



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

COMPARACIÓN BIOLÓGICA Y ESTRUCTURAL
ENTRE ANTIBIÓTICOS PEPTÍDICOS TIPO ALFA
LINEALES Y BETA DEFENSINAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

M. en C. B. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS

ASESOR

DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE



CUERNAVACA, MORELOS.

2012.



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.



La presente **TESIS** fue realizada en los laboratorios de los doctores Alejandro Alagón Cano, Baltazar Becerril Lujan y Lourival Domingos Possani Postay, pertenecientes al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (**IBt-UNAM**), ubicado en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

Gracias al apoyo económico de la Dirección de Asuntos del Personal Académico (**DGAPA-UNAM**), proyecto **IN200412** y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) mediante el proyecto **CB-2010-153606** y la beca para estudios de **DOCTORADO** número **199738**.

La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.

François Marie Arouet (Voltaire).

Dedicada con admiración y respeto:

*A mis padres, Daudet y Mayki, por todo su amor, gracias
por los valores que inculcaron en mí y por siempre
animarme para alcanzar mis metas y nunca darme por
vencido.*

*A mi esposa Ma. Luisa por tu apoyo incondicional y por
el inicio de nuestro sueño...*

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Gerardo A. Corzo Burguete**, por su valiosa asesoría, orientación y apoyo durante la realización de este proyecto, por dejarme pertenecer a su grupo de trabajo y su vez transmitirme un poco de sus conocimientos.

A los miembros de mi comité tutorial, **Dr. Luis Manuel Terán Juárez** y **Dr. Enrique Rudiño Piñera**, por todas sus aportaciones y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto y por su importante contribución a mi formación como Doctor en Ciencias Bioquímicas.

A los miembros del comité de evaluación para la obtención del grado de doctor, **Dr. Joel Osuna Quintero**, **Dr. Miguel Ángel Vargas Suarez**, **Dr. Renaud J. Conde**, **Dr. Gabriel del Río Guerra** y **Dr. Humberto Lanz Mendoza**, por su minuciosa revisión y crítica, las cuales contribuyeron a hacer de este un mejor trabajo.

A los doctores **Elba Cristina Villegas Villareal** (CEIB-UAEM), **Alejandro Alagón Cano** (IBt-UNAM), **Baltasar Becerril Luján** (IBt-UNAM) y **Lourival D. Possani Postay** (IBt-UNAM), por la facilidades y el espacio que me fue otorgado en sus respectivos laboratorios para la realización de la parte experimental de esta **TESIS**.

A los doctores **Raymond Stanley Norton**, **Marie Petersen** e **Indu Chandrapashekar**, del Instituto de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Monash; Melbourne Australia, por su adiestramiento y apoyo para la realización de los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear sobre la hBDcon.

A la **Dra. Adela Rodríguez** y la **Q.B.P. Ma. Rocío Patiño Maya** (IQ-UNAM) por las facilidades para la realización de los experimentos de Dicroísmo Circular sobre las variantes de Pin2.

Al **Dr. Leobardo Serrano Carreón** y al **M. en B. José Raunel Tinoco Valencia** (Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del IBt-UNAM) por las facilidades prestadas para la purificación de los péptidos alfa-lineales.

Al **Dr. Fernando Zamudio** (IBt-UNAM) por su apoyo en la determinación de los pesos moleculares por Espectrometría de Masas de los diferentes péptidos evaluados en este reporte.

A la **L. en B. Rosby del Carmen Nájera** (IBt-UNAM) por su apoyo en la síntesis química en fase sólida de las variantes cortas de Pin2.

Al **Dr. Sergio Andrés Águila Puentes** (IBt-UNAM) por su apoyo en los análisis computacionales y el cálculo de propiedades fisicoquímicas de los péptidos alfa-lineales.

A todos los integrantes del grupo de investigación del *Dr. Gerardo Corzo*: **Francia García**, **Georgina Estrada**, **Guillermo Barraza**, **Kenya Hernández**, **Lilu Corrales** y **Omar Piña**, por su apoyo, valiosas sugerencias y compañía en este proceso de mi vida.

En el laboratorio de la *Dra. Elba C. Villegas* (CIEB-UAEM), quiero agradecer a **Abraham Salgado, Carmen Rodríguez, Constanza Cerejido, Erika Espinosa, Gaby Carmona, Mariel Adame, Pamela Cordero y Sepori Salgado**, por su amistad, por su ayuda y por hacer siempre alegres las horas de trabajo.

En el laboratorio del *Dr. Alejandro Alagón* (IBT-UNAM), agradezco a **Alejandro y Felipe Olvera, a Héctor Cardoso, Herlinda Clement y Ricardo Mondragón**, por siempre facilitarme las cosas y resolver mis dudas.

En el laboratorio del *Dr. Lourival D. Possani* (IBt-UNAM), agradezco a **Carmen Martínez, Chano Balderas, Fernando Zamudio, Fredy Coronas, Itzel Amaro, Juan Canul, Juanita Jiménez, Lidia González, Linda Espinoza, Martha Pedraza, Martha Rendón, Pavel Espino, Rosby Nájera, Rita Restano y Vero Quintero**, por hacerme siempre la vida más sencilla en el laboratorio.

En el laboratorio del *Dr. Baltazar Becerril* (IBt-UNAM), agradezco a **Ernesto Ortiz, Timo Olamendi y Lidia Riaño**, por su comprensión, ayuda y apoyo.

A mis amigos, **Adriana Longoria, Sara Centeno, Abraham Vidal, Cristina Torres, Sergio Águila, Daniela Morales y Raunel Tinoco**, gracias por hacer mi paso por el IBt más grato.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** (DGAPA-UNAM), proyecto **IN200412**, por el financiamiento para la realización de este proyecto.

Al **Consejo de Nacional Ciencia y Tecnología** (CONACyT), proyecto **CB-2010-153606**, por el financiamiento para la realización de este proyecto y por la beca que me fue otorgada para mis estudios de doctorado, No. **199738**.

I. C ONTENIDO

I.	C ONTENIDO	I
II.	L ISTA DE TABLAS	VI
III.	L ISTA DE FIGURAS	VIII
IV.	S ÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XI
V.	R ESUMEN	XIII
VI.	S UMMARY	XVII
VII.	J USTIFICACIÓN	XX

1.	I NTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
	[1.1.] Antibióticos	1
	1.1.1. Clasificación de los antibióticos	1
	1.1.2. Mecanismos de acción de los antibióticos	3
	[1.2.] Resistencia bacteriana a los antibióticos	7
	1.2.1. Mecanismos de resistencia bacteriana	8
	[1.3.] Péptidos antimicrobianos	14
	1.3.1. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos	17
	1.3.2. Clasificación y estructura de los péptidos antimicrobianos	18
	1.3.3. Péptidos antimicrobianos alfa-lineales del veneno de arácnidos	19
	1.3.3.1. Oxyopininas y Pandininas	21
	1.3.3.2. Efecto de la incidencia de prolina en péptidos antimicrobianos alfa-lineales provenientes de venenos	22
	1.3.4. Péptidos antimicrobianos de origen humano	25
	1.3.4.1. beta-Defensinas	25
	1.3.5. Potencial terapéutico y limitaciones de los péptidos antimicrobianos	28
	1.3.5.1. Potencial terapéutico de los péptidos antimicrobianos	28
	1.3.5.2. Limitantes de los péptidos antimicrobianos	29

2.	H IPÓTESIS	31
	[2.1.] Hipótesis, diseño de variantes con base en la secuencia de Pin2	31
	[2.2.] Hipótesis, caracterización de beta-Defensinas de origen humano	31
3.	O BJETIVOS	32
	[3.1.] Objetivo general	32
	[3.2.] Objetivos específicos	32
4.	M ATERIALES Y MÉTODOS	33
	[4.1.] Agentes químicos y material biológico	33
	4.1.1. Reactivos y solventes	33
	4.1.2. Material biológico	33
	[4.2.] Producción y purificación de los péptidos antimicrobianos	34
	4.2.1. Síntesis química de péptidos antimicrobianos	34
	4.2.2. Plegado <i>in vitro</i> de la hBD11 y la hBDcon	36
	4.2.3. Espectrometría de masas	36
	[4.3.] Ensayos biológicos	36
	4.3.1. Cinéticas de crecimiento bacteriano	36
	4.3.2. Ensayos de actividad antimicrobiana por el método de difusión	37
	4.3.3. Ensayos de actividad antimicrobiana por el método de dilución	37
	4.3.4. Ensayos de actividad hemolítica contra eritrocitos humanos	38
	4.3.5. Cálculo del índice terapéutico	38
	4.3.6. Análisis estadístico	39
	[4.4.] Experimentos para determinar estructura de los péptidos antimicrobianos	39
	4.4.1. Experimentos de Dicroísmo Circular (DC)	39

4.4.2.	Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	40
[4.5.]	Diseño de modelos y parámetros fisicoquímicos computacionales	40
5.	R ESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
[5.1.]	Diseño y purificación de los péptidos antimicrobianos con estructuras alfa lineales y beta-plegada	42
5.1.1.	Diseño y purificación de los péptidos de la serie de variantes de Pin2	42
5.1.2.	Diseño, purificación y plegado <i>in vitro</i> de la beta-Defensina 11 (hBD11) y la beta-Defensina consenso (hBDCon)	44
[5.2.]	Ensayos de actividad biológica	47
5.2.1.	Ensayo de actividad antimicrobiana en difusión agar	47
5.2.1.1.	Variantes de Pin2	47
5.2.1.2.	beta-Defensinas humanas, hBD11 y hBDcon	49
5.2.2.	Ensayo de actividad antimicrobiana en dilución	51
5.2.2.1.	Variantes de Pin2	51
5.2.2.2.	beta-Defensinas humanas, hBD11 y hBDcon	54
5.2.3.	Ensayos de actividad hemolítica contra eritrocitos humanos	55
5.2.3.1.	Variantes de Pin2	55
5.2.3.2.	beta-Defensinas humanas, hBD11 y hBDcon	58
[5.3.]	Análisis de los resultados experimentales	58
5.3.1.	Efecto del cambio de la anfipaticidad sobre la actividad hemolítica en las variantes de Pin2	60
5.3.2.	Efecto del cambio de la hidrofobicidad sobre la actividad hemolítica en las variantes de Pin2	63
5.3.3.	Efecto del cambio de la flexibilidad sobre la actividad hemolítica en las variantes de Pin2	67
5.3.4.	Conformación estructural	70
5.3.4.1.	Estimación de la estructura secundaria de las variantes de Pin2 por análisis de secuencia y espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)	70
5.3.4.2.	Estimación de la estructura secundaria de las de las Defensinas hBD11 y hBDcon por análisis de secuencia y espectroscopia de	75

Dicroísmo Circular (DC)	
5.3.4.3. Estimación de la estructura secundaria de las de las Defensinas hBD11 y hBDcon por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	76
5.3.4.3.1. Digestiones de la hBD11 con tripsina y experimentos de DC	78
5.3.4.3.2. Experimentos de RMN en dos dimensiones	80
[5.4.] Diseño y caracterización de variantes cortas inspiradas en Pin2 [P14G] y Pin2 [P14GPG]	88
5.4.1. Estrategia de diseño	88
5.4.2. Purificación de las variantes cortas de Pin2	90
5.4.3. Ensayos de actividad biológica	90
5.4.3.1. Ensayo de actividad antimicrobiana en difusión agar de las variantes cortas de Pin2	90
5.4.3.2. Ensayo de actividad antimicrobiana en dilución de las variantes cortas de Pin2	92
5.4.3.3. Ensayos de actividad hemolítica de las variantes cortas de Pin2 contra eritrocitos humanos	92
5.4.4. Estimación de la estructura secundaria de las variantes cortas de Pin2 mediante espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC) y modelos estructurales	93

6. C ONCLUSIONES	97
-------------------------	----

7. R EFERENCIAS	101
------------------------	-----

8. A NEXOS	
-------------------	--



I. **C**ONTENIDO

- ANEXO 1. Péptidos de origen humano con actividad antimicrobiana A
- ANEXO 2. Alineamiento de las secuencias reportadas para beta-Defensinas humanas B
- ANEXO 3. Índices de Hidropaticidad y Flexibilidad para los 20 L-aminoácidos C
- ANEXO 4. Núcleos activos comúnmente utilizados para el estudio de proteínas por RMN D
- ANEXO 5. Indicadores de átomos para los veinte L-aminoácidos (IUPAC) E
- ANEXO 6. Estructuras resueltas para Defensinas de diversas fuentes F
- ANEXO 7. Contribuciones en congresos nacionales e internacionales H
- ANEXO 8. Artículo generado con los resultados experimentales de esta tesis J

II. LISTA DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

- Tabla 1. Ejemplos de antibióticos bactericidas y bacteriostáticos 2
- Tabla 2. Ejemplos de antibióticos clasificados con base en su mecanismo de acción 3
- Tabla 3. Ejemplo de los principales genes de resistencia a antibióticos 8
- Tabla 4. Bases de datos avocadas al estudio de los péptidos antimicrobianos 16
- Tabla 5. Clasificación estructural de los péptidos antimicrobianos 19
- Tabla 6. Péptidos antimicrobianos de la familia de las alfa-hélices 20
- Tabla 7. Actividad de antimicrobianas y antifúngicas de péptidos antimicrobianos aislados del venenos de alacranes 21
- Tabla 8. Prolina en la regiones centrales de diferentes péptidos antimicrobianos hemolíticos 23
- Tabla 9. Aplicaciones propuestas para los péptidos antimicrobianos 29

2. MATERIALES Y MÉTODOS

- Tabla 10. Cepas bacterianas utilizadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los péptidos 33
- Tabla 11. Composición del medio de cultivo agar Mueller-Hinton 34
- Tabla 12. Secuencias y propiedades de los diferentes péptidos sintéticos evaluados 34

3. **R**ESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Tabla 13. Alineamientos de las secuencias de la hBD11 y la hBDcon 45
- Tabla 14. Tiempos de retención (HPLC) y pesos moleculares experimentales (ESI-MS) para los péptidos caracterizados en este reporte
Concentraciones mínimas inhibitorias determinadas por el método de 47
- Tabla 15. Concentraciones mínimas inhibitorias determinadas por el método de 49
difusión en placa de los diferentes péptidos evaluados en este reporte
- Tabla 16. Comparativo entre los ensayos en sólido y las cinéticas de inhibición 54
en líquido
- Tabla 17. Índices terapéuticos de Pin2 y sus variantes para los ensayos con *S. aureus* ATCC 25923, tanto en sólido como en líquido 57
- Tabla 18. Valores teóricos de GRAVY determinados para cada uno de los 65
péptidos antimicrobianos evaluados
- Tabla 19. Secuencia y predicción de estructura secundaria de Pin2 y sus 71
variantes
- Tabla 20. Constantes de acoplamiento $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ de los sistemas de espín de la 84
hBDcon medidos de la región C α H del espectro correspondiente al
experimento ^1H - ^1H -DQF COSY
- Tabla 21. Lista de las asignaciones para cada sistema de espín perteneciente a 85
la hBDcon identificado
- Tabla 22. Patrón de puentes disulfuro reportado para Defensinas de diversas 87
fuentes
- Tabla 23. Alineamiento de las secuencias de Pin2 [14aa] y Pin2 [17aa] con 89
otros péptidos antimicrobianos de actividad biológica caracterizada
- Tabla 24. Valores de CMI determinados para las variantes Pin2 [14aa] y Pin2 91
[17aa]

III. LISTA DE FIGURAS

I

1. INTRODUCCIÓN

- Figura 1. Blancos celulares de los principales tipos de antibióticos 4
- Figura 2. Principales mecanismos bacterianos de resistencia a los antibióticos 9
- Figura 3. Mecanismos mediante los cuales los péptidos antimicrobianos generan la lisis celular bacteriana 18
- Figura 4. Estructuras de péptidos antimicrobianos alfa-lineales 23
- Figura 5. Alineamientos de alfa y beta-Defensinas presentando el patrón de sus puentes disulfuro 26
- Figura 6. Estructuras de Defensinas humanas 26

M

2. MATERIALES Y MÉTODOS

- Figura 7. Proceso de síntesis química en fase sólida de péptidos 35

R

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Figura 8. Purificación de los péptidos antimicrobianos de la serie Pin2 mediante HPLC en fase reversa 43
- Figura 9. Purificación de las beta-Defensinas humanas en su estado reducido, (Red.), mediante HPLC en fase reversa 46
- Figura 10. Cromatograma correspondiente a la reacción de plegamiento *in vitro* de la hBD11 y la hBDcon sintéticas 47
- Figura 11. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias mediante ensayos de actividad en placa de agar Mueller-Hinton 48
- Figura 12. Ensayo de la actividad antimicrobiana en placa de la hBD11 50

- Figura 13. Determinación de las CMI de la hBDcon mediante ensayos de actividad antimicrobiana en placa 51
- Figura 14. Ensayos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos de la serie Pin2 53
- Figura 15. Ensayos de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de diferentes concentraciones de las beta-Defensinas hBD11 y hBDcon 55
- Figura 16. Ensayos de actividad hemolítica de los péptidos antimicrobianos de la serie Pin2 56
- Figura 17. Ensayos de actividad hemolítica de las beta-Defensinas hBD11 y hBDcon 58
- Figura 18. Parámetros fisicoquímicos determinantes de la actividad antimicrobiana 59
- Figura 19. Representación helicoidal de Pin2, mostrando la anfipaticidad de la molécula 60
- Figura 20. Representación helicoidal de los diferentes péptidos evaluados en este trabajo 62
- Figura 21. Hidropaticidades de Kyle y Doolittle (1982) por residuo graficadas para cada variante de Pin2 64
- Figura 22. Análisis del efecto de parámetros fisicoquímicos para la modulación de la actividad hemolítica de las variantes de Pin2 69
- Figura 23. Espectros de DC obtenidos para los diferentes péptidos evaluados en este trabajo 73
- Figura 24. Modelos estructurales de los péptidos α -lineales evaluados en este trabajo 74
- Figura 25. Experimentos de Dicroísmo Circular de las beta-Defensinas humanas evaluadas 76
- Figura 26. Espectros de los diferentes experimentos de 1D $^1\text{H-NMR}$ 77
- Figura 27. Comparación de los resultados obtenidos para la hBDcon y los reportados para hBD2 y hBD3 78
- Figura 28. Digestión de la hBD11 oxidada con tripsina 79
- Figura 29. Espectro del experimento Heteronuclear 2D $^1\text{H-}^{15}\text{N-HMQC}$ 80
- Figura 30. Análisis de la secuencia primaria de la hBDcon para su asignación secuencial 81

- Figura 31. Espectros de la región de los protones unidos a carbono alfa de los experimentos de RMN en dos dimensiones 82
- Figura 32. Espectro de la región de protones unidos a carbono alfa del experimento Homonuclear ^1H - ^1H -DQF COSY 83
- Figura 33. Modelos estructurales de la hBDcon 86
- Figura 34. Representación de alfa-hélice de las variantes cortas de Pin2 89
- Figura 35. Purificación de las variantes cortas de Pin2 mediante HPLC 90
- Figura 36. Ensayos de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de diferentes concentraciones de las variantes cortas de Pin2 93
- Figura 37. Ensayos de actividad hemolítica de las variantes cortas de Pin2 94
- Figura 38. Experimentos de Dicroísmo Circular y modelos estructurales de las variantes cortas de Pin2 95

IV. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo/Abreviatura	Definición
Å	Amstrongs.
°C	Grados Celsius o Centígrados.
%	Porcentaje.
%Sim	Porcentaje de Similitud.
1D	Primera Dimensión.
2D	Dos Dimensiones.
${}^3J_{\text{NH-H}\alpha}$	Constantes de Acoplamiento a Tres Enlaces de Distancia.
ACN	Acetonitrilo.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
AMP	Adenosín Monofosfato.
APD	Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos.
ARN	Ácido Ribonucleico.
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero.
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo.
C	Carbono.
Ca	Calcio.
cADN	Ácido Desoxirribonucleico Complementario.
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50.
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio.
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
cm	Centímetros.
Cys	Cisteína.
Da	Daltones.
DC	Dicroísmo Circular.
D ₂ O	Agua Deuterada.
DE ₅₀	Dosis efectiva 50.
DHF	Dihidrofolato.
DO	Densidad Óptica.
DQF-COSY	Espectroscopia de Doble Correlación y Filtrado de Quantum.
e	Coefficiente de Extinción Molar.
EDT	Etanoditiol.
EH	Eritrocitos Humanos.
ESI-MS	Espectrometría de Ionización de Electrones por Espray.
FDA	Administración Americana de Alimentos y Medicinas.
Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonil.
Fmoc-Asp(OtBu)-PEG	Fluorenilmetiloxicarbonil-L Ácido Aspártico (terButil ester)-Polietilenglicol.
g	Gramos.
GdHCl	Hidrocloruro de Guanidinio.
GRAVY	Gran Promedio de Hidropaticidad.
GSH	Glutatió n Reducido.
GSSG	Glutatió n Oxidado.
h	Horas.
hBD	beta-Defensina humana.
HMQC	Espectroscopia de Correlación Heteronuclear de Quantum Múltiple.
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
Hz	Hertz.
IC	Intervalo de Confianza.
IL	Interlucina.
IT	Índice Terapéutico.
K	Potasio.
KDa	Kilo Daltones.
L	Litros.
lb	Libras.
M	Concentración Molar (número de moles/Litro).

μg	Microgramos.
Mg	Magnesio.
mg	Miligramos.
μH	Momento Hidrofóbico.
μHr	Momento Hidrofóbico Relativo.
MHz	Mega Hertz.
min	Minutos.
μL	Microlitros.
mL	Mililitros.
μM	Concentración Micromolar.
mM	Concentración Milimolar.
mm	Milímetros.
MRE	Elipticidad Promedio por Residuo.
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia a Metacilina .
N	Nitrógeno.
N. A.	No Reportó Actividad Antimicrobiana.
Na	Sodio.
NCCLS	Comité Nacional de Estándares Clínicos y de Laboratorio.
N. D.	No Determinado.
NK	Células Asesinas Naturales.
nm	Nanómetros.
NOESY	Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser.
No. AA	Número de Aminoácidos.
PABA	Ácido p-aminobenzoico.
PBP2'	Proteína de Unión a Penicilina 2' de <i>Staphylococcus aureus</i> .
PBP _s	Proteína de Unión a Penicilina .
PBS	Amortiguador de Fosfatos.
PC	Fosfatidilcolina.
PDB	Banco de Datos de Estructuras de Proteínas.
PELE	Exploración de la Energía Superficial de Proteínas.
PG	Fosfatidilglicerol.
pH	Potencial de Hidrógeno.
P.M.	Peso Molecular (g/mol).
ppm	Partes por Millón.
Q	Carga Neta.
QSAR	Relación Cuantitativa Estructura-Actividad.
rARN	Ácido Ribonucleico Ribosomal.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa-en Tiempo Real.
S	Svedbergs.
SAM	S-Adenosilmetionina.
Sp.	Especie.
TFA	Ácido Trifluoroacético.
TFE	Trifluoroetanol.
THF	Tetrahidrofolato.
TNF	Factor de Necrosis de Tumores.
TOCSY	Espectroscopia de Correlación Total.
TSB	Caldo Soya-Tripticasa.
UDP	Uridina-difosfato.
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
US\$	Dólares Americanos.
VRE	<i>Enterococos</i> con resistencia a Vancomicina .
WHO	Organización Mundial de la Salud.

V. **R**ESUMEN

La constante aparición de cepas bacterianas con resistencia a antibióticos comerciales, como efecto de su uso desmedido desde su aparición a mediados del siglo XX, ha dirigido la investigación farmacológica hacia la búsqueda y desarrollo de agentes antimicrobianos con propiedades o mecanismos de acción diferentes a los convencionales, que ayuden a contener con este problema. Los péptidos antimicrobianos se plantean como una posible solución, debido a que su mecanismo de acción no se limita en la interacción con un receptor único y sólo se han reportado muy pocos eventos de resistencia contra su acción antibacteriana. Sin embargo, estas moléculas presentan algunas desventajas que limitan su aplicación como terapéuticos, tales como, su alto costo de producción, su baja estabilidad y posibles efectos tóxicos contra células eucariotas en comparación con los antibióticos comunes, los cuales tienen una química más sencilla. En este reporte se realizó el diseño y caracterización de péptidos con conformaciones estructurales del tipo alfa-helicoidal, provenientes del veneno de arácnidos, y del tipo de hebras beta, estabilizadas por puentes disulfuro pertenecientes a la familia de las **beta-Defensinas** de mamíferos, con la finalidad de generar péptidos antimicrobianos con toxicidades menores hacia eritrocitos humanos como medida terapéutica.

La presencia de Prolina en las regiones centrales de péptidos antimicrobianos alfa-helicoidales está relacionada con una gran actividad antimicrobiana, sin embargo, estos péptidos también presentan actividades hemolíticas a concentraciones cercanas a las de su actividad antibacteriana. Por otro lado, péptidos alfa-helicoidales con actividades hemolíticas menores presentan motivos estructurales más flexibles en sus regiones centrales. La **Pandinina 2** (Pin2), es un péptido antimicrobiano alfa-helicoidal de 24 aminoácidos, proveniente del veneno del escorpión africano *Pandinus imperator*, que presenta una Prolina en la posición 14, ubicada en la región central de la molécula. Pin2 presenta actividades antimicrobianas contra diferentes bacterias de importancia clínica, y una gran actividad hemolítica a concentraciones en el rango micromolar (μM).

En este trabajo se analizó el efecto del cambio de este residuo de Prolina por una combinación de residuos estructuralmente más flexibles, con la finalidad de reducir su actividad hemolítica. Una serie de variantes de Pin2 con sustituciones en el residuo Prolina por los aminoácidos G, V, GV, VG, GVG y GPG, fueron sintetizadas químicamente. En los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano realizados mediante el método de difusión en agar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las variantes de Pin2 fueron mayores a medida que la hidrofobicidad de los péptidos se incrementó, mientras que en los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano usando el método de dilución todas las variantes de Pin2 mantuvieron valores de CMI en el mismo orden de magnitud (6.25-12.50 μ M). La actividad hemolítica de estos péptidos fue ensayada contra eritrocitos humanos (EH), encontrándose que, de manera general, esta actividad disminuyó como resultado de la sustitución de la Prolina, siendo las variantes GV, GVG y GPG las menos hemolíticas. Estas variantes incrementaron sus índices terapéuticos hasta en 14 veces para el caso de la variante con la sustitución GPG. Sin embargo, la sustitución de la Prolina 14 por Glicina aceleró la cinética de disrupción de EH, incrementando a su vez su actividad antimicrobiana. Parámetros fisicoquímicos y estructurales como la anfipaticidad, la hidrofobicidad, la flexibilidad y la propensión para adoptar una conformación alfa-helicoidal resultaron de importancia para modular la actividad hemolítica de las variantes de Pin2, por lo que fueron utilizados para el diseño de variantes cortas de este péptido, que además, mantuvieran los cambios de la Prolina 14 por Glicina y por el triplete GPG. Se diseñaron dos variantes una de 14 y otra de 17 aminoácidos, ambas variantes cortas presentaron mayor actividad contra *E. coli* tanto en los ensayos de difusión en agar, como en los de dilución, sin embargo, en lo referente a la actividad hemolítica, la variante de 17 aminoácidos con el triplete GPG en su posición central, no presentó ningún efecto tóxico, mientras que la variante de 14 aminoácidos con el residuo de Glicina sólo presentó un 25% de hemólisis a la concentración de 100 μ M. El índice terapéutico de la variante corta con el residuo de Glicina fue 32 veces superior al del péptido parental Pin2.

La familia de las **beta-Defensinas** comprende, péptidos antimicrobianos presentes en vertebrados con una estructura compuesta por tres hebras beta antiparalelas estabilizadas por tres puentes disulfuro organizadas en un patrón de unión Cys1-Cys5/Cys2-Cys4/Cys3-Cys6. Las **beta-Defensinas** se expresan de manera soluble en los diferentes organismos y además de su actividad antimicrobiana y antiviral, estos péptidos pueden estimular al sistema inmune mediante el reclutamiento de células de defensa como neutrófilos y macrófagos. En este trabajo se caracterizaron dos péptidos pertenecientes a esta familia, la **beta-Defensina 11** (hBD11) de origen humano y la hBDcon originada de la secuencia consenso resultante del alineamiento de todas las **beta-Defensinas** humanas reportadas. Ambos péptidos no presentaron actividades hemolíticas contra EH, y en los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de difusión en agar estos péptidos presentaron actividades antimicrobianas entre 12-25 μM , mientras que en los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de dilución en medio de cultivo la hBD11 sólo presentó una actividad bacteriostática contra *E. coli* y una CMI contra *S. aureus* de 100 μM . La hBDcon por su parte mostró poca actividad contra *S. aureus*, pero una CMI contra *E. coli* de 12.5 μM . El análisis de la estructura de la hBDcon por RMN permitió asignar los puentes disulfuro en este péptido, los cuales fueron Cys1-Cys3/Cys2-Cys5/Cys4-Cys6. Interesantemente, el arreglo de los puentes disulfuro no corresponde al consenso de las **beta-Defensinas**, pero la hBDcon mantiene una estructura biológicamente activa, lo cual confirma que el arreglo de los puentes disulfuro en las **beta-Defensinas** no está estrictamente correlacionado a su actividad microbicida.

Con los resultados experimentales obtenidos con este trabajo se concluye que las variantes generadas a partir de la secuencia de la **Pandinina 2** representan una alternativa para la realización de nuevos diseños de antibióticos peptídicos que permitan mejorar el potencial de estas moléculas como agentes terapéuticos futuros. Por su parte, las **beta-Defensinas**, hBD11 y hBDcon, caracterizadas en esta tesis, no presentaron ningún efecto tóxico contra eritrocitos humanos, en lo respectivo a la actividad

antimicrobiana la hBDcon presento CMI contra *E. coli* (ATCC 25922), en el mismo rango que los péptidos alfa-helicoidales, además, la secuencia de 32 aminoácidos de la hBDcon es la más corta reportada para un péptido perteneciente a la familia de las **Defensinas** de mamífero, sin embargo, su costo de síntesis química sigue siendo elevado comparado con el de péptidos alfa-helicoidales reportados con secuencias de entre 12-17 aminoácidos con actividades similares, por lo que sería importante para favorecer su desarrollo como posibles terapéuticos, establecer las condiciones para su expresión de manera recombinante y determinar si estos péptidos presentan actividades quimiotácticas.

VI. SUMMARY

The constant emergence of drug resistant bacterial strains, as a consequence of the unrestricted use of commercial antibiotics, had redirected the pharmacological research towards the exploration and development of new antimicrobial agents with different properties and mechanism of action, when compared to the conventional antibiotics, which could help overcome the bacterial resistance problem. The antimicrobial peptides (AMPs) offer a possible solution to this problem because their mechanisms of action are not limited to a single receptor; consequently only few events of bacterial resistance towards AMPs have been reported. However, these molecules have some disadvantages such as cost of chemical synthesis, peptide stability and cytotoxicity to eukaryotic cells, when compared to conventional antibiotics. Here the design, the biological activities and the comparison of two types of AMPs, those having an alpha-helical structure and those having a beta-strand structure stabilized by disulphide bridges (**beta-Defensins**), are reported. This work has also the intention to propose AMPs as new therapeutic antibiotics with lower toxicities towards human erythrocytes (HE).

The presence of amino acid residues such as Proline in the central region of an alpha-helical antimicrobial peptide had been correlated to high antimicrobial and hemolytic activities. This phenomenon may be related to the “kink” imposed by the Proline, breaking the alpha-helix structure of the peptide. On the other side, antimicrobial peptides with lower hemolytic activities have a more flexible structure in the central region. For example, **Pandinin 2** (Pin2) is an alpha-helical antimicrobial peptide obtained from the venom of the African scorpion *Pandinus imperator*. Pin2 has a Proline residue in its middle region and presents antimicrobial activities at micromolar (μM) concentrations, but it also presents high hemolytic activity at the same concentrations. In this work, the Proline was substituted by more flexible structural motifs with the intention to reduce its hemolytic activity. Therefore, a series of Pin2 variants, with substitutions of the P14 for the residues G, V, GV, VG, GVG and GPG, was

performed. These six variants of Pin2 were chemically synthesized and their biological activities were compared. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of the six peptides were inversely correlated with their overall hydrophobicity; that is, in the agar diffusion inhibition assay the higher their antibiotic activity the lower their hydrophobicity. On the other hand, in the dilution assay, the MICs of all Pin2 variants had similar values. In addition, the hemolytic activities towards HE of all six peptides were tested. The hemolytic activities of the Pin2 variants GV, GVG and GPG were reduced. In this way, such variants increased their therapeutic indexes (TI). The TI of the variant [P14GPG] was up to 14 times better than the parental peptide Pin2. Curiously, the Proline substitution by Glycine was even more hemolytic than Pin2.

Because of the Proline substitution in Pin2, variant peptides presented distinct particular physicochemical and structural characteristics, such as different levels of hydrophobicity, amphipaticity, and propensity to adopt an alpha-helical conformation. These differences result of great importance for the hemolytic activity modulation in the Pin2 variants; therefore, such parameters were used to design two short variants of Pin2. The Proline 14 was substituted in each peptide either by the Glycine or by the GPG motif, respectively. The new peptides had 14 and 17 residues, respectively. Both peptides Pin2 [14] and Pin2 [17] showed antibiotic selectivity against *E. coli* in both the diffusion and dilution assays. In addition, Pin2 [14] showed 25% hemolysis at 100 μ M while Pin2 [17] did not show any hemolytic effect at the same concentration. Therefore, Pin2 [14] had a therapeutic index 32 times higher than the parental peptide Pin2 and Pin2 [17] did not show any hemolytic effect.

The **beta-Defensins** family integrates antimicrobial peptides of vertebrates with a structure composed of antiparallel beta strands stabilized by three disulphide bridges with the cysteine pattern Cys1-Cys5/Cys2-Cys4/Cys3-Cys6. These soluble molecules are expressed in different tissues and they exert antimicrobial and antiviral activities. They also stimulate the immune system by recruiting defense cells such neutrophils and macrophages. In this work, two peptides belonging to the **beta-Defensins** family

were studied, the human **beta-Defensin 11** (hBD11) and **beta-Defensin consensus** (hBDcon). The last was obtained as the consensus sequence resulting from all **beta-Defensins** already reported. The two hBDs did not showed any toxic effect against HE. Both hBD11 and hBDcon had MIC values between 12 and 25 μM in the diffusion assay. However in the dilution assay, only hBD11 showed a bacteriostatic effect against *E. coli* and its MIC value towards *S. aureus* was 100 μM . Finally, the hBDcon showed a poor selectivity towards *S. aureus*, but the MIC value for the *E. coli* inhibition was 12.5 μM . The experimental results obtained in this work shows that the alpha-helical variants represent a better alternative than that of **beta-Defensins** for designing new antibiotic peptides to be used as therapeutic agents.

VII. JUSTIFICACIÓN

De manera natural el cuerpo humano convive en simbiosis con billones de microorganismos como bacterias, hongos y protozoarios, principalmente concentrados en el tracto gastrointestinal y la piel (Zoetendal *et al.*, 2006; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2007; Grice *et al.*, 2008; Turroni *et al.*, 2008; Kong, 2011; Rosenthal *et al.*, 2011). Estos microorganismos juegan un papel trascendental para la salud humana, así como constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades. El uso excesivo de los antibióticos desde mediados del siglo XX, ha modificado este equilibrio al destruir a las cepas bacterianas sensibles a su acción, y otorgando la ventaja a cepas resistentes, anulando así la competencia natural para su proliferación y generando un grave problema de salud pública (Hart, 1998; Conly, 1998; Wang *et al.*, 1998). La resistencia bacteriana es un fenómeno previo al descubrimiento y uso médico de los antibióticos, generado por causa de la selección natural durante el curso de la selección de las especies. Sin embargo, este se ha incrementado en los últimos años por efecto de la enorme presión evolutiva que genera el uso indiscriminado e inapropiado de antibióticos por el ser humano en medicina, agricultura y ganadería (Hart, 1998; Gérvas, 2000). Algunos ejemplos de los principales organismos de interés médico que presentan resistencia a antibióticos son los siguientes: *Staphylococcus aureus* con resistencia a **Metacilina** (MRSA) y/o múltiples antibióticos, enterococos con resistencia a **Vancomicina** (VRE), neumococos resistentes a **Penicilina**, bacilos Gram negativos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., y *Enterobacter* sp., con multirresistencias a antibióticos. Los efectos sociales y económicos del problema de la aparición de cepas bacterianas con multirresistencia a los antibióticos se reflejan principalmente en incrementos en los índices de mortalidad, aumento en los tiempos de hospitalización (morbilidad) y costos de los medicamentos, comparados con aquellos en infecciones causadas por cepas susceptibles (French, 2005). Por lo que ante la problemática generada por la constante aparición de cepas bacterianas con resistencia a antibióticos, en los últimos años la investigación farmacológica se ha encaminado hacia la obtención de agentes antimicrobianos con

propiedades o mecanismos de acción diferentes a los convencionales (Villegas y Corzo, 2005). Dentro de las posibles soluciones se encuentran; el aislamiento, caracterización e ingeniería de péptidos antimicrobianos de distintas fuentes, dado que su mecanismo de acción antimicrobiana, diferente al de los antibióticos comunes, está basado principalmente en la formación de poros en las membranas bacterianas provocando su lisis o bien, interaccionando con complejos intracelulares, interfiriendo así, con procesos elementales para la supervivencia celular, tales como la replicación del ADN, la síntesis de ARNm y el plegado de proteínas (Almeida y Pokorny, 2009; Sharma y Khuller, 2001; Sitaram y Nagaraj, 2002). Desafortunadamente, algunos de estos péptidos presentan actividades tóxicas contra células humanas, como la hemólisis, y además por su origen proteico pueden ser susceptibles a degradación por la acción de proteasas bacterianas, restringiendo su aplicación (Villegas y Corzo, 2005). Por lo que el propósito general de este trabajo es el desarrollo de péptidos antimicrobianos con estructuras alfa-lineales y del tipo **beta-Defensinas** con propiedades antibióticas mejoradas, tales como una mayor actividad antimicrobiana y menor actividad hemolítica, mediante el uso del diseño racional de proteínas y la síntesis química.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Antibióticos

El término “antibiótico” se refiere a sustancias químicas producidas generalmente por bacterias y hongos, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o actividad de otros microorganismos, por lo que se les considera un producto de la evolución y pueden conferir una ventaja selectiva a quienes los producen dentro de un ecosistema específico (Waksman y Flynn, 1973). El desarrollo de la tecnología de los antibióticos inició en la década de 1940 con el establecimiento de la producción de la **Penicilina** a gran escala, gracias a los trabajos de Howard W. Florey y Ernst B. Chain, que inspirados en los reportes de Fleming, lograron aislar, purificar y caracterizar este compuesto a partir de cultivos de *Penicillium notatum* (Kardos y Demain, 2011). El uso de los agentes antimicrobianos en la actualidad, permite el tratamiento de infecciones bacterianas agudas y enfermedades crónicas en humanos, presentando además, un alto impacto en la medicina veterinaria y la agricultura (Butaye *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2007; Vidaver, 2002). A inicios del siglo XXI, Wise calculó que el consumo de antibióticos a nivel mundial se encontraba entre las 100,000 y 200,000 toneladas, de las que aproximadamente el 75% fue destinado a su aplicación en salud humana (Wise, 2002). El valor comercial de la industria de los antibióticos a nivel mundial fue de US\$42 billones de dólares en 2009, representando el 46% del mercado de agentes anti-infectivos, que incluye antivirales y vacunas, y el 5% del total del mercado farmacéutico, manteniendo un crecimiento promedio del 4% desde 2004 (Hamad, 2010). Mientras que en México se calculó que las ventas anuales de esta clase de agentes terapéuticos se situaban en cerca de los US\$960 millones de dólares anuales (Dresser *et al.*, 2008).

1.1.1. Clasificación de los antibióticos

Los agentes antimicrobianos pueden ser clasificados de acuerdo con el efecto que ejercen sobre desarrollo bacteriano, por sus mecanismos específicos de acción o por su estructura química. Los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos contra las bacterias Gram positivas y Gram

negativas son muy similares, estos compuestos pueden interferir con el proceso de síntesis de elementos esenciales para la supervivencia bacteriana como son, la pared celular, las proteínas, y los ácidos nucleicos (ADN y ARN), o inhibir una ruta metabólica específica (Cordiés *et al.*, 1998a). Con base en el efecto que ejercen sobre el desarrollo bacteriano, los antibióticos puede ser clasificados como bacteriostáticos o bactericidas, los primeros, son aquellos que inhiben la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda al disminuir la concentración del agente terapéutico o al resuspender el tratamiento, mientras que los antibióticos bactericidas, destruyen totalmente la estirpe bacteriana por lo que su efecto terapéutico es irreversible (Pankey y Sabath, 2004). Sin embargo, las designaciones de bacteriostático o bactericida pueden variar según el tipo de microorganismo sobre el cual se evalúe su efecto, por ejemplo, la **Penicilina G** suele ser bactericida para cocos Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, pero sólo es bacteriostático contra enterococos como *Streptococcus faecalis*, en tanto que el **Cloranfenicol** suele ser bacteriostático, incluso a concentraciones muy altas, pero puede ser bactericida contra *Hemophilus influenzae* (Young, 1994), por esta razón es importante la selección del conjunto de agentes terapéuticos adecuados al tipo de infección a tratar. En la tabla 1 se enumeran algunos ejemplos de compuestos antibióticos divididos de acuerdo con el tipo de actividad preponderante e inherente a cada uno de ellos.

Tabla 1. Ejemplos de antibióticos bactericidas y bacteriostáticos.

Bactericidas	Bacteriostáticos
Penicilinas	Tetraciclinas
Cefalosporinas	Eritromicina
Aminoglucósidos	Sulfonamina
Rifampicina	Novobiocina
Quinolonas	Cloranfenicol
Monobactámicos	
Polimixinas	

Modificada de Cordiés *et al.* (1998a).

La clasificación que organiza a los diferentes antibióticos con base en su blanco de acción, resulta de gran utilidad en establecimiento de tratamientos en los que se administran simultáneamente varios

agentes antimicrobianos, ya que permite decidir que blancos de la maquinaria celular bacteriana atacar. Según su mecanismo de acción, los antibióticos se clasifican en: **a)** Inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana, **b)** Antibióticos que afectan la permeabilidad de la membrana bacteriana, **c)** Inhibidores de la síntesis proteica e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (Calderón y Sabundayo, 2007; Cordiés *et al.*, 1998a, Falconer *et al.*, 2011; Kohanski *et al.*, 2010) (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplos de antibióticos clasificados con base en su mecanismo de acción.

Blanco de acción	Antibiótico
Síntesis de la pared celular	<i>Penicilinas</i>
	<i>Cefalosporinas</i>
	<i>Vancomicina</i>
	<i>Bacitracina</i>
Efecto sobre la permeabilidad de la membrana	<i>Polimixinas</i>
	<i>Colistinas</i>
	<i>Nistatina</i>
	<i>Anfotericina B</i>
Síntesis proteica	<i>Cloranfenicol</i>
	<i>Tetraciclina</i>
	<i>Aminoglucósidos</i>
	<i>Eritromicina</i>
Síntesis de ácidos nucleicos	<i>Quinolonas</i>
	<i>Sulfonamidas</i>
	<i>Rifampicina</i>
	<i>Trimetropina</i>

Modificada de Cordiés *et al.*, 1998a.

1.1.2. Mecanismos de acción de los antibióticos

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias, naturales y sintéticas, con comportamientos farmacocinéticos y farmacodinámicos diferentes de acuerdo con sus características químicas o estructurales. Generalmente tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y su toxicidad es selectiva debido a que estos compuestos ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo. En la figura 1 se esquematizan los puntos de interacción de los antibióticos con los principales constituyentes celulares bacterianos y algunos ejemplos de los mecanismos más estudiados se describirán a continuación.

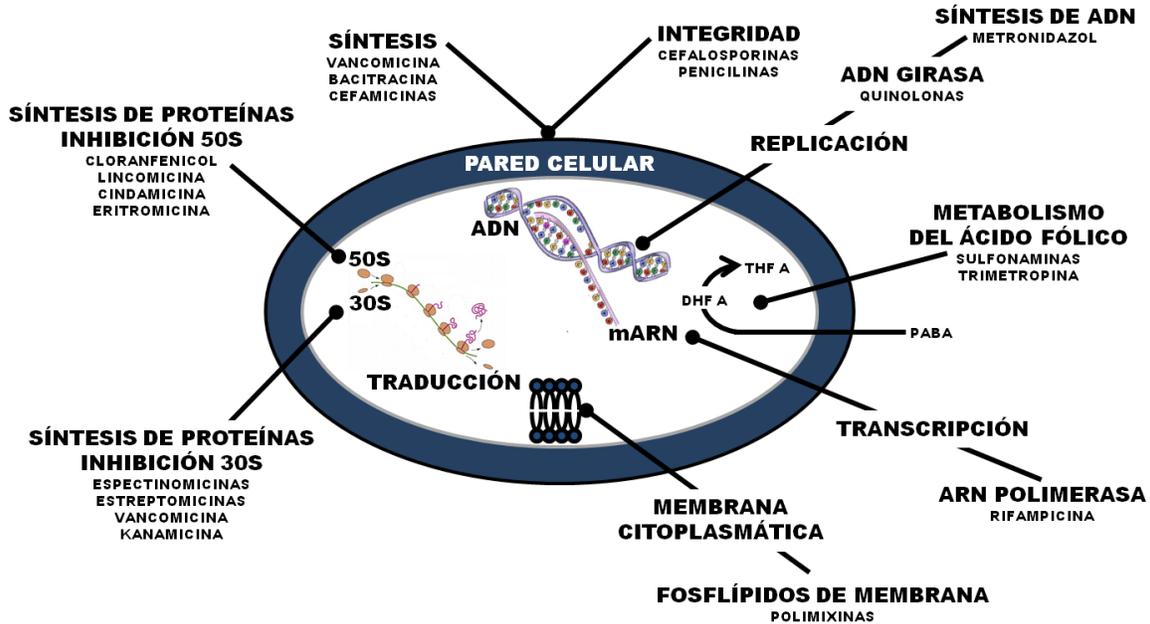


Figura 1. Blancos celulares de los principales tipos de antibióticos.

a) Antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared celular

Dado que las bacterias son microorganismos hiperosmolares, con respecto a los tejidos y al líquido intersticial de los mamíferos, necesitan una pared celular rígida para mantener su integridad cuando los infectan. La estructura de la pared celular bacteriana está constituida principalmente por un polímero denominado peptidoglicano (mureína), cuya síntesis se divide en tres etapas principales, cada una de éstas puede ser inhibida por un grupo de antibióticos diferentes. En la primera etapa se forma el UDP-N-acetilmuramil-pentapéptido en el citoplasma bacteriano. En la segunda etapa, se polimerizan el UDP-N-acetilmuramil-pentapéptido y la N-acetilglucosamina que son transportados a través de la membrana citoplasmática y se unen al punto de crecimiento de la pared bacteriana. Esta fase es inhibida por antibióticos como la **Vancomicina** y la **Bacitracina**. Finalmente, las cadenas de peptidoglicano, una vez fuera de la célula, quedan entrelazadas transversalmente y dan lugar a

la formación de un polímero tridimensional, esta etapa, también conocida como reacción de transpeptidación, es inhibida por las **Penicilinas** y las **Cefalosporinas**. La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana tiene habitualmente un efecto bactericida (Bugg *et al.*, 2011; Cordiés *et al.*, 1998a; Projan, 2002).

b) Antibióticos que afectan la permeabilidad de la membrana bacteriana

La membrana citoplasmática es fundamental para la regulación del medio intracelular de las bacterias, antibióticos como **Polimixina**, **Pristanamicina** y la **Anfotericina B** poseen la capacidad de lesionar a las membranas alterando así su permeabilidad. Las **Polimixinas**, por su parte, tienen una afinidad especial para los receptores de polifosfatos situados en la membrana celular de las bacterias, producen toxinas letales para las bacterias, pero que no son tóxicas para el hombre (Cordiés *et al.*, 1998a; Falagas y Kasiakou, 2005; Vaara, 1992).

c) Inhibidores de la síntesis proteica e Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

Algunos antibióticos como el **Cloranfenicol**, la **Lincomicina**, los **Aminoglucósidos** y las **Tetraciclinas**, son capaces de inhibir la síntesis de proteínas en las bacterias. El ribosoma bacteriano, más pequeño que el de los mamíferos, está constituido por dos subunidades denominadas 50S y 30S; algunos antibióticos se unen a los ribosomas bacterianos y bloquean su interacción con el RNA mensajero, este bloqueo en ocasiones es reversible. En el caso de los **Aminoglucósidos**, éstos se unen a la subunidad ribosomal 30S y producen la acumulación de complejos precursores de la síntesis proteica, lectura errónea del código RNA mensajero y producción de polipéptidos anormales que se comportan como bactericidas (Cordiés *et al.*, 1998a; Knowles *et al.*, 2002; Sutcliffe, 2005; Sutcliffe, 2011).

Las **Fluoroquinolonas**, **Sulfonamidas**, **Rifampicina**, **Novobiocina** y los **Nitroimidazoles** inhiben de forma selectiva a la enzima RNA polimerasa dependiente del DNA, la cual cataliza la transcripción de la información genética contenida en el RNA mensajero y se convierten así

en potentes bactericidas (Cordiés *et al.*, 1998a; Gill y García, 2011; Srivastava *et al.*, 2011). El cromosoma de *Escherichia coli* está compuesto por una doble cadena de ADN circular de aproximadamente 1000 μm de longitud. El ADN cromosómico bacteriano necesita compactarse y adquirir un plegamiento terciario para poder ser acomodado dentro de la célula bacteriana, de sólo entre 1-3 μm de longitud, por lo que *E. coli* produce diferentes enzimas, llamadas ADN topoisomerasas, para realizar esta función (Hawkey, 2003). Se ha reportado que la ADN girasa (topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV son dos de los blancos de las **Fluoroquinolonas** (Drlica y Zhao, 1997). Las **Quinolonas** ejercen su actividad mediante su unión a complejos formados por el ADN y las girasas o topoisomerasas IV. Poco tiempo después de la unión al complejo, las **Quinolonas** inducen un cambio conformacional en la enzima, la enzima corta al ADN y la **Quinolona** evita la religación de la cadena de ADN. La enzima es atrapada en el ADN resultando en la formación de un complejo integrado por la [Quinolona-Enzima-ADN]. La formación del complejo [Quinolona-Girasa-ADN] inhibe rápidamente la replicación del ADN, lo cual es consistente con la actividad de la Girasa, la cual se encarga de desempaquetar el ADN y permite la formación de las horquillas de replicación por la helicasa. Por su parte la formación del complejo [Quinolona-Topoisomerasa IV-ADN], es un proceso de inhibición lento, debido a que esta enzima reempaqueta el ADN después de la replicación (Khodursky y Cozzarelli, 1998). La formación de estos complejos inhiben de manera reversible la replicación del ADN y por lo tanto el crecimiento celular, por lo que la efecto de las **Quinolonas** sobre el metabolismo bacteriano mediante este mecanismo es sólo bacteriostático. Cuando se administran concentraciones mayores de **Quinolonas** se puede observar un efecto bactericida y se piensa que podría relacionarse con la liberación de los extremos de ADN de las horquillas de replicación (Chen *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1997).

1.2. Resistencia bacteriana a los antibióticos

El descubrimiento de las bacterias como agentes causantes de enfermedades infecciosas a finales del siglo XIX estimuló la búsqueda e implantación de medidas terapéuticas y preventivas para contrarrestar su acción, sin embargo, sólo se obtuvo un verdadero éxito hasta el descubrimiento e introducción de los antibióticos a mediados del siglo XX (Tenover, 2006). El uso de los antibióticos revolucionó la medicina, salvando un incontable número de vidas y hoy en día son esenciales para el tratamiento de enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias, hongos y parásitos, así como en el tratamiento de enfermedades crónicas como el cáncer y la diabetes (Davies y Davies, 2010). No obstante, sus aplicaciones se extienden además, a la medicina veterinaria, agricultura, ganadería, acuicultura, entre otras actividades productivas (Barton, 2000; Butaye *et al.*, 2003; McManus *et al.*, 2002; Schwarz *et al.*, 2001; Teuber, 2001). Su aplicación desmedida, ha generado una gran presión selectiva sobre los microorganismos, propiciando la aparición, sobrevivencia y propagación de múltiples cepas resistentes, no sólo de especies patógenas, sino también de comensales (Barbosa y Levy, 2000; Hawkey, 1998). Con base en las secuencias pertenecientes a los diferentes genomas bacterianos disponibles, se ha reportado la existencia de cerca de 20,000 genes de resistencia potencialmente hacia los antibióticos (Liu y Pop, 2009) (Tabla 3), afortunadamente, el número de genes que son funcionales como determinantes de la resistencia bacteriana es mucho menor. El fenómeno de resistencia bacteriana a los antibióticos tiene grandes implicaciones tanto a nivel salud como económicas (Levy y Marshall, 2004). En el caso de pacientes con infecciones ocasionadas por bacterias resistentes, los costos de tratamiento se incrementan por la necesidad de mayor número de análisis clínicos, estadías más largas de convalecencia, mayores concentraciones de antibióticos de primera línea o el uso de agentes antimicrobianos de segunda línea, lo cual puede resultar en efectos adversos. Inclusive las bacterias más resistentes pueden ser inhibidas o erradicadas por una concentración suficientemente alta de antibióticos, sin embargo, los pacientes no son capaces de tolerar las concentraciones necesarias, sin

sufrir efectos tóxicos (Cosgrove y Carmeli, 2003). Por citar un ejemplo, el tratamiento con **Colistina** de infecciones ocasionadas por especies de *Pseudomonas* o *Acinetobacter* altamente resistentes, está asociado con un alto riesgo de disfunción renal (Levin *et al.*, 1999). Por lo que en casos extremos en donde los pacientes presentan infecciones por cepas bacterianas resistentes a todos los antibióticos disponibles, es necesaria la remoción quirúrgica del sitio de infección; o cuando no es posible realizar la cirugía los índices de mortalidad son muy altos (Cosgrove y Carmeli, 2003; Harris *et al.*, 1999).

Tabla 3. Ejemplo de los principales genes de resistencia a antibióticos.

Tipo de resistencia	Genes	Actividad
Resistencia a Aminoglucósidos	<i>aac</i>	Acetilación
	<i>aph</i>	Fosforilación
	<i>ant</i>	Adenilación
Resistencia a β -Lactámicos	β -Lactamasas Clases A-D	Hidrólisis Enzimática
Resistencia a Macrólidos	<i>erm</i> A-Y	ARN Metilasas
	<i>ere</i> A, <i>ere</i> B	Esterasas
	<i>vgb</i> A, <i>vgb</i> B	Hidrolasas
	<i>lnu</i> A-B, <i>vat</i> A-E	Transferasas
	<i>mph</i> A-C	Fosforilasas
Resistencia a Vancomicina	Operones Tipo Van A-G	Modificación Enzimática de precursores de Peptidoglicano
Resistencia a Tetraciclina	<i>otr</i> B, <i>tr</i> 3, <i>tet</i> 30, 33, 38, 39, 40, 41;	Bombas de Eflujo
	<i>tet</i> A-E,G,H, J	
	<i>otr</i> A, <i>tet</i> 32, 36; <i>tet</i> M, O, PB, Q, S,	Protección Ribosomal
	T, W	

Información tomada de la base de datos de genes de resistencia a antibióticos ARDB, (<http://ardb.cbcb.umd.edu/>) (Liu y Pop, 2009).

1.2.1. Mecanismos de resistencia bacteriana

El estudio de la resistencia bacteriana a la acción de los antibióticos ha revelado múltiples y complejos mecanismos mediante cuales los genes de resistencia se diseminan a través de reino bacteriano (Brown *et al.*, 2003; Dzidic y Bedekovic, 2003; Oppegaard *et al.*, 2001). La adquisición y estabilización de los genes de resistencia en el fenotipo bacteriano impiden a los antibióticos ejercer su efecto específico de acción sobre el desarrollo de los patógenos (Alanís, 2005; Wright, 2011) (Figura 2).

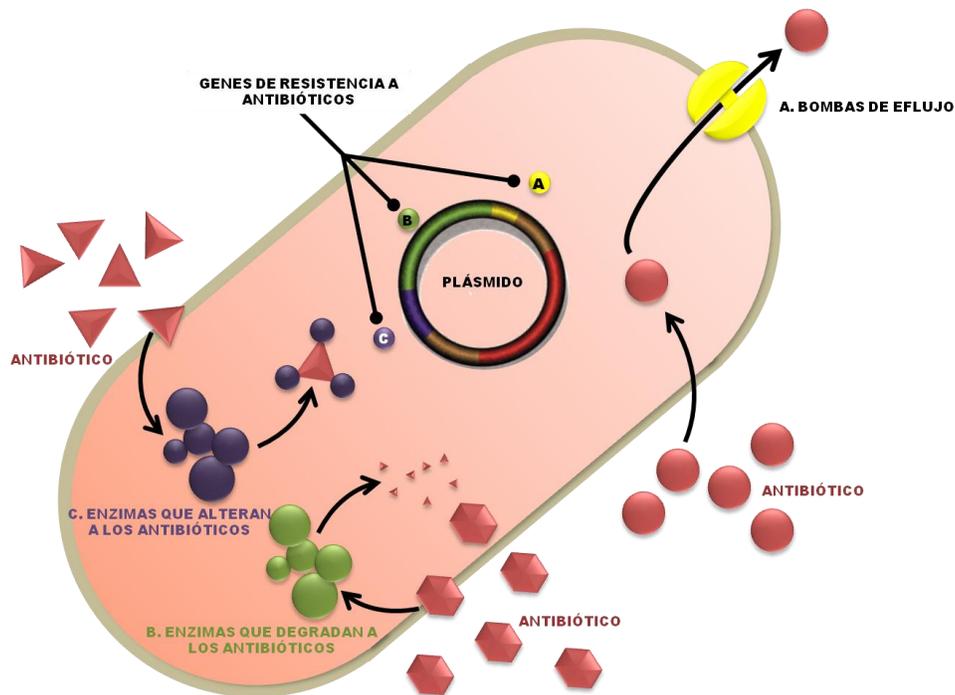


Figura 2. Principales mecanismos bacterianos de resistencia a los antibióticos.

Los mecanismos de resistencia pueden ser divididos en cuatro grupos fundamentales, los cuales se describen a continuación:

- a) **Modificaciones bacterianas que disminuyen la interacción del antibiótico al punto blanco de su acción:** Uno de los mecanismos de resistencia más exitosos usados por los microorganismos para evadir la acción de los antibióticos es la modificación del blanco molecular. A menudo este tipo de resistencia es generada por mutaciones puntuales en genes seleccionados, resultando en el desarrollo de cambios en los blancos moleculares, sin generar un alto impacto sobre la integridad del microorganismo. Por ejemplo, los antibióticos sintéticos denominados **Fluoroquinolonas**, tienen como blanco la Topoisomerasa tipo IIA necesaria para la relajación del ADN superenrollado, la separación y desencadenado de los hebras hijas en la replicación del ADN bacteriano, mutaciones puntuales observadas en el gen *gyrA* producen un alto grado de resistencia, mutaciones de la Serina 83 por aminoácidos con cadenas laterales mayores como, Leucina,

Isoleucina o Triptófano, o bien el cambio del Aspártico 87 por Asparagina, Tirosina, o Glicina, son comunes en *gyrA* de bacterias resistentes a las **Fluoroquinolonas** (Piddock, 1999). Estos pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos alteran la estructura de esta proteína lo suficiente para impedir la unión y acción de los antibióticos, como demostraron Piton y colaboradores en 2010 al analizar la estructura de la proteína GyrA proveniente de *Mycobacterium tuberculosis* con y sin la presencia de resistencia a la acción de las **Quinolonas** (Piton *et al.*, 2010). Otra manera de modificar el sitio blanco de la acción de los antibióticos, es mediante su modificación regioselectiva catalizada por enzimas. Las metil transferasas ribosomales son un ejemplo de esta estrategia: las enzimas Erm modifican la adenina 2058 de la 23S rARN de la subunidad grande del ribosoma de *E. coli* confiriéndole resistencia a tres diferentes clases estructurales de antibióticos: **Macrólidos** como la **Eritromicina**, **Licosamidas** como la **Clindamicina**, y **Estreptograminas** como la **Quinupristina**. Mediante la determinación de la estructura tridimensional de ribosomas bacterianos en complejo con estos antibióticos se observó que a pesar de sus grandes diferencias en estructura, todos estos antibióticos se unen a la región del túnel de salida de péptidos de la subunidad larga del ribosoma (Bulkley *et al.*, 2010; Dunkle *et al.*, 2010; Blaha *et al.*, 2008; Ogle *et al.*, 2001; Brodersen *et al.*, 2000). La adenina 2058 establece contactos directos o indirectos con estos antibióticos a través de la amina N6 del anillo de purina. Las enzimas Erm catalizan la mono o di-metilación de N6, utilizando como donador a la S-adenosilmetionina (SAM), resultando en la pérdida de sus propiedades para establecer enlaces de hidrógeno y bloqueando el sitio de unión de los antibióticos mediante un impedimento estérico. De manera similar las metil transferasas pueden modificar la adenina 1408 o la guanina 1405 de la 16S rARN de la subunidad ribosomal pequeña, resultando en resistencia contra la acción de los antibióticos de la familia de los **Aminoglicósidos** (Savic *et al.*, 2009). Adenina 1408 y guanina 1405 son blancos críticos para la interacción de los **Aminoglicósidos** con el ribosoma (Brodersen *et al.*,

2000). Las resistencias mediadas por metil transferasas demuestran que los antibióticos presentan una especificidad remarcable y por lo tanto, pequeños cambios moleculares en su blanco de acción neutralizan su actividad.

- b) **Inactivación enzimática del antibiótico:** La destrucción o modificación del antibiótico por acción enzimática es otro de los mecanismos exitosos de resistencia utilizados por las bacterias. El ejemplo más estudiado de este tipo de resistencia es la desactivación hidrolítica del anillo beta-lactámico de las **Penicilinas** y **Cefalosporinas** por las beta-lactamasas producidas por bacterias resistentes (Philippon *et al.*, 1989). Los anillos beta-lactámicos acilan y modifican irreversiblemente a los PBP (Proteína de Unión a Penicilina, por sus siglas en inglés), que son necesarias para el entrecruzamiento de las subunidades de la pared celular, sin embargo, los anillos beta-lactámicos hidrolizados pierden esta propiedad de unión y así se nulifica su efecto. Las bacterias productoras de beta-lactamasas las liberan en el espacio periplásmico para destruir a los antibióticos **beta-Lactámicos** antes de alcanzar su blanco (PBPs) en la membrana citoplasmática. Una sola molécula de beta-lactamasa tiene la capacidad de hidrolizar 10^3 moléculas de **Penicilina** por segundo, así que, si una bacteria puede secretar alrededor de 10^5 enzimas, aproximadamente 100 millones de moléculas de **Penicilina** son hidrolizadas cada segundo, evidenciando el éxito de esta estrategia de resistencia (Walsh, 2000). Otras clases de antibióticos como los **Aminoglucósidos**, no contienen los anillos beta-lactámicos susceptibles a la hidrólisis mediada por las beta-lactamasas, sin embargo, existen otras enzimas que modifican a estos antibióticos, principalmente decorando su periferia con sustituyentes químicos que interrumpen su interacción con sus blancos de ARN en el ribosoma bacteriano (Shaw *et al.*, 1993). Las enzimas encargadas de la modificación de los **Aminoglicósidos** pueden ser, adenil-transferasas que les agregan AMP (Adenosín Monofosfato, por sus siglas en inglés) (*O-adenilización*), fosforil-transferasas que les adicionan grupos $-PO_3$ (*O-fosforilación*), o acetil-transferasas que acetilan (*N-acetilación*) los grupos amino de estos

antibióticos. Las especies modificadas presentan una menor afinidad por el ARN, por lo que no pueden interactuar correctamente con él y la síntesis de proteínas no se interrumpe (Mínguez-Leclercq *et al.*, 1999).

- c) **Modificaciones sobre enzimas y proteínas para evadir la acción de los antibióticos:** Otro mecanismo de resistencia reportado en bacterias es la reprogramación del sitio blanco o la implantación de un “*bypass*” molecular para evitar el efecto de los antibióticos. Este mecanismo es utilizado por los enterococos resistentes a **Vancomicina** (VRE). En estas bacterias los genes *vanHex*, codifican para una nueva serie de enzimas que realizan la reducción del Piruvato a D-Lactato (*vanH*), la unión del D-Lactato y la D-Alanina para la producción de D-Ala-D-Lac (*vanA*) o, hidrolizan el sustrato natural D-Ala-D-Ala (*vanX*). Generando que sólo el precursor D-Ala-D-Lac se acumule y sea utilizado como único sustrato para la elongación de las cadenas de peptidoglicano (Walsh *et al.*, 1996). La presencia del precursor D-Ala-D-Lac en lugar del natural D-Ala-D-Ala no tiene ningún efecto en la eficiencia de entrecruzamiento llevado a cabo por los PBPs, sin embargo, el cambio del D-D-dipéptido natural por el D-D-depsipéptido genera una disminución de 1,000 veces en la afinidad de la **Vancomicina** permitiendo a los VRE crecer en concentraciones 1,000 veces mayores de este antibiótico (Bugg *et al.*, 1991). La resistencia a las **Penicilinas** no sólo es mediada por la expresión de beta-Lactamasas, además mutaciones en las PBPs para disminuir su interacción con los antibióticos o la expresión de nuevas variantes de las PBPs se han reportado en cepas resistentes. Por ejemplo, la adquisición del gen *mecA* que codifica para la proteína PBP2', en *Staphylococcus aureus*, la cual presenta afinidad menor por antibióticos **beta-Lactámicos**; PBP2' es la base genética para el desarrollo del fenotipo **Metacilina** resistente (MRSA) (Chu *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1987; Spratt, 1994) ampliamente diseminado y de preocupación clínica en la actualidad (Deresinski, 2005).

- d) **Presencia de bombas de eflujo:** Para que los antibióticos puedan ejercer su efecto es necesario que estos, puedan interactuar con su blanco de acción en la maquinaria celular bacteriana y que además estos puedan acumularse para alcanzar concentraciones que les permitan actuar en un periodo razonable de tiempo. Por ejemplo, la maquinaria para la síntesis de proteínas está localizada en el citoplasma bacteriano, por lo que los antibióticos que tienen como blanco de acción inhibir la síntesis de proteínas, tienen que atravesar las membranas celulares (externa e interna para Gram negativas y la interna para las Gram positivas) y después acumularse en las concentraciones necesarias para bloquear el paso específico del ensamble proteico sobre el cual actúan (Walsh, 2000). Tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas pueden volverse resistentes a la acción de las **Tetraciclinas**, mediante la sobreproducción de proteínas asociadas a membrana (42 KDa aproximadamente) que actúan como exportadoras o bombas de eflujo para estos antibióticos (Levy, 19992; Paulsen *et al.*, 1996). En este mecanismo los antibióticos son expulsados antes de que puedan difundirse, por lo que su concentración siempre se mantiene por debajo de las necesarias para su acción eficaz. Las bombas de eflujo son generalmente variantes de las bombas utilizadas por todas las bacterias para la internalización y expulsión de moléculas lipofílicas o anfipáticas. Sin embargo, algunas, por pertenecer a bacterias productoras de antibióticos, están optimizadas para la secreción de antibióticos, con la finalidad de prevenir posibles daños ocasionados por sus propios metabolitos. Bombas de eflujo equivalentes se han observado como mecanismo de defensa en diferentes bacterias con resistencia a **Macrólidos** como la **Eritromicina** (Paulsen *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 1990).

Una misma bacteria puede desarrollar diferentes mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos, y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos en diversas especies bacterianas. La industria farmacéutica ha visto casi agotada su capacidad de introducir nuevos fármacos antibacterianos por los altos costos de investigación y la escasa recuperación de la

inversión, por lo que ante el desalentador panorama generado por la constante aparición de cepas bacterianas con resistencia a antibióticos, en los últimos años la investigación farmacológica se ha encaminado hacia la obtención de agentes antimicrobianos con propiedades o mecanismos de acción diferentes a los convencionales, entre los cuales podemos encontrar a los péptidos antimicrobianos de distintas fuentes (Villegas y Corzo, 2005).

1.3. Péptidos antimicrobianos

Los organismos, a través de la evolución, han desarrollado diversos mecanismos para reconocer y neutralizar el ataque de patógenos. Incluso organismos unicelulares simples, como las bacterias, poseen un sistema de enzimas, endonucleasas principalmente, que las protegen contra infecciones virales por bacteriófagos (Labrie *et al.*, 2010). Al conjunto de estos mecanismos de defensa se le denomina sistema inmunológico. Las estrategias de la inmunidad se dividen en mecanismos de inmunidad innata, común en todos los organismos, e inmunidad adquirida o adaptativa, evolucionada en vertebrados. En los organismos multicelulares, las defensas innatas constituyen la primera barrera contra la colonización, infección y enfermedad causada por patógenos. Estas defensas están siempre disponibles y tienen una especificidad limitada, por lo que están dirigidas a contrarrestar las estrategias generales utilizadas por los patógenos para invadir a un organismo. Los principales elementos de la inmunidad innata comprenden, diferentes tipos de barreras físicas como mucosas y la piel, así como, diferentes tipos de células como las NK (Células Asesinas Naturales, por sus siglas en inglés) y granulocitos (macrófagos, neutrófilos) que son activadas por receptores, por ejemplo los del tipo "Toll", para la fagocitosis de los microorganismos patógenos y la liberación de diferentes compuestos y péptidos con capacidades químico atrayentes (citoquinas y quimiocinas) y antimicrobianas (Beutler, 2004; Kimbrell y Beutler, 2001; Medzhitov y Janeway, 1997; Mushegian y Medzhitov, 2001; Turvey y Broide, 2010). Los péptidos antimicrobianos, componentes de la inmunidad innata (Zaslhoff, 2002b), se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en organismos inferiores como superiores, (Andreu y Rivas, 1998;

Bulet *et al.*, 2004; Ganz, 2003a; Lai y Gallo, 2009; Rivas-Santiago *et al.*, 2006; Zasloff, 2002a), han sido aislados en bacterias (Jack *et al.*, 1995; Cotter *et al.*, 2005), en plantas (Barbosa *et al.*, 2011; Thomma *et al.*, 2002), en la hemolinfa y el veneno de abejas, avispas, arañas y alacranes, así como en células epiteliales y la sangre de anfibios y mamíferos (Andreu y Rivas, 1998; Bulet *et al.*, 1999; Corzo *et al.*, 2001; Corzo *et al.*, 2002; Moerman *et al.*, 2002; Villegas y Corzo, 2005; Zeng *et al.*, 2005). Comprenden el principal mecanismo de defensa contra infecciones bacterianas en insectos y anfibios, mientras que en mamíferos son componentes del sistema de inmunidad innata y además, se han reportado diferentes actividades accesorias, como la quimiotaxis, que sirve de enlace con el sistema inmune adaptativo, y la angiogénesis (Agerberth *et al.*, 2000; Gallo y Nizet, 2003; Oppenheim *et al.*, 2003; Rollins-Smith *et al.*, 2005; Schaubert y Gallo, 2008; Yeung *et al.*, 2011). Por lo que debido a la amplia distribución de los péptidos antimicrobianos a través de los organismos se ha generado una gran diversidad en su estructura y espectro de actividad (Epanand y Vogel, 1999; Rosengren *et al.*, 2002). Los péptidos antimicrobianos son moléculas pequeñas, con un tamaño que puede variar entre los 12-50 aminoácidos, que generalmente se organizan en una estructura anfipática, y un peso molecular de entre 2-5 KDa (Jenssen *et al.*, 2006). Sin importar su longitud y características estructurales, los péptidos antimicrobianos poseen dos características comunes: la primera, poseen una carga neta positiva de +2 a +9 debido a la presencia de aminoácidos básicos (Lisinas y Argininas) y la segunda, aproximadamente de un 30-50% de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos (Hancock y Lehrer, 1998; Zasloff, 2002b; Wang y Wang, 2009). Estas características comunes otorgan a los péptidos antimicrobianos un amplio espectro de actividad, que incluye a diferentes tipos de virus encapsulados, microorganismos como bacterias Gram positivas y negativas, levaduras, protozoarios y hongos, además, se ha reportado su actividad citotóxica contra células cancerígenas (Hancock y Lehrer, 1998; Larrick y Wright, 1996), razón por la cual en los últimos años los péptidos antimicrobianos han sido propuestos como candidatos para el desarrollo de nuevos antibióticos. En la actualidad, existen reportadas más de 4,000 secuencias para

péptidos antimicrobianos (Thomas *et al.*, 2010) y se han caracterizado cerca de 1,800 diferentes péptidos tanto naturales como sintéticos, sus secuencias, así como la información estructural de 241 de ellos, están depositadas en la APD (Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos, por sus siglas en Inglés), agrupados con base en la selectividad de su actividad, antiviral, antibacteriana, antifúngica y contra células cancerígenas (Wang y Wang, 2004; Wang *et al.*, 2008). Sin embargo, existen otras bases de datos más especializadas avocadas al estudio de los péptidos antimicrobianos que pueden servir como herramientas para el descubrimiento y diseño de nuevos péptidos antimicrobianos con características mejoradas (Tabla 4).

Tabla 4. Bases de datos avocadas al estudio de los Péptidos Antimicrobianos.

Nombre	Página Web	Contenido	Actualizada	Referencias
AMSDb	http://www.bbcm.units.it/~tossi/pag1.htm	811 Secuencias de PAMs de plantas y animales.	2003	Tossi y Sandri, 2002.
AMPER	http://marray.cmdr.ubc.ca/cgi-bin/amp.pl	1045 Secuencias de plantas y animales y herramientas para el descubrimiento de PAMs.	2007	Fjell <i>et al.</i> , 2007.
APD2	http://aps.unmc.edu/AP/main.php	1954 Secuencias de PAMs de todas las fuentes y sintéticos. Herramientas para el descubrimiento y diseño de PAMs.	2012	Wang y Wang, 2004. Wang <i>et al.</i> , 2009.
Bactibase 2	http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php	177 Secuencias de Bacteriocinas naturales.	2009	Hammami <i>et al.</i> , 2007. Hammami <i>et al.</i> , 2010.
BAGEL2	http://bagel2.molgenrug.nl/	335 Secuencias de Bacteriocinas y herramientas de predicción en procariontes.	2010	de Jong <i>et al.</i> , 2006. de Jong <i>et al.</i> , 2010.
CAMP	http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/	4020 Secuencias de PAMs de todas las fuentes, 1216 validadas experimentalmente.	2010	Thomas <i>et al.</i> , 2010.
CyBase	http://www.cybase.org.au/	498 Secuencias de PAMs cíclicos de todas las fuentes y aplicaciones para diseño.	2012	Mulvenna <i>et al.</i> , 2006. Wang <i>et al.</i> , 2008.
DAMPD	http://apps.sanbi.ac.za/dampd/index.php	Antes ANTIMIC, 1232 Secuencias de PAMs validadas experimentalmente y herramientas para el descubrimiento de PAMs.	2011	Brahmachary <i>et al.</i> , 2004. Brahmachary <i>et al.</i> , 2006. Sundararajan <i>et al.</i> , 2011.
Defensin Knowledgebase	http://defensins.bü.a-star.edu.sg/	363 Secuencias de PAMs de la familia de las Defensinas de todas las fuentes.	2008	Seebah <i>et al.</i> , 2007.
Penbase	http://penbase.immunaqua.com/	28 Secuencias de PAMs de la familia de las Penacidinas	2008	Gueguen <i>et al.</i> , 2006.
Peptaibols	http://peptaibol.cryst.bbk.ac.uk/home.shtml	317 Secuencias y estructuras de la familia de los Peptaibols, PAMs con amino ácidos no estándar.	2004	Chugh y Wallace, 2001. Whitmore y Wallace, 2004.
PhyAMP	http://phytamp.pfba-lab-tun.org/main.php	271 Secuencias de PAMs naturales aislados de plantas.	2008	Hammami <i>et al.</i> , 2009.
RAPD	http://faculty.ist.unomaha.edu/chen/rapid/	179 Secuencias de PAMs producidos de manera recombinante.	2010	Li y Chen, 2008.

PAMs: Péptidos antimicrobianos.

1.3.1. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos

Las superficies de las membranas bacterianas se encuentran cargadas negativamente por la presencia de fosfolípidos como el fosfatidilglicerol, la cardiolipina o la fosfatidilserina, que presentan una carga neta negativa. Se ha propuesto que las regiones catiónicas de los péptidos antimicrobianos interactúan con los fosfolípidos de la membrana, mientras que sus regiones hidrofóbicas se insertan en el interior hidrofóbico, ensamblándose en diferentes poros multiméricos que causan la lisis celular (Hancock y Lehrer, 1998; Yeaman y Yount, 2003). Para el caso de las bacterias Gram positivas, envueltas por una simple membrana citoplasmática y peptidoglicano, los péptidos se unen a la superficie externa de la membrana, después, se insertan en ella formando canales que permiten la filtración del contenido celular al exterior (Hancock y Lehrer, 1998). Las bacterias Gram negativas están conformadas por una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos (estabilizados por cationes como Mg^{+2} y Ca^{+2}), proteínas y fosfolípidos, el espacio periplásmico (compuesto de proteínas y peptidoglicano) y la membrana citoplasmática (compuesta de fosfolípidos). Los péptidos antimicrobianos interactúan inicialmente con los lipopolisacáridos de la superficie bacteriana, desplazando los cationes e insertándose en la membrana mediante un proceso denominado “Self-promoted-uptake”. Este proceso permite la entrada de diferentes moléculas como otros péptidos antimicrobianos, compuestos hidrofóbicos, o bien, antibióticos (Hancock y Lehrer, 1998). El mecanismo molecular por el cual los péptidos antimicrobianos se permeabilizan a través de las membranas provocando su disrupción es dependiente de parámetros como la secuencia de aminoácidos, su carga neta y la concentración del péptido (Oren y Shai, 1998; Powersand y Hancock, 2003). Aunque como se mencionó anteriormente el objetivo principal de la actividad de los péptidos antimicrobianos es la membrana celular de las bacterias (proceso disruptivo), los péptidos antimicrobianos pueden difundirse al espacio intracelular e interferir con procesos esenciales para la maquinaria celular bacteriana, tales como, la síntesis y plegado de proteínas, así como la replicación del ADN y el ARN (proceso no disruptivo) (Almeida y Pokorny,

2009; Marcos y Gandía, 2009; Nicolas, 2009; Powersand y Hancock, 2003; Sharma y Khuller, 2001; Sitaram y Nagaraj, 2002) (Figura 3).

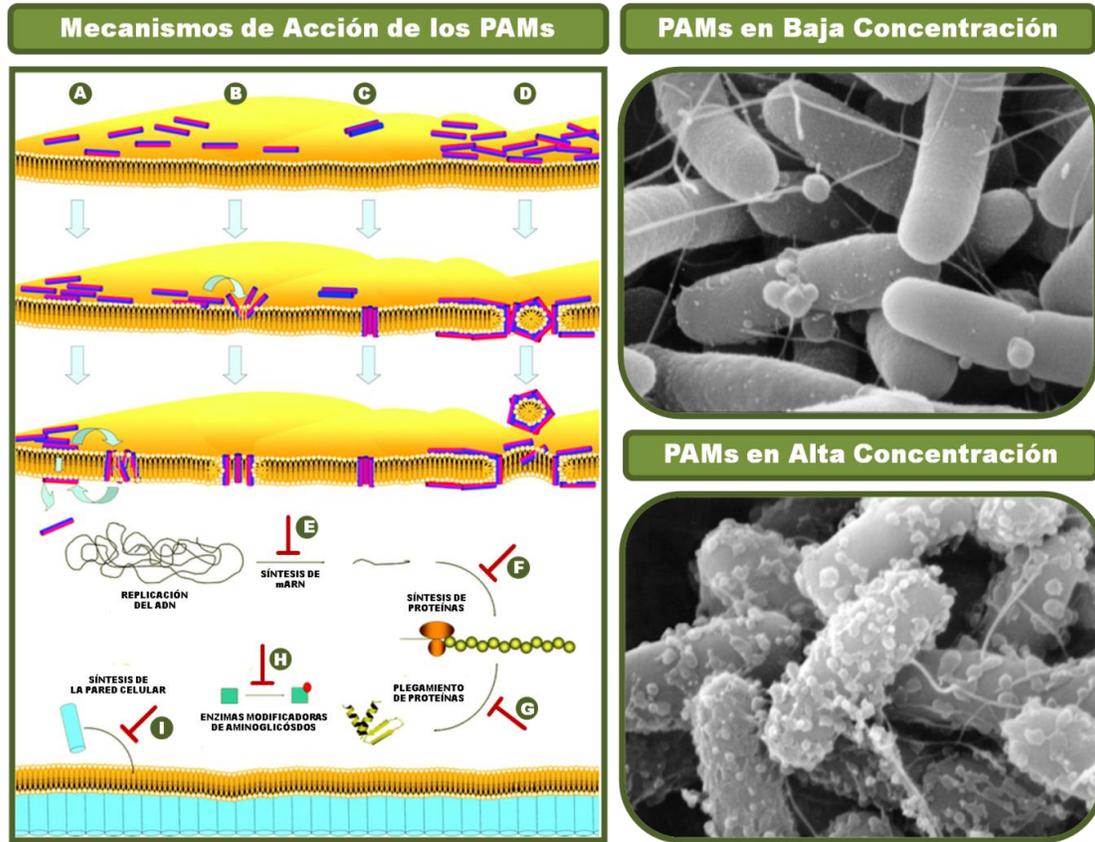


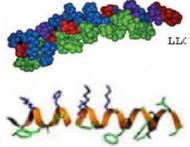
Figura 3. Mecanismos mediante los cuales los péptidos antimicrobianos generan la lisis celular bacteriana. Izquierda, A) Internalización por flip-flop y Poro multimérico, B) Poro toroidal, C) Barril sin fondo, D) Mecanismo de carpeta y E-I) Posibles blancos intracelulares. Derecha, Unión de los péptidos antimicrobianos a la superficie de la membrana bacteriana de *E. coli*, en baja y alta concentración. (Modificada de Jenssen *et al.*, 2006).

1.3.2. Clasificación y estructura de los péptidos antimicrobianos

Existen diferentes maneras de clasificar a los péptidos antimicrobianos, estos pueden ser clasificados por su procedencia (insectos, plantas, anfibios, mamíferos), o bien por la selectividad de su actividad (virus, bacterias, protozoarios, células de cáncer). Sin embargo, la forma de clasificación de los péptidos antimicrobianos más utilizada en la literatura científica está basada en sus características estructurales.

Existen cuatro familias o clases estructurales: hojas beta, alfa-hélices, asas y péptidos lineales, siendo las dos primeras las más comunes en la naturaleza (Hancock y Lehrer, 1998). Algunos ejemplos de estructuras correspondientes a algunos péptidos antimicrobianos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Clasificación estructural de los péptidos antimicrobianos.

Clasificación	Características	Ejemplos	Estructuras
Hebras beta	2-4 Puentes Disulfuro	alfa-Defensinas	
		beta-Defensinas	
alfa-Hélices	Sin Puentes Disulfuro	LL-37 Magaininas	
Lineales	Ricos en G, P, W, R/H	Indolicinas	
Asas	1 Puente Disulfuro	Mersacidina	

Modificada de Hancock y Sahl, 2006.

1.3.3. Péptidos antimicrobianos alfa-lineales del veneno de arácnidos

Los péptidos antimicrobianos con estructura alfa-helicoidal son moléculas lineales que, principalmente, se encuentran como estructuras desordenadas en medios acuosos, adquiriendo su conformación helicoidal justo antes de interactuar con las regiones hidrofóbicas de las membranas bacterianas. Estos péptidos antimicrobianos son producidos por organismos que van desde los insectos hasta los humanos (Tossi *et al.*, 2000) y de manera general, poseen un amplio y potente espectro de actividad (bacterias, virus, hongos y levaduras). Sin embargo, su espectro de acción de los diferentes péptidos

antimicrobianos es variable a través de ellos (Tossi *et al.*, 2000); algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos con estructura alfa-helicoidal se enumeran en la tabla 6.

Tabla 6. Péptidos antimicrobianos de la familia de las alfa-hélices.

PAM	Fuente	Secuencia	Actividad
Cecropina P1 ^[a]	Cerdo	SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGLAIAIQGGPR	Bacterias Gram +/-, Hongos y Protozoarios
Magainina 2 ^[b]	Rana	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Bacterias Gram +/-, Hongos y Protozoarios
Melitina ^[c]	Abeja	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ	Bacterias Gram +/-, Hongos y Eritrocitos
Cetelucidina LL-37 ^[d]	Humano	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	Bacterias Gram +/- y Virus

^[a] Christensen *et al.*, 1988 ^[b] Zasloff, 1987 ^[c] Andreu *et al.*, 1992 ^[d] Agerberth *et al.*, 1995.

El veneno de los diferentes arácnidos es una mezcla compleja de diferentes componentes proteicos, tales como, toxinas, enzimas y péptidos. Estos componentes actúan como herramientas de defensa contra predadores o bien, para capturar a sus presas (Nicholson, 2006; Possani y Rodríguez de la Vega, 2006). En el caso de los venenos provenientes de los alacranes y escorpiones se conocen cerca de 350 componentes proteicos y se proyecta que existen cerca de 100,000 distintos componentes (Possani *et al.*, 1999). Los componentes proteicos más estudiados en los venenos de escorpiones son las toxinas de Na⁺ y K⁺, pero también se han reportado actividades enzimáticas (hialuronidasa y fosfolipasa) (Jungo y Bairoch, 2005; Possani, 1984), así como la presencia de péptidos antimicrobianos (Tabla 6) alfa-Lineales, **Pandininas**, **IsCT**, **Opistoporinas** y **BmK** (Corzo *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2002; Moerman *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2004). Por otro lado, el veneno de las arañas también presenta una amplia gama de componentes proteicos (Escoubas, 2006; Escoubas y Rash, 2004; Estrada *et al.*, 2007b), principalmente neurotoxinas específicas para insectos, las cuales han sido propuestas como alternativas para el control biológico de plagas en diferentes cultivos (Corzo *et al.*, 2000; de Castro *et al.*, 2004; Escoubas *et al.*, 2000; Nicholson, 2006). En las glándulas venenosas de diferentes arañas se han identificado péptidos antimicrobianos como las **Oxyopininas**, **Latarcinas** y **Lycotoxinas** (Corzo *et al.*, 2002; Kozlov *et al.*,

2006; Moerman *et al.*, 2002; Yan y Adams, 1998; Zeng *et al.*, 2004). Estos reportes ponen de manifiesto el potencial de los venenos de los arácnidos para la identificación de nuevos péptidos antimicrobianos.

Tabla 7. Actividad de antimicrobianas y antifúngicas de Péptidos Antimicrobianos aislados del venenos de alacranes.

PAM	CMI (μ M) Bacterias		Actividad Antifúngica CI_{50}	Actividad Hemolítica
	Gram +	Gram -		
Hadurina	10-50	10-50	N. D.	+
Parabutoporina	6.3- >50*	1.6- >50*	0.3-3.5	+
Pandinina 1	1.3-5.2	20.8- >20.8	>20.8**	+
Opistoporina 1	12.5- >50*	1.6- >50*	N. D.	+
Opistoporina 2	N. D.	N. D.	19.1**	N. D.
Pandinina 2	2.4-4.8	19.1-38.2	N. D.	+
BmKb 1	16.0-81.5	18.1-98.8	N. D.	N. D.
IsCT	0.7-16.6	3.3- >150	N. D.	+
IsCT 2	0.7-17.1	3.4- >150	N. D.	+
BmKn 2	0.6-8.0	1.5-21.3	N. D.	N. D.

CMI, Concentración Mínima Inhibitoria; N.D., No Determinada; +, Actividad positiva; CI_{50} , Concentración necesaria para inhibir e crecimiento fúngico en un 50%; *, Ensayo en ausencia de Mg^{+2} ; **, Valor de la CMI (Modificada de Zeng *et al.*, 2004).

1.3.3.1. Oxyopininas y Pandininas

En nuestro grupo de investigación se ha abordado el estudio de péptidos antimicrobianos provenientes principalmente del veneno de arácnidos, reportando la purificación y caracterización de diferentes péptidos, tales como las **Oxyopininas** (Oxki1 y Oxki2) del veneno de *Oxyopes takiobus* y las **Pandininas** (Pin1 y Pin2) del veneno de *Pandinus imperator* (Corzo *et al.*, 2001; Corzo *et al.*, 2002; Belokoneva *et al.*, 2003; Belokoneva *et al.*, 2004; Nomura *et al.*, 2004; Nomura *et al.*, 2005; Nomura y Corzo, 2006). Estos péptidos poseen cualidades y potencial para ser considerados como antibióticos de aplicación tópica (Villegas y Corzo, 2005). La estructura secundaria de estos antibióticos peptídicos es una estructura alfa-lineal, la cual es interrumpida generalmente por aminoácidos que rompen esta estructura para continuar en un segmento alfa-helicoidal (Corzo *et al.*, 2001; Nomura *et al.*, 2004). Estos aminoácidos, Prolina (presente en Pin2) o Glicina-Valina-Glicina (presente en Oxki2), dividen la estructura alfa-hélice en dos secciones, generando propiedades más hemolíticas (cuando existe una

Prolina) o menos hemolíticas (cuando existe Glicina-Valina-Glicina), esta característica les permite ser propuestos como productos antimicrobianos con igual modo de acción pero con un menor o mayor índice terapéutico, por lo que modificaciones estructurales mediante sustituciones de aminoácidos que mejoren el índice terapéutico de estas moléculas, generarían un producto con propiedades antimicrobianas comercialmente diferentes (Estrada *et al.*, 2007b; Villegas y Corzo, 2005).

1.3.3.2. Efecto de la incidencia de residuos de Prolina en las regiones centrales de los péptidos antimicrobianos alfa-lineales provenientes de venenos

Los residuos de Prolina pueden ser encontrados comúnmente en las regiones centrales de componentes de proteínas transmembranales con estructura alfa-helicoidal (Bywater *et al.*, 2001; Sansom, 1992), su elevada frecuencia en este tipo de proteínas es indicativo de roles estructurales y funcionales (Cordes *et al.*, 2002). La Prolina se presenta en concentraciones significativas dentro de las regiones centrales de alfa-hélices transmembranales, regularmente antes de una Glicina. Debido a la hidratación estérica y la ausencia de puentes de hidrógeno, las Prolinas introducen una región de flexibilidad en la estructura transmembranal, la cual en ocasiones se incrementa por la presencia de residuos de Glicina cercanos (Cordes *et al.*, 2002). Diferentes péptidos antimicrobianos formadores de poros en las membranas bacterianas, como la **Melitina** del veneno de *Apis mellifera* y la **Pardaxina** de *Pardachirus marmoratus*, presentan residuos de Prolina en sus regiones centrales (Tabla 5). Su presencia ha sido relacionada con una gran actividad antimicrobiana, sin embargo, estos péptidos también presentan actividades hemolíticas a concentraciones bajas (Dathe *et al.*, 1998; Dempsey *et al.*, 1991; Oren y Shai, 1997; Thennarasu y Nagaraj, 1996). Por el contrario, péptidos antimicrobianos no hemolíticos como la **Magainina 2** (aislada de la piel de la rana *Xenopus laevis*), solo presentan residuos de Glicina en sus regiones centrales (Zasloff, 1987), sugiriendo el efecto de estos residuos en la modulación de la actividad hemolítica. En la figura 4 se muestra la estructura alfa-hélice de la **Magainina 2** de la piel de *Xenopus laevis* y la estructura hélice-doble-hélice de la **Melitina** del veneno de *Apis mellifera*.

Tabla 8. Prolina en la regiones centrales de diferentes péptidos antimicrobianos hemolíticos.

Péptido	Secuencia	% Similitud	Referencias
Pandinina 2	FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKKD--	100.0	Corzo <i>et al.</i> , 2001.
Brevinina 1	FLPVLAGIAAKVVPALFCKITKKC--	75.2	Morikawa <i>et al.</i> , 1992.
Gaegurina 5	FLGALFKVASKVLPKV KCAITKKC-	73.2	Park <i>et al.</i> , 1994.
Pipinina 1	FLPIIAGVAAKVFPKIFCAISKKC--	72.2	Goraya <i>et al.</i> , 2000.
Pipinina 2	FLPIIAGIAAKVFPKIFCAISKKC--	71.4	Goraya <i>et al.</i> , 2000.
Ponicicina W5	FWGALIKGAAKLIPSVVGLFKKKQ	70.0	Orivel <i>et al.</i> , 2001.
Gaegurina 6	FLPLLAGLAANFLPTIICKISYKC--	67.0	Park <i>et al.</i> , 1994.
Melitina	GIGAVLKVLTGGLPALISWIKRKRQQ	63.4	Kreil, 1973.
Ponicicina W3	IWGTLAKIGIKAVPRVISMLKKK	56.0	Orivel <i>et al.</i> , 2001.

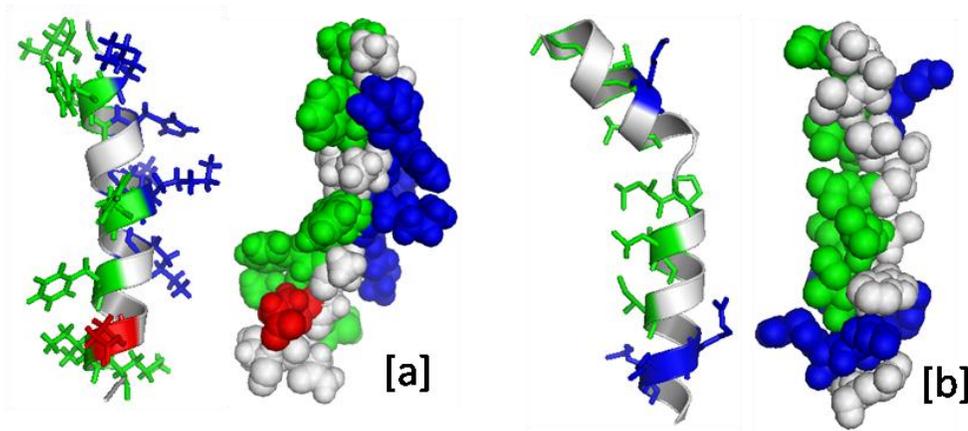


Figura 4. Estructuras de péptidos antimicrobianos alfa-lineales. [a] Magainina 2 de *Xenopus laevis* [PDB ID: 2MAG] (Gesell *et al.*, 1997) y [b] Melitina de *Apis mellifera* [PDB ID: 2MLT] (Anderson *et al.*, 1980). ● Residuos hidrofóbicos, ● Residuos ácidos y ● Residuos básicos.

Se han realizado diferentes estudios avocados a la modificación de péptidos altamente hemolíticos, como la **Melitina** y la **Pardaxina**, con la finalidad de aumentar su especificidad hacia las bacterias y disminuir su actividad hemolítica, utilizando estrategias como modificación de sus regiones C-terminales o insertando D-aminoácidos en su estructura (Oren y Shai, 1997; Sitaram y Nagaraj, 2002). Cambios y eliminaciones de las Prolinas centrales presentes en las secuencias de estos péptidos generan diferentes efectos, por ejemplo, la sustitución de la Prolina 14 por Alanina en los péptidos antimicrobianos **Melitina** y **Pardaxina** incrementa sus actividades antimicrobianas y hemolíticas, como resultado de un incremento en la helicidad de los análogos (Dempsey *et al.*, 1991). Por otro lado, péptidos antimicrobianos catiónicos como las **Oxyopininas** provenientes del veneno de la araña

Oxyopes takiobus y las **Ponericinas G** del veneno de la hormiga ponerina *Pachycondyla goeldii* presentan actividades antimicrobianas, sin efectos cito tóxicos contra eritrocitos. Estos péptidos presentan diferentes perfiles en sus regiones centrales, las **Oxyopininas** poseen la secuencia [GVG] y las ponericinas G tienen Glicinas flanqueando a la Prolina central de su secuencia generando el motivo estructural [GPG] (Corzo *et al.*, 2002; Orivel *et al.*, 2001). Híbridos sintéticos de **Melitina** y **Cecropina** en los cuales la Prolina central de la **Melitina** fue cambiada por Glicina o flanqueada por los mismos residuos, como en el caso de las **Ponericinas G**, no presentaron actividades hemolíticas en comparación con los péptidos parentales y otros análogos en los que la Prolina permaneció presente (Shin *et al.*, 1999). La hemólisis es una de las principales limitaciones para la aplicación de los péptidos antimicrobianos como terapéuticos (Blondelle y Houghten, 1992). La **Pandinina 2** (Pin2) es un péptido catiónico con una estructura alfa-helicoidal aislado del veneno del escorpión africano *Pandinus imperator*, este péptido presenta actividades antimicrobianas contra bacterias Gram positivas y negativas en el rango micromolar, pero además este péptido es altamente hemolítico en concentraciones cercanas a las de actividad antimicrobiana (Corzo *et al.*, 2001). Pin2 posee un residuo de Prolina en la parte media de su estructura formando un motivo hélice-doblez-hélice como en los péptidos **Melitina**, **Alameticina** y **Pardaxina** (Corzo *et al.*, 2001). Nosotros proponemos en este reporte que la incidencia del motivo hélice-doblez-hélice a través de diferentes péptidos antimicrobianos altamente hemolíticos, podría ser un factor intrínsecamente relacionado con la selectividad de la actividad de estos péptidos. Por lo que el intercambio del motivo hélice-doblez-hélice por la introducción de la secuencia [GVG] inspirada en las **Oxyopininas** o bien, la adición de Glicinas flanqueando a la Prolina central de Pin2 [GPG] como en el caso de la **Ponericinas G**, podrían tener un efecto sobre la selectividad de la actividad de Pin2 disminuyendo su perfil hemolítico.

1.3.4. Péptidos antimicrobianos de origen humano

Existen diferentes tipos de péptidos antimicrobianos de procedencia humana, dentro de los cuales destacan las **Histatinas**, **Catelicidinas** y, las **alfa-Defensinas** y **beta-Defensinas** como los más estudiados (Agerbert *et al.*, 1995; Agerbert *et al.*, 2000; De Smet y Contreras, 2005; Ganz, 2003b; Ryley, 2001). En la APD se encuentra la secuencia de 28 diferentes péptidos antimicrobianos de procedencia humana y de 9 análogos sintéticos con actividad antimicrobiana probada (Anexo 1). La longitud de los péptidos humanos varía entre 12 y 45 residuos y su carga neta positiva va desde +2 hasta +12. Se han identificado además, actividades antifúngicas, antivirales y citotóxicas relacionadas con estos péptidos (Cole y Ganz, 2000). Dentro de los péptidos humanos más referenciados en la literatura científica encontramos a las **Defensinas**. En todas las **Defensinas** existen seis residuos de cisteína ampliamente conservados, los cuales forman tres puentes disulfuro intramoleculares, los cuales estabilizan tres hebras beta antiparalelas (Bauer *et al.*, 2001; Ganz y Lehrer, 1994; Lehrer, 2004), su longitud varía de 30-40 aminoácidos y presentan un peso molecular de 3-4 KDa (Ganz y Lehrer, 1994). Las **Defensinas** presentan una estructura tridimensional similar en solución (Bauer *et al.*, 2001) y se subdividen en alfa, beta y teta de acuerdo con el patrón de sus tres puentes disulfuro, sin embargo, en los humanos solo existen las clases alfa y beta. En la figura 5 se muestra el alineamiento de algunos ejemplos de **alfa** y **beta-Defensinas** y en la figura 6 las estructuras de la **alfa-Defensina humana 2** (hNP2) y la **beta-Defensina humana 2** (hBD2).

1.3.4.1. beta-Defensinas

Las **beta-Defensinas** han sido aisladas principalmente en tejidos epiteliales humanos, pero además, se han detectado en mucosas orales y nasales, pulmón, glándulas salivales, intestino, estomago, riñones, ojos entre otros (Fellermann y Stange, 2001; Lehmann *et al.*, 2002; Nitschke *et al.*, 2002; Valore *et al.*, 1998).

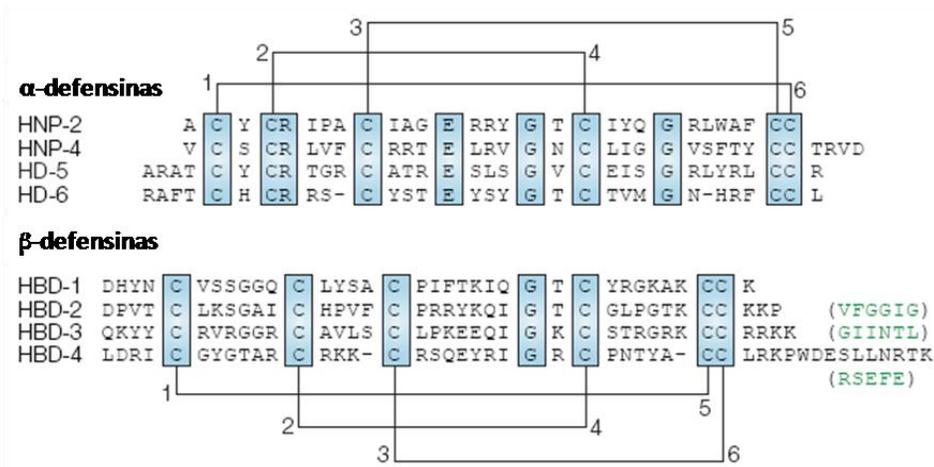


Figura 5. Alineamientos de alfa y beta-Defensinas presentando el patrón de sus puentes disulfuro. alfa-Defensinas Cys1-Cys6, Cys2-Cys4, Cys3-Cys5 y beta-Defensinas Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6, los residuos verdes indican variaciones en la secuencia carboxilo terminal (Lehrer, 2004).

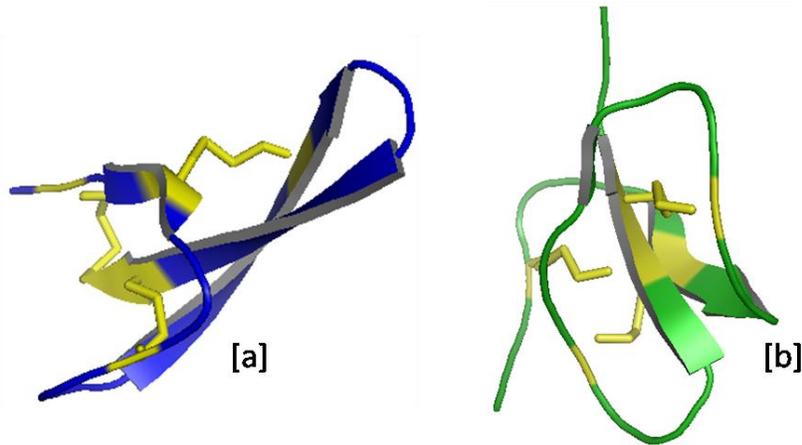


Figura 6. Estructuras de Defensinas humanas. [a] alfa-Defensina humana 2 [PDB ID: 1ZMH] (Xi *et al.*, 2005) y [b] la beta-Defensina humana 2 [PDB ID: 1E4Q] (Bauer *et al.*, 2001).

Hasta la fecha se han aislado y caracterizado solo seis **beta-Defensinas** (hBD 1-6) (Yang *et al.*, 2004), pero gracias a estudios genómicos y con la ayuda de estrategias computacionales se han identificado un total de 23 nuevos genes que hipotéticamente codifican para **beta-Defensinas** (Pazgiera *et al.*, 2006; Schutte *et al.*, 2002) (Figura 5), de los cuales cuatro han sido reportados a nivel de ARNm (hBD7, hBD9, hBD11 y hBD12) con expresión constitutiva en queratinocitos gingivales y dos (hBD8 y hBD14) inducidos en las mismas células por Interleucina (IL) 1 β y reto con diferentes especies de

Candida, indicando la importancia de múltiples **beta-Defensinas** en la respuesta a infecciones orales (Premratanachai *et al.*, 2004). Las hBD1 y hBD2 son producidas en células epiteliales (Yang *et al.*, 2001), mientras que la hBD3 se expresa en diferentes órganos y tejidos no epiteliales (García *et al.*, 2001; Harder *et al.*, 2001). Mientras que la hBD1 se expresa constitutivamente, las hBD2 y hBD3 pueden ser inducidas por la presencia de virus, bacterias, productos microbianos (endotoxina) o por citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis de tumores (TNF, por sus siglas en inglés) e interleucina 1 (IL-1) (Duits *et al.*, 2003; Ganz, 2003b; Proud *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2001). La hBD4 presenta expresión constitutiva en testículos y puede ser inducida en células respiratorias humanas con infecciones bacterianas; las hBD5 y hBD6 se restringen al epidídimo (Yamaguchi *et al.*, 2002). Las **beta-Defensinas** 2 y 3 han demostrado su actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos (aerobios y anaerobios) con incidencia en infecciones bucales como *Actinomyces* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Candida* sp., entre otros (Joly *et al.*, 2004), hBD3 presenta la mejor actividad antimicrobiana caracterizada en este tipo de péptidos (<10µg/mL) y además, por su alta concentración de cargas positivas (+12) es menos sensible a la presencia de sales en el medio (Jung *et al.*, 2011; Harder *et al.*, 1997; Harder *et al.*, 2001). Además, diferentes reportes han demostrado que las **beta-Defensinas** pueden contribuir al control de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) "*in vivo*" (Chang y Klotman, 2004; Quiñones-Mateu *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005). En nuestro grupo de investigación se ha logrado el plegamiento y producción "*in vitro*" de toxinas de alacranes y arañas con estructuras conformadas por hojas beta plegadas y la presencia de hasta cuatro puentes disulfuro (Estrada *et al.*, 2007a; Hernández-Salgado *et al.*, 2009), aprovechando esta experiencia previa, este proyecto permitió a nuestro grupo incursionar en el estudio de las **beta-Defensinas** humanas, péptidos antimicrobianos que presentan tres puentes disulfuro. En este reporte seleccionamos dos secuencias, la de la **beta-Defensina humana 11** (hBD11), debido a que su actividad antimicrobiana no ha sido caracterizada y además presenta la secuencia más corta reportada para una

beta-Defensina humana, facilitando así su producción por síntesis química y por otro lado, la secuencia consenso de 32 aminoácidos surgida del alineamiento de todas las **beta-Defensinas** caracterizadas experimentalmente así como de las hipotéticas, deducidos por su similitud de secuencia, que presenta una carga neta de +9 cercana a la de la hBD3 (+11). Debido a la similitud a nivel de secuencia entre las **beta-Defensinas** humanas estudiadas en este trabajo (hBD11 y hBDcon) y las ya caracterizadas previamente (hBD 1-6/26-28), se espera que presenten un plegamiento similar y actividades antimicrobianas tanto contra bacterias Gram positivas y negativas, sin presentar actividades hemolíticas.

1.3.5. Potencial terapéutico y limitaciones de los péptidos antimicrobianos

1.3.5.1. Potencial terapéutico de los péptidos antimicrobianos

Como ya se mencionó en la primera parte de la introducción, en los últimos años se ha generado un incremento significativo del número de cepas bacterianas con resistencia a antibióticos, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar antibióticos novedosos que ayuden a solucionar esta problemática. Los péptidos antimicrobianos, debido a su mecanismo de acción, amplio espectro de actividad, poca resistencia bacteriana, y sus actividades inmunomoduladoras, han sido propuestos como candidatos para el desarrollo de nuevos antibióticos y sus aplicaciones podrían abarcar diferentes ámbitos productivos, relacionados a la salud (Tabla 8). A la fecha al menos de 20 productos terapéuticos basados en péptidos antimicrobianos han sido sometidos para su aprobación por la FDA (Administración Americana de Alimentos y Medicinas, por sus siglas en inglés), sin embargo, solo un par de ellos han sido aceptados para su comercialización, dado que, para la mayoría de estas moléculas, aun existen ciertas limitantes a vencer para lograr su aprobación como terapéuticos. El primer PAM aceptado para aplicación fue la Nicina, este péptido antimicrobiano de 34 aminoácidos pertenece a la familia de los antibióticos bacterianos o bactericinas y es producido mediante fermentación de la bacteria *Lactococcus lactis* en sustratos naturales como leche y dextrosa. La principal aplicación de este

PAM se relaciona con la industria de los alimentos y es utilizado en concentraciones que van desde 1-25 ppm como preservador de diferentes productos como, quesos, carnes y bebidas, evitando su descomposición por la acción de bacterias Gram negativas (Bajardí, 2011; Laverty *et al.*, 2011; Ruhr y Sahl, 1985).

Tabla 9. Aplicaciones propuestas para los péptidos antimicrobianos.

Aplicación	Referencia
Quimioprofilaxia antimicrobiana, evitando la adherencia de bacterias infecciosas a los dispositivos médicos implantados en cirugías.	Cirioni <i>et al.</i> , 2003
Inhibir el crecimiento de las bacterias orales asociadas al desarrollo de la caries y a la formación temprana de la placa bacteriana.	Concannon <i>et al.</i> , 2003
Tratamiento de las infecciones de la piel.	Ulvatne, 2003
Terapia de úlceras estomacales ocasionadas por infecciones de <i>Helicobacter pylori</i> .	Projan y Blackburn, 1993
Agentes anticonceptivos que limiten la infección de enfermedades de transmisión sexual provocadas por <i>Neisseria</i> , <i>Chlamydia</i> y los virus del Herpes e inmunodeficiencia humana.	Yasin <i>et al.</i> , 2000
Agentes que mejoren la potencia de los antibióticos comunes, facilitando su acceso al interior de las células bacterianas.	Darveau <i>et al.</i> , 1991
Seguridad alimentaria.	Rydlo <i>et al.</i> , 2006

1.3.5.2. Limitantes de los péptidos antimicrobianos

Se han planteado tres limitantes principales para lograr el aprovechamiento de los péptidos antimicrobianos como terapéuticos en la industria farmacéutica:

1. **Posible toxicidad contra células eucariotas:** Esta limitante restringe su modo de aplicación al tratamiento tópico de infecciones superficiales y deja de lado su uso parenteral y oral, que son las aplicaciones más lucrativas en el mercado farmacéutico (Hancock y Sahl, 2006). Las posibles alternativas para contender con esta desventaja son el diseño de péptidos con actividad hemolítica reducida y el uso de los péptidos de origen humano, como la **Catelicidina LL-37** y las **beta-Defensinas**, que por su origen, poseen una menor actividad hemolítica y toxicidad contra células eucariotas (Sandgren *et al.*, 2004).
2. **Susceptibilidad a la acción enzimática de las proteasas:** Por ejemplo, enzimas proteolíticas como la tripsina atacan a las proteínas en los residuos básicos, esenciales para la actividad de

los péptidos antimicrobianos. Se han propuesto diferentes soluciones a este problema, tales como el uso de D-aminoácidos en lugar de los L-aminoácidos naturales y la modificación química de los péptidos para favorecer su estabilidad y disminuir su toxicidad (McPhee *et al.*, 2005).

3. **El alto costo de la síntesis química de los péptidos antimicrobianos:** El costo de la síntesis química de péptidos antimicrobianos varía entre 100 y 600 dólares por gramo (dependiendo de su longitud), limitando el estudio y el desarrollo de gran número de variantes de estos péptidos. Por lo que la solución a esta desventaja se direcciona hacia el uso de las técnicas del ADN recombinante y el uso de bacterias, hongos y plantas como sistemas de producción (Hancock y Sahl, 2006).

El principal objetivo de este estudio consistió en desarrollar péptidos antimicrobianos, basados en estructuras alfa-helicoidales como Pin2 y hojas beta plegadas como en las **Defensinas**, con característica mejoradas, tales como mayores actividades antibióticas, toxicidad reducida y menores longitudes, propiedad que reduce los costos de producción de estas moléculas mediante el uso de la síntesis química, y con mayores índices terapéuticos, y así favorecer su posible aplicación en la industria farmacéutica, como herramientas novedosas para combatir la emergencia generada por lo incidencia de bacterias multirresistentes a los antibióticos convencionales en el futuro.

2. HIPÓTESIS

2.1. Hipótesis, diseño de variantes con base en la secuencia de Pin2

En este reporte se propone que la incidencia del motivo hélice-doblez-hélice a través de diferentes péptidos antimicrobianos altamente hemolíticos, podría ser un factor intrínsecamente relacionado con la selectividad de la actividad de estos péptidos. Por lo que el intercambio del motivo hélice-doblez-hélice por la introducción de la secuencia [GVG] inspirada en las **Oxyopininas** o bien, la adición de Glicinas flanqueando a la Prolina central de Pin2 [GPG] como en el caso de la **Ponericinas G**, podrían tener un efecto sobre la selectividad de la actividad de Pin2 disminuyendo su perfil hemolítico y aumentando su índice terapéutico.

2.2. Hipótesis, caracterización de beta-Defensinas de origen humano

Por otra parte, en este reporte se decidió evaluar la actividad antimicrobiana y hemolítica de dos diferentes secuencias pertenecientes a la familia de las **beta-Defensinas** humanas, hBD11 y hBDcon, debido a que, por su procedencia se propone que no generarán ningún efecto tóxico contra células eucariontes y porque sus actividades antimicrobianas podrían ser comparables a las de **beta-Defensinas** humanas reportadas en la literatura, generando péptidos con índices terapéuticos atractivos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Diseñar y sintetizar antibióticos peptídicos contra cepas patógenas de interés clínico que presenten una mayor actividad antimicrobiana comparada con antibióticos proteicos naturales tipo **alfa-hélice** y tipo **beta-Defensina**.

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de cambios en la secuencia de Pin2 sobre su estructura, actividad antibiótica, hemolítica e índice terapéutico.
2. Caracterizar la estructura, actividades antimicrobiana y hemolítica e índice terapéutico de la **beta-Defensina humana 11** y la **beta-Defensina consenso**.
3. Comparar la actividad antimicrobiana y la selectividad de los péptidos tipo **alfa-lineales** y **beta-Defensinas** obtenidos en este trabajo, con la finalidad de establecer cuál de los dos formatos estructurales presentan un mayor potencial para el diseño de nuevos péptidos con potencial terapéutico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Agentes químicos y material biológico

4.1.1. Reactivos y solventes

Todos los reactivos, medios de cultivo y solventes utilizados durante la realización de los diferentes experimentos enumerados en esta tesis fueron de grado extra puro. Los medios de cultivo agar y caldo Mueller-Hinton, agar y caldo Soya Trypticase, utilizados para los ensayos de actividad antimicrobiana y la preservación de las diferentes cepas bacterianas fueron obtenidos de BD Bioxon (Estado de México, México). Las resinas de síntesis y los diferentes aminoácidos protegidos fueron obtenidos de ChemPep Inc. (Miami, Florida, EE.UU.). El imidazol, tianizol, ácido trifluoroacético, etanoditiol (EDT), fenol, ácido acético, sulfato de amonio y el acetonitrilo, utilizados para la purificación de los péptidos sintéticos, además de los antibióticos utilizados como testigos fueron obtenidos de SIGMA Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EE.UU.).

4.1.2. Material biológico

Para la realización de los diferentes ensayos de actividad antimicrobiana se emplearon ocho cepas bacterianas, cuatro pertenecientes al género de las Gram positivas y cuatro al de las bacterias Gram negativas (Tabla 9). El mantenimiento de las diferentes cepas bacterianas se realizó mediante resiembras consecutivas utilizando como medio de cultivo agar Mueller-Hinton (BD Bioxon) (Tabla 10). Las resiembras se realizaron en periodos de 15 días y se preservaron en refrigeración (4°C). Además, todas las cepas se preservaron en una solución de glicerol al 15% y congelamiento a -80°C.

Tabla 10. Cepas bacterianas utilizadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los péptidos.

Tipo de cepa	Especie	ATCC	Morfología
Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	Bacilo
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Coco
	<i>Listeria monocytogenes</i>	244	Bacilo
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	AC	Coco
	<i>Escherichia coli</i>	25922	Bacilo
Gram -	<i>Salmonella typhi</i>	6399	Bacilo
	<i>Shigella flexneri</i>	AC	Bacilo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	925	Bacilo

ATCC = Colección Americana de Cultivos Tipo; AC= aislados clínicos

Tabla 11. Composición del medio de cultivo agar Mueller-Hinton.

Ingrediente	Cantidad	Función
Infusión de carne	300.0 g	Fuente de C, N, Aminoácidos y Vitaminas
Peptona de caseína	15.5 g	Fuente de C, N, Aminoácidos y Vitaminas
Almidón	1.5 g	Absorbente para compuestos o metabolitos nocivos
Agar bacteriológico	17.0 g	Agente solidificante
Suspender 38 g del medio de cultivo en 1L de agua, calentar suavemente hasta su total disolución y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) por 15 min, pH final 7.4±0.2.		
Mueller y Hinton, 1941.		

4.2. Producción y purificación de los péptidos antimicrobianos

4.2.1. Síntesis química de péptidos antimicrobianos

La **Pandinina 2** y sus diferentes variantes, así como la **beta-Defensina 11** (secuencia tomada de Pazgier *et al.*, 2006) y la **beta-Defensina consenso** (generada del alineamiento de secuencias de todas las **beta-Defensinas** humanas caracterizadas e hipotéticas reportadas), fueron sintetizadas químicamente utilizando la metodología Fmoc en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433 A. Las secuencias y algunas propiedades de los diferentes péptidos generados se enumeran en la tabla 12. La síntesis química de los diferentes péptidos evaluados en este trabajo se realizó a partir del carboxilo terminal utilizando una resina Fmoc-AA(OtBu)-PEG (Watanabe Ltd., Hiroshima, Japón), el primer aminoácido a acoplar en la síntesis (AA) química, fue seleccionado según el péptido a sintetizar (Figura 7). Posteriormente a la síntesis los grupos reactivos pertenecientes a los aminoácidos que integran a los diferentes péptidos fueron desprotegidos y finalmente los péptidos fueron separados de la resina de síntesis de acuerdo con lo estipulado en The Novabiochem Peptide Synthesis Handbook, 1999.

Tabla 12. Secuencias y propiedades de los diferentes péptidos sintéticos evaluados.

Péptido	Secuencia	Residuos	P. M. (Da)	Carga	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
Oxki 2b	GKFSGF AKILKSI AKFFKGVGKVRKQFKEASDL DKNQ	37	4146.8	+7	-
Pin2	FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKKD	24	2612.1	+3	5500
Pin2 [P14V]	FWGALAKGALKLIVSLFSSFSKKD	24	2614.1	+3	5500
Pin2 [P14G]	FWGALAKGALKLIGSLFSSFSKKD	24	2572.0	+3	5500
Pin2 [P14GV]	FWGALAKGALKLIGVSLFSSFSKKD	25	2671.1	+3	5500
Pin2 [P14VG]	FWGALAKGALKLIVGSLFSSFSKKD	25	2671.1	+3	5500
Pin2 [P14GVG]	FWGALAKGALKLIVGSLFSSFSKKD	26	2728.2	+3	5500
Pin2 [P14GPG]	FWGALAKGALKLIGPGSLFSSFSKKD	26	2726.2	+3	5500
hBD11	RECRIGNGQCKNQCHENEIRIAYCIRPGTHCCLQQ	35	4075.6	+2	1865
hBDcon	KKCWNNGRCRKKCKENEKPIGYCRNGKCCVN	32	3726.4	+9	7365

P. M. = Peso molecular
 ϵ = Coeficiente de extinción molar a 280 nm

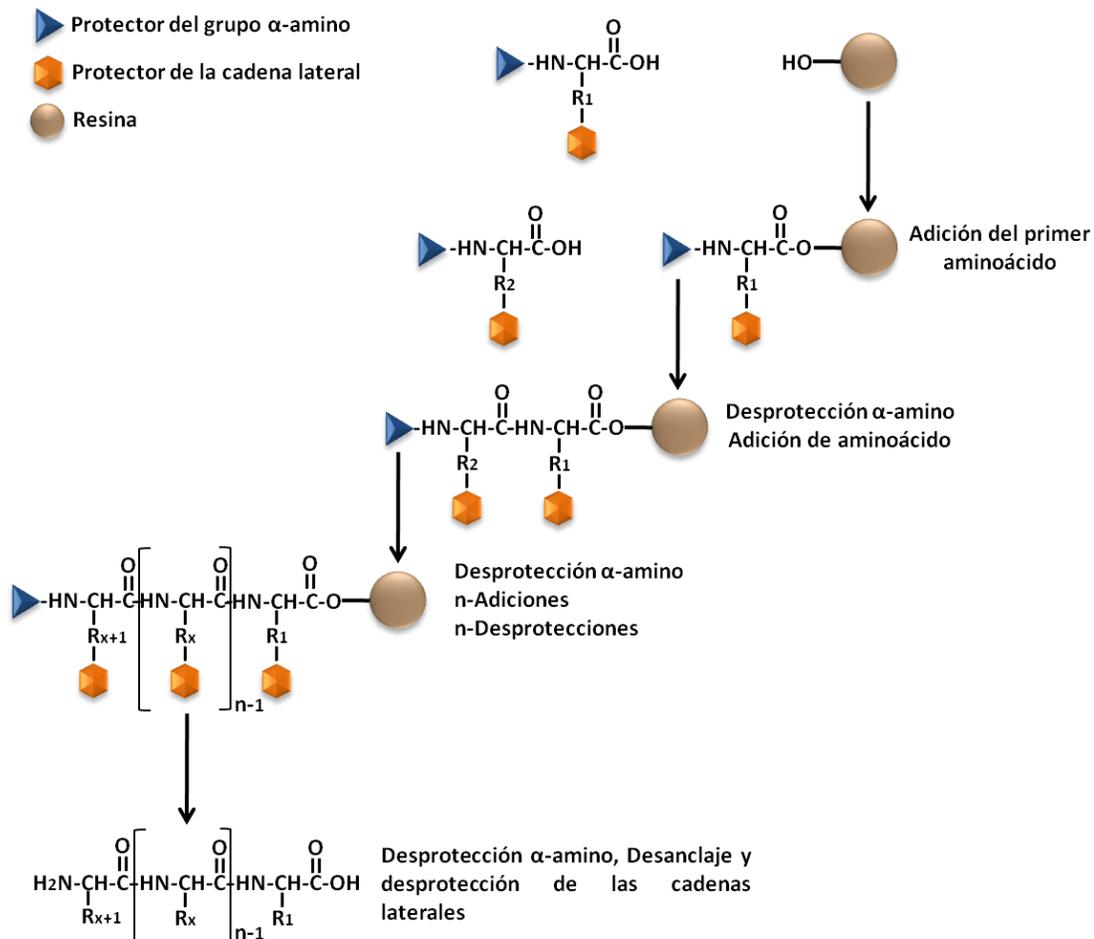


Figura 7. Proceso de síntesis química en fase sólida de péptidos. Generada a partir de la información obtenida de Nilsson y colaboradores (2005).

El péptido liofilizado fue disuelto en una solución al 10% (acetonitrilo:agua) acidificada con TFA 0.1% y purificados en tres etapas por HPLC, en la primera etapa se utilizó una columna semipreparativa C_{18} (10x250 mm, Nacalai Tesque, Japón) en fase reversa, posteriormente los péptidos fueron recromatografiados utilizando una columna de intercambio catiónico TSK con base de sulfopropil (7.5x75 mm, Tosoh SP-5PW, Japón) y finalmente se realizó el desalado de los péptidos en una columna analítica C_{18} (4.6x250 mm, Nacalai Tesque, Japón). La identidad de los péptidos sintéticos fue verificada mediante espectrometría de masas.

4.2.2. Plegado *in vitro* de la hBD11 y la hBDcon

El plegado de la hBD11 y la hBDcon se realizó bajo condiciones controladas utilizando 2M de GdHCl en 0.05 M de amortiguador Tris-HCl, pH 8, conteniendo una proporción de 1 mM de glutatión reducido (GSH)/0.1 de glutatión oxidado (GSSG) como par de amortiguadores redox, la mezcla de reacción se mantuvo en incubación a temperatura ambiente (25°C) por espacio de 24 horas de acuerdo con Estrada y colaboradores (2007a). Posteriormente a la reacción de plegamiento se realizó la purificación de las diferentes fracciones mediante cromatografía de líquidos (HPLC), utilizando una columna analítica C₁₈ (4.6x250 mm, Nacalai Tesque, Japón) a un flujo de 1mL/min y un gradiente lineal de acetonitrilo + 0.1% TFA como eluyente (15-75%, 1%/min).

4.2.3 Espectrometría de masas

Los espectrogramas de masas correspondientes a los diferentes péptidos fueron obtenidos mediante ESI-MS utilizando un espectrómetro Finnigan LCQ^{DUO} ion trap (San José, California, EE.UU.).

4.3. Ensayos biológicos

4.3.1. Cinéticas de crecimiento bacteriano

El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés), antes conocido como Comité Nacional de Estándares Clínicos y de Laboratorio (NCCLS, por sus siglas en inglés), así con la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), recomiendan para la realización de ensayos de susceptibilidad antimicrobiana a la acción de antibióticos, el empleo de 1×10^8 UFC, provenientes de cultivos bacterianos frescos en fase de crecimiento exponencial. Por lo cual, con la finalidad de establecer las condiciones y los tiempos necesarios a los cuales las diferentes cepas bacterianas evaluadas en esta tesis de cumplían con los requerimientos anteriores, se realizó el seguimiento de sus respectivas cinéticas de crecimiento mediante el registro de DO. En tubos de ensayo, con tapa de rosca, se colocó un volumen de 4.5 mL de caldo de cultivo Mueller-Hinton estéril, posteriormente fueron inoculadas en los tubos colonias aisladas en cultivo sólido (18 h de incubación a

37°C) de las diferentes cepas ensayadas, el seguimiento del crecimiento bacteriano se llevó a cabo mediante la medición del incremento en la densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda de 625 nm (Espectrofotómetro Molecular Devices, Spectramax plus 384, BioRad) y el conteo directo de colonias por el ensayo de diluciones seriales (18 h de incubación a 37°C) con intervalos de 2 horas entre mediciones. Todos los cultivos bacterianos ensayados presentaron una densidad celular de 1×10^8 UFC/mL en fase de crecimiento exponencial a tiempos de incubación de entre 2-4 horas.

4.3.2. Ensayos de actividad antimicrobiana por el método de difusión

Para determinar la actividad antimicrobiana de los diferentes péptidos estudiados en este trabajo, (Oxki 2b, Pin2, Pin2 [P14G], Pin2 [P14V], Pin2 [P14GV], Pin2 [P14VG], Pin2 [P14GVG], Pin2 [P14GPG], hBD11 y hBDcon), se realizaron ensayos de susceptibilidad antimicrobiana mediante la metodología de difusión radial en placa de agar, la cual consiste en medición del halo de inhibición del crecimiento bacteriano generada por un agente antimicrobiano. Para la realización de los ensayos se utilizaron cepas bacterianas diferentes (ver Tabla 10), las cuales fueron cultivadas utilizando como medio de cultivo caldo nutritivo Mueller-Hinton (Bioxon, Tabla 11) a una temperatura de 37°C durante un periodo de 18-24 horas, de acuerdo a las recomendaciones de el CLSI. Posteriormente los cultivos fueron ajustados a una DO_{625nm} de 0.2 ($\sim 1.5 \times 10^8$ UFC/mL) y se adicionó 1 mL de cada cultivo a tubos de ensayo con 9 mL de medio cultivo sólido fresco y estéril, posteriormente las mezclas fueron agregadas a cajas de Petri, y después de que el medio de cultivo solidificó se agregaron 5 μ L de cada una de las diferentes soluciones de los péptidos antimicrobianos a concentraciones desde 300 hasta 0.8 μ M, los diferentes cultivos bacterianos se incubaron por un espacio de 18-24 h y finalmente se determinó la CMI, todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

4.3.3. Ensayos de actividad antimicrobiana por el método de dilución

Para un análisis más detallado de la actividad microbicida de los péptidos se realizaron cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano, preparando concentraciones decrecientes del péptido microbicida

lío-filizado desde 100 hasta 0.8 μM y añadiéndolo a un inóculo de bacterias en medio líquido (2 h de incubación, $\sim 1 \times 10^4$ UFC/mL). El seguimiento de las cinéticas de inhibición se realizó midiendo el cambio de absorbancia (625 nm) respecto al tiempo de incubación a los inóculos de bacterias en medio líquido en presencia y ausencia de los péptidos antibióticos. Las muestras con mayor crecimiento mostraron poco efecto inhibitorio y por lo tanto mayor registro de absorbancia con respecto al testigo en ausencia de péptido microbicida.

4.3.4. Ensayos de actividad hemolítica contra eritrocitos humanos

La actividad hemolítica de los diferentes péptidos fue determinada mediante la incubación de suspensiones celulares de eritrocitos humanos (EH), provenientes de un donador sano con un tipo de sangre O RH +, con diluciones seriales de los péptidos a concentraciones desde 25 hasta 1 μM . Los EH fueron lavados intensivamente con una solución amortiguadora de fosfatos PBS (10 mM, pH 7.1) y posteriormente fueron centrifugados por espacio de 5 minutos a 2,000 rpm, entre cada lavado, hasta que la absorbancia del sobrenadante igualó a la de la solución de lavado. La concentración de EH presentes en la solución se determinó mediante conteo directo en un hematocitómetro y ajustada a aproximadamente 7.7×10^6 células por mililitro. Los EH fueron incubados a temperatura ambiente por espacio de una hora en presencia de 10% de Tritón X100 y agua tretradesilada (testigos positivos), PBS (10 mM, pH 7.1) (testigo negativo) y las diferentes concentraciones de los péptidos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 570 nm. Finalmente se calculó en porcentaje de hemólisis de los péptidos, tomando como 100% el valor de $\text{DO}_{570\text{nm}}$ observado con los testigos positivos.

4.3.5. Cálculo del índice terapéutico

El índice terapéutico de los diferentes péptidos se calculó mediante la razón entre la concentración mínima inhibitoria (CMI) determinada en los ensayos de actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923, tanto por el método de difusión como por el de dilución, y la dosis efectiva 50 de

hemólisis (DE_{50}), calculada de la curva dosis/respuesta generada a partir de los datos experimentales con la ayuda del paquete de gráficos y análisis estadístico Prism Graph Path, versión 3.0.

4.3.6. Análisis estadístico

Se determinaron los valores de las desviaciones estándar entre cada experimento y se realizó un análisis de diferencia significativa entre los diferentes tratamientos (Prueba de Tukey $P > 0.05$) con la ayuda del paquete de gráficos y análisis estadístico Prism Graph Path, versión 3.0.

4.4. Experimentos para evaluar la estructura de los péptidos antimicrobianos

4.4.1. Experimentos de Dicroísmo Circular (DC)

Los espectros de DC fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J-725 (Jasco, Japón). Los ensayos fueron realizados desde 260-190 nm en 60% de trifluoroetanol (TFE), pH 7.1 a temperatura ambiente (25°C), utilizando una celda de cuarzo de 1 mm y los datos fueron colectados a una velocidad de 100 nm/min. La concentración de los diferentes péptidos fue de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los valores promedio de tres corridas individuales fueron utilizados para determinar el porcentaje de contenido de alfa-hélice presente en los péptidos mediante el uso del software CDNN v.2.1 (Böhm, 1992). Por otro lado, con la finalidad de establecer las condiciones bajo las cuales los péptidos Pin2[P14G] y Pin2[P14GPG] tienen una estructura predominantemente de alfa-hélice, se realizaron experimentos de Dicroísmo Circular (DC) a diferentes concentraciones de trifluoroetanol (TFE) a 25°C, utilizando un espectrómetro AVIV 410-SFCD (AVIV, Inc. Biomédica, NJ, EE.UU.). El análisis se realizó en un intervalo de longitudes de onda entre 190 y 250 nanómetros (nm) y concentraciones de 12 μM para Pin2, 12.2 μM para Pin2 [P14G] y 12 μM para Pin2 [P14GPG] en una cubeta de cuarzo de 1 mm. Los datos fueron recolectados cada 0.2 nm y un tiempo promedio de adquisición de 4s. Para determinar la proporción de TFE necesaria para inducir el máximo contenido de estructura alfa-helicoidal en ambos péptidos, diferentes volúmenes de TFE se añadieron a las muestras (20, 40 y 60% v/v, 300 μL de volumen final, y sólo para Pin2 [P14GPG] se utilizó una concentración del 70% TFE). El porcentaje de estructura secundaria se

calculó mediante el análisis de los datos de DC usando el paquete de software CDPro (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>).

4.4.2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Con la finalidad de evaluar la conformación tridimensional y el plegamiento de las **beta-Defensinas humanas**, hBD11 y hBDcon, se realizaron diferentes experimentos de RMN. Los experimentos de preliminares de 1D ^1H RMN sobre la hBD11 (1 mg) y la hBDcon (1.3 mg), a diferentes pH (entre 3-6) y temperaturas (15 y 25°C) fueron realizados en un espectrómetro Varian Inova a 600 MHz, utilizando una proporción de 8% de agua deuterada (D_2O). Posteriormente los diferentes experimentos de 2D, ^1H - ^{15}N -HMQC, ^1H - ^{13}C -HMQC, ^1H - ^1H DQF-COSY, ^1H - ^1H TOCSY y ^1H - ^1H NOESY, fueron llevados a cabo utilizando los espectrómetros Bruker Avance III a 600 MHz y Avance Bruker 800 MHz, en presencia de D_2O al 8% y 100%, todos los experimentos se realizaron utilizando la abundancia natural de los isótopos pesados de cada elemento (Anexo 2). El procesamiento de los espectros de RMN obtenidos se realizó con TopSpin 3.1 (Bruker, Biospin NMR software) versión para Linux, y la asignación de las diferentes señales de resonancias observadas en los espectros se realizó con Sparky NMR assignment and integration software (<http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/>), versión para Windows.

4.5. Diseño de modelos y parámetros fisicoquímicos computacionales

Con la finalidad de explicar una posible relación entre los cambios observados en la actividad hemolítica, como efecto de los cambios en la secuencia primaria de Pin2, con la modulación parámetros fisicoquímicos calculados computacionalmente, se evaluaron en primera instancia parámetros teóricos desprendidos del análisis de la secuencia primaria de los péptidos, tales como el grado de estructura secundaria, el promedio de la hidrofobicidad de la molécula (GRAVY), el momento hidrofóbico (μH), parámetro que relaciona la hidrofobicidad con su distribución en una alfa-hélice y el momento hidrofóbico relativo (μHr), parámetro que mide el grado de anfipaticidad de la molécula.

Posteriormente, se generaron modelos estructurales de las diferentes variantes evaluadas en este trabajo insertando las mutaciones en la secuencia de Pin2 y optimizándolos, en una caja de agua de 10\AA^2 , con ayuda de paquete para modelado molecular Maestro versión para uso académico (<http://www.schrodinger.com>), posteriormente los modelos fueron minimizados utilizando mediante la Exploración de la Energía Superficial de Proteínas (PELE, por sus siglas en inglés) (Borrelli *et al.*, 2005) simulando el efecto de una temperatura hipotética de $5,000^\circ\text{C}$. Los experimentos computacionales fueron realizados por triplicado y posteriormente se determinaron propiedades como la superficie del péptido expuesta al solvente, la superficie hidrofóbica, el número de enlaces de hidrógeno extra e intermoleculares, longitud total del péptido, y el ángulo de deformación generado por los cambios e inserciones de aminoácidos. Finalmente todos los parámetros se correlacionaron con el grado de actividad hemolítica.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Diseño y purificación de los péptidos antimicrobianos con estructuras alfa-hélice y beta-plegada

5.1.1. Diseño y purificación de los péptidos de la serie de variantes de Pin2

La **Pandinina 2** (Pin2), proveniente del veneno del escorpión africano *Pandinus imperator*, presenta un residuo de Prolina en la posición 14 (Corzo *et al.*, 2001). La presencia de este residuo en péptidos antimicrobianos provenientes del veneno de alacranes y escorpiones, así como en péptidos como la **Melitina** (*Apis mellifera*), la **Pardaxina** (*Pardachirus marmoratus*) y las **Ponericinas W** (*Pachycondyla goeldii*), se ha relacionado con sus actividades altamente hemolíticas (Dempsey *et al.*, 1991; Orivel *et al.*, 2001; Thennarasu y Nagaraj, 1996; Zeng, *et al.*, 2005), mientras que péptidos con perfiles menos hemolíticos como las **Magaininas** (*Xenopus laevis*), las **Oxyopininas** (*Oxyopes takiobus*) y las **Ponericinas G** (*Pachycondyla goeldii*), presentan otros motivos estructurales en su región central, tales como residuos de Glicina, o los tripletes Glicina-Valina-Glicina y Glicina-Prolina-Glicina, respectivamente (Corzo *et al.*, 2002; Orivel *et al.*, 2001, Zaslhoff, 1987). Razón por la cual en este reporte se decidió evaluar el efecto de la sustitución de la Prolina 14 de Pin2 por los aminoácidos presentes en los péptidos antimicrobianos con perfiles menos hemolíticos, por lo que una serie de variantes fue sintetizada químicamente insertando en la región central de Pin2 los siguientes aminoácidos, G, V, GV, VG, GVG y GPG. La purificación de las diferentes variantes de Pin2 evaluadas en este reporte se realizó mediante tres pasos de cromatografía de líquidos de alta presión HPLC (Varian, modelo 335), las corridas cromatográficas fueron monitoreadas a longitudes de onda de 280 y 320 nm, finalmente todas las fracciones de interés fueron colectadas manualmente. En la figura 8 (A-G) se muestra los cromatogramas correspondientes a la última fase de purificación de cada uno de los péptidos de la serie de variantes de Pin2. La identidad molecular de los péptidos sintéticos se corroboró determinando su masa molecular experimental mediante espectrometría de masas, ESI-MS (Finnigan LCQ^{DUO} ion trap mass spectrometer, San José,

California, EE.UU.) (Tabla 14). Como resultado de los cambios e inserciones de aminoácidos los tiempos de retención observados fueron diferentes para cada uno de los péptidos de la serie (Figura 8H). Estas diferencias en los tiempos de retención podrían estar relacionadas con dos factores, el primero, posibles diferencias en el nivel de estructura secundaria entre ellos, esperándose que péptidos con menor porcentaje de estructura alfa-helicoidal presentaran mayores tiempos de retención y el segundo incrementos en la hidrofobicidad global de los mismos.

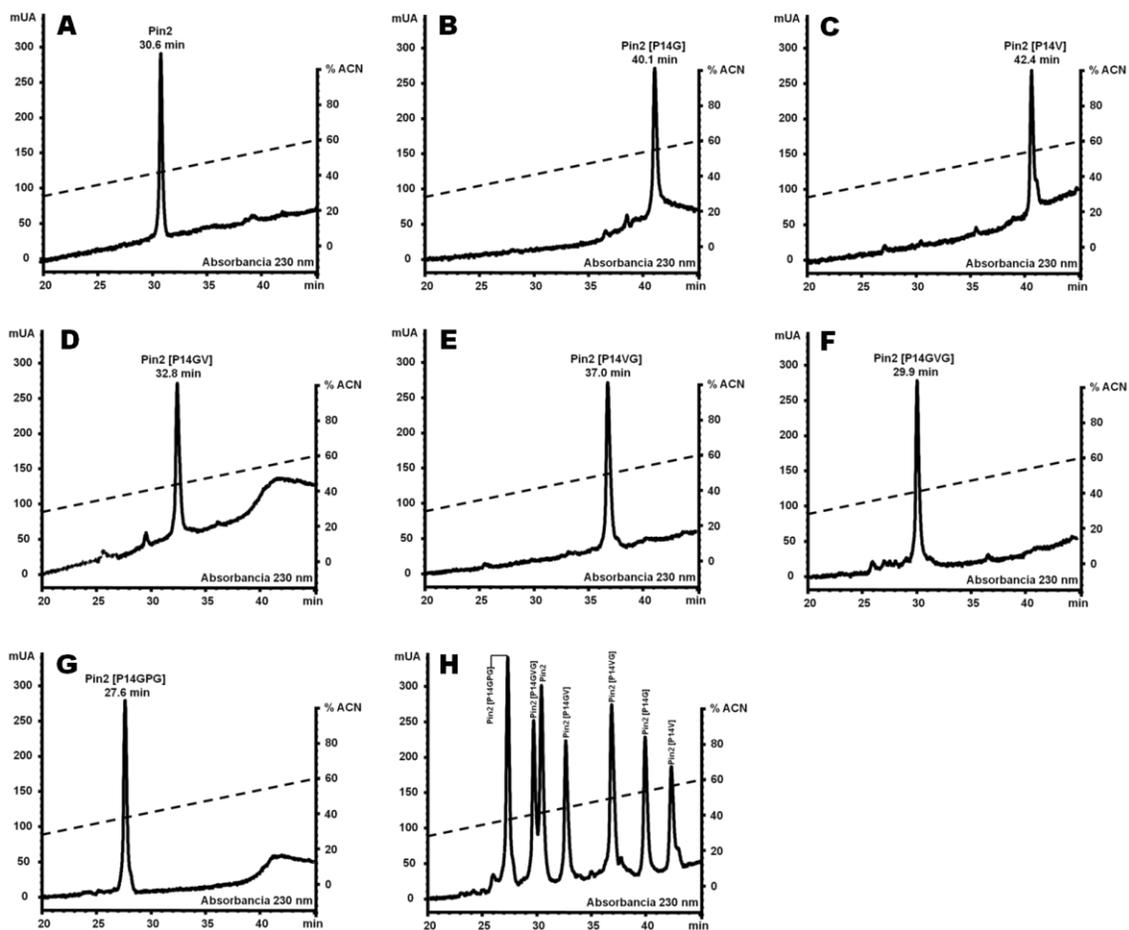


Figura 8. Purificación de los péptidos antimicrobianos de la serie Pin2 mediante HPLC en fase reversa. Columna analítica C₁₈ (4.6x250mm, Nacalai Tesque, Japón), agua/acetonitrilo (0.1 % de TFA) de 20 a 60% y un flujo de de 1 ml/min. A. Pin2, B. Pin2 [P14G], C. Pin2 [P14V], D. Pin2 [P14GV], E. Pin2 [P14VG], F. Pin2 [P14GVG], G. Pin2 [P14GPG] y H. Coelución de los diferentes péptidos.

5.1.2. Diseño, purificación y plegado *in vitro* de la beta-Defensina 11 (hBD11) y la beta-Defensina consenso (hBDcon)

El gen de la hBD11 (DEFB 110, DEFB11, DEFB111, UniProtKB ID: **Q30KQ9**) fue descubierto por Schutte y colaboradores en 2002, en el sitio p12 del cromosoma 6, mediante estrategias genómico-computacionales. En 2004 Premratanachai y colaboradores lograron detectar la presencia de ARN mensajero correspondiente a este gen en queratinocitos gingivales provenientes de muestras bucales de individuos sanos, mediante diferentes rondas de RT-PCR sobre el cADN generado a partir del ARN total, con ayuda de “*primers*” específicos de 20 bases, generados a partir de la secuencia correspondiente al Exón 2 de los genes de la familia de las **beta-Defensinas**, determinando que la hBD11 se expresa de manera constitutiva, en bajas concentraciones en este tipo de células. La secuencia de aminoácidos de la hBD11 fue generada por predicción partiendo de la secuencia de nucleótidos obtenida por Schutte y colaboradores (2002), determinándose que la longitud de su secuencia en aminoácidos es de 67 residuos, de los cuales los aminoácidos 1-32, corresponden al pre-propéptido y de los aminoácidos 33-67 al péptido maduro, además se reportó la presencia de una segunda isoforma, generada por “*splicing alternativo*” (UniProtKB ID: **Q30KQ9-2**) (Schutte *et al.*, 2002). La secuencia de 35 aminoácidos correspondiente a la hBD11, tomada de Pazgier y colaboradores (2006), fue sintetizada para su caracterización en este reporte. Esta secuencia presenta una ligera similitud (35%) con otros péptidos de la familia de las **beta-Defensinas** de mamíferos, principalmente con **Defensinas** provenientes de roedores (Tabla 13). Por otro lado, la secuencia consenso generada del alineamiento de todas las secuencias reportadas para **beta-Defensinas humanas** (Anexo 3), fue tomada para generar la hBDcon, en las posiciones con incertidumbre (X) se seleccionaron los residuos estadísticamente más representados en esas posiciones, generando cuatro posibilidades, todas ellas correspondieron a péptidos con cargas netas de +8 y +9. Como puede observarse en el alineamiento de la secuencia sintetizada para la hBDcon (Tabla 13), este péptido presenta cierta similitud (40-50%) con las **beta-**

Defensinas humanas 26, 27 y 28, cuya actividad ya fue caracterizada, observándose una actividad preferencial contra bacterias Gram negativas, para el caso de las hBD26 y hBD27. Se reportó que la hBD26 presenta una actividad antimicrobiana más alta comparada con la hBD27 (Huang, *et al.*, 2009; Shulz *et al.*, 2005). La hBD28 presenta un amplio espectro de acción en rangos de concentración entre 6-12 μ M (Shulz *et al.*, 2005). Debido a esta similitud, es posible que la hBDcon presente una actividad antimicrobiana de amplio espectro, como la hBD28, o limitada hacia bacterias Gram negativas como la hBD26 y la hBD27.

Tabla 13. Alineamientos de las secuencias de la hBD11 y la hBDcon.

Péptido	UniProtKB ID	Origen	Secuencia	No. AA	%Sim	Q
hBd11	Q30KQ9	Humano	RE@RIGNG@CKN@CHENEIRIAYCIRPGTH@C@L@Q@	35	100.0	+2
hBd11-2	Q30KQ9-2	Humano	ER@EKVRGI@KTF@DDVEYDYG@CIKWR@S@C@V@--	33	44.7	0
			..*..* **..*.: * ..**.: ::**:			
hBD11	Q30KQ9	Humano	---REC-RIGN-G@CK-N@CHENEIRIAY---CIRPG-T---H@C@L@Q@	35	100.0	+2
HANP-2	P81466	Hámster	-----C-----F@KRFV@DSGET@IGY---C-RLGNTFYRLCC-RQ	31	35.0	+3
HANP-4	P81468	Hámster	---VTC-----F@KRFV@DSGET@IGY---C-RLGNTFYRLCC-RQ	33	35.0	+3
mBD-7	Q91V70	Ratón	NSKRACYREG--G@C-L@R@I@GLFHKIGT---C@NFR---FK-C@CK@FQ	37	34.1	+6
NP-3b	P07468	Conejo	-GR@V@CR---K@Q---L@L@SYRERRIGD---C@KIR-GVRF@F@C@-PR	34	34.1	+8
Mj-AMP1	P25403	Planta [§]	---@C@-IGNG-GR@-N---EN-V@P@PY@C@SGF@L@R@Q@P@G@Q@Y@G@-C@K@NR	37	34.1	+3
hBDcon	-	-	K@K@W@NG GX@R@K@K@X@ENEK@PIGY@R@NG@K@C@V@X	32	-	-
hBDcon-1	-	Sintética	**C*** *RC***@K*****C*****C@*N	32	-	+9
hBDcon-2	-	-	**C*** *RC***@K*****C*****C@*P	32	-	+9
hBDcon-3	-	-	**C*** *RC***@L*****C*****C@*N	32	-	+8
hBDcon-4	-	-	**C*** *RC***@L*****C*****C@*P	32	-	+8
			*****; *****;			
hBDcon-1	-	Sintética	-----K@K@W@NGGR---@R@K@K@-@L@ENEK@PIGY---@R@NG@K@K@---@C@V@N@-----	32	100.0	+9
hBD28	Q14DW6	Humano	-----ARLKK@FNKVTGY-@R@K@K@-@K@V@G@E@Y@E@I@G@---@L@S@G@K@L@---@C@C@A@N@-----	37	50.0	+8
cBD-1	Q863D0	Perro	-----K@W@N@L@R@-G@S@-@C@R@E@K@-@C@I@K@N@E@K@L@Y@I@F@---@T@S@G@K@L@---@C@C@L@K@P@K@F@Q@P@N@M@L@Q@R@	42	43.2	+8
hBD27	Q9H1M4	Humano	-----Q@L@K@K@W@N@N@Y@V@Q@H@C@R@K@I@-@C@R@V@N@E@V@E@A@L@---@E@N@G@R@Y@---@C@C@L@N@I@K@E@L@E@A@C@---	44	43.2	+2
TEWP	P0CAPO	Tortuga	-----E@K@K@P@G@R@---@C@T@L@K@-@C@G@K@H@E@R@P@T@L@P@Y@N@---@C@G@K@Y@I@---@C@C@V@P@V@K@V@K@-----	36	42.5	+7
hBD26	Q9BYW3	Humano	-----W@Y@V@K@K@L@N@D@V@G@I@-@C@K@K@K@-@C@P@E@E@M@H@V@K@N@G@W@M@C@G@K@G@R@D@---@C@C@V@P@A@D@-----	42	40.1	+4
mBD14	Q71NV9	Ratón	FLPKTLRKFF@CIRIRGGR---C@V@L@N@C@L@G@K@E@Q@I@G@R@---@C@S@N@S@G@R@K@---@C@C@R@K@K@-----	45	40.0	+12
CS-VI	P80223	Conejo	-----G@I@C@A@---@C@R@R@R@F@L@N@F@E@Q@F@S@G@Y@---@C@R@V@N@G@A@Y@V@R@C@C@S@R@R@-----	34	39.5	+7
GmoDef	Q8WTD4	Insecto [†]	-----V@T@N@I@G@E@W@V@---@C@V@A@H@-@C@N@S@K@K@S@G@Y@---@C@S@R@G@V@---@C@Y@C@T@N@-----	33	38.9	+3

(*) Residuo conservado; (:) Residuos similares o equivalente; (.) Cambio poco similar u opuesto.
 (No. AA) Número de aminoácidos del péptido maduro; (%Sim) Porcentaje de similitud; (Q) Carga neta; (X) Cualquier residuo.
 Los residuos subrayados corresponden a la secuencia de la hBD11 (35 aminoácidos) y la hBDcon (32 aminoácidos) sintetizadas y evaluadas en este reporte.
 (S) *Mirabilis jalapa*; (†) *Glossina morsitans morsitans*.

La purificación de las **beta-Defensinas humanas**, hBD11 y hBDcon, se realizó bajo las mismas condiciones que los péptidos de la serie de variantes de Pin2, observándose tiempos de retención de 29.8 y 19.7 minutos respectivamente (Figura 10), dado que la secuencia de la hBDcon está hipercargada, (presenta dos residuos de Ácido Glutámico, dos de Arginina y ocho residuos de Lisina), con una carga neta de +9, este péptido presentó uno de los menores tiempos de retención en la purificación por HPLC en fase reversa C₁₈ de los péptidos evaluados en este reporte (Figura 10B). La identidad de los

péptidos, en estado reducido, fue corroborada por espectrometría de masas, ESI-MS (Finnigan LCQ^{DUO} ion trap mass spectrometer, San José, California, EE.UU.)(Tabla 14).

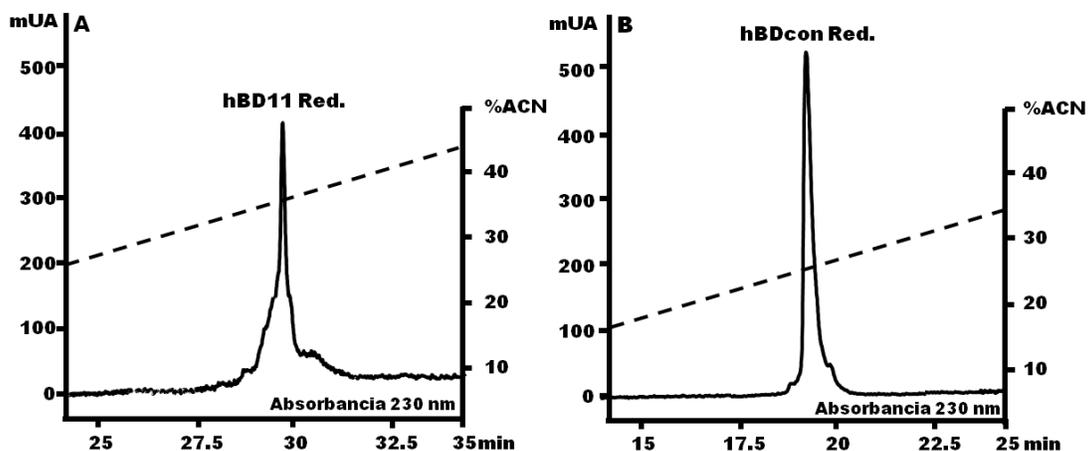


Figura 9. Purificación de las beta-Defensinas humanas en su estado reducido (Red.) mediante HPLC en fase reversa. Columna analítica C₁₈ en fase reversa (4.6x250mm, Nacalai Tesque, Japón). A. hBD11 y B. hBDcon.

Las reacciones de plegamiento de la hBD11 y la hBDcon (200 µg) se realizaron bajo condiciones controladas de acuerdo con Estrada y colaboradores (2007a). Posteriormente a la reacción de plegamiento se realizó la purificación de las diferentes fracciones mediante cromatografía de líquidos de alta presión. Como resultado del proceso de plegamiento y purificación por HPLC, para el caso de la hBD11 se obtuvieron un total de siete fracciones, de las cuales la fracción número siete fue la más abundante, y presentó el peso molecular esperado para un péptido con la presencia de tres puentes disulfuro (4,069.0 Da) (Figura 10A) (Tabla 14), por lo que fue seleccionada para los ensayos biológicos posteriores. En lo referente a las reacciones de plegamiento de la hBDcon, se obtuvieron un total de cuatro fracciones, de las cuales la fracción número tres presentó mayor abundancia y el peso molecular esperado para la formación de tres puentes disulfuro (3,711.0 Da) (Tabla 14), por lo que también fue seleccionada para los experimentos posteriores (Figura 10B).

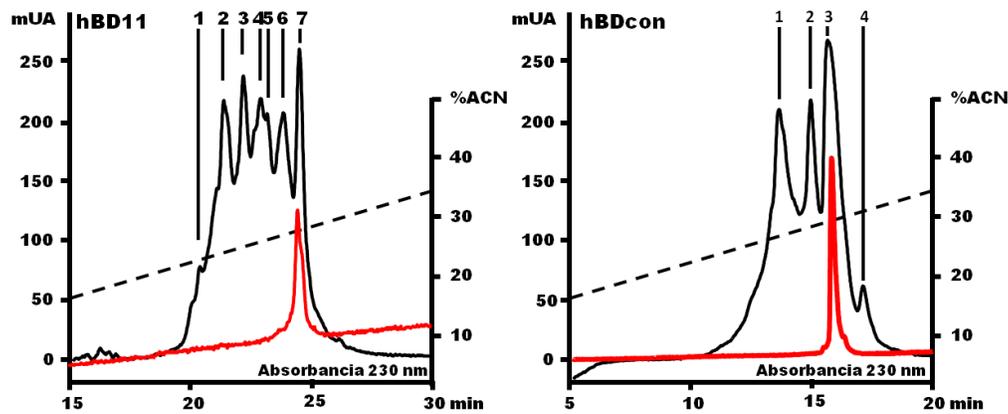


Figura 10. Cromatograma correspondiente a la reacción de plegamiento *in vitro* de la hBD11 y la hBDcon sintéticas. HPLC (Varian, modelo 335), columna analítica C₁₈ en fase reversa (4.6x250mm, Nacalai Tesque, Japón).

Tabla 14. Tiempos de retención (HPLC) y pesos moleculares experimentales (ESI-MS) para los péptidos caracterizados en este reporte.

Péptido	GRAVY	Tiempo retención (min)	Masa Molecular (Da) [§]	
			PM Teórico	PM Experimental
Pin2	0.329	30.60	2612.1	2612.0
Pin2 [P14G]	0.379	40.10	2572.0	2572.0
Pin2 [P14V]	0.571	42.40	2614.1	2614.1
Pin2 [P14GV]	0.532	32.80	2671.1	2671.0
Pin2 [P14VG]	0.532	37.00	2671.1	2671.0
Pin2 [P14GVG]	0.496	29.90	2728.2	2729.0
Pin2 [P14GPG]	0.273	27.60	2726.2	2727.0
hBD11 reducida	-0.843	29.50	4075.6	4075.6
hBD11 oxidada	-0.843	24.2	4069.6	4069.0
hBDcon reducida	-1.241	19.50	3717.4	3717.4
hBDcon oxidada	-1.241	17.00	3711.4	3711.0

GRAVY, Promedio de hidropaticidad de la secuencia; (§) Espectrometría de masas, ESI-MS (Finnigan LCQ^{DUO} ion trap mass spectrometer, San José, CA, EE.UU).

5.2. Ensayos de actividad biológica

5.2.1. Ensayo de actividad antimicrobiana por difusión agar

5.2.1.1. Variantes de Pin2

Para determinar la actividad antimicrobiana y las CMI (Concentraciones Mínimas Inhibitorias) de los diferentes péptidos, Oxki 2b, Pin2, Pin2 [P14G], Pin2 [P14V], Pin2 [P14GV], Pin2 [P14VG], Pin2 [P14GVG] y Pin2 [P14GPG], se realizaron ensayos de susceptibilidad antimicrobiana mediante la metodología de difusión radial en placas de agar Mueller-Hinton de acuerdo con las especificaciones del

CLSI. La detección de la actividad antimicrobiana se realizó inicialmente a concentraciones de 300 μM y fueron ensayadas ocho cepas bacterianas, cuatro pertenecientes al género de las Gram positivas y cuatro al de las Gram negativas. Después de corroborar la presencia de actividad antimicrobiana, se realizaron los ensayos para determinar la CMI de los diferentes péptidos contra cada cepa bacteriana, mediante la aplicación de concentraciones decrecientes de los diferentes péptidos, un ejemplo de este ensayo se ilustra en la figura 11. Además, los péptidos Pin2, Pin2 [P14G] y Pin2 [P14GPG] fueron evaluados además en agar Soya-Trypticasa (TSB, por sus siglas en inglés) de acuerdo con Lehrer y colaboradores (1991) contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, esta metodología es más sensible para la detección de la actividad antimicrobiana de los PAMs, debido a que a que el medio TSB presenta menor proporción de polisacáridos, que por su concentración de cargas negativas pueden interferir con la actividad de los PAMs en comparación con el medio Mueller-Hinton. Los valores de las CMI correspondientes a los diferentes péptidos evaluados se enumeran en la tabla 15.

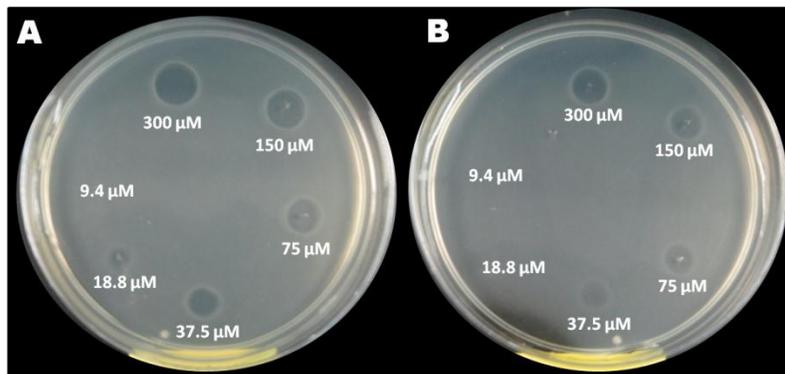


Figura 11. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias mediante ensayos de actividad en placa de agar Mueller-Hinton. Ensayo de CMI de A. Pin2 y B. Pin2 [P14GVG] contra *Streptococcus agalactiae*.

Como se observa en la tabla 15, el péptido Oxky 2B, sólo presentó actividades antimicrobianas contra dos bacterias Gram negativas, *E. coli* y *S. flexnerii* a concentraciones de 100 μM , por lo que se decidió no seguir utilizándolo como testigo. Por otro lado, los valores de CMI para el péptido parental Pin2 se situaron en valores entre 6-40 μM , presentando actividad antimicrobiana contra las 8 cepas bacterianas

ensayadas, las variantes Pin2 [P14V], Pin2 [P14GV] y Pin2 [P14VG], disminuyeron ampliamente su actividad antimicrobiana, respecto al péptido parental, la variante Pin2 [P14V] no presentó actividad antimicrobiana contra ninguna de la cepas bacterianas en este ensayo y las variantes Pin2 [P14GV] y Pin2 [P14VG] sólo lograron inhibir el crecimiento a concentraciones superiores a 300 μM , las variantes con las sustituciones de la Prolina 14 por los tripletes GVG y GPG, también presentaron una disminución en su actividad antimicrobiana, sin embargo sus CMI se mantuvieron en un rango más cercano a las observadas para el péptido parental, sólo la variante Pin2 [P14G] presentó valores de CMI similares, e inclusive mejores para algunas cepas respecto, a Pin2.

Tabla 15. Concentraciones mínimas inhibitorias determinadas por el método de difusión en placa de los diferentes péptidos evaluados en este reporte.

Cepas	Concentraciones mínimas inhibitorias (μM)								
	Oxky2b	Pin2	Pin2 [P14G]	Pin2 [P14V]	Pin2 [P14GV]	Pin2 [P14VG]	Pin2 [P14GVG]	Pin2 [P14GPG]	
Gram +	<i>S. aureus</i>	N. A.	37.5/6.25*	12.5/12.5*	N. A.	> 300	> 300	75.0	25/50.0*
	<i>B. subtilis</i>	N. A.	37.5	N. D.	N. A.	> 300	> 300	37.5	N. D.
	<i>S. agalactiae</i>	N. A.	18.8	N. D.	N. A.	> 300	> 300	37.5	N. D.
	<i>L. monocytogenes</i>	N. A.	18.8	N. D.	N. A.	> 300	> 300	37.5	N. D.
Gram -	<i>E. coli</i>	> 100	18.8/6.25*	12.5/25.0*	N. A.	> 300	> 300	37.5	25/12.5*
	<i>S. flexnerii</i>	> 100	37.5	N. D.	N. A.	> 300	> 300	37.5	N. D.
	<i>S. typhi</i>	N. A.	37.5	N. D.	N. A.	> 300	> 300	37.5	N. D.
	<i>P. aeruginosa</i>	N. D.	12.5/6.25*	12.5/50.0*	N. A.	N. D.	N. D.	N. D.	100/100.0*

N. A. = No reportó actividad; N. D.= No determinado; (*) Ensayo realizado en Agar Soya Trypticasa (TSB) con media fuerza iónica.

5.2.1.2. beta-Defensinas humanas, hBD11 y hBDcon

Las diferentes fracciones de plegamiento de la hBD11 fueron evaluadas con la finalidad de determinar su actividad antimicrobiana en placa, para la realización de este ensayo se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* ATCC 25922. Como se observa en la figura 12A las fracciones con actividad antimicrobiana fueron las enumeradas como 3, 4, 5, 6 y 7. Dado que los tiempos de retención observados para las fracciones con actividad antimicrobiana fueron muy similares entre sí (Figura 12), es posible que se trate de isoformas con patrones de puentes disulfuro diferentes pero que conservan su actividad antimicrobiana. En el caso de la **beta-Defensina 3** (hBD3), sintetizada químicamente y plegada *in vitro* se observó que la actividad antimicrobiana fue independiente del patrón de puentes disulfuro de las

fracciones purificadas, sin embargo, la actividad quimiotáctica sólo se conservó en aquella isoforma que presentaba el patrón de puentes disulfuro correcto (Wu *et al.*, 2003). La fracción 7, correspondiente a la isoforma con la masa molecular esperada, fue repurificada a homogeneidad y probada contra *S. aureus* en ensayo de difusión en agar Mueller-Hinton, encontrándose un valor de CMI de 25 μ M (Figura 12B). La actividad antimicrobiana de la fracción principal de la reacción de plegamiento de la hBDcon fue evaluada contra tres diferentes cepas bacterianas, seleccionadas por representar a las bacterias de mayor incidencia en aislados provenientes de infecciones de pié diabético y quemaduras de tercer grado (Fadeyibi *et al.*, 2012; Martínez-Gómez *et al.*, 2009; Rangel, 2005; Tentolouris *et al.*, 1999), dos Gram negativas, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 9027, y una Gram positiva, *S. aureus* ATCC 25923, en agar Soya-Trypticasa (Lehrer *et al.*, 1991), debido a que dada la gran concentración de cargas positivas en esta molécula, no se pudo registrar ninguna actividad con el método tradicional sobre agar Mueller-Hinton.

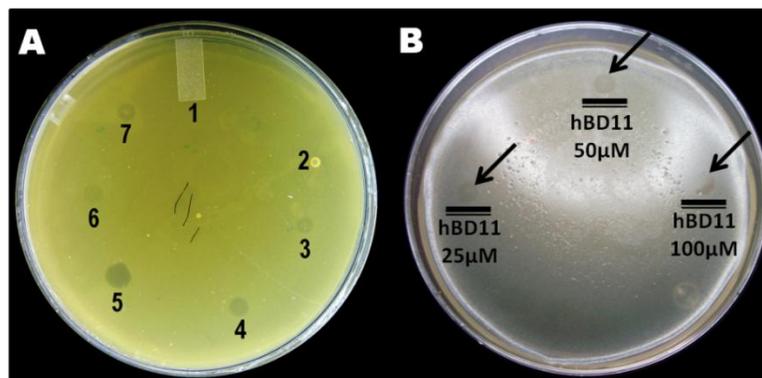


Figura 12. Ensayo de la actividad antimicrobiana en placa de la hBD11. A. Fracciones obtenidas de la reacción de plegamiento *in vitro* contra *E. coli* ATCC 25922. B. Ensayo de actividad antimicrobiana en placa de la fracción 7 (hBD11 plegada) contra *S. aureus* ATCC 25923.

La fuerza iónica del medio de cultivo es un parámetro importante a considerar durante la caracterización de la actividad de los péptidos antimicrobianos, ha sido reportada la presencia de falsas resistencias en ensayos de CMI cuando antibióticos muy cargados, como los aminoglicósidos, son probados en presencia de una fuerza iónica elevada (Beggs y Andreus, 1976; Marín *et al.*, 1995), además

de que los péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana, especialmente las **Defensinas**, son susceptibles a inhibición por concentraciones elevadas de sales presentes en el medio de cultivo (Cudic, 2002; Goldman *et al.*, 1995; Lehrer *et al.*, 1991; Otvos y Cudic, 2007). El péptido hBDcon presentó mayor actividad antimicrobiana, respecto a hBD11, contra *E. coli* ATCC 25922 (12.5 μ M) al igual que todos los péptidos antimicrobianos provenientes de la secuencia de Pin2, además esta cepa bacteriana presenta menor susceptibilidad a la acción de la **Ampicilina** (Figura 13A), mientras que para el caso de *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *S. aureus* ATCC 25923 se reportaron CMI de 25 μ M, valores que aun siguen manteniéndose en un rango similar al obtenido con las variantes anteriormente evaluadas (Figura 13).

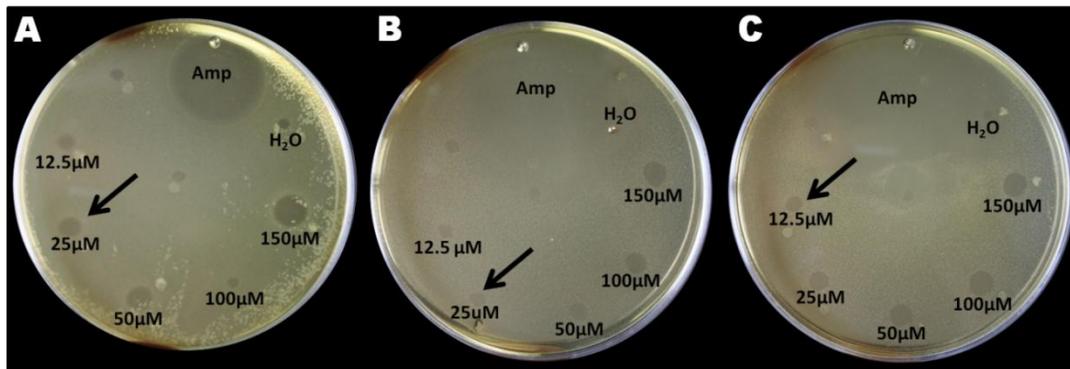


Figura 13. Determinación de las CMI de la hBDcon mediante ensayos de actividad antimicrobiana en placa. A. *E. coli* ATCC 25922, B. *P. aeruginosa* ATCC 9027, y C. *S. aureus* ATCC 25923.

5.2.2. Ensayo de actividad antimicrobiana en dilución

5.2.2.1. Variantes de Pin2

Con la finalidad de realizar un análisis certero de la actividad microbicida de los péptidos antimicrobianos generados de la secuencia de Pin2, evaluados en este reporte, se realizaron cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano, preparando concentraciones decrecientes del péptido antimicrobiano liofilizado desde 50 hasta 0.8 μ M y añadiéndolo a un inóculo de bacterias en medio líquido (2 h de incubación, $\sim 1 \times 10^4$ UFC/mL). El seguimiento de las cinéticas de inhibición se realizó midiendo el cambio de absorbancia (625 nm) respecto al tiempo de incubación de los inóculos de bacterias en medio líquido en presencia y ausencia de los péptidos (Corzo *et al.*, 2001; Corzo *et al.*,

2002). En la figura 14 se muestran las cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de los péptidos Pin 2 y sus análogos sintéticos. De manera general todos los péptidos ensayados lograron inhibir al 100% el crecimiento microbiano a partir de concentraciones menores o iguales a 12.5 μM . Al comparar las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas por ambos métodos, difusión en agar y dilución (Tabla 16), se puede observar que las CMI obtenidas por medio del ensayo en placa son aproximadamente dos veces mayores en el caso de Pin2 y hasta más de 20 veces mayores en el caso de los péptidos Pin2 [P14GV] y Pin2 [P14VG], una posible explicación para esta discrepancia en los resultados es que la movilidad e interacción de los diferentes péptidos con la células bacterianas podría estar comprometida en los ensayos en sólido, debido a una interacción con la matriz del medio de cultivo, observándose CMI mayores. Los cambios observados en las actividades antimicrobianas en el ensayo de difusión en agar podrían estar relacionados con el incremento o disminución de la hidrofobicidad global de las variantes de Pin2, dado que las variantes más hidrofóbicas Pin2 [P14V], Pin2 [P14GV] y Pin2 [P14VG] presentaron menores actividades antimicrobianas respecto a los péptidos más hidrofílicos Pin2, Pin2 [P14GVG] y Pin2 [P14GPG]. El péptido Pin2 [P14V] no presentó actividad antimicrobiana en sólido contra ninguna de las bacterias evaluadas, la ausencia de actividad del péptido Pin2 [P14V] y las bajas actividades presentadas por las variantes Pin2 [P14GV] y Pin2 [P14VG] pueden estar relacionadas con una difusión limitada a través de la matriz del agar, como consecuencia de la naturaleza hidrofóbica de estos péptidos. Resultados similares fueron observados con el péptido antimicrobiano Nicina de *Lactococcus lactis* (Chandrapati y O'Sullivan, 1998). Una de las limitantes principales del ensayo de inhibición por difusión en agar, es que la difusión de los antibióticos es proporcional a la concentración hasta un rango limitado, por lo cual, después de este rango los diámetros de las zonas de inhibición no pueden ser correlacionados con la concentración de antibiótico o agente antibacterial (Chandrapati y O'Sullivan, 1998). Por otro lado, en los ensayos de inhibición en medio líquido todos los péptidos evaluados conservaron una actividad antimicrobiana similar a la del péptido parental Pin2 contra *S. aureus* ATCC 25923 (CMI alrededor de 12.5 μM), indicando que todas las variantes se comportan de una manera similar en medios líquidos. Estos resultados aportan información relevante sobre las aplicaciones potenciales para estos péptidos

antimicrobianos en el tratamiento de infecciones tópicas, principalmente en ambientes semisólidos en donde su actividad estaría limitada por la difusión.

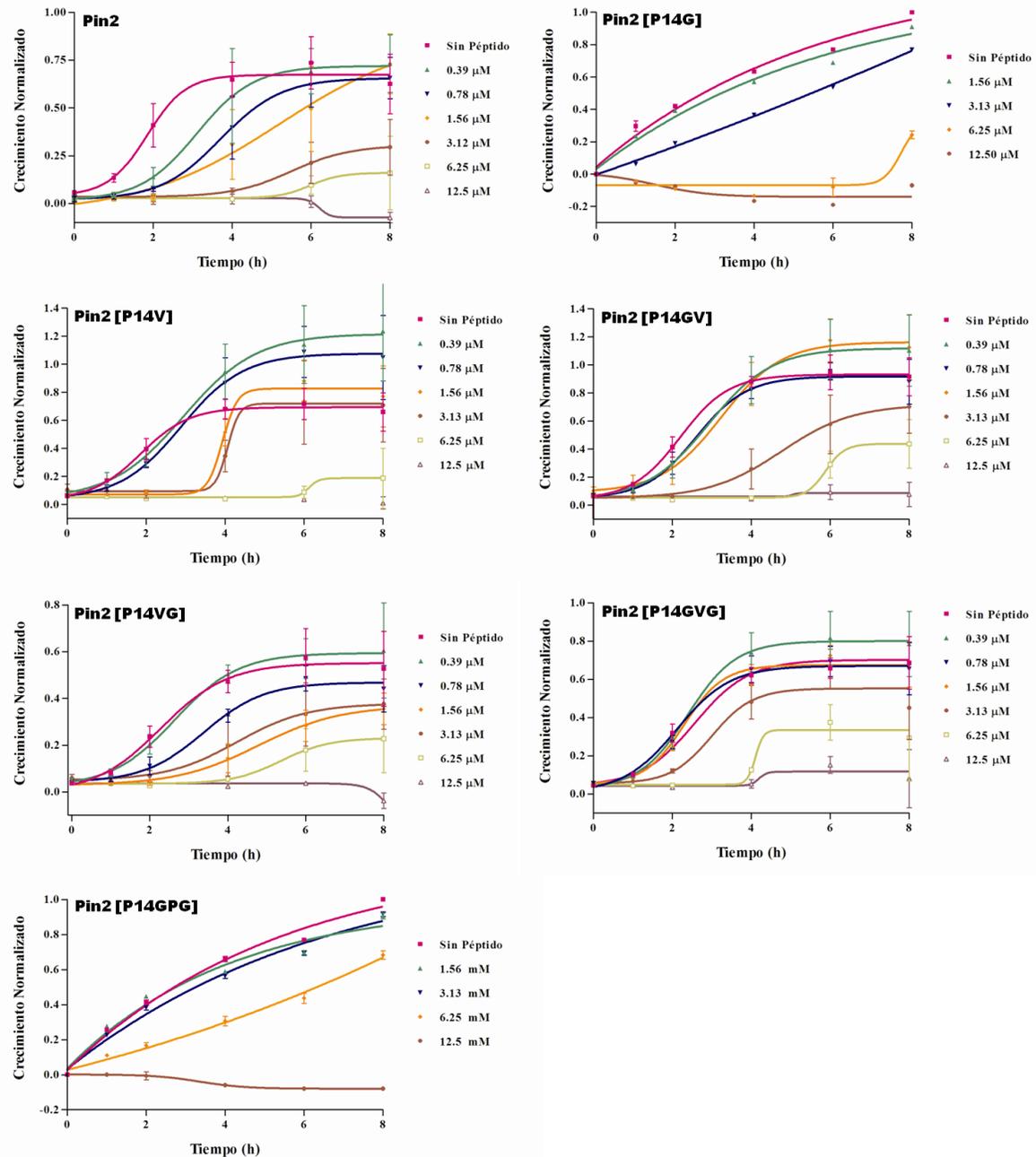


Figura 14. Ensayos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos de la serie Pin2 (37°C; DO_{625 nm}). Las Barras representan la desviación estándar entre los ensayos.

Tabla 16. Comparativo entre los ensayos en sólido y las cinéticas de inhibición en líquido.

Ensayo	Concentraciones Mínimas Inhibitorias (μM) <i>S. aureus</i> ATCC 25923						
	Pin2	Pin2 [P14G]	Pin2 [P14V]	Pin2 [P14GV]	Pin2 [P14VG]	Pin2 [P14GVG]	Pin2 [P14GPG]
Difusión	37.5	12.5*	N.A	>300	>300	75.0	50.0*
Dilución	12.5/<1*	6.25/3.1*	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5/12.5*

*Ensayo realizado en Agar Soya Trypticasa (media fuerza iónica).

5.2.2.2. beta-Defensinas humanas, hBD11 y hBDcon

La actividad antimicrobiana de los péptidos hBD11 y hBDcon, en su estado reducido, fue evaluada mediante la realización de cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano contra *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 (1×10^4 UFC/mL), preparando concentraciones decrecientes del péptido antimicrobiano liofilizado desde 100 hasta 1.6 μM , utilizando como medio de cultivo TSB, a bajas concentraciones, para minimizar el efecto de la fuerza iónica del medio de cultivo, y pH controlado (PBS, pH 7.4), de acuerdo con Lherer y colaboradores (1991). El seguimiento de las cinéticas de inhibición, se realizó midiendo el cambio de absorbancia (595 nm) respecto al tiempo de incubación de los inóculos de bacterias, *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, en medio líquido en presencia y ausencia de los péptidos. Como se observa en la figura 15 la hBD11 logró inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 a concentraciones de 100 μM , pero sólo presentó una actividad bacteriostática contra *E. coli* ATCC 25922 a la misma concentración. Por su parte la hBDcon en los ensayos de inhibición por el método de dilución presentó una CMI igual a la de la hBD11 contra *S. aureus* ATCC 25923, sin embargo, en lo que respecta a su actividad antimicrobiana contra *E. coli* ATCC 25922 su CMI fue de 12.5 μM , situándose en el mismo rango que en los ensayos de difusión y en valores de CMI similares a los de las variantes de Pin2. Como se observa en la tabla número 12 la secuencia sintetizada para la hBDcon presenta similitudes de entre un 40-50% con las **beta-Defensinas humanas 26, 27 y 28**, de 43% con la **beta-Defensina canina 1 (cBD-1)** y de 42.5% con la **beta-Defensina de tortuga**

(TEWP), los péptidos hBD28 y cBD-1 presentan actividades antimicrobianas de amplio espectro (Chattopadhyay *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009; Shulz *et al.*, 2005), mientras que los péptidos hBD26, hBD27 y TEWP presentan una selectividad de su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas como *E. coli* (Sang *et al.*, 2005; Shulz *et al.*, 2005) La hBDcon presentó una actividad antimicrobiana que podría describirse como de amplio espectro, como la de la HBD28 y la cBD-1, sin embargo, los valores de CMI contra *S. aureus* ATCC 25923 resultaron mayores que los observados para los ensayos contra *E. coli* ATCC 25922 indicando una selectividad preferencial contra bacterias Gram negativas como la reportada para la hD26, hBD27 y TEWP.

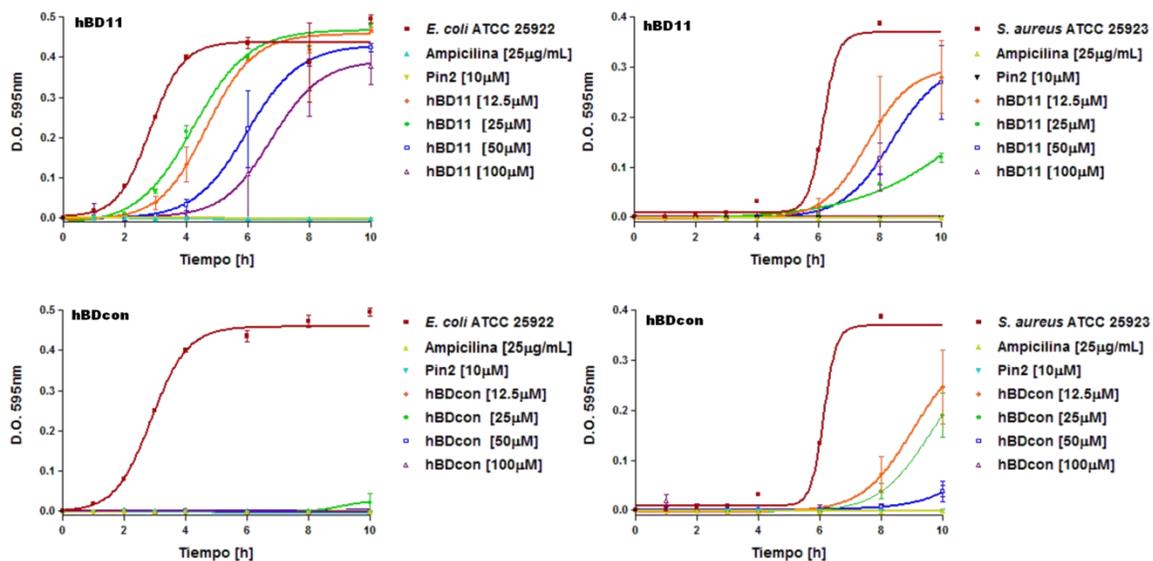


Figura 15. Ensayos de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de diferentes concentraciones de las beta-Defensinas hBD11 y hBDcon (37°C; DO_{595 nm}). Las barras representan la desviación estándar de tres ensayos.

5.2.3. Ensayos de actividad hemolítica contra eritrocitos humanos

5.2.3.1. Variantes de Pin2

La actividad hemolítica de los diferentes péptidos de la serie Pin2 fue determinada mediante la incubación de suspensiones celulares de eritrocitos humanos (EH) con diluciones seriales de los

péptidos a concentraciones desde 25 hasta 0.8 μM . La concentración de EH utilizada fue aproximadamente 1×10^7 células por mililitro. Los EH fueron incubados a temperatura ambiente por espacio de una hora en presencia de las diferentes concentraciones de los péptidos antimicrobianos, una solución de Tritón X100 al 10%, agua desionizada, como testigos positivos de hemólisis, y PBS (10 mM, pH 7.4), como testigo negativo de hemólisis. Posteriormente al periodo de incubación a 37 °C, las muestras fueron centrifugadas, se midió el registro de absorbancia del sobrenadante a 570 nm y se determinó en porcentaje de hemólisis de los péptidos, tomando como valor máximo de hemólisis el registro de $\text{DO}_{570\text{nm}}$ observado en los testigos positivos (Figura 16A). Como se observa en el gráfico (Figura 16B), de manera general las sustituciones o inserciones de aminoácidos alrededor de la posición de la Prolina 14 presente en Pin2 disminuyeron la actividad hemolítica de las variantes. En el caso de los péptidos Pin2 [P14V] y Pin2 [P14VG] la actividad hemolítica disminuyó alrededor de un 20% comparada con la de Pin2, mientras que la actividad hemolítica de los péptidos Pin2 [P14GV] y Pin2 [P14GVG] se redujo cerca de un 50%, la variante con la reducción en la actividad hemolítica más significativa fue Pin2 [P14GPG], que redujo su actividad tóxica contra EH cerca de un 70%, sin embargo, la actividad hemolítica de la variante Pin2 [P14G] fue mayor que la registrada con el péptido parental Pin2.

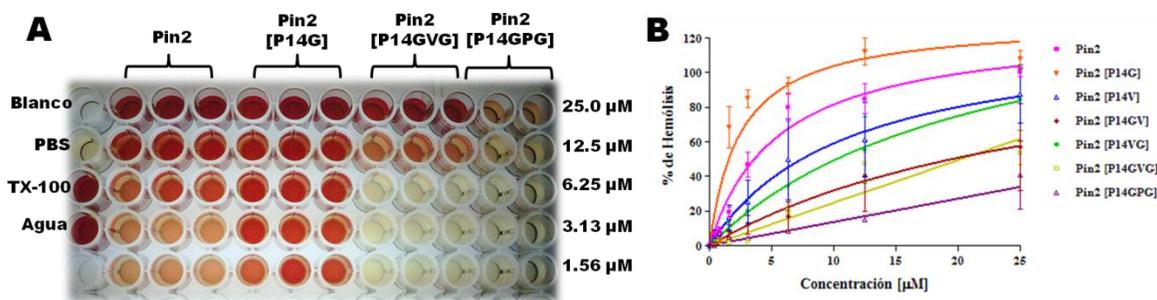


Figura 16. Ensayos de actividad hemolítica de los péptidos antimicrobianos de la serie Pin2. A. Ensayo en placas de 96 pozos contra eritrocitos humanos (1×10^7 EH/mL, incubación 1 h a 37 °C). B. Gráfico de la cinética de disrupción de los eritrocitos humanos como efecto de la presencia de los péptidos antimicrobianos de la serie Pin2.

Una característica esencial para cualquier agente antimicrobiano de uso terapéutico, es que presente una selectividad preferente contra los microorganismos causantes de enfermedad o infección que contra las células del huésped. Por lo que una manera de determinar el grado de esta selectividad es el cálculo del Índice Terapéutico (IT), que se define como la relación entre la actividad tóxica (DE₅₀ de hemólisis) y actividad deseada (antimicrobiana, CMI), por lo que compuestos con IT cercanos a la unidad son menos recomendables para su aplicación segura. En este reporte el IT fue calculado como el resultado de la razón entre la DE₅₀ de la actividad hemolítica (calculada mediante el ajuste de los datos experimentales a una curva clásica Dosis/Respuesta con el uso del paquete estadístico GraphPad, Prism 3.0) y la CMI observada en los ensayos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923, siendo IT mayor, el calculado para la variante Pin2 [P14GPG] tanto en los ensayos de difusión, como en los de dilución (Tabla 17). Estos resultados resaltan la importancia de la presencia del doblez rígido generado por la Prolina en regiones centrales de este tipo de péptidos antimicrobianos como efectores de la actividad hemolítica, y confirman la hipótesis de que el cambio de este residuo por otros motivos estructurales como GVG y GPG disminuyen la actividad hemolítica y por su efecto incrementan el IT de estos péptidos antimicrobianos.

Tabla 17. Índices terapéuticos de Pin2 y sus variantes para los ensayos con *S. aureus* ATCC 25923, tanto en sólido como en líquido.

Péptido	DE ₅₀ [μM]	IC [μM]	MIC [μM] Difusión	MIC [μM] Dilución	IT ^a	IT ^b
Pin2	3.3	1.9-5.7	37.5	12.50	0.09	0.26
Pin2 [P14G]	1.4 [†]	0.45-4.4	12.5	6.25	0.11	0.22
Pin2 [P14V]	7.1 [§]	5.4-9.1	NA	12.50	-	0.56
Pin2 [P14GV]	20.4 [‡]	16.4-25.4	300.0	12.50	0.07	1.63
Pin2 [P14VG]	9.6 [§]	7.1-13.1	300.0	12.50	0.03	0.77
Pin2 [P14GVG]	21.2 [‡]	14.0-32.0	37.5	12.50	0.56	1.69
Pin2 [P14GPG]	46.6 [§]	34.0-63.8	50.0	12.50	0.93	3.73

DE₅₀= Dosis efectiva 50 de hemólisis

IC = Intervalo de confianza 95%

NA= No Presentó Actividad Antimicrobiana

^aÍndice Terapéutico representa DE₅₀ (Hemólisis)/MIC (Ensayo de difusión)

^bÍndice Terapéutico representa DE₅₀ (Hemólisis)/MIC (Ensayo de dilución)

[†] No existe diferencia estadísticamente significativa en la DE₅₀ respecto al péptido parental P>0.05

[§] Diferencia estadísticamente significativa en la DE₅₀ respecto al péptido parental P<0.05

[‡] No existe diferencia estadísticamente significativa entre las DE₅₀ de ambas variantes P>0.05

5.2.3.2. beta-Defensinas humanas, hBD11 y hBDcon

De acuerdo con lo propuesto en la hipótesis de esta tesis, debido al origen eucarionte de su secuencia, las **beta-Defensinas humanas** hBD11 y hBDcon no presentaron ninguna actividad hemolítica contra EH hasta concentraciones de 100 μM , razón por lo que no fue posible hacer un cálculo del IT de estos péptidos, sin embargo, dado que no presentan efectos tóxicos contra EH, la única limitante posible para su uso potencial como agentes antimicrobianos sería su solubilidad, principalmente para el caso de la hBD11 que presentó CMI muy altas respecto a las variantes alfa-lineales provenientes de la secuencia de Pin2 y con la hBDcon en los ensayos de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 en líquido. En la figura 17 se muestran los efectos hemolíticos de los péptidos antimicrobianos tipo **beta-Defensina**, hBD11 y hBDcon, evaluados en este reporte comparados con el de la **Pandinina 2**.

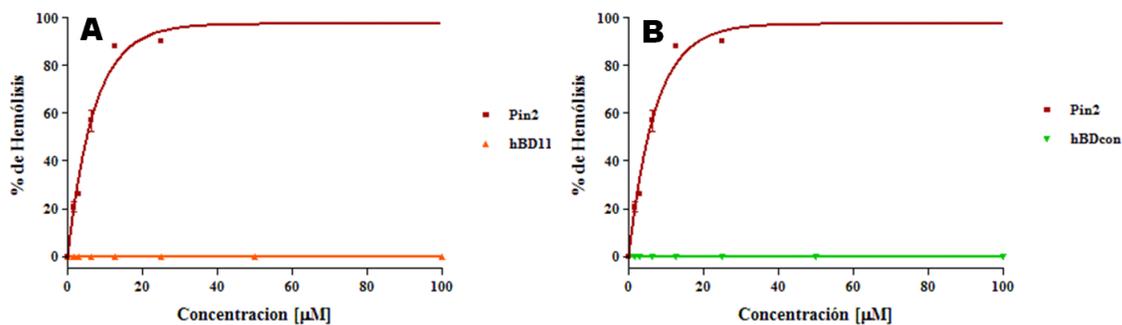


Figura 17. Ensayos de actividad hemolítica de las beta-Defensinas A. hBD11 y B. hBDcon. Realizado en placas de 96 pozos contra eritrocitos humanos (1×10^7 EH/mL, incubación 1 h a 37 °C).

5.3. Análisis de los resultados experimentales

Estudios de estructura/función sobre péptidos antimicrobianos revelaron que diferentes parámetros fisicoquímicos y estructurales están relacionados con la selectividad de sus actividades biológicas, microbicidas y/o tóxicas (Takahashi *et al.*, 2010; Yeaman y Yount., 2003). Parámetros fisicoquímicos como la anfipaticidad, la hidrofobicidad, la carga, el ángulo polar, entre otros, así como la conformación estructural (grado de estructura secundaria, longitud, flexibilidad), determinan ciertas características de

la actividad de los péptidos antimicrobianos (Figura 18). En este reporte evaluamos parámetros fisicoquímicos teóricos (basados principalmente en el análisis de secuencia primaria) y experimentales con la finalidad de correlacionarlos con los cambios en la actividad hemolítica de las variantes. Así como las determinaciones del grado de estructura secundaria de las variantes de Pin2 por dicroísmo circular y modelos estructurales fueron de utilidad para determinar el efecto de la conformación estructural de estos péptidos sobre su actividad hemolítica. Además, el cálculo de parámetros como: el contenido de estructura secundaria, flexibilidad, GRAVY (medida de la hidrofobicidad calculada de la secuencia primaria de los péptidos) (Kyte y Doolittle, 1982), el momento hidrofóbico (medida de la hidrofobicidad de la molécula que incluye el efecto de la conformación helicoidal) y el momento hidrofóbico relativo (medida de anfipaticidad de la molécula), para las variantes de la serie Pin2, en servidores avocados al estudio de péptidos antimicrobianos fue de gran ayuda para tratar de correlacionar las diferencias en las actividades hemolíticas observadas en las fases experimentales.

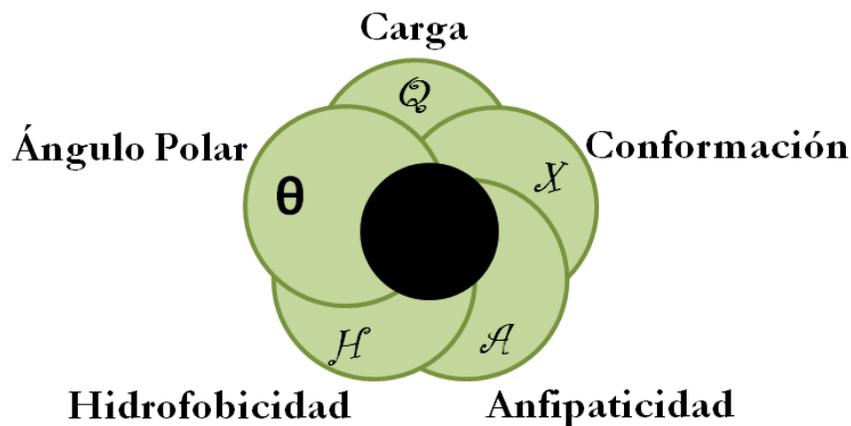


Figura 18. Parámetros fisicoquímicos determinantes de la actividad antimicrobiana, modificada de Yeaman y Yount (2003).

5.3.1. Efecto del cambio de la anfipaticidad sobre la actividad hemolítica en las variantes de Pin2

La anfipaticidad es una de las características principales que determinan la selectividad de los péptidos antimicrobianos, prácticamente todos los péptidos antimicrobianos son anfipáticos al interactuar con las membranas bacterianas o eucarióticas, las hélices anfipáticas generalmente presentan una periodicidad de un residuo hidrofóbico cada tres o cuatro residuos. La anfipaticidad es un factor importante en la interacción con membranas cargadas negativamente, como en el caso de las membranas bacterianas, sin embargo, su efecto es aun más pronunciado contra membranas zwitterionicas o neutras, encontradas en organismos eucariontes, generando péptidos más hemolíticos. Un elevado grado de anfipaticidad genera un dominio hidrofóbico más marcado, el cual es correlacionado con toxicidades mayores hacia membranas compuestas por fosfolípidos neutros (Dathe y Wieprecht, 1999). Pin2 presenta una estructura claramente anfipática, concentrando la mayoría de sus residuos hidrofóbicos en una de sus caras y los residuos hidrofílicos en la cara opuesta, en la figura 19 se muestra la representación helicoidal, evidenciando el grado de su anfipaticidad.

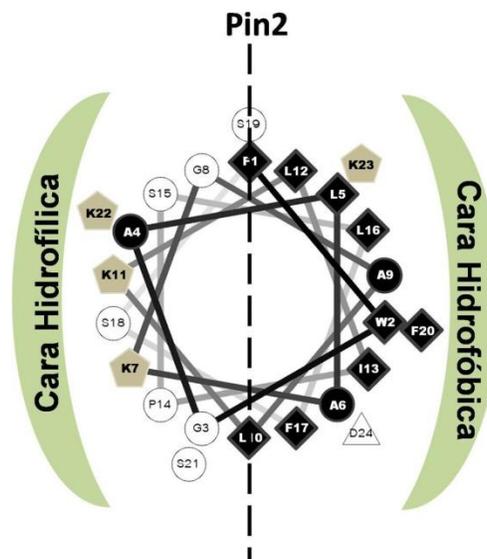


Figura 19. Representación helicoidal de Pin2, mostrando la anfipaticidad de la molécula. ■ Residuos hidrofóbicos, ■ Residuos con carga positiva y □ otros residuos, neutros y aniónicos.

Como se observa en la figura 20, la sustitución del residuo de Prolina ubicado en la posición 14 por Glicina o Valina no afectó el grado de anfipaticidad de la molécula, este se mantuvo en el mismo perfil que Pin2, sin embargo, con la inserción de los nuevos residuos la clara conformación anfipática del péptido parental se fue distorsionando, inicialmente con los cambios [P14GV] y [P14VG], la cara hidrofóbica de la molécula se interrumpió con dos residuos de Serina, numerados como 16 y 20 y con la inserción de una Lisina, numerada como 23. Posteriormente con la inserción de los cambios [P14GVG] y [P14GPG], se observó una disminución de la anfipaticidad inicial más marcada, ahora en la cara inicialmente hidrofóbica, hay un residuo de Glicina, numerado como 16, tres residuos de Serina, numerados como 17, 20 y 23 y un residuo de Lisina, numerado como 23. Debido a que las variantes con mayores cambios en anfipaticidad también presentaron los mayores cambios en la actividad hemolítica, se estableció que existe una relación entre los dos efectos. Una medida teórica que permite cuantificar el grado de anfipaticidad de un péptido antimicrobiano es el momento hidrofóbico relativo (μHr), calculado como la suma de las hidropaticidades individuales de cada aminoácido en un hélice ideal (Eisenberg, 1984). Incrementos en μHr resultan en incrementos significativos en la capacidad para permeabilizar membranas y por ende, incrementos en las actividades hemolíticas de péptidos modelo (Yeaman y Yount., 2003). Pathak y colaboradores (1995) sugirieron en su estudio, que la anfipaticidad es el factor más importante para modular la actividad antimicrobiana, por otro lado Wieprecht y colaboradores (1997), observaron que al incrementar el μHr en sus péptidos la liberación del colorante calceína no se veía afectada en vesículas compuestas por fosfatidílglicerol(PG), fosfolípido hidroxilado ampliamente distribuido en bacterias, pero por el contrario, la liberación de calceína se incremento en vesículas compuestas por una proporción 3:1 de fosfatidícolina(PC):fosfatidílglicerol(PG), la fosfatidícolina es un fosfolípido de carga neutra muy representado en membranas eucarióticas, indicando que el μHr juega un rol trascendental en la toxicidad hacia ellas (Yeaman y Yount, 2003).

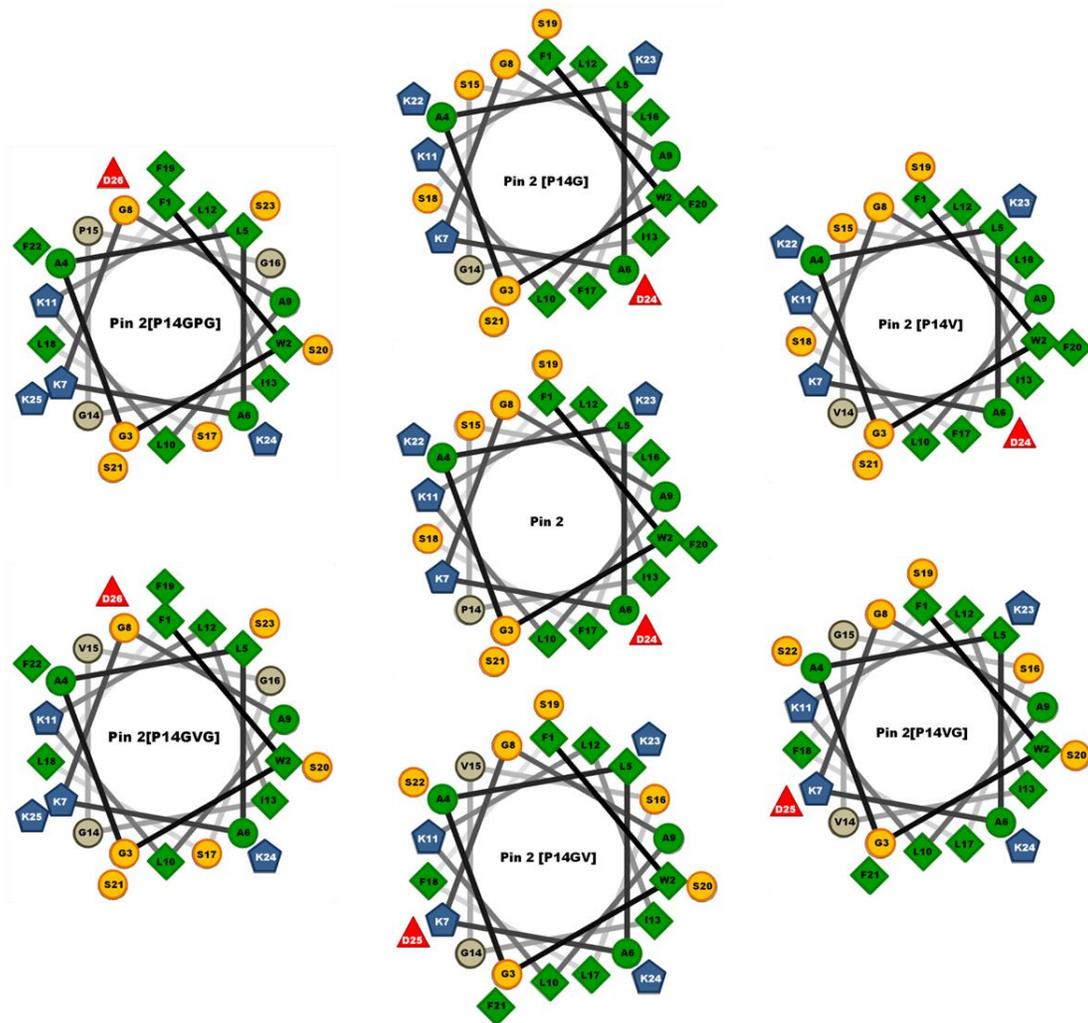


Figura 20. Representación helicoidal de los diferentes péptidos evaluados en este trabajo. ■ Residuos hidrofóbicos, ■ residuos catiónicos ■ residuos polares sin carga o neutros, ■ residuos aniónicos y ■ los residuos sustituidos o insertados.

Los valores de μHr de las variantes generadas en este reporte fueron calculados con base en su secuencia primaria, y correlacionados con la DE_{50} de la actividad hemolítica, el gráfico del efecto de los valores de μHr sobre la actividad hemolítica de las variantes de Pin 2 se ilustra en la figura 22A, nuestro péptido con mayor toxicidad contra EH fue Pin 2 [P14G], el cual presentó un valor de μHr de 0.49, indicando que este péptido presenta un porcentaje de cerca del 50% de anfipaticidad, mientras que los péptidos más selectivos Pin 2 [P14GVG] y Pin 2 [P14GPG] solo presentaron un valor de μHr de 0.28,

indicando que un menor grado anfipaticidad en la conformación estructural de los péptidos antimicrobianos reduce su toxicidad contra EH, sin embargo, las disminuciones en los valores de μHr solo correlacionaron en un 27% con la disminución de efecto hemolítico, por lo que no se observa un efecto lineal entre la anfipaticidad y la hemólisis.

5.3.2. Efecto del cambio de la hidrofobicidad sobre la actividad hemolítica en las variantes de Pin2

Como consecuencia de la sustitución de residuos en la secuencia del péptido modelo Pin2, los tiempos de retención en la columna de fase reversa C_{18} para todos los péptidos fueron diferentes con respecto al parental, siendo el más hidrofílico Pin2 [P14GPG] con un tiempo de retención de 27.6 minutos y el más hidrofóbico el péptido Pin2 [P14V] con un tiempo de retención de 42.4 minutos (Figura 8H). La hidrofobicidad de los péptidos antimicrobianos es definida como el porcentaje de residuos hidrofóbicos que componen a la molécula, el cual es cercano al 50% en la mayoría de los péptidos antimicrobianos descritos. Como ya se mencionó anteriormente la hidrofobicidad es fundamental para la inserción de los péptidos antimicrobianos en las membranas, sin embargo, porcentajes elevados de hidrofobicidad disminuyen la selectividad hacia bacterias, incrementando su toxicidad hacia células de mamífero (Yeaman y Yount, 2003). En la figura 22B se ilustra el efecto de la hidrofobicidad experimental, expresada como el tiempo de retención en la columna de intercambio hidrofóbico C_{18} sobre la actividad hemolítica de las variantes. Como se observa en el gráfico existe una correlación de cerca del 48% entre la hidrofobicidad observada experimentalmente y la DE_{50} de hemólisis, sugiriendo que la disminución en la hidrofobicidad de los péptidos antimicrobianos evaluados resultó importante para la disminución de su actividad hemolítica contra EH, sin embargo, fue necesario evaluar otros parámetros fisicoquímicos aunados a la disminución de la hidrofobicidad, tales como la flexibilidad y el nivel de estructura secundaria. En la figura 21 se presenta un gráfico de la hidropaticidades por residuo, para cada uno de los péptidos, los valores individuales fueron calculados por el método de Kyle y Doolittle

(1982) con la ayuda del servidor PETStats (<http://www.petstats.com/>) y en el Anexo 4 se enlistan los valores de hidropaticidad para cada aminoácido. Como se observa en la figura 21, los máximos de hidrofobicidad, situados entre los residuos 11 al 17, corresponden al péptido más hidrofóbico Pin2 [P14V], mientras que los mínimos en hidrofobicidad de la misma región correlacionan con los péptidos con menores tiempos de retención, Pin2 [P14GVG] y Pin2 [P14GPG], y que a su vez presentaron las actividades hemolíticas menores. El Gran Promedio de Hidropaticidad (GRAVY, por sus siglas en inglés) es el resultado de la suma de los índices de hidropaticidad de todos los residuos que componen a una proteína dividido por el número de residuos total; este parámetro nos permite comparar las hidrofobicidades de diferentes proteínas entre sí, cuanto más positivo es el valor del GRAVY la proteína en cuestión es más hidrofóbica (Kyte y Doolittle, 1982).

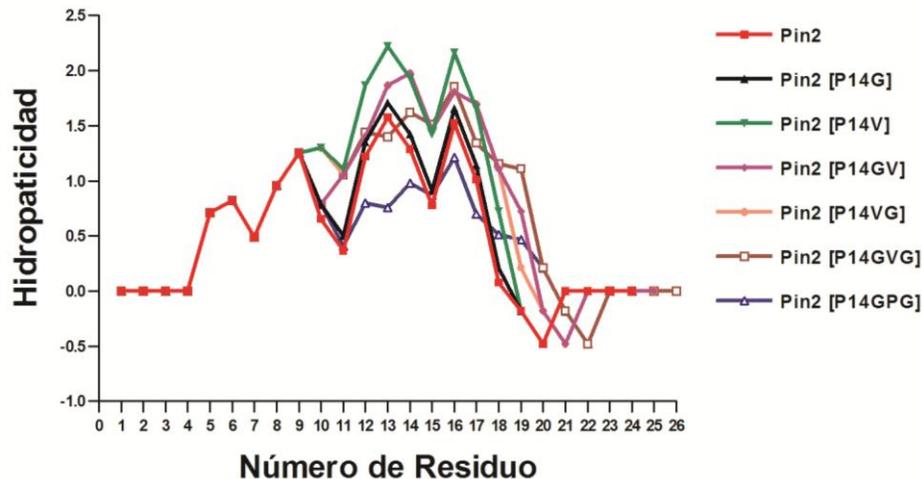


Figura 21. Hidropaticidades de Kyle y Doolittle (1982) por residuo graficadas para cada variante de Pin2. PETstats (<http://www.petstats.com/>).

Con la finalidad de facilitar el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos se intentó correlacionar los valores de GRAVY calculados, con base en la secuencia primaria para cada variante, con los tiempos de retención observados; una correlación adecuada entre estos dos parámetros nos permitiría predecir de una manera más sencilla el posible comportamiento de un péptido en la columna de intercambio

hidrofóbico C₁₈ y a su vez el grado de hidrofobicidad del mismo, facilitando así el diseño de péptidos con menores toxicidades. Para este fin, los valores teóricos de GRAVY para cada uno de ellos, así como el correspondiente a cada una de las caras (hidrofílica e hidrofóbica) fueron calculados (Tabla 18).

Tabla 18. Valores teóricos de GRAVY determinados para cada uno de los péptidos antimicrobianos evaluados.

Péptido	Secuencias de las caras Hidrofilicas	Secuencias de las caras Hidrofóbicas	GRAVY Total	GRAVY Hidrofilica	GRAVY Hidrofóbica
Pin2	GPKSKASGSK	<u>ELLAWIAFLSKFD</u>	0.329	-1.470	1.614
Pin2 [P14G]	GGKSKASGSK	<u>ELLAWIAFLSKFD</u>	0.379	-1.350	1.614
Pin2 [P14V]	GVKSKASGSK	<u>ELLAWIAFLSKFD</u>	0.571	-0.890	1.614
Pin2 [P14GV]	GGKFKAVGFDS	<u>ELLSAWIALLSKK</u>	0.532	-0.155	1.071
Pin2 [P14VG]	GVKFKAGGFDS	<u>ELLSAWIALLSKK</u>	0.532	-0.155	1.071
Pin2 [P14GVG]	GGKCLKAVGSKFD	<u>ELLGAWIASLESSK</u>	0.496	-0.383	1.250
Pin2 [P14GPG]	GGKCLKAVGSKFD	<u>ELLGAWIASLESSK</u>	0.273	-0.867	1.250

GRAVY: Calculado con ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)

El cambio de la Prolina 14 por Valina generó un incremento en la hidrofobicidad global del péptido análogo; presentando el mayor tiempo de retención, comparado con los correspondientes al resto de las variantes, en la columna C₁₈ durante el proceso de purificación por HPLC. Este aumento de hidrofobicidad podría explicarse al considerar los valores de los índices de hidropaticidad de los residuos sustituidos, el índice de hidropaticidad de la Valina es 4.2, mientras que el de la Prolina es -1.6 (Kyte and Doolittle, 1982). A pesar de que el valor de GRAVY calculado para los péptidos Pin2 [P14GV] y Pin2 [P14VG] es idéntico (0.53), es posible que la diferencia existente entre sus tiempos de retención, 32.8 y 37.0 minutos respectivamente, esté relacionada a que en el caso de Pin2 [P14VG] se forma un parche hidrofóbico mayor, dada la cercanía de los residuos L12 e I13 adyacentes al residuo insertado V14, el cual puede favorecer la interacción entre el motivo LIV del péptido y la resina de la columna C₁₈. Dado que el valor de GRAVY calculado para el péptido Pin2 es menor que el de Pin2 [P14GVG], se esperaría un menor tiempo de retención en este péptido, sin embargo, es probable que la cercanía de los residuos G14 y G16, generen una mayor hidrofobicidad en la región central del péptido Pin2 [P14GVG]. El valor de GRAVY de la variante Pin2 [P14G] (0.38) es mayor que el calculado para Pin2 (0.33), pero menor al de la variante Pin2 [P14V] (0.57), por lo que su incremento en toxicidad

parece no está relacionado directamente con su grado de hidrofobicidad, así que es posible que este incremento esté relacionado con otros parámetros, como su conformación tridimensional. Finalmente la variante Pin2 [P14GPG] presentó sólo un 30% de hemólisis a la máxima concentración evaluada (25 μM), presentando el valor de GRAVY menor (0.27), comparado con todas las variantes evaluadas, y correlacionando con el menor tiempo de retención observado.

Las **Ponericinas G** son péptidos antimicrobianos con estructura alfa-helicoidal provenientes de la hormiga *Pochycondyla goeldii* y poseen un “doblez” estructural en su región central constituido por la secuencia GPG. Las **Ponericinas G** no poseen ninguna actividad hemolítica (Orivel *et al.*, 2001), indicando que la sustitución de la Prolina 14 de Pin2 por el motivo GPG, fue importante para disminuir toxicidad contra EH. Al analizar los gráficos de las figuras 22C y 22D se puede observar que los valores de GRAVY calculados no presentan una buena correlación con los tiempos de retención observados (29%), ni con la disminución de la actividad hemolítica (12.5%), por lo que se concluye que, si bien el GRAVY nos da una referencia de la hidrofobicidad global de la molécula, no nos permite inferir el efecto ocasionado por la posición en espacio tridimensional de residuos clave, razón por la cual no existió una correlación clara entre este parámetro y la disminución de la actividad hemolítica de los péptidos Pin2 [P14GV], Pin2 [P14GVG] y Pin2 [P14GPG]. Por otro lado el momento hidrofóbico (μH) toma en cuenta la conformación que presenta la estructura alfa-helicoidal clásica para el cálculo de hidrofobicidad, valores más positivos representan hidrofobicidades mayores, al igual que el caso del GRAVY. Este parámetro (μH) se define como la suma vectorial de las hidrofobicidades correspondientes a cada aminoácido que conforma la molécula, dividido por el número de los mismos, pero además incluye el valor del ángulo de proyección de Edmudson. En este caso, el péptido con la menor hidrofobicidad, dada por un momento hidrofóbico de 1.76 fue la variante Pin2 [P14GPG], la cual también presentó los valores de DE_{50} de hemólisis mayores. En la figura 22E se correlaciona la hidrofobicidad expresada como los valores de μH con los valores de DE_{50} de hemólisis calculados para

cada péptido, observándose que al igual que para los valores de GRAVY la correlación fue muy baja (28%), evidenciando que los parámetros de hidrofobicidad obtenidos a partir de la secuencia primaria no reflejaron el grado de hidrofobicidad real de los péptidos evaluados y por lo tanto constituyen solo una herramienta de referencia que debe ser tomada con cautela en el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos. Con el análisis de los datos experimentales se observa que de manera general la disminución de la actividad hemolítica se correlaciona con la disminución de la hidrofobicidad observada experimentalmente, indicando que péptidos con mayor hidrofobicidad son menos selectivos y por ende más tóxicos. Sin embargo, este parámetro no parece dominar todo el fenómeno, por lo que otros parámetros, como su organización tridimensional, pueden estar involucrados en la modulación de la actividad de estos péptidos.

5.3.3. Efecto del cambio de la flexibilidad sobre la actividad hemolítica en las variantes de Pin2

La flexibilidad es un parámetro estructural que no se ha tomado en cuenta de manera relevante para el estudio de los péptidos antimicrobianos, razón por la cual existen muy pocos reportes en donde se haya estudiado la relación de su efecto sobre las actividades biológicas de los péptidos antimicrobianos. Liu y colaboradores (2008) propusieron, basándose en sus resultados experimentales, que la flexibilidad tiene una correlación directa con la actividad antimicrobiana observada en péptidos del tipo alfa-lineales, indicando que a medida que la flexibilidad disminuye las actividades antimicrobianas aumentan. En el año 2000 Shin y colaboradores reportaron la importancia del doblez estructural generado por la secuencia GIG en el péptido antimicrobiano alfa-lineal y no hemolítico, CA(1-8)-MA(1-12). En este reporte se generaron 3 variantes CA-MA1 en donde la secuencia GIG fue eliminada, CA-MA2 en donde el triplete se sustituyó por Prolina y la variante CA-MA3 donde la Isoleucina fue sustituida por Prolina generando el motivo GPG, al evaluar experimentalmente estas variantes, observaron que la presencia del motivo GIG y su sustitución por Prolina mantenían un perfil de actividad antimicrobiana similar, pero la inserción del motivo GPG disminuyó su efecto bactericida, por lo que después de

analizar la estructura de estos péptidos por 2D-RMN, observaron que la flexibilidad de los péptidos CA-MA y CA-MA2 fue similar por lo que propusieron que la flexibilidad generada por estos motivos era importante para la interacción electrostática y su posterior inserción en membranas bacterianas, pero que al incrementar más este parámetro por la inserción de GPG se afectaba la actividad antimicrobiana. En otro reporte Frecer y colaboradores (2004) evaluaron las actividades biológicas de péptidos cíclicos con la presencia del motivo GSG en el centro de su estructura y con la ayuda de herramientas computacionales (Docking y Relación Cuantitativa Estructura-Actividad, QSAR, por sus siglas en inglés) determinaron que la flexibilidad generada por la presencia de estos residuos resultó importante para su actividad antimicrobiana, similar a lo anteriormente reportado por Shin y colaboradores (2000). Sin embargo, en ninguno de estos reportes se discute el efecto de la flexibilidad estructural global sobre el efecto hemolítico, dado que en el reporte de Shin y colaboradores (2000), las variantes mantuvieron las características no hemolíticas del péptido parental CA-MA y en el reporte de Frecer y colaboradores (2004) se mantuvo el motivo GSG en todas las variantes, presentando actividades hemolíticas a concentraciones alrededor de 5 μ M. En nuestra hipótesis inicial propusimos que el "doble" rígido generado por la presencia del residuo de Prolina en la posición 14 del péptido Pin2 estaba relacionado con su alto efecto hemolítico y que su cambio por motivos como GVG y GPG que rompieran la continuidad de la estructura alfa-helicoidal de una manera más flexible, permitiría disminuir su toxicidad. Por ese motivo se decidió determinar si cambios en la flexibilidad promedio de las variantes generadas de la secuencia de Pin2 podrían relacionarse con las disminuciones en la actividad hemolítica observadas principalmente en las variantes Pin2 [P14GV], Pin2 [P14GVG] y Pin2 [P14GPG]. Para evaluar esta relación, la flexibilidad promedio de las variantes se calculó utilizando los valores de flexibilidad reportados por (Bhaskaran y Ponnuswamy, 1988) para cada aminoácido (Anexo 4). Como se observa en la figura 22F a pesar de que los valores de flexibilidad promedio de cada molécula varían en rangos muy pequeños entre sí, existe un porcentaje de correlación de más del 60%

entre el aumento de la flexibilidad y la disminución de la actividad hemolítica. Situándose junto con la hidrofobicidad entre los parámetros más importantes para la modulación de la actividad hemolítica de las variantes evaluadas en este reporte.

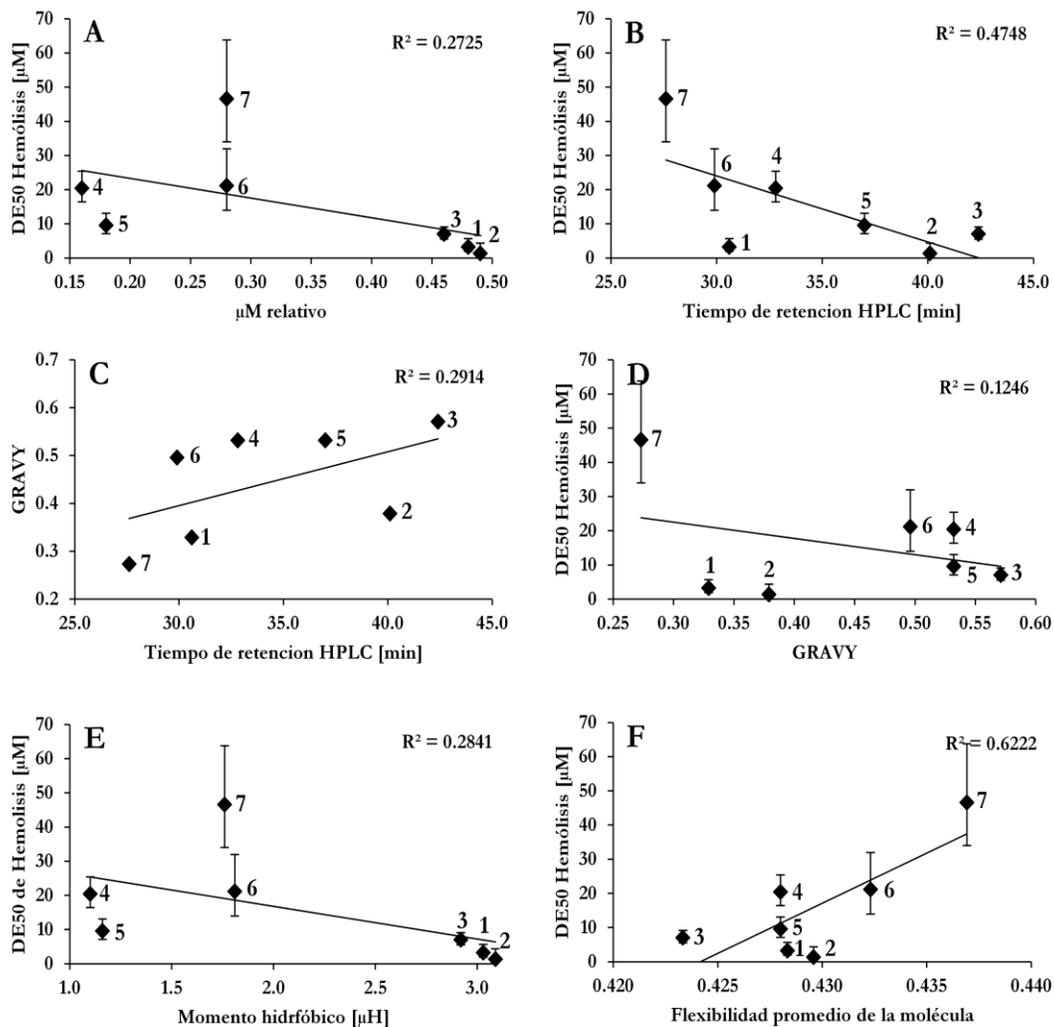


Figura 22. Análisis del efecto de parámetros fisicoquímicos para la modulación de la actividad hemolítica de las variantes de Pin2. A. Correlación del μH relativo con la DE_{50} de hemólisis, B. Correlación del tiempo de retención en HPLC con la DE_{50} de hemólisis, C. Correlación del GRAVY con el tiempo de retención en HPLC, D. Correlación del GRAVY con la DE_{50} de hemólisis, E. Correlación del μH con la DE_{50} de hemólisis y F) Correlación de la flexibilidad promedio de la molécula con la DE_{50} de hemólisis. Las barras de error representan los intervalos de confianza (95%) para los valores de DE_{50} de hemólisis calculados.

5.3.4. Conformación estructural

Dado la correlación de la flexibilidad con la disminución de la actividad hemolítica de las variantes de Pin2, se podría estudiar su efecto utilizando como templado la variante Pin2 [P14GPG], mediante la inserción de residuos más flexibles en la posición de la Prolina como un residuo de Glicina, generando el motivo “GGG”, o bien modificando los residuos de Lisina (0.47) por Arginina (0.53), que presenta mayor flexibilidad. Además con estos cambios disminuiríamos también la hidrofobicidad y de esta manera podríamos estudiar la influencia de la flexibilidad y la hidrofobicidad sobre la modulación de la actividad hemolítica en este tipo de péptidos alfa-lineales, sin modificar los valores de parámetros como la anfipaticidad y longitud de las moléculas.

5.3.4.1. Estimación de la estructura secundaria de las variantes de Pin2 por análisis de secuencia y espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)

Los péptidos antimicrobianos alfa-lineales son abundantes en los fluidos extracelulares de insectos y ranas. Frecuentemente estos péptidos mantienen una estructura desordenada en solución; sin embargo, estos adquieren su conformación estructural de alfa-hélice al interactuar con los fosfolípidos de la membrana (Yeaman y Yount., 2003). **Maganina 2** presenta 61% de estructura alfa-helicoidal (Imura *et al.*, 2007), mientras que **Melitina** un 71% (Ladokhin *et al.*, 1999). En experimentos de DC en presencia de trifluoroetanol (TFE), de manera general, un mayor contenido de estructura alfa-helicoidal. está relacionado con CMI menores (Pathak *et al.*, 1995) y con un mayor grado de toxicidad contra células eucarióticas (Dathe y Wieprecht, 1999). El conocimiento del grado de estructura secundaria de las variantes de Pin2, podrían ayudar a dilucidar los parámetros estructurales responsables de la actividad hemolítica en estos péptidos antimicrobianos y facilitar el diseño de nuevas variantes. La secuencia del péptido parental Pin2 y sus variantes se muestran en la tabla 19. La predicción de estructura secundaria se llevó a cabo en el servidor de análisis de secuencias de proteínas NPS@ (<http://npsa->

pbil.ibcp.fr/) con la herramienta de predicción de estructura secundaria (Combet *et al.*, 2000), el cual osciló entre 40 y 90 % para las variantes.

Tabla 19. Secuencia y predicción de estructura secundaria de Pin2 y sus variantes.

Péptido	Secuencia	α -Hélice (%)	Sin estructura (%)
Pin2	FWGALAKGALKLI-P-SLFSSFSKDD hhhhhhhhhhhh-h-hhhhhhcccc	87.5	12.5
Pin2 [P14G]	FWGALAKGALKLI-G-SLFSSFSKDD hhhhhhhhhhhh-h-hhhhhhcccc	87.5	12.5
Pin2 [P14V]	FWGALAKGALKLI-V-SLFSSFSKDD hhhhhhhhhhhh-h-hhhhhhcccc	83.3	16.7
Pin2 [P14GV]	FWGALAKGALKLIGV-SLFSSFSKDD cchhhhhhhhhheee-eecccccccc	40.0	40.0
Pin2 [P14VG]	FWGALAKGALKLI-VGSLFSSFSKDD hhhhhhhhhhhh-h-hhhhhhcccc	84.0	16.0
Pin2 [P14GVG]	FWGALAKGALKLIGVSGSLFSSFSKDD cchhhhhhhhhccccccchhcccc	46.2	53.8
Pin2 [P14GPG]	FWGALAKGALKLIGPGSLFSSFSKDD hhhhhhhhhhhhccccchhhhhcccc	65.4	34.6

h=Hélice; c=Sin estructura; e= hebra beta; Determinado en el servidor NPS@ (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>)

Para determinar si diferencias en el grado de estructura secundaria estaban relacionadas con el aumento de la actividad hemolítica observado con la variante Pin2 [P14G] o con las disminuciones en esta actividad presentadas por las variantes Pin2 [P14GV], Pin2 [P14VG] y Pin2 [P14GPG], se realizaron experimentos de dicroísmo circular. Los espectros de DC fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J-725 (Jasco, Japón). Los ensayos fueron realizados desde 260-190 nm en 60% de trifluoroetanol (TFE), pH 7.1 a temperatura ambiente (25°C), utilizando una celda de cuarzo de 1 mm y los datos fueron colectados a una velocidad de 100 nm/min. La concentración de los diferentes péptidos fue de 40 μ g/mL. Como se observa en la figura 23A no existe diferencia significativa entre los espectros obtenidos para cada uno de los péptidos antimicrobianos evaluados en este reporte, en los espectros se observan las bandas características (208 y 222 nm) de una estructura alfa-helicoidal, demostrando esta conformación espacial de los péptidos en ambientes hidrofóbicos, similares a los encontrados en las membranas lipídicas de origen bacteriano. Los valores promedio de tres corridas individuales fueron utilizados para determinar el porcentaje de contenido de α -hélice presente en los péptidos mediante el uso del software CDNN v.2.1 (Böhm, 1992), resultando muy similares (60%) sugiriendo que a nivel

global los cambios no modifican en gran manera la conformación estructural de los péptidos respecto a Pin2 (Figura 23A). Sin embargo, para el caso de las variantes Pin2 [P14G], la más hemolítica respecto a Pin2, y Pin2 [P14GPG], la menos hemolítica respecto a Pin2, se decidió hacer experimentos de DC con mayor detalle. Se realizaron experimentos de DC a diferentes concentraciones de trifluoroetanol (TFE) a 25 ° C, utilizando un espectrómetro AVIV 410-SFCD (AVIV, Inc. Biomédica, N.J., E.E.UU.). El análisis se realizó en un intervalo de longitudes de onda entre 190 y 250 nanómetros (nm) y a concentraciones de 12 μ M para Pin2, Pin2 [P14G] y Pin2 [P14GPG] en una cubeta de cuarzo de 1 mm. Los datos fueron recolectados cada 0.2 nm y un tiempo promedio de adquisición de 4s. Para determinar la proporción de TFE necesaria para inducir el máximo contenido de estructura α -helicoidal en los tres péptidos, diferentes volúmenes de TFE se añadieron a las muestras (20, 40 y 60% v/v, 300 μ L volumen final, y sólo para el péptido Pin2 [P14GPG], se utilizó una concentración del 70% TFE). Respecto a los experimentos de DC realizados al péptido parental Pin2 (Figura 23B) y el péptido Pin2 [P14GPG] (Figura 23D), ambos péptidos mostraron un perfil de DC característico de ausencia de estructura secundaria en la solución testigo (agua destilada); por su parte el péptido Pin2 [P14G] (Figura 23C) en ausencia de TFE ya presenta un 20% de estructura alfa-helicoidal, sugiriendo que este péptido tiene mayor propensión a esta conformación, lo que podría estar relacionado con su mayor actividad. El porcentaje máximo de estructura secundaria para todos los péptidos se calculó mediante el análisis de los datos de DC usando el paquete de software CDPro, observándose que el contenido total de estructura alfa-hélice fue de 60%.

Por otro lado, se realizaron los modelos estructurales de las diferentes variantes insertando las mutaciones en la secuencia de Pin2 y optimizándolos, en una caja de agua de 10 \AA^2 , con ayuda de paquete para modelado molecular Maestro versión para uso académico (<http://www.schrodinger.com>), posteriormente los modelos fueron minimizados utilizando PELE (Protein Energy Landscape Exploration, Borrelli *et al.*, 2005) a una temperatura hipotética de 5,000°C (Figura 24).

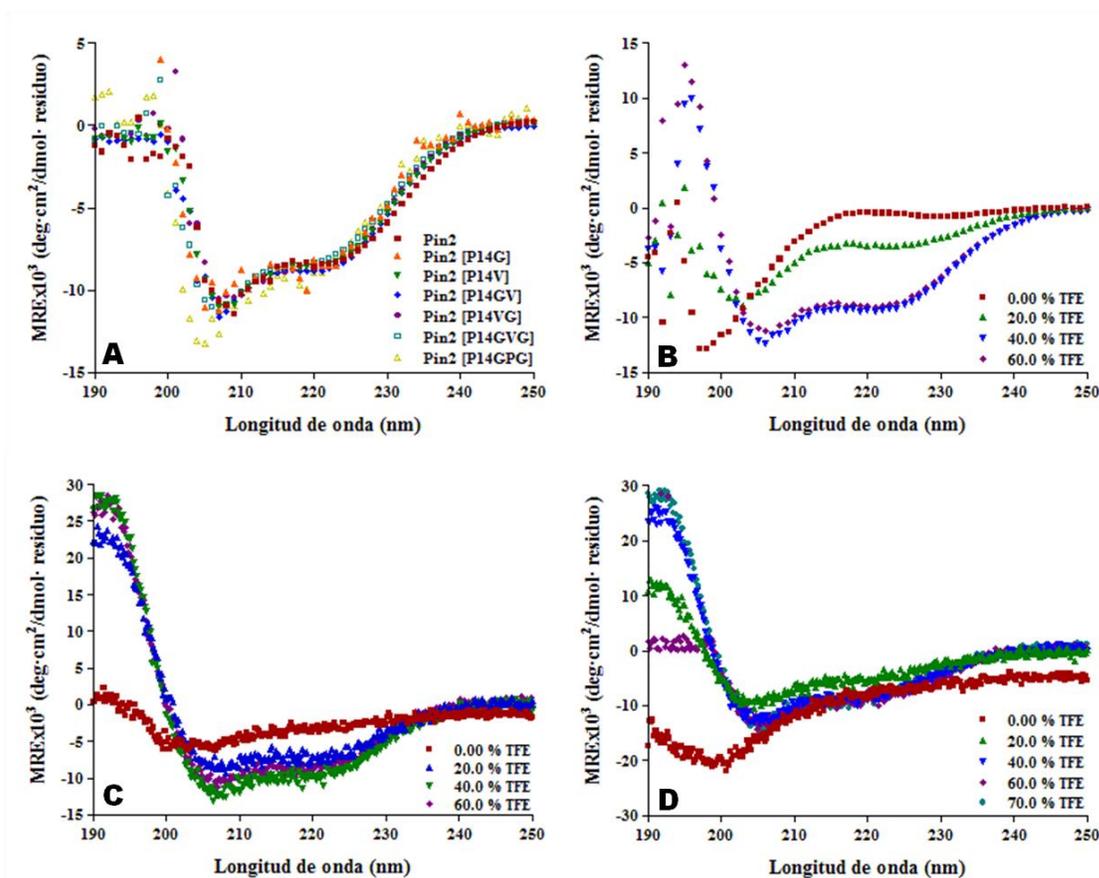


Figura 23. A) Espectros de DC obtenidos para los diferentes péptidos evaluados en este trabajo, 60% TFE (Jasco J-725, Japón). B) Espectros de DC de la titulación de Pin2 con TFE (Jasco J-725, Japón). C. Espectros de DC de la titulación de Pin2 [P14G] con TFE. D. Espectros de DC de la titulación de Pin2 [P14GPG] con TFE. SFCD (AVIV, Inc. Biomédica, NJ., EE.UU.).

En estos modelos estructurales obtenidos después de la minimización se puede observar que el grado de estructura es mayor para los péptidos más tóxicos, Pin2 y Pin2 [P14G], como se observa en la figura 24, mientras que el grado de estructura de los péptidos Pin2 [P14GVG] y Pin2 [P14GPG] fue menor, por lo que lucen muy desordenadas. Posteriormente con la ayuda de estos modelos tratamos de correlacionar otras propiedades fisicoquímicas reportadas como importantes en experimentos de QSAR sobre péptidos antimicrobianos para modular su actividad antimicrobiana y hemolítica (Hilpert *et al.*, 2008; Jenssen *et al.*, 2007; Langham *et al.*, 2008) tales como, el número de enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares, la longitud de la molécula (medida en Å desde el carbono alfa de

residuo inicial al carbono alfa de residuo final), el grado de deformación inducida por la presencia de los residuos de Prolina, Glicina, Valina y sus combinaciones (medido como el ángulo formado entre el primer residuo, el residuo central y el residuo final de la molécula) y el momento dipolar generado por la distribución de las cargas en la estructura de cada variante, con las actividades antimicrobianas y hemolíticas, con la finalidad de establecer que parámetro es el de mayor peso para favorecer disminuciones en el perfil hemolítico y facilitar el diseño de nuevas variantes.

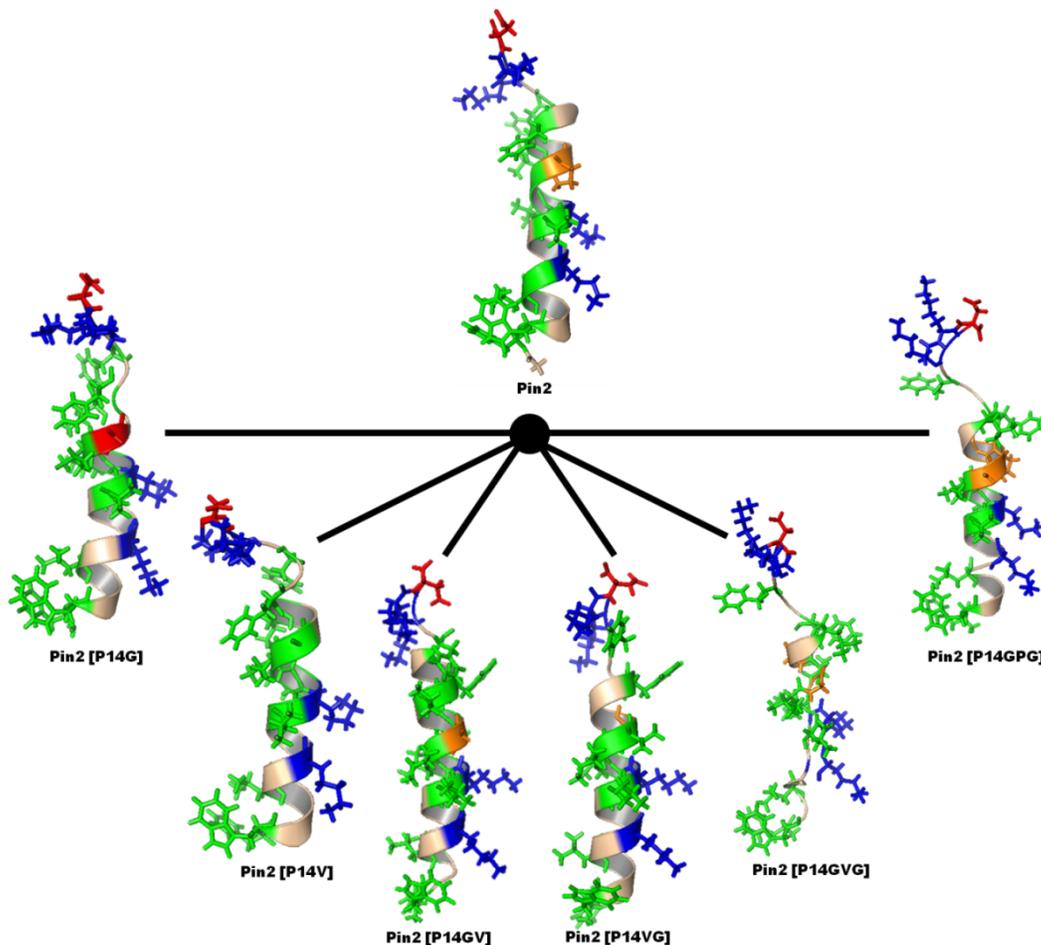


Figura 24. Modelos estructurales de los péptidos α -lineales evaluados en este trabajo. Los modelos fueron generados con Maestro y minimizados con PELE.

Sin embargo, no se lograron obtener porcentajes de correlación superiores al 30% entre estos parámetros y la disminución en el perfil hemolítico observadas en la caracterización de las variantes,

lo que podría estar relacionado al método de análisis, dado que PELE esta optimizado para realizar sus cálculos en agua; tomando en cuenta que los péptidos antimicrobianos alfa-lineales adquieren su conformación estructural al interactuar con el interior hidrofóbico de las membranas bacterianas y/o eucariotas, el análisis de sus propiedades fisicoquímicas en condiciones acuosas no refleja adecuadamente las condiciones en las que ejercen su actividad biológica. Por lo que una posibilidad para realizar un análisis más realista de los parámetros fisicoquímicos y estructurales de las variantes de Pin2, se basaría en el uso de dinámicas moleculares en presencia de un solvente hidrofóbico, tales como metanol u octanol, solventes que están totalmente parametrizados para su uso en la dinámica molecular, que favorezca o induzcan la adquisición de una conformación estructural del tipo alfa-helicoidal, necesaria para la formación de los poros o canales en las membranas bacterianas.

5.3.4.2. Estimación de la estructura secundaria de las de las Defensinas hBD11 y hBDcon por análisis de secuencia y espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC)

Las **Defensinas** son una familia de péptidos antimicrobianos distribuida en diferentes organismos eucariontes como hongos, plantas, insectos, y mamíferos (Ganz y Lehrer, 1994). Las **Defensinas** de mamíferos se clasifican en tres grupos **alfa-Defensinas**, **beta-Defensinas** y **teta-Defensinas**. Mientras que las **alfa-Defensinas** y **beta-Defensinas** se expresan constitutivamente en todos los mamíferos, las **teta-Defensinas** sólo se han reportado en el mono Rhesus, *Macaca mulatta*, (Bauer *et al.*, 2001). Diferentes estructuras de **Defensinas** han sido reportadas y de manera general, independientemente de su fuente estas están conformadas por dos o tres hojas beta estabilizadas por tres puentes disulfuro, en ocasiones pueden presentar un motivo estructural alfa-hélice en alguno de sus extremos. Nuestro interés en estudiar a las **beta-Defensinas** de origen humano radica en que por una parte estos péptidos son expresados de manera soluble en diferentes órganos y tejidos, y ejercen su actividad antimicrobiana sin mostrar ninguna actividad tóxica contra células eucariotas. Y por el otro lado, su estructura tridimensional es similar a las de las toxinas de alacrán, hebras beta estabilizadas por

múltiples puentes disulfuro, ampliamente estudiadas en nuestro laboratorio. Con la finalidad de determinar el grado de estructura secundaria presente en los péptidos tipo **beta-Defensina** hBD11 y hBDcon, se realizaron experimentos de DC. Los espectros de DC fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J-725 (Jasco, Japón). Los ensayos fueron realizados desde 260-190 nm en amortiguador de fosfatos (PBS 10 mM, pH 7.4) a temperatura ambiente (25°C), utilizando una celda de cuarzo de 1 mm, los datos fueron colectados a una velocidad de 100 nm/min. La concentración de los diferentes péptidos en estado oxidado fue de 40 µg/mL. En la figura 25 se muestran los espectros de DC obtenidos para cada péptido tipo **beta-Defensina**. Como se observa en la figura 25A la hBD11 muestra un perfil característico para un péptido constituido principalmente por hebras beta, mientras que la hBDcon muestra un perfil de DC correspondiente a una proteína alfa/beta.

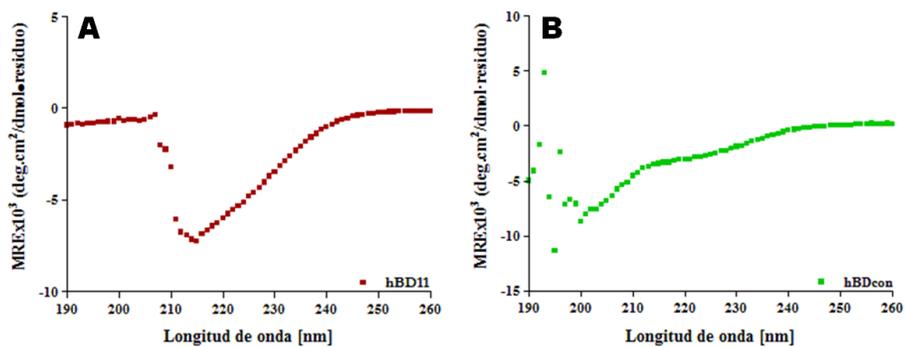


Figura 25. Experimentos de Dicroísmo Circular de las beta-Defensinas humanas evaluadas. A) beta-Defensina 11 (hBD11) y B. beta-Defensina consenso (hBDcon).

5.3.4.3. Estimación de la estructura secundaria de las de las Defensinas hBD11 y hBDcon por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Con la finalidad de determinar si la secuencia correspondiente a la hBD11 y la hBDcon mantenía un plegamiento similar al de las **beta-Defensinas** ya caracterizadas (hBD1-3), se decidió realizar experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Como primera aproximación para evaluar el

grado de estructura de las muestras de la hBD11 (0.7 mg) y la hBDcon (1.3 mg) se registraron diferentes espectros de ^1H RMN en primera dimensión (Varian Inova 600 MHz a diferentes pH y temperaturas). Para el caso de la hBD11 el espectro de ^1H RMN mostró una distribución de desplazamientos químicos diferente al de una proteína con un plegamiento correcto dado que, se observó la ausencia de señales definidas, además de que en las regiones aromáticas del campo bajo (9-10 ppm) y en la región correspondiente a carbonos alfa (5-6 ppm) no se observaron desplazamientos químicos, razón por la cual se decidió no continuar los experimentos de RMN sobre este péptido. Respecto a los espectros de ^1H -RMN realizados con la hBDcon, estos presentaron una distribución de desplazamientos químicos más uniforme y mejor definida, indicando que este péptido estaba mejor estructurado (Figura 26).

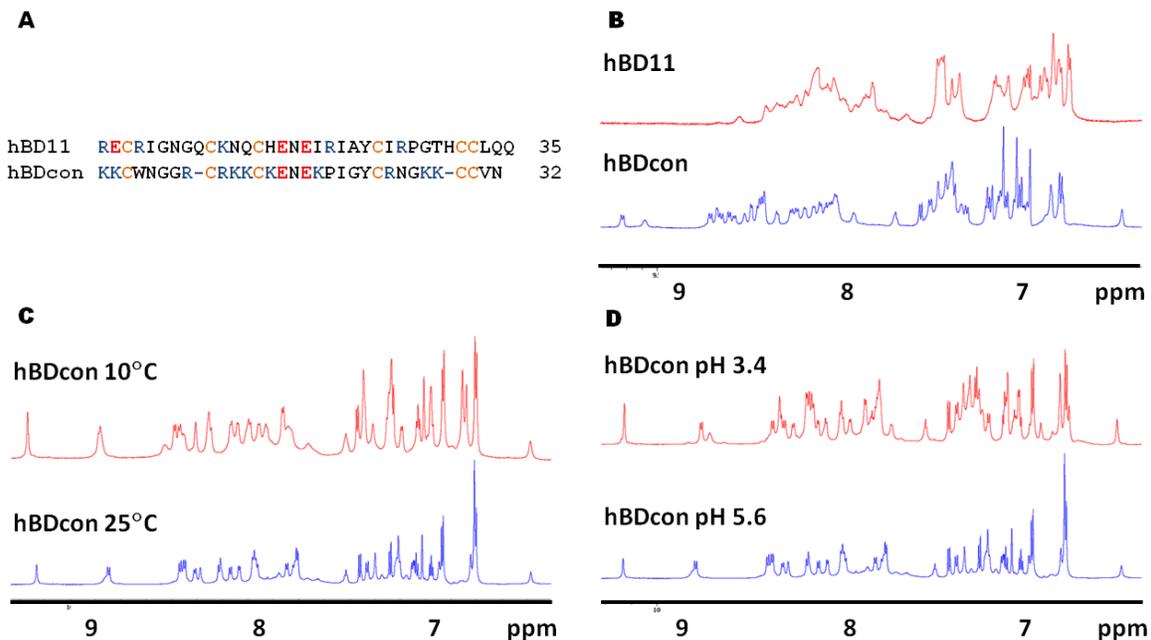


Figura 26. Espectros de los diferentes experimentos de 1D ^1H -NMR. A. Alineamiento de las secuencias de la hBD11 y la hBDcon, B. Comparación entre los espectros de la hBD11 y la hBDcon, C. Experimentos a diferentes temperaturas y D. experimentos a diferentes pH.

Posteriormente la distribución de desplazamientos químicos obtenida para la hBDcon obtenida a un pH de 3.4 y una temperatura de 25°C fue comparada con el de la **beta-Defensinas humana 2** (PDB:

1FQQ; Sawai *et al.*, 2001) y el de la **beta-Defensina humana 3** (PDB:1KJ6; Schibli *et al.*, 2002), únicas estructuras resueltas por RMN que aportaban las listas de desplazamientos asignados (Figura 27). Se observó que los desplazamientos obtenidos de los espectros ^1H -RMN de la hBDcon presentaban una distribución similar a la reportada para estos dos péptidos, indicando de manera preliminar que las muestras de la hBDcon, presentaban plegamiento tipo **beta-Defensina**, por lo que se continuó con su caracterización estructural mediante RMN en 2D.

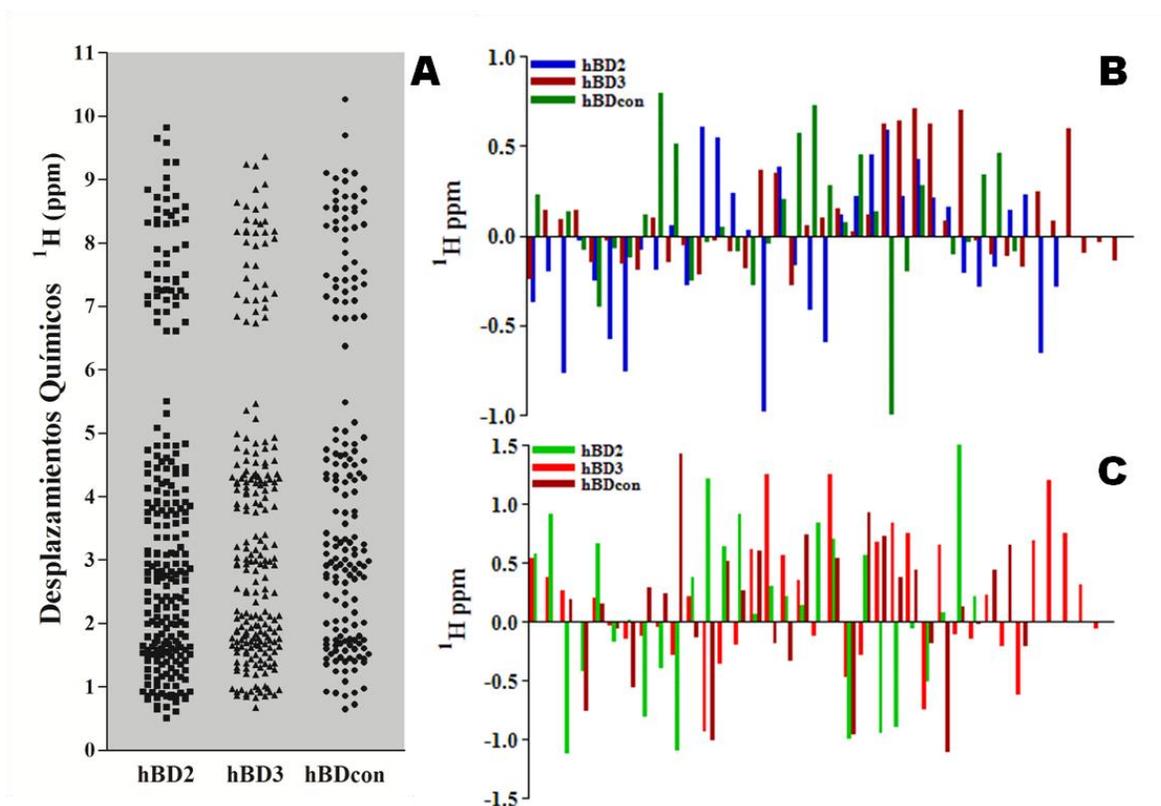


Figura 27. Comparación de los resultados obtenidos para la hBDcon y los reportados para hBD2 y hBD3. A. Distribución de los desplazamientos químicos reportados para la hBD2 y la hBD3 comparados obtenidos para la hBDcon. Diferencias entre los valores experimentales de la estructuras plegadas de la hBD2 y la hBD3 y los esperados para una estructura "random coil", B. protones unidos a carbono alfa (C^αH) y C. protones unidos al nitrógeno del enlace peptídico (NH).

5.3.4.3.1. Digestiones de la hBD11 con tripsina y experimentos de DC.

Dado que la hBD11 no presentaba una distribución de desplazamientos químicos que indicara un plegamiento similar al de los péptidos hBD2 y hBD3, se decidió realizar los experimentos en dos

dimensiones únicamente con la hBDcon. Sin embargo, se decidió inferir las posibles conectividades de los puentes disulfuro en esta molécula mediante digestiones con **Tripsina**. La hBD11 presenta dos residuos de Lisina y tres de Arginina, cinco posiciones de corte probables para la **Tripsina**, de manera inicial se determinaron las probabilidades de corte de la **Tripsina** mediante el software Peptide Cutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter/) (Figura 28) y se calcularon las masas resultantes de la proteólisis tomando en cuenta las 15 posibilidades de conexión entre las 6 cisteínas de la molécula. Una muestra de 20 µg de la hBD11 oxidada se incubó por espacio de una hora a 37 °C en presencia de tripsina posteriormente se inyectó la reacción a una columna de HPLC en fase reversa C₁₈ (gradiente lineal 0-60% de ACN + 0.1% TFA), los dos picos resultantes de la digestión fueron colectados y sus masas fueron determinadas mediante ESI-MS (Finnigan LCQ^{DUO} ion trap mass spectrometer, San José, California, EE.UU.). Las masas calculada fueron las siguientes 1,263.4 y 2,830.0 indicando que las cisteínas 1 y 2 están conectada y que las cisteínas 3, 4, 5 y 6 presentaran alguna de sus 6 posibilidades de conexión, en donde de darse el corte de la Arginina 26, reduciría las posibilidades de unión a cuatro posibilidades, la cisteína 3 unida a la cisteína 5 o 6 y la cuatro unida a las mismas cisteínas (Figura 28).

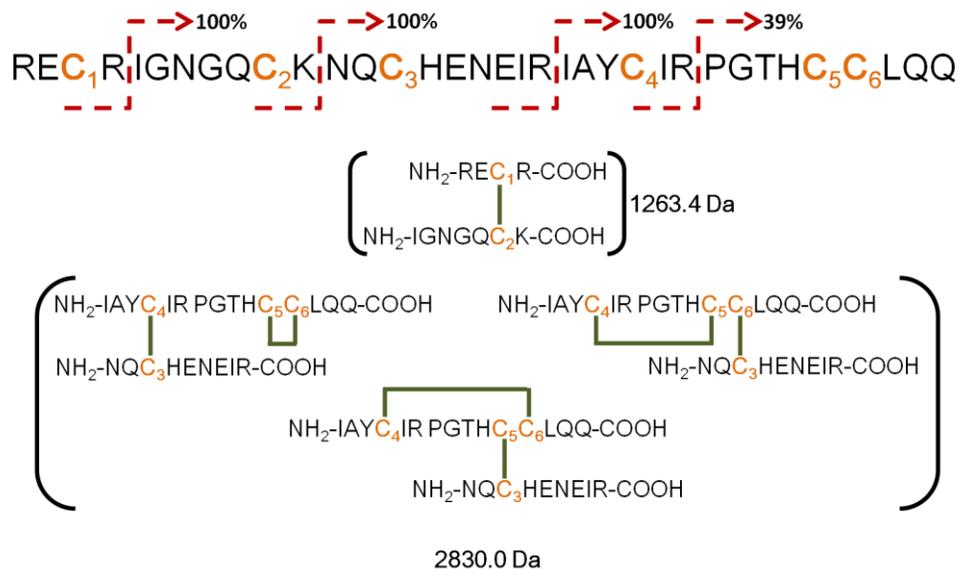


Figura 28. Digestión de la hBD11 oxidada con tripsina. A. Sitios de corte posibles, B. Fragmentos y conectividades posibles de acuerdo con las masas experimentales obtenidas.

5.3.4.3.2. Experimentos de RMN en dos dimensiones

Se realizaron diferentes experimentos tanto, homonucleares, (2D ^1H - ^1H) DQF-COSY, TOCSY y NOESY, como heteronucleares, ^1H - ^{15}N y ^1H - ^{13}C -HMQC. Los espectros fueron obtenidos a 600 y 800 MHz (espectrómetros Bruker Avance III 600 MHz y Bruker Avance 800 MHz), a 10 y 25°C, así como a 3.5 y 5.6 de pH. El patrón de desplazamientos químicos fue similar en todas las condiciones, sin embargo, a 10 °C la resolución de los desplazamientos químicos disminuyó y algunas señales se perdieron, por esta razón el "set" de datos obtenidos a 25 °C fue utilizado para iniciar la asignación secuencial de las señales de cada sistema de espín (aminoácido) que integra la molécula. El experimento heteronuclear ^1H - ^{15}C -HMQC, nos ayudó a estimar cuantos de los 31 sistemas de espín posibles podríamos observar, antes de iniciar su asignación con la ayuda de los experimentos de TOCSY y NOESY. En la figura 29 se observa es espectro correspondiente al experimento ^1H - ^{15}C -HMQC, en el cual solo podemos distinguir 26 señales de protones unidos al nitrógeno del enlace peptídico (NH).

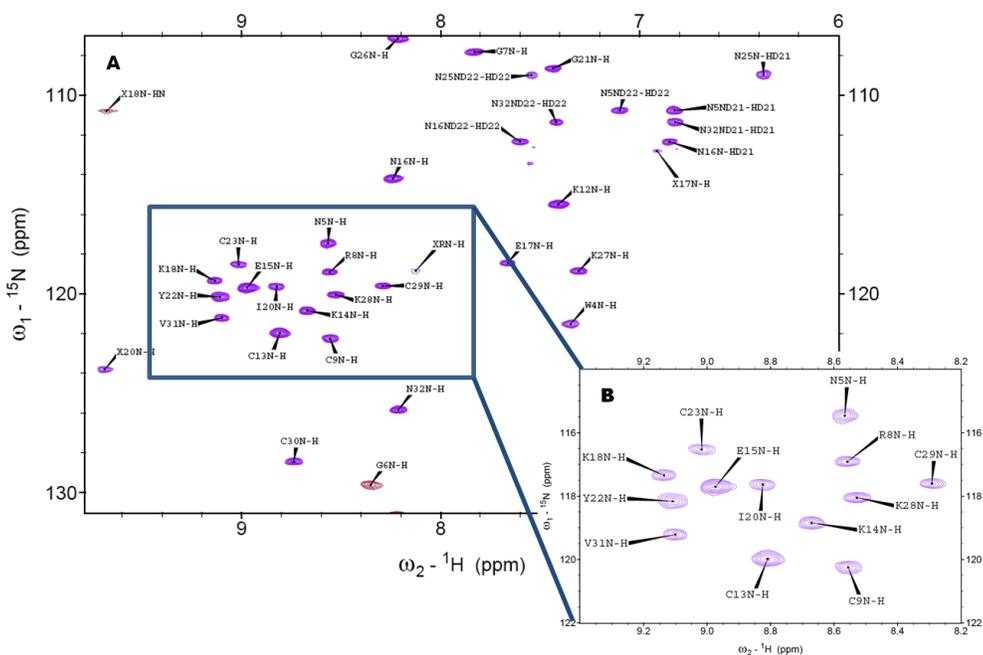


Figura 29. A. Espectro del experimento Heteronuclear 2D ^1H - ^{15}N -HMQC (5% $^2\text{H}_2\text{O}$, 1.3 mg, pH 5.6, 25 °C) (Bruker Avance III 600 MHz) B. Acercamiento al área de concentración de las señales NH.

La estrategia de asignación secuencial de los sistemas de espín comienza con el análisis de la secuencia primaria del péptido de interés para identificar aquellos aminoácidos únicos y las secuencias correspondientes a los dipéptidos y tripéptidos que se forman en torno a ellos. hBDcon es un péptido de 32 residuos, con cinco aminoácidos únicos en su secuencia (W3, P19, I20, Y22 y V31), y la presencia de tres puentes disulfuro, probablemente con una conectividad similar a la familia de **beta-Defensinas** de mamífero, Cys3-Cys29, Cys9-Cys23 y Cys13-Cys30. En la figura 30 ilustran los dipéptidos y tripéptidos únicos de la secuencia de la hBDcon.

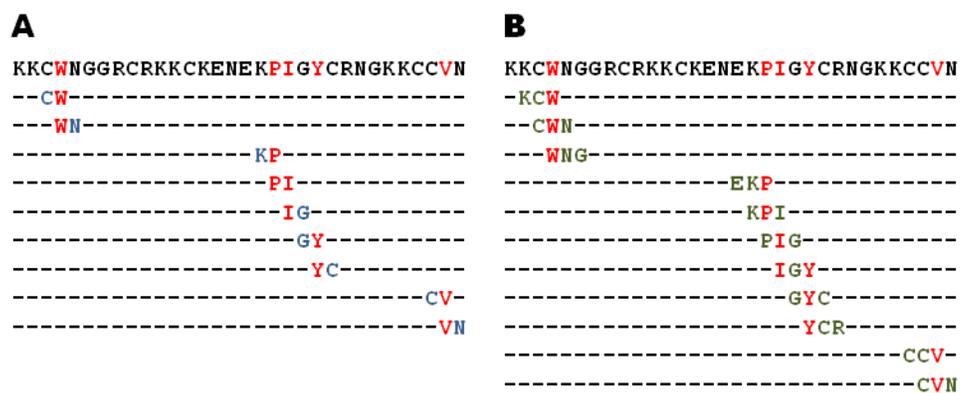


Figura 30. Análisis de la secuencia primaria de la hBDcon para su asignación secuencial. Los aminoácidos únicos en la secuencia se presentan en rojo. **A.** Dipéptidos generados por unión a los aminoácidos únicos y **B.** Tripéptidos generados por unión a los aminoácidos únicos.

Una vez identificados los aminoácidos únicos y sus di y tripéptidos, con la ayuda de los espectros obtenidos de los experimentos homonucleares ^1H - ^1H en 2D, DQF-COSY, TOCSY y NOESY, se inició la asignación secuencial de todos los sistemas de espín (aminoácidos) que comprenden a la hBDcon, y de las interacciones (NOEs) por vecindad en la secuencia y por cercanía en el plegamiento, los espectros sobrepuestos de NOESY/DQF-COSY y NOESY/TOCSY se ilustran en la figura 31. En la figura 32 se muestra la región en donde se agrupan las señales de protones unidos a carbono alfa ($\text{H}\alpha\text{C}$) del espectro correspondiente al experimento ^1H - ^1H -DQF COSY. De las 39 señales posibles, los

residuos de Glicina presentan dos señales por carbono alfa, solo pueden observarse 32 señales que podrían ser correlacionadas con los sistemas de espín.

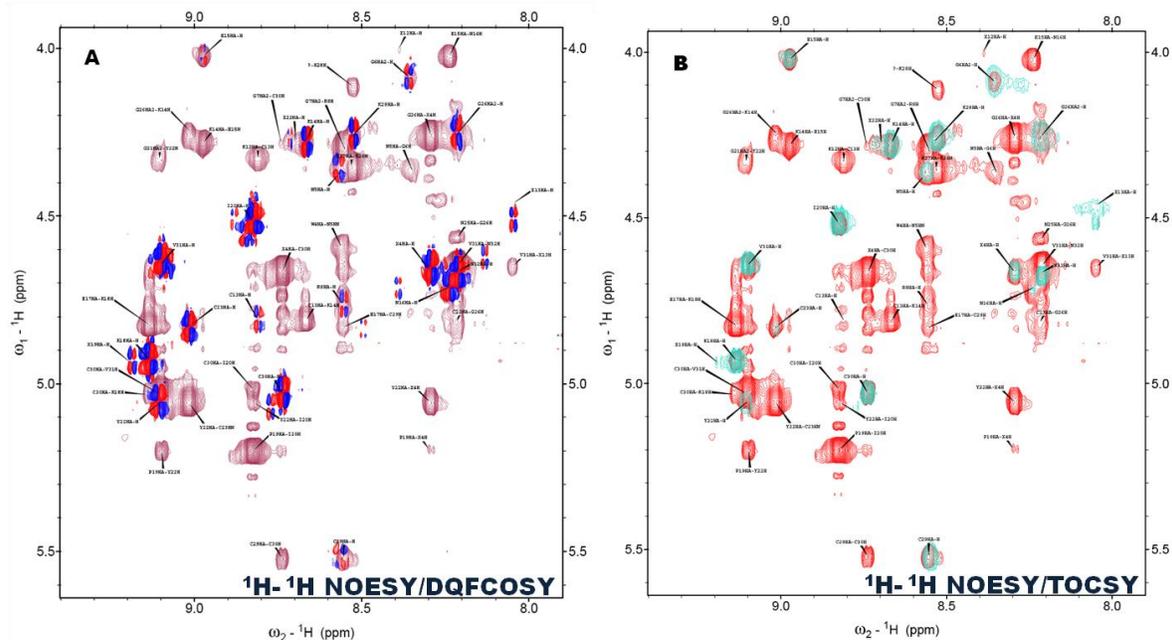


Figura 31. Espectros de la región de los protones unidos a carbono alfa de los experimentos de RMN en dos dimensiones. A. Comparación de los experimentos de ^1H - ^1H -DQF COSY y ^1H - ^1H -NOESY (Tiempo de mezclado, 200 ms). B. Comparación de los experimentos de ^1H - ^1H -TOCSY (Tiempo de mezclado, 120 ms) y ^1H - ^1H -NOESY (Tiempo de mezclado, 200 ms).

Tanto para proteínas, así como para los ácidos nucleicos, los enlaces de hidrógeno son elementos esenciales para la formación de su estructura secundaria, además participan en la estabilización de la estructura terciaria (Dingley *et al.*, 2001). Muchas propiedades correspondientes a los enlaces de hidrógeno han sido ampliamente estudiadas por una gran variedad de técnicas, como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Los acoplamientos escalares mediados por electrones solo permiten observar la conexión entre los dos lados correspondientes al enlace de hidrógeno, la RMN por medio de un experimento de COSY nos permite observar todos los elementos involucrados en un enlace de hidrógeno, el donador, el protón y el aceptor (Dingley *et al.*, 2001; Vuister y Bax, 1993).

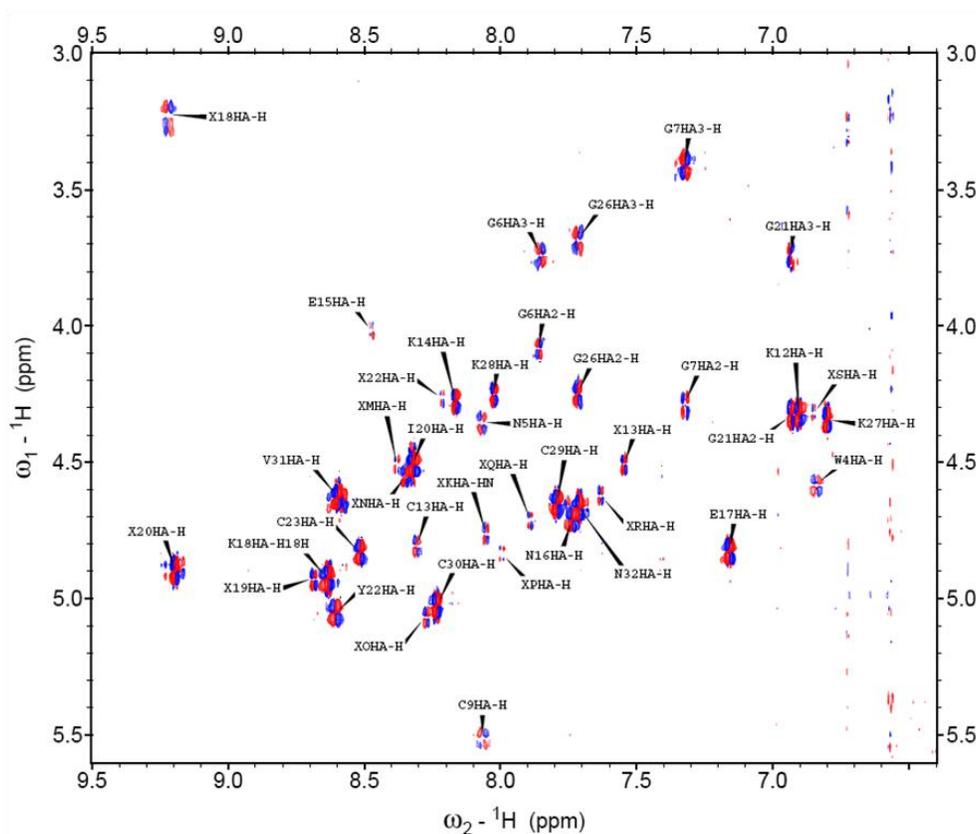


Figura 32. Espectro de la región de protones unidos a carbono alfa del experimento Homonuclear ^1H - ^1H -DQF COSY (5% $^2\text{H}_2\text{O}$, 1.3 mg, pH 5.6, 25 °C) (Bruker Avance III 600 MHz).

El valor de los acoplamientos (J) es influenciado por el arreglo geométrico de los núcleos involucrados en la formación del enlace de hidrógeno, por lo que el del valor de las constantes de acoplamiento puede ser relacionado con distancias y ángulos entre enlaces de hidrógeno. De manera general, en el caso de las constantes de acoplamiento de tercer orden (tres enlaces de distancia) entre el protón de la amida del enlace peptídico y el protón unido al carbono alfa ($^3J_{\text{NH-H}\alpha}$), cuando se observa un valor superior a 8 Hz indica una conformación de hebras beta y cuando es inferior a 4 Hz indica una conformación estructural de alfa-hélice (Rule y Hitchens, 2006; Wishart *et al.*, 1991). El experimento homonuclear ^1H - ^1H DQF-COSY fue utilizado para calcular las constantes de acoplamiento de tercer orden (tres enlaces de distancia) entre el protón de la amida del enlace peptídico y el protón unido al carbono alfa ($^3J_{\text{NH-H}\alpha}$) necesarias para el cálculo de los ángulos diedros (ψ , γ , φ) de los diferentes enlaces

peptídicos de la molécula de la hBDcon. Como se observa en la Tabla 20, la mayoría de los valores de las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ se encuentran en un rango entre 7-10 Hz, indicando la presencia de una estructura predominantemente conformada por hebras beta.

Tabla 20. Constantes de acoplamiento $^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ de los sistemas de espín de la hBDcon medidos de la región C α H del espectro correspondiente al experimento ^1H - ^1H -DQF COSY.

Sistema de espín	NH (ppm)	$^3J_{\text{NH-H}\alpha}$	Sistema de espín	NH (ppm)	$^3J_{\text{NH-H}\alpha}$	Sistema de espín	NH (ppm)	$^3J_{\text{NH-H}\alpha}$
Asn32	8.211	8.10	Asn16	8.238	8.24	X17	7.657	9.50
Val31	9.097	9.80	Glu15	8.974	-	X18	9.749	4.10
Cys30	8.733	8.89	Lys14	8.665	7.09	X19	9.187	9.54
Cys29	8.292	8.96	Cys13	8.808	5.17	X22	8.713	7.07
Lys28	8.524	8.25	Arg10	9.695	9.54	XM	8.881	-
Lys27	7.301	8.14	Cys9	8.566	9.39	XN	8.849	5.15
Gly26	8.217	8.10	Arg8	8.553	9.58	XO	8.774	3.88
Cys23	9.016	8.70	Gly7	7.823	6.43	XP	8.494	-
Tyr22	9.108	7.37	Gly6	8.360	6.28	XQ	8.390	8.58
Gly21	7.434	8.31	Asn5	8.567	9.39	XR	8.132	4.18
Ile20	8.824	10.14	Trp4	7.340	4.26	XS	7.350	7.55
Lys18	9.134	9.36	X13	8.046	7.58	XT	7.719	8.31

X Sistema de espín aun no identificado

Con ayuda de todos los espectros generados de los experimentos de RMN en dos dimensiones se logró asignar entre el 80-90% de los protones correspondientes a los aminoácidos de la secuencia de la hBDcon (Tabla 21), nos ha sido particularmente difícil asignar los protones correspondientes al gran número de residuos de Lisina presentes en la molécula, principalmente las Lisinas número 1 y 2, debido a su gran movilidad y ambientes químicos similares, lo cual genera desplazamientos químicos difusos o sobrelapados entre sí.

Con los protones asignados en los experimentos heteronucleares (^1H - ^{15}N -HMQC) y homonucleares (DQF-COSY, TOCSY y NOESY) se realizaron los primeros cálculos de la estructura tridimensional de la hBDcon con la ayuda de CYANA 2.1 como se observa en la figura 33A. El modelo estructural aun es muy burdo y viola muchas restricciones estructurales, por lo que para mejorar el modelo es necesario terminar las asignaciones de los sistemas de espín faltantes, así también se precisa aumentar en número de resonancias medidas para cada protón con la finalidad de disminuir los valores de las desviaciones entre las resonancias, por lo que será necesario asignar los espectros de todos los experimentos en 2D realizados, 10 y 25°C y los realizados a pH 3.4 y 5.6, pero con el avance actual se puede mapear la conformación estructural adoptada por la hBDcon, que indica la presencia de tres hebras beta y motivo

alfa-helicoidal en la región del extremo amino terminal (Figuras 33B y 33C) similar a la conformación estructural de la hBD3. Sin embargo, el patrón de puentes disulfuro no corresponde con el reportado para las **beta-Defensinas** Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 y Cys3-Cys6 (Figura 33D).

Tabla 21. Lista de las asignaciones para cada sistema de espín perteneciente a la hBDcon identificado.

Residuo	NH	N	α H	Bh	Otros
Asn32	8.212	125.843	4.676	2.785,2.713	H δ :7.412,6.822
Val31	9.095	121.217	4.642	2.170	Hy:0.932,0.903
Cys30	8.737	128.442	5.027	2.928,2.836	-
Cys29	8.293	119.606	4.664	2.448,2.369	-
Lys28	8.528	120.051	4.262	1.733,1.477	Hy:1.258,H δ :1.429,He:3.083,NH:NA
Lys27	7.801	118.858	5.617	1.731,1.679	Hy:1.086,H δ :1.411,He:2.916,NH:NA
Gly26	8.217	107.148	4.258,3.694	-	-
Asn25	NA	NA	4.565	3.175,2.879	H δ :7.546,6.371
Arg24	NA	NA	NA	NA	NA
Cys23	9.011	118.528	4.648	2.357,3.272	-
Tyr22	9.101	120.161	5.064	3.161,2.731	H δ :7.068,He:6.812
Gly21	7.434	108.655	4.330,3.748	-	-
Ile20	8.826	119.636	4.516	1.969,1.969	Hy:0.981,0.848,Hy1=0.720,H δ :0.684
Pro19	-	-	5.195	2.294,2.049	Hy:2.006,H δ :NA
Lys18	9.133	119.342	4.931	1.754,1.677	Hy:1.385,1.344,H δ :1.603,He:2.894,NH:NA
Glu17	NA	NA	NA	NA	NA
Asn16	8.242	114.206	4.719	3.105,2.771	H δ :7.598, 6.845
Glu15	8.975	119.702	4.024	2.039	Hy:2.361
Lys14	8.661	120.848	4.285	2.006	Hy:1.439,H δ :1.658,He=2.936,H ζ :NA
Cys13	8.808	121.984	4.812	3.222,2.639	-
Lys12	7.399	115.498	4.328	-	Hy:NA,H δ :NA,He:3.005,H ζ :NA
Lys11	NA	NA	NA	NA	NA
Arg10	9.696	123.816	4.896	1.799,1.514	Hy:1.242,H δ :1.431*,He:3.244,H ζ :NA
Cys9	8.556	122.248	5.524	2.952,2.744	-
Arg8	8.560	118.911	4.361	1.710,1.633	Hy:1.574,H δ :3.383,3.149,He:NA
Gly7	7.827	107.826	4.298,3.418	-	-
Gly6	8.354	105.605	4.089,3.750	-	-
Ans5	8.557	117.463	4.363	2.923,2.484	H δ :7.092,6.813
Trp4	7.354	121.516	5.593	3.320,3.268	H2:7.228,H4:7.718,H5:7.157,H6:7.278,H7:7.478,He1:10.26
Cys3	NA	NA	NA	NA	-
Lys2	NA	NA	NA	NA	NA
Lys1	-	-	4.586	1.905,1.736	Hy:1.473,1.399,H δ :1.644,He:2.932,H ζ :NA
X8 (Arg)	7.407	NA	4.327	1.669,1.446	Hy:1.391,H δ =3.006,He:NA
X12(Cys)	8.391	NA	4.005*	2.745,2.038	-
X13(Cys)	8.054	NA	4.511	2.745,2.038	-
X17(Lys)	7.663	NA	4.826	1.870,1.603	Hy:2.206,2.156
X18	9.722	NA	3.242	-	-
X19	9.182	NA	4.939	-	-

NA=No Asignado; *= Desplazamiento químico no claro; La nomenclatura de los protones en cada uno de los aminoácidos de acuerdo con la IUPAC se representa en el Anexo 6.

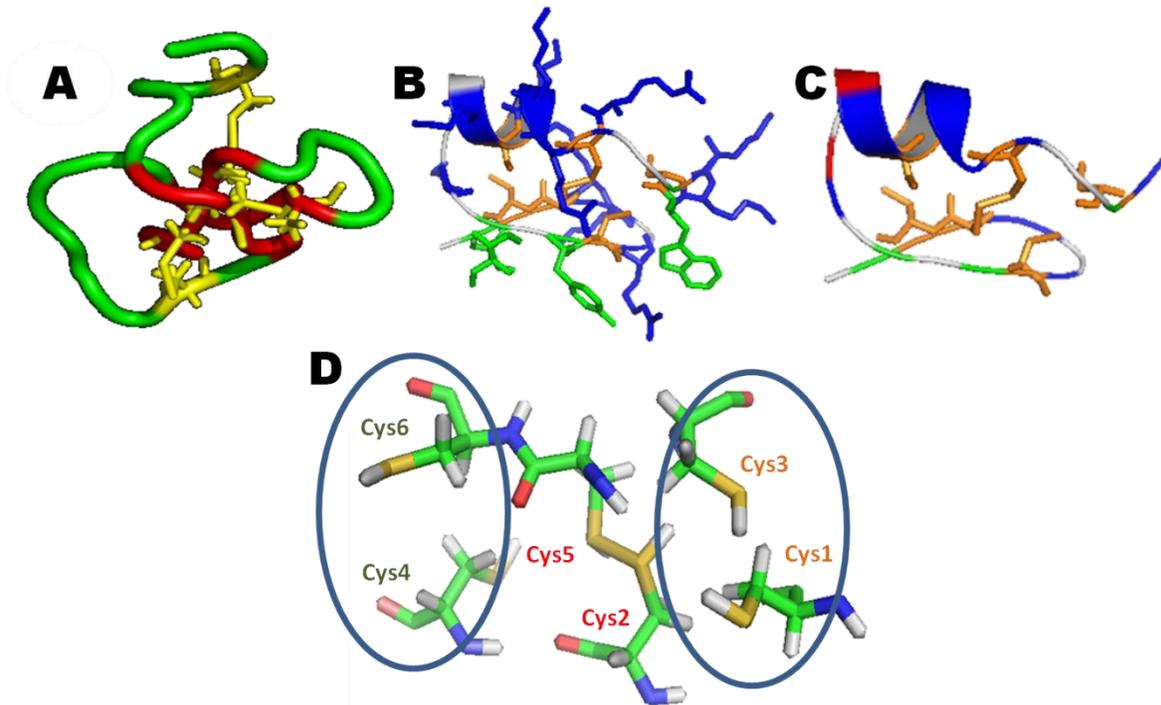


Figura 33. Modelos estructurales de la hBDcon. A. Primer estructura calculada con CYANA 2.1, B y C Modelos estructurales construidos en el servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), optimizado en MAESTRO y minimizado con PELE. D. Patrón de puentes disulfuro probable (C1³-C3¹³, C2⁹-C5²⁹ y C4²³-C6³⁰, los superíndices indican su posición en la secuencia primaria de la hBDcon).

Dado que el patrón de conectividades inferido de los datos de RMN y los modelos estructurales para la hBDcon no correspondió al esperado para un péptido de la familia de las **beta-Defensinas**, se decidió investigar si el patrón obtenido correspondía con el de alguno de los reportados para péptidos de la familia de las **Defensinas**, para realizar esta comparación se seleccionaron todos los péptidos de la familia de la **Defensinas** que tenían una estructura tridimensional reportada por difracción de rayos X o RMN, con la ayuda de la base de datos "Defensin Knowledgebase" (<http://defensins.bii.a-star.edu.sg/>). En la tabla 22 se enumeran los diferentes péptidos pertenecientes a la familia de las **Defensinas**, ordenadas de acuerdo a su origen, vertebrados, invertebrados, plantas y hongos, sin embargo, al comparar el patrón reportado para todos estos péptidos con los inferidos para la hBDcon

no se observó ninguna similitud. Las estructuras de las diferentes **Defensinas** están representadas en el Anexo 7.

Tabla 22. Patrón de puentes disulfuro reportado para Defensinas de diversas fuentes.

	Tipo de Péptidos	Ejemplos [§]	UniProtKB ID:	Fuente	Patrón de puentes disulfuro	
		hBDcon	-	Sintética	C1-C3, C2-C5, C4-C6	
Vertebrados	Mamíferos					
	α -Defensinas	DEFA2	P59665	Humano	C1-C6, C2-C4, C3-C5	
		DEFA3	P59666	Humano		
		DEFA4	P12838	Humano		
		DEFA5	Q01523	Humano		
		DEFA6	Q01524	Humano		
		Cryptidin 4	P28311	Ratón		
		RK-1	P81655	Conejo		
	β -Defensinas	DEFB1	P60022	Humano	C1-C5, C2-C4, C3-C6	
		DEFB2	O15263	Humano		
		DEF103A	P81534	Humano		
		DEFB12	P46171	Bovina		
		Defb7	Q91V70	Ratón		
		Defb8	Q91V82	Ratón		
	θ -Defensinas	RTD-1	P82271	Mono Rhesus	C1, C2-C3	
		Aves				
		β -Defensinas	Sphe-2	P83430	Pingüino Emperador	C1-C6, C2-C4, C3-C5
	Invertebrados	Insectos				
			Heliomicina	P81544	Polilla del tabaco	C1-C4, C2-C5, C3-C6
			ARD-1	P84156	Mariposa alas de hoja	
		Phormicina	P10891	Moscardón negro		
		DEF1	Q17027	Mosquito de la malaria		
		Sapccina	P18313	Mosca de la carne		
		Termicina	P82321	Termita		
		Protactiamycina	-	Escarabajo		
		Drosomicina	P41964	Mosca de la fruta	C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7	
		Quelicerados				
		Defensina grande	P80957	Cangrejo herradura	C1-C5, C2-C4, C3-C6	
		Moluscos				
		MGD-1	P80571	Mejillón del Mediterráneo	C1-C5, C2-C6, C3-C7, C4-C8	
	Dg-def	Q4GWV4	Ostra de Pacífico	C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7		
Plantas	Brasicáceas					
		RsAFP-1	P69241	Rábano	C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7	
		Fabáceas				
		Psd-1	P81929	Chícharo de jardín	C1-C6, C2-C5, C3-C7, C4-C8	
		VrD-1	Q6T418	Frijol chino	C1-C4, C2-C5, C3-C6	
		Solanáceas				
		PhD-1	Q8H6Q1	Petunia	C1-C4, C2-C5, C3-C6	
		NaD-1	Q8GTM0	Tabaco	C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7	
	Hongos	Ascomicetos				
			Plectasina	Q53106	Hongo taza de ébano	C1-C4, C2-C5, C3-C6

(§) Los ejemplos fueron obtenidos de la base de datos Defensins Knowledgebase (<http://defensins.bii.a-star.edu.sg/>), se presentan solo péptidos con estructura resuelta experimentalmente por cristalografía de Rayos X o Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

5.4. Diseño y caracterización de variantes cortas inspiradas en Pin2 [P14G] y Pin2 [P14GPG]

5.4.1. Estrategia de diseño

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con las variantes de Pin2 se decidió generar nuevas variantes inspiradas en Pin2 [P14G] y Pin2 [P14GPG] modificando dos nuevos factores, la carga neta de los péptidos y su longitud, anteriormente se mencionó que una de las limitantes más importantes a solventar para lograr la aprobación de los péptidos antimicrobianos como terapéuticos es su costo de producción (Giuliani *et al.*, 2007; Marr *et al.*, 2006; Vlieghe *et al.*, 2010), por lo que en este reporte se decidió generar variantes cortas aprovechando el bajo perfil hemolítico presentado con la variante Pin2 [P14GPG] y que la variante Pin2 [P14G] presentó actividades antimicrobianas y hemolíticas mayores que el péptido parental Pin2. Como primera aproximación del diseño se cambió el residuo Ácido aspártico en la posición 24 por un residuo de Lisina con la finalidad de aumentar la carga neta de los nuevos péptidos de +3 a +5, diferentes reportes indican que el aumento de la carga genera incrementos en la actividad antimicrobiana (Dathe *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Yeaman y Yount, 2003). Como segunda parte del diseño se disminuyó el tamaño de los péptidos eliminando los residuos menos relacionados con la actividad antimicrobiana, principalmente Serinas y Alaninas, manteniendo el carácter anfipático de las moléculas, disminuyendo su hidrofobicidad y aumentando su flexibilidad. Se generaron dos variantes una de 14 aminoácidos la cual mantiene un residuo de Glicina cercano a su posición media y otra variante de 17 aminoácidos la cual presenta el triplete GPG (Figura 34). Con la finalidad de identificar péptidos con una secuencia similar a la de nuestras variantes cortas de Pin2 reportados con actividad antimicrobiana, se realizó una búsqueda en la base de datos de péptidos antimicrobianos APD2. Arrojando como resultado la comparación con las secuencias de los 1,800 diferentes péptidos antimicrobianos caracterizados depositados en esta base de datos, las cinco secuencias con porcentajes de similitud de aminoácidos más alto para cada variante. Como se observa en la tabla 23 las variantes cortas generadas presentaron valores cercanos al 50% de similitud con el

péptido parental Pin2 y otros péptidos antimicrobianos, naturales y sintéticos, con actividades antimicrobianas probadas, indicando que las secuencias generadas de nuestro diseño resultaron novedosas y presentaban amplias posibilidades para presentar actividades antimicrobianas. Por lo que se decidió realizar su síntesis química en fase sólida para su posterior caracterización biológica.

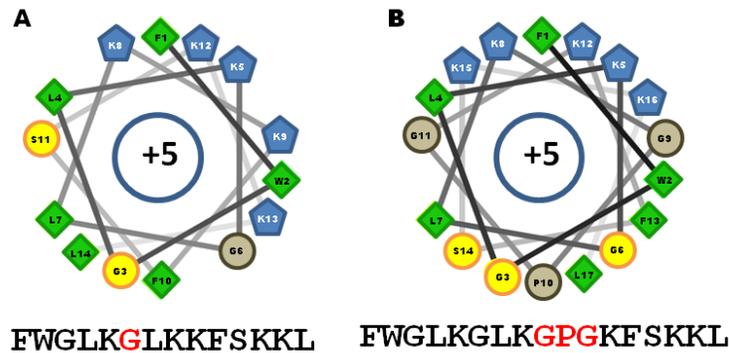


Figura 34. Representación de alfa-hélice de las variantes cortas de Pin2. A. Pin2 [14aa] y B. Pin2 [17aa].

Tabla 23. Alineamiento de las secuencias de Pin2 [14aa] y Pin2 [17aa] con otros péptidos antimicrobianos de actividad biológica caracterizada.

Péptido	UniProtKB ID	Origen	Secuencia	No. AA	%Sim	Q
Pin2 [14aa]	-	Sintético	-FWG-----LKGLKKFS---KKL----	14	-	+5
Pin2	P83240	Escorpión	-FWGALARGALKLIPSLF---SSFSKKD	24	50.0	+3
CE-MA[§]	-	Sintético	-KWK-----LFKKIKFLHSAKKF----	17	47.4	+7
Macropina 1	-	Abeja	---G-----FGMALKLL---KKVL----	13	47.1	+3
Mastoparam	P69034	Avispa	INW-----LKLGGKMM---SAL----	14	47.1	+3
Japonicina 1	B3VZU2	Rana	-FFP-----LALLCKVF---KKC----	14	46.7	+3
			: :			
Pin2 [17aa]	-	Sintético	-FWG-LKG-----L-KGPGKFSKKL	17	-	+5
Pin2	P83240	Escorpión	-FWGALARGALKLIPSLFSSFSKKD	24	54.2	+3
Ponicicina W5	P82427	Hormiga	-FWGALIKGAALKLIPSVVGLFKKKQ	24	50.0	+5
NRC-15	-	Pez	GFWGKLFK----LGLHGIGLLHLHL	21	47.6	+2
Brevinina 1A	-	Rana	-FLPILAGLAAKLVPKVFCSITKCC	24	44.0	+4
Maxinina H39	Q58T55	Sapo	-ILGPVLG----LVGNALGGLIKKL	20	42.9	+2
			: : : :			

(:) Cambio equivalente; (.) Cambio opuesto.

(No. AA) Número de aminoácidos del péptido maduro; (%Sim) Porcentaje de similitud; (Q) Carga neta.

(§) Híbrido de Cecropina A (residuos del 1-8) y Magainina (residuos del 4-12).

5.4.2. Purificación de las variantes cortas de Pin2

La síntesis química y la purificación de estos péptidos se realizó bajo las mismas condiciones utilizadas para los péptidos evaluados anteriormente, observándose tiempos de retención en la columna de intercambio hidrofóbico C₁₈ durante su purificación por HPLC de 19 minutos para la variante de 14 aminoácidos, Pin2 [14aa] y de 17 minutos para la variante de 17 aminoácidos, Pin2 [17aa], estos péptidos presentan tiempos de retención menores a los de las variantes de Pin2 caracterizadas previamente, indicando que su hidrofobicidad es menor (Figura 35). Posteriormente a su purificación las actividades antimicrobianas y hemolíticas de los péptidos Pin2 [14aa] y Pin2 [17aa] fueron ensayadas y comparadas con las de los péptidos alfa-lineales caracterizados anteriormente.

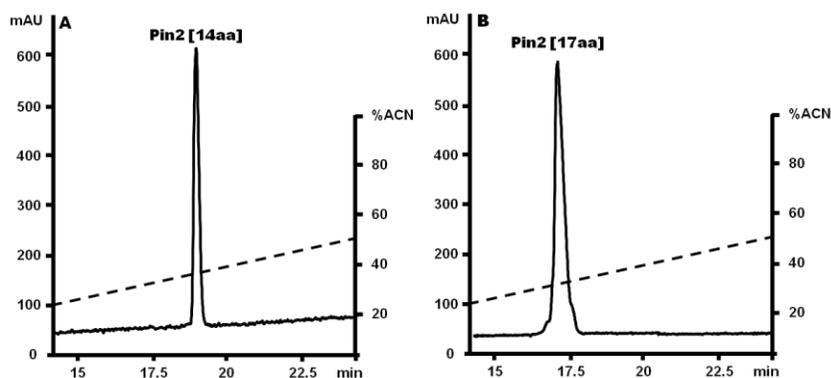


Figura 35. Purificación de las variantes cortas de Pin2 mediante HPLC (Varian, modelo 335), columna analítica C₁₈ en fase reversa (4.6x250mm, Nacalai Tesque, Japón). A. Pin2 [14aa] y B. Pin2 [17aa].

5.4.3. Ensayos de actividad biológica

5.4.3.1. Ensayo de actividad antimicrobiana en difusión agar de las variantes cortas de Pin2

La actividad antimicrobiana de las variantes cortas de Pin2 fue evaluada inicialmente mediante ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano en medio sólido, agar Mueller-Hinton, tal como se realizó con las variantes de Pin2 evaluadas previamente, sin embargo, no fue posible observar halos claros de inhibición por este método. El incremento en la carga neta de las variantes cortas pudo generar la ausencia de halos de inhibición observada en este ensayo, por lo que se sugirió que al igual que para el caso de los antibióticos con gran concentración de cargas positivas y las **beta-Defensinas**, la fuerza

iónica del agar Mueller-Hinton interfería con la acción antimicrobiana de estos péptidos, indicando que este medio de cultivo no era el adecuado para su caracterización. Por lo que se decidió realizar los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de difusión, bajo las mismas condiciones utilizadas para la caracterización de las **beta-Defensinas hBD11** y **hBDcon**, utilizando medio Soya-Trypticase y agarosa de baja electroendosmosis, de acuerdo con las especificaciones de Lherer y colaboradores (1991). La actividad antimicrobiana de los péptidos Pin2 [14aa] y Pin2 [17aa] fue evaluada contra tres cepas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *S. aureus* ATCC 25923. Se observó que ambos péptidos presentan CMI (25 µM) menores contra *E. coli* ATCC 25922 cuando se comparo con las observadas contra *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *S. aureus* ATCC 25923, (100 y 300 µM para Pin2 [14aa] respectivamente), mientras que Pin2 [17aa] no presentó actividad contra *P. aeruginosa* ATCC 9027 y una CMI de 80 µM contra *S. aureus* ATCC 25923 (Tabla 24). Respecto a los valores de CMI, determinados mediante el método de Lherer y colaboradores (1991), para el péptido parental Pin2, estos se mantuvieron en 6.2 µM contra las tres cepas bacterianas ensayadas, valores de CMI menores a los determinados por el método convencional sobre agar Mueller-Hinton, sugiriendo que el método de difusión utilizando medio Soya-Trypticase y agarosa como agente solidificante es más sensible.

Tabla 24. Valores de CMI determinados para las variantes Pin2 [14aa] y Pin2 [17aa]

Péptido	Ensayo	CMI (µM)		
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
Pin2	Sólido	6.2	6.2	6.2
	Líquido	12.5	12.5	N.D.
Pin2 [P14G]	Sólido	25	12.5	50
	Líquido	12.5	12.5	N.D.
Pin2 [P14GPG]	Sólido	12.5	50	100.0
	Líquido	25		N.D.
Pin2 [14aa]	Sólido	25	>300	100
	Líquido	25	50	N.D.
Pin2 [17aa]	Sólido	25	80	N.A.
	Líquido	>25†	N.A.	N.D.

N.A. = No Actividad; N.D. = No determinado; † Bacteriostático; * 12.5 µM; § 100 µM

5.4.3.2. Ensayo de actividad antimicrobiana en dilución de las variantes cortas de Pin2

La actividad antimicrobiana de los péptidos Pin2 [14aa] y Pin2 [17aa] fue evaluada mediante la realización de cinéticas de inhibición del crecimiento bacteriano contra *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 (1×10^4 UFC/mL), preparando concentraciones decrecientes de los péptidos antimicrobianos liofilizados en concentraciones desde 25 hasta 1.6 μ M, utilizando como medio de cultivo caldo TSB, a bajas concentraciones, para minimizar el efecto de la fuerza iónica del medio de cultivo, y pH controlado (PBS, pH 7.4), de acuerdo con Lherer y colaboradores (2001). El seguimiento de las cinéticas de inhibición, se realizó midiendo el cambio de absorbancia (595 nm) en proporción del tiempo de incubación de los inóculos de bacterias, *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, en medio líquido en presencia y ausencia de los péptidos. Como se observa en la figura 36 el péptido Pin2 [17aa] solo presentó una actividad bacteriostática contra *E. coli* ATCC 25922 a la concentración máxima ensayada 25 μ M y no presentó inhibición del crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923. Por su parte la Pin2 [14aa] en los ensayos de inhibición por el método de dilución presentó una CMI de 25 μ M contra *E. coli* ATCC 25922, igual a la determinada por el método de difusión en agar, mientras que su CMI contra *S. aureus* ATCC 25923 fue de 50 μ M.

5.4.2.3. Ensayos de actividad hemolítica de las variantes cortas de Pin2 contra eritrocitos humanos

La actividad hemolítica de los péptidos Pin2 [14aa] y Pin2 [17aa] fue determinada en las mismas condiciones la de las variantes de Pin2 evaluadas anteriormente, mediante la incubación de suspensiones celulares de eritrocitos humanos (EH) con diluciones seriales de los péptidos a concentraciones desde 100 hasta 1.6 μ M. La concentración de EH utilizada fue aproximadamente 1×10^7 células por mililitro. Los EH fueron incubados a 37°C por espacio de una hora en presencia de las diferentes concentraciones de los péptidos antimicrobianos, una solución de Tritón X100 al 10%, agua desionizada, como testigos positivos de hemólisis, y PBS (10 mM, pH 7.4), como testigo negativo.

Posteriormente al periodo de incubación de una hora a 37 °C, las muestras fueron centrifugadas (14,000 rpm), se midió el registro de absorbancia del sobrenadante a 570 nm y se determinó el porcentaje de hemólisis de los péptidos, tomando como valor máximo de hemólisis el registro de DO_{570nm} observado en testigos positivos. Como se observa en la figura 37 la variante Pin2 [14aa] solo presentó un 20% de hemólisis a la máxima concentración utilizada 100 µM, aproximadamente 8 veces mayor a la concentración necesaria para que el péptido parental Pin2 ejerza su máximo efecto hemolítico, razón por la cual Pin2 [14aa] presentó valores de índice terapéutico de 16.7 para la inhibición de *E. coli* ATCC 25922 y de 8.4 para la inhibición *S. aureus* ATTC 25923.

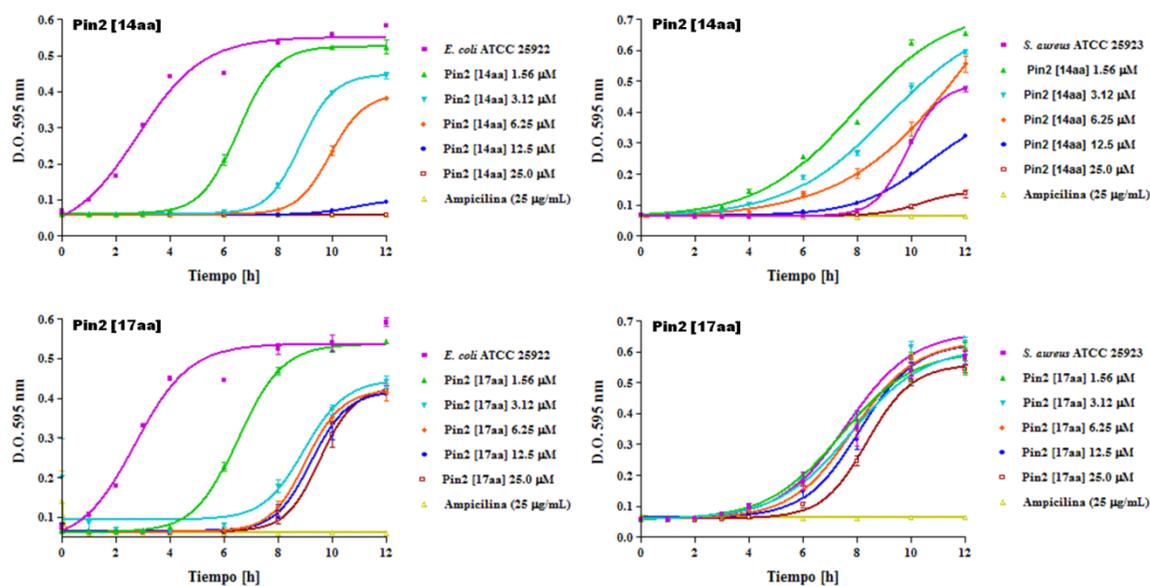


Figura 36. Ensayos de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 en presencia de diferentes concentraciones de las variantes cortas de Pin2 (37°C; DO_{595 nm}). Las barras representan la desviación estándar.

5.4.4. Estimación de la estructura secundaria de las variantes cortas de Pin2 mediante espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC) y modelos estructurales

Para determinar el grado de estructura secundaria de las variantes Pin2 [14aa] y Pin2 [17aa] se realizaron experimentos de dicroísmo circular. Los espectros de DC fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J-725 (Jasco, Japón). Los ensayos fueron realizados desde 260-190 nm en 60% de trifluoroetanol

(TFE), pH 7.1 a temperatura ambiente (25°C), utilizando una celda de cuarzo de 1 mm y los datos fueron colectados a una velocidad de 100 nm/min.

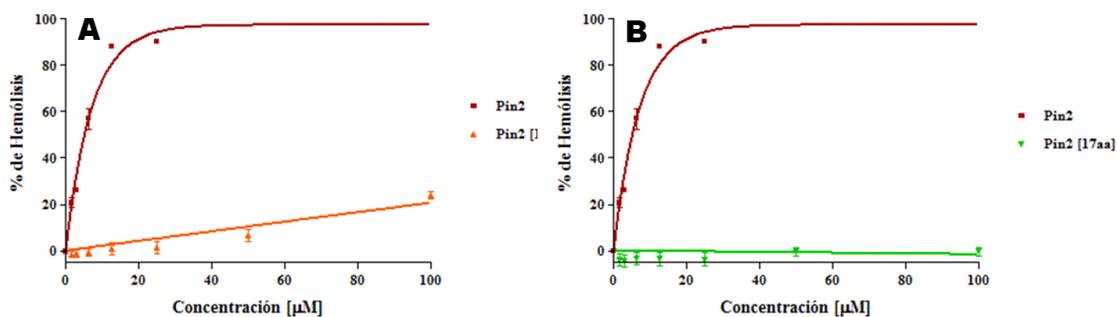


Figura 37. Ensayos de actividad hemolítica de las variantes cortas de Pin2. A. Pin2 [14aa] y Pin2 [17aa] B. Realizado en placas de 96 pozos contra eritrocitos humanos (1×10^7 EH/mL, incubación 1 h a 37 °C).

La concentración de los diferentes péptidos fue de 40 µg/mL. Como se observa en la figura 38A el péptido Pin2 [14aa] presenta una estructura alfa-helicoidal con la señales características a 208 y 222 nm, mientras que el péptido Pin2 [17aa] presenta un perfil de DC correspondiente a la ausencia de estructura (Figura 38B). Los valores promedio de tres corridas individuales de DC fueron utilizados para determinar el porcentaje de contenido de alfa-hélice presente en los péptidos mediante el uso del software K2d (Andrade *et al.*, 1993; Merelo *et al.*, 1994), resultando en un 100% de estructura alfa-hélice para el péptido Pin2 [14aa] y solo un 28% para Pin2 [17aa]. Por otro lado, se realizaron los modelos estructurales de las variantes con la ayuda de servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), y optimizándolos, en una caja de agua de 10 \AA^3 , con ayuda de paquete para modelado molecular Maestro versión para uso académico (<http://www.schrodinger.com>), posteriormente los modelos fueron minimizados utilizando PELE (Protein Energy Landscape Exploration, Borrelli *et al.*, 2005) a una temperatura hipotética de 5,000°C. Como se ilustra en la figura 38C los modelos estructurales correlacionan en gran medida con los datos obtenidos de los experimentos de DC, observándose el bajo grado de conformación secundaria del péptido Pin2 [17aa], el cual no presentó ningún efecto hemolítico, pero a su vez su actividad

antimicrobiana fue muy baja, confirmando que una disminución en el porcentaje de estructura disminuye el efecto hemolítico, pero a su vez indica que para el diseño de nuevas variantes deberá tenerse mayor cuidado de no disminuir el porcentaje de estructura a niveles que no permitan conservar la actividad antimicrobiana. La variante Pin2 [14aa], con la presencia de Glicina en su región central, mantuvo una actividad antimicrobiana en el mismo rango que el péptido parental contra *E. coli* ATCC 25922, pero menor en el caso de *S. aureus* ATCC 25923, sin duda, el resultado más relevante fue la disminución de la actividad hemolítica en esta variante. Por lo que Pin2 [14aa] podría utilizarse como andamiaje para nuevos diseños, dado que es una molécula pequeña y su costo de síntesis química se reduce comparado con el péptido parental Pin2.

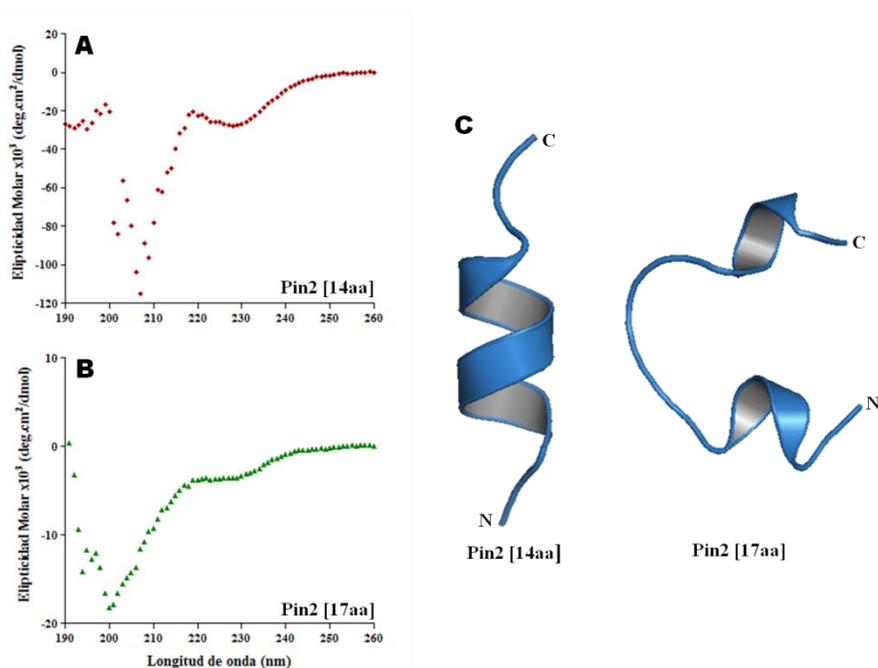


Figura 38. Experimentos de Dicroísmo Circular y modelos estructurales de las variantes cortas de Pin2. A. Pin2 [14aa], B. Pin2 [17aa] y C. modelos estructurales de las variantes generados con I-TASSER (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), optimizados y preparados en MAESTRO y minimizado con PELE.

Dentro de las posibles alternativas para mejorar las características es este péptido se comprendería la síntesis química de análogos con D-aminoácidos para favorecer su estabilidad a la degradación proteolítica (Besalle *et al.*, 1990; Hamamoto *et al.*, 2002), o la inserción de beta-aminoácidos, que

presentan dos carbonos entre el extremo carboxilo y el extremo amino permitiendo la unión del grupo R al segundo carbono (beta), que le otorga conformaciones estructurales diferentes a los péptidos compuestos por estas moléculas (Epand *et al.*, 2004; Godballe *et al.*, 2011; Porter *et al.*, 2000), además de la posible inserción de peptoides, moléculas que presentan el grupo R unido a la amina en lugar del carbono alfa, razón por la cual también son resistentes a la acción de proteasas (Brogden y Brogden, 2011; Rotem y Mor, 2009; Som *et al.*, 2008). Generando moléculas que mantengan las propiedades biológicas de Pin2 [14aa] pero mejorando su estabilidad.

6. Conclusiones

El trabajo realizado compara las actividades biológicas de péptidos antibióticos con dos andamiajes estructurales diferentes; por un lado los péptidos con estructura alfa-helicoidal y por el otro, los péptidos compuestos por hebras beta antiparalelas con la presencia de múltiples puentes disulfuro. Respecto a los péptidos con estructura alfa-lineal, se generaron variantes de la secuencia del péptido antimicrobiano y hemolítico Pin2, con sustituciones en el residuo Prolina 14, con la finalidad de reducir su actividad hemolítica. El cambio de la P14 por los motivos [GVG] ó [GPG] permitió disminuir el perfil hemolítico del péptido parental Pin2, sin alterar su actividad antimicrobiana en gran medida, observándose mayores índices terapéuticos en estas variantes y comprobando la importancia del motivo generado por la Prolina como modulador de las actividades hemolíticas en este tipo de péptidos antimicrobianos. La inserción de estos motivos estructurales disminuyó a la vez parámetros fisicoquímicos y estructurales como la anfipaticidad, la hidrofobicidad, la flexibilidad y la propensión a adoptar una conformación alfa-helicoidal, relacionados con la modulación de la actividad hemolítica de los péptidos antimicrobianos. Sin embargo, no se logró abatir por completo el efecto hemolítico, los datos experimentales indican la importancia de la primer Glicina del triplete para la disminución de la actividad hemolítica dado que las variante Pin2 [P14GV] no presentó una diferencia estadísticamente significativa respecto a la hemólisis generada por la variante Pin2 [P14GVG], pero su actividad hemolítica fue ligeramente mayor a la de la variante Pin2 [P14GPG]. La Prolina es un aminoácido con un índice de hidropaticidad menor (-1.6) al de la Valina (4.2), de acuerdo con la escala de Kyte y Doolittle (1982), por lo que una perspectiva para el diseño de nuevas variantes que permitan abatir en mayor grado la actividad hemolítica de Pin2 sería integrar el motivo GXG, donde X correspondería a un aminoácido más hidrofílico como Arginina (-4.5), Asparagina (-3.5), Glutamina (-3.5) o Lisina (-3.9), que modificarían la hidrofobicidad global, principal parámetro para la inserción no selectiva en membranas celulares, pero no para la interacción con los lipopolisacáridos de las membranas

bacterianas y su inserción selectiva en la membrana (Dathe y Wieprecht, 1999; Yeaman y Yount, 2003). Con ayuda de los parámetros fisicoquímicos que resultaron de mayor peso para modular la actividad hemolítica de Pin2 (flexibilidad, hidrofobicidad y anfipaticidad), además de las sustituciones de la P14 por Glicina, que permitió aumentar la actividad antimicrobiana y hemolítica de Pin2, y por el triplete GPG que logró disminuir la hemólisis en un 70% sin afectar la actividad antimicrobiana, se generaron dos nuevas variantes, en donde aunado a los parámetros anteriores, se incrementó la carga neta del péptido y se disminuyó el número de aminoácidos. La variante o nuevo péptido antimicrobiano de 14 aminoácidos, con la presencia de Glicina en su región central, mantuvo una actividad antimicrobiana en el mismo rango que el péptido parental Pin2, sin embargo, la actividad hemolítica se disminuyó ampliamente. Por otro lado la variante de 17 aminoácidos con la presencia del triplete GPG en su región central disminuyó su actividad antimicrobiana, pero a su vez ningún efecto hemolítico fue observado en los rangos de concentración probados. Con los resultados obtenidos de las variantes cortas de Pin2, se comprobó la importancia de la hidrofobicidad y la anfipaticidad como herramientas para el diseño de nuevos péptidos, además de que la disminución en el número de aminoácidos reduce los costos de producción de estos péptidos. Una perspectiva desprendida de estos resultados comprendería la síntesis química de análogos con D-aminoácidos para favorecer su estabilidad a la posible degradación proteolítica (Besalle *et al.*, 1990; Hamamoto *et al.*, 2000), o la inserción de beta-aminoácidos, que presentan dos carbonos entre el extremo carboxilo y el extremo amino permitiendo la unión del grupo R al segundo carbono (beta), otorgándole resistencia a la acción de proteasas a los péptidos compuestos por estas moléculas (Epanand *et al.*, 2004; Godballe *et al.*, 2011; Porter *et al.*, 2000), además de la posible inserción de peptoides, moléculas que presentan el grupo R unido a la amina en lugar del carbono alfa, razón por la cual también son resistentes a la acción de proteasas (Brogden y Brogden, 2011; Lienkamp *et al.*, 2011; Rotem y Mor; Som *et al.*, 2008). En lo referente a los péptidos con una conformación compuesta de hebras beta estabilizadas por múltiples puentes disulfuro, se

evaluaron péptidos de origen humano pertenecientes a la familia de las **beta-Defensinas**, estas moléculas se expresan de manera soluble en los diferentes organismos y además de su actividad antimicrobiana y antiviral, estos péptidos pueden estimular al sistema inmune mediante el reclutamiento de células de defensa como neutrófilos y macrófagos, sin presentar actividades tóxicas. En este trabajo se caracterizaron dos péptidos pertenecientes a esta familia la **beta-Defensina 11** (hBD11) de origen humano y la hBDcon originada de la secuencia consenso resultante del alineamiento de todas las **beta-Defensinas humanas** reportadas. Ambos péptidos no presentaron actividades hemolíticas contra EH, mientras que en los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de difusión estos péptidos presentaron actividades entre 12-25 μM , mientras que en los ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de dilución la hBD11 sólo presentó una actividad bacteriostática contra *E. coli* y una CMI contra *S. aureus* de 100 μM . Por su parte la hBDcon, a pesar de no mantener el patrón de puentes disulfuro clásico de las **beta-Defensinas**, mantiene actividades antimicrobianas en rangos similares a los observados contra bacterias Gram negativas, como *E. coli*, con las variantes alfa-lineales caracterizadas en este trabajo, sin presentar ningún efecto tóxico contra EH, por lo que este péptido podría ser un candidato potencial para desarrollar una aplicación terapéutica en el futuro. Como una perspectiva desprendida de estos resultados se plantea la evaluación de la actividad inmunomoduladora de la hBDcon, actividad que aunada a su actividad antimicrobiana aumentaría el potencial para el desarrollo de formulaciones antibacteriales con base en hBDcon. La secuencia de 32 aminoácidos de la hBDcon es la más corta reportada para un péptido tipo **Defensina** de origen humano, sin embargo, su costo de síntesis química sigue siendo elevado comparado con algunos péptidos alfa lineales reportados con secuencias entre 12-17 aminoácidos con actividades similares, por lo que sería importante establecer las condiciones para su expresión de manera recombinante. Los datos sobre estructura obtenida por RMN indican que la hBDcon presenta un motivo alfa-helicoidal en su región amino terminal al igual que la **beta-Defensina humana 3**, se ha reportado que

este motivo estructural presenta actividad antimicrobiana por sí mismo, por lo que otra posible alternativa para continuar con el estudio de la hBD con comprendería la síntesis química de este segmento alfa-helicoidal y su caracterización como agente antimicrobiano (Hoover *et al.*, 2003). Hasta el momento no existe mucha información reportada sobre como modular parámetros fisicoquímicos en los péptidos con andamiajes estructurales del tipo **beta-Defensina**, pero por su parte, los resultados experimentales obtenidos de la caracterización de variantes alfa helicoidales generadas a partir de la secuencia de la **Pandinina 2** en este trabajo, sugieren que este tipo de péptidos permiten la modificación y evaluación de los efectos de parámetros fisicoquímicos y estructurales, de una manera más sencilla, por lo que representan una alternativa para la realización de nuevos diseños que permitan mejorar el potencial de estas moléculas como agentes terapéuticos.

7. REFERENCIAS

- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jörvall, H., Wigzell, H. and Gudmundsson, G. H. (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. **96**,3086-93.
- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G. and Gudmundsson, G. H. (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**,195-99.
- Alanís, A. J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*. **36**,697-705.
- Almeida, M. S., Cabral, K. M. S., Kurtenbach, E., Almeida, F. C. L. and Valente, A. P. (2002). Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: Plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *The Journal of Molecular Biology*. **315**,749-57.
- Almeida, P. F. and Pokorny, A. (2009). Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: from kinetics to thermodynamics. *Biochemistry*. **48**,8083-93.
- Anderson, D., Terwilliger, T. C., Wickner, W. and Eisenberg, D. (1980). Melittin forms crystals which are suitable for high resolution X-ray structural analysis and which reveal a molecular 2-fold axis of symmetry. *Journal of Biological Chemistry*. **255**,2578-82.
- Andrade, M. A., Chacón, P. Merelo, J. J. and Morán, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. *Protein Engineering*. **6**,383-90.
- Andreu, D. and Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers*. **47**,415-33.
- Andreu, D., Ubach, J., Boman, A., Wahlin, B., Wade, D., Merrifield, R. B. and Boman, H. G. (1992). Shortened cecropin A-melittin hybrids, significant size reduction retains potent antibiotic activity. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **296**,190-4.
- Barbosa, T. M. and Levy, S. B. (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*. **3**,303-11.
- Barbosa, P., Perseghini, R., Nascimento, O., Franco, O. L. and Grossi-de-Sa, M. F. (2011). Antibacterial peptides from plants: What they are and how they probably work. *Biochemistry Research International*. **2011**,1-9.

- Bardají, E. (2011).** Marketing antimicrobial peptides: A critical academic point of view. In Castanho, M. and Santos, N. C. Eds. Peptide drug discovery and development: Translational research in academia and industry. Wiley-VCH, Verlag & Co. pp. 57-69.
- Barton, M. D. (2000).** Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*. **13**,279-99.
- Bauer, F., Schweimer, K., Kluver, E., Conejo-Garcia, J., Forssmann, W. G., Roesch, P., Adermann, K. and Sticht, H. (2001).** Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Science*. **10**,2470-9.
- Beggs, W. H. and Andrews, F. A. (1976).** Role of ionic strength in salt antagonism of aminoglycoside action on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Infectious Diseases*. **134**,500-4.
- Belokoneva, O. S., Satake, H., Mal'tseva, E. L., Pal'mina, N. P., Villegas, E., Nakajima, T. and Corzo, G., (2004).** Pore formation of phospholipid membranes by the action of two hemolytic arachnid peptides of different size. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1664**,182-8.
- Belokoneva, O. S., Villegas, E., Corzo, G., Dai, L. and Nakajima, T. (2003).** The hemolytic activity of six arachnid cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine to sphingomyelin ratio in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1617**,22-30.
- Bessalle, R., Kapitkovsky, A., Gorea, A., Shalit, I. and Fridkin, M. (1990).** All-D-magainin: Chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. **274**,151-5.
- Beutler, B. (2004).** Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*. **40**,845-59.
- Bhaskaran, R. and Ponnuswamy, P. K. (1988).** Positional flexibilities of amino acid residues in globular proteins. *International Journal of Peptide and Protein Research*. **32**,241-55.
- Blaha, G., Gurel, G., Schroeder, S. J., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2008).** Mutations outside the anisomycin binding site can make ribosomes drug-resistant. *Journal of Molecular Biology*. **379**,505-19.
- Blondelle, S. E. and Houghten, R. A. (1992).** Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochemistry*. **31**,12688-94.
- Böhm, G., Muhr, R. and Jaenicke, R. (1992).** Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering*. **5**,191-5.
- Borrelli, K. W., Vitalis, A., Alcantara, R. and Guallar, V. (2005).** PELE: Protein energy landscape exploration. A novel Monte Carlo based technique. *Journal of Chemical Theory and Computation*. **1**,1304-11.

- Brahmachary, M., Krishnan, S. P. T., Koh, J. L. Y., Khan, A. M., Seah, S. H., Tan, T. W., Brusic, V. and Bajic, V. B. (2004). ANTIMIC: A database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Research*. **32**,D586-9.
- Brahmachary, M., Schönbach, C., Yang, L., Huang, E., Tan, S. L., Chowdhary, R., Krishnan, S. P. T., Lin, C. -Y., Hume, D. A., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y. and Bajic, V. B. (2006). Computational promoter analysis of mouse, rat and human antimicrobial peptide-coding genes. *BMC Microbiology*. **7**,S8.
- Brodersen, D. E., Clemons, W. M. Jr., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. and Ramakrishnan, V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*. **103**,1143-54.
- Brogden, N. K. and Brogden, K. A. (2011). Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents*. **38**,217-25.
- Brown, J. R., Gentry, D., Becker, J. A., Ingraham, K., Holmes, D. J. and Stanhopel, M. J. (2003). Horizontal transfer of drug-resistant aminoacyl-transfer-RNA synthetases of anthrax and Gram-positive pathogens. *Nature, EMBO reports*. **4**,692-8.
- Bugg, T. D. H., Braddick, D., Christopher G., Dowson, C. G. and Roper, D. I. (2011). Bacterial cell wall assembly: Still an attractive antibacterial target. *Trends in Biotechnology*. **29**,167-73.
- Bugg, T. D. H., Wright, G. D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin. P. and Walsh, C. T. (1991). Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*, BM4147: Biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry*. **30**,10408-15.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. -L. and Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*. **23**,329-44.
- Bulet, P., Stöcklin, R. and Menin, L. (2004). Antimicrobial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*. **198**,169-84.
- Bulkley, D., Innis, C. A., Blaha, G. and Steitz, T. A. (2010). Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**,17158-63.
- Butaye, P., Devriese, L. A. and Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on Gram positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. **16**,175-88.
- Bywater, R. P., Thomas, D. and Vriend, G. (2001). A sequence and structural study of transmembrane helices. *Journal of Computational-Aided Molecular Desing*. **15**,533-52.

- Calderón, C. B. and Sabundayo, B. P. (2007). Antimicrobial classifications: Drugs for bugs. In Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A. C. Eds. Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC Press. Taylor & Frances Group. pp. 7-52.
- Chandrapati, S. and O'Sullivan, D. J. (1998). Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Biotechnology*. **63**,229-33.
- Chang, T. L. and Klotman, M. E. (2004). Defensins: Natural anti-HIV peptides. *AIDS Reviews*. **6**,161-8.
- Chattopadhyay, S., Sinha, N. K., Banerjee, S., Roy, D., Chattopadhyay, D. and Roy, S. (2006). Small cationic protein from a marine turtle has β -defensin-like fold and antibacterial and antiviral activity. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. **64**,524-31.
- Chen, C. R., Malik, M., Snyder, M. and Drlica, K. (1996). DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: Quinolone-induced DNA cleavage. *Journal of Molecular Biology*. **258**,627-37.
- Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R. B. and Mauzerall, D. (1988). Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **85**,5072-6.
- Chu, D. W., Plattner, J. J. and Katz, L. (1996). New directions in antibacterial research. *Journal of Medicinal Chemistry*. **39**,3853-74.
- Chugh, J. K. and Wallace, B. A. (2001). Peptaibols: Models for ion channels. *Biochemical Society Transactions*. **29**,565-70.
- Cirioni, O., Giacometti, A., Ghiselli, R., Dell'Acqua, G., Gov, Y., Kamysz, W., Lukasiak, J., Mocchegiani, F., Orlando, F., D'Amato, G., Balaban, N., Saba, V. and Scalise, G. (2003). Prophylactic efficacy of topical temporin A and RNAIII-inhibiting peptide in a subcutaneous rat pouch model of graft infection attributable to Staphylococci with intermediate resistance to glycopeptides. *Circulation*. **108**,767-71.
- Cole, A. M. and Ganz, T. (2000). Human antimicrobial peptides: Analysis and application. *Biotechniques*. **29**,822-31.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. and Deleage G. (2000). NPS@: Network protein sequence analysis. *Trends in Biochemical Sciences*. **29**,147-50.
- Concannon, S. P., Crowe, T. D., Abercrombie, J. J., Molina, C. M., Hou, P., Sukumaran, D. K., Raj, P. A. and Leung, K. P. (2003). Susceptibility of oral bacteria to an antimicrobial decapeptide. *Journal of Medicinal Microbiology*. **52**,1083-93.

- Conly, J. (1998). Controlling antibiotic resistance by quelling the epidemic of overuse and misuse of antibiotics. *Canadian Family Physician*. **44**,1769-73.
- Cordes, F. S., Bright, J. N. and Sansom, M. S. P. (2002). Proline-induced distortions of transmembrane helices. *Journal of Molecular Biology*. **323**,951-60.
- Cordiés, L., Machado, L. A. y Hamilton, M. L. (1998a). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*. **8**,13-27.
- Cordiés, L., Machado, L. A. y Hamilton, M. L. (1998b). Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Médica*. **8**,58-65.
- Cornet, B., Bonmatin, J. M., Hetru, C., Hoffmann, J. A. and Vovelle, F. (1995). Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure*. **3**,435-48.
- Corzo, G., Escoubas, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Kristensen, C.P. and Nakajima, T. (2000). Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-palutoxins IT, novel insecticide toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). *European Journal of Biochemistry*. **18**,5783-95.
- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S. and Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochemical Journal*. **359**,35-45.
- Corzo, G., Villegas, E., Gómez-Lagunas, F., Possani, L. D., Belokoneva, O. S. and Nakajima, T. (2002). Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *Journal of Biological Chemistry*. **277**,23627-37.
- Cosgrove, S. E. and Carmeli, Y. (2003). The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clinical Infectious Diseases*. **36**,1433-7.
- Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews, Microbiology*. **3**,777-88.
- Cudic, M., Condie, B. A., Weiner, D. J., Lysenko, E. S., Xiang, Z. Q., Insug, O., Bulet, P. and Otvos, L. Jr. (2002). Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates. *Peptides*. **23**,2071-83.
- Da Silva, P., Jouvensal, L., Lamberty, M., Bulet, P., Caille, A. and Vovelle, F. (2003). Solution structure of termicin, an antimicrobial peptide from the termite *Pseudacanthotermes spiniger*. *Protein Science*. **12**,438-46.

- Dai, L., Corzo, G., Naoki, H., Andriantsiferana, M. and Nakajimaa, 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.
- Darveau, R. P., Cunningham, M. D., Seachord, C. L., Cassiano-Clough, L., Cosand, W. L., Blake, J. and Watkins, C. S. (1991).** Beta-lactam antibiotics potentiate magainin 2 antimicrobial activity in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **35**,1153-9.
- Dathe, M. and 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.
- Dathe, M., Kaduk, C., Tachikawa, E., Melzig, M. F., Wenschuh, H. and Bienert, M. (1998).** Proline at position 14 of alamethicin is essential for hemolytic activity, catecholamine secretion from chromaffin cells and enhanced metabolic activity in endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes*. **1370**,175-83.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. and Bienert, M. (2001).** Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *The Federation of European Biochemical Societies Journal Letters*. **501**,146-50.
- Davies, J. and Davies, D. (2010).** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **74**,417-33.
- de Castro, C. S., Silvestre, F. G., Araújo, S. C., Gabriel de, M. Y., Mangili, O. C., Cruz, I., Chávez-Olórtegui, C. and Kalapothakis, E. (2004).** Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon*. **44**,273-80.
- de Jong, A., van Heel, A. J., Kok, J. and Kuipers, O. P. (2010).** BAGEL2: Mining for bacteriocins in genomic data. *Nucleic Acids Research*. **38**,W647-51.
- de Jong, A., van Hijum, S. A. F. T., Bijlsma, J. J. E., Kok, J. and Kuipers, O. P. (2006).** BAGEL: A web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Research*. **34**,W273-9.
- De Smet, K. and Contreras, R. (2005).** Human antimicrobial peptides: Defensin, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters*. **27**,1337-47.
- del Rio-Portilla, J. F. (2003).** Determinación de la estructura de una proteína por resonancia magnética nuclear. En Flores-Herrera, O., Riveros-Rosas, H., Sosa-Penado, A. y Vázquez-Contreras, E. Eds. Mensaje Bioquímico, Vol. XXVII. Cd. Universitaria, México D. F., México. pp. 65-83.

- Dempsey, E. C., Bazzo, R., Harvey, T. S., Syperek, I., Boheim, G. and Campbell, I. D. (1991). Contribution of proline-14 to the structure and actions of melittin. *The Federation of European Biochemical Societies Journal Letters*. **281**,240-44.
- Deresinski, S. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clinical Infectious Diseases*. **40**,562-73.
- Dingley, A. J., Cordier, F. and Grzesiek, S. (2001). An introduction to hydrogen bond scalar couplings. *Concepts in Magnetic Resonance*. **13**,103-27.
- Dresser, A. Wirtz, V. J., Corbett, K. K. y Echániz G. (2008). Uso de antibióticos en México: Revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México*. **50**,s480-7.
- Drlica, K. and Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **61**,377-92.
- Duits, L., Nibbering, P. and van Strijen, E. (2003). Rhinovirus increases human beta-defensin-2 and -3 mRNA expression in cultured bronchial epithelial cells. *Federation of European Microbiological Societies, Immunology and Medical Microbiology*. **38**,59-64.
- Dunkle, J. A., Xiong, L., Mankin, A. S. and Cate, J. H. (2010). Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**,17152-7.
- Dzidic, S. and Bedekovic, V. (2003). Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacologica Sinica*. **6**,519-26.
- Eisenberg, D. (1984). Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annual Review of Biochemistry*. **53**,595-623.
- Eband, R. F., Raguse, T. L., Gellman, S. H. and Eband, R. M. (2004). Antimicrobial 14-helical β -peptides: Potent bilayer disrupting agents. *Biochemistry*. **43**,9527-35.
- Eband, R. M. and Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1462**,11-28.
- Escoubas, P. (2006). Molecular diversification in spider venoms: A web of combinatorial peptide libraries. *Molecular Diversity*. **10**,545-54.
- Escoubas, P. and Rash, L. (2004). Tarantulas: Eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*. **43**,555-74.
- Escoubas, P., Diochot, S. and Corzo, G. (2000). Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*. **82**,893-907.

- Estrada, G., García, B. I., Schiavon, E., Ortiz, E., Cestele, S., Wanke, E., Possani, L. D. and Corzo, G. (2007a). Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin C_{ss}II: Heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1770**,1161-68.
- Estrada, G., Villegas, E. and Corzo, G. (2007b). Spider venoms: A rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Natural Products Reports*. **24**,145-61.
- Fadeyibi, I. O., Raji, M. A., Ibrahim, N. A., Ugburo, A. O. and Ademiluyi, S. (2012). Bacteriology of infected burn wounds in the burn wards of a teaching hospital in Southwest Nigeria. *Burns*. In press (doi:10.1016/j.burns.2012.02.005).
- Falagas, M. E. and Kasiakou, S. K. (2005). Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*. **40**,1333-41.
- Falconer, S. B., Czarny, T. L. and Brown, E. D. (2011). Antibiotics as probes of biological complexity. *Nature, Chemical Biology*. **7**,415-23.
- Fant, F., Vranken, W. F. and Borremans, F. A. A. (1999). The three-dimensional solution structure of *Aesculus hippocastanum* antimicrobial protein 1 determined by ¹H nuclear magnetic resonance. *Proteins*. **37**,388-403.
- Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W. and Borremans, F. (1998). Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by ¹H NMR. *The Journal of Molecular Biology*. **397**,408-22.
- Fellermann, K. and Stange, E. (2001). Defensins-innate immunity at the epithelial frontier. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **13**,771-6.
- Fjell, C. D., Hancock, R. E. W. and Cherkasov, A. (2007). AMPer: A database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. *Bioinformatics*. **23**,1148-55.
- Freceer, V., Ho, B. and Ding J. L. (2004). De novo design of potent antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43**,3349-57.
- French, G. L. (2005). Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **57**,1514-27.
- Gallo, R. L. and Nizet, V. (2003). Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Current Allergy and Asthma Reports*. **3**,402-9.
- Ganz T. and Lehrer R. I. (1994). Defensins. *Current Opinion in Immunology*. **6**,584-9.
- Ganz, T. (2003a). The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integrative and Comparative Biology*. **43**,300-4.

- Ganz, T. (2003b). Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews, Immunology*. 3,710-20.
- García, J. R., Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodríguez-Jiménez, J., Forssmann, U., Adermann, K., Klüver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W. G. and Bals, R. (2001). Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell and Tissue Research*. 306,257-64.
- Gérvás, J. (2000). La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. *Atención Primaria*. 25,589-96.
- Gesell, J., Zasloff, M. and Opella, S. J. (1997). Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue Magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *Journal of Biomolecular NMR*. 9,127-35.
- Gill, S. K. and Garcia G. A. (2011). Rifamycin inhibition of WT and Rif-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli* RNA polymerases in vitro. *Tuberculosis*. 91,361-9.
- Giuliani, A., Pirri, G. and Nicoletto, S. F. (2007). Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*. 2,1-33.
- Godballe, T., Nilsson L. L., Petersen, P. D. and Jensen, H. (2011). Antimicrobial β -peptides and α -peptoids. *Chemical Biology and Drug Design*. 77,107-16.
- Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M. and Wilson, J. M. (1996). Human β -Defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*. 88,553-60.
- Goraya, J., Wang, Y., Li, Z., O'Flaherty, M., Knoop, F. C., Platz, J. E. and Conlon, J. M. (2000). Peptides with antimicrobial activity from four different families isolated from the skins of the North American frogs *Rana luteiventris*, *Rana berlandieri* and *Rana pipiens*. *European Journal of Biochemistry*. 267,894-900.
- Graham, J. P., Boland, J. J. and Silbergeld, E. (2007). Growth promoting antibiotics in food animal production: An economic analysis. *Public Health Reports*. 122,79-87.
- Grice, E. A., Kong, H. H., Renaud, G., Young, A. C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Wolfsberg, T. G., Turner, M. L. and Segre, J. A. (2008). A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Research*. 18,1043-50.

- Gueguen, Y., Garnier, J., Robert, L., Lefranc, M. P., Mougnot, I., de Lorgeril, J., Janech, M., Gross, P. S., Warr, G. W., Cuthbertson, B., Barracco, M. A., Bulet, P., Aumelas, A., Yang, Y., Bo, D., Xiang, J., Tassanakajon, A., Piquemal, D. and Bachère, E. (2006). PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. *Developmental and Comparative Immunology*. **30**,283-8.
- Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J. -M., Bulet, P., González, M., Lelong, C., Favrel, P. and Bachere, E. (2006). Characterization of a defensin from the *Oyster Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *The Journal Of Biological Chemistry*. **281**,313-23.
- Hamad, B. (2010). The antibiotics market. *Nature Reviews, Drug Discovery*. **9**,675-6.
- Hamamoto, K., Kida, Y., Zhang, Y., Shimizu, T. and Kuwano, K. (2002). Antimicrobial activity and stability to proteolysis of small linear cationic peptides with D-amino acid substitutions. *Microbiology and Immunology*. **46**,741-9.
- Hammami, R., Hamida, R. B., Vergoten, G. and Fliss, I. (2009). PhytAMP: A database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research*. **37**,D963-8.
- Hammami, R., Zouhir, A., Hamida J. B. and Fliss, I. (2007). BACTIBASE: A new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*. **7**,89.
- Hammami, R., Zouhir, A., Lay, C. L., Hamida, J. B. and Fliss, I. (2010). BACTIBASE second release: A database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*. **10**,22.
- Hancock, R. E. W. and Lehrer, R.I. (1998). Cationic peptides: A new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*. **16**,82-8.
- Hancock, R. E. W. and Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature, Biotechnology*. **24**,1551-57.
- Hanzawa, H., Shimada, I., Kuzuhara, T., Komanol, H., Kohda, D., Inagaki, F., Natori, S. and Arata, Y. (1990). ¹H nuclear magnetic resonance study of the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin. *The Federation of European Biochemical Societies Journal Letters*. **269**, 413-20.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. and Schröder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature*. **387**,861.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. and Schroder, J. M. (2001). Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**,5707-13.

- Harris, A., Torres-Viera, C., Venkataraman, L., DeGirolami, P., Samore, M. and Carmeli, Y. (1999). Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*. **28**,1128-33.
- Hart, C. A. (1998). Antibiotic resistance: An increasing problem? *British Medical Journal*. **316**,1255-46.
- Hawkey, P. M. (1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *British Medical Journal*. **317**,657-60.
- Hawkey, P. M. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **51**,S29-35.
- Hernández-Salgado, K., Estrada, G., Olvera A., Coronas, F. I., Possani, L. D. and Corzo, G. (2009). Heterologous expressed toxic and non-toxic peptide variants of toxin CssII are capable to produce neutralizing antibodies against the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Immunology Letters*. **15**,93-9.
- Hill, C. P., Yea, J., Selsted, M. E. and Eisenber D. (1991). The crystal structure of the antimicrobial defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: Suggests mechanisms of membrane permeabilization. *Science*. **251**,1481-5.
- Hilpert, K., Fjell, C. D. and Cherkasov, A. (2008). Short linear cationic antimicrobial peptides: Screening, optimizing, and prediction. In Otvos, L. Ed. *Methods in molecular biology* Vol. 494-peptide-based drug design. Totowa, NJ. USA: Humana Press. pp. 127-59.
- Hong, S. Y., Park, T. G. and Lee, K. -H. (2001). The effect of charge increase on the specificity and activity of a short antimicrobial peptide. *Peptides*. **22**,1669-74.
- Hoover, D. M., Wu, Z., Tucker, K., Lu, W. and Lubkowski (2003). Antimicrobial characterization of human β -defensin 3 derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47**,2804-9.
- Huang, L., Leong, S. S. L. and Jiang, R. (2009). Soluble fusion expression and characterization of bioactive human beta-defensin 26 and 27. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **84**,301-8.
- Imura, Y., Nishida, M., Ogawa, Y., Takakura, Y. and Matsuzaki, K. (2007). Action mechanism of tachyplesin I and effects of PEGylation. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1768**,1160-9.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. **59**,171-200.
- Janssen, B. J. C., Schirra, H. J., Lay, F. T., Anderson, M. A. and Craik, D. J. (2003). Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochemistry*. **42**,8214-22.
- Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. **19**,491-511.

- Jenssen, H., Lejon, T., Hilpert, H., Fjell, C. D., Cherkasov, A. and Hancock, R. E. W. (2007). Evaluating different descriptors for model design of antimicrobial peptides with enhanced activity toward *P. aeruginosa*. *Chemical Biology and Drug Design*. **70**,134-42.
- Joly, S., Maze, C., McCray, P. B. J. and Guthmiller, J. M. (2004). Human β -defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**,1024-9.
- Jung, S., Mysliwy, J. Spudy, B., Lorenzen, I., Reiss, K., Gelhaus, C., Podschun, R. Leippe, M. and Grötzinger, J. (2011). Human β -defensin 2 and β -defensin 3 chimeric peptides reveal the structural basis of the pathogen specificity of their parent molecules. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55**,954-60.
- Jungo, F. and Bairoch, A. (2005). Tox-Prot, the toxin protein annotation program of the Swiss-Prot Knowledgebase. *Toxicon*. **45**,293-301.
- Kardos N. and Demain A. L. (2011). Penicillin: The medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **92**,677-87.
- Khodursky, A. B. and Cozzarelli, N. R. (1998). The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *Journal of Biological Chemistry*. **273**,27668-77.
- Kimbrell, D. A. and Beutler, B. (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Reviews, Genetics*. **2**,256-67.
- Knowles, D. J. C., Foloppe, N., Matassova, N. B. and Murchie, A. I. H. (2002). The bacterial ribosome, a promising focus for structure-based drug design. *Current Opinion in Pharmacology*. **2**,501-6.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. and Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews, Microbiology*. **8**,424-35.
- Kong, H. H. (2011). Skin microbiome: Genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. *Trends in Molecular Medicine*. **17**,320-8.
- Kouno, T., Fujitani, N., Mizuguchi, M., Osaki, T., Nishimura, S. -I., Kawabata, S. -I., Aizawa, T., Demura, M., Nitta, K. and Kawano, K. (2008). A novel β -defensin structure: A potential strategy of big defensin for overcoming resistance by Gram-positive bacteria. *Biochemistry*. **47**,10611-9.
- Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., Feofanov, A. V., Surovoy, A. Y., Karpunin, D. V. and Grishin, E. V. (2006). Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaevi* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *Journal of Biological Chemistry*. **281**,20983-92.

- Kreil, G. (1973).** Structure of melittin isolated from two species of honey bees. *The Federation of European Biochemical Societies Journal Letters*. **33**,241-4.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982).** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *The Journal of Molecular Biology*. **157**,105-32.
- Labrie, S. J., Samson, J. E. and Moineau, S. (2010).** Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews, Microbiology*. **8**,317-27.
- Ladokhin, A. S. and White, S. H. (1999).** Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: Energetics of helix formation by melittin. *The Journal of Molecular Biology*. **285**,1363-9.
- Lai, Y. and Gallo, R. L. (2009).** AMPed up immunity: How antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*. **30**,131-41.
- Lamberty, M., Caille, A., Landon, C., Tassin-Moindrot, S., Hetru, C., Bulet, P. and Vovelle, F. (2001).** Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochemistry*. **40**,11995-2003.
- Landon, C., Barbault, F., Legrain, M., Guenneugues, M. and Vovelle, F. (2008).** Rational design of peptides active against the gram positive bacteria *Staphylococcus aureus*. *Proteins*. **72**,229-39.
- Langham, A. A., Khandelia, H., Schuster, B., Waring, A. J., Lehrer, R. I. and Kaznessis, Y. N. (2008).** Correlation between simulated physicochemical properties and hemolysis of protegrin-like antimicrobial peptides: Predicting experimental toxicity. *Peptides*. **29**,1085-93.
- Larrick, J. W., and Wright, S. C. (1996).** Cationic antimicrobial peptides. *Drugs Future*. **21**,41-8.
- Laverty, G., Gorman, S. P. and Gilmore, B. F. (2011).** The potential of antimicrobial peptides as biocides. *International Journal of Molecular Sciences*. **12**,6566-96.
- Lay, F. T., Mills, G. D., Poon, I. K. H., Cowieson, N. P., Kirby, N., Baxter, A. A., van der Weerden, N. L., Dogovskil, C., Perugini, M. A., Anderson, M. A., Kvensakul, M. and Hulett, M. D. (2012).** Dimerization of the plant defensin NaD1 enhances its antifungal activity. *The Journal of Molecular Biology*. **287**,19961-72.
- Lehmann, J., Retz, M., Harder, J., Krams, M., Kellner, U., Hartmann, J., Hohgräwe, K., Raffenberg, U., Gerber, M., Loch, T., Weichert-Jacobsen, K. and Stöckle, M. (2002).** Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infectious Diseases*. **2**,20.
- Lehrer, R. I. (2004).** Primate defensins. *Nature Reviews, Microbiology*. **2**,727-38.
- Lehrer, R. I., Rosenman, M., Herwing, S. S. S. L., Jackson, R. and Eisenhauer, P. (1991).** Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *Journal of Immunological Methods*. **137**,167-73.

- Levin A. S., Barone A. A., Penco J., Santos, M. V., Marinho, I. S., Arruda, E. A. G., Manrique, E. I. and Costa S. F. (1999). Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical and Infectious Diseases*. **28**,1008-11.
- Levy, S. B. (1992). Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **36**,695-703.
- Levy, S. B. and Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature, Medicine*. **10**,S122-9.
- Li, Y. and Chen, Z. (2008). RAPD: A database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. *FEMS microbiology letters*. **289**,126-9.
- Liu, B. and Pop, M. (2009). ARDB-Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Research*. **37**,D443-47.
- Liu, L., Fang, Y., Huang, Q., Pan, Q. and Wu, J. (2008). A new structure-activity relationship of linear cationic α -helical antimicrobial peptides. In Peng, Y., and Weng, X. Eds. 7th Asian-Pacific conference on medical and biological engineering. IFMBE Proceedings. Springer, Berlin-Heidelberg. pp. 167-70.
- Mandal, K., Pentelute, B. L., Tereshko, V., Thammavongsa, V., Schneewind, O., Kossiakoff, A. A. and Kent, S. B. H. (2009). Racemic crystallography of synthetic protein enantiomers used to determine the X-ray structure of plectasin by direct methods. *Protein Science*. **18**,1146-54.
- Marcos, J. F. and Gandía, M. (2009). Antimicrobial peptides: To membranes and beyond. *Expert Opinion on Drug Discovery*. **4**,659-71.
- Marín, I., Adad, J. P., Ureña, D. and Amils, R. (1995). High-ionic strength interference of ribosomal inhibition produced by aminoglycoside antibiotics. *Biochemistry*. **34**,16519-23.
- Markley, J. L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C. W., Kaptein, R., Sykes, B.D., Wright, P. E. and Wüthrich, K. (1998). Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *Pure and Applied Chemistry*. **70**,117-42.
- Marr, A. K., Gooderham, W. J. and Hancock, R. E. W. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: Obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*. **6**,468-72.
- Martínez-Gómez, D. A., Ramírez-Almagro, C., Campillo-Soto, A., Morales-Cuenca, G., Pagán-Ortiz, J., y Aguayo-Albasini, J. L. (2009). Infecciones del pie diabético. Prevalencia de los distintos microorganismos y sensibilidad a los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **27**,317-21.

- McManus, A. M., Dawson, N. F., Wade, J. D., Carrington, L. E., Winzor, D. J. and Craik, D. J. (2000). Three-dimensional structure of RK-1: A novel α -defensin peptide. *Biochemistry*. **39**,15757-64.
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin G. W. and Jones A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review Phytopathology*. **40**,443-65.
- McPhee, J. B., Scott, M. G. and Hancock, R. E. W. (2005). Design of host defense peptides for antimicrobial and immunity enhancing activities. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. **8**,257-72.
- Medzhitov, R. and Janeway, C. A. Jr. (1997). Innate immunity: minireview the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. **91**,295-8.
- Merelo, J. J., Andrade, M. A., Prieto, A. and Morán, F. (1994). Proteinotopic feature maps. *Neurocomputing*. **6**,443-54.
- Mingeot-Leclercq, M. -P., Glupczynski, Y. and Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43**,727-37.
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Van Eldere, J., van der Walt, J. and Verdonk, F. (2002). Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *European Journal of Biochemistry*. **269**,4799-810.
- Morikawa, N., Hagiwara, K. and Nakajima, T. (1992). Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, rana *Brevipoda porsa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **189**,184-90.
- Mueller, J. and Hinton, J. (1941). A protein free medium for primary isolation of Gocococcus and Meningococcus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **48**,330-3.
- Mulvenna, J. P., Wang, C. K. L. and Craik, D. J. (2006). CyBase: A database of cyclic protein sequence and structure. *Nucleic Acids Research*. **34**,D192-4.
- Mushegian, A. and Medzhitov, R. (2001). Evolutionary perspective on innate immune recognition. *The Journal of Cell Biology*. **155**,705-10.
- Nicholson, G. M. (2006). Spider venom peptides. In Kastin, J. A., Ed. Handbook of biologically active peptides. *Burlington: Academic Press, Elsevier*. pp. 369-80.
- Nicolas, P. (2009). Multifunctional host defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. **276**,6483-96.
- Nitschke, M., Wiehl, S., Baer, P. and Kreft, B. (2002). Bactericidal activity of renal tubular cells: The putative role of human beta-defensins. *Experimental Nephrology*. **10**,332-7.

- Nomura, K. and Corzo, G. (2006). The effect of binding of spider-derived antimicrobial peptides, oxyopinins, on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1758**,1475-82.
- Nomura, K., Corzo, G., Nakajima, T. and Iwashita, T. (2004). Orientation and pore-forming mechanism of a scorpion pore-forming Peptide bound to magnetically oriented lipid bilayers. *Biophysical Journal*. **87**,2497-507.
- Nomura, K., Ferrat, G., Nakajima, T., Darbon, H., Iwashita, T. and Corzo, G. (2005). Induction of morphological changes in model lipid membranes and the mechanism of membrane disruption by a large scorpion-derived pore-forming peptide. *Biophysical Journal*. **89**,4067-80.
- Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M. Jr., Tarry, M. J., Carter, A. P. and Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*. **292**,897-902.
- Oppegaard, H., Steinum, T. M. and Wasteson, Y. (2001). Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**,3732-34.
- Oppenheim, J. J., Biragyn, A., Kwaak, L. W. and Yang, D. (2003). Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **62**,ii17-21.
- Oren, Z. and Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers, Peptide Science*. **47**,451-63.
- Oren, Z. and Shai, Y. (1997). Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: Structure-function study. *Biochemistry*. **36**,1826-35.
- Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J. P., Krier, F., Revol-Junelles, A. M., Longeon, A., Chaffotte, A., Dejean, A. and Rossier, J. (2001). Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the Ant *Pachycondyla goeldii*. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**,17823-9.
- Otvos, L. Jr. and Cudic, M. (2007). Broth microdilution antibacterial assay of peptides. In Greg, B. F. (Ed). *Methods in molecular biology*, volume 386: Peptide characterization and application protocols. pp. 309-20.
- Pankey, G. A. and Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*. **38**,864-70.
- Park, J. M., Jung, J. E. and Lee, B. J. (1994). Antimicrobial peptides from the skin of a korean frog, *Rana rugosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **205**,948-54.
- Pathak, N., Salas-Auvert, R., Ruche, G., Janna, M. H., McCarthy, D. and Harrison, R. G. (1995). Comparison of the effects of hydrophobicity, amphiphilicity and alpha-helicity on the activities of antimicrobial peptides. *Proteins*. **22**,182-6.

- Paulsen, I. T., Brown, M. H. and Skurray, R. A. (1996).** Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*. **60**,575-608.
- Pazgier, M., Hoover, M.D., Yang, D., Lu, W. and Lubkowski, J. (2006).** Human β -defensins. *Cellular and Molecular Life Science*. **63**,1294-13.
- Philippon, A., Labia, R. and Jacoby, G. (1989).** Extended spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **33**,1131-6.
- Piddock, L. J. (1999).** Mechanisms of fluoroquinolone resistance: An update 1994-1998. *Drugs*. **58**,s11-8.
- Piton, J., Petrella, S., Delarue, M., Andre-Leroux, G., Jarlier, V., Aubry, A. and C. Mayer, C. (2010).** Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase. *PLoS One*. **5**,e12245.
- Porter, E. A., Wang, X., Lee, H. -S., Weisblum, B. and Gellman S. H. (2000).** Non-haemolytic β -amino-acid oligomers. *Nature*. **404**,565.
- Possani, L. D. and Rodríguez de la Vega, R. C. (2006).** Scorpion venom peptides. In Kastin, A. J., Ed. Handbook of biologically active peptides. *Burlington: Academic Press, Elsevier*. pp. 339-99.
- Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M. and Tytgat, J. (1999).** Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *European Journal of Biochemistry*. **264**,287-300.
- Possani, L. D. (1984).** Structure of scorpion toxins. In Tu, A., Ed. Handbook of natural toxins vol 2. *New York: Marcel Dekker*. pp. 513-50.
- Powersand, J. P. and Hancock, R. E. W. (2003).** The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. **24**,1681-91.
- Premratanachai, P., Joly, S., Johnson G. K., McCray P. B., Jia H. P. and Guthmiller J. M. (2004).** Expression and regulation of novel human β -defensins in gingival keratinocytes. *Oral Microbiology and Immunology*. **19**,111-17.
- Projan, S. J. (2002).** New (and not so new) antibacterial targets-from where and when will the novel drugs come? *Current Opinion in Pharmacology*. **2**,513-22.
- Projan, S. J. and Blackburn, P. (1993).** The bacteriocin nisin activated by chelating agents is bactericidal for *Helicobacter pylori* *in vitro*. *Gastroenterology*. **104**,S173.
- Proud, D., Sanders, S. P. and Wiehler, S. (2004).** Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Immunology*. **172**,4637-45.

- Quiñones-Mateu, M. E., Lederman, M. M., Feng, Z., Chakraborty, B., Weber, J. and Rangel, H. R. (2003). Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS*. 17,F39-48.
- Rajilić-Stojanović, M., Hauke Smidt, H. and de Vos, W. M. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental Microbiology*. 9,2125-36.
- Rangel, H. (2005). Infección en quemaduras. *Cirugía Plástica*. 15,111-7.
- Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R. y Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*. 48,62-71.
- Rollins-Smith, L. A., Reinert, L. K., O'leary, C. J., Houston, L. E. and Woodhams, D. C. (2005). Antimicrobial peptide defenses in amphibian skin. *Integrative and Comparative Biology*. 45,137-42.
- Rosengren, K. J., Daly, N. L. , Fornander, L. M., Jonsson, L. M. H., Shirafuji, Y., Qu, X., Hans J. Vogel, H. J., Ouellette, A. J. and Craik, D. J. (2006). Structural and functional characterization of the conserved salt bridge in mammalian paneth cell α -defensins. Solution structures of mouse Cryptdin-4 and (E15D)-Cryptdin-4. *The Journal of Biological Chemistry*. 281,28068-78.
- Rosengren, K. J., McManus, A. M. and Craik D. J. (2002). The structural and functional diversity of naturally occurring antimicrobial peptides. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents*. 1,319-41.
- Rosenthal, M., Goldberg, D., Aiello, A., Larson, E. and Foxman, B. (2011). Skin microbiota: Microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infection, Genetics and Evolution*. 11,839-48.
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., Cunliffe, W. J., Baumberg, S. and Wootton, J. C. (1990). Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATPbinding transport super gene family. *Molecular Microbiology*. 4,1207-14.
- Rotem, S. and Mor, A. (2009). Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788,1582-92.
- Ruhr, E. and Sahl, H. -G. (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 27,841-45.
- Rule, G. S and Hitchens T. K. (2006). Fundamentals of protein NMR spectroscopy. In Kaptein, R. Ed. Focus on structural biology vol. 5. Dordrecht, NLD: Springer. pp. 387-9.

- Rydlo, T., Miltz, J. and Mor, A. (2006). Eukaryotic antimicrobial peptides: Promises and premises in food safety. *Journal of Food Science*. **71**,R125-35.
- Ryley, H. C. (2001). Human antimicrobial peptides. *Reviews in Medical Microbiology*. **12**,177-86.
- Sandgren, S., Wittrup, A., Cheng, F., Joönsson, M., Eklund, E., Busch, S. and Belting, M. (2004). The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**,17951-6.
- Sang, Y., Ortega, M. T., Blecha, F., Prakash, O. and Melgarejo, T. (2005). Molecular cloning and characterization of three β -defensins from canine testes. *Infection and Immunity*. **73**,2611-20.
- Sansom, M. S. P. (1992). Proline residues in transmembrane helices of channel and transport proteins: A molecular modeling study. *Protein Engineering*. **5**,53-60.
- Savic, M., Lovric, J., Tomic, T. I., Vasiljevic, B. and Conn, G. L. (2009). Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Research*. **37**,5420-31.
- Sawai, M. V., Jia, H. P., Liu, L., Aseyev, V., Wiencek, J. M., McCray, P. B. Jr., Ganz, T., Kearney, W. R. and Tack, B. F. (2001). The NMR structure of human beta-defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment. *Biochemistry*. **40**,3810-6.
- Schauber, J. and Gallo, R. L. (2008). Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2**,261-66.
- Schibli, D. J., Hunter, H. N., Aseyev, V., Starner, T. D., Wiencek, J. M., McCray, P. B. Jr., Tack, B. F. and Vogel H. J. (2002). The solution structures of the human β -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**,8279-89.
- Schutte, B. C., Mitros, J. P., Bartlett, J. A., Walters, J. D., Jia, H. P., Welsh, M. J., Casavant, T. L. and McCray, P. B. J. (2002). Discovery of five conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**,2129-33.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C. and Walsh T. R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **17**,431-7.
- Seebah, S., Suresh, A., Zhuo, S., Choong, Y. H., Chua, H., Chuon, D., Beuerman, R. and Verma, C. (2007). Defensins knowledgebase: A manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, **35**,D265-8.

- Sharma, S. and Khuller, G. K. (2001). DNA as the intracellular secondary target for antibacterial action of human neutrophil peptide-I against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Current Microbiology*. **43**,74-6.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, S. R. and Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*. **57**,138-63.
- Shin, S. Y., Kang, J. H., Jang, S. Y., Kim, Y., Kim, K. L., and Kyung-Soo Hahm, K. -S. (2000). Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1463**,209-18.
- Shin, S. Y., Kang, J. H., Lee, D. G., Jang, S. Y., Seo, M. Y., Kim, K. L. and Ham, K. -S. (1999). Influences of hinge region of a synthetic antimicrobial peptide, Cecropin A(1-13)-Melittin(1-13) hybrid on antibiotic activity. *Bulleting of the Korean Chemistry Society*. **20**,1078-84.
- Shulz, A., Klüver, E., Shulz-Maronde, S. and Andermann, K. (2005). Engineering disulfide bonds of the novel human β -defensins hBD-27 and hBD-28: Differences in disulfide formation and biological activity among human β -defensins. *Biopolymers*. **80**,34-49.
- Sitaram, N. and Nagaraj, R. (2002). The therapeutic potential of host-defense antimicrobial peptides. *Current Drug Targets*. **3**,259-67.
- Som, A., Vemparala, S., Ivanov, I. and Tew, G. N. (2008). Synthetic mimics of antimicrobial peptides. *Peptide Science*. **90**,83-93.
- Song, M. D., Wachi, M., Doi, M., Ishino, F. and Matsushashi, M. (1987). Evolution of an inducible penicillin target protein in MRSA by gene fusion. *The Federation of European Biochemical Societies Journal Letters*. **221**,167-71.
- Spratt, B. G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science*. **264**,388-93.
- Srivastava, A., Talaue, M., Liu, S., Degen, D., Ebright, R. Y., Sineva, E., Chakraborty, A., Druzhinin, S. Y., Chatterjee, S., Mukhopadhyay, J., Ebright, Y. W., Zozula, A., Shen, J., Sengupta, S., Niedfeldt, R. R., Xin, C., Kaneko, T., Irschik, H., Jansen, R., Donadio, S., Connell, N. and Ebright, R. H. (2011). New target for inhibition of bacterial RNA polymerase: 'switch region'. *Current Opinion in Microbiology*. **14**,532-43.
- Sun, L., Finnegan, C. M., Kish-Catalone, T., Blumenthal, R., Garzino-Demo, P., La Terra-Maggiore, G. M., Berrone, S., Kleinman, C., Wu, Z., Abdelwahab, S., Lu, W. and Garzino-Demo, A. (2005). Human β -defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. *Journal of Virology*. **79**,14318-29.

- Sundararajan, V. S., Gabere, M. N., Pretorius, A., Adam, S., Christoffels, A., Lehväslaiho, M., Archer, J. A. C. and Bajic, V. B. (2011). DAMPD: A manually curated antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Research*. **40**,D1108-12.
- Sutcliffe, J. A. (2005). Improving on nature: Antibiotics that target the ribosome. *Current Opinion in Pharmacology*. **8**,534-42.
- Sutcliffe, J. A. (2011). Antibiotics in development targeting protein synthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1241**,122-52.
- Szyk, A., Wu, Z., Tucker, K., Yang, D., Lu, W. and Lubkowski, J. (2006). Crystal structures of human α -defensins HNP4, HD5, and HD6. *Protein Science*. **15**,2749-60.
- Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O. and Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimie*. **92**,1236-41.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*. **119**,s3-10.
- Tentolouris, N., Jude, E. B., Smirnof, I., Knowles E. A. and Boulton, A. J. M. (1999). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an increasing problem in diabetic foot clinic. *Diabetic Medicine*. **16**,767-71.
- Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*. **4**,493-9.
- Thennarasu, S. and Nagaraj, R. (1996). Specific antimicrobial and hemolytic activities of 18-residue peptides derived from the amino terminal region of the toxin pardaxin. *Protein Engineering*. **9**,1219-24.
- Thomas, S., Karnik, S., Barai, R. S., Jayaraman, V. K. and Idicula-Thomas, S. (2010). CAMP: A useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*. **38**,D774-80.
- Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A. and Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta*. **216**,193-202.
- Torres, A. M., de Plater, G. M., Doverskog, M., Birinyi-Strachan, L. C., Nicholson, G. M., Gallagher, C. H. and Kuchel, P. W. (2000). Defensin-like peptide-2 from platypus venom: member of a class of peptides with a distinct structural fold. *Biochemical Journal*. **348**,649-56.
- Torres, A. M., Wang, X., Fletcher, J. I., Alewood, D., Alewood, P. F., Smith, R., Simpson, R. J., Nicholson, G. M., Sutherland, S. K., Gallagher, C. H., King, G. F. and Kuchel, P. W. (1999). Solution structure of a defensin-like peptide from platypus venom. *Biochemical Journal*. **341**,785-94.
- Tossi, A. and Sandri, L. (2002). Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Current Pharmaceutical Design*. **8**,743-61.

- Tossi, A., Sandri, L. and Giangaspero, A. (2000).** Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. **55**,4-30.
- Trabi, M., Schirra, H. J. and Craik, D. J. (2001).** Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from rhesus macaque leukocytes. *Biochemistry*. **40**,4211-21.
- Tu, D., Blaha, G., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2005).** Structures of MLS_BK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell*. **121**,257-70.
- Turrone, F., Ribbera, A., Foroni, E., van Sinderen, D. and Ventura, M. (2008).** Human gut microbiota and bifidobacteria: From composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek*. **94**,35-50.
- Turvey, S. E. and Broide, D. H. (2010).** Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **125**,s24-32.
- Ulvatne, H. (2003).** Antimicrobial peptides: Potential use in skin infections. *American Journal of Clinical Dermatology*. **4**,591-5.
- Vaara, M. (1992).** Agents that increase the permeability of the outer membrane, *Microbiological Reviews*. **56**,395-411.
- Valore, E., Park, C., Quayle, A., Wiles, K. R., McCray, P. J. and Ganz, T. (1998).** Human beta-defensin-1: An antimicrobial peptide of urogenital tissues. *The Journal of Clinical Investigation*. **101**,1633-42.
- Vidaver, A. (2002).** Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Disease*. **34**,s107-10.
- Villegas, E. and Corzo, G., (2005).** Pore-forming peptides from spiders. *Toxin Reviews*. **24**,345-57.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martínez, J. and Khrestchatsky, M. (2010).** Synthetic therapeutic peptides: Science and market. *Drug Discovery Today*. **15**,40-56.
- Vuister, G. W. and Bax, A. (1993).** Quantitative *J* correlation: A new approach for measuring homonuclear three-bond *J*(HNHa) coupling constants in ¹⁵N-enriched proteins. *Journal of the American Chemical Society*. **115**,7772-7.
- Waksman, S. A. and Flynn J. E. (1973).** History of the word 'antibiotic'. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*. **28**,284-6.
- Walsh, C. (2000).** Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. **406**,775-81.

- Walsh, C., Fisher, S. L., Park, I. S., Prahalad, M. and Wu, Z. (1996). Bacterial resistance to vancomycin: Five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *Chemistry and Biology*. **3**,21-8.
- Wang, C. K. L., Kaas, Q., Chiche, L. and Craik, D. J. (2008). CyBase: A database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. *Nucleic Acids Research*. **36**,D206-10.
- Wang, E. E., Kellner, J. D. and Arnold, S. (1998). Antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Implications for medical practice. *Canadian Family Physician*. **44**,1881-8.
- Wang, G., Li, X. and Wang, Z. (2009). APD2: The update antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*. **37**,D933-37.
- Wang, Z. and Wang, G. (2004). APD: The antimicrobial peptide database. *Nucleic Acids Research*. **32**, D590-92.
- Whitmore, L. and Wallace, B. A. (2004). The peptaibol database: A database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Research*. **32**,D593-4.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M., Maloy, W. L., MacDonald, D. L. and Bienert, M. (1997). Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*. **417**,135-40.
- Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance: Priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **49**,585-6.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D. and Richards, F. M. (1991). Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *Journal of Molecular Biology*. **222**,311-33.
- Wright, G. D. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical Communications*. **47**,4055-61.
- Wu, Z., Hoover, D. M., Yang, D., Boulègue, C., Santamarina, F., Oppenheim J. J., Lubkowski, J. and Lu, W. (2003). Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human β -defensin 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**,8880-5.
- Xie, C., Prahl, A., Ericksen, B., Zeng, P., Li, X., Lu, W. Y., Lubkowski, J. and Lu, W. (2005). Reconstruction of the conserved beta-bulge in mammalian defensins using D-amino acids. *Journal of Biological Chemistry*. **23**,32921-9.
- Yamaguchi, Y., Nagase, T. and Makita, R. (2002). Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *Journal of Immunology*. **169**,2516-23.

- Yan, L. and Adams, M. E. (1998).** Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**,2059-66.
- Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D., Lubkowski, J. and Oppenheim, J. (2004).** Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual Review of Immunology*. **22**,181-15.
- Yang, D., Chertov, O. and Oppenheim, J. (2001).** Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *Journal of Leukocyte Biology*. **69**,691-7.
- Yang, Y. -S., Mitta, G., Chavanieu, A., Calas, B., Sanchez, J. F., Roch, P., and Aumelas, A. (2000).** Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond mediterranean mussel defensin (MGD-1). *Biochemistry*. **39**,14436-47.
- Yasin, B., Pang, M., Turner, J. S., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J., Lehrer, R. I. and Wagar, E. A. (2000).** Evaluation of the inactivation of infectious *Herpes simplex* virus by host-defense peptides. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **19**,187-94.
- Yeaman, M. R. and Yount, N. Y. (2003).** Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*. **55**,27-55.
- Yeung, A. T. Y., Gellatly, S. L. and Hancock, R. E. W. (2011).** Multifunctional cationic host defense peptides and their clinical applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **68**,2161-76.
- Young L. S. (1994).** Tratamiento antimicrobiano. En Wyngaarden J., Lloyd H. S. y Bennett J., Eds. Cecil: Tratado de Medicina Interna. 19 ed. México, D.F. Nueva Editorial Interamericana. pp. 1859-72.
- Zasloff, M. (1987).** Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **84**,5449-53.
- Zasloff, M. (2002a).** Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature*. **415**,389-95.
- Zasloff, M. (2002b).** Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *The Lancet*. **360**,1116-17.
- Zeng, X. -C., Corzo, G. and Hahin, R. (2005).** Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Life*. **57**,13-21.
- Zeng, X. -C., Wang, S. -X., Zhu, Y., Zhu, S. -Y., and Li, W. -X. (2004).** Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. *Peptides*. **25**,143-50.

- Zhao, X., Xu, C., Domagala, J. and Drlica, K. (1997).** DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: A strategy for avoiding bacterial resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**,13991-6.
- Zimmermann, G. R., Legault, P., Selsted, M. E. and Pardi, A. (1995).** Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: The peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry*. **34**,13663-71.
- Zoetendal, E. G., Vaughan, E. E. and de Vos, W. M. (2006).** A microbial world within us. *Molecular Microbiology*. **59**,1639-50.

ANEXO 1. PÉPTIDOS DE ORIGEN HUMANOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Tipo	Clave	Nombre	Secuencia	Aminoácidos	PD	Carga	Actividad
α-Defensinas	AP00176	HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLLWAFCC	30	3	+3	Gram+ & Gram-, Virus, Hongos, Células de Cáncer
	AP00177	HNP-2	CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLLWAFCC	29	3	+3	Gram+ & Gram-, Virus, Hongos, Células de Cáncer
	AP00178	HPN-3	DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLLWAFCC	30	3	+2	Gram+ & Gram-, Virus, Hongos, Células de Cáncer
	AP00179	HPN-4	VCSCRLVFCRRTELRVGNCLIGGVSTFYCCTRV	33	3	+4	Gram+ & Gram-, Hongos
	AP00180	HD-5	QARATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR	35	3	+5	Gram+ & Gram-, Hongos
	AP00181	HD-6	STRAFTCHCRRRSCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCLL	35	3	+5	Gram+ & Gram-, Hongos
β-Defensinas	AP00451	HBD-1	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCTYRGKAKCCK	36	3	+5	Gram+ & Gram-
	AP00524	HBD-2	GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	41	3	+7	Gram+ & Gram-
	AP00283	HBD-3	GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCTRGRKCCRRKK	45	3	+11	Gram+ & Gram-
Histatinas	AP00798	Histatina Humana 1	DSHEKRHHGYRRKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN	38	-	0	Hongos
	AP00799	Histatina Humana 2	RKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN	27	-	0	Hongos
	AP00520	Histatina Humana 3	DSHAKRHHGYRRKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN	32	-	+12	Gram+ & Gram-, Hongos
	AP00800	Histatina Humana 4	RKFHEKHHSHRGYRSNYLYDN	21	-	0	Hongos
	AP00505	Histatina Humana 5	DSHAKRHHGYRRKFHEKHHSHRGY	24	-	+12	Gram+ & Gram-, Hongos
	AP00801	Histatina Humana 6	DSHAKRHHGYRRKFHEKHHSHRGY	25	-	0	Hongos
Catelicidinas	AP00523	Histatina Humana 8	KFHEKHHSHRGY	12	-	+6	Gram+ & Gram-, Hongos
	AP00310	Catelicidina Humana LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	37	-	+6	Gram+ & Gram-, Virus
	AP00309	KS-27 (sintética de LL-37)	KSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	27	-	+6	Gram+ & Gram-
	AP00624	ALL-38 (sintética de LL-37)	ALLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	38	-	0	Gram+ & Gram-
	AP00625	KR-20 (sintética de LL-37)	KRIVQRIKDFLRNLPRTES	20	-	0	Gram+ & Gram-
	AP00626	KS-30 (sintética de LL-37)	KSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	30	-	0	Gram+ & Gram-
	AP00627	RK-31 (sintética de LL-37)	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	30	-	0	Gram+ & Gram-
	AP00628	LL-23 (sintética de LL-37)	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQR	23	-	0	Gram+ & Gram-
	AP00629	LL-29 (sintética de LL-37)	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR	29	-	0	Gram+ & Gram-
Otros	AP00707	LLAA (sintética de LL-37)	RLFDKIRQVIRKF	14	-	0	Gram-
	AP00708	FK-13 (sintética de LL-37)	FKRIVQRIKDFLR	13	-	0	Gram- & Células de Cáncer
	AP00432	LLP Humana	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	37	-	+6	Gram+ & Gram-, Virus
	AP00431	LLP1 Humana	KSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	27	-	+6	Gram+ & Gram-
	AP00433	Dermicidina (DCD-1) Humana	ALLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	38	-	0	Gram+ & Gram-
	AP00503	P-113D Humana	KRIVQRIKDFLRNLPRTES	20	-	0	Gram+ & Gram-
	AP00504	MUC7 20-Mer Humana	KSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	30	-	0	Gram+ & Gram-
	AP00509	Calcitermina Humana	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	30	-	0	Gram+ & Gram-
	AP00765	Salvic Humana	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQR	23	-	0	Gram+ & Gram-
	AP00811	LEAP-2 Humana	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR	29	-	0	Gram+ & Gram-
AP00192	Hepcidina 20 Humana	RLFDKIRQVIRKF	14	-	0	Gram-	
AP00193	LEAP-1 (Hepcidina 25) Humana	FKRIVQRIKDFLR	13	-	0	Gram- & Células de Cáncer	

Las secuencias y propiedades de los diferentes péptidos antimicrobianos se obtuvieron de la APD (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>)

ANEXO 2. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS REPORTADAS PARA BETA-DEFENSINAS HUMANAS.

```

hbd-1 .....DHYNCVS--SGGQCLYSACPIFTKIQ---GTCY-RGKAKCK.....36
hbd-2 .....GIGDPVTLK--SGAICHVFCPRRYKQI---GTCG-LPGTKCKKP.....39
hbd-3 .....GIINTLQYYCRV--RGGRCVLSCLPKEEQI---GKCS-TRGRKCCRKK.....45
hbd-4 .....EFELDRICG--YGTARCRK-KCRSQEYRI---GRG--PNTYACLRKWD-ESLNRKTP.....50
hbd-5 .....GLDFSQFFPSGEFAVCESECK--LGRGKCRK-ECLENEKPD---GNC--RLNFLCQRQRI.....51
hbd-6 .....FDEKCNK--LKGCKN-NCGKNEELI---ALC--QKSLKCCRTIQPCGSIID.....45
hbd-7 .....AIHRALISKRMEGHCEA-ECLTFEVKI---GGRAELAPFCCNR.....41
hbd-8 .....KFKELCE--RPNCSRCD-FCLTEIHV---GRG--LNSQPCCLPL.....37
hbd-9 .....RGDLGPVEGHCLN--LSGVCRDVKVVEQI---GAC--RRRMKCCRTWIIIMPITPLIM.....55
hbd-11 .....RECRI--GNGQCKN-QCHENEIRI---AYCI-RPETHCCLOQ.....35
hbd-12 TEKISTARSEGHHITFSRWKSCA--IGGRCKN-QDDSEFRI---SYCA-RPTHCCVTECDPTDENNWPVKDSVGTQEWYPKDSRH.....81
hbd-14 .....TLVNADRCT--KRYGRCKR-DLSEKQI---DICS-LPGKICCTEKLYEEDDMF.....39
hbd-18 .....YSGEKCKWN--RSGHCRK-QCKDGEAVK---DTC--KNLRACCIKPSNEDHRRVPATSPPTPLSDSTPGIIDDILTVRFTTDYFEVSSKMDVVESEAGRGTETSLPNVHSS.....103
hbd-19 .....KRHILRCMG--NSGICRA-SEKKEQPY---LYC--RNCQSCCLQSYMRIISIGKEENTDWSYEKQWPLRF.....63
hbd-20 .....VECW---DGHCR-L-LKDGEDSI---IRG--RNRKRCVFSRYLTIQPVTHGILGWTFQMSSTAPKMKTNITNR.....68
hbd-21 .....VMKCG--KSGRCRT-TCKESEVY---ILC--KTEAKCVDPKYVPVKPLTDNTSLESTSAV.....57
hbd-23 .....GTQRCWN--LYGKCRY-RCSKERVY---VYC--INNMCCKVKP-----KYQ---PKERWPF.....47
hbd-25 .....SFEQKCKW--NNVGHCR-RLDTERYI---LLC--RNLKSCCISISHEYTRRPAFVVIHLEDITLDYSDVDSFTGSPVSMNLNLIPTDFTTKFGETMTPETNTPETMPPSEATTPETMPPSETATSETMPPPSQALTHN.....136
hbd-26 .....NMYVKKCLN--DVGICK-KCKPEEMHVKNWAMCG--KQRDCVPAARRANYPVFCVQTKTRISTVTATTATTTLMMTTASMSMPTPVSPG.....91
hbd-27 .....EQLKCKNNYVQGHCRK--ICRVNEVPE---ALC--ENGRYCLNIKELEACKKITKPPRPKATLALTLQDYVTIENFPPLKQST.....81
hbd-28 .....LKKCFN-KVTGYCRK-KCKVGEREY---IGC--LSGKLCANDEEEKHVSFKPHQHSGEKLS-VLQDYIIL---PTTIIFTV.....73
hbd-29 .....EPFGLRCLM--GLGRCDR-HONVDEKEI---QKC--KMKCCVGPVKVVKLIKNYLQYQTPPNVLENDVQEMLKFAKNSSAVIQRKHLVSLVPLQIKSTGFFANTNFVFINATPMNSATISTMTPGQITYTATSTKSNKESRDSATASPPPPPPNIL...153
hbd-30 .....GVIPGQKCIALK--GVCRDKLCLDLDTI---GIC--NEGKCCRRWVILEPYPTPVKPKSP.....57
hbd-31 .....ISNDECP--EYHCR-L-KNADEHAI---RYC--ADFSICCKLKIIEIDGQKWK.....48
hbd-32 .....GSGKVSNTFGYCR-----TC---CHWGÉTAL---FMCA--SRKCCISYSFLPKPDLPLQLIGNHWQSRRTQRKDKKQQTTVTS.....73
hbd-33 .....AVKDTYSCFIMR--GKCRH-ECHDFEKPI---GFTKL--NANCYM.....38
hbd-34 .....GINSLSSEMHHKCYKN--GICRL-ECYESEMLV---AYCMF--QLECCVKGNPAP.....47
hbd-35 .....GPNVYIKIFASCWRL--QGTGRP-KCLKNEYR---ILCDTI--HLCCVNPKYLPILTGG.....53
hbd-36 .....MFGNDGVKVRTCTSQK--AVCF-GPPGYRWI---AFCHNI--LSCCKNMTRFQPPQAKDPVH.....57
Consenso .....KKCN-N-G-GRCKK-CKENEKPI---GYC--RNGKCCVN.....32

```

Las secuencias de las beta-Defensinas 1-31 se obtuvieron de Pazgier *et al.*, 2006 y Schutte *et al.*, 2002, las secuencias de las beta-Defensinas 32-36 se obtuvieron de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>). Las secuencias resaltadas en azul corresponden a las beta-Defensinas caracterizadas experimentalmente y las secuencias resaltadas en rojo corresponden a las beta-Defensinas estudiadas en este trabajo.

ANEXO 3. ÍNDICES DE HIDROPATICIDAD Y FLEXIBILIDAD PARA LOS 20 L-AMINOÁCIDOS.

Aminoácido	Código de una letra	Índice de hidropaticidad [†]	Índice de flexibilidad [‡]
Alanina	A	1.8	0.36
Arginina	R	-4.5	0.53
Asparagina	N	-3.5	0.46
Aspartato	D	-3.5	0.51
Cisteína	C	-3.5	0.35
Glutamato	E	-3.5	0.50
Glicina	G	-0.4	0.54
Histidina	H	-3.2	0.32
Isolueucina	I	4.5	0.46
Lueucina	L	3.8	0.37
Metionina	M	1.9	0.30
Fenilalanina	F	2.8	0.31
Prolina	P	-1.6	0.51
Serina	S	-0.8	0.51
Treonina	T	-0.7	0.44
Glutamina	Q	-3.5	0.49
Lisina	K	-3.9	0.47
Triptofano	W	-0.9	0.31
Tirosina	Y	-1.3	0.42
Valina	V	4.2	0.39

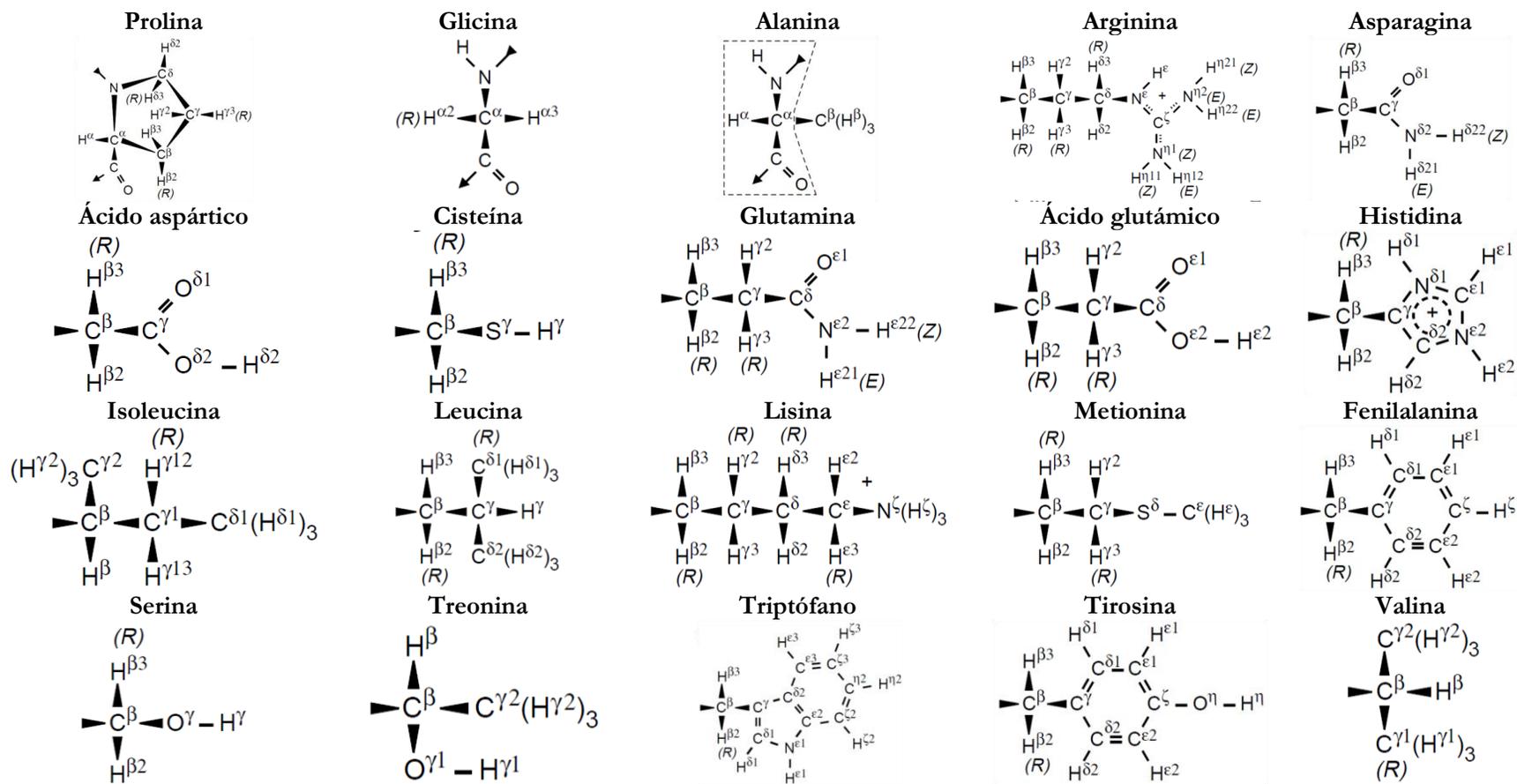
[†] Kyte y Doolittle, 1982/[‡] Bhaskaran y Ponnuswamy, 1988

Anexo 4. NÚCLEOS ACTIVOS COMÚNMENTE UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS POR RMN.

Núcleo	Espín nuclear	Abundancia natural (%)	Región de normal (ppm)
¹ H	1/2	99.99	10:0
¹³ C	1/2	1.10	220:0
¹⁵ N	- 1/2	0.37	130:0
¹⁹ F	1/2	100.0	0:-250
³¹ P	1/2	100.0	100:-100

del Rio-Portilla, 2003.

Anexo 5. INDICADORES DE ÁTOMOS PARA LOS VEINTE L-AMINOÁCIDOS (IUPAC) (Markley *et al.*, 1998)

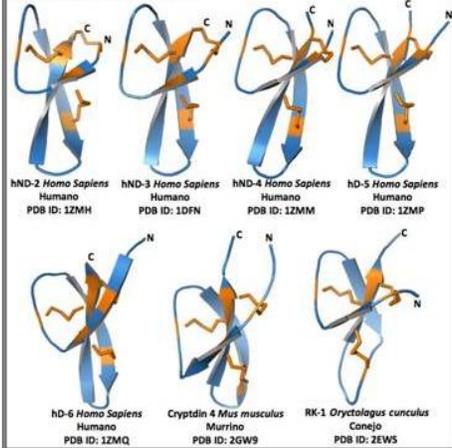


ANEXO 6.

ESTRUCTURAS RESUELTAS PARA DEFENSINAS DE DIVERSAS FUENTES.

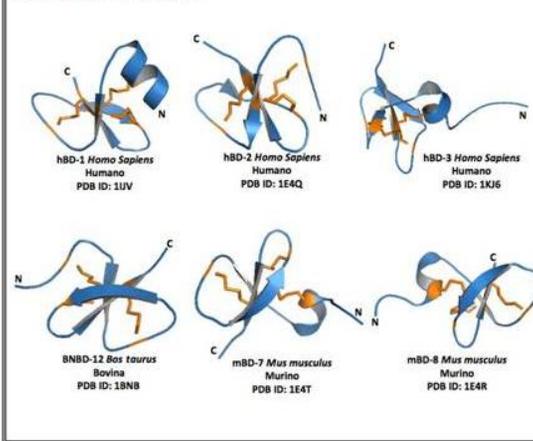
Defensinas de vertebrados

Alfa-Defensinas de mamíferos



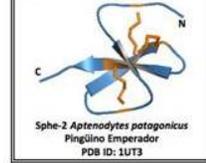
Alfa-Defensinas de mamíferos: Son péptidos catiónicos conformados por tres hebras beta antiparalelas, estabilizadas por tres puentes disulfuro, con un patrón de unión Cys1-Cys6/Cys2-Cys4/Cys3-Cys5. hND-2 [1ZMH] Xie et al., 2005; hND-3 [1DFN] Hill et al., 1991; hND-4 [1ZMM] Sayk et al., 2006; hD-5 [1ZMP] Sayk et al., 2006; hD-6 [1ZMQ] Sayk et al., 2006; Cryptidin 4 [2GW9] Rosengren et al., 2006; y RK-1 [2EWS] McManus et al., 2000.

Beta-Defensinas de mamíferos



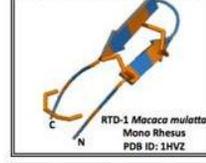
Beta-Defensinas de mamíferos: Son péptidos catiónicos conformados por tres hebras beta antiparalelas, estabilizadas por tres puentes disulfuro, con un patrón de unión Cys1-Cys5/Cys2-Cys4/Cys3-Cys6, que pueden contener un motivo alfa-hélice en su región amino terminal. hBD-1 [1IUV] Schibli et al., 2002; hBD-2 [1E4Q] Bauer et al., 2001; hBD-3 [1KJ6] Schibli et al., 2002; BNB-12 [1BNB] Zimmermann et al., 1995; mBD-7 [1E4T] Bauer et al., 2001 y mBD-8 [1E4R] Bauer et al., 2001.

Beta-Defensinas de aves



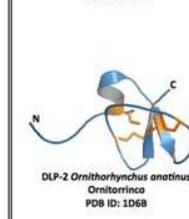
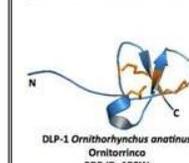
Beta-Defensina de aves: Presenta una conformación estructural y un patrón de unión de puentes disulfuro igual a las beta-Defensinas de mamífero. Sphe-2 [1UT3] Landon et al., 2004.

Theta-Defensina de mamífero



Theta-Defensina: Únicamente aislada en Mono rhesus, presenta una conformación circular formada por dos hebras beta antiparalelas, estabilizadas por tres puentes disulfuro, con un patrón de unión Cys1-Cys6/Cys2-Cys5/Cys3-Cys4. RTD-1 [1HVZ] Trabi et al., 2001.

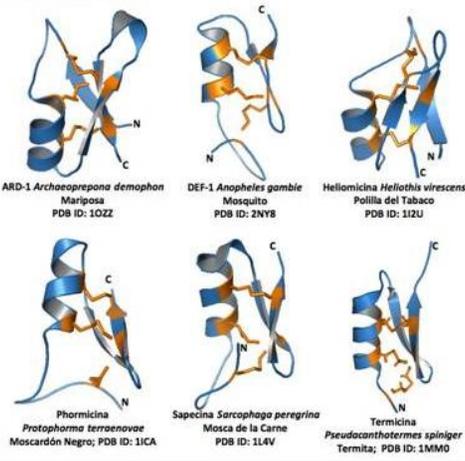
Tipo-Defensinas mamífero



Estadío tipo-Defensinas: Únicamente aisladas en Ornitorrinco, presenta una conformación formada por dos hebras beta antiparalelas, estabilizadas por tres puentes disulfuro, con un patrón de unión Cys1-Cys5/Cys2-Cys4/Cys3-Cys6 y un motivo alfa-hélice en su región amino terminal. DLP-1 [1BBW] Torres et al., 1999 y DLP-2 [1D68] Torres et al., 2000.

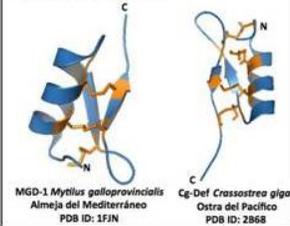
Defensinas de invertebrados

Defensinas de Insecto

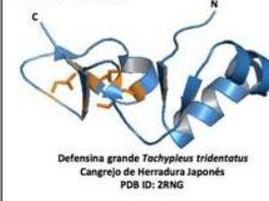


Defensinas de Insecto: Son péptidos catiónicos conformados por dos o tres hebras beta antiparalelas, estabilizadas por dos dominios con dos hebras beta antiparalelas y un marcado motivo alfa-hélice, cada uno. Sin embargo, sólo el dominio carboxilo terminal esta estabilizado por tres puentes disulfuro, con un patrón de unión Cys1-Cys4/Cys2-Cys5/Cys3-Cys6 y un marcado motivo alfa-hélice en su región amino terminal. ARD-1 [1OZZ] Landon et al., 2003; DEF-1 [2NY8] Landon et al., 2008; Heliomicina [1I2U] Lamberty et al., 2001; Phormicina [1ICA] Cornet et al., 1995; Sapecina [1L4V] Hanazawa et al., 1990 y Termicina [1MM0] Da Silva et al., 2002.

Defensinas de moluscos

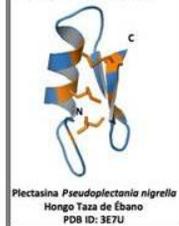


Defensinas grandes



Defensinas grandes: Son péptidos catiónicos aislados de moluscos y quelicerados, su estructura está conformada por dos dominios con dos hebras beta antiparalelas y un marcado motivo alfa-hélice, cada uno. Sin embargo, sólo el dominio carboxilo terminal esta estabilizado por tres puentes disulfuro, con un patrón de unión Cys1-Cys5/Cys2-Cys4/Cys3-Cys6, como en las beta-Defensinas de mamífero. Defensina grande [2RNG] Kouino et al., 2008.

Defensinas de hongos

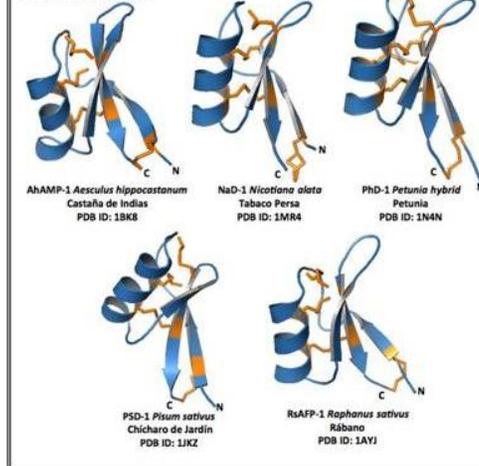


Defensinas de moluscos: presentan una conformación formada por dos hebras beta antiparalelas, estabilizadas por dos o tres puentes disulfuro y un marcado motivo alfa-hélice en su región amino terminal. MGD-1 [1FJN] Yang et al., 2000 y Cg-Def [2B68] Gueguen et al., 2006.

Defensinas de hongos: presenta una conformación formada por dos hebras beta antiparalelas, estabilizadas por dos o tres puentes disulfuro y un marcado motivo alfa-hélice en su región amino terminal. Plectasina [3E7U] Mandal et al., 2009.

Defensinas de plantas

Defensinas de plantas



Defensinas plantas: Son péptidos catiónicos conformados por tres hebras beta antiparalelas estabilizadas por tres o cuatro puentes disulfuro, con un patrón de unión que varían dependiendo del péptido y un marcado motivo alfa-hélice en su región amino terminal. AHAMP-1 [1BK8] Fant et al., 1999; NaD-1 [1MR4] Lay et al., 2003; PhD-1 [1N4N] Janssen et al., 2003; PSD-1 [1JKZ] Almeida et al., 2002 y RaAFP-1 [1AYJ] Fant et al., 1998.

Anexo 7. CONTRIBUCIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES.

Congresos nacionales:

1. **Rodríguez, A.**, Aguilar, E., Villegas, E. and Corzo, G. (2009). Proline substitution reduces the hemolytic activity of a short antimicrobial peptide. **Presentación en cartel.** Tercer Simposio Mexicano de Espectrometría de Masas, Proteómica Celular y Molecular. (San Luis Potosí, S.L.P., México).
2. Carmona, G., **Rodríguez, A.**, Rodríguez, C.I., Corzo, G. y Villegas, E. (2009). D-Pin2 un péptido catiónico alfa hélice con D-aminoácidos. **Presentación en cartel.** Segunda Reunión Regional en Ciencias Microbiológicas. (H. Puebla de Zaragoza, Puebla, México).
3. **Rodríguez, A.**, Villegas E., y Corzo, G. (2010). Sustituciones de prolina reducen la actividad hemolítica de péptidos antimicrobianos α -lineales. **Presentación oral.** XXVIII Congreso Nacional de Bioquímica. (Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México).

Congresos Internacionales:

1. **Rodríguez, A.**, Aguilar, E., Villegas, E. and Corzo, G. (2009). The relevance of a proline substitution in an antimicrobial peptide towards toxicity to Gram positive bacteria. **Oral communication.** XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia (Recife-Pernambuco, Brazil).

2. Carmona, G., Rodríguez, A., Gutiérrez, C., Corzo, G. and Villegas, E. (2010). Biological enhancements of an antimicrobial peptide substituted with D-aminoacids. **Oral communication.** 10th Meeting of the PanAmerican Section of the International Society on Toxinology. (San José, Costa Rica).

3. Rodríguez, A., Aguilar, E., Villegas, E. and Corzo, G. (2010). Proline substitution reduces the hemolytic activity of a short antimicrobial peptide. **Poster presentation.** 9th International Meeting of Experts in Venomous Animals Poisoning. (Cuernavaca, Morelos, México).

4. García, F., Villegas, E., Espino-Solís, G. P., Rodríguez, A., Paniagua-Solís, J., Possani, L. D., Sandoval, G. and Corzo, G. (2012). Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their biological activity in the presence of commercial antibiotics. **Oral communication.** 17th World Congress of the International Society on Toxinology & Venom Week 2012, 4th International Scientific Symposium on All Things Venomous. *Toxicon.* 60,110.

5. Juárez-López, D., Corzo, G., Rodríguez, A. and Villegas, E. (2012). Biological features of an enantiomeric antimicrobial peptide from scorpion venom. **Poster presentation.** 17th World Congress of the International Society on Toxinology & Venom Week 2012, 4th International Scientific Symposium on All Things Venomous. *Toxicon.* 60,188.

Anexo 8. ARTÍCULO GENERADO CON LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE ESTA TESIS.

Rodríguez, A., Villegas, E. Satake, H. Posanni, L. and Corzo, G. (2011). Amino acid substitutions in an alpha-helical antimicrobial arachnid peptide affect its chemical properties and biological activity towards pathogenic bacteria but improves its therapeutic index. *Amino Acids*. **40**, 61-68.

Amino acid substitutions in an alpha-helical antimicrobial arachnid peptide affect its chemical properties and biological activity towards pathogenic bacteria but improves its therapeutic index

A. Rodríguez · E. Villegas · H. Satake ·
L. D. Possani · Gerardo Corzo

Received: 26 October 2009 / Accepted: 10 December 2009 / Published online: 24 December 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Four variants of the highly hemolytic antimicrobial peptide Pin2 were chemically synthesized with the aim to investigate the role of the proline residue in this peptide, by replacing it with the motif glycine-valine-glycine [GVG], which was found to confer low hemolytic activity in a spider antimicrobial peptide. The proline residue in position 14 of Pin2 was substituted by [V], [GV], [VG] and [GVG]. Only the peptide variant with the proline substituted for [GVG] was less hemolytic compared to that of all other variants. The peptide variant [GVG] kept its antimicrobial activity in Muller–Hilton agar diffusion assays, whereas the other three variants were less effective. However, all Pin2 antimicrobial peptide variants, were active when challenged against a Gram-positive bacteria in Muller–Hilton broth assays suggesting that chemical properties of the antimicrobial peptides such as hydrophobicity is an important indication for antimicrobial activity in semi-solid environments.

Keywords Antimicrobial peptide · Arachnid, pandinin 2 · Peptide synthesis · *S. aureus*

A. Rodríguez · L. D. Possani · G. Corzo (✉)
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de
México, UNAM, Apartado Postal 510-3, 61500 Cuernavaca,
Morelos, Mexico
e-mail: corzo@ibt.unam.mx

E. Villegas
Centro de Investigación en Biotecnología,
Universidad Autónoma del Estado de Morelos,
Av. Universidad 1001, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

H. Satake
Suntory Institute for Bioorganic Research, 1-1-1 Wakayamadai,
Shimamoto-Cho, Mishima-Gun, Osaka 618-8503, Japan

Abbreviations

CD	Circular dichroism
OD	Optical density
Oxki2	Oxypinin 2
Pin2	Pandinin 2
TFA	Trifluoroacetic acid
TFE	Trifluoroethanol
MIC	Minimum inhibitory concentration

Introduction

Amphipathic and cationic α -helical peptides are broadly found in animals as part of their biological defense system (Andreu and Rivas 1998). A large number of amphiphilic and cationic peptides have been characterized in invertebrates, especially from the phyla Arthropoda, and in vertebrates from the class Amphibia. Short linear cationic peptides with α -helical conformation share some common characteristics such as antimicrobial activities at low micromolar concentrations and α -helix formation in hydrophobic environments (Andreu and Rivas 1998).

Pandinin 2 (Pin2) is a 24 mer α -helical antimicrobial peptide from the venom of the African scorpion *Pandinus imperator*. This peptide has antimicrobial activities towards Gram-positive and Gram-negative bacteria in the micromolar range; however, it shows hemolytic activity at similar concentrations (Corzo et al. 2001). High-resolution structure of Pin2 determined by NMR showed that the peptide is essentially α -helical with a kink in the middle of the structure. The proline kink is a structural characteristic of some pore-forming peptides that confer a high pore-forming ability to antimicrobial peptides. Clear examples

Table 1 Amino acid sequences of Pin2, Pin2 variants, Oxki2 and ponericin G1

Peptide	Amino acid sequence	Mass (Da)	Hydrophobicity (GRAVY) ^a	Elution time (min) ^b
Pin2	FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKKD	2,612.1	0.329	38
Pin2 [P14V]	FWGALAKGALKLIVSLFSSFSKKD	2,614.1	0.571	49
Pin2 [P14GV]	FWGALAKGALKLIGVSLFSSFSKKD	2,671.1	0.532	41
Pin2 [P14VG]	FWGALAKGALKLIVGSLFSSFSKKD	2,671.1	0.532	46
Pin2 [P14GVG]	FWGALAKGALKLIGVGSLSFSSFSKKD	2,728.2	0.496	37
Ponericin G1	GWKDWAKKAGGWLKKKGPGMAKAALKAAMQ	3,212.9	-0.683	ND
Oxki2b	GKFSGFAKILKSIKFFKGVGKVRKQFKEASDLKQ	4,146.8	-0.546	ND

ND Not determined

^a The GRAVY (Grand Average of Hydropathy) value for a peptide or protein is calculated as the sum of hydropathy values (Kyte and Doolittle 1982) of all the amino acids, divided by the number of residues in the sequence

^b Elution times under the HPLC conditions of Fig. 1

of such peptides are mellitin, alamethicin and pardaxin. In these peptides the presence of a proline was correlated to a high antimicrobial activity; nevertheless, these antimicrobial peptides also show high hemolytic activities (Dempsey et al. 1991; Thennarasu and Nagaraj 1996; Oren and Shai 1997; Dathe et al. 1998). Structural substitutions of proline in the amino acid sequence of these peptides had different effects. For example, substitutions of the P14 for alanine in the antimicrobial peptides mellitin and pardaxin increase their hemolytic and antimicrobial activities, respectively, as result of an increment in the helicity of their analogs (Dempsey et al. 1991). On the other hand, cationic antimicrobial peptides such as oxypinins from the wolf spider (*Oxyopes takiobus*) and ponericins G1 from the ponerin ant (*Pachycondyla goeldii*) showed antimicrobial activities with low cytotoxic effects towards erythrocytes (Orivel et al. 2001; Corzo et al. 2002). These peptides have a different amino acid motif in the middle of their primary structures. For example, oxypinin 2 has a GVG motif and ponericin G has glycine residues flanking the central proline, that is, has the GPG motif (Table 1). Moreover, cecropin and melittin synthetic hybrids in which the proline of melittin was changed by glycine or was flanked by the same residues showed no hemolytic activities related to the parental peptides and others in which the proline remains present (Shin et al. 1999). Therefore, it was hypothesized that the proline residue (P14) at the center of the structure of Pin2 is responsible for such activity. Based on low hemolytic activity shown by two α -helical peptides from the venom of the spider *O. takiobus* and *P. goeldii*, synthetic variants of Pin2 were constructed with the aim of decreasing its hemolytic activity. The antimicrobial spider peptide Oxki2 has a GVG motif and the antimicrobial ponericin has a GPG motif in the middle of their structure. These natural analogs prompt us to design a low hemolytic peptide with a GVG motif. Therefore, four variants P14V, P14VG, P14GV and P14GVG were chemically synthesized

and assayed. In this work, we report the chemical and biological characteristics of such Pin2 variants.

Materials and methods

Microorganisms

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhi* ATCC 6399 were purchased directly from the American Type Culture Collection through The Global Bioresource Center™ by UNAM. The strains *Streptococcus agalactiae* and *Shigella flexneri* were a donation from a local clinic and identified in our laboratory.

Peptide synthesis of Pin2 variants

Pin2 and its variants were chemically synthesized by a solid-phase method using the Fmoc methodology on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer. Fmoc-Gln(tBu)-PEG resin (Watanabe Ltd., Hiroshima, Japan) was used to provide a free carboxyl group at the C-terminus of Pin2 and its variants. Cleavage and deprotection of peptide resins were performed using a chemical mixture composed of 1 g crystalline phenol, 0.2 g imidazole, 1 ml thioanisole, 0.5 ml 1,2-ethanedithiol in 20 ml trifluoroacetic acid (TFA). The resin was removed by filtration, and the deprotected peptides in solution were precipitated using cold ethyl ether. The precipitated peptide was washed twice with cold diethyl ether to remove remaining scavengers and protecting groups. The crude synthetic peptide was then dissolved in a 25% aqueous acetonitrile solution and separated by reverse-phase HPLC on a semipreparative C₁₈ column (10 × 250 mm, Nacalai Tesque, Japan). Cation exchange chromatography and C₁₈ analytical

reverse-phase HPLC were further used to purify the synthetic peptides. The structural identities of the synthetic peptides were verified by automatic Edman degradation and mass spectrometry using a Finnigan LCQ^{DUO} electrospray ionization ion trap mass spectrometer (San Jose, CA, USA).

Circular dichroism (CD) measurements

Circular dichroism spectra were obtained on a Jasco J-725 spectropolarimeter (Jasco, Japan). The spectra were measured from 260 to 190 nm in 60% trifluoroethanol (TFE), pH 7.1 at room temperature, with a 1 mm path-length cell. Data were collected at 0.1 nm with a scan rate of 100 nm/min and a time constant of 0.5 s. The concentration of the peptides was 40 µg/ml. Data were the average of three separate recordings. Percentages of α -helix content were calculated from the spectra using the software CDNN, v. 2.1 (Bohm et al. 1992).

Antimicrobial and hemolytic assays

Minimal inhibitory concentrations (MIC) and growth inhibition curves were obtained using pure peptides. Briefly, the inoculums were prepared from fresh bacteria cultures. The minimum inhibitory concentration (MIC) values were defined as the lowest concentration of peptide at which 100% growth inhibition was observed. The cell count for each bacteria tested was 1.2×10^8 CFU/ml in Mueller–Hilton agar according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, <http://www.clsi.org>) recommendations. Serial dilutions of peptides were arranged at concentrations of 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 and 300 µM.

For growth curves, the final volume in each vial was 200 µl and the cell count was 1×10^5 CFU/ml for *S. aureus* at the initial time. Serial dilutions of peptides were arranged, and an aliquot of cell suspension was added to each vial. The final peptide concentration ranged from 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25 and 12.5 µM. The optical density (OD) of each vial was measured at 625 nm in an ELISA reader (BioRad, model 450, Hercules, CA, USA). The positive control contained only the bacterial suspension, and the negative control contained only sterile culture medium.

Hemolytic activity was determined by incubating suspensions of human red blood cells with serial dilutions of each selected peptides. Red blood cells were rinsed several times in PBS by centrifugation for 3 min at 3,000g until the OD of the supernatant reached the OD of the control (PBS only). Red blood cells were counted by a hemacytometer and adjusted ca to $7.7 \times 10^6 \pm 0.3 \times 10^6$ cells/ml. Red blood cells were then incubated at room temperature for 1 h in 10% Triton X-100 (positive control), in PBS

(blank), or with amphipathic peptides at concentrations of 0.39, 0.78, 1.6, 3.1, 6.2, 12.5 and 25 µM. The samples were then centrifuged at 10,000g for 5 min, the supernatant was separated from the pellet, and its absorbance measured at 570 nm. The relative optical density compared to that of the suspension treated with 10% Triton X-100 defined the percentage of hemolysis.

Statistical analysis

The last significant difference method was used to determine whether statistically significant differences occurred among the mean values obtained. The hemolysis constants (IC₅₀) were obtained using a non-linear regression where the data was fit the Boltzmann sigmoidal equation using the software package Prism 4 (GraphPad, Inc.).

Results

Peptide synthesis of Pin2 variants

Chemical synthesis of Pin2 and Pin2 variants was performed in 0.1 mmol Fmoc chemistry. The theoretical yield for 0.1 mmol peptidyl resin was 260 mg of crude synthetic peptide. Pin2 and Pin2 variants were purified by reverse-phase HPLC (rpHPLC) as describe in “[Material and methods](#)”. The final yields after chromatographic purification of Pin2 variants were 40, 38, 36, 36 and 34% for Pin2, P14 [V], P14 [VG], P14 [GV] and P14 [GVG], respectively. Since a proline residue was substituted from the original amino acid sequence, the chromatographic elution times were different (Fig. 1). All Pin2 variants eluted at close retention times, and before 60% acetonitrile (solvent B) was reached under the HPLC conditions already described. All purified Pin2 variants were proved to have the expected molecular masses. For instance, the experimental versus the theoretical masses expected were 2,612.1/2,612.0 for the native Pin2, 2,614.1/2,614.1 for P14 [V], 2,671.1/2,671.0 for P14 [VG], 2,671.1/2,671.0 for P14 [GV], and 2,728.2/2,729.0 for P14 [GVG], respectively. With all five chemically synthesized peptides structural analyses as well as antimicrobial and hemolytic experiments were performed.

Secondary structure

The CD spectra of Pin2 variants were compared. The secondary structure analysis was performed using CD spectral data from 190 to 260 nm. Pandinin 2 and Pandinin 2 variants showed an unordered structure in aqueous solution (data not shown). However, in the presence of 60% TFE, the CD spectra of all peptides changed

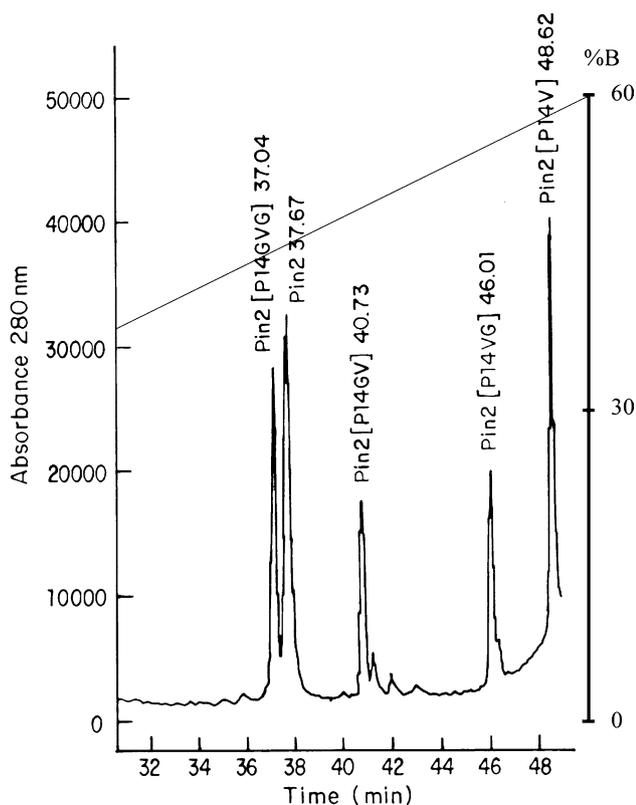


Fig. 1 Elution times of Pin2 and its variants. The peptides (10 nmol each) were fractionated using a reverse-phase analytical C_{18} column (5C₁₈MS, 4.6 × 250 mm) equilibrated in 15% acetonitrile containing 0.1% TFA for 5 min, and eluted with a linear gradient of acetonitrile from 15 to 60% in 0.1% TFA, run for 45 min (1%B/min) at a flow rate of 1 ml/min

dramatically and indicated a more ordered structure with a minimum ellipticity at 208 and 222 nm (Fig. 2). These data are consistent with formation of a α -helix in aqueous TFE or in a membrane-mimetic environment, as observed previously with other amphipathic antimicrobial peptides (Mor et al. 1991; Wong et al. 1997; Batista et al. 1999; Amiche et al. 2000).

Antimicrobial activity

Growth in solid culture medium

In solid culture media (agar), the antimicrobial activity of Pin2 and Pin2 variants were tested against the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. They were also tested against the Gram-negative bacteria *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. Table 2 shows the minimum inhibitory concentration according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Under our bioassay conditions, Pin2 displayed strong activity, with few variations between the target

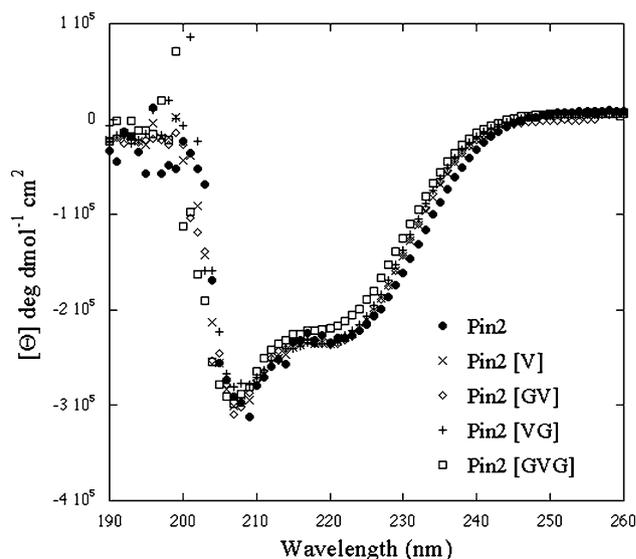


Fig. 2 Circular dichroism spectra of Pin2 and its variants in 60% TFE. The concentration of the peptides was 670 μ g/ml. The alpha-helical values of the parental peptide Pin2 and the Pin2 variants were more than 98%. Data is the average of three separate recordings

microorganisms. Pandinin 2 variants had weak activity against all bacteria tested except the variant Pin2 [GVG], which showed clear activity against all bacteria tested. Indeed, Pandinin 2 was almost twice more active against *S. aureus*, *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* and *E. coli* than Pin2 [GVG].

Growth in liquid culture medium

In liquid culture media, the antimicrobial activity of Pin2 and Pin2 variants were tested only against *S. aureus*. This Gram-positive bacterium is one of the main concerns in several topical infections. The growth of *S. aureus* was observed under serial dilutions of all antimicrobial peptides from 0.4 to 12.5 μ M. Figure 3a shows only the growth curves of *S. aureus* under 12.5 μ M for each Pin2 variants. Under our bioassay conditions, Pin2 and all Pin2 variants displayed strong activity against this pathogenic bacterium, with few variations. An unexpected result was the variant Pin2 [V], which did not have antimicrobial properties at concentrations higher than 300 μ M in solid agar media, but it has comparable activity to all Pin2 variants at 12.5 μ M. These results show that amino acid modification at the proline position is irrelevant for the antibiotic activity towards *S. aureus*.

Hemolytic assays

Assays of Pin2 and Pin2 variants on human erythrocytes showed that Pin2 had the highest hemolytic activity of all of them, with 91% hemolysis observed at 25 μ M for Pin2 but only 52% for Pin2 [GVG] at a similar concentration

Table 2 Minimum inhibitory concentrations of Pin2 and Pin2 variants

Strain	Gram (\pm)	Minimum inhibitory concentrations (μ M)				
		Pin2	P14V	P14GV	P14VG	P14GVG
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	37.5	NA	300	300	75.0
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	+	37.5	NA	300	300	37.5
<i>S. agalactiae</i>	+	18.8	NA	300	300	37.5
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	+	18.8	NA	300	300	37.5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	18.8	NA	300	300	37.5
<i>S. flexeri</i>	-	37.5	NA	300	300	37.5
<i>S. typhi</i> ATCC 6399	-	37.5	NA	300	300	37.5

NA No antimicrobial activity

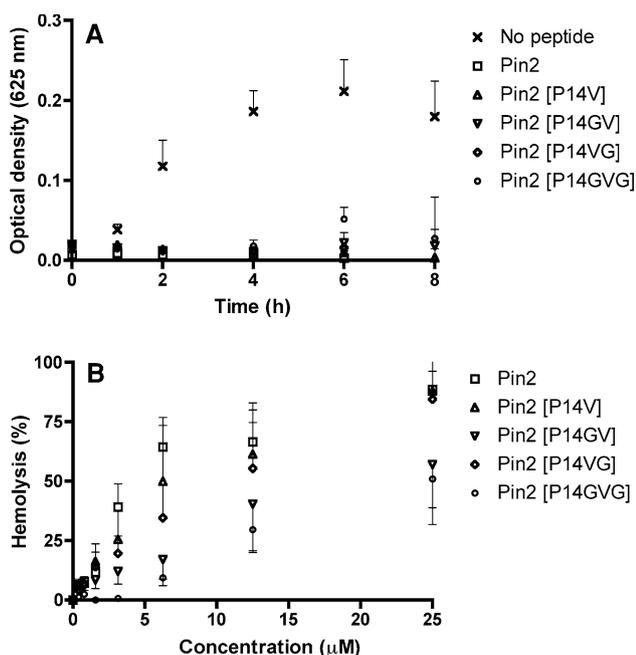


Fig. 3 Biological activity of Pin2 and Pin2 variants. **a** Antimicrobial activity was assayed using *S. aureus*. The concentration of peptides used was 12.5 μ M. **b** Hemolytic activity was measured using human red blood cells. Data are the average of at least four independent experiments. Error bars represent the standard deviations

(Fig. 3b). Similarly, the variant Pin2 [GV] had lower hemolytic activity compared to the more hydrophobic variants Pin2 [V] and [VG]. Moreover, it can be observed that the difference in hemolysis between the parental peptide Pin2 and its variants is conserved from 0.78 to 25 μ M; that is, the cell membrane disruption of such peptides seems to be unaffected by the peptide concentration.

Helical wheel projections

To understand schematically the amino acid substitutions in Pin2, helical projections of Pin2 and Pin2 variants were

generated (Fig. 4). First, both helical wheels of Pin2 and Pin2 [V] look similar with the exception that the hydrophobic residue Val replaces the hydrophilic residue Pro. This replacement introduces a hydrophobic moiety in the hydrophilic face of Pin2 (left side of the helical wheel); therefore, it could be observed that such substitution increases the hydrophobic section in Pin2 [V], which is correlated with its low diffusion in agar media. On the other hand, looking at helical wheel of the Pin2 variant [GVG], it could be observed that the hydrophilic part of this peptide (left side) has been crowded with hydrophobic residues. However, it is also observed that the hydrophobic face (right side of the helical wheel) has been disrupted because of the inclusion of hydrophilic residues such Gly15 and Ser17. Moreover, other residues such Ser23 and Ser20 in such hydrophobic face may also balance the amphipathic properties of Pin2 [GVG]. Such equilibrium between the left and right side of the helical wheel seems to improve the antimicrobial activity of Pin2 [GVG] as observed in Table 2. In a quantitative basis the grand average of hydropathy (GRAVY) values of the hydrophobic face of Pin2 (FLLLAWIAFLSKFD) and Pin2 [GVG] (FLLGAWIASL-FSSK) were 1.61 and 1.25, respectively (Fig. 4). Therefore, Pin2 [GVG] is less hydrophobic than the parental Pin2 as observed in Fig. 1. Finally, the peptide variants [VG] and [GV] as well as the variant [GVG] also introduce hydrophilic residues in the right side of the helical wheel with the exemption that the variant [VG] has a hydrophobic neighbor Phe21 besides the par Ile13Val14, which make it a little more hydrophobic than that of [GV].

Discussion

Proline residues can be found frequently at the midpoint regions of α -helical components of trans-membrane proteins, where it shows a significant concentration in the central part of the amino acid sequence of trans-membrane α -helices, and it is often found prior to glycine residues

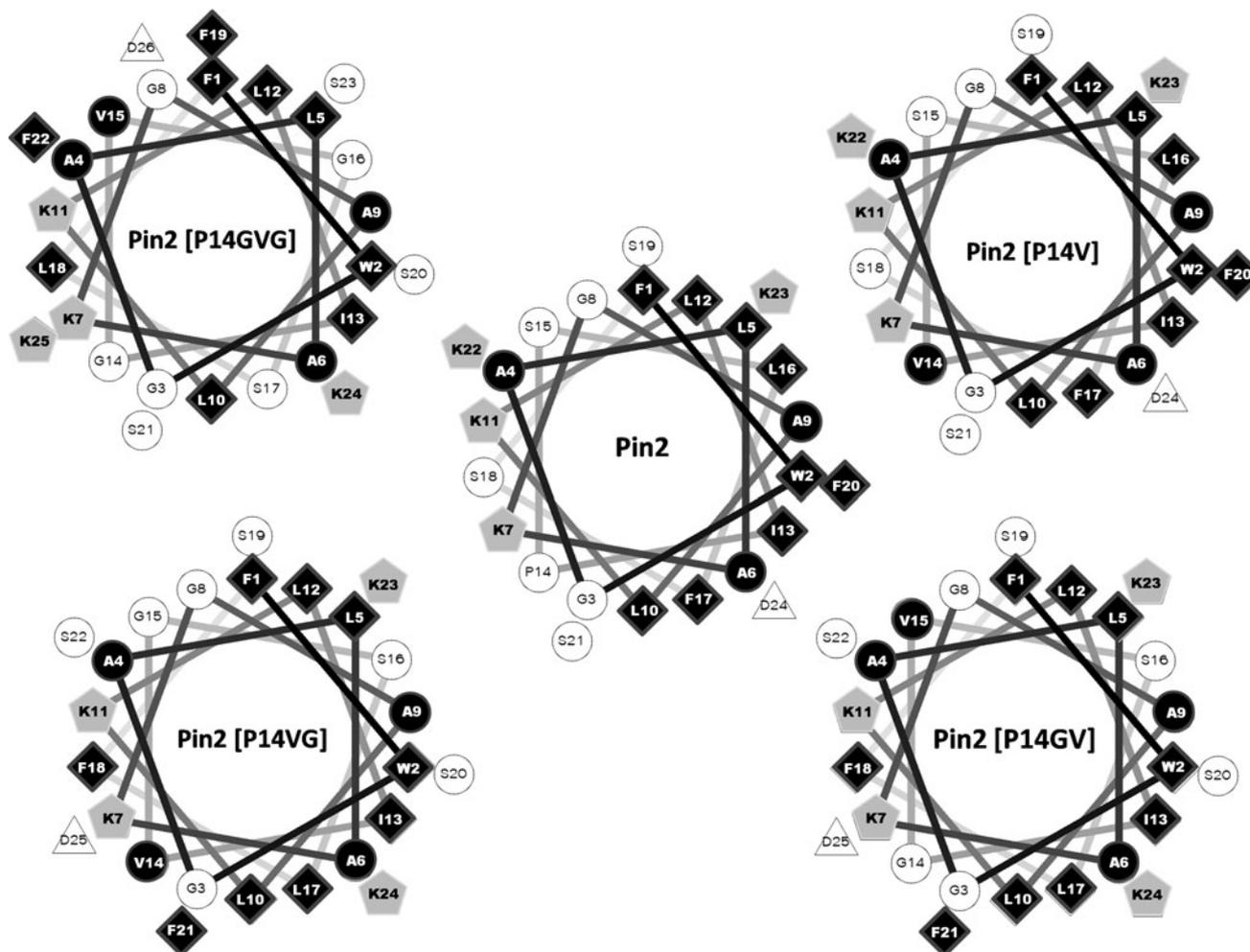


Fig. 4 Helical wheel diagrams of Pin2 and Pin2 variants. Helical wheels were prepared by the software Helical Wheel Projections; wheel.pl, v 1.3 (Zidovetzki et al. 2003). The hydrophobic, hydrophilic and neutral residues are colored in *black*, *gray* and *white*, respectively

(Sansom 1992; Bywater et al. 2001). Due to steric hindrance and the loss of hydrogen bonds, the proline residue introduces a region of flexibility in the trans-membrane structure, which is sometimes increased by the presence of glycine residues; therefore, the high frequency of proline residues in this kind of proteins implicates important structural and functional roles (Cordes et al. 2002). Similar to trans-membrane α -helices, proline plays an important role in the biological activity of the amphipathic and cationic α -helical peptides. Both the chemical synthesis and the purification of Pin2 and Pin2 variants showed different chemical properties of proline substitution by the residues [V], [GV], [VG] and [GVG] in Pin2. According to the elution times under reverse-phase HPLC, the proline substitution by [V] produces a more hydrophobic peptide. This result was expected because valine is a more hydrophobic residue than proline; however, the addition of a glycine residue to form Pin2 [VG] and Pin2 [GV] produces a less hydrophobic antimicrobial Pin2. Although the theoretical

GRAVY Index of Pin2 [VG] and Pin2 [GV] are the same, experimentally the hydrophobicity of Pin2 [VG] is higher than that of Pin2 [GV] because the existence of a hydrophobic patch formed by residues I13V14 is formed in Pin2 [VG] (Fig. 4). Indeed, only the parental Pin2 and the variant [GVG] have hydrophilic clusters constituted by G3P14S21 and G3G14S21 in Pin2 and Pin2 [GVG], respectively (Fig. 4). The proline substitution by [GVG] re-established the ratio between the hydrophilicity and hydrophobicity in Pin2 [GVG]. The hydrophobicity of Pin2 and Pin2 variants are correlated to their biological activities in the agar diffusion assays because the more hydrophobic variants [V], [GV] and [VG] had lower antimicrobial properties than that of the less hydrophobic Pin2 and Pin2 [GVG]. In other words, Pin2 [V], [VG] and [GV] were less active in solid culture assays, and only the variant Pin2 [GVG] had important biological activity. Although all four variants conserved their secondary structure, the peptide Pin2 [V] showed no antimicrobial activity against any

Table 3 Therapeutic index of Pin2 and Pin2 variants for *S. aureus*

Peptide	Hemolysis (IC ₅₀) ^a	MIC (diffusion assay) ^b	MIC (dilution assay)	Therapeutic index ^b	Therapeutic index ^c
Pin2	3.3 (1.9–4.6)	37.5	12.5	0.09	0.26
Pin2 [P14V]	6.4 (0.0–13.2)	NA	12.5	–	0.51
Pin2 [P14GV]	9.3 (0.1–18.5)	300	12.5	0.03	0.74
Pin2 [P14VG]	8.8 (2.2–15.4)	300	12.5	0.03	0.70
Pin2 [P14GVG]	11.5 (8.4–14.6)	37.5	12.5	0.3	0.92

NA No antimicrobial activity

^a Mean and 95% confidence intervals

^b Therapeutic index represents IC₅₀ (hemolysis)/MIC (diffusion assay)

^c Therapeutic index represents IC₅₀ (hemolysis)/MIC (dilution assay)

bacteria used under the agar diffusion assay. Such result may be related to the hydrophobicity of Pin2 [V]. The unexpected lack of activity of Pin 2 [V] and the low activity of Pin2 [VG] and [GV] may be due to its limited diffusion through the agar media primarily because of the hydrophobic nature of such peptide. Similar results were observed for Nisin an antimicrobial peptide produced by *Lactococcus lactis* (Chandrapati and O'Sullivan 1998). Usually, a major limitation of plate diffusion assays is that antibiotic diffusion through agar media is proportional to its concentration only over a limited linear range, and such antibiotic levels should be restricted to this range. Beyond this range, the zone diameters cannot be accurately related directly to the concentration of such antibiotics (Chandrapati and O'Sullivan 1998). In the liquid culture medium all five peptides kept their antimicrobial properties. There were no significant differences ($p < 0.05$) in the biological activity among all five peptides towards *S. aureus* (Fig. 3a). The MIC of Pin2 and Pin2 variants in the liquid culture medium was similar because they all had the same value; so, this data is valuable because one of the main potential applications of antimicrobial peptides is on topical infections, which develop in semi-solid environments such skin wounds where peptide diffusion plays an important role. Therefore, for topical clinical applications, the MIC values of plate diffusion assays offer advantages over that of MIC values in the liquid culture medium.

Concerning the hemolytic activities, the peptide variant P14 [GVG] had the lowest hemolytic activity of all five antimicrobial peptides. Such results are probably related to the composition of the cellular membrane. Eukaryotic membrane cells are more enriched in neutral phospholipids and cholesterol than bacterial membranes, which had a significant proportion of acidic phospholipids such phosphatidic acids.

The therapeutic index defined as the relationship between the hemolysis and the MIC values of all antimicrobial peptides was better for the variant Pin2 [GVG] (Table 3). Therefore, modifications of the proline residue

for other amino acid motifs could be one way to improve the therapeutic index of highly hemolytic antimicrobial peptides.

Structures involving two helices separated by a flexible hinge region or a kink in the chain associated with a proline were reported for melittin (Bazzo et al. 1988), caerin 1.1 (Wong et al. 1997), sarcotoxin IA (Iwai et al. 1993), or cecropin A (Holak et al. 1988). Contrary to such antimicrobial peptides, Pin2 has a strongly basic C-terminal linked to a neutral N-terminal by a rigid proline link. The overall structure deduced by NMR for Pin2 is also two amphipathic segments joined by the proline hinge (Corzo et al. 2001). Therefore, the purpose of this work was to replace such proline for a more flexible hinge such GV, VG or GVG similar to the flexible Gly-Val and Gly-Pro hinges found in other natural antimicrobial peptides such oxypinins, ponerocins and cecropins. Here, we found that the proline is an essential residue in this peptide, but it can be substituted successfully with amino acid residues that maintain the hydrophobic/hydrophilic characteristics of the peptide as well as its secondary structure keeping the range in antimicrobial activity and reducing its hemolytic properties compared with the parental Pin2 antimicrobial peptide.

Acknowledgments This work was supported by grants from CONACyT 83962/2007 to E.V., and CONACyT 49773/24968 to G.C. The mass spectrometry determination conducted by Dr. Fernando Zamudio is greatly acknowledged. The authors also acknowledge QBP Ma. Rocio Patiño Maya from Instituto de Química–UNAM for CD spectra data acquisition. Alexis Rodriguez is recipient of a PhD scholarship (#199738) from CONACyT.

Conflict of interest statement The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Amiche M, Seon AA, Wroblewski H, Nicolas P (2000) Isolation of dermatoin from frog skin, an antibacterial peptide encoded by a

- novel member of the dermaseptin genes family. *Eur J Biochem* 267:4583–4592
- Andreu D, Rivas L (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47:415–433
- Batista CVF, Rosendo da Silva L, Sebben A, Scaloni A, Ferrara L, Paiva GR, Olamendi-Portugal T, Possani LD, Bloch C Jr (1999) Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides* 20:679–686
- Bazzo R, Tappin MJ, Pastore A, Harvey TS, Carver JA, Campbell ID (1988) The structure of melittin. A $^1\text{H-NMR}$ study in methanol. *Eur J Biochem* 173:139–146
- Bohm G, Muhr R, Jaenicke R (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* 5:191–195
- Bywater RP, Thomas D, Vriend G (2001) A sequence and structural study of transmembrane helices. *J Comput Aided Mol Des* 15:533–552
- Chandrapati S, O'Sullivan DJ (1998) Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *J Biotechnol* 63:229–233
- Cordes FS, Bright JN, Sansom MSP (2002) Proline-induced distortions of transmembrane helices. *J Mol Biol* 323:951–960
- 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*. *Biochem J* 359:35–45
- Corzo G, Villegas E, Gomez-Lagunas F, Possani LD, Belokoneva OS, Nakajima T (2002) Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider *Oxyopes kitabensis* with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins. *J Biol Chem* 277:23627–23637
- Dathe M, Kaduk C, Tachikawa E, Melzig MF, Wenschuh H, Bienert M (1998) Proline at position 14 of alamethicin is essential for hemolytic activity, catecholamine secretion from chromaffin cells and enhanced metabolic activity in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1370:175–183
- Dempsey CE, Bazzo R, Harvey TS, Syperek I, Boheim G, Campbell ID (1991) Contribution of proline-14 to the structure and actions of melittin. *FEBS Lett* 281:240–244
- Holak TA, Engstrom A, Kraulis PJ, Lindeberg G, Bennich H, Jones TA, Gronenborn AM, Clore GM (1988) The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* 27:7620–7629
- Iwai H, Nakajima Y, Natori S, Arata Y, Shimada I (1993) Solution conformation of an antibacterial peptide, sarcotoxin IA, as determined by $^1\text{H-NMR}$. *Eur J Biochem* 217:639–644
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105–132
- Mor A, Nguyen VH, Delfour A, Migliore-Samour D, Nicolas P (1991) Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry* 30:8824–8830
- Oren Z, Shai Y (1997) Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure–function study. *Biochemistry* 36:1826–1835
- Orivel J, Redeker V, Le Caer JP, Krier F, Revol-Junelles AM, Longeon A, Chaffotte A, Dejean A, Rossier J (2001) Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J Biol Chem* 276:17823–17829
- Sansom MSP (1992) Proline residues in transmembrane helices of channel and transport proteins: a molecular modelling study. *Protein Eng* 5:53–60
- Shin SY, Kang JH, Lee DG, Jang SY, Seo MY (1999) Influences of hinge region of a synthetic antimicrobial peptide, cecropin A(1–13)-melittin(1–13) hybrid on antibiotic activity. *Bull Korean Chem Soc* 20:1078–1084
- Thennarasu S, Nagaraj R (1996) Specific antimicrobial and hemolytic activities of 18-residue peptides derived from the amino terminal region of the toxin pardaxin. *Protein Eng* 9:1219–1224
- Wong H, Bowie JH, Carver JA (1997) The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *Eur J Biochem* 247:545–557
- Zidovetzki R, Rost B, Armstrong DL, Pecht I (2003) Transmembrane domains in the functions of Fc receptors. *Biophys Chem* 1000:555–575