procesos de intercambio genético por medio de:

- *Plásmidos*: Son elementos dispensables extracromosomales compuestos por una molécula de ADN circular de doble cadena. Algunos poseen el factor R, el cual contiene genes que codifican para uno o más mecanismos de resistencia a antibióticos. Tienen la capacidad de auto-replicarse y unos pocos tienen la habilidad de transferirse a otras especies bacterianas a través del proceso denominado conjugación, ocasionando brotes de actividad multirresistente. Una bacteria puede contener diferentes plásmidos [12].
- *Bacteriófagos*: En el proceso conocido como transducción, estas partículas virales son utilizadas como vehículo de transferencia de material genético de una bacteria a otra. Pueden contener genes de resistencia a antibióticos ya sean propios, adquiridos por transposición o a partir de una infección previa de un cromosoma bacteriano [12].
- *Transposones*: Conocidos también como elementos genéticos móviles, son segmentos de ADN capaces de insertarse por sí mismos en una nueva posición dentro de un plásmido, cromosoma o bacteriófago. Algunos de ellos pueden tener uno o varios genes que codifican para un mecanismo de resistencia a antibióticos [12].

Generalmente el fenómeno de resistencia no suele ser muy frecuente entre las bacterias (con una frecuencia de 1×10^{-6} a 1×10^{-9}), no obstante, cuando el microorganismo se encuentra expuesto a bajas concentraciones de antibiótico esta posibilidad se incrementa. Por ello, la importancia del uso prudente de antibióticos y de la responsabilidad por parte del paciente de adherirse en forma estricta a las recomendaciones del tratamiento, así como en la identificación del patógeno causante de la infección y de su patrón de susceptibilidad a diferentes antibióticos [13].

En los últimos 40 años hemos sido testigos de la escasa cantidad de nuevas clases de antibióticos aceptados para combatir las infecciones bacterianas, los cuáles son indicados para bacterias Gram positivas (lipopéptidos, oxazolidinonas y estreptograminas) y debido a la falta de nuevos antibióticos que puedan hacer frente a bacterias Gram negativas se requiere de nuevas estrategias para encontrar compuestos novedosos con amplia actividad antibiótica [14]. Para ilustrar lo anterior, sólo 10 nuevos antibióticos se han aprobado desde 1998, de los cuales dos son verdaderamente nuevos, estableciendo como agentes nuevos a aquellos con un blanco de

acción distinto, sin resistencia cruzada con otros antibióticos. En el año 2002, salieron al mercado 89 nuevos medicamentos, pero ninguno de ellos es de tipo antibiótico [15]. No obstante, una solución a la problemática anterior son los llamados “péptidos antimicrobianos”, ya que muestran un amplio espectro de acción y potente actividad en contra de bacterias resistentes a los antibióticos convencionales y debido a su particular modo de acción la resistencia bacteriana es limitada [16].

3. ANTECEDENTES

3.1 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son un grupo diverso de moléculas que se han identificado en casi todas las clases de organismos vivos (desde los organismos unicelulares, los insectos y otros invertebrados hasta los anfibios, las aves, los peces, las plantas y los mamíferos). Estos compuestos se consideran actores clave de la inmunidad innata ya que funcionan como un mecanismo de defensa del huésped contra la invasión de microorganismos patógenos. Los péptidos antimicrobianos son relativamente pequeños (5 a 50 aminoácidos), poseen una carga neta positiva (+2 a +9), dado que contienen arginina, lisina y/o residuos modificados (p. ej. los lantibióticos y polimixinas producidos por bacterias) [17, 18] y son anfipáticos ya que una vez plegados forman dos caras: una hidrofóbica compuesta por las cadenas laterales de los residuos apolares y otra hidrofílica formada por aminoácidos polares y residuos cargados positivamente [19].

Debido a la extrema diversidad en su estructura primaria y secundaria, la clasificación de los PAMs es un tanto arbitraria, ya que existen péptidos con secuencias similares pero con motivos estructurales diferentes. Aun así, los podemos clasificar en los siguientes grupos principales: (i) péptidos lineales que forman hélices anfipáticas e hidrofóbicas, (ii) péptidos cíclicos y de cadena abierta con uno o varios residuos de cisteína y (iii) péptidos ricos en ciertos aminoácidos como la arginina, la prolina o la histidina (Tabla 2) [20].

Tabla 2. Ejemplos de péptidos antimicrobianos de acuerdo a su clasificación general. Tomado de [21].

Péptidos lineales que forman hélices anfipáticas e hidrofóbicas		
<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Fuente</i>
Cecropina	RWKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVIGSAKI ⁺	Gusano de la seda (<i>Bombyx mori</i>)
Magainina 1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	Rana sudafricana (<i>Xenopus laevis</i>)
Melitina	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ ⁺	Abeja (<i>Apis mellifera</i>)
Péptidos cíclicos y de cadena abierta con uno o varios residuos de cisteína		
<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Fuente</i>
Tanatina	GSKKPVIYCNRRRTGKCQRM	Hemíptero (<i>Podisus maculiventris</i>)
Androctonina	RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY (1–4, 2–3)	Alacrán (<i>Androctonus australis</i>)
Defensina	GFGCLDQMQCHRHCQTITGRSGGYCSGPLKLTCTCYR (1–4, 2–5, 3–6)	Libélula (<i>Aeschna cyanea</i>)
Péptidos ricos en ciertos aminoácidos		
<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Fuente</i>
Histatina 1	DS [*] HEKRHHGYRRKFHEKHSHKKEFPFYGDYGSNYLYDN	Humano (<i>Homo sapiens</i>)
Indolicidina	ILPWKWPWWPWR ⁺	Buey (<i>Bos taurus</i>)
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF	Cerdo (<i>Sus scrofa</i>)

En el grupo de péptidos lineales helicoidales +=extremo carboxilo amidado. Para los péptidos que conforman el segundo grupo en paréntesis se indica los pares de residuos de cisteína. En el último grupo de péptidos *=fosfoserina, +=extremo carboxilo amidado.

3.2 Modificaciones postraduccionales de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos naturales muestran distintos tipos de modificaciones postraduccionales que pueden modificar su actividad de manera significativa. Las siguientes son algunas de las más frecuentes:

- **Glucosilación:** Se ha descrito para péptidos provenientes de insectos, se han caracterizado la secuencia de cinco de ellos: diptericina, drosocina, formaecina, lebecina y pirrocorrícina, todos con una alta composición de residuos de prolina. La principal modificación es O-glucosilación con cadenas cortas y heterogéneas de glicanos, principalmente N-acetil glucosamina y N-acetil galactosamina. Se cree que son necesarios para preservar su actividad antimicrobiana, a su vez que sirven de protección contra algunas proteasas.
- **Puentes disulfuro:** Es un motivo estructural relativamente común de los PAMs. Puede haber de uno a cinco puentes en una sola molécula, no se les ha asignado un efecto benéfico. Por el contrario, la reducción de puentes disulfuro en péptidos nativos o el

reemplazo de cisteínas en análogos sintéticos disminuye su actividad antimicrobiana en algunos casos, mientras que en otros hay pérdida completa del efecto microbicida.

- *Amidación*: Es una de las modificaciones más usuales entre los PAMs, ya que se encuentra ampliamente en diferentes clases de péptidos, como en: la melitina, la cecropina, la dermaseptina, el PGLa, la clavanina, el PR-39, la apidaecina, la diptericina, la profenina, la polifemusina y la penaidina. La reacción de amidación involucra una descarboxilación oxidativa que se lleva a cabo en dos pasos enzimáticos. La correlación entre la actividad biológica y la amidación aún no es clara.
- *Halogenación*: La bromación del anillo de indol del triptófano se ha descrito en algunos péptidos provenientes del pez bruja *Mixina glutinosa*. Asimismo, se ha reportado la cloración de la misgurina derivada del pez lobo del Japón *Misgurnus anguillicaudatus*, la cual se ha confirmado por espectrometría de masas. No es clara la función que desempeña la halogenación, mientras que para el primer ejemplo el espectro de acción aumenta, para el segundo es indistinguible la acción biológica de la forma halogenada de la no modificada.
- *D-aminoácidos*: En organismos eucariotas se ha descrito un péptido cuya secuencia está compuesta por D-aminoácidos. Este péptido es la bombinina derivada de la rana *Bombina variegata*. La presencia de estos residuos se atribuye a una reacción de epimerización del correspondiente L-aminoácido. Al comparar la actividad biológica de ambos isómeros no se observa una diferencia significativa [21].

3.3. Mecanismo de acción

A pesar de un amplio número de estudios realizados durante las últimas dos décadas, el mecanismo por el cual los PAMs interactúan con la membrana biológica aún no se ha esclarecido con precisión. No obstante, en los últimos años se ha sugerido que existen mecanismos alternos que permiten reconocer otro tipo de sitios blanco. Esto da lugar a dos clases funcionales de péptidos, los que actúan directamente sobre la membrana y aquellos que ejercen su acción antimicrobiana sin disociar la bicapa lipídica (Tabla 3). Independiente a esta clasificación, todos los PAMs deben interactuar con la membrana para llegar al sitio donde ejercerán su acción [22].

Debido a las diferencias estructurales en las dos clases principales de bacterias, el camino hacia la membrana plasmática es diferente, sin embargo, la interacción inicial se debe a la atracción electrostática entre la carga positiva del péptido con los componentes polianiónicos de la superficie exterior de la célula bacteriana. En las bacterias Gram positivas son los ácidos teicoico y lipoteicoico asociados a la pared celular, mientras que para Gram negativas son los

lipopolisacáridos. Posterior a este primer paso, los PAMs desplazan los cationes divalentes, tales como Ca^{+2} y Mg^{+2} , desestabilizando la membrana externa e iniciando su pase a través de la misma, a este proceso se le conoce como mecanismo de absorción auto-promovido [23].

Las interacciones con la membrana citoplasmática comienzan cuando el péptido antimicrobiano se asocia con los fosfolípidos de la misma. Este fenómeno no ocurre de manera homogénea sobre toda la unidad biológica sino que se localiza en ciertas regiones. Cuando la proporción de péptido/lípido es baja se une paralelamente a la bicapa lipídica, pero cuando esta relación incrementa el péptido se orienta de tal forma que se inserta en la membrana y forma poros [24, 25].

En la actualidad, no se sabe con seguridad como se lleva a cabo la formación de poros en la membrana, pese a ello se han propuestos varios modelos para explicar como ocurre este fenómeno. El modelo clásico es el llamado “modelo de barril” ó también llamado “paquete helicoidal” (ver Figura 4C), el cual propone que las caras hidrofóbicas de los péptidos anfipáticos se alinean con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos mientras que la superficie hidrofílica forma un canal que semeja las hojas de un barril. Este modelo requiere que el péptido sea lo suficientemente largo para atravesar el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica [26].

Un PAM prototipo que sigue este modelo es la alameticina, ya que a altas concentraciones forma canales estables. Gracias a diferentes estudios se ha observado que este canal se compone de 8 ó 9 monómeros α -helicoidales y cuenta con un diámetro $\sim 18\text{-}26 \text{ \AA}$, dependiendo de la composición lipídica y grado de hidratación del péptido. Esto concuerda con estudios realizados en membranas lipídicas en las que se determinó que el poro está formado de 8-10 monómeros. Sin embargo, para otros péptidos este modelo no se ajusta a la actividad biológica observada experimentalmente, por lo que se han propuesto otros modelos [27].

En el “modelo de poro toroidal” el péptido induce una abertura en la bicapa lipídica, debido a su interacción con las cabezas fosfolípidicas, dando lugar a una curvatura de manera continua (ver Figura 4B). Lo anterior es energéticamente favorable para el péptido, ya que aumenta la concentración en la interfase de la membrana y facilita la formación de un poro de tipo toroidal [27]. Este modelo se propuso por primera vez basándose en estudios realizados con la magainina, se ha estimado que el poro tiene un diámetro de $30\text{-}50 \text{ \AA}$ y que se requiere para su formación de 4-7 péptidos y 90 fosfolípidos. Para el caso de la melitina, el poro tiene un diámetro de $25\text{-}30 \text{ \AA}$, lo que está en concordancia con el tamaño de poro ($20\text{-}30 \text{ \AA}$) observado en ensayos con eritrocitos. La estructura modelo de poro toroidal contempla el hecho de que muchos PAMs son demasiado pequeños para abarcar en una conformación helicoidal el grosor de la membrana citoplasmática. Puesto que para una hélice α -helicoidal se requiere de ~ 22 aminoácidos para atravesar la bicapa lipídica cuya ancho típicamente es de $32\text{-}38 \text{ \AA}$ [26].

Un modelo conceptualmente diferente debido a la manera en la cual los PAMs disocian la membrana es el llamado “modelo de carpeta” (ver Figura 4D). En este modelo, los péptidos se acumulan paralelamente sobre la superficie de la membrana atraídos electrostáticamente por la carga aniónica de los fosfolípidos de la bicapa lipídica hasta llegar a un momento en el cual se deteriora la estructura de la misma produciendo una acción tipo detergente y dando lugar a la formación de micelas [25]. Este mecanismo fue propuesto por primera vez por Steiner y colaboradores basados en la observación de que a 50% de muerte celular cecropina A está en suficiente concentración para cubrir completamente la superficie de la célula bacteriana [26]. De manera similar, en el “modelo de agregado” (ver Figura 4A) los péptidos se reorientan para atravesar la membrana en forma de agregado, dando lugar a un complejo péptido-lípido tipo micela, pero sin adoptar una orientación en particular [25].

La actividad citotóxica exhibida por los péptidos antimicrobianos puede explicarse teniendo en consideración los efectos perjudiciales tras la desintegración de la bicapa lipídica. La formación de poros disipa el gradiente electroquímico ocasionando que las bacterias disminuyan su capacidad para producir ATP, se incremente la concentración de agua intracelular y el flujo iónico extracelular. Hay pérdida de constituyentes citoplásmicos, debido a un aumento de la permeabilidad celular, afectando la regulación osmótica e inhibiendo la respiración celular, lo que trae como consecuencia la muerte celular [25, 26].

Existen evidencias recientes que sugieren que la eficacia microbicida de algunos péptidos antimicrobianos no sólo se debe a su efecto biológico sobre la membrana, sino también a su capacidad de actuar sobre blancos intracelulares, ya sea después de ejercer su efecto biológico sobre la bicapa lipídica ó como una combinación de ambos (Tabla 3). Se ha propuesto que los PAMs tienen múltiples blancos de acción, un ejemplo de lo anterior es la indolicina, la cual interacciona con la topoisomerasa 1 (enzima de unión al ADN). A pesar de que péptidos como cecropina y magainina 2 se ha clasificado como péptidos que disocian la membrana, se ha observado para el primer caso que a concentraciones cercanas a la concentración mínima inhibitoria (CMI) influyen en la transcripción de varios genes en *E. coli*, mientras que en el segundo caso se ha demostrado la translocación del péptido hacia el medio intracelular. También se ha encontrado que LL-37 es capaz de influir en la expresión de genes en *P. aeruginosa* a concentraciones debajo de la CMI, a pesar de ser catalogado como un péptido que ejerce su acción microbicida a través de la membrana [23].

Entre los modelos alternos propuestos se encuentran la inhibición de la síntesis de proteínas específicas de membranas (atacinas, gloverinas), la interacción con componentes intracelulares que desencadenan respuestas relacionadas con el estrés, la interrupción durante la síntesis del ADN (PR-39), el rompimiento de la hebra sencilla del ADN (defensinas), la interacción con el ADN sin afectar su síntesis (buforina) o producción de peróxido de hidrógeno

[19]. A su vez, pueden desencadenar mecanismos de autodestrucción como apoptosis en células eucariotas o autólisis en blancos bacterianos. Del mismo modo, se sabe que inhiben enzimas producidas por organismos patógenos, ya sea uniéndose con una gran afinidad al sitio activo o bloqueando el paso del sustrato impidiendo la catálisis enzimática. Entre las actividades descritas para los PAMs se incluyen: quimiotaxis, liberación de histamina, entre otras [21].

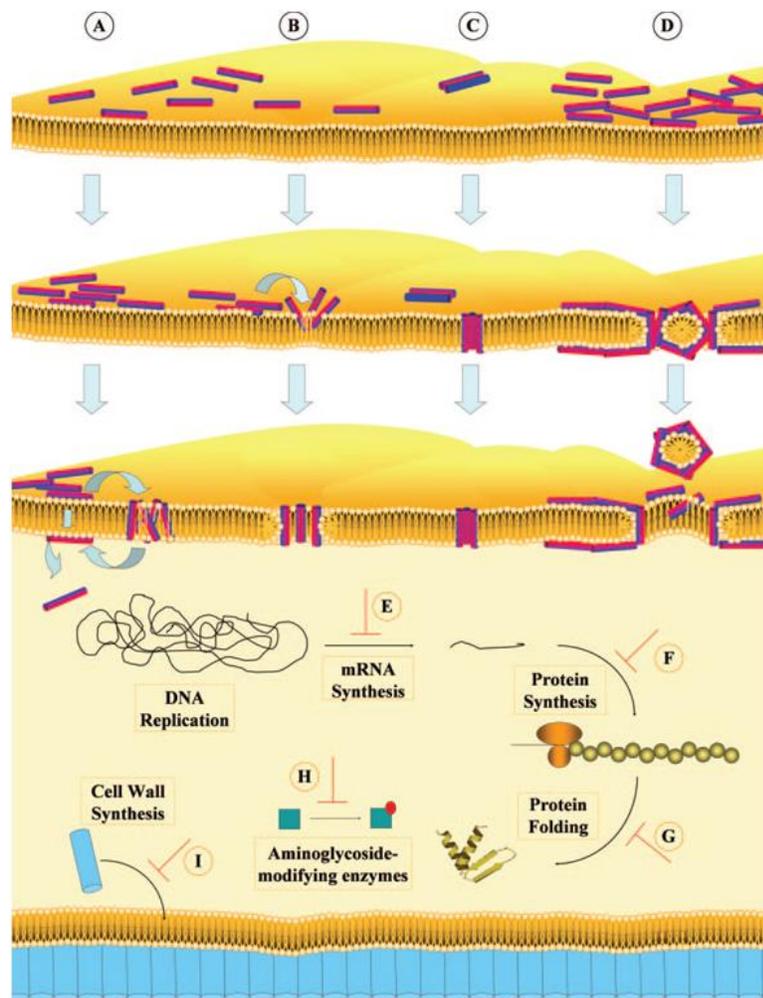


Figura 4. Mecanismos de acción de los PAMs. En la figura 4 en los paneles de la A a la D se esquematizan los modelos que explican el mecanismo por el cual ejercen su efecto los péptidos que penetran la membrana, mientras que en los paneles de la E a la I se muestran los mecanismos de acción de los péptidos que no actúan por permeabilización de la misma. Modificado de [19].

Tabla 3. Resumen de péptidos antimicrobianos y su mecanismo de acción [23].

Actividad putativa	Péptido	Mecanismo de acción
Péptidos que actúan directamente sobre la membrana.	Nisina.	Formador de canal; inhibición del lípido II y liberador de enzimas líticas de la pared celular.
	Alameticina.	Modelo de barril.
	Magainina 2.	Modelo poro toroidal.
	Cecropina.	Modelo de carpeta.
	Indolicidina.	Modelo de agregado.
	Buforin II.	Síntesis ADN.
	Indolicidina.	Síntesis ADN, división celular.
Péptidos cuya acción antimicrobiana se lleva a cabo sin disociar la bicapa lipídica.	PR-39.	Síntesis de proteínas, formación del septum celular.
	CP10A.	Síntesis de RNA, proteínas.
	Dermaseptina, HNP-1.	Síntesis de proteínas.
	Pirrocorricina, drosocina, apideacina.	Disrupción de la actividad DnaK (chaperona).
	Pep5.	Liberación de enzimas líticas de la pared celular.
	Mutacina 1140.	Lípido II.
	Microcina 25.	Formación del septum celular.

HNP=Péptido neutrófilo humano.

3.4. Resistencia microbiana a los péptidos antimicrobianos

El desarrollo de microorganismos resistentes a los PAMs es un evento poco probable. La amplia diversidad de péptidos antimicrobianos sugiere que éstos han evolucionado en respuesta a la co-evolución con el patógeno. La hipótesis más simple propone que cada péptido es específico, de tal suerte que la gama de péptidos producidos para hacer frente a una especie microbiana coincide con el espectro de acción de microorganismos a los que ataca, lo anterior está sujeto a cambios dentro de la comunidad microbiana. La adaptación de cada especie bacteriana proporciona un agente más del cambio, lo que implica que cada variante es eficaz o pierde su eficiencia por un proceso de evolución de la resistencia del patógeno [28].

Los mecanismos de resistencia bacteriana involucran: (i) la inactivación por una barrera de oligosacáridos, (ii) la inactivación por la membrana externa bacteriana, (iii) la proteólisis del péptido, (iv) la resistencia por alguno de los componentes de la membrana plasmática tales como composición lipídica, (v) la reducción de enlaces disulfuro y (vi) los sistemas de bombas de flujo intra y extracelulares [21]. Un ejemplo de ello es el sistema de flujo extracelular dependiente de energía, a través del cual los gonococos disminuyen la acción letal de la protegrina 1, el LL-37 y de otros más. Otro caso es el incremento en el contenido de fosfocolina en la pared celular de *Haemophilus influenzae* disminuyendo la susceptibilidad a LL-37. Así

como, la inactivación del operon *dlt*, el cual codifica para proteínas que son necesarias para la incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos de la pared celular, en *Staphylococcus aureus* confiriéndole resistencia a defensinas, protegrinas y otros péptidos antimicrobianos. Estos cambios disminuyen la susceptibilidad de la bacteria contra los péptidos catiónicos antimicrobianos. En el caso de pacientes con fibrosis cística, *P. aeruginosa* modifica el entorno de las vías respiratorias realizando cambios en la estructura de los lipopolisacáridos (LPS) que se encuentran unidos a la membrana externa. De igual modo, infecciones gastrointestinales en humanos ocasionadas por *Shigella* se asocian con la disminución de la expresión de LL-37 en células epiteliales. No obstante, cuando aparecen cepas mutantes resistentes hacia los PAMs hay otros mecanismos del sistema inmune que se activan para atenuar la respuesta y de esta forma controlar la infección bacteriana [29].

3.5. Distribución natural y actividad biológica de los péptidos antimicrobianos

Hasta enero del 2009 se habían caracterizado más de 1330 péptidos antimicrobianos naturales y sintéticos. En algunos casos se reportaron que las concentraciones mínimas inhibitorias de estos péptidos son menores a la de los antibióticos convencionales [18]. De la misma manera, los PAMs poseen una actividad antifúngica y dada la importancia de las enfermedades fúngicas propias de las plantas, no es de sorprenderse que algunos péptidos vegetales sean selectivos para hongos, al igual que ciertos péptidos de insectos (p. ej. Drosomicina). Pocos trabajos se han realizado para estudiar el espectro antimicótico de los PAMs y se sabe muy poco acerca de los mecanismos de acción específicos [30].

Otro aspecto que se ha definido pobremente es su actividad parasitaria, ya que sólo se cuenta con algunos reportes de péptidos seleccionados contra protozoos, incluidos los tripanosomas y los nematodos. A su vez, se ha descrito actividad contra células cancerígenas, aunque existe la duda si dichos péptidos tienen la selectividad necesaria para distinguir estas células malignas. Aunado a lo anterior, se ha descrito actividad antiviral para algunos péptidos, referido a defensinas, indolicidina, polifemusina y melitina, incluyendo el virus de la inmunodeficiencia humana, virus del herpes simple, virus de la influenza tipo A y virus de la estomatitis vesicular. Se cree que entre los mecanismos de acción involucrados se encuentran el bloqueo de la fusión virus-célula y actividad contra secuencias repetidas del ADN que rodean genes funcionales del VIH, conocidas como terminaciones repetidas largas [30]. Más allá de su acción antimicrobiana, estos péptidos claramente se han establecido como actores clave en los sistemas de defensa tanto de plantas como de animales [21].

En muchos casos, la función principal de los PAMs es la muerte de microorganismos invasores patógenos, sin embargo, se ha reconocido que pueden funcionar como moduladores de la respuesta inmune innata en los organismos superiores. La velocidad y la efectividad de este proceso es variable, tanto en las distintas ubicaciones dentro de un organismo como en entre los diferentes tipos de organismos [17].

La regulación de la expresión de los genes involucrados en la secreción de los PAMs está estrechamente controlada. Se expresan principalmente en aquellas zonas predispuestas a las reacciones de defensa del huésped, tales como: los tejidos epiteliales o las células inflamatorias. Algunos péptidos se producen constitutivamente, como es el caso de las β -defensinas humanas 1 (HBD-1) o las β -defensinas murinas 1 (MBD-1). En otros casos, la expresión se incrementa una vez que la célula entra en contacto con el producto microbiano o a través de mediadores pro-inflamatorios. Se ha demostrado que las defensinas humanas 2, 3 y 4 (HBD-2, HBD-3 y HBD-4), el LL-37, entre otros PAMs son inducidos *in vitro* por los productos bacterianos y los mediadores de la inflamación. En varios estudios se reporta un aumento en las concentraciones de β -defensinas en los fluidos corporales de pacientes que padecen enfermedades infecciosas o inflamatorias, tales como la neumonía o la fibrosis cística. De igual forma, las lesiones cutáneas inducen la liberación de catelicidina, el cual se activa en presencia de estreptococos del grupo A. Otro ejemplo, es el el sistema inmune de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) reconoce las diferentes clases de microorganismos y responde con la producción del espectro apropiado de antibióticos peptídicos. Una lista de propiedades generales de estos compuestos, incluyendo las propiedades de la estructura primaria y actividades antimicrobianas se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Ejemplos y propiedades generales de los péptidos antimicrobianos [31].

Organismo	Clase/subclase	Ejemplos	Principales propiedades estructurales	Actividad antimicrobiana
Bacteria del ácido láctico.	Bacteriocinas clase I y II.	Lantibióticos Clase I: nisina, mersacidina, no-lantibióticos. Clase II: pediocina, PA1, enterocina AS48.	Clase I: conformación catiónica. Clase II: Muy diverso. Hojas β o hélices α C terminales.	Rango nanomolar, actividad de amplio espectro, bacterias Gram positivas.
Otras bacterias (p. ej. <i>E. coli</i>).	Bacteriocinas.	Colicinas, microcinas.	Estructura globular rica en α hélices.	Rango nanomolar, actividad contra <i>Enterobacteriaceae</i> .

Hongos.	Defensinas.	Plectasina.	Ricos en cisteínas conteniendo 2 hojas β antiparalelas y una hélice α .	MIC: 1-35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para bacterias Gram positivas multirresistentes.
Plantas.	Defensinas.	Ib-AMP 1-4 y ciclótidos.	Ricos en cisteínas conteniendo hojas β antiparalelas y estructura cíclica con nudos de cisteína.	Rango micromolar antifúngico, anti-VIH, antiparasitaria.
Insectos/ Anfibios.	Péptidos catiónicos.	Cecropina A, melitina, magaininas, temporinas.	Alto contenido de residuos básicos, formación de α -hélices.	Rango micromolar contra bacterias multirresistentes.
Arácnida/ Vertebrados.	β -defensinas.	Toxinas tipo defensinas y β -defensinas.	Hojas β y puentes disulfuro formando horquillas.	Rango micromolar contra bacterias halófilas multirresistentes.
Mamíferos.	α , β y θ defensinas.	Defensinas neutrófilo humanas, defensinas epiteliales y entéricas.	Hojas β y puentes disulfuro formando horquillas.	Rango micromolar contra bacterias multirresistentes, hongos y virus.
Vertebrados superiores.	Catelicidinas.	LL-37-humana, PR-39 porcina, indolicidina bovina.	Secuencia tipo catelina líder con péptido anfipático catiónico.	Rango micromolar contra bacterias multirresistentes, hongos y virus.
Humanos.	Otros.	Lactoferricina y dominio antimicrobiano de lisozima.	Fragmentos catiónicos/aniónicos derivados de lactoferrina, caseína y lisozima.	Rango micromolar contra bacterias multirresistentes.

3.6. Péptidos antimicrobianos derivados de alacrán

Dentro de la clase Arachnida uno de los artrópodos venenosos más antiguos que se conocen son los alacranes [32]. Las condiciones naturales en las que este arácnido habita han propiciado la producción de veneno como un mecanismo de caza y defensa, el cual contiene sales inorgánicas, moléculas orgánicas y proteínas de bajo peso molecular [33]. Algunos de estos componentes tienen funciones neurotóxicas que actúan en una gran variedad de canales iónicos [34]. Sin embargo, recientemente se ha descrito que algunos péptidos cumplen con otras funciones. Para nosotros son de mayor interés aquellos que tienen actividad antibacteriana debido a su potencial terapéutico [35].

La primer molécula de este tipo que se aisló fue una defensina proveniente de la hemolinfa de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. La investigación continuó con el aislamiento de péptidos pertenecientes a las familias Buthidae, Scorpionidae, Ischnuridae y Luridae provenientes del veneno de escorpiones de Eurasia, de África y de América [36]. Posteriormente, se han obtenido péptidos con actividad antimicrobiana como las IsCTs 1 y 2 de *Opisthacanthus madagascariensis* con potente actividad contra bacterias Gram positivas [37]. En contraste, las opistoporinas 1 y 2 de *Opistophtalmus carinatus* presentan una marcada acción contra bacterias Gram negativas [38]. Por otra parte, a partir del veneno de *Pandinus imperator* se han identificado las pandininas 1 y 2 con actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [37]. Asimismo, se ha aislado el péptido denominado escorpina cuya secuencia de aminoácidos es única, ya que es similar a cecropinas en su extremo amino terminal y a defensinas en la región carboxilo terminal. Tiene una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1 μM en *Bacillus subtilis* y una CMI de 10 μM en *K. pneumoniae*[39].

En la continúa búsqueda de nuevos péptidos con propiedades microbicidas recientemente se han encontrado nuevas moléculas en los alacranes *Vaejovis mexicanus* y *Hadrurus gertschi*.

Del veneno de la primera especie se obtuvo la vejovina, que tiene 47 aminoácidos y un peso molecular de 4873 Da. Presenta una conformación anfipática característica de los péptidos antimicrobianos, una concentración mínima inhibitoria en las especies: *Escherichia coli* ATCC25922 (CMI 4.4 μM), *Escherichia coli* 170 (CMI 4.4 μM), *Escherichia coli* 4530 (CMI 4.4 μM), *Enterobacter cloacae* 2524 (CMI 4.4 μM), *Pseudomona aeruginosa* 4677 (CMI 17.7 μM), *Pseudomona aeruginosa* 5106 (CMI 17.7 μM), *Klebsiella pneumoniae* 913 (CMI 17.7 μM) y *Klebsiella pneumoniae* 1625 (CMI 17.7 μM) [40].

A partir del veneno de la segunda especie se aisló la hadrurina con un peso molecular de 4436 Da. Posee 41 aminoácidos, de los cuáles los residuos Lys-Arg-Lys están agrupados como un triplete y como característica remarcable es la ausencia de cisteínas. Inhibe el crecimiento de las cepas *Escherichia coli* ATCC25926, *Serratia marscesces* ATCC13880 y *Enterobacter cloacae* 129 a una concentración <10 μM . Mientras que para *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumonia* se requirió mayor cantidad de péptido (40 μM) para un efecto inhibitorio completo [41]. Los péptidos naturales anteriormente descritos son potencialmente útiles para el desarrollo de agentes con acción antibacteriana. Por lo anterior, el diseño de análogos sintéticos de estos péptidos mediante modificaciones químicas estructurales podría mejorar la actividad biológica deseada.

Estas propiedades combinadas con la amplia gama de actividades y el tiempo de contacto requerido para inducir muerte han llevado a considerar a los PAMs como excelentes candidatos para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Por lo tanto, comprender los

mecanismos de acción permitirá desarrollar estrategias para descubrir nuevos agentes farmacológicos [42].

3.7. Desarrollo de los péptidos antimicrobianos como potenciales fármacos antimicrobianos

La clase mejor estudiada de los PAMs son los péptidos catiónicos helicoidales debido a que poseen la mayor actividad antibiótica. Se han desarrollado diferentes propuestas para generar péptidos con alta actividad antimicrobiana y baja actividad hemolítica. Un planteamiento consiste en analizar secuencias de péptidos naturales para descubrir aquellas regiones que están relacionadas con la citotoxicidad y de esta manera sintetizar péptidos análogos que tengan estas regiones y sean capaces de actuar como péptidos microbianos más efectivos. La segunda metodología emplea bibliotecas combinatorias para desarrollar nuevos derivados de esta clase de péptidos. El tercer método consiste en estudiar sistemáticamente las propiedades estructurales de los péptidos y su función en la interacción con la membrana biológica [43].

Entre los parámetros fisicoquímicos que participan de manera importante en la actividad biológica se encuentran: la helicidad, el momento hidrofóbico, la hidrofobicidad, el ángulo polar, la carga y el número de aminoácidos.

El motivo de unión a membrana para los PAMs es una estructura α -helicoidal. Se sabe que ciertos aminoácidos favorecen la conformación helicoidal (p. ej. Alanina), al contrario otros residuos como la prolina la desestabilizan. De esta forma, los primeros estudios dirigidos a mejorar la actividad antimicrobiana se basaron en la sustitución de aminoácidos para aumentar el carácter helicoidal del péptido. Un ejemplo de ello, es el caso de melitina, en donde la sustitución de glicina por leucina en el extremo amino terminal incremento la helicidad y mejoró notablemente la eficacia del péptido. Por el contrario, sustituciones que impiden el plegamiento en una conformación helicoidal resultan en pérdida de la actividad biológica. Del mismo modo, la incorporación de prolina en el extremo amino terminal de cecropina A y cecropina P1 reducen la actividad microbicida [43].

El momento hidrofóbico (μ) es un análisis cuantitativo de la anfipaticidad del péptido y se ha definido como la suma vectorial de la hidrofobicidad de los aminoácidos individuales. Originalmente este concepto se desarrolló para estudiar el plegamiento de proteínas, pero puede aplicarse para predecir la actividad membranal de los péptidos helicoidales. Sin embargo, obtener una correlación directa entre la actividad y el momento hidrofóbico es difícil por dos factores: (i) en muchos péptidos, tales como la melitina, los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos no se encuentran distribuidos regularmente y por ende hay regiones con un alto o bajo

momento hidrofóbico. (ii) El cálculo de este parámetro se realiza sobre la base de una hélice ideal, pero la helicidad de los péptidos unidos a la membrana es a menudo menor a 100%. Un ejemplo ideal es la magainina, en donde se observó que las regiones con el mayor grado de hidrofobicidad y estabilidad helicoidal son las responsables de la actividad antibiótica. No obstante, el problema surge cuando hay cambios simultáneos de la anfipaticidad como resultado de modificaciones en la secuencia. En contraste, la reducción gradual del momento hidrofóbico en la melitina por sustituciones de lisina en el extremo amino terminal de la hélice condujo a una pérdida de la actividad antimicrobiana y hemolítica. Estudios realizados con un fragmento del extremo C-terminal de melitina mostraron que rearrreglos menores en la secuencia correlacionaron con un incremento del momento hidrofóbico resultaron en un incremento considerable de la actividad antibiótica. Estudios adicionales con péptidos modelo del tipo KLAL reveló que el momento hidrofóbico tiene una participación menor en la permeabilización de membranas lipídicas aniónicas (procariotas), pero influyen sustancialmente sobre membranas cuya composición lipídica es neutra (eucariotas) [43].

La hidrofobicidad (H) del péptido refleja la capacidad intrínseca para pasar de un medio acuoso a otro apolar. Además de las interacciones hidrofóbicas, fuerzas como las transiciones conformacionales y las interacciones de van der Waals son de importancia en la partición de los PAMs en la bicapa lipídica. Sin embargo, con respecto a este parámetro un péptido debe cumplir dos requerimientos: (i) tiene que ser soluble en agua para poder ser almacenado en altas concentraciones, transportarse al sitio blanco y (ii) al mismo tiempo permeabilizar la membrana biológica. Sin embargo, un alto grado de hidrofobicidad da lugar a fenómenos como la auto-asociación o precipitación del péptido en agua. Por el contrario, un péptido con baja hidrofobicidad tiene baja afinidad lipídica [43]. Para estudiar la importancia de la anfipaticidad se ha realizado la síntesis *de novo* de secuencias con residuos hidrofóbicos alternando con aminoácidos cargados positivamente, en donde un alto grado de hidrofobicidad se ha correlacionado con una mayor actividad citotóxica contra las membranas eucariotas [29]. Por otra parte, se han diseñado péptidos en los que se ha cambiado leucina por alanina en diferentes posiciones de la secuencia permitiendo incrementar gradualmente la naturaleza hidrofóbica del péptido. Aquellos análogos en los que se sustituyó alanina por leucina aumentaron la hidrofobicidad y se incrementó la desestabilización de la estructura alfa helicoidal. Además, la actividad antimicrobiana disminuye cuando la hidrofobicidad es alta [44]. Varios estudios con péptidos modelo indicaron que no existe una fuerte correlación entre hidrofobicidad y actividad antibacteriana. Al parecer hay una relación más directa entre actividad hemolítica e hidrofobicidad [43].

La unión del péptido a la membrana implica la inserción de la cara hidrofóbica de la hélice en la región hidrocarbonada de los lípidos, mientras que los grupos hidrofílicos están en contacto con el medio acuoso. De lo anterior se espera que el tamaño relativo de las superficies

hidrófoba/hidrófila esté relacionado con la perturbación de la membrana y la estructura de los poros transmembranales. Un parámetro simple que se emplea para expresar la distribución anfipática del péptido es el ángulo formado por las caras hidrófoba/hidrófila de la hélice o ángulo polar (Φ). Brasseur y cols., sugirieron una clasificación de los PAMs de acuerdo al ángulo polar, en base a lo anterior estos péptidos pueden agruparse de la siguiente manera: (i) aquellos con un ángulo hidrofílico pequeño y un alto grado de hidrofobicidad, los cuáles tienden a formar poros transmembranales y (ii) péptidos con una distribución hidrofóba/hidrófila equivalente orientándose de manera paralela sobre la superficie de la membrana. Igualmente, se han analizado análogos del péptido híbrido cecropina-mellitina utilizando como sustituyentes residuos de lisina con la finalidad de aumentar la distribución anfipática mediante el incremento del carácter catiónico de la α -hélice teniendo como consecuencia una disminución en el porcentaje hemolítico obtenido [45]. A su vez, se amplió la actividad microbicida de péptidos con una secuencia rica en alanina y lisina tanto para microorganismos Gram negativos (CMI de 4 μ M a $>64 \mu$ M) como para Gram positivos (CMI de $<0.25 \mu$ M a $>64 \mu$ M) sumado a una escasa o nula actividad contra eritrocitos [46]. Los datos experimentales disponibles en la actualidad para los PAMs sugieren que estos en su mayoría están situados paralelamente a la superficie de la membrana, independientemente del ángulo formado por las caras hidrófila/hidrófoba. Sin embargo, estos hallazgos no excluyen la posibilidad de que una pequeña fracción del péptido unido esté involucrada en la formación de poros transmembranales.

La cationicidad (Z) es una propiedad que se ha mantenido constante ya que es esencial para la atracción electrostática inicial con los componentes electronegativos de la membrana microbiana, se ha determinado el rango óptimo el cual se encuentra entre +2 y +9 [43, 47]. Existe un amplio número de reportes que describen diversas estrategias para tratar de mejorar el efecto antimicrobiano que ejercen los péptidos con estructura α -helicoidal, entre éstas se encuentran la síntesis de análogos de ascaphina-8 en los que se incrementó el carácter catiónico haciendo sustituciones puntuales sobre la cara hidrofílica de la hélice por residuos de L-lisina. De los derivados obtenidos las sustituciones de Ala¹⁰→Lys, Val¹⁴→Lys y Leu¹⁸→Lys dieron lugar a una acción bactericida comparable a la del péptido nativo aunado a una menor actividad hemolítica (LD₅₀ $>500 \mu$ M) [48]. En otro estudio se toma como base al péptido XT-7 en el que se sustituyó la glicina de la posición 4 por lisina, obteniendo un análogo con mayor potencia contra microorganismos (CMI $\leq 25 \mu$ M) y reducida actividad contra eritrocitos (LD₅₀ $>500 \mu$ M) [49]. Asimismo, se ha utilizado temporina 1-RDa para sintetizar moléculas en las que las sustituciones de treonina en la posición 5 y el residuo 8 de asparagina por D-lisina incrementaron la actividad microbicida (8-32 μ M) con una apreciable disminución sobre la hemólisis (LD₅₀ $>500 \mu$ M) en comparación con el templado [50]. La correlación entre la actividad biológica y la carga no es tan simple como se podría esperar, ya que cuanto mayor carácter catiónico tenga el péptido, mayor será su unión a la membrana bacteriana, sin embargo, la formación de poros transmembrana se inhibe [43].

Con respecto al número de aminoácidos, se han sintetizado recientemente péptidos en los que se redujo su secuencia hasta 12 residuos y en los que se reporta una potencia y espectro antimicrobiano razonables [51, 47]. Puesto que todas estas características estructurales están fuertemente relacionadas entre sí, es difícil predecir la actividad antimicrobiana o citotóxica de una secuencia de aminoácidos [52]. En general, los péptidos con una alta carga positiva, un momento hidrofóbico alto y con un ángulo hidrofóbico pequeño son atraídos con mayor fuerza hacia membranas microbianas, presentan baja toxicidad y una preferencia por el mecanismo de acción de tipo carpeta. Por el contrario, los péptidos con una baja carga positiva, un momento anfipático pequeño y una alta hidrofobicidad intrínseca revelan una alta actividad hacia membranas tanto de procariontas como de eucariotas y una preferencia a formar estructuras en forma de barril.

Los péptidos antimicrobianos de origen natural parecen ser candidatos prometedores contra los patógenos resistentes por su alta especificidad y bajo o nulo desarrollo de resistencia microbiana. Su utilidad clínica está limitada por problemas de degradación enzimática, biodisponibilidad, y el costo de producción. Así, los derivados sintéticos que poseen características estructurales similares, pero que contienen aminoácidos artificiales pueden proporcionar la solución. Del mismo modo, una alternativa atractiva a este problema es el diseño de péptidos antimicrobianos con secuencias cortas [53].

Por lo anterior, péptidos antimicrobianos sintéticos han surgido recientemente como candidatos prometedores contra patógenos multiresistentes a antibióticos. Se ha realizado el diseño de un nuevo hexapéptido, Orn-D-Trp-D-Phe-Ile-D-Phe-His-(1-Bzl)-NH₂, asimismo se sintetizó su derivado ciclizado para estudiar la correlación entre las estructuras lineales y cíclicas y sus respectivas actividades a los antimicrobianos. El péptido sintético mostró actividad contra *Candida albicans* y bacterias Gram positivas, tales como *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* resistente a meticilina, del mismo modo en la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, los valores de CMI para las estructuras más potentes estuvieron en el rango de 1 a 5 µg/mL (los valores IC₅₀ en el rango de 0.02 a 2 µg/mL) [53].

3.8. Aplicaciones clínicas y futuras perspectivas

Los péptidos antimicrobianos están involucrados en la respuesta local a la infección. De hecho, los primeros ensayos clínicos se han dirigido a infecciones tópicas. La empresa Magainin Pharmaceuticals ha llevado su variante de magainina (MSI-78) a la fase III de ensayos clínicos con 926 pacientes en dos estudios de eficacia contra las infecciones polimicrobianas indicada para úlceras del pie diabético. Recientemente se anunció

(<http://www.pslgroup.com/dg/2168e.htm>) que estos ensayos demostraron la equivalencia a la ofloxacina por vía oral, pero con menos efectos secundarios. Otras dos compañías farmacéuticas se encuentran en la fase I de los ensayos clínicos. Intra Biotics está utilizando el péptido derivado de protegrina (IB-367) contra las úlceras orales polimicrobianas (mucositis oral) en pacientes con cáncer, y la empresa Applied Microbiology ha puesto en marcha un ensayo en colaboración con Astra para probar la eficacia del péptido bacteriano de tipo antibiótico nisina contra úlceras estomacales ocasionadas por *Helicobacter pylori* (<http://www.businesswire.com/cnn/ambi.htm>) [54]. A continuación se dan ejemplos representativos de péptidos que se encuentran en ensayos preclínicos o clínicos:

- Plectasina (Novozymes) es un péptido tipo defensina que muestra una buena actividad microbicida contra bacterias resistentes a los antibióticos responsables de enfermedades como la neumonía. A diferencia de otros PAMs clínicamente probados, la plectasina parece ser tolerado en dosis altas y muestra eficacia en el tratamiento de infecciones sistémicas. El desarrollo de la plectasina como agente terapéutico está en la fase preclínica con la previsión de que un producto sea aprobado para uso clínico dentro 8 a 10 años.
- P-113 (Dermegen) es un fragmento de 12 aminoácidos derivado de histatina-5 con actividad anti-candida comparable a la formulación comercial. Este péptido se encuentra en ensayos clínicos de fase I-II y se utiliza como enjuague bucal para el tratamiento de la placa bucal y gingivitis. Los datos obtenidos de un modelo experimental en humanos muestra que P-113 es activo contra la gingivitis y la placa.
- MBI-226 (Migenix) es un análogo de la indolicidina está en fase III de ensayos clínicos. Será utilizado para el tratamiento de infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con cateterismo.
- MX-594AN (Migenix) es un péptido antimicrobiano catiónico en desarrollo que se ha formulado como un tratamiento tópico contra el acné de leve a moderado. MX-594AN está en ensayos clínicos y parece ser eficaz frente a todo tipo de lesiones provocadas por el acné. El Migenix también ha desarrollado MX-594AN bajo el nombre CLS001, que es probado para el tratamiento tópico de la rosácea. Los ensayos de fase II se completaron en el 2007.

No obstante, las limitaciones potenciales de la aplicación útil de los péptidos antimicrobianos son las siguientes: (i) los altos costos de fabricación, (ii) vida media corta, (iii) pérdida de actividad en condiciones fisiológicas, (iv) problemas de aplicación, (v) reacciones sistémicas no deseadas (la aparición de fenómenos de agregación reduce aun más la vida media o inmunoreactividad) y (vi) la interferencia con bacterias de la flora normal que puedan surgir al intentar utilizar los péptidos como agentes antibacterianos. Además, sigue habiendo una serie de cuestiones sin resolver a considerar: (i) aún no están disponibles técnicas estandarizadas

para evaluar la actividad de estos péptidos; (ii) asimismo, los mecanismos moleculares de regulación génica no están bien definidos, ya que el conocimiento detallado de como se regulan permitiría crear fármacos que modulan directamente la expresión de los PAMs para mejorar la condición específica de la enfermedad. (iii) Es necesario abordar la tolerancia y problemas de toxicidad de estos péptidos, en especial de las interacciones con los componentes aniónicos de las células del huésped (debido al carácter catiónico de los mismos). (iv) Por último, la comprensión de la función y expresión de los PAMs tanto en la salud como en la enfermedad sigue siendo un área difícil en la investigación [55]. Un fármaco peptídico ideal sería uno que pudiera ser tolerado en dosis altas, fuera resistente a la degradación, adecuado para la aplicación tópica y con un buen índice terapéutico. Entendiendo como índice terapéutico a la relación entre la actividad citotóxica del péptido con la concentración mínima inhibitoria requerida para un cultivo microbiano. Entre mayor sea el valor numérico de esta relación, mayor será su probabilidad de que pueda emplearse como agente antibiótico potencial. En conclusión, es necesario generar mayores bases teóricas y metodológicas para el uso de estos péptidos como prototipos de fármacos innovadores.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido al aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales, la búsqueda de nuevas moléculas provenientes de fuentes naturales con actividad microbicida efectiva se ha vuelto una primera necesidad. Puesto que los péptidos antimicrobianos tienen una actividad eficiente en contra de organismos patógenos, el diseño de nuevos derivados de este tipo tiene el potencial para desarrollar valiosos agentes antimicrobianos.

5. HIPÓTESIS

Dado que los parámetros fisicoquímicos claves en la actividad antimicrobiana involucran: la helicidad, el momento hidrofóbico, la hidrofobicidad, el ángulo polar, la carga y el número de aminoácidos; entonces el diseño de nuevos derivados que cuenten con mejores características estructurales que los péptidos antimicrobianos naturales nos permitirá obtener péptidos sintéticos con mayor eficacia microbicida y menor actividad citotóxica.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Diseñar péptidos antimicrobianos, basados en la secuencia de aminoácidos de los péptidos hadrurina y vejovina, con un mejor índice terapéutico que los péptidos parentales.

6.2. Objetivos Particulares

1. Diseñar péptidos con posible actividad antimicrobiana.
2. Sintetizar químicamente y purificar los péptidos diseñados.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos en cepas modelo de bacterias Gram positivas y Gram negativas y posteriormente delimitar la concentración mínima inhibitoria en bacterias multirresistentes a los antibióticos ya conocidos.
4. Determinar la actividad hemolítica de los nuevos péptidos sintéticos.
5. Obtener la estructura secundaria de los mismos empleando espectroscopía de dicroísmo circular.
6. Evaluar la actividad citotóxica de los péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana en líneas celulares derivadas de epitelio.
7. Establecer la influencia de la composición lipídica en la actividad biológica de los péptidos sintéticos empleando liposomas unilamelares pequeños.

7. METODOLOGÍA

7.1. Diseño de los péptidos antimicrobianos

Para realizar el diseño de los péptidos antimicrobianos se emplearon dos grupos distintos de herramientas informáticas. En el primer grupo se usaron los servidores: ProtParam Tool [56] y HeliQuest [57]. Los parámetros calculados por ProtParam incluyen: el peso molecular teórico, el punto isoeléctrico, la composición de aminoácidos, el coeficiente de vida media, el índice de inestabilidad, el índice alifáticos y GRAVY (acrónimo del inglés grand average of hydropathicity, promedio total de hidrofobicidad). Mientras que en HeliQuest a partir de una secuencia dada se genera la proyección de Edmundson-Schiffer, así como sus propiedades fisicoquímicas.

El segundo grupo consiste en una serie de servidores que predicen la estructura secundaria. La predicción de la estructura de las proteínas es la predicción o cálculo de la estructura tridimensional de una proteína desde su secuencia de aminoácidos, es decir, la predicción de sus estructuras secundaria y terciaria desde su estructura primaria. Existen dos estrategias básicas para aproximarse a la predicción de la estructura: (i) la predicción *de novo*, en la que se suelen utilizar métodos estocásticos; y (ii) la predicción por comparación, en la que se recurre a una biblioteca de estructuras previamente conocidas. Los PAMS se analizaron en los siguientes programas: CFFSP [58,59], GOR IV [60], HNN [61], Porter [62], ProfPredictor [63], PsiPred [64] y SOPMA [65].

7.2. Síntesis química y purificación de los péptidos

Los péptidos se sintetizaron por el método de Merrifield de síntesis química en fase sólida (Figura 5) [66], empleando el grupo Fmoc (N-(9-fluorenil)metoxycarbonil) para proteger el grupo amino terminal de los L-aminoácidos. Para llevar a cabo la síntesis se utilizó Rink Amide Resin MBHA (Nova Biochem [67], 0.54 mol/g de resina) como soporte sólido. La activación del extremo carboxilo de los Fmoc-L-aminoácidos se realizó con HBTU (Hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio, PM=379.3 g/mol), HOBT (N-hidroxibenzotriazol, PM=135.12 g/mol), DIPEA (Diisopropiletilamina, PM=129.25 g/mol, $d=0.742$) para la formación del enlace peptídico correspondiente. En aquellos casos en que el acoplamiento no se llevó a cabo exitosamente, se sustituyó HBTU por HATU (Hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, PM=380.2 g/mol) en la misma relación molar. La proporción de los reactivos empleados en la síntesis fue 1:0.9:0.9:1.5 de Fmoc-L-aminoácido:HBTU:HOBT:DIPEA, respectivamente. Se utilizó el doble de equivalentes de reactivo

con respecto a los de la resina. La eliminación del grupo protector del extremo amino terminal de los Fmoc-L-aminoácidos acoplados (desprotección), se realizó a través de un lavado de la resina haciendo uso de una solución de piperidina al 20% en DMF (Dimetilformamida) durante 20 min. El monitoreo de cada uno de los ciclos de acoplamiento y desprotección de los L-aminoácidos se llevó a cabo a través de la reacción con ninhidrina. Ésta prueba, mejor conocida como prueba de Kaiser, permite detectar la presencia de grupos amino libres y consiste en añadir 15 μ L de cada una de las siguientes soluciones: (i) 5 g de ninhidrina (2,2-dihidroxiindano-1,3-diona, PM=178.14 g/mol) en 100 mL de etanol, (ii) 80 g de fenol (PM=94.11 g/mol) en 20 mL de etanol y (iii) 2 mL de una solución 0.001 M de KCN (cianuro de potasio, PM=65.12 g/mol) a 98 mL de piridina. Ésta mezcla se agrega a una alícuota de la resina a probar y se calienta de 3 a 5 min a 120°C. La presencia de grupos aminos libres se detecta cuando la resina presenta un color azul-violáceo, por el contrario cuando hay ausencia de éstos la resina es amarilla o incolora [68].

La liberación de los péptidos de la resina se consiguió gracias al empleo de una solución llamada reactivo K compuesta por: 84% de TFA (ácido trifluoro acético, PM=114.02 g/mol, $d=1.489$), 5% de fenol, 5% de tioanisol (PM=124.2 g/mol, $d=1.058$), 1% de DTT (ditiotreitól, PM=154.25 g/mol) y 5% de agua. Se agregaron 10 mL del reactivo K al reactor de síntesis por cada 100 a 150 mg de resina y se dejó en agitación constante durante 1 h. Transcurrido el tiempo de reacción ésta solución se agregó gota a gota en 40 mL de metil-*t*-butil éter a 0°C, una vez que termino de gotear, se hicieron 2 a 3 lavados con 1 mL de TFA. Para asegurar la completa precipitación del péptido liberado se dejó reposar de 30 min a 1 h en metil-*t*-butil éter a 0°C. Posteriormente, se centrifugó 10 min a 3000 rpm. La fase etérea se transfirió a un matraz y el precipitado se lavó 2 veces más con 40 mL de metil-*t*-butil éter. El producto resultante se recuperó con 1 a 2 mL de H₂O tetradestilada y se liofilizó para estudios posteriores o almacenamiento.

Los péptidos se purificaron por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) en una columna C₁₈ analítica (5x250 mm) empleando un gradiente lineal de 0 a 60% de solvente B en 60 min (solvente A: 0.12% de TFA en agua, solvente B: 0.10% de TFA en acetonitrilo). El cromatograma se registró a una longitud de onda de 230 nm. El equipo que se utilizó fue un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters que cuenta con una bomba de gradiente Waters600E, un sistema de suministro multisolvente con un controlador 600, un detector de absorbancia de luz ultravioleta (UV) Waters2487 Dual λ y un graficador BECKMAN 427.

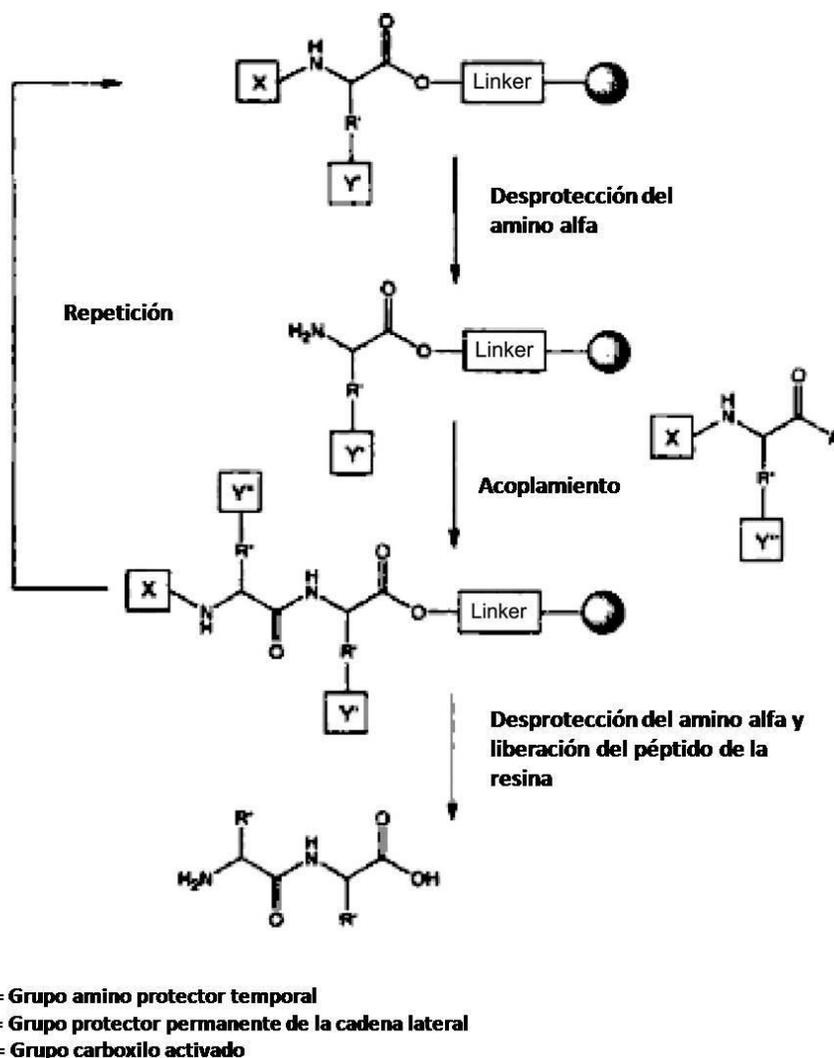


Figura 5. Mecanismo de la síntesis química de péptidos por el método de Merrifield en fase sólida [69].

7.3. Determinación de la masa molecular

La determinación de las masas moleculares de los componentes se realizó utilizando el espectrómetro de masas LCQ^{Duo} de la compañía Thermo Electron/Finningan (San José CA, USA).

7.4. Cuantificación de proteína

La cuantificación de los péptidos sintéticos purificados se determinó empleando el espectrofotómetro BECKMAN DU-50 Spectrophotometer, a través de una celda de cuarzo de 1 cm de ancho y midiendo los valores de absorbancia en tres longitudes de onda diferente: 205 nm, 215 nm y 225 nm. Para saber la concentración de los péptidos sintéticos se aplicaron las fórmulas que se describen a continuación:

Concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$)= $\text{Abs}_{205 \text{ nm}} \times 31$

Concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$)= $(\text{Abs}_{215 \text{ nm}} - \text{Abs}_{225 \text{ nm}}) \times 144$ [70]

7.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó en las cepas modelo *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC29213 a través del método de Kirby-Bauer. El método de difusión en agar se emplea para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico. Para llevarlo a cabo fue necesario preparar placas de Petri con 25 mL de medio de cultivo Müller-Hinton agar a una concentración de 39 g/L, asegurándose que el grosor del medio de cultivo sea de 4 mm. Como control de esterilidad se incubaron las placas por un período de 24 h y si no se utilizan el mismo día se deben guardar en refrigeración de 2 a 8°C por no más de 7 días. Para la preparación del inóculo se tomó una muestra de colonias bacterianas a probar previamente sembradas en medio agar LB (Luria-Bertani) y se descargó la alícuota tomada en un tubo que contiene una solución de NaCl 0.8%. Se midió la absorbancia a 625 nm. Un valor de absorbancia de 0.08 a 0.130 es igual a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. Se tomó una muestra de la solución anterior con un hisopo estéril y se estrío en las placas con medio Müller-Hinton, esta operación se repitió para cada placa. Se colocaron alícuotas de 3 μL a diferentes concentraciones de una solución de la molécula sobre el agar previamente sembrado. Las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ de 16 a 18 h. El ensayo se realizó por duplicado. El efecto antimicrobiano se detectó por el halo de inhibición de crecimiento bacteriano en el lugar donde se colocaron las muestras [71].

7.6. Ensayos de concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó utilizando el método de microdilución en placa. El método se llevó a cabo utilizando una placa de 96 pozos. En cada uno de ellos se colocaron 90 μL de medio de cultivo Müller-Hinton caldo, 5 μL de la concentración del

componente con actividad antimicrobiana a probar y 5 μL de la bacteria a una concentración de 5×10^5 UFC/mL (volumen final por pozo 100 μL). Como control negativo se utilizaron 100 μL de medio de cultivo y como control positivo 95 μL de medio de cultivo más 5 μL de bacteria. El ensayo se realizó por duplicado. La placa se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ de 16 a 19 h. La concentración mínima a la cual el componente inhibe el crecimiento bacteriano se observó en la placa, en comparación con los controles positivo y negativo [72].

7.7. Evaluación de la actividad antiparasitaria

En la determinación de la actividad antiparasitaria se emplearon ratones machos con 6 semanas de edad de la cepa Balb/c inoculados intraperitonealmente con 200 μL de fenilhidrazina (6 mg/mL en 9% de NaCl; 60 mg/kg de peso) para inducir la producción de reticulocitos. Tres días después, se inocularon intraperitonealmente con $\sim 1 \times 10^8$ eritrocitos infectados con *Plasmodium berghei*, en el tercer y cuarto día post-infección se inocularon intraperitonealmente con 200 μL de pirimetamina (1 mg/mL) en PBS-Tween 20 (Tween 20 μL /mL de PBS; 10 mg/kg de peso). Se prepararon extendidos a partir de una gota de sangre de la cola de ratón tras 24 y 48 h después del tratamiento con metamina para asegurar parasitemia y gametocitemia y se tiñeron con Giemsa.

Para la evaluación de los péptidos se usaron ratones con una gametocitemia de $\sim 5\%$. El cultivo de oocinetos se realizó en placa de 96 pozos, en cada uno de ellos se colocaron 20 μL de la sangre del ratón elegido, 2.5 μL y 12.5 μL del péptido en 100 μL de medio de cultivo RPMI pH 8.3 para dar una concentración final de 5 μM y 25 μM respectivamente. Posteriormente, se incubó de $20\text{-}21^\circ\text{C}$ durante 24 h. Transcurrido este tiempo se revisaron los cultivos en el microscopio óptico y una vez que se observaron oocinetos en el control se realizaron extendidos (siguiendo el procedimiento anterior) tomando una alícuota de 1 μL por cultivo. A continuación, se contó el número de oocinetos con ayuda del microscopio. El porcentaje de inhibición parasitaria se calculó con base al número de oocinetos del control (sin péptido) en comparación con los cultivos experimentales [73].

7.8. Determinación de la actividad hemolítica

Se tomó una muestra de sangre y se lavó con 10 mL de amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4 Se centrifugó a 2600 rpm durante 5 min y se desechó el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces más. De esta forma se eliminó el plasma sanguíneo, glóbulos blancos y plaquetas. Se

preparó una solución al 0.5% de eritrocitos en PBS, de la cual se tomaron 195 μL añadiendo 5 μL de las diferentes concentraciones del compuesto a probar. Para calcular el 100% de hemólisis, se añadió 5 μL de una solución 1% de Tritón X-100 en 195 μL de la solución al 0.5% de eritrocitos y como control negativo se agregaron 5 μL de H_2O a 195 μL de la solución al 0.5% de eritrocitos. Se incubaron a 37°C durante 1 h. A continuación, la muestra se centrifugó a 900 g durante 2 min y la absorbancia del sobrenadante se determinó a 541 nm utilizando el espectrofotómetro Beckman [41].

7.9 Determinación de la estructura secundaria

La caracterización conformacional de los péptidos se realizó a través de la técnica de espectroscopía de dicroísmo circular (CD). Para poder usar esta técnica las muestras deben ser ópticamente activas (quirales), es decir, no disponer de un plano de simetría y no ser superponibles con su imagen especular, se utiliza como fuente luz polarizada (UV-VIS). La señal medida en CD es la diferencia entre las absorbancias (A) de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda (l) y hacia la derecha (r):

$$\text{CD} = A(r) - A(l)$$

Teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer, esta diferencia de absorbancias se puede expresar como:

$$\Delta A(\lambda) = A_L(\lambda) - A_R(\lambda) = [\epsilon_L(\lambda) - \epsilon_R(\lambda)] \cdot l \cdot c = \Delta\epsilon \cdot l \cdot c,$$

Donde, c es la concentración molar del soluto quiral, ϵ es el coeficiente de extinción molar y l la longitud de la celda por la cual pasa el haz de luz.

Cuando los vectores de las componentes circulares izquierda y derecha se encuentran en la misma dirección, la suma de sus magnitudes proporciona el eje semimayor de la elipse, y cuando están en direcciones opuestas, la diferencia de sus magnitudes proporciona el eje semimenor de la elipse. El CD se define mediante la relación entre el eje semimayor y semimenor. Esta relación es la tangente del ángulo θ , conocido como elipticidad.

Las lecturas de espectroscopía de CD se llevaron a cabo empleando un espectropolarímetro JASCO J-720 (JASCO PTC-423S) a 25°C . El espectro de absorción se obtuvo en el rango de 190-260 nm y usando una velocidad de exploración de 20 nm/min. Las muestras en solución se colocaron en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. La temperatura del compartimento de la muestra se mantuvo constante mediante un baño de agua. Los experimentos de CD se realizaron por triplicado [74].

7.10. Ensayos de viabilidad celular

El ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en la producción de formazán (un compuesto color azul), que permite así determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 [75] y fue modificado, en 1986, por Francois Denizot y Rita Lang [76].

Para llevar a cabo el ensayo de viabilidad celular fue necesario conocer el número de células a emplear por pozo, por lo que se realizó un primer ensayo con células sin la sustancia a analizar y se midió su densidad óptica (DO). El valor de absorbancia igual a la unidad es el número de células que se emplearon para los ensayos de viabilidad celular en presencia de los péptidos sintéticos. En este caso, para la línea celular HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293 cells) fueron 50 000 células, mientras que para COS 7 (CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material) se usaron 5 000 células por pozo.

El método se llevó a cabo utilizando una placa de 96 pozos. En cada uno de ellos se colocaron 90 μ L de medio de cultivo DMEM, 10 μ L de la concentración del componente con la actividad a probar. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 h para permitir que la sustancia actúe en todas las células en caso de que su acción sea sobre una fase específica del ciclo celular. Se añadió 20 μ L de MTT en solución tampón libre de calcio y magnesio. Se incubó por 4 h a 37°C y 5% de CO₂. Se realizó la lectura de la densidad óptica (DO) en el lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 492 nm. El porcentaje de viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{DO células tratadas} \times 100) / \text{DO células control}$$

Cada ensayo se realizó por triplicado, con controles negativos (solvente) y células no tratadas las cuales deben dar una lectura de DO mayor ó igual a 1.

7.11 Determinación de la liberación de calceína

En las pruebas de liberación de calceína se emplearon vesículas unilamelares pequeñas (SUVs, *small unilamellar vesicles*) cargadas con una concentración de 80 mM de calceína según Wieprecht y cols. [77]. Los lípidos empleados se adquirieron de la compañía Avanti Polar Lipids Inc., para las vesículas de tipo eucariota fueron 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina aislada de huevo (PC de huevo PM=770.123 g/mol) y colesterol (PM=386.654 g/mol) en una proporción 7:3 (mol: mol). Para las vesículas de tipo procariota fueron 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina aislada de huevo (PC de huevo PM=770.123 g/mol, Avanti Polar Lipids Inc.) y 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfo-*rac*-(1-glicerol) sal de amonio (PM=766.04 g/mol) en una

proporción 1:3 (mol: mol). Acorde con la metodología mencionada anteriormente, 325 μ moles de lípido se disolvieron en cloroformo y se secaron bajo atmósfera de nitrógeno para posteriormente dejarlos al vacío a 25°C durante 12 h, en seguida, se añadió 325 μ L del amortiguador 10 mM HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico), 150 mM KCl, a pH 7.4 y 16.1 mg de calceína (PM = 622.54 g/mol) y se mezcló por 10 min (vortex). Para la preparación de SUVs la dispersión lipídica se sonicó tres veces por dos min con intervalos de 5 min de reposo en hielo. Una vez formada una solución lipídica translúcida se llevó a cabo una separación por filtración en gel empleando una columna Sephadex G75 (13x20 mm) en donde el eluyente fue 10 mM HEPES, 150 mM KCl a pH 7.4. Una alícuota de la fracción correspondiente a las vesículas (25-35 μ L dependiendo de la densidad a la que se consiguió recuperar los liposomas) se agregó a una celda, la cual contenía 900 μ L de una solución 10 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM CaCl₂ a pH 7.4 con agitación suave y constante a una temperatura de 25°C. Para determinar el aumento en la señal de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 490$ nm y $\lambda_{\text{emisión}} = 520$ nm) se agregó de 1.56-50 μ L del péptido dependiendo de la concentración deseada (rango de concentración 0.09-25 μ M) y se registró la fluorescencia en función del tiempo en el espectrómetro de fluorescencia de la compañía SIM-AMINCO (Spectronic Instruments) modelo AMINCO Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer [78].

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Diseño de los péptidos sintéticos

La secuencia de los péptidos vejovina y hadrurina, aislados del veneno de los alacranes *V. mexicanus* y *H. gertschi* respectivamente, se eligieron como planteados para el desarrollo de nuevos análogos, debido a su actividad antibacteriana. Para el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos primero se realizó un alineamiento de las secuencias parentales a través del programa FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta/index.html>) y la base de datos SwissProt (Figura 6). El análisis comparativo de las secuencias nativas nos permite saber aquellos aminoácidos que están conservados en ambos péptidos y por tanto pudieran ser importantes para conservar la actividad antimicrobiana de los mismos.

Péptido	Secuencia	% de identidad
Vejovina	G-IWSS IKNLASKAWNS DIGQSLRNKAAGAINKF VADKIGVT PSQAAS	100
Hadrurina	G-ILDT IKSIASKV WNSKTVQDLKRRG---IN-W VANKLGVSP -QAA-	59
Opistoporina2	GKVWDW IKSTAKKLW NSEPVKELKNTALNAAKNF VAEKIGATPS ----	50
Opistoporina1	GKVWDW IKSTAKKLW NSEPVKELKNTALNAAKNL VAEKIGATPS ----	48
Pandinina1	GKVWDW IKSAAKKIWS SEPVSQLKGQVLNAAKNY VAEKIGATPT ----	39

Figura 6. Alineamiento de secuencias de PAMs. En la figura se muestra la similitud de la secuencia de hadrurina y vejovina con otros péptidos de la misma familia. El alineamiento se realizó utilizando el servidor Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Los aminoácidos resaltados son los residuos conservados, los guiones se utilizaron para conservar el alineamiento de acuerdo a la secuencia consenso.

A partir de los datos obtenidos podemos observar que el mayor porcentaje de similitud se encuentra en los extremos amino y carboxilo de las secuencias templado (Figura 6). Posteriormente, se realizó un análisis comparativo de aquellas secuencias pertenecientes a la misma familia de péptidos que poseen un alto porcentaje de similitud con respecto a los PAMs naturales vejovina y hadrurina para determinar la importancia que estos aminoácidos tienen en la actividad biológica.

Esta información coincide con trabajos previos realizados con vejovina, en donde se determinó que la eliminación de los primeros ocho aminoácidos de la secuencia (G1 a N8) suprimen la actividad biológica del péptido. Lo anterior se debe a que la modificación en la secuencia altera la proporción de la superficie hidrofóbica/hidrófila lo que modifica la

conformación helicoidal de la molécula (Figura 7), repercutiendo en la acción del péptido sobre la membrana, dando como resultado la pérdida de la actividad antibacteriana.

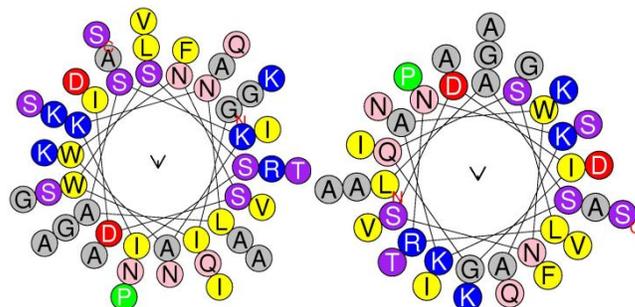


Figura 7. Comparación de las secuencias vejovina nativa y con la eliminación en el extremo amino terminal. La imagen de la izquierda es una proyección helicoidal de la secuencia de vejovina sin cambio alguno, mientras que a la derecha se muestra la secuencia sin los primeros ocho aminoácidos (G1-N8).

Otro dato importante a considerar en el diseño de los nuevos derivados son las modificaciones químicas realizadas en las variantes de la hadrurina (Figura 8) dando lugar a dos mutantes sintéticas. Los cambios fueron la sustitución del aspártico de la posición cuatro por lisina para incrementar la carga positiva del péptido, aunado al cambio de triptófano 14 y 34 por alanina para el primer análogo y fenilalanina en el segundo caso para disminuir el grado de hidrofobicidad de la molécula. Por último, la sustitución de lisina 33 por alanina conserva la anfipaticidad de la molécula. En conjunto, las modificaciones descritas anteriormente incrementan tanto la actividad antibiótica como la selectividad hacia células procariontas [79].

Hadrurina	GILDT	IKSIA	SKVWN	SKTVQ	DLKRR	GINWV	ANKLG	VSPQA	A
Hadrurina A/W	GILKT	IKSIA	SKVAN	SKTVQ	KLKRR	GINAV	ANALG	VSPQA	A
Hadrurina K/D	GILKT	IKSIA	SKVFN	SKTVQ	KLKRR	GINFV	ANALG	VSPQA	A

Figura 8. Alineamiento de hadrurina y variantes. Se presenta la comparación de secuencias entre hadrurina y las dos variantes sintéticas. En la primera variante designada como A/W se cambiaron todos los residuos de triptófano por alanina, mientras que para el segundo caso (variante K/D) triptófano se reemplazo por fenilalanina y para ambos análogos sintéticos se sustituyo aspártico por lisina y lisina 33 por alanina.

Entre las estrategias aplicadas para mejorar la función de los PAMs se encuentran la creación de bibliotecas combinatorias de péptidos, cuya ventaja principal es el elevado número de variantes que se llegan a obtener. Sin embargo, esta metodología sufre de limitaciones técnicas y

financieras ya que se deben probar la actividad antibiótica y citotóxica de los compuestos. Durante la última década se han hecho esfuerzos para desarrollar métodos de simulación computacional para diseñar nuevos péptidos antimicrobianos, no obstante, en algunos casos los resultados teóricos no concuerdan con los valores experimentales. Otra alternativa que se ha empleado es la modificación de secuencias a través de sustituciones, deleciones e hibridación de secuencias de diferentes péptidos. Esto último, permite la determinación de los dominios que son importantes en la modulación de la actividad y puede resultar en análogos con una mayor eficacia que los péptidos parentales. [80, 81] Tomando en cuenta esta última estrategia, así como, los trabajos previos realizados hasta el momento en la vejovina y la hadrurina se construyó la secuencia consenso (Figura 9).

```

Vejovina          GIWSS IKNLA SKAWN SDIGQ SLRNK AAGAI NKFVA DKIGV TPSQAAS
Hadrurina A/W    GILKT IKSIA SKVAN SKTVQ KLRK  ---G-I N-AVA NALGV SP-QAA-
Consenso        GI--- IK-IA SK-AN  S---Q -L--K ---G-I N--VA -KLGV -P-QAA-
  
```

Figura 9. Alineamiento de vejovina, hadrurina y secuencia consenso. Se presenta la secuencia consenso a partir del alineamiento de la secuencia de vejovina y hadrurina. Se resaltan los aminoácidos conservados de las secuencias parentales.

A partir de la secuencia consenso se realizó un análisis estructural de la misma con la finalidad de mejorar los parámetros característicos de los péptidos antimicrobianos, tales como: carga neta, hidrofobicidad y anfipaticidad. Se propusieron cuatro derivados (Figura 10), cada uno de los cuáles se analizó empleando los programas descritos en metodología sección 6.1. En la Tabla 5 se encuentra un resumen de los datos obtenidos de este análisis. Puesto que diversos estudios sugieren que la hidrofobicidad es uno de los principales parámetros que influyen en la actividad antimicrobiana, ya que es un factor importante para promover la interacción hidrofóbica con la bicapa lipídica [82], además, se ha observado que al reducir el tamaño de secuencia en algunos péptidos antimicrobianos se obtienen secuencias que poseen mayor potencia que los parentales [83]. De las secuencias propuestas se eligió el péptido 3 (Figura 10), ya que posee una baja hidrofobicidad (0.246), un buen momento hidrofóbico (0.349), una carga positiva (+2) y una secuencia de 19 aminoácidos.

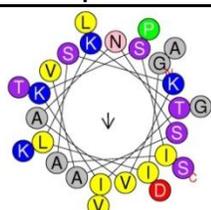
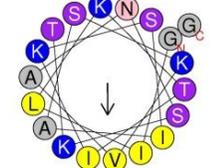
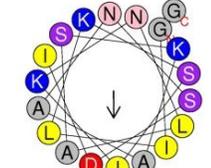
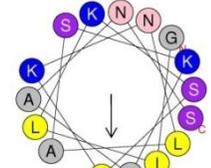
```

Consenso  GI--- IK-IA SK-AN S---Q -L--K --G-I N--VA -KLGV -P-QA A-
Péptido 1  GILKT IKSIA SKVAN S---- - - - - - --AVA DKLGV TPS
Péptido 2  GILKT IKSIA SKVAN S---- - - - - - - - - - -KTG
Péptido 3  GILKS IKNLA SKAAN S---- - - - - - - - - - -D-IG
Péptido 4  GILKS IKNLA SKAAN S

```

Figura 10. Secuencia consenso y péptidos propuestos. En la figura se muestra tanto la secuencia consenso como la de los péptidos propuestos.

Tabla 5. Resultado del análisis de los parámetros fisicoquímicos de los derivados propuestos.

Péptido	Secuencia	No. de aa	H	μH	Z	Anfipaticidad
1	GILKTIKSIASKVANSAVADKLGVTPS	27	0.350	0.217	+3	
2	GILKTIKSIASKVANSKTG	19	0.252	0.409	+4	
3	GILKSIKNLASKAANSDIG	19	0.246	0.349	+2	
4	GILKSIKNLASKAANS	16	0.227	0.519	+3	

Nota: H=hidrofobicidad, μH=momento hidrofóbico, Z=carga neta.

8.2. Síntesis química y purificación

La resina empleada como soporte sólido para la síntesis del análogo tres da lugar a péptidos con el extremo carboxilo terminal amidado. Una vez finalizada esta etapa, se procedió a purificar el producto crudo de reacción de la síntesis química siguiendo la Metodología Sección 6.2. En la figura 11 panel A se muestra el cromatograma de la purificación en HPLC fase reversa del

péptido tres, en el que se observa un pico mayoritario con un tiempo de retención aproximado de 39 min, este pico se colectó y se confirmó su peso molecular por espectrometría de masas, el cual corresponde con el peso molecular esperado (Figura 11B). El rendimiento total de la síntesis fue de 45%.

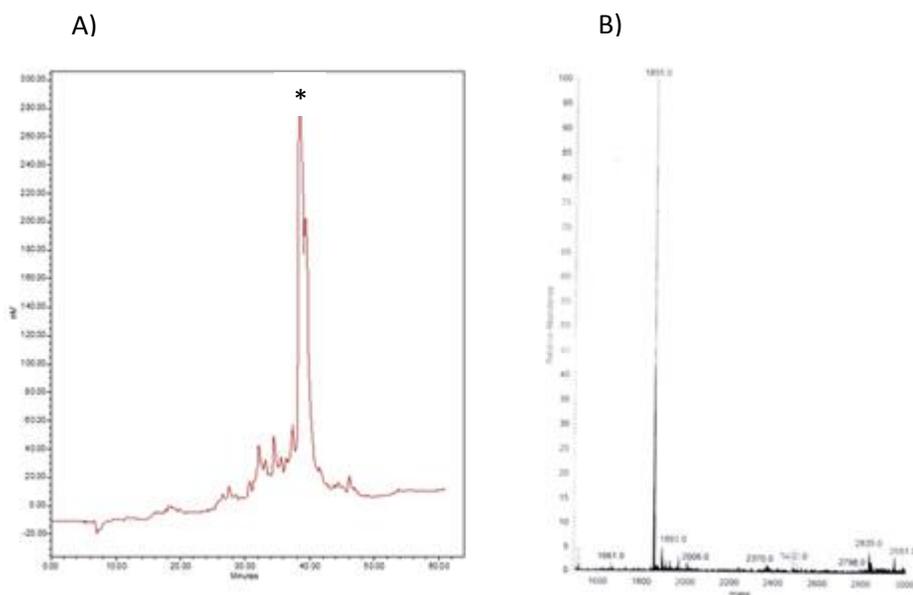


Figura 11. Cromatograma de la purificación por HPLC fase reversa y determinación del peso molecular por espectrometría de masas del péptido tres. En el panel A se muestra el cromatograma de la purificación por RP-HPLC de 0-60% B en 60 min. Se puede observar un pico mayoritario indicado con asterisco, el cual corresponde al peso molecular esperado para el análogo tres (1855 Da), el espectro de masas obtenido se muestra en el panel B.

La cuantificación del péptido se realizó acorde a lo descrito en la metodología sección 6.3 y de esta forma se obtuvo la cantidad de péptido necesaria para poder realizar los ensayos de actividad antimicrobiana.

8.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Los ensayos de la actividad biológica se realizaron en el Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI), adscrito al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) ubicado en Cuernavaca, Morelos. Las pruebas de inhibición del crecimiento bacteriano se realizaron como se describe en la parte de metodología sección 6.2 y los resultados se muestran en la Figura 12.

E. coli ATCC25922

S. aureus ATCC29213



Figura 12. Ensayos de actividad antimicrobiana del péptido tres. En la figura se muestra que no hubo inhibición del crecimiento bacteriano probando el péptido tres a 1, 3 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un volumen final de 3 μL . El blanco es H_2O estéril (3 μL). Las cepas utilizadas son *E. coli* ATCC25922 y *S. aureus* ATCC29213. El ensayo se realizó por duplicado.

En la Figura 12 se puede observar que el péptido tres no muestra actividad biológica, debido a esto se revisaron nuevamente las características del péptido tres encontrando dos puntos débiles: (i) la carga positiva neta está en el límite inferior recomendado y (ii) en la cara apolar de la superficie helicoidal se encuentra un residuo cargado negativamente. Por diversos estudios realizados en distintos PAMs se ha demostrado que la reducción de la carga neta disminuye la actividad microbicida [84]. En este sentido, se sabe que la carga neta positiva, así como la localización de la misma puede modular la especificidad y eficacia antimicrobianas. Por lo anterior, la presencia de un residuo cargado positivamente en la cara polar de los péptidos α -helicoidales es un factor determinante en el proceso de localización del péptido en la interfase de la membrana de procariontas, lo opuesto ocurre en membranas eucarióticas donde la inserción en la membrana disminuye [85]. Por otra parte, en aquellas secuencias que conservan el carácter anfipático a lo largo de la secuencia se favorece la formación de la estructura helicoidal y por ende su inserción en la bicapa lipídica [86]. Es por ello, que se procedió a un nuevo proceso de análisis de las secuencias de los péptidos parentales (hadrurina y vejovina) y al re-diseño de nuevos análogos sintéticos.

8.4. Re-diseño, síntesis química y purificación de los nuevos derivados sintéticos

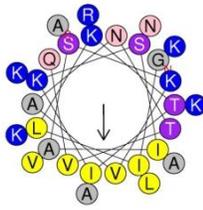
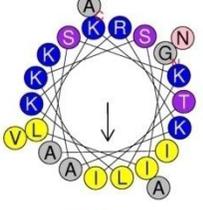
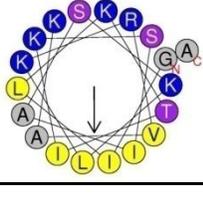
Como se puede observar en la Figura 13, los péptidos parentales presentan un fragmento con residuos cargados positivamente (KLKR), debido a que un punto débil del péptido tres es el bajo valor de carga positiva, se decidió incluir este fragmento dentro de los nuevos derivados. Puesto que al incrementar la carga positiva, la atracción electrostática entre el péptido catiónico con la membrana microbiana aumentaría. Nuevamente se calcularon tanto los parámetros fisicoquímicos como la estructura secundaria putativa siguiendo la metodología establecida anteriormente. En la Tabla 6 se encuentra un resumen de los valores teóricos obtenidos.

```

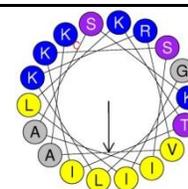
Vejovina      GIWSS IKNLA SKAWN SDIGQ SLRNK AAGAI NKFVA DKIGV TPSQA AS
Hadrurina A/W GILKT IKSIA SKVAN SKTVQ KLKRK --G-I N-AVA NALGV SP-QA A-
Secuencia 1   GILKT IKSIA SKVAN TVQ-- KLKRK AK--- NA-VA
Secuencia 2   GILKT IKSIA S----- KLKRK AK--- NA-VA
Secuencia 3   GILKT IKSIA S----- KLKR- ----- ---VA KA
Secuencia 4   GILKT IKSIA S----- KLKR- ----- ---VA K
    
```

Figura 13. Secuencias parentales y nuevos derivados propuestos. En la figura se muestra tanto la secuencia de hadrurina y vejovina, así como, la de los nuevos derivados. Podemos observar que en los péptidos naturales hay un fragmento que contienen aminoácidos cargados positivamente (KLKR), el cual se incluyó en las nuevas propuestas.

Tabla 6. Resultado del análisis de los parámetros fisicoquímicos de los nuevos derivados propuestos.

Péptido	Secuencia	No. de aa	H	μ H	Z	Anfipaticidad
1	GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAVA	29	0.176	0.507	+8	
2	GILKTIKSIASKLKRKAKNAVA	22	0.177	0.500	+7	
3	GILKTIKSIASKLKRVAKA	19	0.272	0.599	+6	

4 GILKTIKSIASKLKRVAK 18 0.270 0.639 +6



Nota: H=hidrofobicidad, μ H=momento hidrofóbico, Z=carga neta.

Se eligió el péptido denominado uno considerando que los principales factores involucrados en el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos son: la carga positiva, la hidrofobicidad, el momento hidrofóbico, el tamaño y la orientación de la superficies hidrofóbica/hidrofílica de la hélice (carácter anfipático) [87]. Tomando en cuenta que la síntesis de péptidos en fase sólida es del extremo carboxilo hacia el amino terminal y considerando la longitud de secuencia del péptido 1 (29 aminoácidos), durante el proceso de síntesis se seleccionaron fragmentos de menor tamaño, para obtener de esta forma una serie de análogos que varíen en sus parámetros fisicoquímicos respecto a la secuencia original y así poder evaluar como estas variaciones influyen en la actividad biológica. En la Figura 14 se muestra los fragmentos sintéticos obtenidos a partir de la secuencia 1, los cuáles se designaron como F1A a F5B, así como la secuencia 4 y un análogo de la misma en la que se realizó el cambio de $K^4 \rightarrow N$. Estos dos últimos péptidos se incluyeron por poseer secuencias de menor longitud (18 aminoácidos) y características estructurales anteriormente descritas que en teoría son determinantes en el reconocimiento del péptido hacia la membrana.

Nuevos Péptidos	Secuencia	No. aa	Abreviación
Fragmento 1A	GILKT IKSIA SKVAN TVQKL KRKAK NAV-	28	F1A
Fragmento 1B	GILKT IKSIA SKVAN TVQKL KRKAK NAVA	29	F1B
Fragmento 2A	----- IKSIA SKVAN TVQKL KRKAK NAV-	23	F2A
Fragmento 2B	----- IKSIA SKVAN TVQKL KRKAK NAVA	24	F2B
Fragmento 3A	----- ---IA SKVAN TVQKL KRKAK NAV-	20	F3A
Fragmento 3B	----- ---IA SKVAN TVQKL KRKAK NAVA	21	F3B
Fragmento 4A	----- -KVAN TVQKL KRKAK NAV-	17	F4A
Fragmento 4B	----- -KVAN TVQKL KRKAK NAVA	18	F4B
Fragmento 5A	----- ---- -KL KRKAK NAV-	10	F5A
Fragmento 5B	----- ---- -KL KRKAK NAVA	11	F5B
Secuencia 4	GILKT IKSIA S-----KL KRVAK ----	18	P18K
Secuencia 4m	GILNT IKSIA S-----KL KRVAK ----	18	P18K3N

Figura 14. Secuencia 1, fragmentos derivados a partir de la misma (F1-F5), así como, la secuencia 4 (P18K) y la modificación de la misma (P18K3N). Los fragmentos fueron separados conforme se avanzaba en el proceso de síntesis para el caso de las secuencias F1-F5. Al lado de cada una de las secuencias está el número de aminoácidos correspondiente y la clave que la identifica.

La Tabla 7 resume los principales parámetros fisicoquímicos de los nuevos derivados, cabe resaltar que los péptidos denominados P18K y P18K3N tienen el mayor grado de hidrofobicidad (0.27 y 0.292, respectivamente) y momento hidrofóbico (0.639 y 0.618, respectivamente), aunado a un valor de carga relativamente alto (+6 para ambas secuencias), mientras que F4A y F4B poseen menor valor de carga (+5). Por otra parte, F1A y F1B tienen un equilibrio entre hidrofobicidad (0.171 y 0.176, respectivamente) y momento hidrofóbico (0.535 y 0.507, respectivamente) aunado a un gran valor de carga positiva (+8 para ambas secuencias). Los restantes análogos propuestos (F2A, F2B, F3A y F3B) tienen valores intermedios a los mencionados con anterioridad para las diferentes características estructurales. Por otra parte, se puede observar que las secuencias F1-F5 (Tabla 7) se diferencian en un aminoácido (alanina) del extremo carboxilo terminal. Esta modificación cae en la cara polar de la estructura helicoidal, en este sentido se ha reportado que variaciones sobre esta superficie afectan la estabilidad de la α -hélice.[91] De esta forma, como se ha discutido con anterioridad la estabilidad helicoidal se relaciona con la hidrofobicidad y por tanto con el momento hidrofóbico, repercutiendo en la actividad microbida y especificidad bacteriana. No obstante, todos los péptidos mantienen su carácter anfipático (Figura 15) y de esta forma la variación de los parámetros estructurales nos ayudará a comprender como estos cambios modulan la actividad microbida/citotóxica.

Tabla 7. Resultado del análisis de los parámetros fisicoquímicos de los péptidos derivados de la secuencia 1, así como, de la secuencia 4 y la modificación de la misma.

Péptido	No. aa	Secuencia	PM	H	μ H	Z	pl
F1A	28	GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAV	3008	0.171	0.535	+8	11.47
F1B	29	GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAVA	3080	0.176	0.507	+8	11.47
F2A	23	IKSIASKVANTVQKLKRKAKNAV	2496	0.087	0.516	+7	11.43
F2B	24	IKSIASKVANTVQKLKRKAKNAVA	2566	0.097	0.483	+7	11.43
F3A	20	IASKVANTVQKLKRKAKNAV	2166	0.062	0.486	+6	11.39
F3B	21	IASKVANTVQKLKRKAKNAVA	2238	0.074	0.450	+6	11.39
F4A	17	KVANTVQKLKRKAKNAV	1896	-0.049	0.495	+6	11.39
F4B	18	KVANTVQKLKRKAKNAVA	1968	-0.029	0.455	+6	11.39
F5A	10	KLKRKAKNAV	1154	-0.203	0.491	+5	11.33
F5B	11	KLKRKAKNAVA	1225	-0.156	0.422	+5	11.33
P18K	18	GILKTIKSIAS-----KLKRVAK	1954	0.270	0.639	+6	11.39
P18K3N	18	GILNTIKSIAS-----KLKRVAK	1940	0.292	0.618	+5	11.33

Nota: PM=peso molecular (Da), H=hidrofobicidad, μ H=momento hidrofóbico, Z=carga neta, pl=punto isoeléctrico. Se resaltan aquellos aminoácidos que difiere respecto a su par homólogo.

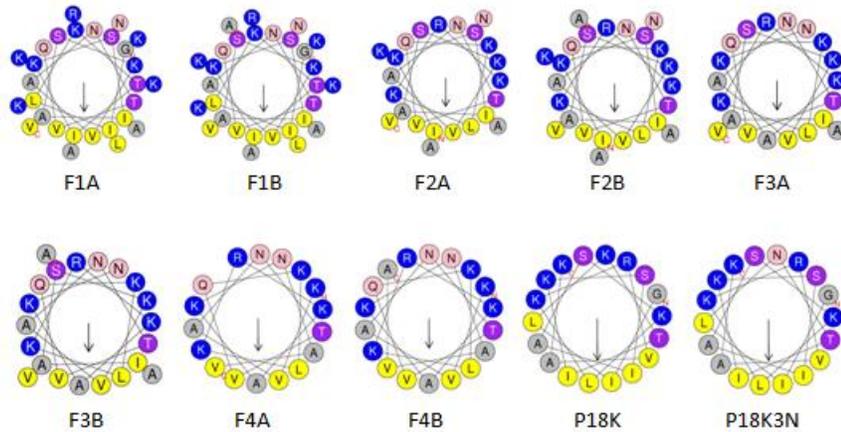


Figura 15. Perfil anfipático de los péptidos.

La purificación de los nuevos derivados se realizó acorde a lo establecido en la parte de metodología sección 6.1. Los cromatogramas de la primera síntesis se muestran en las Figuras de la 16 a la 21. Debido a que algunos ensayos realizados en este trabajo demandaron grandes cantidades de péptido, se sintetizaron por segunda ocasión las secuencias correspondientes a la serie F, es decir, de la F1A a la F4B, los cromatogramas resultantes se encuentran en el Apéndice.

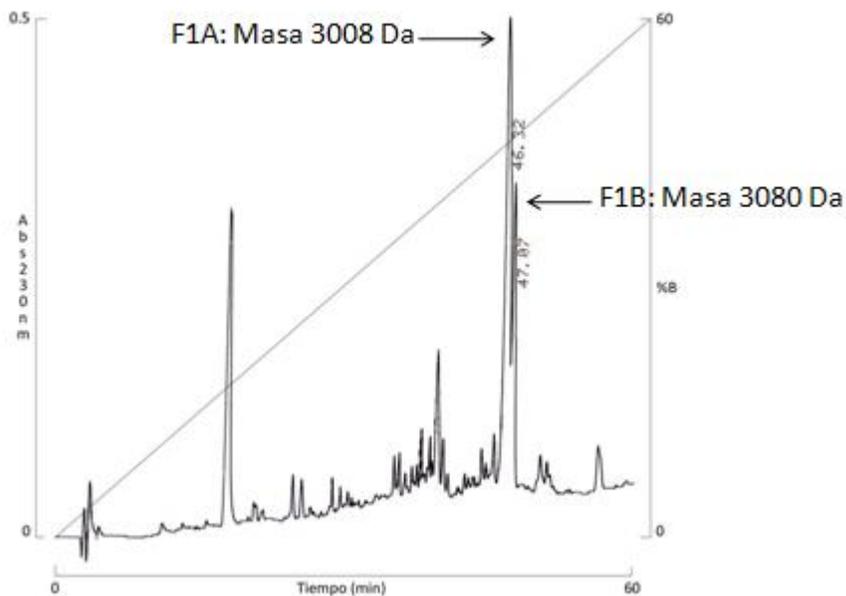


Figura 16. Purificación del fragmento 1. Se muestra el cromatograma de purificación de los fragmentos F1A y F1B (indicados por flecha y su respectiva masa molecular). Tiempo de elución 46.32 y 47.07 min respectivamente.

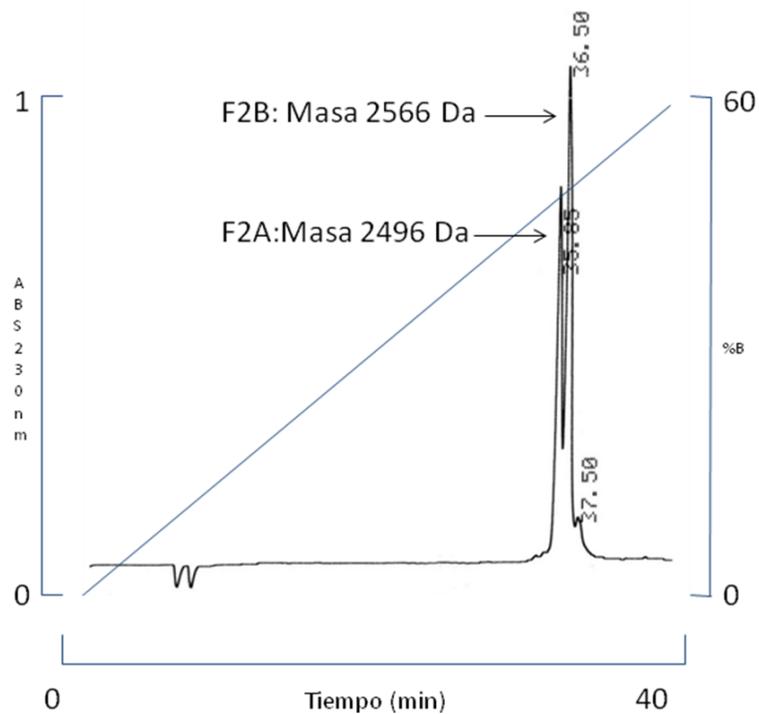


Figura 17. Purificación del fragmento 2. Se muestra el cromatograma de purificación de los fragmentos F2A y F2B (indicados por flecha y su respectiva masa molecular). Tiempo de elución 33.34 y 34.06 min respectivamente.

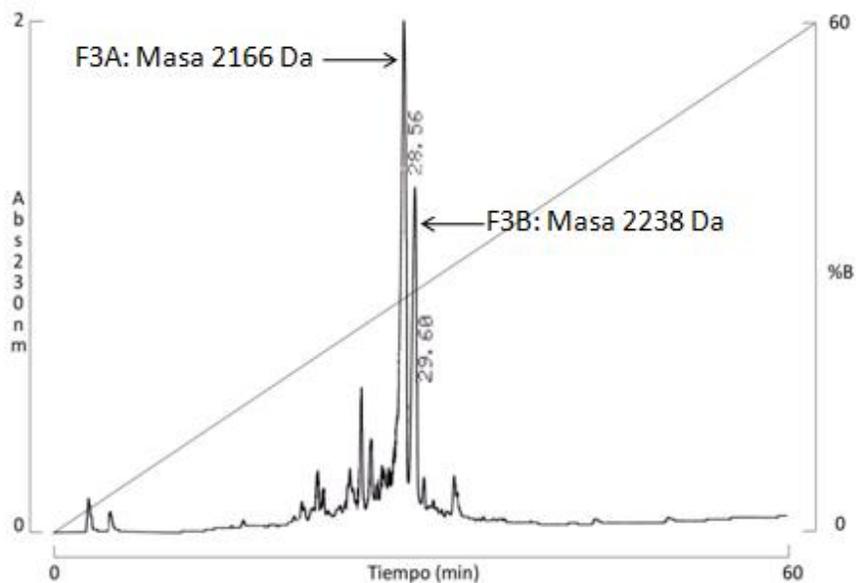


Figura 18. Purificación del fragmento 3. Se muestra el cromatograma de purificación de los fragmentos F3A y F3B (indicados por flecha y su respectiva masa molecular). Tiempo de elución 28.56 y 29.60 min respectivamente.

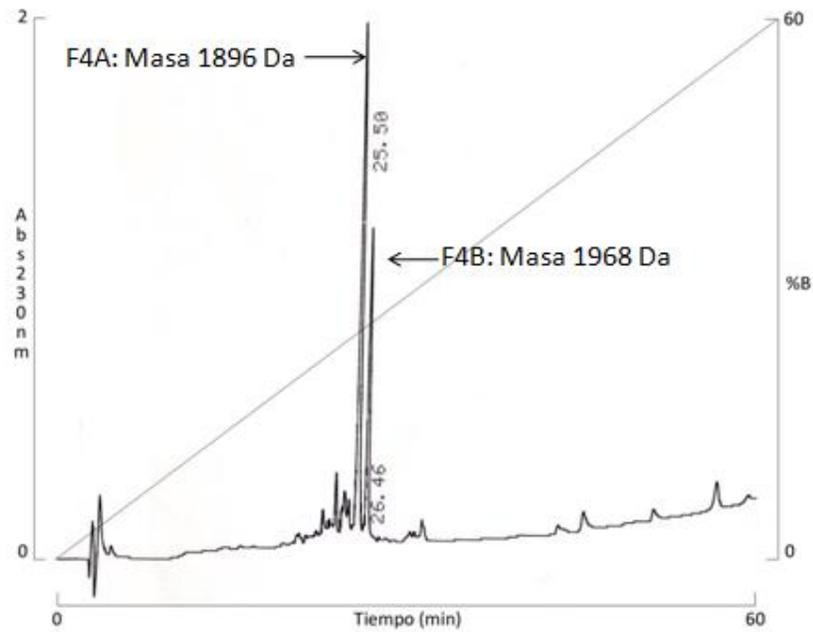


Figura 19. Purificación del fragmento 4. Se muestra el cromatograma de purificación de los fragmentos F4A y F4B (indicados por flecha y su respectiva masa molecular). Tiempo de elución 25.50 y 26.46 min respectivamente.

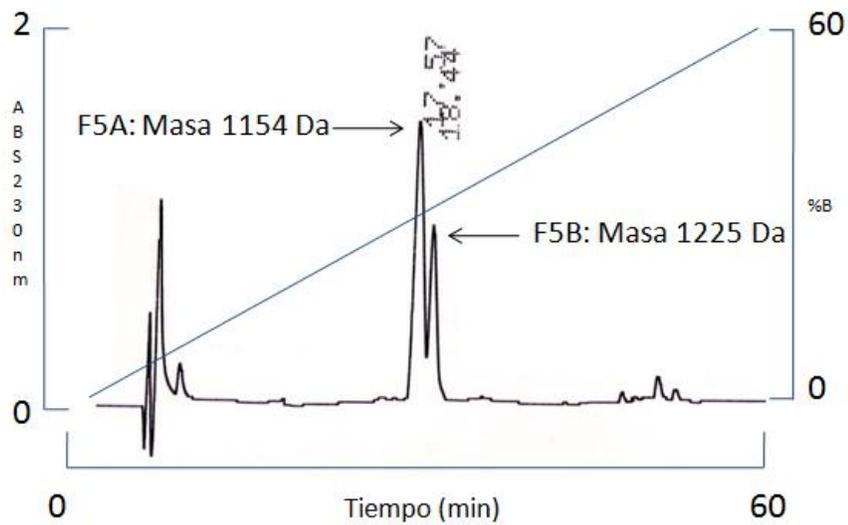


Figura 20. Purificación del fragmento 5. Se muestra el cromatograma de purificación de los fragmentos F5A y F5B (indicados por flecha y su respectiva masa molecular). Tiempo de elución 17.47 y 18.44 min respectivamente.

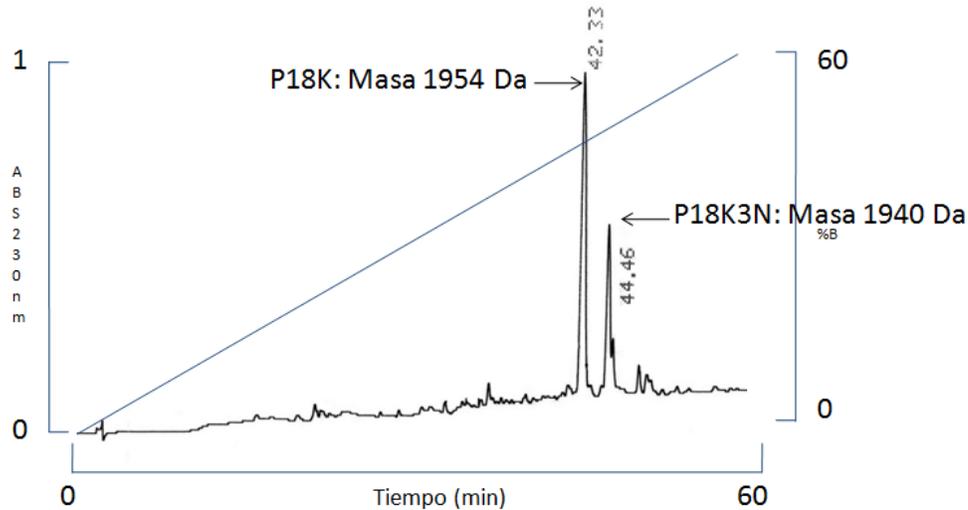


Figura 21. Purificación de la secuencia 4 y 4m. Se muestra el cromatograma de Purificación de los fragmentos P18K y P18K3N (indicados por flecha y su respectiva masa molecular). Tiempo de elución 42.33 y 44.46 min respectivamente.

Como se puede apreciar en los cromatogramas hay un patrón de picos de purificación que se repite para cada uno de los fragmentos y que consiste en dos picos mayoritarios con tiempos de retención similares. Las fracciones correspondientes se colectaron y se determinó el peso molecular para cada uno de los fragmentos. A partir del peso molecular teórico se determinó que el pico con el menor tiempo de retención corresponde a la secuencia esperada menos alanina, mientras que el segundo pico con mayor tiempo de retención tiene un peso que corresponde al de la secuencia esperada. Para el caso de las dos últimas propuestas el primer pico corresponde al de la secuencia esperada y el segundo al péptido que tiene el cambio de K por N.

Por otro parte, se puede observar en los cromatogramas que los tiempos de retención obtenidos son más cortos a medida que la secuencia peptídica disminuye, por ejemplo, la secuencia F1B con 29 aminoácidos tiene un tiempo de retención (TR) de 47 min, por el contrario, el péptido F5A con 10 aminoácidos tiene un TR de 17 min. Lo anterior se debe a la hidrofobicidad intrínseca de la secuencia, al aumentar el grado de hidrofobicidad se favorecen las interacciones entre el péptido y las cadenas alifáticas de la columna empleada en la purificación de los mismos. En la Tabla 8 se resume la información de los análogos sintéticos en la etapa de purificación.

Tabla 8. Parámetros relacionados con el tiempo de retención.

Péptido	No. Aa	Secuencia	PM	H	μH	TR
F1A	28	GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAV	3008	0.171	0.535	46.32
F1B	29	GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAVA	3080	0.176	0.507	47.07
F2A	23	IKSIASKVANTVQKLKRKAKNAV	2496	0.087	0.516	33.34
F2B	24	IKSIASKVANTVQKLKRKAKNAVA	2566	0.097	0.483	34.06
F3A	20	IASKVANTVQKLKRKAKNAV	2166	0.062	0.486	28.56
F3B	21	IASKVANTVQKLKRKAKNAVA	2238	0.074	0.450	29.60
F4A	17	KVANTVQKLKRKAKNAV	1896	-0.049	0.495	25.50
F4B	18	KVANTVQKLKRKAKNAVA	1968	-0.029	0.455	26.46
F5A	10	KLKRKAKNAV	1154	-0.203	0.491	17.57
F5B	11	KLKRKAKNAVA	1225	-0.156	0.422	18.44
P18K	18	GILKTIKSIAS-----KLKRVAK	1954	0.270	0.639	42.33
P18K3N	18	GILNTIKSIAS-----KLKRVAK	1940	0.292	0.618	44.46

Nota: PM=Peso molecular (Da), H=hidrofobicidad, μH=momento hidrofóbico, TR=tiempo de retención (min).

Como anteriormente se ha establecido la hidrofobicidad juega un papel importante en la interacción péptido-bicapa lipídica, se ha sugerido que esta propiedad es dependiente de la helicidad y a su vez ambos parámetros determinan las interacciones entre los grupos carbonilo del péptido con las moléculas de agua. Las diferencias entre el ambiente hidrofóbico teórico y el experimental podrían explicar la falta de correlación con la actividad antibiótica reportada en algunos trabajos. Una propuesta para resolver esta disyuntiva es emplear los tiempos de retención obtenidos y compararlos con la actividad microbica. De acuerdo a lo observado por Sunkyu y cols., aquellos péptidos con tiempos de retención largos tienen actividad antibiótica frente a bacterias en especial Gram positivas [88]. Por lo anterior, se esperaría que los análogos F1A, F1B, P18K y P18K3N sean los más activos y reconozcan ambos grupos bacterianos. Por el contrario, los análogos F5A y F5B tendrían la menor actividad biológica. Para poder determinar si las modificaciones realizadas en los nuevos péptidos propuestos tenían actividad biológica se dispuso a realizar ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano en placa de Petri.

8.5. Ensayos de actividad biológica

Las pruebas de determinación de la actividad antimicrobiana se realizaron siguiendo el método de Kirby-Bauer como se describe en la parte de metodología sección 6.2. Para este ensayo se probaron las dos secuencias pertenecientes a cada fragmento, es decir, tanto la faltante de alanina como la deseada (Tabla 9). Las concentraciones utilizadas por péptido se basan en la cantidad de péptido puro disponible en ese momento.

Tabla 9. Resultados de la prueba de inhibición del crecimiento bacteriano por los PAMs.

Péptido	Secuencia	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
F1A	GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAV	+	+
F1B	GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAVA	+	+
F2A	IKSIASKVANTVQKLKRKAKNAV	+	-
F2B	IKSIASKVANTVQKLKRKAKNAVA	+	-
F3A	IASKVANTVQKLKRKAKNAV	+	-
F3B	IASKVANTVQKLKRKAKNAVA	+	-
F4A	KVANTVQKLKRKAKNAV	+	-
F4B	KVANTVQKLKRKAKNAVA	+	-
F5A	KLKRKAKNAV	-	-
F5B	KLKRKAKNAVA	-	-
P18 K	GILKTIKSIA-----KLKRVAK	+	+
P18 K3N	GILNTIKSIAS-----KLKRVAK	+	+

Nota: La concentración empleada por péptido para el ensayo de actividad biológica fue 10 µg/µL en un volumen total de 3 µL. +=Inhibición del crecimiento microbiano, -=No inhibición del crecimiento microbiano.

Cabe resaltar la importancia de los primeros cinco aminoácidos (GILKT) para preservar la actividad biológica en ambos tipos bacterianos, ya que desde el primer fragmento carente de estos residuos (F2A) se pierde el efecto microbicida en la cepa modelo *Staphylococcus aureus* (Gram positiva).

Una explicación a este fenómeno podría deberse a la diferente composición membranal de ambas clases bacterianas, aunque ambas poseen grupos fosfatos y se encuentran cargadas negativamente existen otras características que las diferencian. Por ejemplo, las bacterias Gram positivas tienen una sola membrana, la membrana citoplásmica, la cual rodea a la célula; mientras que las bacterias Gram negativas poseen dos membranas, la interna y externa. Además, hay que considerar la posición que guarda la pared celular, mientras que en las bacterias Gram negativas se encuentra entre la membrana interna y la externa, en las Gram positivas ésta se encuentra en el exterior. Otra diferencia es la gruesa capa de peptidoglicano de las Gram positivas y la diferente composición de lipopolisacáridos [89].

Otro dato de interés es el reporte de análogos sintéticos de lactoferrina en los que la escisión de los residuos del dominio N-terminal conllevan a una disminución de su actividad contra *E. coli* y *B. subtilis*, y a una reducción en su actividad citotóxica. Estos resultados demuestran la función que cumple el dominio hidrofóbico del extremo amino de los péptidos antimicrobianos [90].

Por otro parte, los cambios realizados en las secuencias de los péptidos P18K y P18K3N no afectaron de manera notable su acción antibiótica, puesto que se observó el mismo efecto inhibitorio en ambos derivados. Retomando de nueva cuenta lo reportado por Sunkyu y cols.,

aquellas secuencias con tiempos de retención prolongados (F1A, F1B, P18K y P18K3N) poseen mayor actividad tanto en la cepa modelo Gram negativa como en la Gram positiva. El caso contrario se observó para los fragmentos F5A y F5B con tiempos cortos de elución. Una vez finalizadas las pruebas de determinación de la actividad antimicrobiana y de saber cuáles secuencias son las que poseen actividad, se realizaron los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano de acuerdo como se establece en la sección 6.4 en las cepas indicadas en la Tabla 10.

Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria de los péptidos contra bacterias multirresistentes.

Péptido/Cepa	<i>Ec</i> ATCC 25922	<i>Ec</i> 170	<i>Ec</i> 4530	<i>Eclo</i> 2524	<i>Eclo</i> 6780	<i>Kpn</i> 913	<i>Kpn</i> 1625	<i>Pa</i> 4677	<i>Pa</i> 5106	<i>Ab</i> 5838	<i>Ab</i> 5852
F1A	1.56	0.78	3.12	3.12	3.12	3.12	3.12	6.25	12.5	3.12	0.78
F1B	1.56	3.12	3.12	6.25	3.12	3.12	1.56	25	12.5	1.56	1.56
F2A	12.5	3.12	25	>50	25	>50	3.12	12.5	>50	12.5	6.25
F2B	12.5	1.56	>50	3.12	>50	>50	6.25	>50	>50	6.25	3.12
F3A	25	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
F3B	>50	12.5	>50	6.25	>50	25	>50	>50	>50	12.5	6.25
F4A	>50	>50	>50	25	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
F4B	>50	>50	>50	12.5	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
P18K	1.56	1.56	25	>50	3.12	3.12	1.56	25	25	3.12	1.56
P18K3N	1.56	1.56	>50	>50	3.12	6.25	3.12	>50	>50	3.12	1.56

Nota: Cada uno de los ensayos se realizó en dos experimentos independientes por duplicado. *Ec* = *Escherichia coli*, *Eclo* = *Enterobacter cloacae*, *Kpn* = *Klebsiella pneumoniae*, *Pa* = *Pseudomonas aeruginosa*, *Ab* = *Acinetobacter baumannii*. Los valores mostrados en la tabla son la concentración (μM) a la cual no se observa crecimiento.

Las cepas empleadas para el ensayo de CMI fueron bacterias Gram negativas debido a que en la prueba de inhibición del crecimiento los resultados esperados se obtuvieron con *E. coli* (ver Tabla 9), aunado al hecho que en el INSP se tiene una gran colección de cepas bacterianas del mismo género. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 10 no todos los análogos sintéticos inhiben el crecimiento bacteriano con la misma eficacia. En particular, las secuencias F1A, F1B, P18K y P18K3N tienen un efecto antibiótico en un rango de 0.78 μM a 25 μM , por el contrario, los péptidos restantes presentan valores por arriba de las concentraciones ensayadas (>50 μM). No obstante, hay que recordar que estos microorganismos son bacterias de relevancia clínica puesto que presentan multiresistencia antibiótica y son muestras representativas de brotes infecciosos de diferentes regiones del país.

Posteriormente, se probó la actividad hemolítica de los péptidos a la concentración a la que demostraron inhibir el crecimiento bacteriano. Para ello, se realizaron las pruebas de hemólisis conforme a la metodología descrita en la sección 6.5 (Tabla 11).

Tabla 11. Actividad hemolítica de los péptidos.

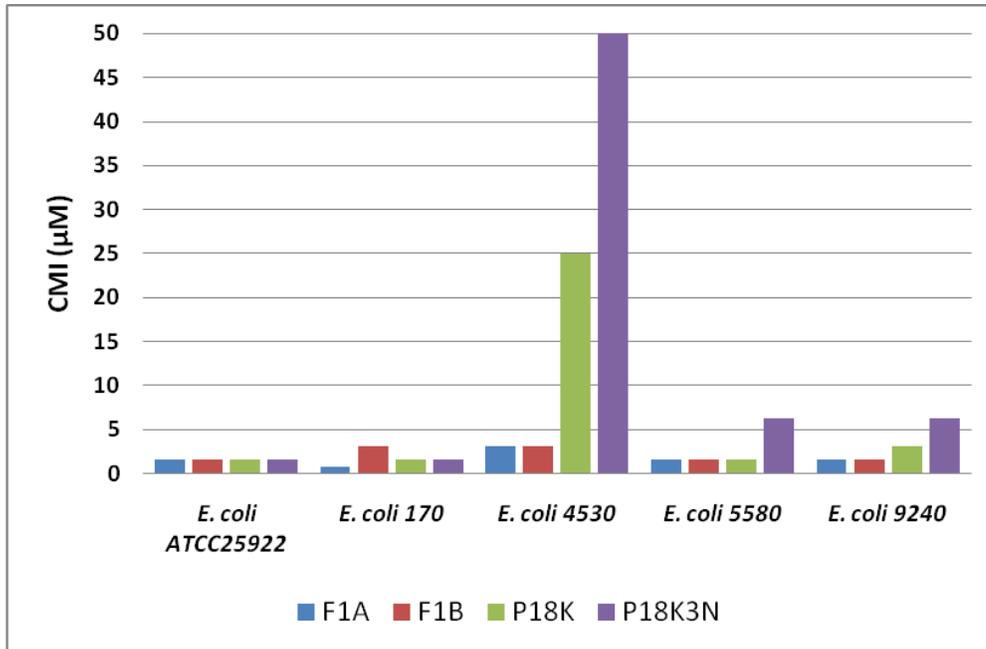
Péptido	%Hemólisis*
F1A	1.29
F1B	0
F2A	3.27
F2B	3.58
F3A	1.47
F3B	1.54
F4A	0.88
F4B	3.45
P18K	1.56
P18K3N	1.18

Nota: * Máximo porcentaje de hemólisis observado a 50µM, la prueba se realizó por duplicado.

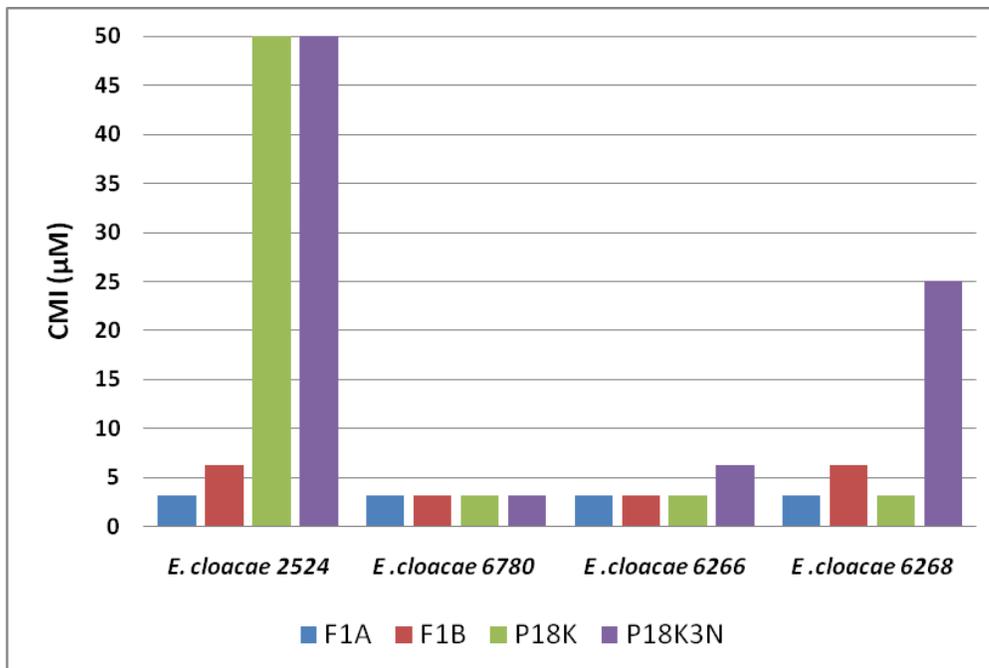
Entre las características que comparten los péptidos anfipáticos y catiónicos es la capacidad para formar poros en la membrana tanto de procarionotas como de eucariotas. Por ello, una forma de estudiar el reconocimiento del péptido con la membrana eucariota es determinar la lisis en los glóbulos rojos. Como se indica en la Tabla 11 los nuevos derivados presentan valores de hemólisis por debajo del 4%, siendo el valor máximo 3.58% para el péptido F2B. Cabe resaltar, que el efecto observado sobre los eritrocitos, además de ser mínimo, es a una concentración superior a la cual inhiben el crecimiento bacteriano. En contraste, tanto la vejovina como la hadrurina tienen una HC_{50} (50% de actividad hemolítica) a una concentración de 100 µM y 5 µM respectivamente. Por lo tanto, el índice terapéutico de las nuevas propuestas mejoró significativamente [68].

Las propiedades de los péptidos tales como la anfipaticidad, la hidrofobicidad y la carga permiten que los análogos tengan una selectividad preferencial hacia membranas procarionotas. Puesto que la membrana del eritrocito es anfipática y debido a la composición rica en fosfatidilcolina (PC), esfingomielina (SM) y colesterol (Chl), la atracción electrostática se reduce de manera considerable [89, 92]. En este sentido, se ha reportado la actividad hemolítica de siete análogos derivados del extremo amino terminal de la proteína ribosomal L1 de *Helicobacter pylori*, en donde el análogo tres a una concentración de 100 µM presenta una hemólisis <5% [93]. En otro trabajo se estudia la interacción de seis péptidos arácnidos Oxki1, Oxki2, Pin1, Pin2, IsCT1e IsCT2 en donde se encontró que la lisis celular depende de la fuente de glóbulos rojos de mamíferos, siendo el orden de potencia: cerdo de guinea>porcino>oveja y concluyendo que la diferencia observada se debe a la variación en las proporciones de lípidos que componen la membrana [94]. En la Tabla tres del apéndice se encuentra una lista más completa de la actividad hemolítica de algunos péptidos antimicrobianos.

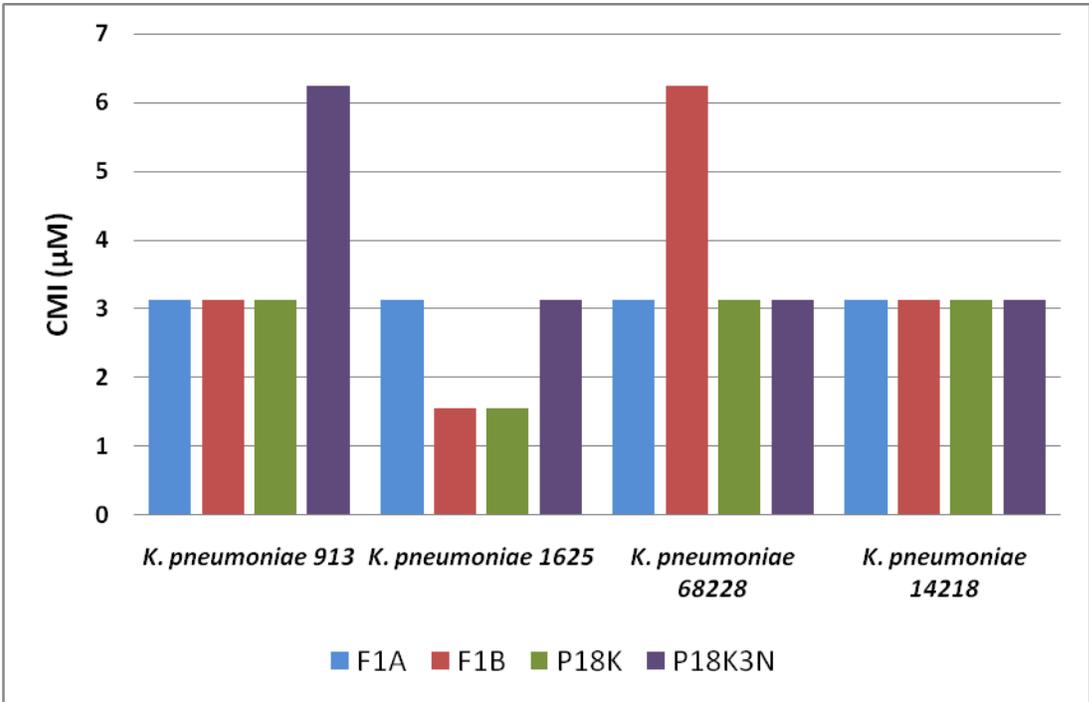
A continuación, se probaron aquellos péptidos con mayor actividad antimicrobiana y menor actividad citotóxica (F1A, F1B, P18K y P18K3N), es decir mejor índice terapéutico, contra 29 aislamientos clínicos provenientes de diferentes hospitales del país (Gráfica 1-6).



Gráfica 1. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *E. coli*.

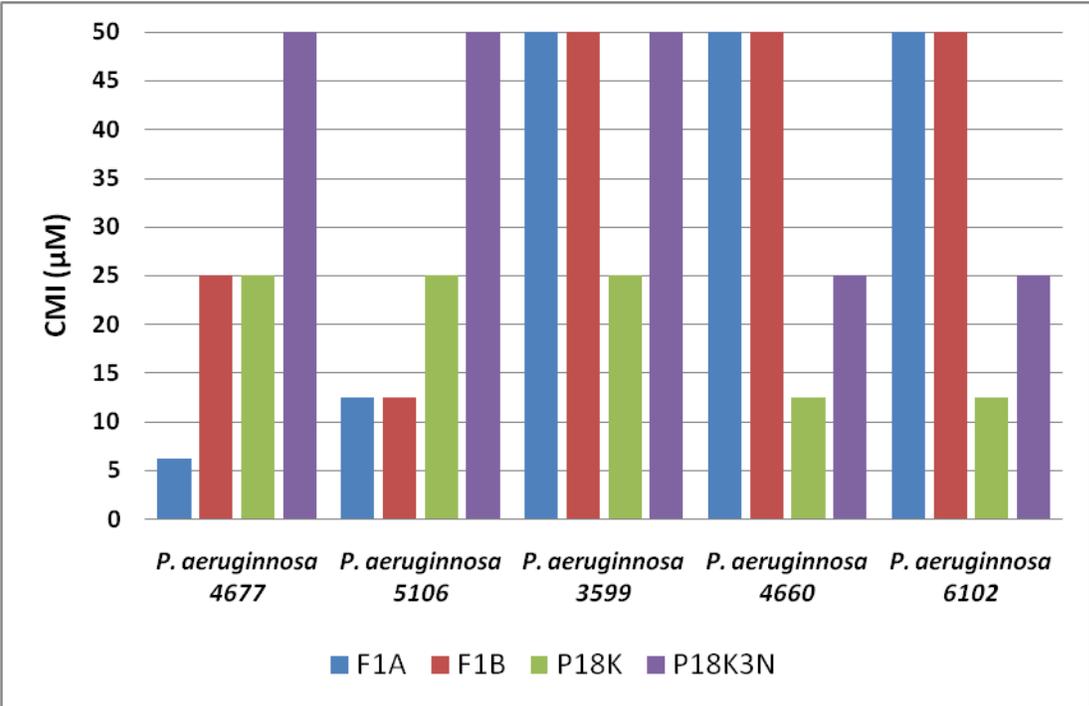


Gráfica 2. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *E. cloacae*.

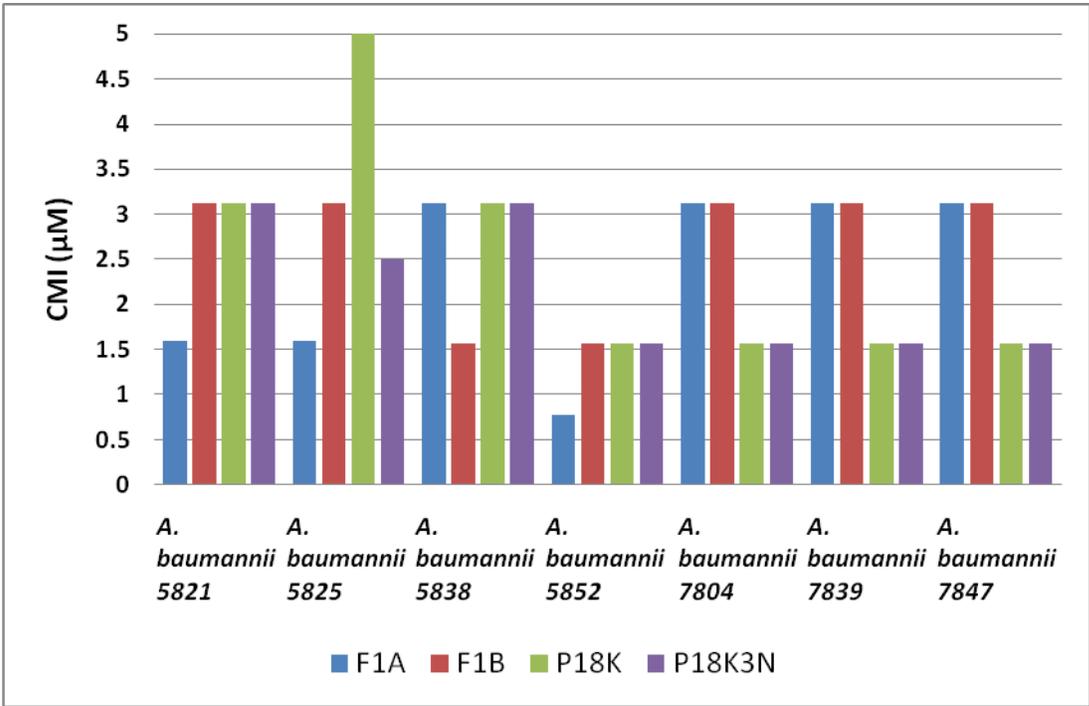


Gráfica 3. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *K. pneumoniae*.

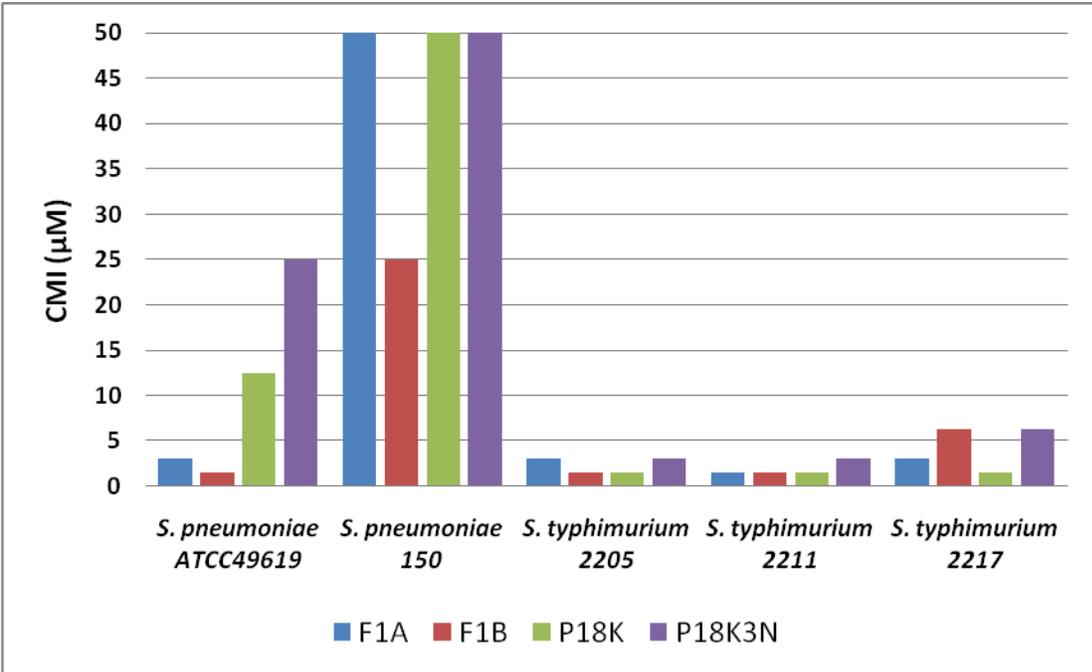
Nota: La escala de CMI es de 1 a 7 µM.



Gráfica 4. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *P. aeruginosa*.



Gráfica 5. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *A.baumannii*.
Nota: La escala de CMI es de 1 a 5 µM.



Gráfica 6. CMI de los PAMs contra diferentes cepas de *Streptococcus* y *Salmonella*.

En las gráficas del 1 al 6 se resaltan las variaciones en la susceptibilidad antibiótica de los diferentes géneros de bacterias Gram negativas frente a los análogos sintéticos. Esta resistencia bacteriana se ha relacionado con la diversidad en la proporción de los componentes de la membrana externa, aunque poseen algunos elementos conservados como el lípido A, esta diversidad en la constitución y longitud de los polisacáridos de las diferentes especies las provee de una barrera que protege en contra de agentes antibacterianos. Esta hipótesis se apoya en los resultados en donde algunos péptidos antimicrobianos presentan diferente actividad contra bacterias Gram negativas, pese a la similitud en los fosfolípidos que las componen. Un ejemplo de ello, es el estudio de la interacción entre magainina 2 y la membrana externa de *Salmonella typhimurium* en donde se encontró que la susceptibilidad microbiana está asociada a la presencia o ausencia de la cadena lateral del antígeno O. Otros estudios revelan que tanto el empaquetamiento de los lipopolisacáridos, así como, variaciones químicas en la estructura de los mismos, por ejemplo, cambios en la posición de los azúcares y carga de las cadenas laterales, son los causantes de la resistencia contra péptidos antibióticos [95].

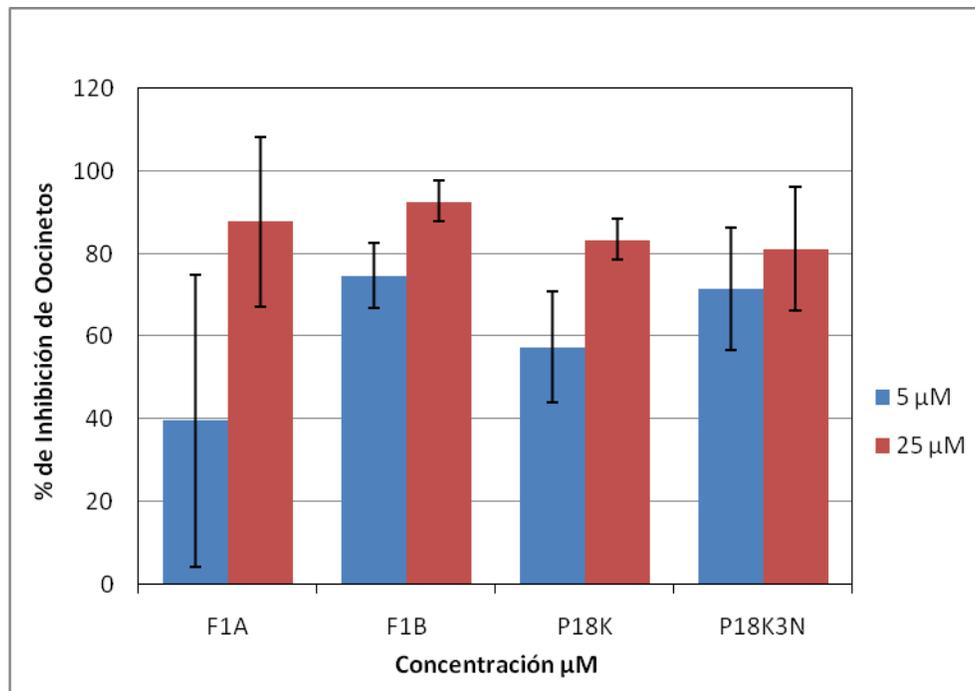
Otro factor relacionado con diferencias en la actividad antimicrobiana en cepas con resistencia múltiple son las bombas de flujo extracelular, pues les confieren la capacidad de hacer frente a compuestos no relacionados estructuralmente con antibióticos, incluyendo sustancias endógenas del hospedero tales como: sales biliares, ácidos grasos y hormonas esteroideas, por tanto, obstaculizan el reconocimiento del péptido hacia la membrana microbiana [96].

Si comparamos los valores obtenidos de los ensayos de inhibición de los nuevos derivados contra los péptidos parentales para la mayoría de las cepas bacterianas se logró mejorar la CMI (Tabla 12). En este aspecto, los derivados F1A, F1B, P18K y P18K3N mejoraron 2.9 veces la acción microbicida en la cepa *E. coli* ATCC25922. Por otro lado, en las cepas *E. coli* 170, *E. cloacae* 4530, 2524 y 6268, *K. pneumoniae* 913, 1625 y 68228, *P. aeruginosa* 4677, 5106, 4660 y 6102 el efecto observado es variable, ya que en algunas cepas se alcanza la inhibición del crecimiento a una concentración de 1.56 μM (p. ej. F1B y P18K en *K. pneumoniae* 1625), mientras que en otras el efecto se observa a una concentración de 50 μM (p. ej. F1A y F1B en *P. aeruginosa* 6102), no obstante, cabe resaltar que en los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* se mejoró la actividad biológica 2.5 y 3 veces respectivamente.

Tabla 12. Comparación de los péptidos parentales contra los péptidos F1A, F1B, P18K y P18K3N en los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Cepa/Péptido	Vejovina	F1A	F1B	P18K	P18K3N	Cepa/Péptido	Hadrurina
<i>E. coli</i> ATCC25922	4.4	1.56	1.56	1.56	1.56	<i>E. coli</i> ATCC25926	<10
<i>E. coli</i> 170	4.4	0.78	3.125	1.56	1.56	<i>E. cloacae</i> 129	<10
<i>E. coli</i> 4530	4.4	3.125	3.125	25	50	<i>E. faecalis</i> 51	50
<i>E. coli</i> 5580	10	1.56	1.56	1.56	6.25	<i>K. pneumoniae</i> 9	<10
<i>E. coli</i> 9240	20	1.56	1.56	3.125	6.25	<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	40
<i>E. cloacae</i> 2524	4.4	3.125	6.25	50	50	<i>P. aeruginosa</i> PG201	40
<i>E. cloacae</i> 6266	>20	3.125	3.125	3.125	6.25	<i>S. typhimurium</i>	50
<i>E. cloacae</i> 6268	>20	3.125	6.25	3.125	25	<i>S. marscencens</i> ATCC13880	50
<i>K. pneumoniae</i> 913	17.7	3.125	3.125	3.125	6.25		
<i>K. pneumoniae</i> 1625	17.7	3.125	1.56	1.56	3.125		
<i>K. pneumoniae</i> 68228	50	3.125	6.25	3.125	3.125		
<i>K. pneumoniae</i> 14218	50	3.125	3.125	3.125	3.125		
<i>P. aeruginosa</i> 4677	17.7	6.25	25	25	50		
<i>P. aeruginosa</i> 5106	17.7	12.5	12.5	25	50		
<i>P. aeruginosa</i> 3599	50	50	50	25	50		
<i>P. aeruginosa</i> 4660	50	50	50	12.5	25		
<i>P. aeruginosa</i> 6102	100	50	50	12.5	25		
<i>A. baumannii</i> 7804	20	3.125	3.125	1.56	1.56		
<i>A. baumannii</i> 7839	20	3.125	3.125	1.56	1.56		
<i>A. baumannii</i> 7847	5	3.125	3.125	1.56	1.56		
<i>S. typhimurium</i> 2205		3.125	1.56	1.56	3.125		
<i>S. typhimurium</i> 2211		1.56	1.56	1.56	3.125		
<i>S. typhimurium</i> 2217		3.125	6.25	1.56	6.25		

En relación al espectro de acción de los péptidos antimicrobianos, hay que recordar que algunos también tienen la capacidad de actuar en contra de parásitos, sin embargo, la mayor parte de los estudios reportados en la literatura se han realizado con las especies *Leishmania* y *Trypanosoma* (ver Tabla 4 del Apéndice), pese a esto, hay que recalcar la relevancia médica que tiene *Plasmodium* puesto que es el agente etiológico de la malaria [97]. Es por ello, que se evaluó la capacidad de inhibir la formación de oocinetos de *P. berghei* de los péptidos F1A, F1B, P18K y P18K3N (Gráfica 7).



Gráfica 7. Determinación de la inhibición de formación de oocinetos de *Plasmodium berghei*.

Como se puede apreciar en la gráfica anterior todos los péptidos inhiben en un 40% el desarrollo de los oocinetos a una concentración de 5 μM y >80% a una concentración de 25 μM en *Plasmodium berghei*. Este hallazgo es importante ya que en la literatura existen pocos reportes de péptidos de alacrán con actividad en contra de este parásito. Respecto a lo anterior, se ha reportado la actividad antiparasitaria de la escopina, péptido aislado del veneno de *Pandinus imperator*, sobre oocinetos (ED_{50} 0.7 μM) y gametocitos (ED_{50} 10 μM) de *Plasmodium berghei* [39]. Otro estudio realizado por Gao y cols., describe el efecto inhibitorio de la meucina-24 y 25, péptidos obtenidos empleando bibliotecas de ADNc a partir de la glándula venenosa del alacrán *Mesobuthus eupeus*, sobre oocinetos de *P. berghei* y trofofoito de *P. falciparum* a una concentración de 10-20 μM [98]. Un trabajo reciente reporta la caracterización de un nuevo péptido denominado MeuTXK β 1, obtenido por clonación molecular de la glándula venenosa del mismo alacrán, con actividad en contra de oocinetos en *Plasmodium berghei* a una concentración de 10-20 μM [99].

De la misma forma, se ha descrito la actividad antiparasitaria de los péptidos antimicrobianos obtenidos de otros organismos. Tal es el caso de la gomesina, aislada de los hemocitos de la araña *Acanthoscurria gomesiana* y cuyo efecto inhibitorio es del 58% (50 μM) y 68% (100 μM) sobre diferentes estadios de los parásitos *Plasmodium berghei* y *P. falciparum* [100]. Asimismo, se ha evaluado el efecto del péptido phylloseptina-1, derivado de la secreción

de la rana *Phyllomedusa azurea*, en los parásitos *Leishmania amazonensis* y *Plasmodium falciparum* encontrando un efecto inhibitorio a una concentración (0.5 µg/mL) comparable a *N*-metilglucamina para la primer especie, mientras que en la segunda reportan una concentración de 16 µg/mL, alcanzando una actividad comparable a la del fármaco de elección para el tratamiento de la malaria grave (artesanato) a 64 µg/mL [101]. En la Tabla cuatro del apéndice se encuentra una lista más extensa de las actividades *in vitro* de diferentes péptidos antimicrobianos.

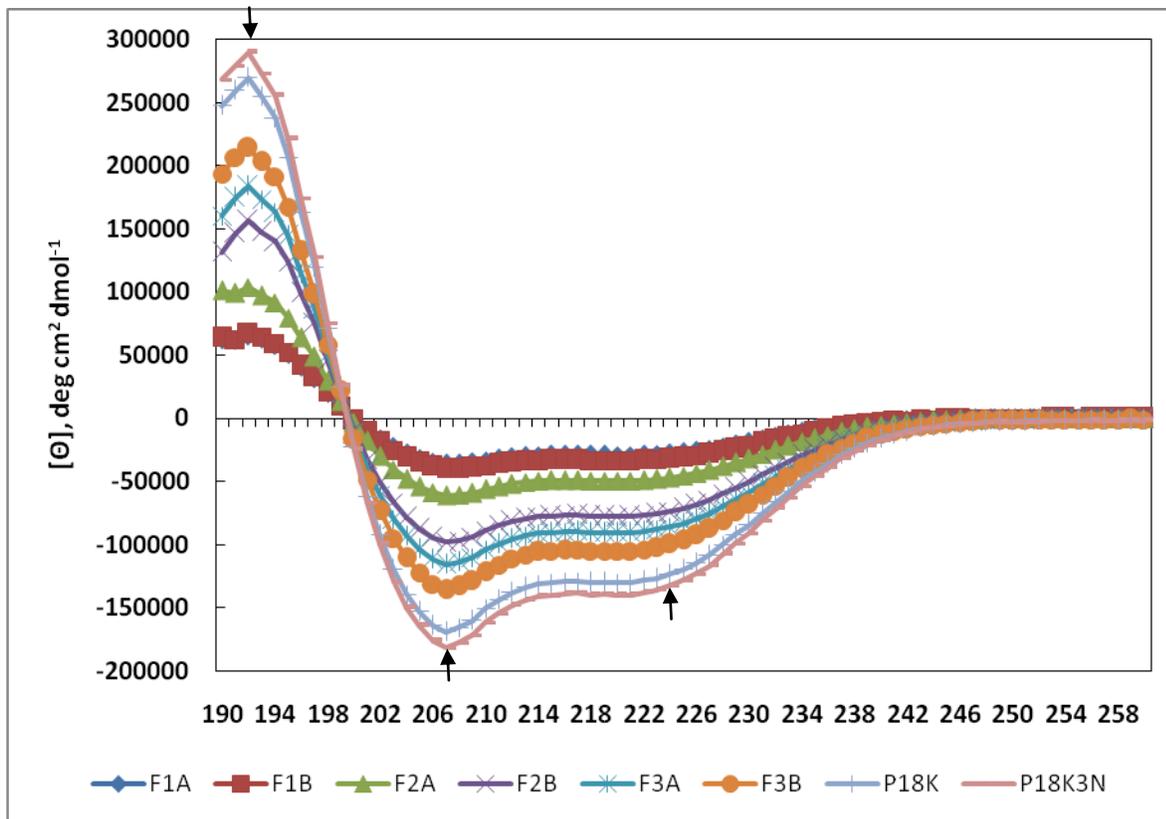
A partir de los resultados de la actividad biológica podemos resaltar la importancia que los parámetros fisicoquímicos desempeñan, ya que tanto la hidrofobicidad, así como, el momento hidrofóbico y la carga neta positiva parecen tener una gran influencia sobre el reconocimiento que el péptido tiene hacia las membranas microbianas y eucariotas [43].

En síntesis, las características que presentan los derivados con mejor índice terapéutico (F1A, F1B, P18K y P18K3N) dan lugar a una actividad microbicida eficiente y homogénea, con mínima actividad citotóxica sobre los eritrocitos. Por ello, los péptidos anteriormente mencionados podrían ser una alternativa como futuros antibióticos. En la Tabla cinco del apéndice se encuentra condensada la información referente a la actividad biológica de los derivados mencionados anteriormente.

8.6. Determinación de la estructura secundaria.

El dicroísmo circular (CD) es una herramienta confiable para determinar la estructura secundaria de manera rápida de proteínas obtenidas mediante extracción de tejidos, técnicas recombinantes o sintéticas. El principal aporte radica en que permite conocer si una proteína se pliega correctamente, si una mutación afecta la estabilidad conformacional, así como estudiar las interacciones peptídicas. La ventaja del método es que se pueden realizar en muestras múltiples que contengan ≤ 20 µg de proteína. Sin embargo, no proporciona información sobre los residuos específicos como la obtenida por rayos X o RMN [102].

Debido a que la helicidad es una de las propiedades principales que poseen los péptidos antimicrobianos se determinó la estructura secundaria de los péptidos propuestos en este trabajo la cual se puede observar en la Gráfica 8.



Gráfica 8. Espectro de dicroísmo circular de los diferentes péptidos sintéticos usando como amortiguador TFE 60%. Nota: Las flechas indican las bandas características de los péptidos con estructura helicoidal (194 nm, 208 nm y 224 nm).

La diferencia en la intensidad de la señal observada en la Gráfica 8 se debe a que se realizó la lectura con 100 μg de péptido en un volumen de 400 μL de TFE 60%, por lo tanto, la concentración (molar) es mayor en aquellas secuencias con menor número de aminoácidos, como en los péptidos P18K y P18K3N compuestas por 18 residuos. El caso contrario, ocurre en secuencias de mayor longitud, como por ejemplo F1A y F1B las cuáles tienen 28 y 29 aminoácidos respectivamente. Es importante resaltar que el espectro de dicroísmo circular de todos los péptidos sintéticos presenta 3 bandas principales: una positiva ~ 194 nm y dos negativas en ~ 208 nm y ~ 224 nm, propias de péptidos con estructura alfa helicoidal [102]. En la Tabla 13 se muestran los porcentajes de alfa hélice correspondiente a cada péptido.

Tabla 13. Valores de helicidad de los péptidos antimicrobianos.

Péptido	% α -hélice	% hoja- β	Error Máx.
F1A	66.82	2.27	>0.32
F1B	3.44	47.08	0.23
F2A	51.03	8.95	>0.32
F2B	67.4	2.2	>0.32
F3A	40.18	10.65	>0.32
F3B	39.37	11.52	>0.32
F4A	Nd	Nd	Nd
F4B	Nd	Nd	Nd
P18K	67.4	2.2	>0.32
P18K3N	28.52	16.82	0.23

Nd = No determinado.

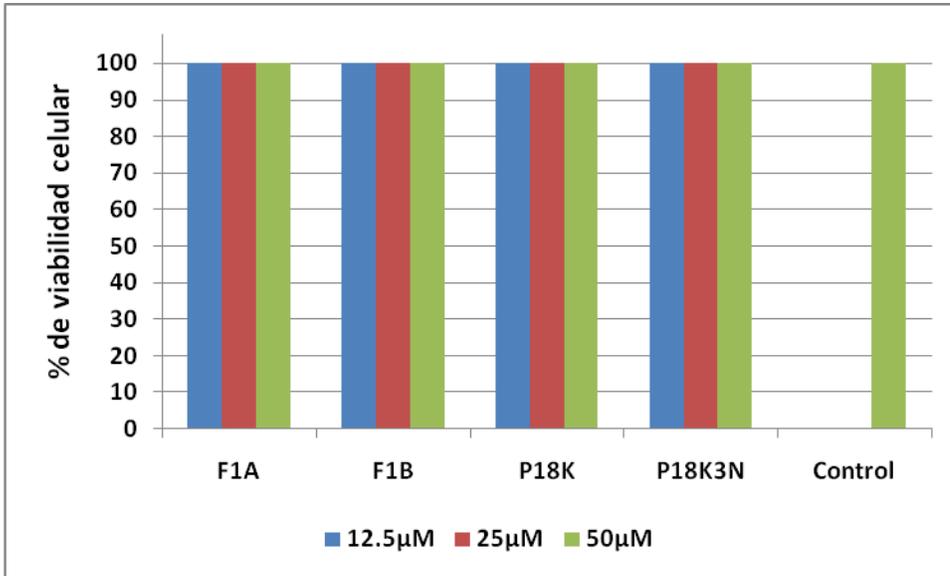
Los porcentajes de helicidad de los péptidos sintéticos se calcularon empleando el método K2D2 dentro del servidor ubicado en <http://www.ogic.ca/projects/k2d2/orainaldia.html>. Este método construye mapas de estructura secundaria de proteínas a partir de los espectros de proteínas de estructura conocida. En principio, entre más similar sea un espectro al mapa de estructura secundaria generado por el método, mejor será su pronóstico. La estimación del error máximo es el error total mayor calculado tomando como referencia al mapa de estructura secundaria creado por dicho método [103].

Como se puede observar en la Tabla anterior, los derivados presentan valores de helicidad desde un porcentaje muy bajo, como es el caso de F1B con 3.44%, hasta porcentajes mayores como lo es para F1A y P18K, con 66.82% y 67.4% respectivamente. En los análogos restantes los porcentajes de α -hélice se encuentran entre 39.7-51.03%. Una excepción es F2B, ya que tiene 67.4% de α -hélice pese a que no presenta una eficiente actividad microbicida. En el caso de los péptidos F1A, F1B, P18K y P18K3N no parece haber una correlación entre la actividad microbicida (ver Tabla 5 y 6 del Apéndice) y la actividad citotóxica (ver Tabla 5 y 6 del Apéndice). En el trabajo realizado por Yamamoto y Tamura se diseñaron péptidos con baja anfipaticidad con valores de helicidad e hidrofobicidad variables, y encontraron que estos péptidos catiónicos inducían la formación de estructuras estables con los lípidos de la membrana responsable del daño observado en membranas bacterianas [104]. Se deben realizar otros experimentos que permitan estudiar la interacción péptido-membrana eucariota/procariota, algunas de las metodologías empleadas para este propósito es evaluar la toxicidad en líneas celulares, ya que es una membrana eucariota más compleja que la del eritrocito y el uso de liposomas como modelo de bicapa lipídica con una composición similar a la membrana de interés.

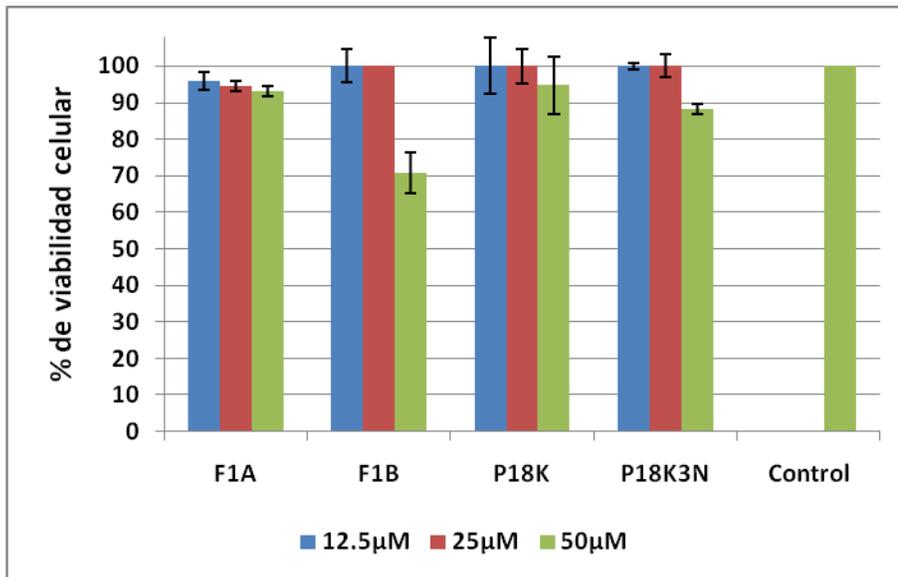
8.7. Evaluación de la viabilidad celular

A pesar de la amplia cantidad de ensayos que miden diferentes aspectos del metabolismo celular, el método empleando MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) es uno de los más sencillos, ya que se basa en la reducción metabólica de esta molécula por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul-púrpura (formazán), permitiendo evaluar la actividad mitocondrial de las células tratadas [105]. No obstante, este método tiene limitaciones que dependerán del (i) estado fisiológico de las células y (ii) de la variabilidad en la actividad deshidrogenasa mitocondrial de los diferentes tipos celulares. Sin embargo, este método ha sido muy utilizado para determinar supervivencia y proliferación celular. Puesto que el número de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, el cual puede ser medido espectrofotométricamente.

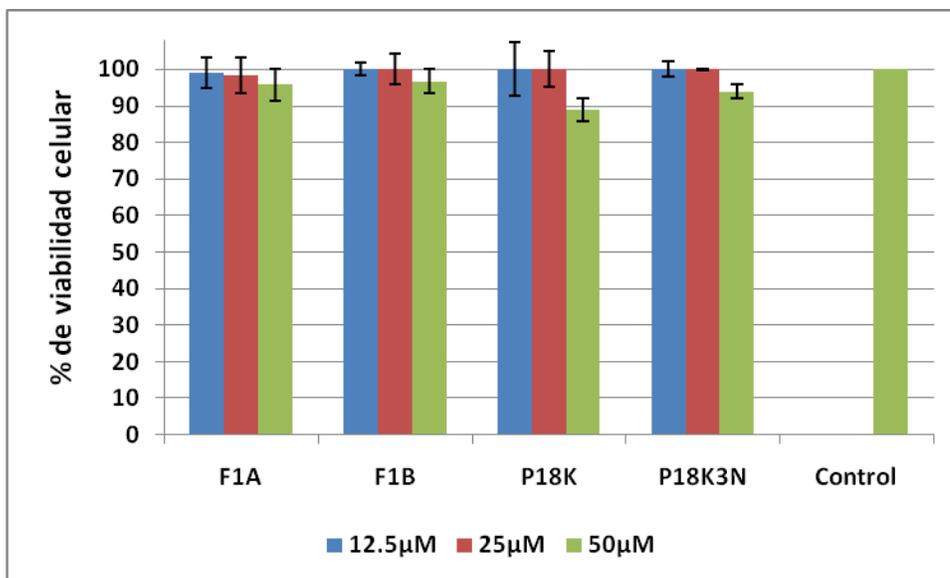
Con respecto a la actividad citotóxica de los PAMs, se ha reportado la actividad en contra de células eucariotas de péptidos antimicrobianos sintéticos observando que a una concentración de 50 μM hay un 97% de supervivencia en células humanas posterior a las 24 h de incubación, en contraste con líneas celulares de insecto las cuáles presentan un 32% de viabilidad celular [98]. Debido a la baja toxicidad que presentan algunos péptidos antimicrobianos en contra de líneas celulares de origen epitelial, actualmente algunos PAMs se encuentran en fase tres de desarrollo clínico como fármacos para uso tópico [55]. Tomando en cuenta lo anterior, se determinó el efecto citotóxico de los péptidos F1A, F1B, P18K y P18K3N empleando las líneas celulares HEK 293 y COS 7. Los ensayos de viabilidad celular se realizaron a la máxima concentración a la cuál se observó inhibición del crecimiento bacteriano en las cepas ensayadas anteriormente incubando por 24 h (Gráfica 9 y 10) y 48 h (Gráfica 11) acorde a lo descrito en la metodología sección 6.9.



Gráfica 9. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células HEK 293, incubando por 24 h con PAMs.



Gráfica 10. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células COS 7, incubando por 24 h con PAMs.



Gráfica 11. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* en células HEK 293, incubando por 48 h con PAMs.

Como se puede apreciar los péptidos sintéticos a las concentraciones ensayadas no tienen una actividad citotóxica significativa en comparación con el control tanto en células HEK 293 como en COS 7, tras 24 h, para ambos casos y 48 h para la primera línea celular, ya que el mínimo porcentaje de supervivencia que se obtuvo fue de ~75% para el caso de F1B en COS 7. Por el contrario, en otros estudios en donde se han realizado ensayos de citotoxicidad empleando líneas celulares de mamífero, como es el caso de las células 3T3 con heptámeros cuya longitud de secuencia es variable, compuestos exclusivamente por Lys-Leu-Ala, se encontró que los análogos 21-meró y 14-meró tienen una actividad citotóxica a una concentración de 3-8 μM y 6-22 μM respectivamente [106]. Tomando en cuenta los bajos valores de hemólisis y la actividad antimicrobiana, los derivados presentados en este trabajo poseen una baja afinidad por la membrana de células eucariotas y al parecer no tienen blancos de acción intracelulares, lo cual se refleja en el alto porcentaje de viabilidad celular.

8.8. Determinación de la liberación de calceína

La selectividad de los PAMs hacia las células procariontas o las eucariotas se debe a la diferencia en la composición química de sus membranas (Tabla 14). Puesto que, las células procariontas contienen un alto porcentaje de fosfolípidos con carga negativa, en comparación a las de mamíferos con una concentración mucho mayor de fosfolípidos zwitteriónicos, por tanto, se asume que la eficiencia de interacción es diferente. Asimismo, existen otras diferencias como:

estructura, potencial transmembrana y polarizabilidad. Además, de las diferencias entre células procariota y eucariota, las membranas de los diferentes tipos de bacterias también presentan variaciones significativas. Esta hipótesis se ha extendido y ahora propone que la diversidad en composición de la bicapa lipídica entre las diferentes cepas bacterianas es la responsable de la variabilidad en la potencia y selectividad de los PAMs [107].

Tabla 14. Fosfolípidos más frecuentes en las membranas celulares.

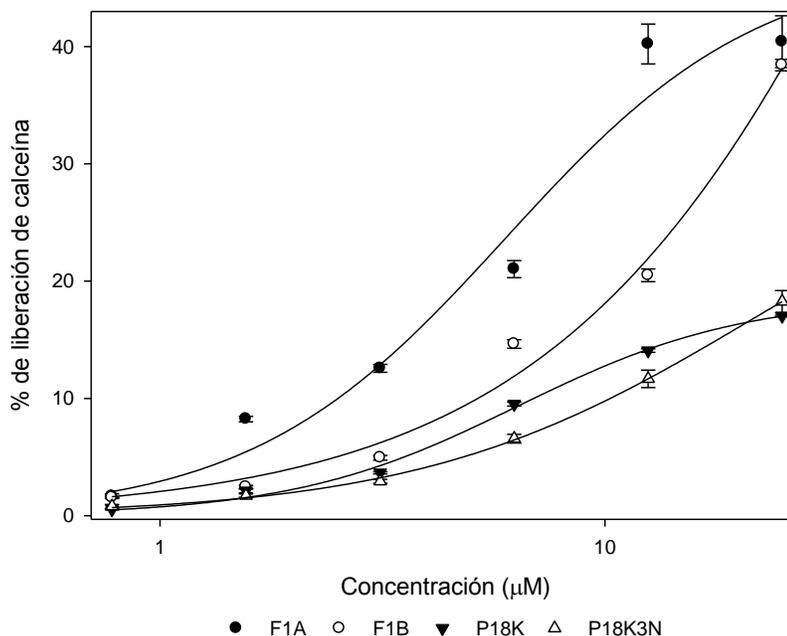
Membranas de eucariotas	Membranas de procariontes
Fosfatidilcolina	Fosfatidiletanolamina
Fosfatidiletanolamina	Fosfatidilglicerol
Fosfatidilserina	Cardiolipina
Fosfatidilinositol	Glucolípidos [†]
Cardiolipina	Glucosfosfolípidos [†]
Esfingomielina*	

Nota: *En lugar de glicerol presenta D-4-esfingenina. [†]Bacterias Gram positivas.

Cabe destacar que pese a que no existe una composición lipídica estándar, sino que depende de cada célula, los lípidos de la Tabla 14 se consideran como los componentes principales. Un caso especial es el del parásito *Plasmodium*, si bien es incapaz de biosintetizar *de novo* ácidos grasos y colesterol, puede producir sus glicéridos y fosfoglicéridos gracias a que consume los ácidos grasos, bases nitrogenadas, alcoholes, ATP y co-enzima A del hospedero. Sin embargo, la composición lipídica del parásito difiere respecto a la del eritrocito en muchos aspectos: tiene un mayor contenido de diacil fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, poligliceroles fosfatídicos, diacilgliceroles, ácidos grasos no esterificados, triacilgliceroles y ácidos grasos hexa y octadecanoicos; una menor proporción de esfingomielina, fosfatidilserina, alcoxi fosfatidiletanolamina, colesterol y ácidos grasos poliinsaturados [108].

Por otra parte, el mecanismo molecular subyacente a la muerte celular mediada por los PAMs sigue siendo un tema de debate, aunque hay muchos estudios que abordan este problema, los datos indican que los péptidos interactúan principalmente con la membrana citoplasmática en vez de interactuar con un receptor específico. Empleando liposomas como sistemas modelo y midiendo la liberación de compuestos fluorescentes o el transporte de iones a través de la membrana se ha demostrado que los péptidos como las cecropinas, las magaininas y las melitinas ejercen sus efectos a través de la bicapa lipídica. Esto ha llevado a la conclusión general de que el mecanismo que da lugar a la muerte celular es la formación de canales en la bicapa lipídica [109]. Por ello, un método para comprender la interacción del péptido con membranas de diferente composición química es utilizar liposomas y estudiar su eficiencia para interactuar con ella. Un método indirecto es la medición de la liberación de liposomas previamente cargados con calceína.

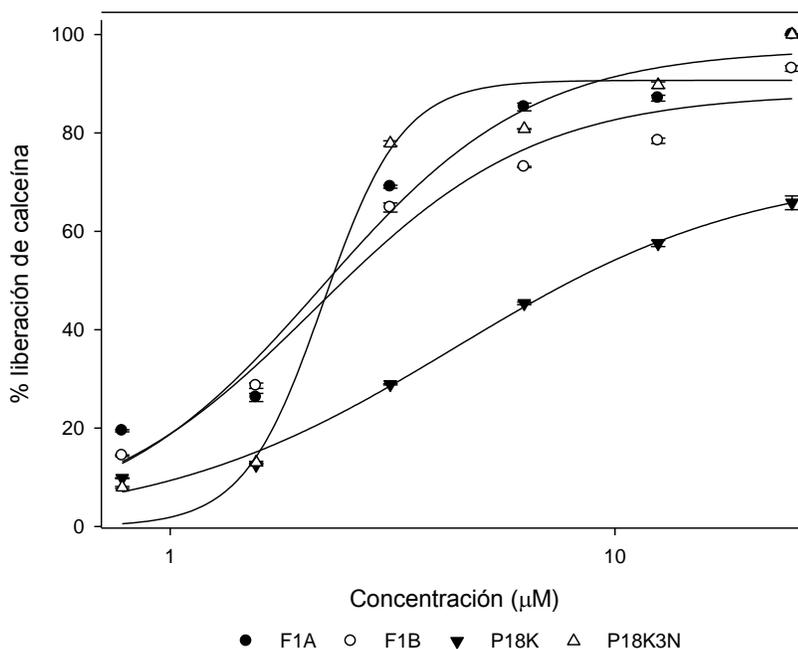
La elección de los lípidos para la formación de un modelo que imite la membrana de células procariontas o eucariotas depende en gran medida de las propiedades físicas de los lípidos tales como: (i) grosor de la bicapa hidrofóbica, (ii) temperatura de la fase de transición del sistema, (iii) miscibilidad de los lípidos y en algunos casos (iv) la facilidad para formar bicapas alineadas correctamente [110]. Como primer modelo de membrana biológica se prepararon liposomas con una composición similar a la de células eucariotas (PC: Chl en una proporción molar 7:3). Los resultados del experimento se muestran en la gráfica 12.



Gráfica 12. Ensayos de liberación de calceína de los péptidos antimicrobianos. La composición de los liposomas es PC: Chl (7:3 mol: mol).

Como se puede apreciar en la gráfica 12 el mayor porcentaje de liberación se alcanza a una concentración de 20 µM y, a excepción de F1B, se llega a una aparente saturación del sistema en el rango de concentraciones para los péptidos ensayados. La secuencia con mayor actividad hacia membrana eucariota fue el F1A, aunque a la máxima concentración probada (25 µM) el porcentaje de liberación de calceína no es mayor al 40%. En contraste, P18K3N apenas y sobrepasa el 15% de liberación (Tabla 15). Los resultados obtenidos sugieren que el sistema eucariota en presencia de los péptidos sintéticos interaccionan dando lugar a la desestabilización de la bicapa lipídica, lo que permite la liberación de calceína. No podríamos afirmar el mecanismo por el cual este fenómeno se lleve a cabo (modelo de barril, poro toroidal o de carpeta), sin embargo, es muy posible que la formación de poros sea la responsable de la liberación del fluoróforo. Por último, para saber si los datos de los estudios biofísicos correlacionan con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad biológica es necesario realizar las mediciones empleando sistemas que simulen la membrana de células procariontas. Es por ello, que el siguiente sistema de vesículas estuvo compuesto por los lípidos fosfatidilglicerol

y fosfatidilcolina (PC: PG en una proporción molar 1:3), en la Gráfica 13 se muestran los resultados obtenidos.



Gráfica 13. Ensayos de liberación de calceína de los péptidos antimicrobianos. La composición de los liposomas es PC: PG (1:3 mol: mol).

Se puede apreciar en la gráfica anterior que para todos los péptidos ensayados el porcentaje de liberación de calceína obtenido es >60%, como es el caso de P18K, mientras que en el resto de derivados sintéticos se alcanza el 100% de liberación (Tabla 15). De lo anterior, podemos deducir que la afinidad de los análogos sintéticos hacia liposomas con una composición similar a la membrana de procariontas es mayor en comparación a la de eucariotas. Nuevamente, al igual que en los ensayos de actividad biológica predomina una tendencia hacia membranas procariontas, confirmando la importancia de la atracción electrostática como primer paso para el reconocimiento e interacción del péptido hacia la bicapa lipídica.

Tabla 15. Porcentajes de liberación de calceína en liposomas compuestos por PC: PG (1:3 mol: mol).

Péptido	100% de liberación de calceína (µM)	50% de liberación de calceína (µM)
F1A	25	1.56-3.12
F1B	25	1.56-3.12
P18K	25*	12.5-25
P18K3N	25	1.56-3.12

Nota: *65.81 % como máximo porcentaje de liberación registrado a 25 µM.

Como anteriormente se ha mencionado, con el empleo de esta metodología solo podemos afirmar que el péptido reconoce a la vesícula a través de un mecanismo que permite la liberación de calceína, teniendo una preferencia por aquellos liposomas con una composición rica en lípidos cargados negativamente. En este sentido, se puede determinar de manera cuantitativa la selectividad de los péptidos antimicrobianos comparando las concentraciones a las cuáles se libera el 50% de calceína en ambos sistemas membranales. Sin embargo, en el liposoma tipo eucariota el máximo porcentaje obtenido es apenas de ~33% con una aparente saturación de la respuesta (Tabla 16). Por lo que adiciones mayores probablemente den una respuesta bifásica que implicaría interacciones distintas a las observadas en membranas PC: PG en las que claramente se logra la saturación al 100% de la señal y un comportamiento sigmoide.

Tabla 16. Porcentajes de liberación de calceína en liposomas compuestos por PC: Chl (7:3 mol: mol).

Péptido	% Máximo de liberación de calceína*
F1A	31.34
F1B	32.35
P18K	18.35
P18K3N	32.95

Nota: *Máximo porcentaje de liberación registrado a 25 μ M.

Los estudios en donde se ha descubierto que debajo de cierta concentración crítica magainina ocasiona una ligera liberación, pero a concentraciones más altas causan una lisis extendida, apoyan esta hipótesis. Algunos ejemplos que demuestran este efecto son: la cinética de liberación de 6-carboxifluoresceína inducida por magainina en liposomas de fosfatidilserina 2 observando el máximo efecto hasta alcanzar la máxima concentración. De igual forma, trabajos en donde se emplea técnicas de unión a membrana en combinación con métodos de permeabilidad en bicapas con los péptidos dermaseptinas y cecropinas demuestran que la máxima actividad se consiguió cuando los péptidos cubrieron la superficie de los liposomas. Asimismo, la dermaseptina, la cecropina B, la cecropina P y la cecropina A disipan el gradiente iónico a bajas concentraciones, mientras que se requirieron concentraciones superiores para conseguir la completa liberación de calceína. Estos resultados indican que la inserción del péptido en la bicapa lipídica es dependiente de la concentración [111].

Paralelamente, se ha estudiado la interacción de derivados sintéticos con bicapas lipídicas a través de liberación de calceína, y se ha encontrado una baja actividad en vesículas neutras (DOPC), por el contrario, cuando los péptidos se encontraron en presencia de vesículas cargadas negativamente (DOPC/DOPG 1:3 ó 3:1) se obtuvo la mayor actividad, consiguiendo resultados compatibles a la actividad antibiótica [112].

Debido a la diversidad de lípidos que componen la membrana microbiana, se ha reportado el comportamiento de la liberación de calceína usando diferentes sistemas de liposomas, concluyendo que algunos efectos como diámetro, temperatura y composición lipídica intervienen en la fluidez de la membrana y por ende en la interacción del péptido con la bicapa [113]. Es por ello, que en los últimos años se han realizado diversos trabajos para tratar de establecer la naturaleza de esta interacción, existiendo varios reportes en la literatura donde se han usado diferentes lípidos: 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-3-fosfocolina (POPC) (por ej., MSI-78 y MSI-94); 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC) (por ej., aureina 1,2); 1,2-difitanoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DPhPC) (por ej., alameticina), otras membranas del tipo diacilfosfatidilcolina (por ej., $K_2(LA)_xK_2$) o mezclas lipídicas, así como POPC/1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-[fosfocolina-*rac*-(1-glicerol)] (POPG) (por ej., MSI-78 y MSI-94) y DMPC/DMPG (por ej., PGLa) por citar algunos ejemplos. Tomando en cuenta lo anterior, aunque hay parámetros que deben tomarse en cuenta en la interacción péptido-bicapa lipídica (proporción péptido/lípido, composición membranal, temperatura, entre otras), lo más importante es que en el presente trabajo los ensayos de liberación de calceína correlacionan con la actividad biológica encontrada para bacterias y células eucariotas [114].

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron por el método de Merrifield en fase sólida 13 péptidos sintéticos catiónicos, de los cuáles ocho poseen actividad antimicrobiana. La presencia de los primeros cinco aminoácidos de la secuencia (GILKT) parece tener un papel importante en la actividad que el péptido ejerce sobre bacterias Gram +/-, ya que los análogos en donde estos residuos se eliminaron carecían de actividad antibiótica en *S. aureus* ATCC29213. Al menos cuatro (F1A, F1B, P18K y P18K3N) de estos nuevos derivados antimicrobianos, a los cuáles se les incrementó la carga neta positiva y conservaron los primeros cinco aminoácidos de la región amino, presentan una eficiente actividad antibacteriana en cepas multiresistentes de aislados clínicos, provenientes de diferentes regiones del país.

La concentración mínima inhibitoria para los péptidos con mayor eficacia se observó en los géneros: *E. coli* (0.78-6.25 μM), *E. cloacae* (3.12-12.5 μM), *K. pneumoniae* (1.56-6.25 μM), *A. baumannii* (0.78-3.12 μM) y *S. typhimurium* (1.56-6.25 μM). Por otra parte, tanto en *P. aeruginosa* como en *S. pneumoniae* la actividad microbicida fue variable, ya que en el primer género se obtuvieron valores de CMI de 12.5 a 25 μM con el péptido P18K, mientras que para el resto de los análogos se logró inhibir el crecimiento a concentraciones en el rango de 25-50 μM . En la segunda especie bacteriana no hay un rango de concentración promedio, puesto que la CMI en ambas cepas (*S. pneumoniae* ATCC49619 y 150) para los derivados probados fue de 1.56 a 50 μM .

Los péptidos diseñados en este trabajo presentan una mejor actividad antimicrobiana y menor actividad hemolítica (mejor índice terapéutico) que los péptidos parentales. Puesto que, la vejovina tiene una CMI 4.4 μM en *E. coli* ATCC 25922 y HC_{50} 100 μM y la hadrurina una CMI 7.5 μM en la misma cepa y HC_{80} 20 μM . En este aspecto, los derivados F1A, F1B, P18K y P18K3N mejoraron 2.9 veces la acción microbicida en la cepa *E. coli* ATCC25922. Cabe resaltar que en los géneros *Enterobacter* y *Klebsiella* se mejoró la actividad biológica 2.5 y 3 veces respectivamente.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de crecimiento de oocinetos de *P. berghei* muestran que los péptidos F1A, F1B, P18K y P18K3N inihiben la formación de esta fase del parásito en un 40% a 5 μM , duplicando este porcentaje si la concentración se incrementa 5 veces. No obstante, en comparación con otros péptidos derivados de alacrán los péptidos propuestos en este trabajo sólo son superados por la escorpina.

Asimismo, se probó el efecto citotóxico de los péptidos F1A, F1B, P18K y P18K3N empleando las líneas celulares HEK 293 y COS 7, encontrando que tanto en HEK 293 como en COS 7 a una concentración máxima de 50 μM y un tiempo de incubación de 24 h no presentan cambios significativos con respecto al control. Mientras que en la línea celular HEK 293

incubando a la misma concentración por un período de 48 h se observó una viabilidad celular >85%.

En cuanto al efecto que ejerce el péptido en membranas biológicas, basados en los porcentajes de liberación de calceína demostramos que hay una acción preferencial hacia bicapa lípidicas compuestas por lípidos con carga negativa (PC: PG en una relación molar 1: 3) en comparación con aquellas compuestas por lípidos neutros (PC: Chl en proporción molar 7: 3), ya que a una concentración de 25 μ M se obtuvo el cien por ciento de liberación, mientras que en los sistemas tipo eucariota apenas se alcanza un ~33%.

A partir de los ensayos de actividad biológica podemos decir que la diferencia en un aminoácido, como es el caso de alanina en el extremo C-terminal de los fragmento de la serie F (F2-F5) y el cambio de K⁴→N, permitió determinar los principales parámetros fisicoquímicos involucrados en la selectividad del péptido. Las características estructurales que establecen la selectividad hacia la membrana blanco, ya sea la procariota o la eucariota son la hidrofobicidad, el momento hidrófobo y la carga positiva. En conjunto estas características le permiten al péptido ser atraído hacia la membrana y una vez que se encuentra paralelamente sobre la membrana pasa de una conformación aleatoria a una estructura de tipo helicoidal, lo que le permite interactuar con los lípidos que constituyen la bicapa lípidica, lo que conlleva a la pérdida de la organización membranal dando como resulta la lisis celular.

Los péptidos diseñados en este trabajo no interactúan de la misma manera con las células eucariotas y las procariotas, pues los porcentajes de liberación de calceína se duplican para vesículas cargadas negativamente en comparación a las zwitteriónicas.

En resumen en este trabajo se obtuvieron cuatro péptidos híbridos, en base a las secuencias de los péptidos hadrurina y vejovina, con mejor efecto microbicida y menor actividad citotóxica que inclusive llegan a tener mejores propiedades que algunos péptidos reportados en la literatura. Por tanto, los derivados sintéticos de este trabajo tienen el potencial para emplearse como agentes antimicrobianos.

10. PERSPECTIVAS

1. Estudiar el espectro de acción antimicrobiana de los péptidos sintéticos llevando a cabo ensayos de concentración mínima inhibitoria en organismos como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*.
2. Analizar los péptidos F4A y F4B por espectroscopía de dicroísmo circular y de esta forma obtener su estructura secundaria.
3. Probar la toxicidad en líneas celulares neoplásicas.
4. Realizar estudios de RMN para investigar la interacción péptido-membrana biológica.
5. Probar la actividad antibiótica en modelos animales *in vivo*.

11. REFERENCIAS

- 1 Yoneyama H & Ryoichi K (2006) Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1060-1075.
- 2 Fischbach M a & Walsh CT (2009) Antibiotics for emerging pathogens. *Science (New York, N.Y.)* **325**, 1089-93.
- 3 Pública INDS (2010) Regulación y promoción para el uso adecuado de antibióticos en México Propuesta de lineamientos. *Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica* **1**, 1-17.
- 4 Walsh CT (2003) Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. *ASM Press USA*.
- 5 Taylor PL & Wright GD (2008) Novel approaches to discovery of antibacterial agents. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* **9**, 237-46.
- 6 Wright GD & Sutherland AD (2007) New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends in molecular medicine* **13**, 260-7.
- 7 Walsh FM & Amyes SGB (2004) Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Current opinion in microbiology* **7**, 439-44.
- 8 Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B & Bartlett J (2009) Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **48**, 1-12.
- 9 Benavides-Plascencia L, Leonardo Aldama-Ojeda A & Javier Vázquez H (2005) Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud Pública de México* **47**, 219-226.
- 10 Kaye K & Kaye D (2000) Multidrug-resistant Pathogens: Mechanisms of Resistance and Epidemiology. *Current infectious disease reports* **2**, 391-398.
- 11 Tenover FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine* **119**, S3-10; discussion S62-70.
- 12 Silva-sánchez J (1996) Mechanisms of antibiotic resistance. *Current therapeutic research* **57**, 30-35.
- 13 Sánchez JS & Ramos RD (2006) Resistencia a antibióticos. *Revista Latinoamericana de microbiología* **48**, 105-112.

- 14 Marr AK, Gooderham WJ & Hancock RE (2006) Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current opinion in pharmacology* **6**, 468-72.
- 15 Infectious Diseases Society Of America I (2004) Bad Bugs, No Drugs. *New York*.
- 16 Peláez F (2006) The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-can history repeat? *Biochemical pharmacology* **71**, 981-90.
- 17 Jenssen H, Hamill P & Hancock REW (2006) Peptide antimicrobial agents. *American Society for Microbiology* **19**, 491-511.
- 18 Venugopal D, Klapper D, Srouji AH, Bhonsle JB, Borschel R, Mueller A, Russell AL, Williams BC & Hicks RP (2010) Novel antimicrobial peptides that exhibit activity against select agents and other drug resistant bacteria. *Bioorganic & medicinal chemistry* **18**, 5137-47.
- 19 Hancock RE & Chapple DS (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **43**, 1317-23.
- 20 Epanand RM & Vogel HJ (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 11-28.
- 21 Andreu D & Rivas L (1998) Animal Antimicrobial Peptides: An Overview. *Biopolymers* **47**, 415-433.
- 22 Hancock REW & Rozek A (2002) Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS microbiology letters* **206**, 143-9.
- 23 Hale JDF & Hancock REW (2007) Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert review of anti-infective therapy* **5**, 951-9.
- 24 Giuliana A & , G. Pirri, A. Bozzi , A. Di Giulio, M. Aschi ACR (2008) Visions & Reflections (Minireview) Antimicrobial peptides : natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 2450 - 2460.
- 25 Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides : pore formers or metabolic inhibitors in bacteria ? *Nature Reviews Microbiology* **3**, 238-250.
- 26 Sato H & Feix JB (2006) Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1758**, 1245-56.
- 27 Bechinger B (1999) The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 157-83.
- 28 Perron GG, Zasloff M & Bell G (2006) Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **273**, 251-6.

- 29 Koczulla AR & Bals R (2003) Antimicrobial Peptides Current Status and Therapeutic Potential. *Drugs* **63**, 389-406.
- 30 Hancock RE (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet infectious diseases* **1**, 156-64.
- 31 Sang Y & Blecha F (2008) Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* **9**, 227-35.
- 32 Plessis LH du, Elgar D & Plessis JL du (2008) Southern African scorpion toxins: an overview. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **51**, 1-9.
- 33 Zhijian C, Feng L, Yingliang W, Xin M & Wenxin L (2006) Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **47**, 348-55.
- 34 Possani LD, Becerril B, Delepierre M & Tytgat J (1999) Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *European journal of biochemistry / FEBS* **264**, 287-300.
- 35 Gao B, Tian C & Zhu S (2007) Inducible antibacterial response of scorpion venom gland. *Peptides* **28**, 2299-2305.
- 36 Díaz P, D'Suze G, Salazar V, Sevcik C, Shannon JD, Sherman NE & Fox JW (2009) Antibacterial activity of six novel peptides from Tityus discrepans scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **54**, 802-17.
- 37 Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS & Nakajima T (2001) Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion Pandinus imperator. *Society* **45**, 35-45.
- 38 Dai L, Corzo G, Naoki H, Andriantsiferana M & Nakajima T (2002) Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion Opisthacanthus madagascariensis. *Biochemical and biophysical research communications* **293**, 1514-22.
- 39 Conde R, Zamudio FZ & Rodr MH (2001) Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Letters* **471**, 165-168.
- 40 Hernández-Aponte C a, Silva-Sanchez J, Quintero-Hernández V, Rodríguez-Romero A, Balderas C, Possani LD & Gurrola GB (2011) Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of Vaejovis mexicanus. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* **57**, 84-92.
- 41 Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ & Possani LD (2000) Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion Hadrurus aztecus. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 5023-31.

- 42 Peters BM, Shirliff ME & Jabra-Rizk MA (2010) Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? *PLoS Pathogens* **6**, e1001067.
- 43 Dathe M & Wieprecht T (1999) Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 71-87.
- 44 Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT & Hodges RS (2007) Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**, 1398-406.
- 45 Sato H & Feix JB (2008) Lysine-enriched cecropin-mellitin antimicrobial peptides with enhanced selectivity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **52**, 4463-5.
- 46 Stark M, Liu L-ping & Deber CM (2002) Cationic Hydrophobic Peptides with Antimicrobial Activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**, 3585-3590.
- 47 Zelezetsky I & Tossi A (2006) Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et biophysica acta* **1758**, 1436-49.
- 48 Eley A, Ibrahim M, Kurdi SE & Conlon JM (2008) Activities of the frog skin peptide, ascaphin-8 and its lysine-substituted analogs against clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing bacteria. *Peptides* **29**, 25-30.
- 49 Conlon JM, Galadari S, Raza H & Condamine E (2008) Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the naturally occurring frog skin peptides, ascaphin-8 and peptide XT-7. *Chemical biology & drug design* **72**, 58-64.
- 50 Conlon JM, Al-Ghaferi N, Abraham B & Leprince J (2007) Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. *Methods (San Diego, Calif.)* **42**, 349-57.
- 51 Giangaspero A, Sandri L & Tossi A (2001) Amphipathic a helical antimicrobial peptides A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5589-5600.
- 52 Yount NY, Bayer AS & Xiong YQ Advances in Antimicrobial Peptide Immunobiology. *Biopolymers* **84**, 435-458.
- 53 Sharma RK, Sundriyal S, Wangoo N, Tegge W & Jain R (2010) New antimicrobial hexapeptides: synthesis, antimicrobial activities, cytotoxicity, and mechanistic studies. *ChemMedChem* **5**, 86-95.
- 54 Hancock RE & Lehrer R (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in biotechnology* **16**, 82-8.
- 55 Zaiou M (2007) Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **85**, 317-29.

- 56 Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD & Hochstrasser DF (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **112**, 531-52.
- 57 Gautier R, Douguet D, Antony B & Drin G (2008) HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics (Oxford, England)* **24**, 2101-2.
- 58 Liwo a, Pincus MR, Wawak RJ, Rackovsky S & Scheraga HA (1993) Prediction of protein conformation on the basis of a search for compact structures: test on avian pancreatic polypeptide. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2**, 1715-31.
- 59 Chou PY & Fasman GD (1974) Conformational Parameters for Amino Acids in Helical, beta-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. *Biochemistry* **13**, 211-222.
- 60 Garnier, Jean; Gibrat J-FRB (1996) GOR Method for Predicting Protein Secondary Structure from Amino Acid Sequence. *Methods in Enzymology, Academic Press* **266**, 540-553.
- 61 Guermeur Y & Gallinari P (1997) Combinaison de Classifieurs Statistiques, Application à la Prédiction de la Structure Secondaire des Protéines = Statistical Classifier Combination, Application to Protein Secondary Structure Prediction. , 169.
- 62 Pollastri G & McLysaght A (2005) Porter: a new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**, 1719-20.
- 63 Ouali M & King RD (2000) Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein science : a publication of the Protein Society* **9**, 1162-76.
- 64 Bryson K, McGuffin LJ, Marsden RL, Ward JJ, Sodhi JS & Jones DT (2005) Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic acids research* **33**, W36-8.
- 65 Christophe Geourjon GD (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer Applications in the Biosciences*, 681-4.
- 66 B. MR (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 2149-2154.
- 67 Biochem N (2000) 2000 Catalog. *Nova Biochem Biosciences Inc.*
- 68 Aponte CAH (2009) Búsqueda, identificación y caracterización de componentes de venenos de alacranes mexicanos con actividad antibacteriana. *Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigación en Biotecnología.*
- 69 W Chan, W C Chan PDW (2000) Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. *Oxford University Press, USA.*
- 70 Richard R Burgess MPD (1990) Guide to Protein Purification. *Methods in Enzymology, Academic Press* **182**, 50-55.

- 71 Wikins TD, Holdeman LV, Abramson IJ & Moore WE (1972) Standardized single-disc method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1**, 451-9.
- 72 Bush K, Dudley MN & Hecht DW (2009) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Eighth Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute* **29**, M7-A8.
- 73 Rodríguez MC, Margos G, Compton H, Ku M, Lanz H, Rodríguez MH & Sinden RE (2002) Plasmodium berghei: routine production of pure gametocytes, extracellular gametes, zygotes, and ookinetes. *Experimental parasitology* **101**, 73-6.
- 74 Greenfield NJ (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols* **1**, 2876-90.
- 75 Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63.
- 76 François Denizot RL (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* **89**, 271-277.
- 77 Wieprecht T, Apostolov O & Seelig J (2000) Binding of the antibacterial peptide magainin 2 amide to small and large unilamellar vesicles. *Biophysical chemistry* **85**, 187-98.
- 78 Belokoneva O (2003) The hemolytic activity of six arachnid cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine-to-sphingomyelin ratio in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1617**, 22-30.
- 79 Meza RDCN (2011) Síntesis Química de Variantes del Péptido "Hadrurina" con Actividad Antimicrobiana, aislado del Veneno del Alacrán Hadrurus gertschi. *Universidad Autónoma de Chiapas*.
- 80 Tian Z-gang, Dong T-tang, Teng D, Yang Y-lin & Wang J-hua (2009) Design and characterization of novel hybrid peptides from LFB15(W4,10), HP(2-20), and cecropin A based on structure parameters by computer-aided method. *Applied microbiology and biotechnology* **82**, 1097-103.
- 81 Langham A a, Khandelia H, Schuster B, Waring AJ, Lehrer RI & Kaznessis YN (2008) Correlation between simulated physicochemical properties and hemolysis of protegrin-like antimicrobial peptides: predicting experimental toxicity. *Peptides* **29**, 1085-93.
- 82 Tachi T, Epand RF, Epand RM & Matsuzaki K (2002) Position-dependent hydrophobicity of the antimicrobial magainin peptide affects the mode of peptide-lipid interactions and selective toxicity. *Biochemistry* **41**, 10723-31.
- 83 Lee S-H, Kim S-J, Lee Y-S, Song M-D, Kim I-H & Won H-S (2011) De novo generation of short antimicrobial peptides with simple amino acid composition. *Regulatory Peptides* **166**, 36-41.

- 84 Jiang Z, Vasil AI, Hale JD, Hancock REW, Vasil ML & Hodges RS (2009) Effects of Net Charge and the Number of Positively Charged Residues on the Biological Activity of Amphipathic α -Helical Cationic Antimicrobial Peptides. *Biopolymers* **90**, 369-383.
- 85 Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT & Hodges RS (2007) Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**, 1398-406.
- 86 Wieprecht T, Beyermann M & Seelig J (2002) Thermodynamics of the coil-alpha-helix transition of amphipathic peptides in a membrane environment: the role of vesicle curvature. *Biophysical chemistry* **96**, 191-201.
- 87 Glukhov E, Stark M, Burrows LL & Deber CM (2005) Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 33960-7.
- 88 Kim S, Kim SS & Lee BJ (2005) Correlation between the activities of alpha-helical antimicrobial peptides and hydrophobicities represented as RP HPLC retention times. *Peptides* **26**, 2050-6.
- 89 Epand RM & Epand RF (2009) Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 289-94.
- 90 Polyansky A a, Vassilevski AA, Volynsky PE, Vorontsova OV, Samsonova OV, Egorova NS, Krylov NA, Feofanov AV, Arseniev AS, Grishin EV & Efremov RG (2009) N-terminal amphipathic helix as a trigger of hemolytic activity in antimicrobial peptides: a case study in laticins. *FEBS letters* **583**, 2425-8.
- 91 Chen Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock REW, Vasil ML & Hodges RS (2006) Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. *J Biol Chem.* **280**, 12316-12329.
- 92 Margitta Dathe, Torsten Wieprecht, Heike Nikolenko, Liselotte Handel, W. Lee Maloy, Dorothy L. MacDonald, Michael Beyermann MB (1997) Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Letters* **403**, 208-212.
- 93 Lee KH, Lee DG, Park Y, Kang D-I, Shin SY, Hahm K-S & Kim Y (2006) Interactions between the plasma membrane and the antimicrobial peptide HP (2-20) and its analogues derived from *Helicobacter pylori*. *The Biochemical journal* **394**, 105-14.
- 94 Belokoneva O (2003) The hemolytic activity of six arachnid cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine-to-sphingomyelin ratio in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1617**, 22-30.
- 95 Rosenfeld Y & Shai Y (2006) Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et biophysica acta* **1758**, 1513-22.

- 96 Rieg S, Huth A, Kalbacher H & Kern WV (2009) Resistance against antimicrobial peptides is independent of Escherichia coli AcrAB, Pseudomonas aeruginosa MexAB and Staphylococcus aureus NorA efflux pumps. *International journal of antimicrobial agents* **33**, 174-6.
- 97 McGwire BS & Kulkarni MM (2010) Interactions of antimicrobial peptides with Leishmania and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Experimental parasitology* **126**, 397-405.
- 98 Gao B, Xu J, Rodriguez MDC, Lanz-Mendoza H, Hernández-Rivas R, Du W & Zhu S (2010) Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion Mesobuthus eupeus. *Biochimie* **92**, 350-9.
- 99 Zhu S, Gao B, Aumelas A, Carmen Rodríguez M del, Lanz-Mendoza H, Peigneur S, Diego-Garcia E, Martin-Eauclaire M-F, Tytgat J & Possani LD (2010) MeuTXKbeta1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. *Biochimica et biophysica acta* **1804**, 872-83.
- 100 Moreira CK, Rodrigues FG, Ghosh A, Varotti FDP, Miranda A, Daffre S, Jacobs-Lorena M & Moreira LA (2007) Effect of the antimicrobial peptide gomesin against different life stages of Plasmodium spp. *Experimental parasitology* **116**, 346-53.
- 101 Kückelhaus S a S, Leite JRSA, Muniz-Junqueira MI, Sampaio RN, Bloch C & Tosta CE (2009) Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of Phyllomedusa azurea (Amphibia). *Experimental parasitology* **123**, 11-6.
- 102 Greenfield NJ (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols* **1**, 2876-90.
- 103 Perez-Iratxeta C & Andrade-Navarro MA (2008) K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC structural biology* **8**, 25.
- 104 Yamamoto N & Tamura A (2010) Designed low amphipathic peptides with alpha-helical propensity exhibiting antimicrobial activity via a lipid domain formation mechanism. *Peptides* **31**, 794-805.
- 105 Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J & Kroemer G (2011) Cell death assays for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **10**, 221-37.
- 106 Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL & McLaughlin ML (1996) De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of medicinal chemistry* **39**, 3107-13.
- 107 Venugopal D, Klapper D, Srouji AH, Bhonsle JB, Borschel R, Mueller A, Russell AL, Williams BC & Hicks RP (2010) Novel antimicrobial peptides that exhibit activity against select agents and other drug resistant bacteria. *Bioorganic & medicinal chemistry* **18**, 5137-47.
- 108 Holz GG (1977) Lipids and the malarial parasite. *Bulletin of the World Health Organization* **55**, 237-48.

- 109 Zhang L, Rozek A & Hancock RE (2001) Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *The Journal of biological chemistry* **276**, 35714-22.
- 110 Cheng JTJ, Hale JD, Elliott M, Hancock REW & Straus SK (2011) The importance of bacterial membrane composition in the structure and function of aurein 2.2 and selected variants. *Biochimica et biophysica acta* **1808**, 622-33.
- 111 Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 55-70.
- 112 Chou H-T, Wen H-W, Kuo T-Y, Lin C-C & Chen W-J (2010) Interaction of cationic antimicrobial peptides with phospholipid vesicles and their antibacterial activity. *Peptides* **31**, 1811-20.
- 113 Shimanouchi T, Ishii H, Yoshimoto N, Umakoshi H & Kuboi R (2009) Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **73**, 156-60.
- 114 Cheng JTJ, Hale JD, Elliot M, Hancock REW & Straus SK (2009) Effect of membrane composition on antimicrobial peptides aurein 2.2 and 2.3 from Australian southern bell frogs. *Biophysical journal* **96**, 552-65.
- 115 Dawson RM & Liu C-Q (2008) Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents. *Critical reviews in microbiology* **34**, 89-107.
- 116 McGwire BS & Kulkarni MM (2010) Interactions of antimicrobial peptides with Leishmania and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Experimental parasitology* **126**, 397-405.

12. APÉNDICE

Tabla 1. Características de los aminoácidos. Modificado de [115]

Amino ácido	Código (3 letras)	Código (1 letra)	Peso Molecular (Da)	Estructura	Carga	Propiedades
Alanina	Ala	A	89.1	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofóbico
Arginina	Arg	R	174.2	$\text{NH}_2\text{-(C=NH)-NH}(\text{CH}_2)_3\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-CO}_2\text{H}$	Positiva	Hidrofílico
Asparagina	Asn	N	132.1	$\text{NH}_2\text{-(C=O)-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofílico
Ác. Aspártico	Asp	D	133.1	$\text{NH}_2\text{-(CH-CO}_2\text{H)-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$	Negativa	Hidrofílico
Cisteína	Cys	C	121.1	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-SH})\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofóbico
Ác. Glutámico	Glu	E	147.1	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CO}_2\text{H})\text{-(CH}_2)_2\text{-CO}_2\text{H}$	Negativa	Hidrofílico
Glutamina	Gln	Q	146.1	$\text{NH}_2\text{-(C=O)-(CH}_2)_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofílico
Glicina	Gli	G	75.1	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Amfipático
Histidina	His	H	155.2	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-imidazol})\text{-CO}_2\text{H}$	Positiva	Hidrofílico
Isoleucina	Ile	I	131.2	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_3)\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofóbico
Leucina	Leu	L	131.2	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_3)\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofóbico
Lisina	Lys	K	146.2	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_4\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-CO}_2\text{H}$	Positiva	Hidrofílico
Metionina	Met	M	149.2	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3)\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofóbico
Fenilalanina	Phe	F	165.2	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-bencilo})\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofóbico
Prolina	Pro	P	115.1	Ác. pirrolidin-2-carboxílico	Neutra	Hidrofóbico
Serina	Ser	S	105.1	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-OH}$	Neutra	Hidrofílico
Treonina	Thr	T	119.1	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CHOH-CH}_3)\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofílico
Triptófano	Trp	W	204.2	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-indol})\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofóbico
Tirosina	Tyr	Y	181.2	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{-}p\text{-fenol})\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofóbico
Valina	Val	V	117.1	$\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_3)\text{-CO}_2\text{H}$	Neutra	Hidrofóbico

Tabla 2. Rendimiento de la síntesis química.

Péptido	No. aa	Secuencia	Rendimiento global
F1A	28	GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAV	30%
F1B	29	GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAVA	33%
F2A	23	IKSIASKVANTVQKLKRKAKNAV	42%
F2B	24	IKSIASKVANTVQKLKRKAKNAVA	26.46%
F3A	20	IASKVANTVQKLKRKAKNAV	22.8%
F3B	21	IASKVANTVQKLKRKAKNAVA	40.45%
F4A	17	KVANTVQKLKRKAKNAV	73.25%
F4B	18	KVANTVQKLKRKAKNAVA	74.5%
F5A	10	KLKRKAKNAV	76.3%
F5B	11	KLKRKAKNAVA	78.4%
P18K	18	GILKTIKSIAS-----KLKRVAK	82.66%
P18K3N	18	GILNTIKSIAS-----KLKRVAK	79.8%

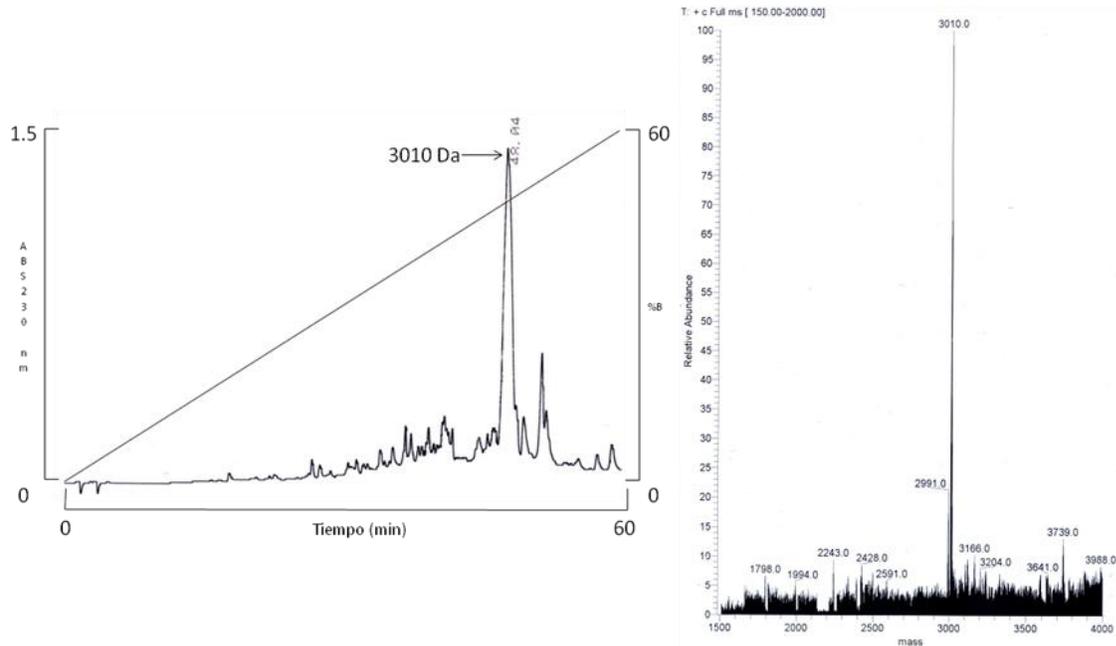


Figura 1. Purificación del fragmento 1A (indicado por flecha y su respectiva masa molecular) con un tiempo de elución 48.04 min, seguido de su respectivo espectro de masas.

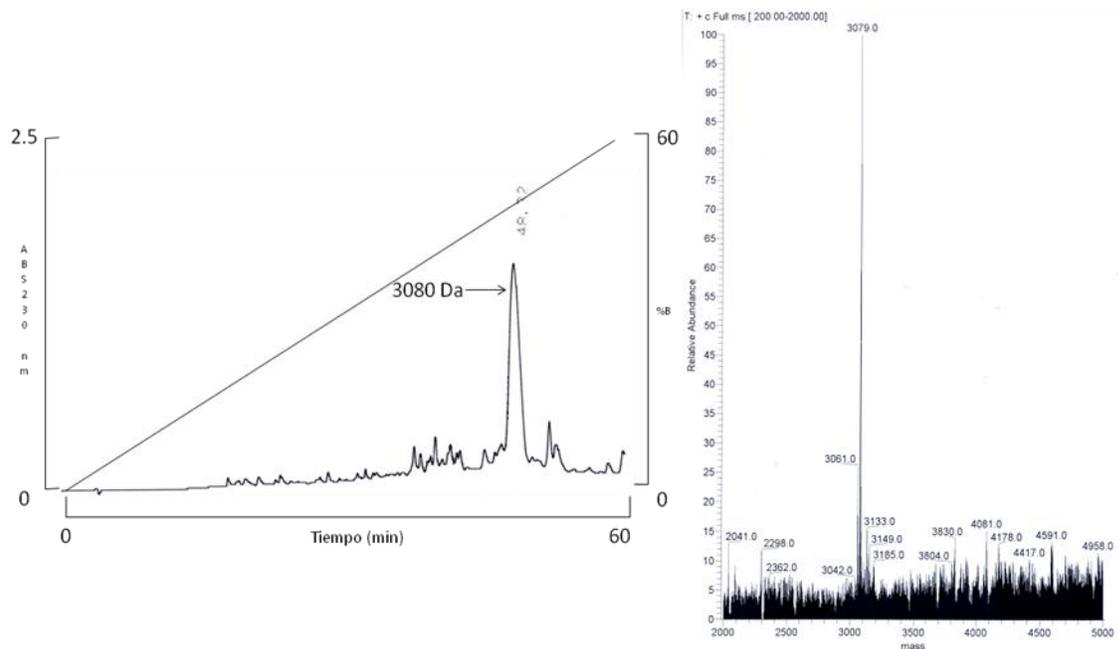


Figura 2. Purificación del fragmento 1B (indicado por flecha y su respectiva masa molecular) con un tiempo de elución 48.32 min, seguido de su respectivo espectro de masas.

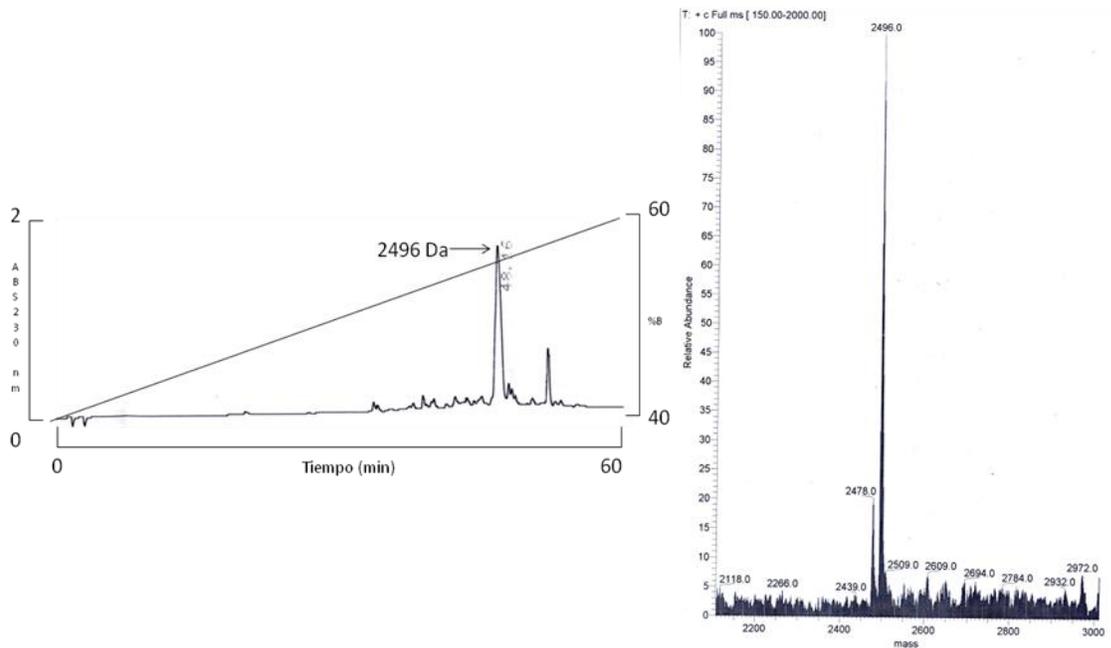


Figura 3. Purificación del fragmento 2A (indicado por flecha y su respectiva masa molecular) con un tiempo de elución 48.96 min, seguido de su respectivo espectro de masas.

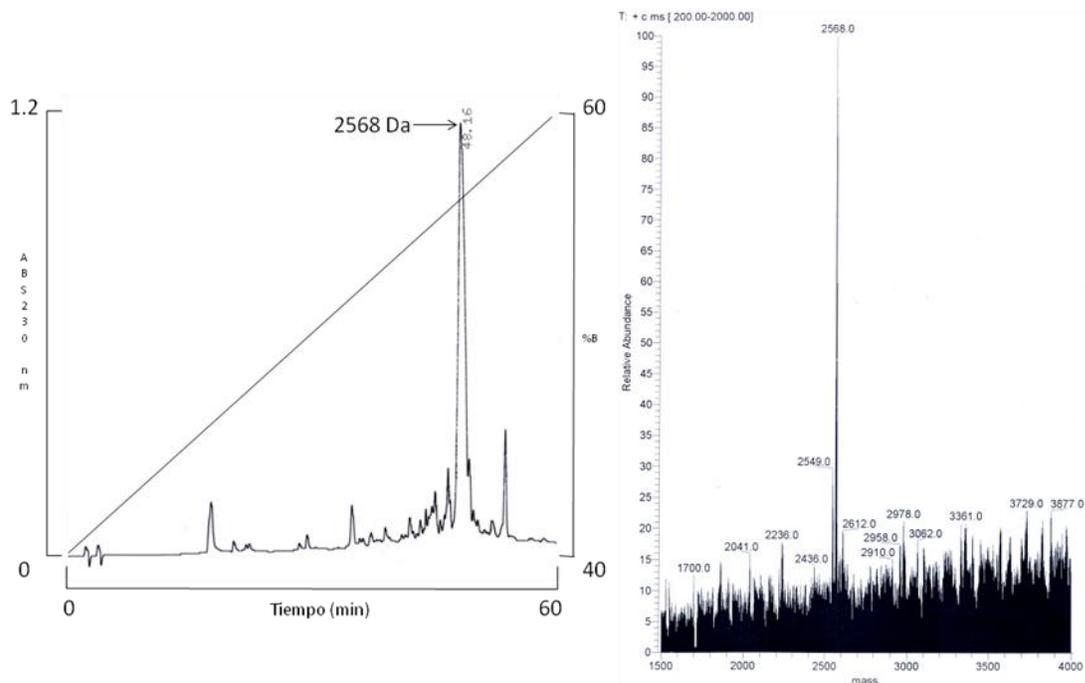


Figura 4. Purificación del fragmento 2B (indicado por flecha y su respectiva masa molecular) con un tiempo de elución 48.16 min, seguido de su respectivo espectro de masas.

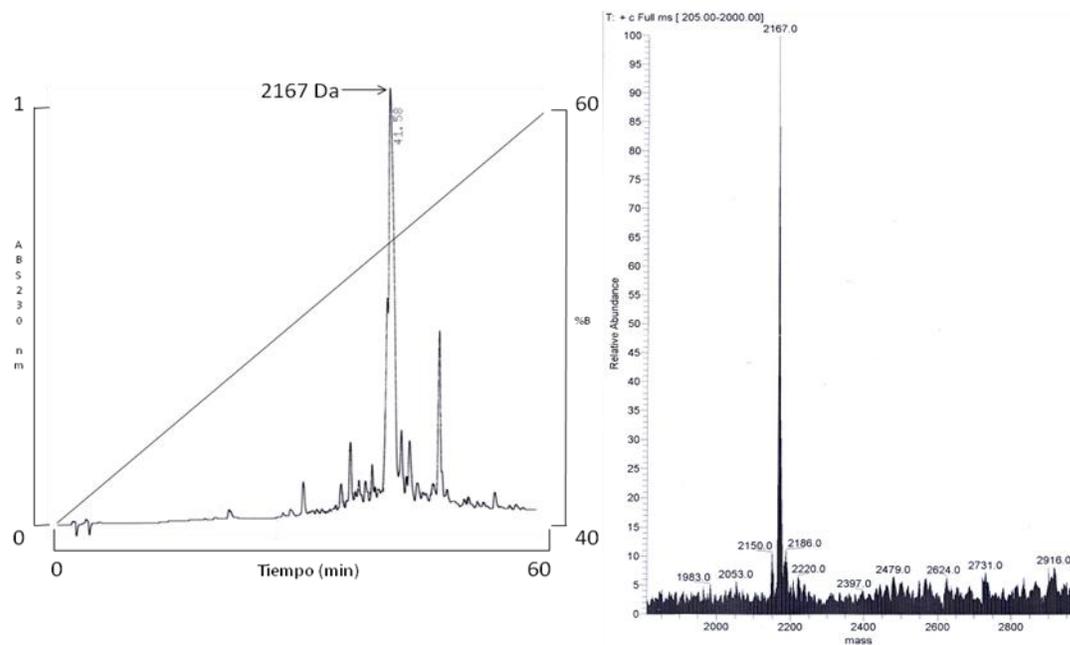


Figura 5. Purificación del fragmento 3A (indicado por flecha y su respectiva masa molecular) con un tiempo de elución 41.58 min, seguido de su respectivo espectro de masas.

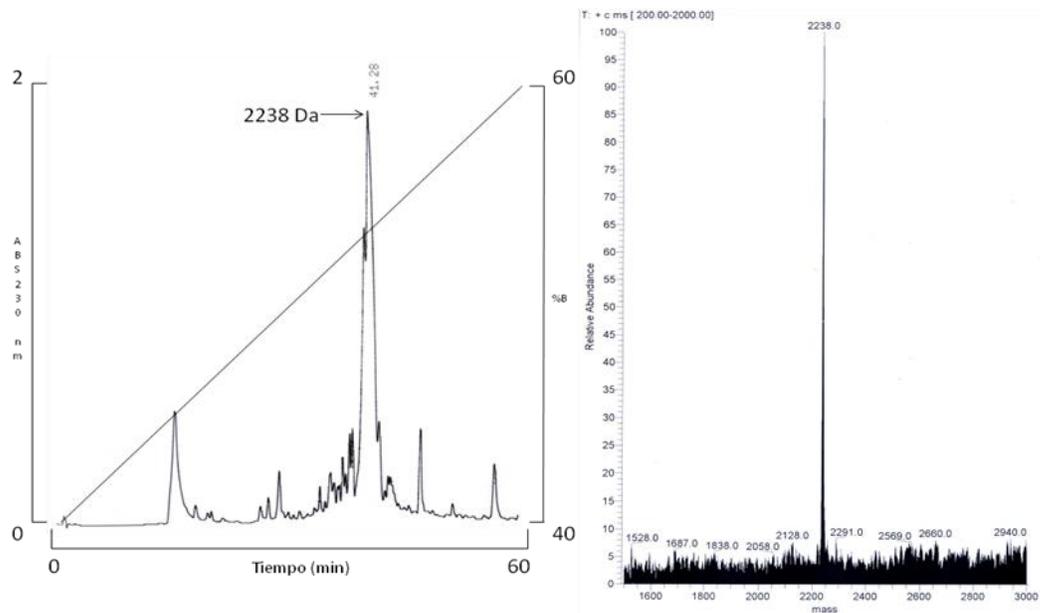


Figura 6. Purificación del fragmento 3B (indicado por flecha y su respectiva masa molecular) con un tiempo de elución 41.28 min, seguido de su respectivo espectro de masas.

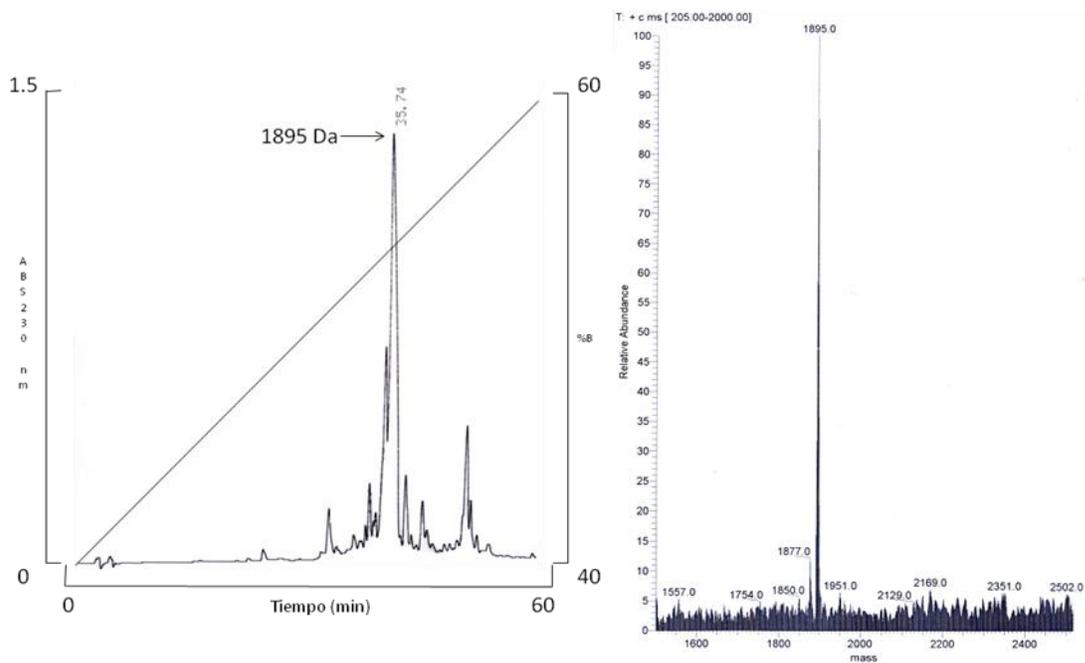


Figura 7. Purificación del fragmento 4A (indicado por flecha y su respectiva masa molecular) con un tiempo de elución 35.74 min, seguido de su respectivo espectro de masas.

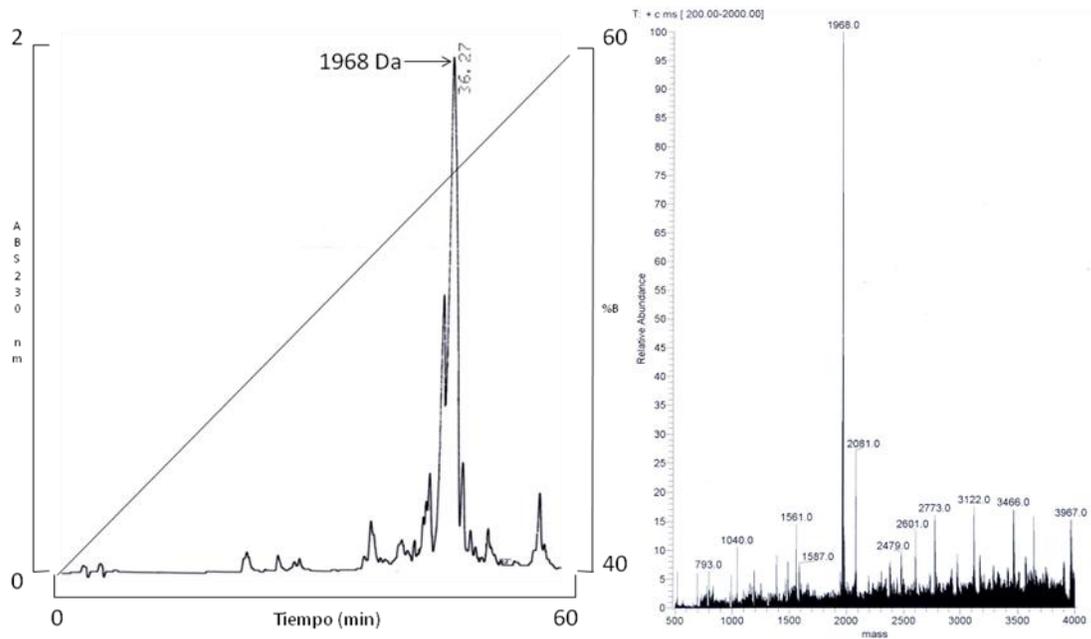


Figura 8. Purificación del fragmento 4B (indicado por flecha y su respectiva masa molecular) con un tiempo de elución 36.27 min, seguido de su respectivo espectro de masas.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana/hemolítica de algunos péptidos antimicrobianos.[115]

Péptido	Organismos Gram +		Organismos Gram –		MHC ^c	MHC/MIC ^d
	Identidad ^a	MIC ^c	Identidad ^b	MIC ^c		
A3-NT	1, 2, 3	0.8–3.1	1, 2, 3, 4	0.4–3.1	>100	>32→250
AP1	1	3,000				
AR-1	1, 2	2–4	1, 2	2–8	>1	<1
AR-1-S	1, 2	4–8	1, 2	8–16	>1	<1
Aurelina	4	22.6	1	7.7		
Brevinina-2Gha	1, 3	15→ 64, 4.4–>19				
Brevinina-2Ghb	1, 3	16.5→ 64, 5.4–>21	1	8.2 2.7		
Brevinina-2Ghc	1, 3	10→ 64, 3→20	1	10–20, 3–6		
Cecropina P1	5–7	0.9→3.6	1, 5–7	0.06→3.6		
CP	1, 3	1.6–3.2	1, 3, 8	0.8–1.6	>100	>31→ 62
CSP	8–10	51→ 60				
CSPC ₁₆	8–10	>60				
G2	8–10	12–41				
C16G2	8–10	3–23.5				
CSP _{M8}	8–10	>60				
D28	1, 11, 12	8–16				
D51	1, 11, 12	8–16				
DCD-1L ^e	1, 1b, 2	6–180, 1.2–35	1, 2	30→200, 6.2–>41	>100	>16.7
Drosocina	1b, 7, 11, 13–16	6→100	1, 2, 3, 9–25	6→100		
Drocosina	1b, 7, 11, 13–16	3→100	1, 2, 3, 9–25	3→100		
Drocosina (análogo 4)	1b, 7, 11, 13–16	3→100	1, 2, 3, 9–25	3→100		
Drocosina (análogo 14)	1b, 7, 11, 13–16	3→100	1, 2, 3, 9–25	3→100		
Euminitina	1–3, 14, 17	6→60	1, 2, 26, 27	6→60	<1,000	<17– <167
Fowlicidina (análogos)	1, 4	0.5–14	1, 28	2–8	1→440	0.5→32
G10KHc			2	0.5–29		
GS (Gramicidina)	2, 18,19	0.7–3	1, 2	3–20	12.5	4–18
GS14	2, 18,19	2–175	1, 2	≥200	1.5	0.01–0.7
GS14K4	2, 18,19	1.5–6.2	1, 3–6	3–25	200	32–133
GS14K4:V3/A3	2, 18,19	3→200	1, 2	6–150	>800	4–520
Guentherina	1, 3	36→64, 11→20				
HBD3	1, 2, 8, 10 20–26	1.6–16	1, 2, 10, 22, 29–38	0.1→250		
HBD3	8, 10, 25–27	5→250	1, 35, 36	4.5→250		
HNP-1	1,1b,2–4,18b	2–40	1, 2, 3, 4, 27, 30, 33	2→250		
HNP-1	11	0.85–25				
HP-A3	1, 2, 3	1.6–3.1	1, 2, 3, 4	0.4–3.1		
Hepcidina ^f	3	11	1	19		
IN (Indolicidina)	1, 1b, 2	1	1, 2, 2b	8–16	25	1.6–3.1
Ink	1, 1b, 2	1–2	1, 2, 2b	2–8	>200	>25→100
K9CATH	1, 4	0.4–44	1, 2, 3, 10, 16, 27, 49	0.06–44	>100	>2.3→250

Péptido	Organismos Gram +		Organismos Gram –		MHC ^c	MHC/MIC ^d
	Identidad ^a	MIC ^c	Identidad ^b	MIC ^c		
Laticeptina	1, 2, 18	>200	1, 2, 10, 26, 27	50–100	<400	<2
LEK-45 ^e	1, 1b, 2	180→200, 40–>44	1, 2	>200 >44	>100	
LL-37 ^e	1, 1b, 2	0.9–9, 0.2–2.0	1, 2	1–9, 0.2–2.0	≈100	11–100
LL-37	1, 2–4, 18, 22, 24, 28	0.2–30, 1→32	1, 2, 3, 4, 10, 27, 30, 33, 35, 39, 40–43	0.2–16, 2.8→32		
LL-37	1, 1b, 2–4, 18b	1.5–8	1, 2, 3, 4, 27, 30, 33	0.1→79		
M8G2	8–10	3.25–20				
Nisina	1b, 18b	4				
NK23c	1	256	1, 2 19, 31, 44, 45	2–16	<10	<1
Novispirina G10			2	10–60		
Odorranaina-NR	1	9.4	1, 46	37.5→100	>100	>2.7→10.6
Oncorhyncina III	3, 5–7	0.06–0.50	1, 5–7	0.25→0.5	1.0	2–16.7
P5	1, 3	1.6–3.1	1, 2, 3	0.8–3.1	>100	>32→64
P10	1, 3	6–12.5	1, 2, 3	1.6–12.5	>100	>8→16
P11	1, 3	3–6	1, 2, 3	1.6–6	>100	>16→32
P-113	1	12.5	2, 30, 33, 50	3→100		
PAF26	1, 28	<5–30	1	20	>100	>3.3→20
P20	1, 28	≥75	1	>75		
KR20	1, 28	<5–50	1	5	>100	>2→20
PAF26:KR20	1, 28	<5–30	1	10		
P20:KR20	1, 28	<5–30	1	10		
Pep-1-K	1, 1b, 2–3	1–2	1, 2, 2b, 3	1–2	>200	>200
Perinerina	1, 29	1.5–50	1, 2	3–21		
Pilosulina (análogo P1)	1, 1b, 2, 6, 30–32	2–8	1, 2, 10, 30, 34	2–8	<10	<1.25– <5
Pilosulina (análogo P2)	1, 1b, 2, 6, 30–32	1–8	1, 2, 10, 30, 34	1–4	<10	<1.25– <5
Protegrina 1	1	6	1, 2	3	< <100	
Protegrina 1	11	1.1–1.3				
Pseudina-2 análogos	1, 2, 18, 28	10→160	1, 1b, 2, 26, 27, 32	2.5→80	<95	<38
RC-1	11	0.7–0.9				
RC-2	11	0.3–0.5				
RC-3	11	0.9–7.7				
RTD-1	11	0.4–1.0				
RTD-2	11	0.3–0.7				
RTD-3	11	0.7–1.6				
Sgl-29	1	>30	1, 2	1.1–3.8	>200	
SSL 23	1, 1b, 2	8→200, 3.6→89	1, 2	10→200, 3.6→89	>100	>12.5
SSL 25	1, 1b, 2	6→200, 2.5→82	1, 2	9–200, 3.7–83	>100	>16.7
SSL 29	1, 1b, 2	>180→200, >62→69	1, 2	>200 >69	>100	
STP	1, 1b, 2	0.5–1	1, 2, 2b	2–8	100	100–200
STPk	1, 1b, 2	0.5–2	1, 2, 2b	1–8	>200	>100→400
Tachyplepsina I	1	2	1, 2	1–2	< <100	
Tachyplepsina II	1	5.6	1, 47, 48	5–14		

Péptido	Organismos Gram +		Organismos Gram –		MHC ^c	MHC/MIC ^d
	Identidad ^a	MIC ^c	Identidad ^b	MIC ^c		
Temporina-GH	1,3	44→64, 31→45				
Tobramycina			2	0.4–55		
TP	1, 2, 3	1–8	1, 2, 3	8	>5	>0.6→5
TP	1, 1b, 2	1–2	1, 2, 2b	8–32	50	25–50
TPI	1, 2, 3	1–16	1, 2, 3	8–16	>1	>0.06→1
TPf	1, 2, 3	1–8	1, 2, 3	8	>1	>0.1→1
TPk	1, 2, 3	1–4	1, 2, 3	2–4	>200	>50→200
TPk	1, 1b, 2	0.5–1	1, 2, 2b	2–8	>200	>25→100
TPK	1, 2, 3	0.5–2	1, 2, 3	2–4	>5	>2.5→10
Tritrpticin	1, 2, 3	4–16	1, 2, 3	8–16		
V681	1, 2, 3, 18	3–6	1, 2, 3	3–12.5	7.8	1.2–2.5
D-V681	1, 2, 3, 18	1.6–6	1, 2, 3	3–12.5	7.8	1.2–4.9
V13A _D	1, 2, 3, 18	1.6–12.5	1, 2, 3	1.6–12.5	31.3	2.5–20
D-V13A _D	1, 2, 3, 18	1.6–12.5	1, 2, 3	3–12.5	31.3	2.5–20
V13K _L	1, 2, 3, 18	1.6–50	1, 2, 3	3–6	250	5–156
D-V13K _D	1, 2, 3, 18	3–12.5	1, 2, 3	3–6	250	20–83
V13K _L			2	8–250	250	1–31

a. Bacteria Gram positiva:

- | | |
|--|--|
| 1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 18. <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 1b. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina | 18b. <i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina |
| 2. <i>Staphylococcus epidermis</i> | 19. <i>Corynebacterium xerosis</i> |
| 3. <i>Bacillus subtilis</i> | 20. <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| 4. <i>Listeria monocytogenes</i> | 21. <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| 5. <i>Aerococcus viridians</i> | 22. <i>Enterococcus faecium</i> |
| 6. <i>Micrococcus luteus</i> | 23. <i>Streptococcus sobrinus</i> |
| 7. <i>Plantococcus citreus</i> | 24. <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| 8. <i>Streptococcus mutans</i> | 25. <i>Actinomyces naeslundii</i> |
| 9. <i>Streptococcus gordonii</i> | 26. <i>Actinomyces Israeli</i> |
| 10. <i>Streptococcus sanguinis</i> | 27. <i>Peptostreptococcus micros</i> |
| 11. <i>Bacillus anthracis</i> | 28. <i>Streptococcus</i> grupo B |
| 12. <i>Bacillus cereus</i> | 29. <i>Bacillus megaterium</i> |
| 13. <i>Bacillus globigii</i> | 30. <i>Staphylococcus simulans</i> |
| 14. <i>Bacillus thuringiensis</i> | 31. <i>Staphylococcus haemolyticus</i> |
| 15. <i>Streptococcus faecalis</i> | 32. <i>Enterococcus</i> sp. |
| 16. <i>Clostridium botulinum</i> A | |
| 17. <i>Staphylococcus saprophytius</i> | |

b. Bacteria Gram negativa:

- | | |
|--|-----------------------------------|
| 1. <i>Escherichia coli</i> | 9. <i>Enterobacter aerogenes</i> |
| 1b. <i>Escherichia coli</i> resistente a antibiotico | 10. <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 11. <i>Shigella sonnei</i> |
| 2b. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi resistente | 12. <i>Erwinia chrysantemi</i> |
| 3. <i>Salmonella typhimurium</i> | 13. <i>Erwinia herbicola</i> |
| 4. <i>Proteus vulgaris</i> | 14. <i>Salmonella panama</i> |
| 5. <i>Aeromonas hydrophila</i> | 15. <i>Salmonella infantis</i> |
| 6. <i>Aeromonas salmonicida</i> | 16. <i>Salmonella enteritidis</i> |
| 7. <i>Listonella (Vibrio) anguillarum</i> | 17. <i>Salmonella Montevideo</i> |
| 8. <i>Salmonella pullorum</i> | 18. <i>Salmonella give</i> |

19. *Yersinia pestis*
20. *Yersinia pseudotuberculosis*
21. *Vibrio cholera*
22. *Serratia marsencens*
23. *Erwinia carotovora atroseptica*
24. *Neisseria meningitides*
25. *Moraxella catarrhallis*
26. *Enterobacter cloacae*
27. *Proteus mirabilis*
28. *Salmonella enteric*
29. *Pseudomona putida*
30. *Stenotrophomonas maltophilia*
31. *Acinetobacter baumannii*
32. *Haemophilus influenza*
33. *Burkholderia cepacia*
34. *Citrobacter freundii*
35. *Actinobacillus actinomycetemcimitans*
36. *Porphyromonas gingivalis*
37. *Porphyromonas micros*
38. *Fusobacterium nucleatum*
39. *Salmonella Minnesota*
40. *Capnocytophaga ochracea*
41. *Capnocytophaga sputigena*
42. *Capnocytophaga gingivalis*
43. *Salmonella serovar Dublin*
44. *Bordetella bronchiseptica*
45. *Brucella abortus*
46. *Bacillus dysenteriae*
47. *Salmonella sp.*
48. *Shigella dysenteriae*
49. *Neisseria gonorrhoeae*
50. *Achromobacter xylosoxidans*

c. MIC= Concentración mínima inhibitoria en μM .

MHC=Concentración máxima no hemolítica en μM .

d. Proporción sólo para bacterias Gram positivas.

e. IC_{90} (Concentración a la cual mueren el 90% de microorganismos) reportado en lugar del MIC.

f. IC_{50} (Concentración a la cual mueren el 50% de microorganismos) reportado en lugar del MIC.

Tabla 4. Actividad *in vitro* de los péptidos antimicrobianos contra parásitos.[116]

Péptido	Parásito^a	Actividad antimicrobiana^b
Ranas		
<i>Dermaseptinas</i>		
Dermaseptina-1	<i>L. major</i> ; <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. chagasi</i> ; <i>L. mexicana</i> ; <i>T. cruzi</i> (T y E)	3+; 2+; 3+; 2-3+; 3-4+
DS-1 análogos	<i>L. major</i> ; <i>T. cruzi</i> (T y E)	2-3+; 3-4+
DShypo-01	<i>L. amazonensis</i>	4+
<i>Phylloseptinas</i>		
Phylloseptina-1	<i>L. amazonensis</i>	3-4+
<i>Temporinas</i>		
Temporina A	<i>L. donovani</i> and <i>L. pifanoi</i> (AA); <i>L. major</i> y <i>L. amazonensis</i>	2+; 0 ^c
Temporina B	<i>L. donovani</i> y <i>L. pifanoi</i> (AA); <i>L. major</i> y <i>L. amazonensis</i>	2+
Temporina-1Sa	<i>L. infantum</i> (P y A)	2+
Temporina-1Sb	<i>L. infantum</i> (P y A)	0
Temporina-1Sc	<i>L. infantum</i> (P y A)	0
<i>Bombininas</i>		
Bombinina H2	<i>L. donovani</i> y <i>L. pifanoi</i> (AA)	2+
Bombinina H4	<i>L. donovani</i> y <i>L. pifanoi</i> (AA)	2+
<i>Magaininas</i>		
Magainina-2	<i>L. donovani</i>	2+
Magainina-H1	<i>L. donovani</i>	3+
Magainina-H2	<i>L. donovani</i>	3+
Pexiganan	<i>L. amazonensis</i> y <i>L. major</i>	2+ ^c
MSI-94	<i>L. braziliensis</i> , <i>T. cruzi</i> (T y E)	0, 1+ (solamente E)
Magainina B	<i>T. cruzi</i> (T)	2+
Magainina H	<i>T. cruzi</i> (T)	0
Insectos		
<i>Cecropinas y melitinas</i>		
Cecropina A	Cepas <i>L. donovani</i> ; <i>T. cruzi</i> (MT)	0; 0
<i>Híbridos de cecropina A y melitina</i>		
CA(1-8)M(1-18)	<i>L. donovani</i>	4+
Sub-fragmentos	<i>L. donovani</i>	3-4+
CA(1-7)M(2-9)	<i>L. donovani</i> y <i>L. pifanoi</i> (AA)	3+ y 2+
N-Lípido-CA(1-7)M(2-9) ^d	<i>L. donovani</i> y <i>L. pifanoi</i> (AA)	3-4+ y 2-4+
<i>Cecropina B</i>		
SB-37	<i>T. cruzi</i> (T y A)	1+
Shiva-1	<i>T. cruzi</i> (T y A)	2+
DC-1	<i>T. cruzi</i> (T y A)	3+
DC-2	<i>T. cruzi</i> (T y A)	4+
DC-2R	<i>T. cruzi</i> (T y A)	3+
<i>Melitina (veneno de abeja)</i>	<i>L. donovani</i> ; <i>T. cruzi</i> (T y A)	4+; 3+ y 0
<i>Defensinas de escarabajo</i>	<i>T. brucei</i> y <i>T. congolense</i> (BF and PF)	1-2+
<i>Atacina (mosca tsetse)</i>	<i>T. brucei</i> (BF y PF)	4+
<i>Gomesina (tarántula)</i>	<i>L. amazonensis</i>	2-3+
<i>Defensina mosca de la arena (SD-1)</i>	<i>L. major</i> y <i>L. amazonensis</i>	0, 0 ^c
<i>Trialisina y sub-fragmentos</i>	<i>T. cruzi</i> (T)	2-4+

Péptido	Parásito^a	Actividad antimicrobiana^b
Animales acuáticos (no anfibios)		
<i>PAMs de mejillón</i>		
Fragmentos de defensina D y P	<i>L. major</i> y <i>T. brucei</i> (BF)	1-2+ y 2-3+
Fragmetnos de defensina B, Q y E	<i>L. major</i> y <i>T. brucei</i> (BF)	0
Myilitina A	<i>L. braziliensis</i> y <i>T. cruzi</i> (T y E)	1-2+ y 0
<i>Tachyplestina (Limulidae)</i>	<i>L. braziliensis</i> y <i>T. cruzi</i> (T y E)	3+ y 2-3+
<i>Clavanina A (Styela clavata)</i>	<i>L. braziliensis</i> y <i>T. cruzi</i> (T y E)	0
<i>PAMs de camarón</i>		
Factor Anti-LPS	<i>L. braziliensis</i> y <i>T. cruzi</i> (T y E)	0
Penaeidiano-3	<i>L. braziliensis</i> y <i>T. cruzi</i> (T y E)	0 and 1+ (solamente E)
Plantas		
<i>Tionina de trigo</i>	<i>L. donovani</i> (P y A)	3-4+ y 1+
<i>Defensina de papa (PTH-1)</i>	<i>L. donovani</i> (P y A)	1-2+
<i>Snakina 1 de papa</i>	<i>L. donovani</i> (P y A)	0
<i>Proteína de transferencia de lípido</i>	<i>L. donovani</i> (P y A)	0
<i>Barley</i>		
Mamíferos		
<i>Catelicidinas</i>		
Indolicidina (bovino)	<i>L. donovani</i>	4+
Mieloide AMP-18 (bovino)	Subespecies <i>L. donovani</i> , <i>T. brucei</i> (BF y PF) y <i>T. congolense</i> (PF)	1-2+, 2-4+ y 4+
Mieloide AMP-27 (bovino)	<i>T. brucei</i> (BF y PF)	3-4+
CRAMP (ratón)	<i>L. major</i> y <i>L. amazonensis</i>	1-2+ ^c
Protegrina-1 (porcino)	<i>L. major</i> y <i>L. amazonensis</i> ; <i>T. brucei</i> (BF y PF)	1-2+ ^c ; 1+ y 3+
SMAP-18, -29 (ovino)	<i>L. major</i> y <i>L. amazonensis</i> ; <i>T. brucei</i> (BF y PF)	1-2+ ^c ; 2+ y 1+
Defensinas		
Cryptdina-1 y -4 (humana)	<i>L. major</i> y <i>L. amazonensis</i> ; <i>T. brucei</i> (BF y PF)	1-2+ ^c ; 1-2+ y 0
β-Defensina-4; -1/2 (humana)	<i>L. major</i> y <i>L. amazonensis</i> ; <i>T. brucei</i> (BF y PF)	0; 1+
θ-Defensina-II	<i>L. major</i> y <i>L. amazonensis</i>	1-2+
<i>Otros</i>		
Péptidos de seminalplasma (bovino)	<i>L. donovani</i>	4+
Histatina 5 (humana)	<i>L. donovani</i> y <i>L. pifanoi</i> (AA)	2-3+
Polipéptido intestinal vasoactivo	<i>T. brucei</i> (BF y PF)	3+ y 0
Péptido activante de la adenilato ciclasa	<i>T. brucei</i> (BF y PF)	3+ y 0
Lisina NK	<i>T. cruzi</i> (T y A)	3+ y 0
Sub-fragmento NK-2	<i>T. cruzi</i> (T y A)	3+ y 3+

^a Todos los estudios con especies de *Leishmania* se realizaron con promastigotes (P) a excepción de aquellos especificados. A, amastigotes intracelulares (sin efectos tóxicos en células del hospedero); AA, amastigotes axénicos. Para *Trypanosoma brucei*: PF, formas pro-cíclicas; BF, Formas infectivas sanguíneas. Para *Trypanosoma cruzi*: tripomastigotes meta-cíclicos; T, tripomastigotes; A, amastigotes intracelulares (sin efecto tóxicos en células del hospedero); E, epimastigotes.

^b Actividad antiparasitaria basada en la concentración a la cual el péptido eliminada parásitos y/o disminuía su capacidad para replicarse: <1 μM = 4+; 1-5 μM = 3+; 6-20 μM = 2+; 21-50 μM = 1+; >50 μM = 0.

^c Condiciones sin proteasa del parásito.

^d Actividad del péptido CA(1-7)M((2-9) el cual tiene lauril, miristoil o palmitoilación en la posición $\alpha 1$ o $\epsilon 1$ del extremoN-terminal.

Tabla 5. Resumen de la actividad biológica de los péptidos F1A, F1B, P18K y P18K3N.

Actividad	F1A	F1B	P18K	P18K3N
<i>Antibacteriana</i>				
<i>E. coli</i> ATCC25922	1.56	1.56	1.56	1.56
<i>E. coli</i> 170	0.78	3.125	1.56	1.56
<i>E. coli</i> 4530	3.125	3.125	25	50
<i>E. coli</i> 5580	1.56	1.56	1.56	6.25
<i>E. coli</i> 9240	1.56	1.56	3.125	6.25
<i>E. cloacae</i> 2524	3.125	6.25	50	50
<i>E. cloacae</i> 6780	3.125	3.125	3.125	3.125
<i>E. cloacae</i> 6266	3.125	3.125	3.125	6.25
<i>E. cloacae</i> 6268	3.125	6.25	3.125	25
<i>K. pneumoniae</i> 913	3.125	3.125	3.125	6.25
<i>K. pneumoniae</i> 1625	3.125	1.56	1.56	3.125
<i>K. pneumoniae</i> 68228	3.125	6.25	3.125	3.125
<i>K. pneumoniae</i> 14218	3.125	3.125	3.125	3.125
<i>P. aeruginosa</i> 4677	6.25	25	25	50
<i>P. aeruginosa</i> 5106	12.5	12.5	25	50
<i>P. aeruginosa</i> 3599	50	50	25	50
<i>P. aeruginosa</i> 4660	50	50	12.5	25
<i>P. aeruginosa</i> 6102	50	50	12.5	25
<i>A. baumannii</i> 5821	1.6	3.125	3.125	3.125
<i>A. baumannii</i> 5825	1.6	3.125	5	2.5
<i>A. baumannii</i> 5838	3.125	1.56	3.125	3.125
<i>A. baumannii</i> 5852	0.78	1.56	1.56	1.56
<i>A. baumannii</i> 7804	3.125	3.125	1.56	1.56
<i>A. baumannii</i> 7839	3.125	3.125	1.56	1.56
<i>A. baumannii</i> 7847	3.125	3.125	1.56	1.56
<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	3.125	1.56	12.5	25
<i>S. pneumoniae</i> 150	50	25	50	50
<i>S. typhimurium</i> 2205	3.125	1.56	1.56	3.125
<i>S. typhimurium</i> 2211	1.56	1.56	1.56	3.125
<i>S. typhimurium</i> 2217	3.125	6.25	1.56	6.25

Nota: Las unidades de los valores de la tabla están en μM .

Tabla 6. Continuación del resumen de actividad biológica de los péptidos F1A, F1B, P18K y P18K3N.

Actividad/Péptido	F1A	F1B	P18K	P18K3N
<i>Antiparasitaria</i>				
<i>P. berghei</i> (5 µM) ⁺	39.67	74.72	57.33	71.46
<i>P. berghei</i> (25 µM) ⁺	87.77	92.66	83.42	81.25
<i>Actividad citotóxica</i>				
Eritrocitos (50 µM)	1.29	0	1.56	1.18
HEK 293 24 h (50 µM)*	100	100	100	100
COS 7 24 h (50 µM)*	93.16	70.65	94.71	88.29
HEK 293 48 h (50 µM)*	95.73	96.65	88.71	93.81

Nota: Las unidades son valores porcentuales obtenidos a la concentración ensayada indicada en la tabla para cada uno de los péptidos evaluados.⁺Inhibición de formación de oocinetos en *P. berghei*. *Porcentajes de viabilidad celular.