

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

//  
2ej

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN PEPTIDO  
ANTIBACTERIANO DEL VENENO DEL ALACRAN

*Hadrurus aztecus.*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

**P R E S E N T A :**

**ALFREDO TORRES LARIOS**

273764

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MOR., MEXICO, 1999.



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.

## **JURADO DE EXAMEN**

Presidente: Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Secretario: Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

Vocal: Dr. Mario Henry Rodríguez López

Suplente: Dr. Eduardo Horjales Reboredo

Suplente: Dr. Lorenzo Segovia Forcella

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Lourival Domingos Possani Postay.**

**Este trabajo fue financiado en parte por donativos del Howard Hughes Medical Institute (75197-527107) y de la compañía Glaxo-Wellcome de México S.A de C.V. El sustentante fue becario de CONACyT (117010) y de la DGEP de la UNAM.**

**Se agradece a las siguientes personas e instituciones su participación en este proyecto:**

**Sr. Fredy I. Coronas Valderrama por su ayuda inicial en la purificación de péptidos.**

**MC Timoteo Olamendi Portugal por la secuenciación de péptidos y análisis de aminoácidos de los mismos.**

**MC Fernando Zamudio Zuñiga y Dra. Georgina Gurrola Briones por la síntesis del péptido sintético.**

**Dr. Brian Martin, del National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, por los análisis de espectrometría de masas.**

**Biól. Silvia Tenorio Salgado, por la realización de los ensayos preliminares de permeabilización de membranas.**

**Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) por la donación de las cepas bacterianas usadas.**

**Quím. Ricardo C. Rodríguez de la Vega Cuéllar por sus comentarios y sugerencias.**

## INDICE

ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCION	11
I. Generalidades	11
II. Clasificación de los péptidos antimicrobianos	12
III. Modo de acción	23
IV. Mecanismos de resistencia	28
V. Aplicaciones	28
ANTECEDENTES	30
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y METODOS	31
Obtención y separación del veneno	31
Caracterización química	31
Síntesis química del péptido y su purificación	32
Ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano en fase líquida	32
Ensayo de actividad hemolítica	32
Preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV)	33
Estudio de permeabilidad de membrana	33

RESULTADOS	34
Aislamiento y purificación del veneno	34
Determinación de la estructura primaria	34
Actividad antibacteriana y citotóxica	38
Síntesis del péptido en fase sólida	38
Análisis de la secuencia	38
Estudio de permeabilidad de membrana	41
DISCUSION	45
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	49
BIBLIOGRAFIA	50
APENDICE	64

# FALTAN PAGINAS

De la:

**1**

A la:

**7**

## ABREVIATURAS

aa	aminoácido(s)
Ala (A)	alanina
Arg (R)	arginina
Asn (N)	asparagina
Asp (D)	ácido aspártico
AspN	endopeptidasa cuyo sitio de corte es el extremo amino terminal de residuos de ácido aspártico
BSA	albúmina de suero bovina
Cys (C)	cisteína
CLAP	cromatografía líquida de alta presión
Da	dalton
DiS-C2-5	3, 3' -diethyltio-ioduro de dicarbocianina
DPhPC	1,2-diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocolina
DPhPS	1,2-diphytanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoserina
Gln (Q)	glutamina
Glu (E)	ácido glutámico
Gly (G)	glicina
HCl	ácido clorhídrico
Hepes	ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetsulfónico
His (H)	histidina
Ile (I)	isoleucina
KCl	cloruro de potasio
Leu (L)	leucina
Lys (K)	lisina
MeGlc	metil glucamina
Met (M)	metionina
mg	miligramos
MIC	concentración mínima inhibitoria
ml	mililitros
mM	milimolar
mV	milivoltios
N	normalidad
nm	nanómetros
nM	nanomolar
PBS	amortiguador salino de fosfatos
Phe (F)	fenilalanina
Pro (P)	prolina
Ser (S)	serina
SUV	vesículas unilamelares pequeñas
TFA	ácido trifluoroacético
TFE	trifluoroetanol
Thr (T)	treonina
Trp (W)	triptofano
Tyr (Y)	tirosina
Val (V)	valina
$\mu$ M	micromolar

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Separación por filtración molecular del veneno de *Hadrurus aztecus*.
- Figura 2 a.** Separación por CLAP de la fracción III.  
**b.** Separación por CLAP de los fragmentos de digestión con AspN
- Figura 3.** Secuencia de aminoácidos de la Hadrurina
- Figura 4.** Actividad antibiótica de la Hadrurina.
- Figura 5.** Efecto hemolítico de la Hadrurina.
- Figura 6.** Comprobación por CLAP de la identidad de la Hadrurina sintética con la nativa.
- Figura 7.** Similitud de la Hadrurina con otros péptidos antimicrobianos.
- Figura 8.** Predicción de la estructura secundaria y diagrama de Schiffer-Edmundson.
- Figura 9.** Modelo de la estructura tridimensional de la Hadrurina.
- Figura 10.** Disipación máxima del potencial de difusión de vesículas inducida por Hadrurina.
- Tabla 1.** Composición de aminoácidos de los fragmentos de digestión del péptido con AspN.

## RESUMEN

En los últimos 20 años se han aislado una serie de péptidos antimicrobianos provenientes de diversos organismos, tanto vertebrados como invertebrados. Dichos péptidos son interesantes desde el punto de vista inmunológico, clínico y para el estudio de la relación estructura-función de proteínas. Muchas de estas moléculas se han obtenido de la hemolinfa de organismos del Phylum Arthropoda. En el laboratorio analizamos la posibilidad de que este tipo de péptidos se encontrara en el veneno del alacrán excavador *Hadrurus aztecus*. Logramos aislar, de especímenes no infectados experimentalmente, un péptido de 41 aminoácidos de carácter básico, al cual denominamos Hadrurina, y que demostró tener actividad tóxica contra una serie de bacterias dentro del rango micromolar, así como una importante actividad citolítica. Esto hace suponer que podría servir como elemento de ataque y defensa de este artrópodo contra su presa y microorganismos invasores. Este péptido, cuya estructura predicha es alfa helicoidal, fue sintetizado químicamente, y su actividad bactericida fue esencialmente idéntica a la del nativo, comprobándose la autenticidad del hallazgo. La Hadrurina muestra similitudes en cuanto a su estructura primaria con péptidos antimicrobianos de organismos muy distantes evolutivamente, lo que demuestra la aparición temprana y conservación de estas moléculas en el reino animal. Finalmente, un estudio de permeabilidad realizado en liposomas de diferente composición mostró que este péptido es capaz de permeabilizar tanto membranas cargadas negativamente como de carácter zwitteriónico, en el mismo rango de concentraciones en que se presenta la actividad tóxica, con lo que se comprueba su baja selectividad, y que el blanco de este péptido, al igual que el de la mayoría de las moléculas de este tipo, es la membrana plasmática. Se proponen una serie de modificaciones con el fin de aumentar la preferencia de la Hadrurina hacia membranas bacterianas.

# INTRODUCCION

## I. GENERALIDADES

Todos los organismos pluricelulares son atacados constantemente durante su ciclo vital por una gran variedad de microorganismos patógenos, ya sean virus, bacterias, protozoarios, u hongos. En respuesta a estas infecciones se han desarrollado mecanismos de defensa que han permitido la permanencia y evolución de los sistemas eucariotes. Dichos mecanismos pueden ser divididos, de manera general, en inmunidad adaptativa, representada por el sistema de las inmunoglobulinas, que tiene las características de especificidad y memoria; e inmunidad innata, que desata un respuesta poco específica pero inmediata en el organismo y que le permite retrasar o evitar el crecimiento microbiano antes de que el sistema adaptativo pueda ser movilizado (Boman, 1995). Este tipo de respuesta es inherente a cualquier organismo no unicelular, mientras que el primero sólo se encuentra en vertebrados.

La inmunidad innata empezó a ser estudiada hasta hace pocos años, y fue a partir de dos líneas distintas de investigación. por un lado la de los mecanismos por los cuales la hemolinfa de insectos libre de células mata a las bacterias (Steiner *et al*, 1981), y por otro la de los mecanismos por los que las células fagocíticas de mamífero matan a las bacterias dentro de las vacuolas (Selsted *et al*, 1985), que fueron descubiertas las primeras moléculas conocidas ahora genéricamente como péptidos antimicrobianos. Desde entonces se han aislado una gran variedad de péptidos con esta propiedad, la mayoría de ellos de artrópodos, anfibios, plantas y mamíferos (revisado en Cociancich *et al*, 1994; Barra y Simmaco, 1995; Broekaert *et al*, 1995; Ganz y Lehrer, 1998). Asimismo, su papel funcional *in vivo* ha quedado bien establecido en algunos casos, tanto en insectos (Lemaitre *et al*, 1995, 1996; Braun *et al*, 1998) como en mamíferos (Goldman *et al*, 1997).

Estas moléculas son posiblemente las barreras primarias de defensa más primitivas y representan un componente tanto constitutivo como inducible de la inmunidad innata, dependiendo del tejido, organismo o patógeno (Lemaitre *et al*, 1997; Stolzenberg *et al*, 1997; Ferrandon *et al*, 1998; Dimopoulos *et al*, 1997, 1998). La mayor parte de ellas comparten características como la presencia de múltiples residuos de lisina y arginina, carácter anfipático, y tamaño de entre 2 y 5 kDa, por lo que se producen por el organismo con un gasto mínimo de energía y biomasa (Levashina *et al*, 1995). Su espectro de actividad es muy amplio (bacterias, protozoarios, hongos) y trabajan localmente a altas concentraciones (1-50  $\mu\text{M}$ ), por los que sus concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) son elevadas en comparación con otros antibióticos (Maloy y Kari, 1995).

Sus efectos citotóxicos se anulan porque se almacenan en gránulos y sólo se liberan en las vacuolas de las células fagocíticas, o bien porque sus precursores, de 2 a 5 veces más grandes que las moléculas maduras, inactivan al péptido por la presencia de aminoácidos ácidos, contrarrestando sus cargas positivas. Empero, muchos de ellos pueden circular libremente por el organismo, lo que indica su nula toxicidad hacia células eucariotes (Lehrer y Ganz, 1990; Barra *et al*, 1998).

## II. CLASIFICACION DE LOS PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Actualmente se conocen más de 140 moléculas de este tipo, las cuales de manera general pueden dividirse, de acuerdo a sus características estructurales, en cinco grandes grupos: alfa helicoidales, con un puente disulfuro, con dos puentes disulfuro, con tres o cuatro puentes disulfuro, y aquéllos que presentan abundancia de algún aminoácido, particularmente prolina y triptofano. Se describen a continuación los péptidos pertenecientes a cada grupo. Algunas secuencias y estructuras representativas, así como las características principales de cada tipo de péptido, se presentan en el apéndice.

### Alfa helicoidales

**Cecropinas (35 a 37 aa).**- Fueron los primeros péptidos antimicrobianos aislados (Steiner *et al*, 1981). Su nombre se debe a que fueron obtenidos inicialmente de la hemolinfa de larvas infectadas experimentalmente de *Hyalophora cecropia*, aunque también se encuentran en su matriz cuticular (Brey *et al*, 1993). Actualmente se conocen cerca de 20 isoformas, todas amidadas y tóxicas para bacterias gram positivas y gram negativas, aisladas de diferentes insectos como *Sarcophaga peregrina* (Okada y Natori, 1985) y *Drosophila melanogaster*. En estos organismos, por ejemplo, las cecropinas de tipo A son idénticas a pesar de sólo conservar el 73% de su secuencia de DNA, por lo que debe haber una fuerte presión de selección que conserva ciertas secuencias en diferentes especies (Boman *et al*, 1991).

Se han encontrado además tres isoformas en el tunicado *Styela clava* (protocordado marino) llamadas styelinas (Lee *et al*, 1997b; Zhao *et al*, 1997), y otra en mamífero (ver más adelante).

La estructura de algunas de ellas, como la Cecropina A, se ha resuelto mediante resonancia magnética nuclear, en ambientes que promueven la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, como mezclas de trifluoroetanol (TFE)-agua. La estructura consiste en una hélice N-terminal anfipática de 20 residuos, una región flexible debida a la presencia de un tripéptido Ala-Gly-Pro, y una hélice C-terminal hidrofóbica de 10 residuos aproximadamente (Holak *et al*, 1988). La flexibilidad central de estos péptidos y otros como melitina y pardaxina (ver más adelante para su descripción) es importante para su actividad antibacteriana. Este doblez de entre 20 y 30 grados, inducido por el residuo de prolina, posiblemente facilita la inserción de las regiones hidrofóbicas del péptido a su blanco (Christensen *et al*, 1988; Fink *et al*, 1989).

Los isómeros D son 100% activos, lo cual se ha probado tanto para Cec D (Fink *et al*, 1989), como para Cec A (Wade *et al*, 1990).

Los residuos conservados de las cecropinas son el Trp 2, el cual es muy importante para la actividad (Andreu *et al*, 1985); las Lys en las posiciones 7, 8 y 9, y la Arg en 18.

**Andropina (34 aa).**- Es un péptido que se aisló de fluido seminal de *D. melanogaster*, y el gen que la codifica se induce por cópula. Ataca bacterias gram-positivas. En la proyección de las hélices se muestran cuatro residuos negativos, lo cual es elevado para un péptido de este tipo (Samakovlis *et al*, 1991).

**Magaininas** (21-26 aa).- Se encuentran en la piel y estómago de la rana *Xenopus leavis* (Zaslhoff, 1987; Moore *et al*, 1991). Esta familia de péptidos está formada por la magainina 1 y 2, PGLa, xenopsina, levididina, y caeruleina. Su actividad en bacterias gram negativas es casi 10 veces menor que la de las cecropinas (Bevins *et al*, 1990; Bessalle *et al*, 1990)

La estructura de magainina 2 en ambientes membranales es de una hélice anfipática, sin una región intermedia flexible como la presentada por las cecropinas (Marion *et al*, 1988; Bechinger *et al*, 1993). El isómero D es 100% activo (Wade *et al*, 1990)

Su potencia se incrementa cuando el péptido se amida, se sustituyen los residuos negativos por Ala, o se estabiliza la hélice reemplazando las Gly por Ala.

Por otro lado, la delección de la Lys 4 disminuye su actividad, así como la introducción de Pro en posiciones intermedias (10 u 11) (revisado en Maloy y Kari, 1995).

**Clavaninas** (23 aa).- De *Styela clava*, el urocordado solitario del cual también se aislaron los homólogos de cecropinas ya descritos, se aislaron cuatro péptidos denominados de esta manera, activos contra bacterias gram positivas y negativas. Tienen una ligera similitud con las magaininas, aunque en las primeras muchos de los residuos positivos son His (Lee *et al*, 1997a).

**Lycotoxinas** (25 y 27 aa).- Del veneno de la araña *Lycosa carolinensis* se obtuvieron estos dos péptidos con una cierta similitud con magainina, y que atacan bacterias gram positivas y gram negativas. La lycotoxina I produce 50% de hemólisis a una concentración de 200  $\mu$ M (Yan y Adams, 1998).

**Dermaseptinas** (24-34 aa).- Estos péptidos se han dividido en dos grupos. Uno de ellos se deriva de la piel de la rana *Phyllomedusa sauvagei*. Se han encontrado 5 isoformas conteniendo entre 3 y 6 Lys, con identidades entre 53 y 94%, y que actúan sinérgicamente, mejorando hasta 100 veces su actividad en comparación con los péptidos actuando individualmente.

La isoforma 1 (Dms1) ataca bacterias, levadura, protozoarios, y hongos (*Aspergillus* sp., induciendo alteraciones morfogénicas), con MICs tan bajas como 5  $\mu$ M. Este péptido tiene un dominio de hélice anfipática de 1-27 y otro hidrofílico de 28 a 34, sin estructura regular. El primer dominio (hasta el aminoácido 18) es suficiente para mostrar actividad antibacteriana (Mor *et al*, 1991; 1994a-d).

El segundo grupo, llamado dermaseptinas B, se obtuvo de la rana *Phyllomedusa bicolor*, y comprende 6 péptidos amidados, con identidades entre 33 y 62%, y compartiendo con el primer grupo la conservación de un residuo de Trp en la posición 3, y la ausencia de residuos de Cys, Arg, ni Tyr (Charpentier *et al*, 1998).

Del pez *Pleuronectes americanus* se aisló la pleurocidina, de 25 aa, con ciertos residuos similares a las dermaseptinas (Cole *et al*, 1997)

**Caerinas** (23-25 aa).- Son siete péptidos derivados de piel de ranas del género *Litoria* sp., activos contra bacterias gram positivas y gram negativas. Presentan un motivo Pro-Xaa3-Pro a mitad de la secuencia, lo que hace que su conformación helicoidal adopte en esta región un doblez que separa a dos hélices anfipáticas, con la segunda cambiada de orientación 140° con respecto a la primera (Steinborner *et al*, 1997; Wong *et al*, 1997).

**Misgurina** (21 aa).- Aislado del pez *Misgurnus anguillicaudatus*, este péptido con cinco residuos de Arg y cuatro de Lys. sin homología con ningún otro descrito, es seis veces más potente que la magainina 2. Es tóxico para bacterias gram positivas y gram negativas (Park *et al*, 1997).

**BMAP 27 y 28** (péptidos antimicrobianos mieloides de bovino).- Atacan bacterias gram positivas y negativas en un rango de 0.25-4  $\mu$ M, una de las concentraciones más bajas reportadas para péptidos alfa helicoidales (Skerlavaj *et al*, 1996).

**LL 37**.- Es un péptido de humano, activo contra bacterias gram positivas y gram negativas, expresado constitutivamente en granulocitos y testículo, y por inducción en lesiones de la piel como psoriasis (Frohm *et al*, 1997).

### **Péptidos con un puente disulfuro**

**Bactenecina** (12 aa).- Es el péptido antimicrobiano más pequeño conocido. Se aisló de neutrófilos de bovino. Cuenta con cuatro residuos de Arg y dos de Cys que, al estar unidos con un puente disulfuro, forman un asa central de 9 residuos, con uno y dos residuos sobrantes en cada lado (Romeo *et al*, 1988). Si se elimina el puente disulfuro el espectro antibacteriano, dirigido hacia gram positivas y gram negativas, cambia, pero no se suprime (Wu y Hancock, 1999).

El resto de este tipo de péptidos son derivados de piel de rana, y se pueden dividir en cuatro grupos:

- 1) **Brevininas 1** (20-24 aa), que comprende a la Br1 (Morikawa *et al*, 1992), 1E (Simmaco *et al*, 1994), ranalexina (Clark *et al*, 1994), y gaegurinas 5 y 6 (Park *et al*, 1994).
- 2) **Brevininas 2** (29-34 aa), que comprende a la Br2 (Morikawa *et al*, 1992), gaegurinas 1-3 (Park *et al*, 1994) y rugosinas A y B (Suzuki *et al*, 1995).
- 3) **Esculentina 1** (46 aa) (Simmaco *et al*, 1994).
- 4) **Esculentinas 2** (37 aa) que comprende a la esculentina 2 (Simmaco *et al*, 1994), gaegurina 4 (Park *et al*, 1994) y rugosina C (Suzuki *et al*, 1995).

Estos péptidos, cuyo espectro antibacteriano abarca bacterias gram positivas y gram negativas, se caracterizan por tener 2 residuos de Cys en las posiciones 1 y 7 contadas a partir del C-terminal, formando un motivo que se conoce como "caja rana". Estos aminoácidos forman un puente disulfuro que se puede reducir sin afectar la actividad antibacteriana. Sin embargo, la ausencia de la última cisteína sí es crítica para ésta, posiblemente por la disminución de interacciones hidrofóbicas.

Por lo que respecta al extremo N-terminal, éste es altamente variable en secuencia y tamaño, aunque hay un cierto consenso de los algoritmos de predicción de estructura en que sea helicoidal (Clark *et al*, 1994)

De este grupo se ha resuelto la estructura de la ranalexina, que muestra un alfa hélice anfipática bien definida de los residuos 8 a 17, con asas en los extremos amino y carboxilo (Vignal *et al*, 1998)

## Péptidos con dos puentes disulfuro

**Taquiplesinas** (17-18 aa).- Se derivan del cangrejo *Tachypleus tridentatus*, un gran artrópodo marino que desde hace más de 30 años ha sido objeto de atención debido a que su sistema de coagulación provee un sistema hipersensitivo para la detección de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos. Debido a su tamaño se pueden obtener numerosos hemocitos, lo que condujo al aislamiento de las taquiplesinas (Nakamura *et al*, 1988); estos péptidos amidados presentan dos motivos hidrofob-cys-hidrofob-cys-arg, que junto con el resto de la secuencia forman una hoja beta antiparalela con una vuelta beta de tipo II y dos puentes disulfuro en conexión 1-4 y 2-3, que rigidizan la cadena (Kawano *et al*, 1990; Matsuzaki *et al*, 1991).

Estos péptidos atacan bacterias gram positivas y gram negativas. La taquiplesina I es hemolítica a concentraciones entre 50-100  $\mu\text{M}$  (Ehret *et al*, 1996)

**IbAMPs** (péptidos antimicrobianos de la planta *Impatiens balsamina*) (20 aa).- Es una familia de 4 péptidos con actividad antifúngica y antibacteriana. Forma dos parches hidrofílicos con la Arg 4, 5, 18, y 13, 14, separados por un parche hidrofóbico formado con los residuos Trp 9, Val 17 y Trp 19, y 4 Cys. La disposición de sus residuos de Cys es Cys1-Cys2-8Xaa-Cys3-3Xaa-Cys4, en conexión 1-3 y 2-4 (Patel *et al*, 1998)

**MBP1** (proteína básica de maíz 1) (33 aa).- Es derivada de las semillas de esta planta. Es antibacteriana y antifúngica. Tiene cuatro Cys agrupadas en dos motivos con disposición Cys-3Xaa-Cys. (Duvick *et al*, 1992)

## Péptidos con tres o cuatro puentes disulfuro

**Defensinas de insecto** (39-43 aa).- Con este nombre se designan a cerca de 30 péptidos aislados de una variedad de insectos (revisado en Hoffmann y Hetru, 1992), con excepción de órdenes antiguos como Ortoptera (grillos, saltamontes), o Dictyoptera (cucarachas) (sólo se ha encontrado una en larvas del alado primitivo *Aeschna cyanea*) (Bulet *et al*, 1992). Sin embargo, sí se han podido aislar de arácnidos (alacranes) (Cociancich *et al*, 1993; Ehret *et al*, 1996) y moluscos (Hubert *et al*, 1998). La primera defensina descubierta se denominó sapecina, y fue aislada del medio de cultivo de la línea celular embrionica NIH-Sape-4 de *Sarcophaga peregrina* (Matsuyama y Natori, 1988).

Estos péptidos, activos principalmente contra bacterias gram positivas, se sintetizan en los trombocitoides, que son un tipo de células sanguíneas, y en el cuerpo graso, una estructura similar a una combinación de hígado y tejido adiposo (Hoffmann *et al*, 1996). Los péptidos maduros se han encontrado en hemolinfa y en epitelio intestinal (Lehane *et al*, 1997).

En cuanto a su anfipaticidad, la sapecina, por ejemplo, presentan una región hidrofóbica con los residuos de Ala 15, 17 y 18, y las Leu 21 y 22, opuesto a una región básica con las Arg 23 y 39 y la Lys 33 (Hanzawa *et al*, 1990).

Las principales diferencias entre las secuencias de las defensinas de insecto se encuentran en el extremo N-terminal, aunque la defensina de jalea real, llamada royalisina, con 53 aa, tiene una extensión C-terminal anfipática de 10 residuos (Hoffmann *et al*, 1992).

La estructura tridimensional de la defensina A de *Phormia terranova*, reveló un motivo alfa-beta estabilizado por cisteínas (C $\alpha$  $\beta$ ), que consiste en un fragmento N-terminal alfa helicoidal (anfipático en el caso de las defensinas) conectado por dos puentes disulfuro con una hoja beta plegada de dos hebras beta antiparalelas. Esta estructura se estabiliza aún más con la adición de un tercer puente disulfuro. La secuencia consenso es Cys1...Cys2-3Xaa-Cys3...Gly-Xaa-Cys4...Cys5-Xaa-Cys6; la Gly conservada permite un contacto íntimo entre la hoja plegada beta y el alfa hélice. La conectividad de los puentes disulfuro es 1-4, 2-5 y 3-6. La estructura puede presentar una tercer hebra beta en el N-terminal, así como un cuarto puente disulfuro que conecte los extremos amino y carboxilo (Cornet *et al*, 1995).

Este motivo estructural se presenta también en las tioninas gama y defensinas de plantas (Bruix *et al*, 1993; Fant *et al*, 1998), las toxinas de alacrán (Bontems *et al*, 1991), y la brazzeina, un péptido de 54 aa extraído de la planta *Pentadiplandra brazzeana*, con la propiedad de ser 2000 veces más dulce que el azúcar (Caldwell *et al*, 1998). A nivel de secuencia, sin embargo, ninguna de estas clases de péptidos son similares entre sí.

**Defensinas de planta (45-54 aa).**- Estos péptidos se agrupan de acuerdo a los efectos morfogénicos causados al tratar, en concentraciones micromolares, hifas de hongos. Las morfogénicas, como Rs-AFP1 (péptido antifúngico de *Raphanus sativus*), reducen la elongación de la hifa con un concomitante incremento en la ramificación hifal, mientras que las no morfogénicas, como Dm-AMP1 (péptido antimicrobiano de dalia), sólo disminuyen la extensión de la hifa (Osborn *et al*, 1995; Thevissen *et al*, 1996). Estos grupos tienen distintos organismos blanco, y la mayor parte se obtuvieron a partir de células periféricas de semillas, aunque se han encontrado también en órganos florales de tabaco y hojas de chícharo. Parece ser que su expresión es constitutiva (revisado en Broekaert *et al*, 1995).

Aunque los dos grupos difieren secuencialmente, en ambos se conservan todas las Cys, dos Gly en las posiciones 13 y 34, un residuo aromático en la 11, y un Glu en la 29, con respecto a Rs-AFP1 (Broekaert *et al*, 1995). Su estructura tridimensional es semejante a la de las defensinas de insecto, con una hebra beta extra en el extremo amino terminal, y un cuarto puente disulfuro.

Las defensinas de plantas (en particular Rs-AFP1) son estructuralmente idénticas a otro grupo de péptidos denominado gama-tioninas (1H y 1P), que no son antifúngicos, posiblemente debido a que su distribución de cargas en la estructura tridimensional es completamente diferente (Bloch *et al*, 1998).

Se han dado razones a favor de la participación de un receptor en la actividad de estas moléculas, argumentando la supresión de la actividad mediante reducción de los puentes disulfuro, y la disminución de la actividad de mutantes sitio-específicas, y debido a la presencia de cationes divalentes (Thevissen *et al*, 1997). Sin embargo, las concentraciones inhibitorias (1-10  $\mu$ M) deberían ser mucho menores en caso de que existiera un receptor. Las diferencias de actividad entre las mutantes tampoco son muy apreciables (una MIC para *Fusarium culmorum* de 3  $\mu$ M del péptido nativo, contra 42  $\mu$ M  $\pm$  17 para la mutante menos activa, Tyr 38 Gly) (De Samblanx *et al*, 1997); además, la reducción de puentes disulfuro se ha hecho en alfa defensinas de mamífero, suprimiendo su actividad, pero no atribuyéndola a la presencia de un receptor, sino a la pérdida de su carácter anfipático (Fujii *et al*, 1993). Existen en general más pruebas a favor de que las defensinas de plantas actúan

desestabilizando la membrana, como la mayoría de los péptidos antimicrobianos (Thevissen *et al*, 1996).

**Tioninas beta (45 aa).**- Se encuentran en el endospermo de la semilla, en raíces, y en hojas etioladas o estresadas por patógenos de una gran variedad de plantas. Tienen tres puentes disulfuro, y su estructura tridimensional puede ser representada como una molécula en forma de L invertida. El brazo vertical consiste en un par de hélices antiparalelas, y el brazo horizontal tiene una corta hoja beta antiparalela. Estas moléculas antifúngicas interactúan electrostáticamente con los fosfolípidos de la membrana, incluyendo algunos que median la transducción de señales que provocan la salida de compuestos específicos y la activación de canales de calcio y enzimas específicas (Teeter *et al*, 1990).

**Defensinas de mamífero.** Existen dos grandes grupos:

**Alfa defensinas (29-35 aa).**- Se aislaron inicialmente de los gránulos citoplásmicos de los neutrófilos de conejo (Selsted *et al*, 1985), en donde se encontraron tres isoformas que sólo difieren en un aminoácido. Posteriormente se hallaron en neutrófilos de rata, conejo y cuyo, en donde su expresión es constitutiva y regulada por el programa intrínseco de maduración de la célula. También se han aislado de macrófagos alveolares y de las células de Paneth intestinales (Jones y Bevins, 1992), en donde son secretadas después de que las bacterias entran al intestino o por estimulación del sistema nervioso autónomo (revisado en Hancock, 1998)

Las alfa defensinas son más efectivas contra bacterias gram-positivas, y algunos péptidos como HNP1 son potentes quimiotácticos de monocitos, por lo que su secreción podría promover su reclutamiento en lesiones inflamadas o infectadas (Lehrer y Ganz, 1990; Chertov *et al*, 1996).

Si se les reduce y carboximetila pierden su efecto antibacteriano, sin embargo, promueven la fusión y lisis de liposomas cargados negativamente, aunque sufriendo cambios conformacionales (Fujii *et al*, 1993).

Son péptidos cuyas isoformas conservan todas las Cys, en conectividad 1-6, 2-4, 3-5, con Cys1 y Cys2 cerca del N-terminal, separados por un solo residuo, y donde la presencia de argininas es más acentuada que la de lisinas. Su carga neta va de +2 a +5 para las defensinas de humano (HNP 1-3) y de +5 a +9 para las de ratón (NP 1-5). Esta propiedad hace que las primeras sean dímeros y las segundas monómeros en solución, ya que aquéllas presentan menos repulsiones electrostáticas.

La característica estructural más obvia del monómero es un par de hebras beta antiparalelas ligadas por puentes de hidrógeno y conectadas por una vuelta corta para formar un pasador beta. Este motivo está formado por aproximadamente los últimos 15 residuos de la secuencia. El par Cys3-Cys5 cierra este pasador. Una tercera hebra beta más flexible, situada en el amino terminal, se conecta con este motivo por medio de dos puentes disulfuro (Hill *et al*, 1991; Pardi *et al*, 1992; revisado en White *et al*, 1995).

Los dímeros se forman uniendo dos hojas beta idénticas de los dos monómeros para crear una estructura beta simétrica de seis hojas, la cual se dobla y curva para formar una estructura en forma de canasta con un pequeño canal accesible a solvente. La base de la canasta es hidrofóbica, contribuyendo algunos de los grupos metileno de las Arg en esta superficie, mientras que la parte superior, que contiene los extremos amino y carboxilo de

los dos monómeros, es polar. La asociación dimérica se estabiliza por interacciones hidrofóbicas, especialmente entre los residuos Cys5, 20, Tyr 22, y Phe 28. La presencia de la Gly18 en la interfase del dímero sugiere que la defensina es un dímero en el sitio de acción (Hill *et al*, 1991).

**Beta defensinas (38-42 aa).**- Este grupo comprende a una serie de péptidos que atacan a bacterias gram positivas, secretados en su mayoría en tejido epitelial. El primero que se encontró, llamado TAP, con actividad antimicótica (contra *Candida albicans*), se aisló de epitelio de tráquea de bovino (Diamond *et al*, 1991). Se halló después otro en lengua de bovino (LAP). La síntesis de ambos péptidos se incrementa después de herida o exposición a lipopolisacáridos y responde a mediadores humorales (citocinas) como el factor alfa de necrosis de tumores (Diamond *et al*, 1996; revisado en Hancock, 1998). Posteriormente se aislaron más moléculas de este grupo a partir de gránulos polimorfonucleados de neutrófilo (PMN) de bovino (Selsted, 1993), de leucocitos de gallo (Harwig *et al*, 1994), de células epiteliales de cuerpo humano, especialmente pulmón, riñón, y tracto urogenital femenino (HBD1: la inactivación a altas concentraciones de sal de este péptido se ha correlacionado con la proliferación bacteriana en pulmones de pacientes con fibrosis quística (Goldman *et al*, 1997)), y de piel con lesiones psoriáticas (HBD2). Este último péptido se induce por reto bacteriano (Harder *et al*, 1997).

El plegamiento de las defensinas beta es esencialmente idéntico al de las alfa defensinas, sólo que en las primeras difiere la disposición de las cisteínas, así como la conectividad de los puentes disulfuro, que es 1-5, 2-4, 3-6 para las beta defensinas. En éstas, los extremos amino y carboxilo están mucho más alejados entre sí que en las alfa defensinas (Zimmermann *et al*, 1995; revisado en White *et al*, 1995).

A pesar de carecer de similitud las secuencias de DNA de las alfa y las beta defensinas y de las diferencias en sus patrones de puentes disulfuro, deben haber evolucionado de un ancestro común ya que las regiones cromosómicas que las codifican están muy próximas entre sí (150 kb entre una y otra) (Liu *et al*, 1997).

## **Péptidos ricos en ciertos aminoácidos**

### **a) Péptidos ricos en prolina**

**PR-39 (39 aa).**- Es un péptido amidado aislado inicialmente de intestino de cerdo, (aunque se produce en médula), y posteriormente de fluido de heridas de ratón (Gallo *et al*, 1994). Tiene 49% de Pro (19 residuos, 14 de los cuales están en la disposición Pro-Pro), y 24% de arginina. El resto de los residuos son apolares, con predominio de Leu e Ile (Agerberth *et al*, 1991).

Se ha encontrado que, al contrario de la mayoría de los péptidos antimicrobianos, PR-39 desestabiliza a membranas modelo sin lisarlas; se transloca al citoplasma de células eucariotes, y se une a una serie de proteínas, entre las cuales está p130Cas, una proteína involucrada en vías de señalización. PR-39 también estimula la expresión de syndecan (proteoglicanos que juegan un papel en la reparación de heridas) en células mesenquimales (Chan y Gallo, 1998).

**Bactenecina 5 (Bac 5) y Bactenecina 7 (Bac 7)**(42 y 59 aa).- Se aislaron de neutrófilos de bovino. En Bac 5, 18 de las 19 Pro con que cuenta la secuencia están como repeticiones Pro-Pro (Agerberth *et al*, 1991), mientras que Bac 7 tiene la presencia invariable de Pro cada dos residuos desde la posición 10 hasta el C-terminal, repitiéndose el motivo Pro-Arg-Pro 12 veces (Frank *et al*, 1990).

No hay homología de secuencia entre estos péptidos y PR-39, pero tienen ciertos motivos comunes como las repeticiones Pro-Arg-Pro y Pro-Pro en muchas ocasiones, pero en diferente disposición (Agerberth *et al*, 1991).

**Homólogo de Bac 7 (6.5 kDa)**.- Del cangrejo *Carcinus maenas* se secuenció parcialmente un péptido constitutivo con actividad antibiótica, teniendo 28 residuos del extremo N-terminal un 60% de identidad con bactenecina 7 (Schnapp *et al*, 1996).

**Apidaecina y abaecina (18 y 34 aa)**.- Ambas se aislaron de la abeja *Apis mellifera*. La apidaecina, con 33% de Pro, no muestra actividad en sistemas modelo de liposomas (Casteels *et al*, 1989), ni utilizando su enantiómero D (Casteels y Tempst, 1994), lo que la hace ser, como PR-39, un péptido antimicrobiano atípico. Se han encontrado tres isoformas que constituyen la mayor parte de los péptidos antimicrobianos presentes en la hemolinfa de abeja (revisado en Cociancich *et al*, 1994).

La abaecina, con 30% de Pro, se parece secuencialmente a la apidaecina, aunque tienen un espectro de acción muy diferente y un periodo de retardo en su actividad. Ambos péptidos se inducen por reto y son activos contra bacterias gram negativas, aunque la abaecina tiene una actividad menor. (Casteels *et al*, 1990)

**Metchnikowina (26 aa)**.- Este péptido antimicrobiano es uno de los siete (sin incluir isoformas) que se han encontrado en *Drosophila melanogaster*. Ataca bacterias gram positivas y hongos filamentosos como *Neurospora crassa* (Levashina *et al*, 1995), y se induce por cualquiera de estos dos tipos de reto, los cuales son sensados por dos sistemas regulatorios independientes (Levashina *et al*, 1998)

**Lumbricina (29 aa)**.- Proviene de la lombriz de tierra, *Lumbricus rubellus* (700 millones de años de antigüedad). Es un péptido relativamente rico en Pro (15%), sin gran similitud con los demás de esta familia. Su carga neta sólo es de +1 (10 aminoácidos básicos y 9 ácidos). Ataca bacterias gram positivas y negativas, además de hongos (Cho *et al*, 1998).

## **b) Péptidos ricos en prolina y O-glicosilados**

**Drosocina (19 aa)**.- Es un péptido inducible de *Drosophila melanogaster* rico en Pro (un tercio del péptido, agrupadas de la forma Pro-Arg-Pro), O-glicosilado en Thr, con una N-acetilgalactosamina-galactosa. La ausencia de esta modificación disminuye su actividad, la cual se presenta sobre todo contra bacterias gram negativas (Bulet *et al*, 1993).

**Formaecinas (16 aa)**.- Son dos péptidos inducibles aislados de la hormiga *Myrmecia gulosa*, O-glicosilados en Thr, y con un 30% de residuos de Pro, ordenadas sin ningún motivo aparente. La glicosilación también es importante para su actividad, la cual es detectada sobre unas cuantas bacterias gram negativas. (Mackintosh *et al*, 1998)

### c) Péptidos ricos en triptofano

**Péptido de médula de cerdo (13 aa).**- Además de la indolicidina, la cual se describe más adelante, se ha encontrado este péptido con tres Trp, que además de ser antibacteriano presenta actividad contra el hongo *Aspergillus fumigatus* (Lawyer *et al*, 1996)

### Péptidos homólogos

En esta sección se incluyen a los péptidos con porcentajes elevados de similitud a alguno de los ya descritos, pero provenientes de organismos muy distantes evolutivamente.

**Cecropina P1 (31 aa).** Homólogo de cecropinas de insecto.- Se obtuvo de intestino de cerdo. Tiene 33% de similitud con las cecropinas de insecto, aunque no es amidado como éstas (Lee *et al*, 1989). Su espectro de actividad se inclina más hacia bacterias gram negativas, a diferencia de las de insecto, que también atacan gram positivas (Gazit *et al*, 1995).

La estructura de CecP1 es alfa helicoidal, y no presenta, a diferencia de las cecropinas de insecto, un doblez a mitad de la secuencia, aunque los residuos Ser 19, Glu 20 y Gly 21 le dan cierta flexibilidad al péptido. Antes del residuo 20 existe una gran hélice antipática y entre los residuos 22-26 hay una región no polar (Sipos *et al*, 1992; Gazit *et al*, 1996).

**Crabrolina (13 aa).** Homólogo de brevininas de tipo 1 y temporinas. - Es un péptido amidado antibacteriano y hemolítico (100% a 32  $\mu$ M, según Krishnakumari y Nagaraj, 1997), de carácter hidrofóbico (con sólo una Arg en la secuencia), aislado del veneno del abejorro europeo, *Vespa crabro*. Se reconoció inicialmente como liberador de histamina y facilitador de la acción de fosfolipasas A2 (Argiolas y Pisano, 1984). Presenta una similitud de más del 50% con los primeros 13 residuos del amino terminal de las brevininas de tipo 1 y temporinas de piel de rana (ver más adelante)

**Thanatina (21 aa).** Homólogo de brevininas 1.- Proviene del insecto díptero *Podisus maculiventris* y tiene un 50% de similitud con brevinina-1. Ambas secuencias tienen un asa C-terminal de 6 o 5 residuos, respectivamente, delineada por un puente disulfuro. Sin embargo, en el N-terminal la thanatina tiene dos residuos de Pro, lo que hace improbable una estructuración de hélice, como con las brevininas. Es activo contra bacterias gram positivas y negativas y hongos, pero no es hemolítica. El enantiómero es activo contra bacterias gram positivas, pero no contra gram negativas (Fehlbaum *et al*, 1996).

**Protegrinas (16-18 aa).** Homólogos de taquiplesinas y defensinas alfa.- Estos péptidos amidados se derivan de leucocitos de cerdo. Atacan sobre todo bacterias gram negativas y hongos. Existe una similitud notable entre el decapeptido  $G_4LCYCRRRFC_{13}$  de la protegrina 3 y  $G_1ICACRRRFC_{10}$  de la defensina de conejo NP 3 (Kokryakov *et al*, 1993). En las protegrinas, los puentes disulfuro, en conectividad 1-4 y 2-3, son necesarios para la alteración de la permeabilidad de membranas modelo, pero no para la actividad antibacteriana. La amidación es importante para la actividad bactericida (Mangoni *et al*, 1996).

Su estructura consiste en dos hojas antiparalelas formadas por los residuos 5-9 y 12-16, unidas por una vuelta beta (residuos 9-12) y estabilizadas por dos puentes disulfuro. Presenta dos regiones hidrofílicas que contienen los seis residuos de Arg localizados en la vuelta (Arg 9, 10 y 11), y en los extremos amino (Arg 1 y 4) y carboxilo (Arg 18), separados por una gran región hidrofóbica formada por los residuos 5-8 y 12-16 (Aumelas *et al*, 1996). El isómero D es 100% activo (Heller *et al*, 1998).

**Drosomicina** (44 aa). Homólogo de defensinas de plantas.- Es un péptido antifúngico (no antibacteriano) inducible aislado de *Drosophila melanogaster*. A altas concentraciones inhibe la germinación de esporas y a bajas retrasa el crecimiento de las hifas, las cuales exhiben una morfología anormal cuando logran crecer (Fehlbaum *et al*, 1994).

La secuencia tiene un 38% de residuos homólogos con Rs-AFP-1, incluidos los residuos conservados de las defensinas de planta. La estructura presenta igualmente un motivo CS $\alpha\beta$ , con los primeros diez residuos formando una tercera hoja beta soportada por un cuarto puente disulfuro, acercando a los extremos amino y carboxilo.

Los residuos Pro 10, Ala 12, Val 13, Trp 14, Pro35 y Leu37 forman una región hidrofóbica bien definida en un polo de la estructura, mientras que el otro es claramente hidrofílico. Se encuentran tres parches negativos (Asp15, Glu 17, Glu 25, 26 y 42) dentro de una superficie globalmente positiva (Landon *et al*, 1997).

**NK-lisina** (78 aa). Homólogo de amoebapore.- Este péptido derivado de las células T y NK de intestino de cerdo (Andersson *et al*, 1995), tiene 30% de identidad y 50% de similitud con amoebapore, un péptido de *Entamoeba histolytica* que forma poros en las células blanco (Leippe *et al*, 1995).

Su estructura tridimensional consiste en 4 alfa hélices unidas por tres puentes disulfuro, cuya reducción inactiva a la molécula. Las cadenas laterales de Lys y Arg se encuentran ecuatorialmente en la estructura. Los residuos negativos se encuentran en la parte superior, y la base de la molécula tiene residuos hidrofóbicos. Esta distribución de carga no está conservada en amoebapore, por lo que deben interactuar de forma distinta con su blanco (Liepinsh *et al*, 1997).

## **Péptidos híbridos**

**Diptericinas** (82 aa).- Se aislaron inicialmente de la mosca *Phormia terranova* (Dimarcq *et al*, 1988) y se han encontrado en otras dos especies de este género. Pueden ser consideradas como moléculas quiméricas consistentes en un dominio N-terminal de 18 residuos con similitud a apidaecinas, y un dominio C-terminal de 64 residuos rico en Gly (25%). Atacan preferencialmente bacterias gram negativas (Cociancich *et al*, 1994).

**Big defensin** (79 aa).- Proviene de hemocitos del cangrejo *Tachypleus tridentatus*. El arreglo de las cisteínas contenidas en los residuos 38-79 de la secuencia es idéntico al de las beta defensinas. El extremo N-terminal es hidrofóbico, y no tiene semejanza con ningún péptido antimicrobiano conocido (Saito *et al*, 1995).

**Penaedinas** (50 y 62 aa).- Se aislaron del camarón *Penaeus vannamei*, sin ser los organismos infectados experimentalmente. Están compuestas de un dominio N-terminal

rico en Pro y un C-terminal con 6 Cys (4 de ellas en dos dobles Cys-Cys separados por cinco residuos). Atacan bacterias gram positivas (Destoumieux *et al*, 1997).

## **Péptidos antimicrobianos y hemolíticos**

**Bombinina** (24 aa).- Fue el primer péptido con actividad antimicrobiana y hemolítica reportado en rana (*Bombina variegata*) por Csordas y Michl, en 1970. La predicción de su estructura indica alta tendencia a adoptar una conformación helicoidal. Provoca lisis de 100% en eritrocitos a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , y elimina cepas de *E.coli* y *S.aureus* a 3 y 14  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

**Bombininas H**.- Fueron aislados también de la rana *Bombina variegata*. Son 100% hemolíticos entre 15 y 17  $\mu\text{M}$ , y su actividad bactericida contra *E.coli* y *S.aureus* está entre 2 y 5  $\mu\text{M}$ . Se llaman bombininas H por ser hidrofóbicos. Tres de los cinco péptidos encontrados presentan como segundo residuo D-aloisoleucina. (Mignogna *et al*, 1993).

**Melitina** (26 aa).- Es el péptido antibacteriano y hemolítico más ampliamente estudiado. Sus propiedades antibacterianas se conocen desde hace más de 30 años (Fennell *et al*, 1968). Es el componente más prominente del veneno de la abeja *Apis mellifera*. Lisis 100% eritrocitos a 0.9  $\mu\text{M}$ . Su actividad antimicrobiana puede ser igual o hasta diez veces menor que esta concentración, dependiendo de la cepa.

Este péptido existe como tetrámero en soluciones de alta fuerza iónica y/o concentración, y como monómero en las condiciones contrarias. Su estructura helicoidal tiene 3 regiones: un alfa hélice N-terminal hidrofóbica (de los residuos 1 a 13); una región flexible formada por el dipéptido Pro-Ala, y una región C-terminal también alfa helicoidal de carácter hidrofóbico en los primeros cinco residuos, incluyendo un Trp, y el resto de carácter básico (residuos 16 a 26) (Terwilliger *et al*, 1982).

En la región N-terminal, la pérdida del residuo 7 (Lys), disminuye 74% la actividad. Este aminoácido es crítico para el balance de las interacciones hidrofóbicas. Si se sustituye por un aminoácido hidrofóbico se pierde la cooperatividad al momento que actúa el péptido en su blanco y las concentraciones mínimas inhibitorias aumentan hasta 10 veces (Perez-Paya *et al*, 1995).

La Pro, el Trp, y los residuos polares 23-26 en el C-terminal son esenciales para la actividad lítica. Péptidos modelo con residuos no desestabilizadores de la hélice tienen una mayor actividad hemolítica, y análogos cortos no tienen actividad (Blondelle y Houghten, 1991). El isómero D es 100% activo (Wade *et al*, 1990)

En general, si se disminuye el momento hidrofóbico disminuye la actividad. Sin embargo, si se utiliza Trp en vez de otros aminoácidos no polares para la disminución de éste, la pérdida de actividad no es tan acentuada (Blondelle y Houghten, 1991).

Con intención de eliminar el efecto hemolítico de la melitina, pero no el antibacteriano, se sintetizaron una serie de híbridos con cecropina A. El único péptido obtenido con estas características fue una combinación de los primeros 13 residuos de la Cec A, seguidos de los primeros 13 residuos de la melitina. Esta quimera tuvo una actividad antimicrobiana comparable a la de Cec A, y la mejoró cuarenta veces en comparación a ésta contra una cepa de *S. aureus* (Boman *et al*, 1989).

**Pardaxina** (33 aa).- Se reconoció inicialmente como una toxina con propiedades surfactantes, repelente de tiburones, secretada por el pez *Pardachirus marmoratus*, proveniente del Mar Rojo (Lazarovici *et al*, 1986). Está compuesta de dos segmentos alfa helicoidales; una hélice N-terminal hidrofóbica, de los residuos 2 al 10, y una hélice C-terminal anfipática, de los residuos 13 a 27. Ambas hélices están separadas por una Pro en la posición 13 (Zagorski *et al*, 1991).

**Dermaseptina 4 , B3 y B4** (28 aa).- La Dms4 es hemolítica 100% a 1  $\mu$ M, mientras que la dermaseptina 3, con un momento hidrofóbico menor, causa 100% de lisis a 80  $\mu$ M (Mor *et al*, 1994d). Las dermaseptinas B3 y B4 son hemolíticas 100% a 30  $\mu$ M (Charpentier *et al*, 1998).

**BMAP 28** (28 aa).- Cuenta con un Trp en la secuencia, y causa 100% de lisis en eritrocitos a 100  $\mu$ M (80% a 30  $\mu$ M), mientras que BMAP27, con 4 Phe, sólo lisa 32.7% a esa concentración. La lisis es menor en eritrocitos de bovino (Skerlavaj *et al*, 1996).

**Temporinas** (10-13 aa).- Son péptidos amidados aislados de la piel de la rana *Rana temporaria*, y que tienen homología con la crabrolina. Se han encontrado varios, y los que tienen carga positiva son antimicrobianos. Si esta carga se cambia a negativa pierden su actividad. Atacan también al hongo *Candida albicans* a una concentración de 3.4  $\mu$ M (Simmaco *et al*, 1996). Ya se habían aislado péptidos parecidos de *Rana esculenta*, sin analizar su actividad bactericida, pero sí la hemolítica, que es de 100% a 3 microM (Simmaco *et al*, 1990)

**Brevininas de tipo 1** (24 aa).- Son tan hemolíticas como la melitina (100% de hemólisis a 0.5  $\mu$ M, para la brevinina 1E), e igualmente bactericidas (Simmaco *et al*, 1993). En su secuencia, 6 posiciones son ocupadas por el mismo residuo en todos los péptidos (Pro en 3, Ala en 9 y 10, y un par de residuos básicos en el extremo C-terminal (Nicolas y Mor, 1995).

Esta familia de péptidos, junto con la crabrolina y las temporinas, tienen una superficie hidrofóbica que se localiza en el extremo N-terminal. La delección de los tres primeros residuos (Phe-Leu-Pro, en la mayoría de ellos) disminuye de manera muy importante la actividad hemolítica. Esta delección disminuye la hidrofobicidad pero aumenta el momento hidrofóbico (Kwon *et al*, 1998). En la crabrolina, el cambio de Pro3 por Ala aumentó su actividad al doble, tanto antibacteriana como hemolítica, por estabilización de la hélice (Krishnakumari *et al*, 1997)

**Indolicidina** (13 aa).- Este péptido amidado (el único con esta característica encontrado en leucocitos de mamífero), aislado de neutrófilos de bovino, con 5 Trp, representa el porcentaje molar de este aminoácido más alto conocido en un péptido. Tiene además tres Pro (Selsted *et al*, 1992). Es el único péptido hemolítico conocido no alfa helicoidal. La sustitución de las Pro por Ala y de los residuos de Trp por Phe no tiene efectos en la actividad antibacteriana, pero sí suprime la actividad hemolítica, que en el péptido nativo es de 100% a 20  $\mu$ M (Subbalakshmi *et al*, 1996). Su modo de acción parece ser el mismo que el de la mayoría de los péptidos antimicrobianos (Falla *et al*, 1996).

La indolicidina, junto con BMAP 27 y 28, LL 37, bactenecina, y Bac 5 y 7, es parte de una familia de péptidos, llamada cathelicidinas, que comparten una proregión conservada y que se almacenan en los gránulos citoplásmicos de los neutrófilos de leucocitos, liberándose en la activación de éstos. Además de su actividad antimicrobiana, algunos pueden neutralizar lipopolisacáridos y promover la cicatrización de heridas (Zanetti *et al*, 1995)

Como se puede apreciar, en un mismo organismo se pueden encontrar varios péptidos antimicrobianos, tanto con secuencias relacionadas como con diferente estructura terciaria. Es posible que cada una de estas moléculas tenga una función distinta, que ejerzan la misma función pero con distintos organismos blanco (defensina y drosomicina), que tengan distintos blancos en el mismo patógeno (defensina y apidaecina), o bien, que actúen sinérgicamente (dermaséptinas, magainina con PGLa) (Boman, 1995).

### III. MODO DE ACCION

#### Consideraciones generales

Existen una serie de evidencias a favor de la ausencia de receptor para la mayoría de este tipo de péptidos:

- 1) Son efectivos contra una gran variedad de organismos.
- 2) Su potencia se correlaciona con su habilidad de formar péptidos catiónicos anfipáticos.
- 3) Las isómeros D son tan potentes como los L.
- 4) Actúan estequiométrica y no catalíticamente.
- 5) Utilizando sistemas modelo como liposomas y bicapas, se observa permeabilidad.

Se asume entonces que el blanco principal de los péptidos antimicrobianos es la membrana interna de las bacterias, la cual contiene típicamente la cadena de transporte de electrones y el aparato enzimático necesario para la fosforilación oxidativa, interfiriendo por tanto en los mecanismos respiratorios (Gazit *et al*, 1994). La permeabilización de la membrana interna es concomitante con la disipación del potencial de membrana y de la asimetría de sus lípidos; se provoca también la salida de iones vitales como  $K^{-1}$  y  $Mg^{-2}$  y entrada de otros tóxicos como  $Ca^{-2}$ , con la consecuente pérdida de viabilidad celular (Matsuzaki, 1998). Pudiera ser también que la acción bactericida se deba exclusivamente a la disipación de gradientes iónicos transmembranales, y que la susceptibilidad a los péptidos antimicrobianos sea dependiente de la susceptibilidad de las células a la disipación de estos gradientes. (Silvestro *et al*, 1997).

A través del diseño de péptidos modelo (Andreu *et al*, 1985; Zasloff *et al*, 1988; Agawa *et al*, 1991; Blondelle *et al*, 1992; Kiyota *et al*, 1996; Tossi *et al*, 1997), síntesis de variantes de péptidos nativos (Chen *et al*, 1988; Boman *et al*, 1989; Blondelle *et al*, 1991; Thennarasu y Nagaraj, 1995), y de su estudio junto con los péptidos nativos mediante dicroísmo circular orientado (CDO) (Ludtke *et al*, 1994; Heller *et al*, 1998), resonancia magnética nuclear (NMR) de estado sólido (Bechinger *et al*, 1993, 1998), espectroscopía de infrarrojo de reflectancia atenuada (ATR-FTIR) (Harwig *et al*, 1996; Hirsh *et al*, 1996; Gazit *et al*, 1996), dispersión en plano de neutrones (Ludtke *et al*, 1995, 1996),

microcalorimetría (Lohner *et al*, 1997; Wenk y Seelig, 1998, Matsuzaki *et al*, 1998a), dinámica molecular (Gazit *et al*, 1996; Berneche *et al*, 1998) y estudios de unión y permeabilización en bicapas (Christensen *et al*, 1988; Kagan *et al*, 1990; Cruciani *et al*, 1991; Cociancich *et al*, 1993; Falla *et al*, 1996) y/o en liposomas de diferente composición y potencial de membrana, mediante técnicas de fluorescencia y transferencia de energía por resonancia (RET) (Nakajima *et al*, 1987; Pouny *et al*, 1992; Fujii *et al*, 1993; Gomes *et al*, 1993; Wimley *et al*, 1994; Hristova *et al*, 1996, 1997; Jo *et al*, 1998; Wu *et al*, 1999; Matsuzaki, ver todas las referencias), se ha determinado que la manera en que se produce la interacción péptido-lípido depende de los siguientes factores:

### Composición de fosfolípidos

La composición de lípido es crítica para la actividad de los péptidos antimicrobianos, uniéndose y permeabilizando preferencialmente fosfolípidos ácidos (Nakajima *et al*, 1987; Matsuzaki *et al*, 1991a; Pouny *et al*, 1992; Hristova *et al*, 1997; Lohner *et al*, 1997; Silvestro *et al*, 1997; revisión de Matsuzaki, 1998. por citar solo algunos). Este hecho se correlaciona perfectamente con su actividad biológica, ya que para el caso de las membranas internas bacterianas, éstas son ricas en fosfatidiletanolamina (PE) y en lípidos cuya carga neta es negativa, como fosfatidilglicina (PG), cardiolipina, y lipopolisacáridos (LPS) (DiRienzo *et al*, 1978). Por lo que respecta a su pared celular, la de las bacterias gram negativas es de LPS y la de las gram positivas es de polisacáridos ácidos (ácidos teicoicos), contando ambas con una carga neta negativa (Gazit *et al*, 1994).

En cuanto a las membranas de las células eucariotes, éstas presentan una distribución asimétrica de fosfolípidos: la monocapa externa contiene fosfolípidos neutros como fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina, mientras que la interna tiene fosfolípidos ácidos (DiRienzo *et al*, 1978). Estas membranas son ricas en colesterol, lo que hace que varíe la fluidez de la membrana y su potencial de dipolo (Christensen *et al*, 1988).

Las células tumorales, sensibles a la acción de algunos péptidos antimicrobianos, han perdido parte de su asimetría lipídica y exhiben un carácter más aniónico en su membrana plasmática externa en comparación con células de vertebrado saludables (revisión de Bechinger, 1997). Las microvellosidades de estas células incrementan además la superficie de acción de los péptidos (Wang *et al*, 1998).

En general, la acción diferencial de los péptidos antimicrobianos en diferentes cepas bacterianas y tipos de células es debida en parte a que las membranas biológicas contienen más de 100 especies de lípidos con diferentes grupos polares y caracteres hidrofóbicos, y cuya composición regula la carga superficial, fluidez, y curvatura de la bicapa (Matsuzaki *et al*, 1998; Matsuzaki, 1998).

El efecto en bicapas cargadas negativamente está determinado por la carga del péptido, que hace que se acumule éste en la superficie de la membrana; la estructura secundaria es de menor importancia. La perturbación del arreglo de los lípidos es causada por interacciones electrostáticas. Los cationes divalentes protegen a este tipo de lípidos de la acción de los péptidos antimicrobianos, ya que se unen a ellos muy eficientemente, incrementando el ordenamiento de sus cadenas hidrocarbonadas (Cociancich *et al*, 1993).

En bicapas con una carga negativa menor la perturbación de la membrana depende del tamaño de los dominios helicoidales hidrofóbicos y de la hidrofobicidad total, ya que en

este caso se ve más afectada la región hidrofóbica interna de la membrana (Dathe *et al*, 1996).

### Potencial de membrana

Las cecropinas (Christensen *et al*, 1988), magaininas (Brasseur *et al*, 1991; Cruciani *et al*, 1991) defensinas alfa (Kagan *et al*, 1990), defensinas de insecto (Cociancich *et al*, 1993), e indolicidina (Falla *et al*, 1996), parecen requerir un potencial de membrana como fuerza electromotriz para realizar o facilitar la inserción del péptido y formar canales en la membrana. Sin embargo, en otros estudios hechos con Cec B y defensina HNP-2, no se requiere de éste (Gazit *et al*, 1994; Hristova *et al*, 1996). La necesidad de potencial podría ser debida, en el caso de los péptidos con alfa hélice, al dipolo de ésta (Ludke *et al*, 1995). Fisiológicamente, el potencial de membrana de las bacterias está entre  $-100$  y  $-150$  mV. En las bacterias gram negativas hay otro potencial pequeño pero significativo de carácter negativo debido a la presencia de especies aniónicas de alto peso molecular en el periplasma (Gabay *et al*, 1994). El potencial de las células tumorales está entre  $-5$  y  $-40$  mV, y el de las células normales no proliferantes, entre  $-40$  y  $-90$  mV (Matsuzaki *et al*, 1995).

### Oligomerización del péptido

La mayor parte de las hélices alfa presentes en las proteínas muestran algún grado de anfipaticidad, con la excepción de las hélices transmembranales, que tienen momentos hidrofóbicos bajos y alta hidrofobicidad; las hélices de superficie tienen una hidrofobicidad promedio y un momento hidrofóbico alto (Segrest *et al*, 1990). El gradiente de hidrofobicidad podría también determinar el modo de asociación con los lípidos (Perez-Mendez *et al*, 1998).

De lo anterior se predice que si el ángulo hidrofóbico de la hélice es de más de  $180^\circ$ , ésta se auto agregará y se empaquetará como un poro transmembranal, con la condición de que el péptido tenga al menos 20 aminoácidos para poder traspasar la membrana; si el ángulo es igual a  $180^\circ$ , la hélice estará paralela a la superficie, y si es menor a  $180^\circ$ , la hélice, de forma monomérica, solubilizará a las bicapas (Kiyota *et al*, 1996).

Así, la capacidad de formar oligómeros determina la manera de perturbación de la membrana, ya que es concomitante con la capacidad de formar canales. En general, esta cooperatividad se da en los péptidos antimicrobianos a relaciones péptido/lípido altas, como en magainina y magainina 2a (Matsuzaki, 1998; Wenk *et al*, 1998), o se da en grado mucho menor que para otros péptidos formadores de canales, como el caso de dermaseptina vs. colicina, un antibiótico producido por *E. coli*, en donde la segunda se oligomeriza a una relación péptido/lípido 50 veces menor que para la primera (Pouny *et al*, 1992), o bien, no existe cooperatividad, como en cecropina B (Gazit *et al*, 1994) y cecropina P1 (Gazit *et al*, 1995).

Cabe hacer notar que los resultados de la cooperatividad pueden variar con la composición del lípido usado (Matsuzaki, 1998), y no proveen información acerca de la estructura detallada del canal, la intervención de otras moléculas, ni la composición del complejo oligomérico (Bechinger, 1997).

También es importante resaltar que aunque está comprobado por ejemplo que en las dermaséptinas (Pouny *et al*, 1992), defensinas de insecto (Cociancich *et al*, 1993) y cecropina A (Silvestro *et al*, 1997), el flujo de iones no se produce hasta que se alcanza una concentración crítica (lo cual también ocurre para la colicina), esto no necesariamente indica que exista una cooperatividad en la unión.

En general, la oligomerización se estimula incrementando las interacciones hidrofóbicas aumentando la concentración de péptido y/o su hidrofobicidad, o disminuyendo las repulsiones de carga, ya sea con sal, o restando residuos básicos al péptido (Perez-Paya *et al*, 1995; Matsuzaki *et al*, 1997a ). La estabilidad del oligómero también depende del ángulo de la carga abarcado en la hélice (Wieprecht *et al*, 1997).

Un caso interesante es el de la magainina, que muestra heterocooperatividad con el péptido PGLa, lo cual pudiera ser la razón biológica de la diversidad de estas moléculas, aumentando su tendencia a adsorberse en la membrana y/o haciéndolos menos accesibles a proteasas acuosas. (Gomes *et al*, 1993; Westerhoff *et al*, 1995).

### Modelo establecido

Los péptidos helicoidales estudiados hasta la fecha en cuanto a su orientación con respecto a la membrana, que son la magainina (Bechinger *et al*, 1993), la cecropina P1 (Gazit *et al*, 1996), y PGLa (Bechinger *et al*, 1998), adoptan una orientación paralela al plano de la bicapa al interactuar con ella; la melitina es la excepción, ya que parece que adopta una orientación transmembranal (Gazit *et al*, 1996). La orientación en paralelo es energéticamente favorable, y por sí sola podría desestabilizar a la membrana, pero no explica las actividades de canal observadas en bicapas utilizando cecropinas (Christensen *et al*, 1988) y magaininas (Cruciani *et al*, 1991), y aunque estos canales no son selectivos, presentan una variedad de conductancias, y son eventos raros, transientes y lentos, el hecho es que se forman y podrían ser determinantes en la rapidez de eliminación del blanco.

Las características de los canales indican la existencia de grandes barreras energéticas que impiden su formación, como la repulsión electrostática que se presentaría en el lumen del canal, la repulsión dipolar entre dipolos helicoidales paralelos, y la pérdida de entropía durante la oligomerización. A favor de su formación está la interacción de los dipolos helicoidales con el campo eléctrico transmembranal, los cambios en los parámetros de orden cuando los péptidos interactúan con las membranas (aumento de entropía llamado efecto lipofóbico), e interacciones hidrofóbicas entre los péptidos y los lípidos, que eventualmente podrían conducir a la formación de canales transientes (Bechinger, 1997).

En el caso de las defensinas, y en particular para las defensinas alfa, la estructura misma del dímero provee tres modelos para la formación de canales observados en bicapas (Kagan, 1990): 1) dímeros monoméricos que actúan como detergente. 2) Un dímero de dímeros con un canal en medio. 3) Un anillo de dímeros de defensina que constituya un gran poro (Hill *et al*, 1991), pero esto no ocurre para el caso de los demás péptidos como los helicoidales.

La magainina es el péptido helicoidal más extensamente estudiado con objeto de dilucidar estos fenómenos de la interacción péptido-lípido, y actualmente el modo de acción de ésta se concibe así: a concentraciones bajas de magainina, ésta se adsorbe rápida y reversiblemente a la membrana en una conformación helicoidal paralela a la superficie, embebida en las cabezas polares de los fosfolípidos. La adsorción de la magainina desestabiliza a la membrana debido al desbalance creado por su acumulación en el exterior

de la bicapa, expandiéndola lateralmente y disminuyendo su espesor en proporción a la concentración de péptido, induciendo una curvatura positiva. La energía de esta deformación es proporcional al cuadrado del cambio en el grosor de la bicapa, y es parte de la energía libre de adsorción de la magainina, por lo que a altas concentraciones (concentración crítica de inserción, la cual depende de la composición de membrana), ésta se vuelve tan alta que conduce al sistema péptido-lípido a adoptar lentamente otra conformación de menor energía (inserción).

Debido a la alta afinidad de la magainina por las cabezas polares de los lípidos, se podría formar un poro toroidal, en donde se crea una continuidad entre ambas monocapas; este modelo no requiere de agregación de péptido.

Las actividades de canal unitario se presentan también a concentraciones bajas, pero debido a la esporádica aparición de éstos y a los mecanismos de reparación de la célula, no se presenta letalidad.

Cuando estos poros, cuya vida media es corta, se cierran, los monómeros se adsorben en la superficie de cualquier lado de la bicapa; así, la formación de canales es un mecanismo para la translocación del péptido. La reducción de la densidad de péptido en la superficie enlentece la formación de éstos debido a ser éste un proceso altamente cooperativo, aliviando también la constricción debida a la unión asimétrica del péptido y la resultante expansión de la membrana.

Las bicapas son más resistentes que los liposomas a desestabilizaciones transientes inducidas por el péptido debido a que pueden aliviar la constricción transfiriendo lípido a cualquier lado de la bicapa, o bien doblándose en la dirección *cis* o *trans*.

El predominio de canales o desestabilización depende entonces del sistema usado, su composición, y del mismo péptido (Grant *et al*, 1992; Matsuzaki *et al*, 1995a, b; Ludtke *et al*, 1996; Jo *et al*, 1998; revisiones de Bechinger, 1997 y Matsuzaki, 1998).

#### IV. MECANISMOS DE RESISTENCIA

En *Salmonella thyphi* y *Salmonella thyphimurium*, mutantes de genes que codifican para proteínas que regulan los mecanismos de transporte de potasio resultan ser particularmente sensibles a la acción de los péptidos antimicrobianos (Parra *et al*, 1994). En *Neisseria gonorrhoeae* existe también un mecanismo regulatorio de flujo cuya falta la hace susceptible a estas moléculas (Shafer *et al*, 1998).

Por otra parte, en *Salmonella* sp., parte de la respuesta de invasión al huésped involucra la activación por limitación de  $Mg^{+2}$  o  $Ca^{+2}$  del sistema de transducción de señales de dos componentes PhoP-PhoQ, cuya función es sensor cambios ambientales. Las mutantes en este sistema no son virulentas, no pueden sobrevivir en presencia de macrófagos, y son extremadamente sensibles a péptidos antimicrobianos como defensinas alfa (Groisman *et al*, 1989; 1992). PhoP-PhoQ activa la transcripción de genes que promueven alteraciones en la membrana externa que incluyen modificaciones del lípido A (el glicolípido más común entre las bacterias gram negativas), como adición de aminoarabinosa a los grupos fosfato del lípido, reemplazo del grupo acilo miristato por 2-OH miristato, y transformación de lípido A de hexa a heptaacilado por adición de palmitato. El aumento en acilación disminuye la fluidez de la membrana por incremento de las interacciones hidrofóbicas, alterando el momento hidrofóbico y retardando o suprimiendo la inserción de los péptidos antimicrobianos (Guo *et al*, 1998).

## V. APLICACIONES

La acumulación de mutaciones en las bacterias patógenas y la ausencia de nuevas clases de antibióticos han acelerado el desarrollo de la resistencia a éstos. El ácido nalidíxico, que representa a la clase más nueva, fue introducido hace más de 30 años. En este sentido, los péptidos antimicrobianos podrían ser una alternativa para el uso terapéutico, presentando las ventajas de matar al blanco rápidamente, lo que hace más difícil la selección de bacterias resistentes; amplio espectro; actividad en contra de patógenos resistentes, y la relativa dificultad de seleccionar mutantes resistentes *in vitro*. Además, la capacidad de algunas de estas moléculas, como la taquiplesina, de unir lipopolisacáridos, podría ser ventajosa en comparación con otros antibióticos, ya que la liberación de dichos lipopolisacáridos producida por muchos de éstos al matar a los microorganismos, promueve endotoxemia.

Se han usado tres tipos de antibióticos peptídicos desde hace algún tiempo: la gramicidina, la polimixina, y la colicina, pero su uso se ha limitado al tópico porque tienden a ser citotóxicos. Esta vía de aplicación parece ser también la más viable para los péptidos antimicrobianos. El uso de la actividad antiviral, reportada para algunos péptidos como defensinas alfa y magaininas, tiene pocas probabilidades de usarse *in vivo* debido a que la molécula necesitaría atravesar la membrana eucariótica (Hancock, 1997).

Para ser competitivos, los costos de los péptidos antimicrobianos tendrían que ser menores a 10 dólares por gramo (Boman, 1995), lo cual es muy difícil de conseguir con síntesis química, por lo que se deben buscar alternativas como su producción en forma de proteínas recombinantes (Zhang *et al*, 1998).

Por otro lado, cualquier uso clínico involucra estudios de toxicidad, estabilidad, inmunogenicidad, ruta de aplicación y formulación, y hay muy pocos datos publicados en este sentido. Es de suponerse sin embargo que estos estudios se están llevando a cabo, sobre todo por las compañías dedicadas a su aplicación, las cuales se presentan en la siguiente tabla (Hancock, 1997).

Compañía	Péptido	Indicación clínica	Estado de desarrollo
Magainin Pharmaceuticals (1987) (Plymouth Meeting, PA)	MSI-78 (helicoidal)	Tratamiento tópico de úlceras de pie diabéticas	Fase III; se completó un estudio en 584 pacientes exitosamente
Micrologix Biotech (1992) (Vancouver, Canada)	MBI-20 (helicoidal)	Infecciones de Gram-negativas; sinérgicos de antibióticos convencionales	Investigación y desarrollo
Intrabiotics (1994) (Sunnyvale, CA)	IB367	Tratamiento tópico de mucositis oral (úlceras de la boca)	Preclínica

## ANTECEDENTES

Dentro del phylum Arthropoda, los alacranes (Chelicerata, Scorpionida) son las especies terrestres más antiguas conocidas, con más de 400 millones de años (150 millones más que los insectos más recientes). Tradicionalmente estos animales han sido estudiados por la presencia en su veneno de péptidos neurotóxicos que afectan canales iónicos de sodio (Catterall, 1979), potasio (Carbone *et al*, 1982), calcio (Valdivia *et al*, 1992) y cloro (DeBin *et al*, 1993). Su motivo estructural (CS $\alpha\beta$ ) ya ha sido descrito en la introducción. El estudio de otro tipo de péptidos del veneno ha sido relegado.

Por lo que respecta a la presencia de péptidos antimicrobianos, se han aislado algunos de la hemolinfa de dos alacranes euroafricanos:

De *Leiurus quinquestriatus* se aisló una defensina de insecto de 38 aa. Para su aislamiento no se requirió de reto previo ni se apreció un aumento considerable de su presencia con éste (Cociancich *et al*, 1993).

En *Androctonus australis* se encontraron tres péptidos:

Defensina (37 aa).- Tiene dos cambios conservados con respecto a la de *Leiurus quinquestriatus* en las posiciones 6 y 28 (Phe y Leu por Leu y Phe, respectivamente), y también carece del último residuo de Asn presente en ella.

Buthinina (34 aa).- Presenta cierta homología con las toxinas de cadena corta. En particular, tiene de 44-50% de similitud con las agitoxinas y kaliotoxinas. Presenta un residuo de Arg en la posición 22, equivalente de la Lys 27, muy importante para la actividad de las toxinas cortas contra canales de potasio (Park, 1992).

Androctonina (25 aa).- Es altamente catiónica (pI 10.2), con ocho cargas positivas, con un motivo Arg-Arg-Arg-Gly-Gly en la parte central de la molécula. Su similitud es de 65% con taquiplesina I, pero no es amidada. Además de antibacteriana es antifúngica a concentraciones entre 3 y 12  $\mu\text{M}$ .

Parece ser que estos péptidos tampoco son inducibles (Ehret *et al*, 1996).

En nuestro laboratorio se han caracterizado parcialmente dos péptidos de este tipo, ricos en cisteínas, de la hemolinfa del alacrán americano *Centruroides limpidus* (de la Vega, tesis de licenciatura), y previamente a este trabajo se encontró un péptido con algunas similitudes con defensinas proveniente del veneno del alacrán africano *Pandinus imperator* (Conde, datos no publicados).

Este último antecedente nos dió la pauta para buscar péptidos antimicrobianos en el veneno de alacranes americanos, y escogimos como modelo de estudio al alacrán excavador *Hadrurus aztecus*, que por vivir en el suelo, naturalmente rico en todo tipo de microorganismos, debe tener mecanismos de defensa antimicrobianos que lo protejan en mayor medida con respecto a alacranes con otros hábitats.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Aislamiento del(os) péptido(s) antimicrobiano(s) del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus* y caracterización bioquímica de el(los).

### Objetivos particulares

1. Aislamiento de los componentes del veneno con posible actividad antimicrobiana.
2. Determinación de la actividad biológica y caracterización de los péptidos activos.
3. Comparación de las secuencias obtenidas en bancos de datos.
4. Síntesis química del péptido obtenido más activo.
5. Determinación preliminar de su modo de acción.

## MATERIALES Y METODOS

### Obtención y separación del veneno

El veneno crudo de *Hadrurus aztecus* se obtuvo por estimulación eléctrica del telson de alacranes colectados en Iguala, estado de Guerrero. El veneno se recuperó en agua bidestilada y se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman OptimaTL por 15 minutos, a 4° C y 15000 x g de aceleración. El sobrenadante se liofilizó y conservó a -20° C, hasta su uso.

La purificación de los componentes solubles del veneno se llevó a cabo primeramente por filtración en gel en una columna de Sephadex G-50 (grado superfino, Pharmacia Fine Chemicals). El veneno liofilizado se disolvió en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, y se aplicó directamente a la columna. La fracción III obtenida de esta separación se purificó por cromatografía líquida de alta presión (CLAP) utilizando una columna (Vydac) C18 semi-preparativa, en un aparato Waters 600E equipado con un detector de UV, modelo Waters-486, con un gradiente lineal de 100% de solvente A (agua con 0.12% de ácido trifluoroacético (TFA)) a 60% de solvente B (acetonitrilo con 0.1% de TFA), durante 60 minutos.

### Caracterización química

La composición química del péptido se realizó por análisis de aminoácidos en un analizador Beckman 6300E después de hidrolizar por 20 horas a 110° C en tubos sellados al vacío con 6 N de HCl y 0.05% de fenol. El peso molecular mínimo obtenido del análisis de aminoácidos se confirmó por espectrometría de masas, utilizándose un aparato Finnegan-MAT.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Aislamiento del(os) péptido(s) antimicrobiano(s) del veneno del alacrán *Hadrurus aztecus* y caracterización bioquímica de el(los).

### Objetivos particulares

1. Aislamiento de los componentes del veneno con posible actividad antimicrobiana.
2. Determinación de la actividad biológica y caracterización de los péptidos activos.
3. Comparación de las secuencias obtenidas en bancos de datos.
4. Síntesis química del péptido obtenido más activo.
5. Determinación preliminar de su modo de acción.

## MATERIALES Y METODOS

### Obtención y separación del veneno

El veneno crudo de *Hadrurus aztecus* se obtuvo por estimulación eléctrica del telson de alacranes colectados en Iguala, estado de Guerrero. El veneno se recuperó en agua bidestilada y se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman OptimaTL por 15 minutos, a 4° C y 15000 x g de aceleración. El sobrenadante se liofilizó y conservó a -20° C, hasta su uso.

La purificación de los componentes solubles del veneno se llevó a cabo primeramente por filtración en gel en una columna de Sephadex G-50 (grado superfino, Pharmacia Fine Chemicals). El veneno liofilizado se disolvió en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, y se aplicó directamente a la columna. La fracción III obtenida de esta separación se purificó por cromatografía líquida de alta presión (CLAP) utilizando una columna (Vydac) C18 semi-preparativa, en un aparato Waters 600E equipado con un detector de UV, modelo Waters-486, con un gradiente lineal de 100% de solvente A (agua con 0.12% de ácido trifluoroacético (TFA)) a 60% de solvente B (acetonitrilo con 0.1% de TFA), durante 60 minutos.

### Caracterización química

La composición química del péptido se realizó por análisis de aminoácidos en un analizador Beckman 6300E después de hidrolizar por 20 horas a 110° C en tubos sellados al vacío con 6 N de HCl y 0.05% de fenol. El peso molecular mínimo obtenido del análisis de aminoácidos se confirmó por espectrometría de masas, utilizándose un aparato Finnegan-MAT.

El péptido purificado se secuenció en un ProSequencer modelo 6600 de MilliGen/Biosearch.(división de Millipore) en membranas de unión covalente Sequelon-AAK siguiendo los protocolos descritos por la compañía. Se usó péptido nativo para secuencia directa, así como los péptidos aislados por CLAP provenientes del rompimiento con la endopeptidasa Asp-N (Boehringer Mannheim). Las digestiones se hicieron con 100 µg de péptido cada vez disolviéndolo en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8.0, e incubándolo durante 4 horas a 37° C usando una dilución 1:100 (enzima:péptido).

La cuantificación del contenido de proteína durante los procedimientos cromatográficos se calculó asumiendo que una unidad de absorbancia a 280 nm equivale a 1 mg/ml de proteína. La concentración verdadera de péptido para la curva dosis-respuesta en bacterias, se determinó en base al análisis de aminoácidos.

### **Síntesis química del péptido y su purificación**

Se utilizó el método de fase sólida (Merrifield, 1963), mediante el uso de BOC-aminoácidos. La eficiencia de la incorporación de cada aminoácido se determinó por reacción de ninhidrina. Al final de la síntesis el péptido se liberó de la resina por rompimiento con ácido fluorhídrico. El péptido se purificó primeramente pasando por una columna de Sephadex G-10, para eliminar contaminantes de bajo peso molecular y después por CLAP, usando una columna semi-preparativa C4 fase reversa, con un gradiente lineal de acetonitrilo de 30-60% en presencia de 0.1% de ácido trifluoroacético en 60 minutos. Posteriormente se recromatografió en una segunda columna, analítica C18 de fase reversa (Vydac), con el mismo gradiente.

### **Ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano en fase líquida**

Se incubaron 5 µl de cada fracción, a ser ensayada, resuspendida en 0.01% de ácido acético y 0.2% de albúmina sérica bovina (BSA) a diferentes concentraciones en microplacas de ensayo de 96 pozos con 45 µl de un cultivo conteniendo aproximadamente  $1 \times 10^5$  bacterias por mililitro. El crecimiento microbiano se monitoreó por medida de densidad óptica a 492 nm, en un lector BioRad EIA modelo 2550, después de incubar por 18 horas a 37° C. Como control negativo se usó BSA 0.2% con 0.01% de ácido acético, y como control positivo formaldehído al 0.4%. Las cepas usadas fueron obtenidas de la colección del Instituto Nacional de Salud Pública, México.

### **Ensayo de actividad hemolítica**

Se utilizó sangre humana fresca lavándola tres veces con amortiguador salino de fosfatos (PBS), a pH 7.4, y centrifugando cada vez por 15 minutos a 900x g. Se hizo una suspensión al 0.5% con PBS. Se incubaron 195 µl de esta suspensión en microplacas de ensayo de 96 pozos con 5 µl de péptido a diferentes concentraciones. Se utilizó como control positivo (100% de lisis) una solución al 1% del detergente Triton X-100. Después de incubar por 1 hora a 37° C se centrifugó la muestra a 900 x g por 2 minutos y se leyó la absorbancia de 100 µl del sobrenadante a 541 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-50.

### **Preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV)**

Se colocó 1 mg de fosfolípido solubilizado en cloroformo, ya sea 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-fosfocolina (DPhPC), o una mezcla 1:1 en peso de éste y 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-fosfoserina (DPhPS), obtenidos de Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL), en un tubo de ensayo. Después de la evaporación del solvente bajo corriente de nitrógeno, la película de lípido se hidrató con 500 µl de amortiguador conteniendo 150 mM KCl y 10 mM Hepes, pH 7. La dispersión de lípido resultante se agitó en vortex y posteriormente se sonicó en frío en un sonicador de baño, entre 15 y 20 min, hasta obtener una solución transparente.

**Estudio de permeabilidad de membrana:** ensayo de difusión de potencial mediado por valinomicina (Loew, 1983; Sims, 1974)

Se tomaron 14 µl de la suspensión de SUVs (para una concentración final de 40.2 µM), y se diluyeron en 900 µl de un amortiguador isotónico libre de potasio (150 mM metilglucamina (MeGlc), 10 mM Hepes, pH 7); se añadió 1 µl (para una concentración final de 1 µM) del colorante fluorescente y sensible a potencial, 3, 3'-diethylthio-dicarbocyanine iodide (diS-C2-5, PM 492), obtenido de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). En seguida se añadió valinomicina (1 µl, para una concentración final de 1 nM), con objeto de crear lentamente un potencial de difusión negativo dentro de las vesículas, reflejándose en una disminución en la fluorescencia del colorante. Una vez que la fluorescencia se estabilizó, lo cual tomó entre 5 y 8 min, se fueron añadiendo diferentes cantidades de péptido, hasta la completa disipación del potencial de difusión, el cual se reflejó en un incremento gradual en la fluorescencia, monitoreada en un espectroflorómetro Beckman LD50, con una longitud de onda de excitación a 620 nm, y de emisión a 670 nm. El porcentaje de recuperación de la fluorescencia, Ft, se definió como:

$$F_t = (I_t - I_o / I_f - I_o) 100$$

En donde  $I_t$  es la fluorescencia observada después de la adición de péptido en el tiempo  $t$ ;  $I_o$  es la fluorescencia después de la adición de valinomicina, e  $I_f$  es la fluorescencia total antes de la adición de valinomicina.

## RESULTADOS

### Aislamiento y purificación del péptido

El veneno del alacrán *Hadrurus aztecus* fue inicialmente separado por cromatografía en Sephadex G-50, obteniéndose el perfil mostrado en la figura 1. En esta separación se obtuvieron siete fracciones (numeradas del I al VII en la Fig. 1, en cuya leyenda también se incluyen las recuperaciones). De éstas, la única capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli*, a las concentraciones utilizadas (al rededor de 5 µg por ensayo) fue la fracción III.

Los tubos correspondientes a esta fracción se mezclaron y liofilizaron. Soluciones posteriores de este material, en cantidades de alrededor de 2 mg por aplicación, fueron sometidos a la columna de CLAP (C18, semi-preparativa) resultando el perfil cromatográfico de la figura 2. Más de veinte sub-fracciones fueron obtenidas como se puede observar en la Fig.2, en donde el componente marcado con asterisco (el último, que eluye a los 50 minutos) mostraba actividad antimicrobiana. Esta sub-fracción fue finalmente aplicada a una columna analítica de CLAP resultando un componente puro (véase inserto Fig.2). De acuerdo a los cálculos de recuperación cromatográfica, este péptido corresponde al 1.7% del veneno total.

### Determinación de la estructura primaria

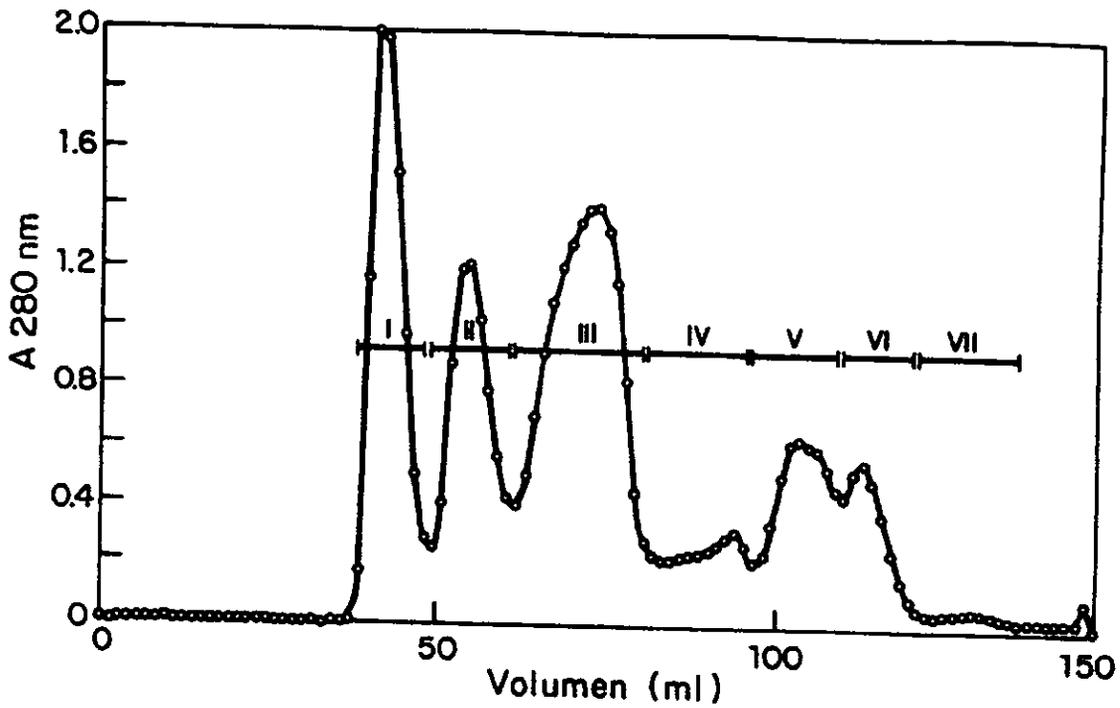
La secuencia de los primeros 30 aminoácidos del extremo amino terminal se determinó directamente; la secuencia completa se obtuvo por secuenciación de un fragmento obtenido mediante el rompimiento del péptido con la endopeptidasa AspN (Fig.3). Se encontraron tres sub-péptidos en la CLAP de este hidrolizado (Fig. 2a). El primero en eluir, a los 33.4 minutos (mismas condiciones que la Fig.2), correspondió a la secuencia indicada en la figura.

El análisis de aminoácidos realizado por triplicado mostró que se trataba de un péptido con peso molecular mínimo compatible con la presencia de al menos 38 residuos de aminoácidos, con un coeficiente de extinción molar de 20, 539.

Debido a que los análisis de aminoácidos del péptido nativo mostraron una gran variación en cuanto a los nanomoles presentes de cada aminoácido, se procedió a analizar los péptidos provenientes del hidrolizado con AspN, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 1, y que coinciden con los datos de la secuencia.

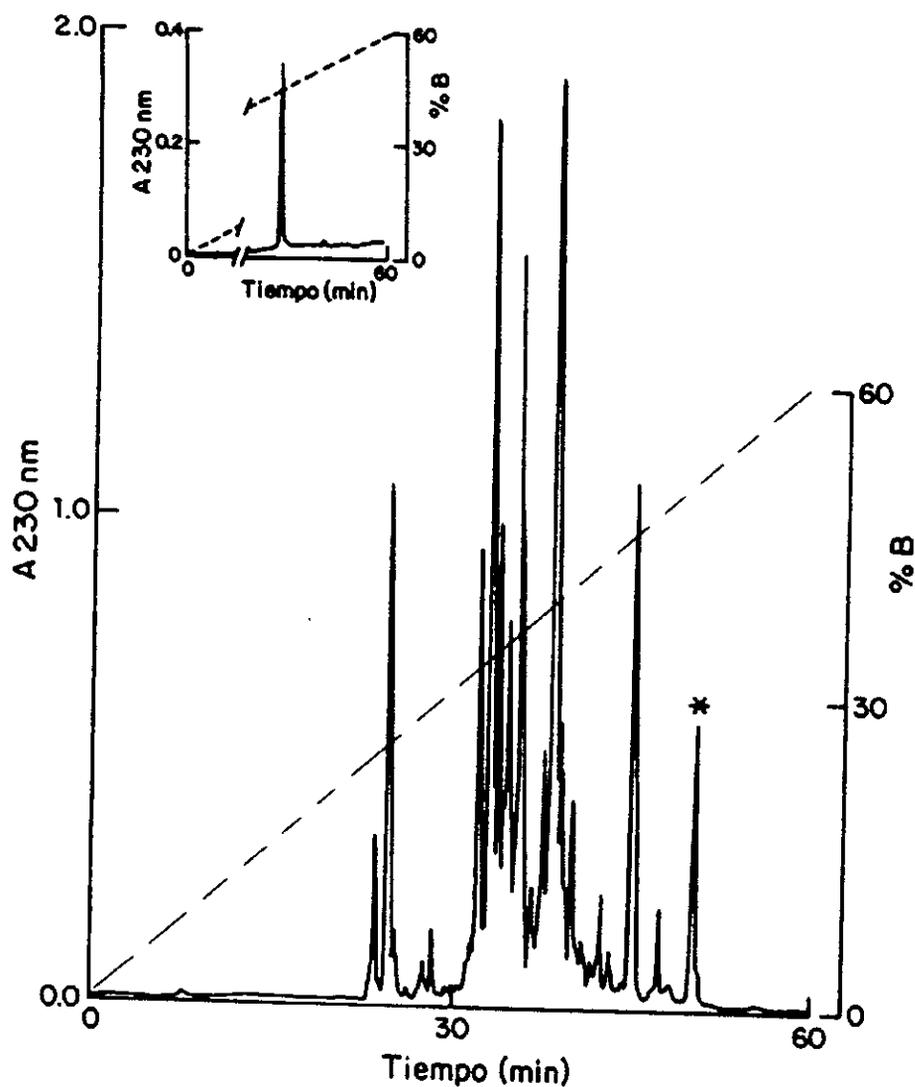
El péptido nativo sometido a análisis de espectrometría de masa demostró ser homogéneo y tener un peso molecular de 4,435.3 Da, contra 4,436.15 Da del esperado. El peso molecular determinado por espectrometría de masas del fragmento C-terminal, separado a los 33.4 minutos, fue de 2265.3 Da, lo que coincide perfectamente con el peso del número de aminoácidos encontrado por secuenciación directa de este sub-péptido en el microsecuenciador automático.

Así, los datos de espectrometría de masas, la secuencia de aminoácidos y la cuantificación de éstos, concuerdan con la secuencia de la figura 3. Se trata de un péptido de 41 residuos de aminoácidos, 7 de los cuales son básicos, que por provenir de un alacrán del género *Hadrurus*, y por su efecto antibacteriano, resolvimos llamarlo Hadrurina. La Hadrurina tiene un punto isoeléctrico calculado de 11.08.



**Fig.1. Separación por filtración molecular del veneno de *Hadrurus aztecus*.**

El veneno soluble (69 mg en 1.5 ml) se fraccionó en una columna de Sephadex G-50 superfino (0.9 x 150 cm) equilibrada y corrida en amortiguador de acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, a un flujo de 12 ml/h. Se colectaron tubos con 1.5 ml y se agruparon de acuerdo a la absorbancia leída a 280 nm como se indica en las barras horizontales. La recuperación total fue del 81%, del cual aproximadamente el 25% corresponde a la fracción I, el 17% a la fracción II, el 29% a la fracción III y el 29% restante a las demás fracciones menores. La fracción III contenía efecto antimicrobiano para *E. coli*.



**Fig. 2. Separación por CLAP de la fracción III.**

La fracción III de la Fig. 1 (18 mg) se separó en una columna C18 semi-preparativa de fase reversa, con un gradiente lineal de 100% de solución A (0.12% de TFA en agua) a 60% de solución B (0.1% de TFA en acetonitrilo) durante 1 hora a un flujo de 2 ml/h. El componente marcado con asterisco presentó efecto antimicrobiano en contra de *E. coli*; se comprobó su pureza por CLAP (véase inserto en esta figura), análisis y secuencia de aminoácidos, así como por espectrometría de masas.



## Actividad antibacteriana y citotóxica

En la figura 4 se muestran los resultados promedio, de al menos tres experimentos independientes, de la aplicación de Hadrurina a cultivos de aislados clínicos de bacterias. La actividad antibacteriana se probó en una serie de cepas, observándose una mayor sensibilidad en *E. coli* 109, *S. marcescens* ATCC13880 y *E. cloacae* 129, con MICs menores a 10  $\mu\text{M}$ . Los cultivos de *S. thyphi* y *K. pneumoniae* se ven relativamente poco afectados hasta concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  de péptido, pero a 40  $\mu\text{M}$  la inhibición del crecimiento es prácticamente total. El resto de las cepas presenta una inhibición gradual de su crecimiento, la cual es total para todas a 50  $\mu\text{M}$ .

La actividad citotóxica se presenta en la figura 5; aunque se observó bastante variabilidad en cada repetición (representada por un color y una línea diferente en la figura), y sólo se incluyen las más homogéneas, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  ya se observa una actividad importante. Este experimento se realizó con veneno total de los alacranes *Centruroides limpidus*, *Centruroides noxius*, *Pandinus imperator*, *Anuroctonus pheodactilus* y *Hadrurus ariztecus*, a una concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$ , obteniendo resultados positivos sólo con el veneno de este último organismo (datos no mostrados).

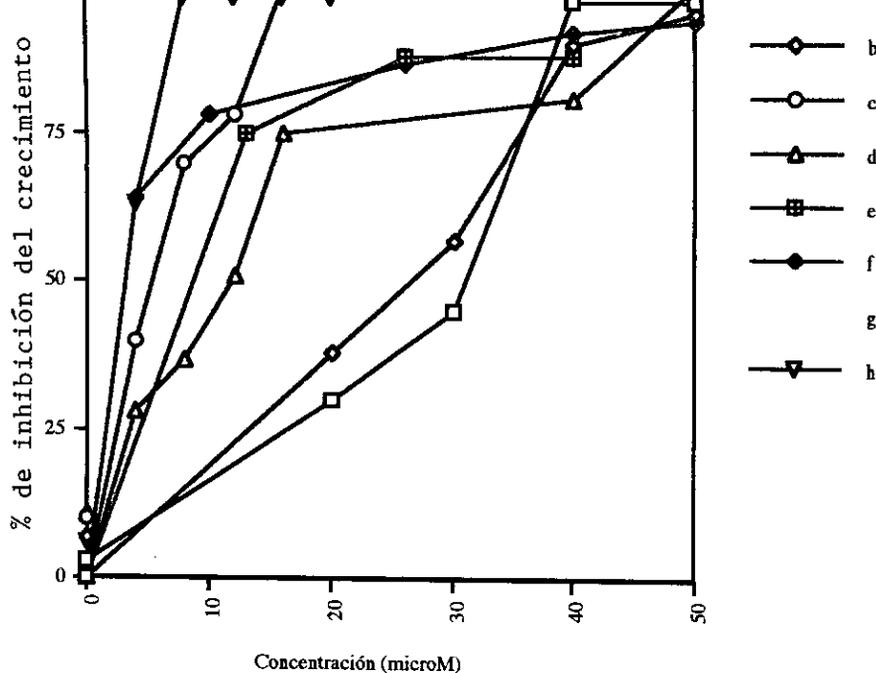
## Síntesis del péptido en fase sólida

Con el objeto de caracterizar en mayor medida este péptido y confirmar definitivamente la estructura primaria propuesta, se sintetizó y purificó a homogeneidad 200 mg de la Hadrurina, obteniendo un rendimiento final del 7% del péptido puro. La identidad del péptido sintético fue confirmada por secuencia del extremo amino terminal y por CLAP (figura 6). En esta figura, la letra **a** corresponde a una muestra de la Hadrurina nativa, tal como es obtenida por purificación del veneno; la letra **b** es el producto sintético purificado por CLAP y la letra **c** una mezcla de 50% de Hadrurina nativa y 50% de Hadrurina sintética, obteniéndose un solo pico simétrico. La actividad antibacteriana del péptido sintético fue esencialmente la misma que la del nativo, con lo que se comprueba su identidad, funcionalidad y correcta estructuración.

## Análisis de la secuencia

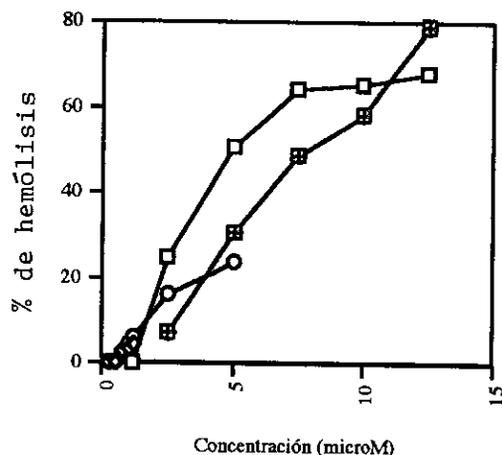
La comparación de la estructura primaria de la Hadrurina contra las presentes en la base de datos Swissprot utilizando el programa Fasta de GCG no reveló inicialmente similitudes significativas con ninguna proteína conocida. Sin embargo, utilizando un banco de secuencias de péptidos antimicrobianos creado con objeto de sensibilizar las búsquedas, se encontró una similitud significativa de los 10 primeros residuos del extremo amino terminal con la brevinina 2e y la gaegurina 4, con seis o siete residuos idénticos a ellas y tres o dos similares, respectivamente (figura 7, parte superior). El resto de la secuencia no presenta similitudes importantes, sobretodo tomando en cuenta la presencia del puente disulfuro en el extremo carboxilo de los péptidos de rana (rana box), el cual no se encuentra en la Hadrurina.

Por lo que respecta al carboxilo terminal, la Hadrurina presenta similitudes a partir del residuo 14 con las cecropinas, sobretodo con la cecropina P1 de cerdo, compartiendo



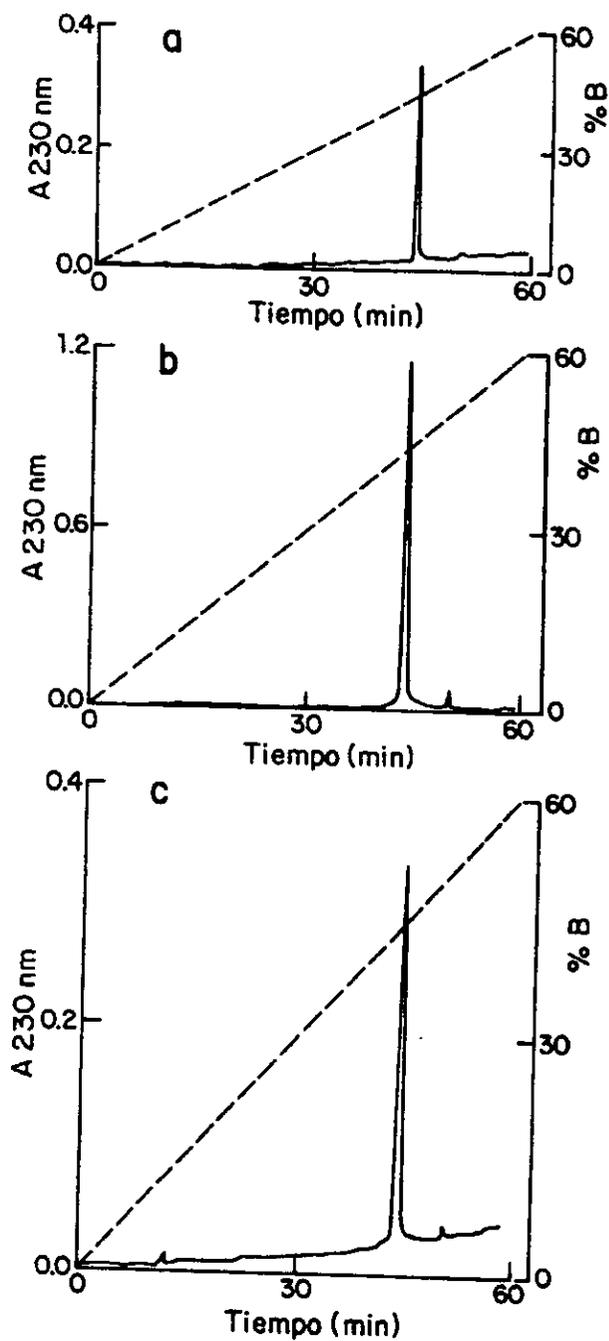
**Fig. 4. Actividad antibiótica de la Hadrurina.**

La inhibición del crecimiento se estimó monitoreando el decremento en la absorbancia a 492 nm, después de incubar a los microorganismos con diferentes concentraciones de péptido por 18 hr a 37°C. Al tiempo cero la absorbancia era igual a cero. Después de 18 horas de incubación, la absorbancia era máxima para los cultivos controles positivos, pero para los cultivos en presencia de distintas concentraciones de Hadrurina, la absorbancia disminuía de acuerdo a la curva indicada en la gráfica. Como control negativo se usó BSA 0.2% con 0.01% de ácido acético, y formaldehído al 0.4% como control positivo, para cada tipo de microorganismo ensayado, donde **a** *Salmonella thyphi*, **b** *Klebsiella pneumoniae* 9, **c** *Enterococcus cloacae* 129, **d** *Pseudomonas aeruginosa* PG201, **e** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 **f** *Enterococcus faecalis* 51, **g** *Escherichia coli* 109, **h** *Serratia marscencens* ATCC13880.



**Fig.5. Efecto hemolítico de la Hadrurina**

La actividad hemolítica se estimó monitoreando el incremento en la absorbancia a 541 nm, después de incubar a la muestra de sangre en PBS con diferentes concentraciones de péptido por una hora a 37 °C. Como control positivo se utilizó Triton X-100 al 1%; y como control negativo BSA 0.2% con 0.01% de ácido acético.



**Fig. 6. - Comprobación por CLAP de la identidad de la Hadrurina sintética con la nativa.**

a.- Separación de 20  $\mu\text{g}$  de Hadrurina nativa. b. - Aplicación de Hadrurina sintética (approx. 50  $\mu\text{g}$ ). c. - Coinyección de una mezcla equivalente (10  $\mu\text{g}$  de cada una) de Hadrurina nativa más sintética. Para mejor apreciación de la pureza se ajustó la escala de absorbancia en la gráfica, esto es, para la sintética (letra b), se puso más material, con la intención de poder evidenciar posibles contaminantes. Se utilizó una columna C18 analítica con un gradiente lineal de 0% de solución A (0.12% TFA en agua) a 60% de solución B (0.1% de TFA en acetonitrilo) durante 1 hora a un flujo de 1 ml/h.

aproximadamente la misma extensión, el primer residuo de Trp, el triplete Ser-Lys-Thr, el triplete de residuos básicos (Lys-Arg-Lys en Hadrurina y Lys-Lys-Arg en CecP1), la Pro cerca del extremo carboxilo, y algunos otros residuos similares (figura 7, parte inferior). En esta figura se puede observar que también existen similitudes con el resto de las cecropinas, y se arregló de tal manera que se maximizara la homología con éstas. Las diferencias más importantes de la Hadrurina con estas secuencias se producen por la presencia del Trp 29, cuyo equivalente no existe en las cecropinas, y de la Gln 20, ya que el residuo consenso en esta posición es Lys.

Las comparaciones de la Hadrurina contra la Br2e, Gae4 y CecP1 resultaron ser significativas (no debidas al azar), lo cual se evaluó mediante el programa Gap del paquete GCG.

Los algoritmos de predicción de estructura secundaria de Chou-Fasman (1978), del Baylor College of Medicine (BCM) (Solovyev, 1994), SOPMA (Geourjon, 1994, 1995), y PHD (Rost, 1993a, b, 1994), predijeron un contenido de alfa hélice de 68.3%, 51.2%, 46.3% y 63.4% respectivamente, con un índice de confianza de alrededor de 65%. Las regiones helicoidales se muestran en la figura 8a. En ellas se aprecia un consenso en cuanto a la presencia de una región para la que no es posible definir estructura, localizada entre los residuos 12 y 16.

Con objeto de predecir las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de la estructura secundaria, se empleó el modelado de rueda helicoidal (Schiffer y Edmundson, 1967). El modelo resultante se muestra en la figura 8b, y comprende dos regiones helicoidales. La primera abarca del residuo 1 al 11, y la segunda comprende el resto de la secuencia a partir del aminoácido 18. Para mostrar una conformación anfipática, con la mayoría de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en lados opuestos de la hélice, la segunda hélice tiene que rotar aproximadamente 100° con respecto a la primera, lo cual podría ser satisfecho por la flexibilidad de los residuos 12 a 16 propuesta por los algoritmos de predicción de estructura.

Con base en los datos anteriores se generó un modelo de estructura tridimensional, el cual se muestra en la figura 9; en él se pueden apreciar las dos hélices anfipáticas propuestas separadas por una región flexible.

### **Estudio de permeabilidad de membrana**

Se examinó la eficacia de la Hadrurina en perturbar el empaquetamiento de lípidos de liposomas y causar la salida de su contenido, utilizando el ensayo de disipación del potencial de difusión. Para ello se mezcló al péptido, en cantidades crecientes, con las vesículas (en concentración constante), pretratadas con el colorante fluorescente y valinomicina. Se monitoreó la recuperación de la fluorescencia y se graficó contra la relación molar péptido/lípido (P/L), cuyo rango fue de 0.002 a 0.15 (figura 10). Cada punto representa, para los liposomas de PC y PC/PS, la media de cinco y tres experimentos independientes, respectivamente. Se observó una actividad perturbadora en los liposomas de PC desde las más bajas relaciones P/L usadas, incrementándose gradualmente, mientras que los liposomas de PS/PC fueron relativamente insensibles, hasta que se llegó a una concentración crítica en donde se recuperó el 50% de la fluorescencia en promedio, hasta recuperar el 100% de la fluorescencia a un relación P/L un poco mayor de 0.1. Los liposomas de PC también recuperaron el 100% de fluorescencia a esta relación.

La actividad mínima de la Hadrurina fue observada con las vesículas de PC con un radio P/L de 0.008, lo que corresponde a un radio molar L/P de 125. Si asumimos un diámetro de vesícula promedio de 35 nm, tomamos en cuenta que cada molécula de fosfolípido abarca un área de  $70 \text{ \AA}^2$ , y consideramos una distribución aleatoria de los monómeros de Hadrurina en los liposomas, entonces aproximadamente 40 moléculas de péptido se unen a una vesícula.

Realizando el mismo cálculo para las vesículas de PC/PS, en donde la actividad mínima se observa a radios P/L de 0.096, tenemos que se unen más de 500 moléculas a una vesícula.

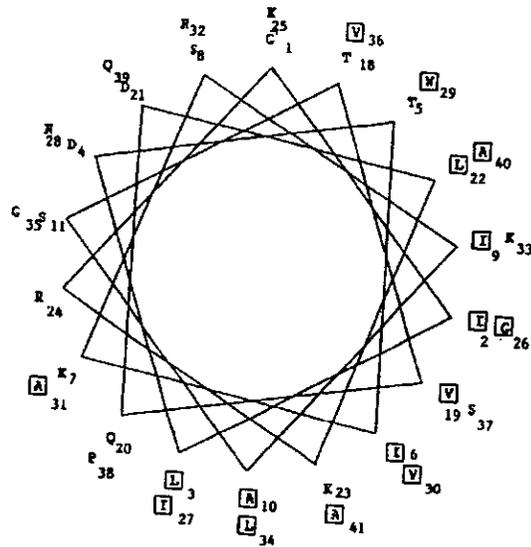
e4\_ranru GILDTLKIQFAKGVKDLVKAAQCVLSTVSCKLALTC  
 GILD  
 ILDTIKSIASK  
 VVNSKTVQDLKRRGINWVANKLGVSPQAA  
 SWLSKTAKKLENSAKKRISEIAIAIQPR  
 RVKIFKKIEKVQYIRDIVKAPAVAVQAATI  
 KWKIFKKIEKVRNIRNIIKAPAVAVLEAKAL  
 WNPKELERAORVRDATTSA.PAVATV.QAAATA

**Figura 7. Similitud de la Hadrurina con otros péptidos antimicrobianos.**

Se observa una gran similitud de los diez primeros residuos del extremo amino terminal de la hadrurina con las brevinina 2e y la gaegurina 4 de piel de rana. Por otro lado, el extremo carboxilo terminal muestra una mayor similitud con la cecropina 1 de cerdo, aunque también tiene una serie de aminoácidos consenso con el resto de las cecropinas. Obsérvese que la cecropina P1 no tiene el segmento correspondiente a los 12 primeros aminoácidos de la Hadrurina. Las búsquedas de homología se hicieron con el programa Fasta, los alineamientos con Pileup, y la significancia con el programa Gap del paquete GCG, utilizándose blancos para maximizar las homologías.

**a**

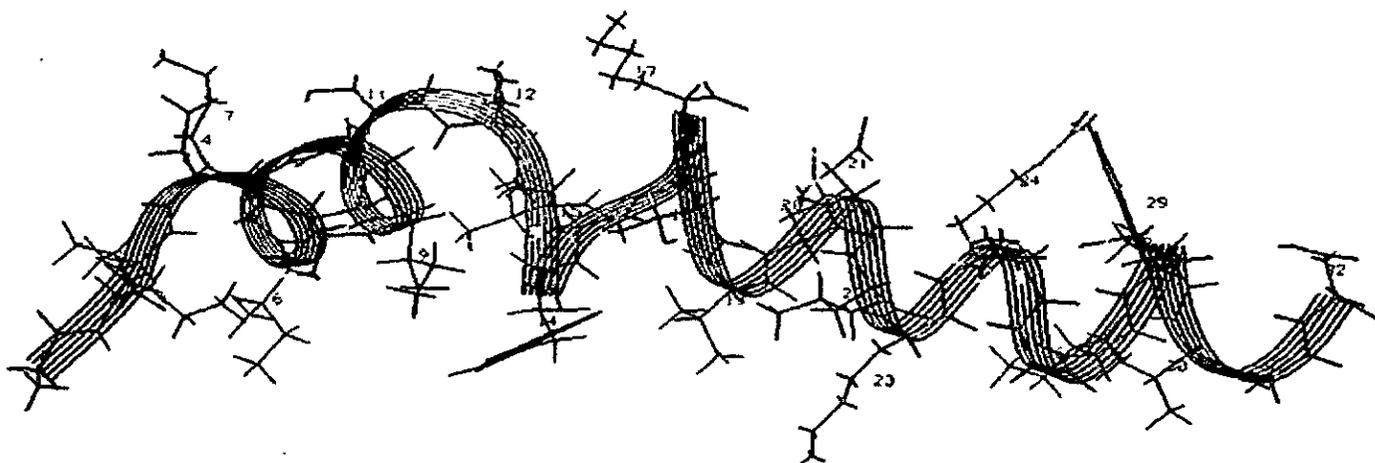
		10	20	30	40
Secuencia	GILDTIKSIASK	VVNSKTVQDLKRRGINWVANKLGVSPQAA			
Chou-Fasman	hhhhhhhhhhhh	ttthhhhhhhh	BBBBBB	tt	hhhhhh
SOPMA	c	hhhhhhhhhh	ccccchhhhh	ttc	hhhhhtcccccc
PHD		HHHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHHHHH		
BCM	aaaaaaaaa		aaaaaaaaa		



**Figura 8. Predicción de la estructura secundaria y diagrama de Schiffer-Edmundson**

**a.** Resultados de la predicción de cuatro diferentes algoritmos, los cuales muestran una propensión helicoidal de los primeros 11 residuos, seguida por una zona de hasta cinco residuos no definida, para terminar con una segunda zona helicoidal.

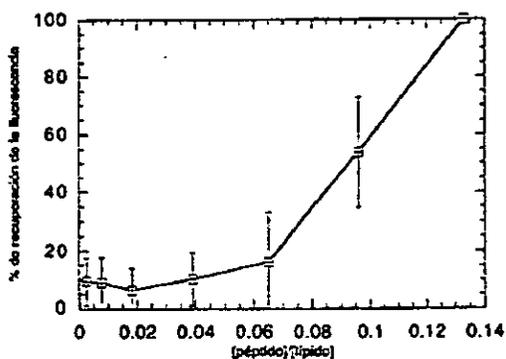
**b.** De acuerdo a los resultados anteriores, se muestra la probable conformación alfa-helicoidal anfipática de la Hadrurina, con una hélice de los residuos 1 a 11 y otra del 18 en adelante. Los cuadros indican aminoácidos hidrofóbicos. Se muestra el número de residuo a partir del amino terminal. La figura se creó con el programa Helicalwheel del paquete GCG.



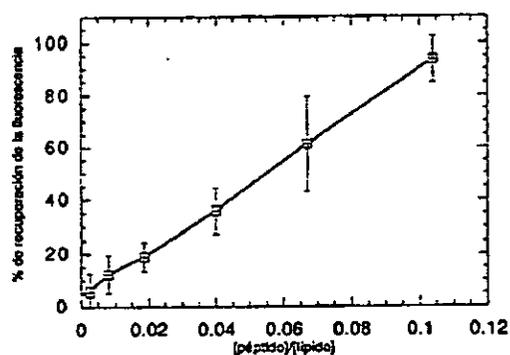
**Figura 9. Modelo de la estructura tridimensional de la Hadrurina**

De acuerdo a los resultados de los programas de predicción de estructura secundaria se realizó un modelo con cálculos de minimización de energía y dinámica molecular, usando el programa de despliegamiento gráfico INSIGHT II y los paquetes HOMOLGY, BIOPOLYMER y DISCOVER de Biosym Technologies. Se observa la presencia de un asa de los residuos 9 al 15. Los residuos hidrofóbicos se muestran en negro, y los cargados en violeta.

**Ensayo de difusión de potencial en liposomas de PS/PC**



**Ensayo de difusión de potencial en liposomas de PC**



**Figura 10. Disipación máxima del potencial de difusión de vesículas inducida por Hadrurina.** La Hadrurina fue añadida a un amortiguador isotónico libre de potasio conteniendo a las vesículas preequilibradas con el colorante fluorescente diS-C2-5 y valinomicina. Se grafica la recuperación de la fluorescencia medida en el momento de su estabilización después de mezclar con el péptido.

## DISCUSION

El análisis de la actividad antimicrobiana que está presente constitutivamente en el veneno del alacrán *Hadrurus aztecus* reveló la presencia de una molécula perteneciente a la familia de los péptidos antimicrobianos, y que denominamos Hadrurina. Este descubrimiento confirma la aparición temprana de este tipo de moléculas dentro del reino animal, dada la antigüedad de estos arácnidos.

La Hadrurina es un péptido que fue purificado por un protocolo de tres pasos incluyendo uno de cromatografía de exclusión molecular y dos de CLAP. El seguimiento de la actividad se realizó mediante ensayos de inhibición zonal de crecimiento bacteriano (*E. coli*). La homogeneidad de la preparación final se comprobó por secuencia y análisis de aminoácidos, espectrometría de masas, y síntesis en fase sólida. Se obtuvo una molécula de 41 residuos de aminoácidos de carácter básico (siete residuos de este tipo, tres de los cuales están agrupados de la forma Lys-Arg-Lys); y que cuenta además con dos aminoácidos ácidos y dos triptofanos. Este péptido no presenta cisteínas, lo que hace una diferencia importante con los péptidos de alacrán reportados hasta la fecha, todos ricos en este aminoácido, incluyendo aún a los péptidos antimicrobianos encontrados en la hemolinfa de otros alacranes (Cociancich *et al*, 1993; Ehret *et al*, 1996).

Este hallazgo se suma a los de los péptidos de este tipo aislados del veneno de animales: la melitina de abeja (Fennell *et al*, 1968), la crabrolina de abejorro (Argiolas y Pisano, 1984), y las lycotoxinas de araña (Yan y Adams, 1998). Los dos primeros péptidos presentan, al igual que la Hadrurina, actividad contra células eucariotes además de su actividad antibiótica, por lo que son también consideradas como toxinas. Fisiológicamente estas moléculas podrían presentar tanto funciones de ataque como de defensa, lo que explicaría su presencia permanente en el veneno; además, aunque su síntesis continua consume mucha energía, no requiere la existencia de un sistema complejo de reconocimiento ni cascadas regulatorias que conduzcan a la transcripción rápida de estos genes por reto.

La actividad hemolítica ya había sido reportada para el veneno de los alacranes *Nebo hierichonticus* (Rosin, 1969), *Heterometrus fulvipes* (Venkaiah, 1983), y *Tityus serrulatus* (Correa, 1997). Sin embargo, ésta no es inherente a todas las especies ya que, como se mencionó en los resultados, de cinco especies distintas (cuatro géneros probados) de alacranes, sólo el *Hadrurus* la presentó. Este ensayo se realizó en ausencia de calcio, con lo que se excluye la interferencia de fosfolipasas de tipo A2, ya reportadas para alacranes como *Pandinus imperator* (Zamudio, 1997). Este hecho podría apuntar a que esta especie, cuyo piquete no muestra toxicidad para mamíferos, y sólo a concentraciones elevadas el veneno es tóxico para insectos como grillos y crustáceos como acociles, ha desarrollado mecanismos de ataque paralelos a la producción de toxinas bloqueadoras de canales iónicos, las cuales ya se han encontrado también en este alacrán (Torres-Larios *et al*, 1997; Prestipino, comunicación personal), y posiblemente dirigidos hacia blancos aún no caracterizados.

La Hadrurina es activa, a concentraciones micromolares, en contra de una variedad de bacterias patógenas a humanos. Cabe resaltar que en este estudio se utilizaron aislados clínicos comúnmente resistentes a antibióticos, y sin pared celular alterada, lo que explica las MICs relativamente altas encontradas, ya que comúnmente se reportan resultados utilizando cepas sensibles. La actividad contra estas bacterias eventualmente podría ser interesante desde el punto de vista aplicado. Desafortunadamente, el tamaño de la molécula

hace difícil su producción en masa, aunque su factibilidad se demostró en este trabajo mediante su síntesis química, lo que también corroboró la veracidad del hallazgo. Sin embargo, sería conveniente localizar dominios cortos del péptido activos que faciliten la síntesis química, el desarrollo de análogos, y que disminuyan las concentraciones efectivas peso/volumen para su posible aplicación clínica.

El examen de la secuencia de la Hadrurina muestra que los diez primeros residuos del amino terminal tiene similitudes importantes con el extremo correspondiente de las brevininas de tipo 2, sobretudo con la brevinina 2e y gaegurina 4, que presentan un residuo de aspártico en la posición 4, al igual que la Hadrurina, además de los otros ocho residuos idénticos o similares. Sin embargo, después de esta zona de máxima homología es necesaria la introducción de un blanco para maximizar las identidades, las cuales son reducidas, tomando también en consideración que el patrón estructural formado por las cisteinas, presente en los péptidos de piel de rana, no se encuentra en nuestro péptido. Es por eso que en lo concerniente a la homología en el extremo carboxilo terminal encontramos más similitudes con las cecropinas, en particular con la cecropina aislada de cerdo, que es la que menor semejanza guarda con el resto de las secuencias de este grupo. Las similitudes de la Hadrurina con la CecP1 son pocas pero significativas, y hay que tomar en cuenta que se presentan además identidades con las otras cecropinas.

Así, nuestro péptido parece compartir características secuenciales con ambos tipos de péptidos, haciendo de él una especie de híbrido que, a diferencia de la diptericina, las penaedinas y "big defensin", podría ser compatible con la estructura tridimensional de ambas regiones; la estructura predicha en la región amino terminal para las brevininas es alfa helicoidal, mientras que la estructura de la CecP1 se ha descrito también como helicoidal. Por otro lado, los algoritmos de predicción de estructura indican que la Hadrurina tiene propensión de asumir una conformación alfa helicoidal comprendiendo los residuos 1 a 11 y 18 a 41. Cuando estas regiones se grafican en una proyección de Schiffer-Edmundson, los residuos hidrofóbicos están alineados en una porción del cilindro helicoidal, y abarcan, de una manera bien definida, aproximadamente una tercera parte del área en la primera hélice, mientras que en la segunda, estos aminoácidos abarcan la mitad del área. Los ángulos hidrofóbicos marcados sugieren que ambas hélices tienden a estar en la superficie de la membrana. Los residuos de lisina no se encuentran agrupados sino distribuidos a lo largo de la superficie polar, e inclusive se encuentran dos residuos de este aminoácido dentro de la región hidrofóbica de la segunda hélice. Otros tres de los siete residuos básicos se encuentran en la región hidrofílica (uno en la primer hélice y dos en la segunda), y los dos restantes están en la zona no definida estructuralmente (residuos 12-17), y que es necesaria para que las dos regiones anfipáticas puedan adoptar la misma orientación.

El modelo final de la estructura tridimensional muestra a las dos hélices anfipáticas unidas por un hexapéptido de conformación indefinida, conteniendo, además de los dos residuos básico ya mencionados, uno de los residuos de triptofano, por lo que el papel que juega esta zona en la actividad podría ser muy importante. La síntesis química proveyó del material necesario para un futuro estudio de NMR con el fin de validar la hipótesis de esta estructura. Ya se han realizado estudios preliminares de este tipo con el péptido nativo en el laboratorio de la Dra. Muriel Delepierre en el Instituto Pasteur, París. El espectro unidimensional de protones de la Hadrurina en solución acuosa no mostró indicación de

una estructura definida (datos no mostrados), lo cual era previsible debido a la ausencia de motivos que impriman constricciones estructurales, por lo que será necesario realizar estos estudios en ambientes no acuosos, como para la mayoría de los péptidos helicoidales.

Muchas líneas de evidencia experimental han demostrado que la habilidad de formar hélices anfipáticas en la interfase de la membrana está directamente correlacionada con las propiedades antimicrobianas y citolíticas de estos péptidos, esto es, que sus actividades se deben a permeación de membranas a través de interacciones péptido-lípido, y no a un reconocimiento mediado por algún receptor. Una manera de entender el mecanismo molecular por el que estas hélices producen el efecto lítico es a través de estudios de unión y perturbación de membranas fosfolipídicas modelo, pudiéndose escoger entre los sistemas de bicapas lipídicas planas o el de vesículas.

En el sistema de bicapas se puede estudiar la formación de canales de una manera mucho más sensible, ya que se puede detectar un sólo canal conductor en una membrana plana de 100 micras de diámetro con  $10^{11}$  moléculas de lípido, mientras que una vesícula de 100 nm de diámetro sólo está constituida por  $10^5$  moléculas de lípido (Matsuzaki, 1998).

El sistema de vesículas tiene la ventaja de ser cerrado, por lo que se mimetiza a la célula, y cualquier estrés impuesto asimétricamente se puede transmitir a la otra monocapa (Matsuzaki, 1998), y aunque la preparación de liposomas es heterogénea en términos de la tensión superficial y de las diferencias entre la distribución de lípidos entre las monocapas como resultado de diferencias en tamaño (Gomes, 1993), y puede presentarse agregación y fusión de las vesículas, sobre todo cuando se usan SUVs (Matsuzaki, 1995b), es el más ampliamente usado debido a las características no homogéneas de los canales que dificultan su estudio en bicapas.

Estudios previos han mostrado que los péptidos antimicrobianos no hemolíticos, como las cecropinas, dermaseptinas y magaininas, tienen una baja actividad perturbadora sobre membranas zwitterionicas comparada con la presentada sobre fosfolípidos cargados negativamente. Se presenta lo contrario para los péptidos que también presentan actividad citolítica; por ejemplo, la melitina rompe vesículas de PC, cuya lisis se correlaciona con la de eritrocitos humanos, a una concentración casi diez veces mayor que la requerida para romper liposomas de PS (Matsuzaki, 1995a), y se observa el mismo comportamiento con la pardaxina (Oren, 1996).

Los ensayos realizados con Hadrurina muestran que ésta tiene preferencia en lisar fosfolípidos zwitteriónicos de PC a bajas concentraciones; a relaciones péptido/lípido más altas también se presenta actividad en fosfolípidos ácidos de PC/PS, provocando un 100% de lisis a la misma relación en donde se presenta también lisis total en los liposomas de PC. Tomando en cuenta que el área superficial ocupada por un péptido alfa helicoidal de 41 aminoácidos es de  $690 \text{ \AA}^2$  aproximadamente, el número de monómeros unidos a las vesículas de PC cubrirían un 8% de la superficie del liposoma al momento en que se empieza a registrar perturbación de la membrana, mientras que prácticamente formarían una monocapa que cubriría toda la superficie de las vesículas de PS/PC para también comenzar a notar algún efecto. Este resultado es indicativo del distinto tipo de interacciones que rigen el comportamiento lípido-péptido; por un lado, las hidrofóbicas, que en el caso de los liposomas de PC tienen mayor influencia, y que para la Hadrurina parecen ser particularmente importantes, promoviendo posiblemente su oligomerización, y por otro las electrostáticas, más determinantes para la interacción con los liposomas de PC/PS, las cuales para tener influencia requieren de una concentración crítica mayor.

La actividad en liposomas de PC, como ya se mencionó, está controlada, entre otros factores, por la hidrofobicidad del péptido, la cual a su vez se correlaciona con la heliticidad en ambientes membranales. Una manera de estimar experimentalmente este parámetro es determinando el tiempo de retención en la matriz de fase reversa de la columna de CLAP, el cual está dado predominantemente por la extensión de las interacciones hidrofóbicas (Regnier, 1987). Mientras mayor es este tiempo, correspondiente a un porcentaje cada vez más alto de acetonitrilo, más hidrofóbica será la molécula en cuestión. Nuestro péptido tiene un tiempo de retención que corresponde aproximadamente a la presencia de un 50% de acetonitrilo en el amortiguador de elución. Considerando el porcentaje de este solvente que requiere la melitina para eluir de la columna en condiciones similares, que es de 53% (Blondelle y Houghten, 1991), podemos considerar que la Hadrurina casi es tan hidrofóbica como ella.

La hidrofobicidad se puede disminuir aumentando la carga del péptido por introducción de aminoácidos cargados, lo cual también aumenta el momento hidrofóbico. La sustitución de aminoácidos catiónicos por negativos no afecta la hidrofobicidad ni el momento hidrofóbico, pero favorece la interacción con las membranas bacterianas (Wieprecht, 1997). Asimismo, con el fin de cambiar la hidrofobicidad, pero no otros parámetros fisicoquímicos, con objeto de determinar la importancia de su papel, se pueden seguir las siguientes reglas:

- 1) No sustituir las glicinas ya que otro residuo incrementará la propensión helicoidal.
- 2) Mantener el número y posición de los aminoácidos cargados para evitar modificaciones de las propiedades de interacción electrostática.
- 3) Sustituir los residuos hidrofóbicos por hidrofóbicos e hidrofílicos por hidrofílicos, manteniendo así constantes los ángulos correspondientes de la hélice.
- 4) Mantener el momento hidrofóbico por sustituciones simultáneas en ambos lados de la hélice. (Wieprecht, 1997)

En base a los resultados y consideraciones anteriores, proponemos las siguientes variantes de la Hadrurina a fin de obtener mayor conocimiento de las interacciones péptido-lípido y que eventualmente nos ayudarían a obtener una selectividad hacia lípidos cargados negativamente:

Sintetizar el péptido amidado. La amidación del C-terminal estabiliza a la hélice debido a la eliminación de las interacciones de Coulomb desfavorables entre la carga negativa del carboxilo y el dipolo de la hélice, con lo que se podría favorecer la actividad hemolítica pero también la antimicrobiana por aumento de las fuerzas electrostáticas. Esta variante ya se sintetizó y actualmente está en proceso de purificación y prueba.

Cambiar los residuos de triptofano por fenilalanina. Este cambio en ocasiones puede anular inclusive la actividad antimicrobiana, como para la cecropina, pero en péptidos como la indolicidina sólo ha suprimido la actividad hemolítica (Subbalakshmi, 1996).

Permutar los residuos de ácido aspártico por residuos de lisina, disminuyendo así posibles repulsiones electrostáticas con las membranas ácidas.

Por lo que se refiere a las condiciones del ensayo, en este experimento hay que tomar en cuenta la existencia de un potencial negativo dentro de las vesículas previo a la adición del péptido, lo cual se ha reportado como necesario para la actividad de ciertos péptidos

antibacterianos (efecto electroforético), por lo que sería deseable realizar otro tipo de ensayos en ausencia de este potencial con objeto de verificar su influencia.

## CONCLUSIONES

- 1.- Demostramos la presencia, en el veneno de alacranes no retados de la especie *Hadrurus aztecus*, de un péptido, denominado Hadrurina, de 41 residuos de aminoácidos, con características antibacterianas y citotóxicas, diferente estructuralmente a cualquier péptido de alacrán reportado hasta la fecha.
- 2.- La Hadrurina muestra diversas similitudes secuenciales con péptidos antimicrobianos de organismos muy distantes evolutivamente, lo que demuestra la aparición temprana y conservación de estas moléculas en el reino animal.
- 3.- Esta molécula, cuya estructura predicha es helicoidal, de carácter anfipático, tiene actividad en sistemas modelo de membranas a concentraciones similares a las que se presenta la actividad antibiótica, con lo que se comprueba la ausencia de receptor en el proceso de interacción con su blanco.
- 4.- La elevada hidrofobicidad de la Hadrurina hace que además de poder permeabilizar membranas de carácter ácido pueda penetrar también sistemas de carácter zwitteriónico incluso con mayor eficacia que la ejercida contra las primeras.
- 5.- Debido a sus características antimicrobianas y hemolíticas, este péptido podría servir como elemento de ataque y defensa de este artrópodo contra su presa y microorganismos invasores.

## PERSPECTIVAS

Sintetizar y probar las variantes del péptido propuestas con objeto de encontrar una más corta y/o con mayor actividad y/o sin efecto hemolítico.

Realizar una mayor cantidad de ensayos biológicos. Una posible aplicación terapéutica exige en primera instancia el contar con espectros de actividad que incluya al menos diez cepas de cada patógeno. Asimismo, se podrían buscar otros blancos eucariotes, como levadura, en donde ensayos preliminares indican actividad, protozoarios, y hongos filamentosos.

Determinar la estructura tridimensional del péptido en cuestión, la cual generará información útil para la síntesis de variantes.

Realizar otro tipo de ensayos con liposomas de composiciones más variadas, y dirigidos también al estudio de la unión y oligomerización del péptido.

antibacterianos (efecto electroforético), por lo que sería deseable realizar otro tipo de ensayos en ausencia de este potencial con objeto de verificar su influencia.

## CONCLUSIONES

- 1.- Demostramos la presencia, en el veneno de alacranes no retados de la especie *Hadrurus aztecus*, de un péptido, denominado Hadrurina, de 41 residuos de aminoácidos, con características antibacterianas y citotóxicas, diferente estructuralmente a cualquier péptido de alacrán reportado hasta la fecha.
- 2.- La Hadrurina muestra diversas similitudes secuenciales con péptidos antimicrobianos de organismos muy distantes evolutivamente, lo que demuestra la aparición temprana y conservación de estas moléculas en el reino animal.
- 3.- Esta molécula, cuya estructura predicha es helicoidal, de carácter anfipático, tiene actividad en sistemas modelo de membranas a concentraciones similares a las que se presenta la actividad antibiótica, con lo que se comprueba la ausencia de receptor en el proceso de interacción con su blanco.
- 4.- La elevada hidrofobicidad de la Hadrurina hace que además de poder permeabilizar membranas de carácter ácido pueda penetrar también sistemas de carácter zwitteriónico incluso con mayor eficacia que la ejercida contra las primeras.
- 5.- Debido a sus características antimicrobianas y hemolíticas, este péptido podría servir como elemento de ataque y defensa de este artrópodo contra su presa y microorganismos invasores.

## PERSPECTIVAS

Sintetizar y probar las variantes del péptido propuestas con objeto de encontrar una más corta y/o con mayor actividad y/o sin efecto hemolítico.

Realizar una mayor cantidad de ensayos biológicos. Una posible aplicación terapéutica exige en primera instancia el contar con espectros de actividad que incluya al menos diez cepas de cada patógeno. Asimismo, se podrían buscar otros blancos eucariotes, como levadura, en donde ensayos preliminares indican actividad, protozoarios, y hongos filamentosos.

Determinar la estructura tridimensional del péptido en cuestión, la cual generará información útil para la síntesis de variantes.

Realizar otro tipo de ensayos con liposomas de composiciones más variadas, y dirigidos también al estudio de la unión y oligomerización del péptido.

antibacterianos (efecto electroforético), por lo que sería deseable realizar otro tipo de ensayos en ausencia de este potencial con objeto de verificar su influencia.

## CONCLUSIONES

- 1.- Demostramos la presencia, en el veneno de alacranes no retados de la especie *Hadrurus aztecus*, de un péptido, denominado Hadrurina, de 41 residuos de aminoácidos, con características antibacterianas y citotóxicas, diferente estructuralmente a cualquier péptido de alacrán reportado hasta la fecha.
- 2.- La Hadrurina muestra diversas similitudes secuenciales con péptidos antimicrobianos de organismos muy distantes evolutivamente, lo que demuestra la aparición temprana y conservación de estas moléculas en el reino animal.
- 3.- Esta molécula, cuya estructura predicha es helicoidal, de carácter anfipático, tiene actividad en sistemas modelo de membranas a concentraciones similares a las que se presenta la actividad antibiótica, con lo que se comprueba la ausencia de receptor en el proceso de interacción con su blanco.
- 4.- La elevada hidrofobicidad de la Hadrurina hace que además de poder permeabilizar membranas de carácter ácido pueda penetrar también sistemas de carácter zwitteriónico incluso con mayor eficacia que la ejercida contra las primeras.
- 5.- Debido a sus características antimicrobianas y hemolíticas, este péptido podría servir como elemento de ataque y defensa de este artrópodo contra su presa y microorganismos invasores.

## PERSPECTIVAS

Sintetizar y probar las variantes del péptido propuestas con objeto de encontrar una más corta y/o con mayor actividad y/o sin efecto hemolítico.

Realizar una mayor cantidad de ensayos biológicos. Una posible aplicación terapéutica exige en primera instancia el contar con espectros de actividad que incluya al menos diez cepas de cada patógeno. Asimismo, se podrían buscar otros blancos eucariotes, como levadura, en donde ensayos preliminares indican actividad, protozoarios, y hongos filamentosos.

Determinar la estructura tridimensional del péptido en cuestión, la cual generará información útil para la síntesis de variantes.

Realizar otro tipo de ensayos con liposomas de composiciones más variadas, y dirigidos también al estudio de la unión y oligomerización del péptido.

## BIBLIOGRAFIA.

- Agawa, Y., Lee, S., Ono, S., Aoyagi, H., Ohno, M., Taniguchi, T., Anzai, K. & Kirino, Y. (1991). Interaction with phospholipid bilayers, ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipathic alpha-helical model peptides of various chain lengths. *J Biol Chem*, **266**: 20218-20222.
- Agerberth, B., Lee, J. Y., Bergman, T., Carlquist, M., Boman, H. G., Mutt, V. & Jornvall, H. (1991). Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur J Biochem*, **202**: 849-854.
- Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jornvall, H., Mutt, V., Olsson, B., Wigzell, H. & et. a. l. (1995). NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *Embo J*, **14**: 1615-1625.
- Andreu, D., Merrifield, R. B., Steiner, H. & Boman, H. G. (1985). N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. *Biochemistry*, **24**: 1683-1688.
- Argiolas, A. & Pisano, J. J. (1984). Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*. *J Biol Chem*, **259**: 10106-10111.
- Aumelas, A., Mangoni, M., Roumestand, C., Chiche, L., Despaux, E., Grassy, G., Calas, B. & Chavanieu, A. (1996). Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur. J. Biochem. Eur J Biochem*, **237**: 575-583.
- Barra, D. & Simmaco, M. (1995). Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends Biotechnol*, **13**: 205-209.
- Barra, D., Simmaco, M. & Boman, H. G. (1998). Gene-encoded peptide antibiotics and innate immunity. Do 'animalcules' have defence budgets? *Febs Lett*, **430**: 130-134.
- Bechinger, B., Zasloff, M. & Opella, S. J. (1993). Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci*, **2**: 2077-2084.
- Bechinger, B. (1997). Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J Membr Biol*, **156**: 197-211.
- Bechinger, B., Zasloff, M. & Opella, S. J. (1998). Structure and dynamics of the antibiotic peptide PGLa in membranes by solution and solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys J*, **74**: 981-987.
- Berneche, S., Nina, M. & Roux, B. (1998). Molecular dynamics simulation of melittin in a dimyristoylphosphatidylcholine bilayer membrane. *Biophys J*, **75**: 1603-1618.
- Bessalle, R., Kapitkovsky, A., Gorea, A., Shalit, I. & Fridkin, M. (1990). All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. *FEBS Lett*, **274**: 151-155.
- Bevins, C. L. & Zasloff, M. (1990). Peptides from frog skin. *Annu Rev Biochem*, **59**: 395-414.
- Bloch, C. J., Patel, S. U., Baud, F., Zvelebil, M. J., Carr, M. D., Sadler, P. J. & Thornton, J. M. (1998). 1H NMR structure of an antifungal gamma-thionin protein Slalpha1: similarity to scorpion toxins. *Proteins*, **32**: 334-349.
- Blondelle, S. E. & Houghten, R. A. (1991). Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogues of melittin. *Biochemistry*, **30**: 4671-4678.
- Blondelle, S. E. & Houghten, R. A. (1992). Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochemistry*, **31**: 12688-12694.
- Boman, H. G., Wade, D., Boman, I. A., Wahlin, B. & Merrifield, R. B. (1989). Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *Febs Lett*, **259**: 103-106.

- Boman, H. G., Faye, I., Gudmundsson, G. H., Lee, J. Y. & Lidholm, D. A. (1991). Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur J Biochem*, **201**: 23-31.
- Boman, H. G., Agerberth, B. & Boman, A. (1993). Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun*, **61**: 2978-2984.
- Boman, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*, **13**: 61-92.
- Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Menez, A. & Toma, F. (1991). Refined structure of charybdoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science*, **254**: 1521-1523.
- Braun, A., Hoffmann, J. A. & Meister, M. (1998). Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 14337-14342.
- Brey, P. T., Lee, W. J., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., Francois, M. & Ashida, M. (1993). Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 6275-6279.
- Broekaert, W. F., Marien, W., Terras, F. R., De, B. M., Proost, P., Van, D. J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J. & et. al. (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, **31**: 4308-4314.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P. & Osborn, R. W. (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol*, **108**: 1353-1358.
- Bruix, M., Jimenez, M. A., Santoro, J., Gonzalez, C., Colilla, F. J., Mendez, E. & Rico, M. (1993). Solution structure of gamma I-H and gamma I-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry*, **32**: 715-724.
- Bulet, P., Cociancich, S., Reuland, M., Sauber, F., Bischoff, R., Hegy, G., Van, D. A., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (1992). A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata). *Eur J Biochem*, **209**: 977-984.
- Bulet, P., Dimarcq, J. L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van, D. A. & Hoffmann, J. A. (1993). A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem*, **268**: 14893-14897.
- Caldwell, J. E., Abildgaard, F., Dzakula, Z., Ming, D., Hellekant, G. & Markley, J. L. (1998). Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein. *Nat Struct Biol*, **5**: 427-431.
- Cammue, B. P., De, B. M., Terras, F. R., Proost, P., Van, D. J., Rees, S. B., Vanderleyden, J. & Broekaert, W. F. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J Biol Chem*, **267**: 2228-2233.
- Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L. D. & Maelicke, A. (1982). Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature*, **296**: 90-91.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *Embo J*, **8**: 2387-2391.
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Van, D. J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F. & Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur J Biochem*, **187**: 381-386.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F. & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J Biol Chem*, **268**: 7044-7054.

- Casteels, P. & Tempst, P. (1994). Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochem Biophys Res Commun*,**199**: 339-345.
- Catterall, W. A. (1979). Neurotoxins as allosteric modifiers of voltage-sensitive sodium channels. *Adv Cytopharmacol*,**3**: 305-316.
- Chan, Y. R. & Gallo, R. L. (1998). PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas). *J Biol Chem*,**273**: 28978-28985.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J. A. & Bulet, P. (1996). Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J Biol Chem*,**271**: 21808-21813.
- Charpentier, S., Amiche, M., Mester, J., Vouille, V., Le, C. J., Nicolas, P. & Delfour, A. (1998). Structure, synthesis, and molecular cloning of dermaseptins B, a family of skin peptide antibiotics. *J Biol Chem*,**273**: 14690-14697.
- Chen, H. C., Brown, J. H., Morell, J. L. & Huang, C. M. (1988). Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. *FEBS Lett*,**236**: 462-466.
- Chertov, O., Michiel, D. F., Xu, L., Wang, J. M., Tani, K., Murphy, W. J., Longo, D. L., Taub, D. D. & Oppenheim, J. J. (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37 azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*,**271**: 2935-2940.
- Cho, J. H., Park, C. B., Yoon, Y. G. & Kim, S. C. (1998). Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochim Biophys Acta*,**1408**: 67-76.
- Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R. B. & Mauzerall, D. (1988). Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*,**85**: 5072-5076.
- Clark, D. P., Durell, S., Maloy, W. L. & Zasloff, M. (1994). Ranalexin, a novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J Biol Chem*,**269**: 10849-10855.
- Cociancich, S., Goyffon, M., Bontems, F., Bulet, P., Bouet, F., Menez, A. & Hoffmann, J. (1993). Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem Biophys Res Commun*,**194**: 17-22.
- Cociancich S., B., P., hetru, C, Hoffmann, J.A. (1994). The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitology Today*,**10**: 132-139.
- Cole, A. M., Weis, P. & Diamond, G. (1997). Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem*,**272**: 12008-12013.
- Cornet, B., Bonmatin, J. M., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Ptak, M. & Vovelle, F. (1995). Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure*,**3**: 435-448.
- Correa, M. M., Sampaio, S. V., Lopes, R. A., Mancuso, L. C., Cunha, O. A., Franco, J. J. & Giglio, J. R. (1997). Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon*,**35**: 1053-1067.
- Cruciani, R. A., Barker, J. L., Zasloff, M., Chen, H. C. & Colamonici, O. (1991). Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*,**88**: 3792-3796.
- Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O. & Bienert, M. (1996). Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and

- hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry*, **35**: 12612-12622.
- De, S. G., Goderis, I. J., Thevissen, K., Raemaekers, R., Fant, F., Borremans, F., Acland, D. P., Osborn, R. W., Patel, S. & Broekaert, W. F. (1997). Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. *J Biol Chem*, **272**: 1171-1179.
- De la Vega, R. (1999). Aislamiento y caracterización de péptidos antimicrobianos presentes en la hemolinfa del alacrán *Centruroides limpidus limpidus* KARSCH. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.*
- DeBin, J. A., Maggio, J. E. & Strichartz, G. R. (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol*, **264**: C361-C369.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van, D. A., Rodriguez, J. & Bachere, E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem*, **272**: 28398-28406.
- Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W. L. & Bevins, C. L. (1991). Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**: 3952-3956.
- Diamond, G., Russell, J. P. & Bevins, C. L. (1996). Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 5156-5160.
- Dimarcq, J. L., Keppi, E., Dunbar, B., Lambert, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Rankine, S. M., Fothergill, J. E. & Hoffmann, J. A. (1988). Insect immunity. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, diptericin A. *Eur J Biochem*, **171**: 17-22.
- Dimopoulos, G., Richman, A., Muller, H. M. & Kafatos, F. C. (1997). Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 11508-11513.
- Dimopoulos, G., Seeley, D., Wolf, A. & Kafatos, F. C. (1998). Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *Embo J*, **17**: 6115-6123.
- DiRienzo, J. M., Nakamura, K. & Inouye, M. (1978). The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. *Annu Rev Biochem*, **47**: 481-532.
- Duvick, J. P., Rood, T., Rao, A. G. & Marshak, D. R. (1992). Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J Biol Chem*, **267**: 18814-18820.
- Ehret, S. L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbaum, P., Hoffmann, J. A., van, D. A. & Bulet, P. (1996). Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J Biol Chem*, **271**: 29537-29544.
- Fahmer, R. L., Dieckmann, T., Harwig, S. S., Lehrer, R. I., Eisenberg, D. & Feigon, J. (1996). Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem Biol*, **3**: 543-550.
- Falla, T. J., Karunaratne, D. N. & Hancock, R. (1996). Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J Biol Chem*, **271**: 19298-19303.
- Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W. & Borremans, F. (1998). Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein 1 by <sup>1</sup>H NMR. *J Mol Biol*, **279**: 257-270.
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Chernysh, S., Briand, J. P., Roussel, J. P., Letellier, L., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (1996). Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 1221-1225.

- Fennell, J. F., Shipman, W. H. & Cole, L. J. (1968). Antibacterial action of melittin, a polypeptide from bee venom. *Proc Soc Exp Biol Med*, **127**: 707-710.
- Ferrandon, D., Jung, A. C., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler, J. S., Michaut, L., Reichhart, J. & Hoffmann, J. A. (1998). A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *Embo J*, **17**: 1217-1227.
- Fink, J., Merrifield, R. B., Boman, A. & Boman, H. G. (1989). The chemical synthesis of cecropin D and an analog with enhanced antibacterial activity. *J Biol Chem*, **264**: 6260-6267.
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle, B. M., Liden, S., Wigzell, H. & Gudmundsson, G. H. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem*, **272**: 15258-15263.
- Fujii, G., Selsted, M. E. & Eisenberg, D. (1993). Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci*, **2**: 1301-1312.
- Fujimoto, Y. & Kaku, T. (1982). Isolation and some properties of the hemolysins from the crude venom extract of scorpion telson, *Heterometrus gravimanus*. *J Pharmacobiodyn*, **5**: 63-72.
- Gabay, J. E. (1994). Ubiquitous natural antibiotics. *Science*, **264**: 373-374.
- Gallo, R. L., Ono, M., Povsic, T., Page, C., Eriksson, E., Klagsbrun, M. & Bernfield, M. (1994). Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 11035-11039.
- Ganz, T. & Lehrer, R. I. (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol*, **10**: 41-44.
- Gazit, E., Lee, W. J., Brey, P. T. & Shai, Y. (1994). Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry*, **33**: 10681-10692.
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H. G. & Shai, Y. (1995). Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **34**: 11479-11488.
- Gazit, E., Miller, I. R., Biggin, P. C., Sansom, M. S. & Shai, Y. (1996). Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J Mol Biol*, **258**: 860-870.
- Geourjon, C. & Deleage, G. (1994). SOPMA : Significant improvement in protein secondary structure prediction by prediction from alignments and joint prediction. *CABIOS*, **11**: 681-684.
- Geourjon, C. & Deleage, G. (1994). SOPM : a self optimised prediction method for protein secondary structure prediction. *Prot Eng*, **7**: 157-164.
- Ghosh, J. K., Shaol, D., Guillaud, P., Ciceron, L., Mazier, D., Kustanovich, I., Shai, Y. & Mor, A. (1997). Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. *J Biol Chem*, **272**: 31609-31616.
- Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M. & Wilson, J. M. (1997). Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, **88**: 553-560.
- Gomes, A. V., de W. A., Berden, J. A. & Westerhoff, H. V. (1993). Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes. *Biochemistry*, **32**: 5365-5372.
- Groisman, E. A., Chiao, E., Lipps, C. J. & Heffron, F. (1989). *Salmonella typhimurium* phoP virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 7077-7081.
- Groisman, E. A., Parra, L. C., Salcedo, M., Lipps, C. J. & Heffron, F. (1992). Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 11939-11943.

- Guo, L., Lim, K. B., Poduje, C. M., Daniel, M., Gunn, J. S., Hackett, M. & Miller, S. I. (1998). Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*,**95**: 189-198.
- Hancock, R. E. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet*,**349**: 418-422.
- Hancock, R. E. & Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol*,**16**: 82-88.
- Hanzawa, H., Shimada, I., Kuzuhara, T., Komano, H., Kohda, D., Inagaki, F., Natori, S. & Arata, Y. (1990). <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance study of the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin. *FEBS Lett*,**269**: 413-420.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature*,**387**: 861.
- Harwig, S. S., Swiderek, K. M., Kokryakov, V. N., Tan, L., Lee, T. D., Panyutich, E. A., Aleshina, G. M., Shamova, O. V. & Lehrer, R. I. (1994). Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes. *FEBS Lett*,**342**: 281-285.
- Harwig, S. S., Waring, A., Yang, H. J., Cho, Y., Tan, L. & Lehrer, R. I. (1996). Intramolecular disulfide bonds enhance the antimicrobial and lytic activities of protegrins at physiological sodium chloride concentrations. *Eur J Biochem*,**240**: 352-357.
- Heller, W. T., Waring, A. J., Lehrer, R. I. & Huang, H. W. (1998). Multiple states of beta-sheet peptide protegrin in lipid bilayers. *Biochemistry*,**37**: 17331-17338.
- Hill, C. P., Yee, J., Selsted, M. E. & Eisenberg, D. (1991). Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*,**251**: 1481-1485.
- Hoffmann, J. A. & Hetru, C. (1992). Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol Today*,**13**: 411-415.
- Hoffmann, J. A., Reichhart, J. M. & Hetru, C. (1996). Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol*,**8**: 8-13.
- Holak, T. A., Engstrom, A., Kraulis, P. J., Lindeberg, G., Bennich, H., Jones, T. A., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1988). The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*,**27**: 7620-7629.
- Hristova, K., Selsted, M. E. & White, S. H. (1996). Interactions of monomeric rabbit neutrophil defensins with bilayers: comparison with dimeric human defensin HNP-2. *Biochemistry*,**35**: 11888-11894.
- Hristova, K., Selsted, M. E. & White, S. H. (1997). Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins. *J Biol Chem*,**272**: 24224-24233.
- Hubert, F., Noel, T. & Roch, P. (1996). A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels. *Eur J Biochem*,**240**: 302-306.
- Iijima, R., Kurata, S. & Natori, S. (1993). Purification, characterization, and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *J Biol Chem*,**268**: 12055-12061.
- Jo, E., Blazyk, J. & Boggs, J. M. (1998). Insertion of magainin into the lipid bilayer detected using lipid photolabels. *Biochemistry*,**37**: 13791-13799.
- Jones, D. E. & Bevins, C. L. (1992). Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem*,**267**: 23216-23225.
- Kagan, B. L., Selsted, M. E., Ganz, T. & Lehrer, R. I. (1990). Antimicrobial defensin peptides form

voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 210-214.

Kawano, K., Yoneya, T., Miyata, T., Yoshikawa, K., Tokunaga, F., Terada, Y. & Iwanaga, S. (1990). Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). NMR determination of the beta-sheet structure. *J Biol Chem*, **265**: 15365-15367.

Kiyota, T., Lee, S. & Sugihara, G. (1996). Design and synthesis of amphiphilic alpha-helical model peptides with systematically varied hydrophobic-hydrophilic balance and their interaction with lipid- and bio-membranes. *Biochemistry*, **35**: 13196-13204.

Kokryakov, V. N., Harwig, S. S., Panyutich, E. A., Shevchenko, A. A., Aleshina, G. M., Shamova, O. V., Korneva, H. A. & Lehrer, R. I. (1993). Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett*, **327**: 231-236.

Krishnakumari, V. & Nagaraj, R. (1997). Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. *J Pept Res*, **50**: 88-93.

Kwon, M. Y., Hong, S. Y. & Lee, K. H. (1998). Structure-activity analysis of brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. *Biochim Biophys Acta*, **1387**: 239-248.

Landon, C., Sodano, P., Hetru, C., Hoffmann, J. & Ptak, M. (1997). Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Sci*, **6**: 1878-1884.

Lawyer, C., Pai, S., Watabe, M., Borgia, P., Mashimo, T., Eagleton, L. & Watabe, K. (1996). Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. *FEBS Lett*, **390**: 95-98.

Lazarovici, P., Primor, N. & Loew, L. M. (1986). Purification and pore-forming activity of two hydrophobic polypeptides from the secretion of the Red Sea Moses sole (*Pardachirus marmoratus*). *J Biol Chem*, **261**: 16704-16713.

Lee, J. Y., Boman, A., Sun, C. X., Andersson, M., Jornvall, H., Mutt, V. & Boman, H. G. (1989). Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 9159-9162.

Lee, I. H., Cho, Y. & Lehrer, R. I. (1997a). Styelins, broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **118**: 515-521.

Lee, I. H., Zhao, C., Cho, Y., Harwig, S. S., Cooper, E. L. & Lehrer, R. I. (1997b). Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Lett*, **400**: 158-162.

Lehane, M. J., Wu, D. & Lehane, S. M. (1997). Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 11502-11507.

Lehrer, R. I. & Ganz, T. (1990). Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood*, **76**: 2169-2181.

Leippe, M. (1995). Ancient weapons: NK-lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell*, **83**: 17-18.

Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1995). Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *Embo J*, **14**: 536-545.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll* cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **86**: 973-983.

Lemaitre, B., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of

- antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 14614-14619.
- Levashina, E. A., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J. M., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (1995). Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur J Biochem*, **233**: 694-700.
- Levashina, E. A., Ohresser, S., Lemaitre, B. & Imler, J. L. (1998). Two distinct pathways can control expression of the gene encoding the *Drosophila* antimicrobial peptide metchnikowin. *J Mol Biol*, **278**: 515-527.
- Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J. M. & Otting, G. (1997). Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat Struct Biol*, **4**: 793-795.
- Liu, L., Zhao, C., Heng, H. H. & Ganz, T. (1997). The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics*, **43**: 316-320.
- Loew, L. M., Rosenberg, I., Bridge, M. & Gitler, C. (1983). Diffusion potential cascade. Convenient detection of transferable membrane pores. *Biochemistry*, **22**: 837-844.
- Lohner, K., Latal, A., Lehrer, R. I. & Ganz, T. (1997). Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry*, **36**: 1525-1531.
- Ludtke, S., He, K. & Huang, H. (1995). Membrane thinning caused by magainin 2. *Biochemistry*, **34**: 16764-16769.
- Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L. & Huang, H. W. (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, **35**: 13723-13728.
- Mackintosh, J. A., Veal, D. A., Beattie, A. J. & Gooley, A. A. (1998). Isolation from an ant *Myrmecia gulosa* of two inducible O-glycosylated proline-rich antibacterial peptides. *J Biol Chem*, **273**: 6139-6143.
- Maloy, W. L. & Kari, U. P. (1995). Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, **37**: 105-122.
- Mangoni, M. E., Aumelas, A., Charnet, P., Rounestand, C., Chiche, L., Despaux, E., Grassy, G., Calas, B. & Chavanieu, A. (1996). Change in membrane permeability induced by protegrin 1: implication of disulphide bridges for pore formation. *FEBS Lett*, **383**: 93-98.
- Marion, D., Zasloff, M. & Bax, A. (1988). A two-dimensional NMR study of the antimicrobial peptide magainin 2. *FEBS Lett*, **227**: 21-26.
- Matsuyama, K. & Natori, S. (1988). Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *J Biol Chem*, **263**: 17112-17116.
- Matsuzaki, K., Harada, M., Funakoshi, S., Fujii, N. & Miyajima, K. (1991a). Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, **1063**: 162-170.
- Matsuzaki, K., Fukui, M., Fujii, N. & Miyajima, K. (1991b). Interactions of an antimicrobial peptide, tachyplesin I, with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1070**: 259-264.
- Matsuzaki, K., Nakayama, M., Fukui, M., Otaka, A., Funakoshi, S., Fujii, N., Bessho, K. & Miyajima, K. (1993). Role of disulfide linkages in tachyplesin-lipid interactions. *Biochemistry*, **32**: 11704-11710.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Tokuda, H., Funakoshi, S., Fujii, N. & Miyajima, K. (1994). Orientational and aggregational states of magainin 2 in phospholipid bilayers. *Biochemistry*, **33**: 3342-3349.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fujii, N. & Miyajima, K. (1995a). Molecular basis for membrane selectivity of

- an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*,**34**: 3423-3429.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N. & Miyajima, K. (1995b). Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry*,**34**: 6521-6526.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N. & Miyajima, K. (1996). An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*,**35**: 11361-11368.
- Matsuzaki, K., Nakamura, A., Murase, O., Sugishita, K., Fujii, N. & Miyajima, K. (1997a). Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge. *Biochemistry*,**36**: 2104-2111.
- Matsuzaki, K., Yoneyama, S., Fujii, N., Miyajima, K., Yamada, K., Kirino, Y. & Anzai, K. (1997b). Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide, tachyplesin I, and its linear analog. *Biochemistry*,**36**: 9799-9806.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Harada, M., Fujii, N. & Miyajima, K. (1997c). Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*,**1327**: 119-130.
- Matsuzaki, K. (1998). Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta*,**1376**: 391-400.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K. i., Ishibe, N., Ueha, M., Nakata, S., Miyajima, K. & Epanand, R. M. (1998). Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry*,**37**: 11856-11863.
- Mignogna, G., Simmaco, M., Kreil, G. & Barra, D. (1993). Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *Embo J*,**12**: 4829-4832.
- Moore, K. S., Bevins, C. L., Brousseau, M. M., Tomassini, N., Turner, K., Eck, H. & Zasloff, M. (1991). Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis*. *J Biol Chem*,**266**: 19851-19857.
- Mor, A., Nguyen, V. H., Delfour, A., Migliore, S. D. & Nicolas, P. (1991). Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry*,**30**: 8824-8830.
- Mor, A., Aniche, M. & Nicolas, P. (1994a). Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. *Biochemistry*,**33**: 6642-6650.
- Mor, A. & Nicolas, P. (1994b). Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *Eur J Biochem*,**219**: 145-154.
- Mor, A. & Nicolas, P. (1994c). The NH<sub>2</sub>-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *J Biol Chem*,**269**: 1934-1939.
- Mor, A., Hani, K. & Nicolas, P. (1994d). The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *J Biol Chem*,**269**: 31635-31641.
- Morikawa, N., Hagiwara, K. & Nakajima, T. (1992). Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipedata*. *Biochem Biophys Res Commun*,**189**: 184-190.
- Nakajima, Y., Qu, X. M. & Natori, S. (1987). Interaction between liposomes and sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J Biol Chem*,**262**: 1665-1669.
- Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T. & Shimonishi, Y. (1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J Biol Chem*,**263**: 16709-16713.
- Nicolas, P. & Mor, A. (1995). Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol*,**49**: 277-304.

- Okada, M. & Natori, S. (1985). Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *J Biol Chem*, **260**: 7174-7177.
- Oren, Z. & Shai, Y. (1996). A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *Eur J Biochem*, **237**: 303-310.
- Osborn, R. W., De, S. G., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van, L. F., Attenborough, S., Rees, S. B. & Broekaert, W. F. (1995). Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett*, **368**: 257-262.
- Pardi, A., Zhang, X. L., Selsted, M. E., Skalicky, J. J. & Yip, P. F. (1992). NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 2. Three-dimensional structures of rabbit NP-2 and human HNP-1. *Biochemistry*, **31**: 11357-11364.
- Park, N. G., Lee, S., Oishi, O., Aoyagi, H., Iwanaga, S., Yamashita, S. & Ohno, M. (1992). Conformation of tachyplesin I from *Tachyplesus tridentatus* when interacting with lipid matrices. *Biochemistry*, **31**: 12241-12247.
- Park, C. S. & Miller, C. (1992). Interaction of charybdotoxin with permeant ions inside the pore of a K<sup>+</sup>-channel. *Neuron*, **9**: 307-313.
- Park, J. M., Jung, J. E. & Lee, B. J. (1994). Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog: *Rana rugosa*. *Biochem Biophys Res Commun*, **205**: 948-954.
- Park, J. M., Jung, J. E. & Lee, B. J. (1995). Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog. *Rana rugosa*. *Biochem Biophys Res Commun*, **209**: 775.
- Park, C. B., Lee, J. H., Park, I. Y., Kim, M. S. & Kim, S. C. (1997). A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS Lett*, **411**: 173-178.
- Parra, L. C., Lin, R., Aspedon, A. & Groisman, E. A. (1994). A Salmonella protein that is required for resistance to antimicrobial peptides and transport of potassium. *embo J*, **13**: 3964-3972.
- Patel, S. U., Osborn, R., Rees, S. & Thornton, J. M. (1998). Structural studies of Impatiens balsamina antimicrobial protein (Ib-AMP1). *Biochemistry*, **37**: 983-990.
- Perez, P. E., Houghten, R. A. & Blondelle, S. E. (1995). The role of amphipathicity in the folding, self-association and biological activity of multiple subunit small proteins. *J Biol Chem*, **270**: 1048-1056.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, **31**: 12416-12423.
- Regnier, F. E. (1987). The role of protein structure in chromatographic behavior. *Science*, **238**: 319-323.
- Richman, A. M., Dimopoulos, G., Seeley, D. & Kafatos, F. C. (1997). Plasmodium activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Embo J*, **16**: 6114-6119.
- Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M. & Gennaro, R. (1988). Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem*, **263**: 9573-9575.
- Rosin, R. (1969). Note on the alpha-hemolytic effect of the venom of the scorpion *Nebo hierichonticus*. *Toxicon*, **6**: 225-226.
- Rost, B. & Sander, C. (1993). Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**: 7558-7562.
- Rost, B. & Sander, C. (1993). Prediction of protein structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol*, **232**: 584-599.

- Rost, B., Sander, C. & Schneider, R. (1994). PHD - an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *CABIOS*,**10**: 53-60.
- Saberwal, G. & Nagaraj, R. (1994). Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. *Biochim Biophys Acta*,**1197**: 109-131.
- Saito, T., Kawabata, S., Shigenaga, T., Takayenoki, Y., Cho, J., Nakajima, H., Hirata, M. & Iwanaga, S. (1995). A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity. *J Biochem (Tokyo)*,**117**: 1131-1137.
- Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D. A., Engstrom, A. & Hultmark, D. (1991). The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *Embo J*,**10**: 163-169.
- Schnapp, D., Kemp, G. D. & Smith, V. J. (1996). Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem*,**240**: 532-539.
- Schonwetter, B. S., Stolzenberg, E. D. & Zasloff, M. A. (1995). Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science*,**267**: 1645-1648.
- Schwartz, T. W., Hansen, H. F., Gether, U. & Aakerlund, L. (1987). Processing or inactivation of antimicrobial peptides. *Nature*,**329**: 494.
- Segrest, J. P., De, L. H., Dohlman, J. G., Brouillette, C. G. & Anantharamaiah, G. M. (1990). Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins*,**8**: 103-117.
- Selsted, M. E., Brown, D. M., DeLange, R. J., Harwig, S. S. & Lehrer, R. I. (1985). Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *J Biol Chem*,**260**: 4579-4584.
- Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y. Q., Smith, W. & Cullor, J. S. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem*,**267**: 4292-4295.
- Selsted, M. E., Tang, Y. Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W., Henschen, A. H. & Cullor, J. S. (1993). Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta- defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem*,**268**: 6641-6648.
- Selsted, M. E., Tang, Y. Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W., Henschen, A. H. & Cullor, J. S. (1996). Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta- defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem*,**271**: 16430.
- Shafer, W. M., Qu, X., Waring, A. J. & Lehrer, R. I. (1998). Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/modulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci U S A*,**95**: 1829-1833.
- Silvestro, L., Gupta, K., Weiser, J. N. & Axelsen, P. H. (1997). The concentration-dependent membrane activity of cecropin A. *Biochemistry*,**36**: 11452-11460.
- Simmaco, M., De, B. D., Severini, C., Aita, M., Erspamer, G. F., Barra, D. & Bossa, F. (1990). Purification and characterization of bioactive peptides from skin extracts of *Rana esculenta*. *Biochim Biophys Acta*,**1033**: 318-323.
- Simmaco, M., Barra, D., Chiarini, F., Noviello, L., Melchiorri, P., Kreil, G. & Richter, K. (1991). A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata*. *Eur J Biochem*,**199**: 217-222.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. & Bossa, F. (1993). Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. *FEBS Lett*,**324**: 159-161.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. & Bossa, F. (1994). Antimicrobial peptides from skin secretions of

- Rana esculenta. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *J Biol Chem*, **269**: 11956-11961.
- Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R., Mangoni, M. L. & Barra, D. (1996). Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur J Biochem*, **242**: 788-792.
- Simmaco, M., Boman, A., Mangoni, M. L., Mignogna, G., Miele, R., Barra, D. & Boman, H. G. (1997). Effect of glucocorticoids on the synthesis of antimicrobial peptides in amphibian skin. *FEBS Lett*, **416**: 273-275.
- Sims, P. J., Waggoner, A. S., Wang, C. H. & Hoffman, J. F. (1974). Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*, **13**: 3315-3330.
- Sipos, D., Andersson, M. & Ehrenberg, A. (1992). The structure of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 in solution, determined by proton-NMR. *Eur J Biochem*, **209**: 163-169.
- Skerlavaj, B., Gennaro, R., Bagella, L., Merluzzi, L., Risso, A. & Zanetti, M. (1996). Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. *J Biol Chem*, **271**: 28375-28381.
- Solovyev, V. & Salamov, A. (1991). Method of calculation of discrete secondary structures in globular proteins. *Molek Biol (Russia)*, **25**: 810-824.
- Solovyev, V. & Salamov, A. (1994). Predicting  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -strand segments of globular proteins. *CABIOS*, **10**: 661-669.
- Steinborner, S. T., Waugh, R. J., Bowie, J. H., Wallace, J. C., Tyler, M. J. & Ramsay, S. L. (1997). New caerin antibacterial peptides from the skin glands of the Australian tree frog *Litoria xanthomera*. *J Pept Sci*, **3**: 181-185.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H. & Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, **292**: 246-248.
- Stolzenberg, E. D., Anderson, G. M., Ackermann, M. R., Whitlock, R. H. & Zasloff, M. (1997). Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 8686-8690.
- Subbalakshmi, C., Krishnakumari, V., Nagaraj, R. & Sitaram, N. (1996). Requirements for antibacterial and hemolytic activities in the bovine neutrophil derived 13-residue peptide indolicidin. *FEBS Lett*, **395**: 48-52.
- Suzuki, S., Ohe, Y., Okubo, T., Kakegawa, T. & Tatemoto, K. (1995). Isolation and characterization of novel antimicrobial peptides, rugosins A, B and C, from the skin of the frog, *Rana rugosa*. *Biochem Biophys Res Commun*, **212**: 249-254.
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., Ray, J. A., Rees, S. B. & Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J Biol Chem*, **272**: 24480-24487.
- Teeter, M. M., Ma, X. Q., Rao, U. & Whitlow, M. (1990). Crystal structure of a protein-toxin  $\alpha$ 1-purothionin at 2.5 Å and a comparison with predicted models. *Proteins*, **8**: 118-132.
- Terwilliger, T. C. & Eisenberg, D. (1982). The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement. *J Biol Chem*, **257**: 6010-6015.
- Thennarasu, S. & Nagaraj, R. (1995). Design of 16-residue peptides possessing antimicrobial and hemolytic activities or only antimicrobial activity from an inactive peptide. *Int J Pept Protein Res*, **46**: 480-486.
- Thevissen, K., Ghazi, A., De, S. G., Brownlee, C., Osborn, R. W. & Broekaert, W. F. (1996). Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J Biol Chem*, **271**: 15018-15025.

- Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P. & Broekaert, W. F. (1997). Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *J Biol Chem*, **272**: 32176-32181.
- Torres-Larios, A., Olamendi-Portugal, T., Gómez-Lagunas, F. & Possani, L. D. (1997). Isolation and characterization of a novel K-channel blocking toxin from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *12th World Congress on animal, plant and microbial toxins*, Cuernavaca, Morelos, México.
- Tossi, A., Tarantino, C. & Romeo, D. (1997). Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *Eur J Biochem*, **250**: 549-558.
- Valdivia, H. H., Kirby, M. S., Lederer, W. J. & Coronado, R. (1992). Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)- release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 12185-12189.
- Venkaiah, B., Parthasarathy, P. R. & Krishnaswamy, S. (1983). Haemolytic effect of the scorpion *Heterometrus fulvipes* venom. *Biochem Int*, **7**: 241-245.
- Vignal, E., Chavanieu, A., Roch, P., Chiche, L., Grassy, G., Calas, B. & Aumelas, A. (1998). Solution structure of the antimicrobial peptide ranalexin and a study of its interaction with perdeuterated dodecylphosphocholine micelles. *Eur J Biochem*, **253**: 221-228.
- Vouille, V., Amiche, M. & Nicolas, P. (1997). Structure of genes for dermaseptins B, antimicrobial peptides from frog skin. Exon 1-encoded prepropeptide is conserved in genes for peptides of highly different structures and activities. *FEBS Lett*, **414**: 27-32.
- Wade, D., Boman, A., Wahlin, B., Drain, C. M., Andreu, D., Boman, H. G. & Merrifield, R. B. (1990). All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 4761-4765.
- Wenk, M. R. & Seelig, J. (1998). Magainin 2 amide interaction with lipid membranes: calorimetric detection of peptide binding and pore formation. *Biochemistry*, **37**: 3909-3916.
- Westerhoff, H. V., Zasloff, M., Rosner, J. L., Hendler, R. W., De, W. A., Vaz, G. A., Jongma, P. M., Riethorst, A. & Juretic, D. (1995). Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. *Eur J Biochem*, **228**: 257-264.
- White, S. H., Wimley, W. C. & Selsted, M. E. (1995). Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol*, **5**: 521-527.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Epand, R. M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L. & Bienert, M. (1997). Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry*, **36**: 12869-12880.
- Williams, R. W., Starman, R., Taylor, K. M., Gable, K., Beeler, T., Zasloff, M. & Covell, D. (1990). Raman spectroscopy of synthetic antimicrobial frog peptides magainin 2a and PGLa. *Biochemistry*, **29**: 4490-4496.
- Williams, M. J., Rodriguez, A., Kimbrell, D. A. & Eldon, E. D. (1997). The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *embo J*, **16**: 6120-6130.
- Wong, H., Bowie, J. H. & Carver, J. A. (1997). The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *Eur J Biochem*, **247**: 545-557.
- Wu, M. & Hancock, R. E. (1999). Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J Biol Chem*, **274**: 29-35.
- Yan, L. & Adams, M. E. (1998). Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J Biol Chem*, **273**: 2059-2066.

- Zagorski, M. G., Norman, D. G., Barrow, C. J., Iwashita, T., Tachibana, K. & Patel, D. J. (1991). Solution structure of pardaxin P-2. *Biochemistry*, **30**: 8009-8017.
- Zamudio, F. Z., Conde, R., Arévalo, C., Becerril, B., Martín, B. M., Valdivia, H. H. & Possani, L. D. (1997). The mechanisms of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J Biol Chem*, **272**: 11886-11894.
- Zanetti, M., Gennaro, R. & Romeo, D. (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett*, **374**: 1-5.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**: 5449-5453.
- Zasloff, M., Martin, B. & Chen, H. C. (1988). Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 910-913.
- Zhang, L., Falla, T., Wu, M., Fidai, S., Burian, J., Kay, W. & Hancock, R. E. (1998). Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem Biophys Res Commun*, **247**: 674-680.
- Zhao, C., Liaw, L., Lee, I. H. & Lehrer, R. I. (1997). cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela clava*. *FEBS Lett*, **412**: 144-148.
- Zimmermann, G. R., Legault, P., Selsted, M. E. & 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**: 13663-13671.

## APENDICE

En cada figura se incluye, en primer lugar, alguna(s) estructuras representativas de cada grupo de péptidos antimicrobianos. En la descripción se incluye entre paréntesis el código de la estructura asignado por el Protein Data Bank (PDB). El despliegue de ellas se realizó a través del programa INSIGHT II de Biosym Technologies.

Enseguida se enlistan las secuencias de péptidos prototipo de cada uno de los descritos en la introducción (en ese orden), incluyendo los péptidos homólogos, híbridos y hemolíticos dentro de su grupo correspondiente de acuerdo a sus características de estructura primaria. El modo de visualización se realizó con el programa de despliegamiento gráfico Seqlab del paquete GCG. En la nota de esta parte de la figura sólo se incluyen observaciones importantes.

### **Figura 1.** Péptidos alfa helicoidales.

- A. 1.- magainina (IMAG). 2.- melitina (IMLT)
- B. Las primeras seis secuencias comprenden isoformas de cecropinas de *Ceratitis capitata* (CEC1\_CERCA), *Drosophila melanogaster* (CECB\_DROME), *Antheraea pernyi* (CECD\_ANTPE) (que presenta el tripéptido AGP), *Manduca sexta* (CEC5\_MANSE), una styelina, y el homólogo aislado de puerco. Las últimas siete secuencias corresponden a los péptidos antimicrobianos y hemolíticos alfa helicoidales.

### **Figura 2.** Péptidos con un puente disulfuro.

- A. ranalexina (Aumelas, comunicación personal)
- B. Se incluye en primer lugar la secuencia de la batenecina, cuya estructura no corresponde como las demás (salvo la thanatina) a la de la ranalexina.

### **Figura 3.** Péptidos con dos puentes disulfuro.

- A. protegrina 1 (IPG1)
- B. A la estructura anterior no corresponden las secuencias de IbAMP1 ni de MBP1.

### **Figura 4.** Estructura y secuencia de la beta purotionina (1BHP).

### **Figura 5.** Estructura y secuencia de NK lisina (1NKL), y secuencia de amoebapore.

### **Figura 6.** Secuencia de los péptidos ricos en ciertos aminoácidos. Se incluye en este grupo a los híbridos penaedina y dipterocina (DIPA\_PROTE).

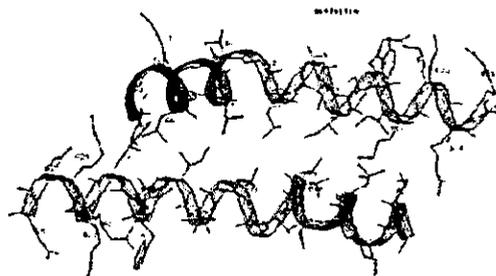
### **Figura 7.** Secuencia de los péptidos antimicrobianos encontrados en alacrán. Se enlistan la butinina, la androctonina, y las defensinas de *Androctonus* y *Leiurus*.

Fig. 1.

A.



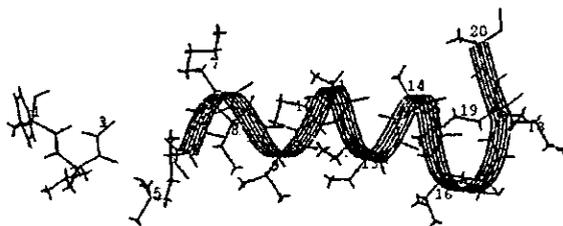
B.



CEC1_CERCA	W...LRKL KKTRV QHTRDATT...QTAVAQQAAYVAATAR #
CECB_DROME	W...LRKL KKTRT QHTRDAST...QVL IAGQAAYVAATAR #
CECD_ANPPE	W...LRKL KKTRV QHTRDAST...QVL IAGQAAYVAATAR #
CECS_MANSE	W...LRKL KKTRV QHTRDAST...QVL IAGQAAYVAATAR #
styelina_c	W...LRKL KKTRV QHTRDAST...QVL IAGQAAYVAATAR #
CEC1_puerco	SWL...SKTAKKLENSAKKRISE TATAIQ #
andropina	VI TDILDRV VAI HNAAQV T EAKPEERLIT #
magainina	T KELLISA KF KAVV ETMKS #
clavanina	AVIQPL KEIHHV EAVI T SAMP #
lycotoxina_1	...IMLIALKFL KEVAK LAKQOL SKL #
lycotoxina_2	KTKWFKTKSTAKETAK QEKKHL #
dermasep_3	ALWVMLK T KLA QAL AVKILV #
dermasep_b5	LVW NAIKEAKSA KVAL TAVNEM #
pleurocidina	W SIKKAAAV KIV KALTYL #
misgurina	RQRVLLSKT SKK AARRRRK #
BMAP_27	RI KRIKKI KKLTKK SPVPLL #
BMAP_28	LRSL RKILRWKKY PIVPTIRI #
LL_37	LL DIFRKSKEI KEI KRIVORIKDTIR #
bombinina	T ALSAK ALK LAK LKQIFAV #
bombinina_H3	IK PVL TV SAL LELKI #
melittina	T ALKVLAI LPILISWIKVARKQ #
pardaxina	ETALIKIISPLIKILLSAV SALSSS #
dermasep_4	ALWVMLK KVAK M VAVLV #
crabrolin	PVPLTKRIVIAL #
temporin	LEPLI KVES TL #

Fig. 2.

A.



B.

bactenecina	RLCRIVVIRVCR	
brevinina_1	ILPVLA IAAKVPALF	C. KTKKCR
ranalexina	FL LIKIVPAMI	C. AVTKKCR
gaegurina_5	FL ALFKVASKVLPVK	C. ATTKKCR
gaegurina_6	FLPLLA LAANLPITL	C. RTSYKCR
thanatina	SKRPVPTIY	C. RRRT KQRM
brevinina_2	LLDSLK FAATA K VLQSLSTAS	C. KLAKTC
gaegurina_2	IMSIVKDVAKAAKLAAR ALSTLS	C. KLAKTC
rugosina_A	LI NTFKDWAISTAR A K VLI ILS	C. RLDRSC
esculent_1	TFSKL RKKTKVLLTS LKNV KVV MDVVRT TDTA	C. KTK EC
esculent_2	TL SILK VAKLA K LAKE KF LELTA	C. KTAQCC
rugosina_C	LLDSFRQFAK V KDLIK AAQ VLSIMS	C. KLAKTC
gaegurin_4	ILDITLKQFAK V KDLVK AAQ VLSIVS	C. KLALTC





**Figura 8.** Defensinas de insecto y planta.

A. Estructuras con el motivo CS $\alpha\beta$ :

- a. tionina gama 1H (1GPT)
- b. drosomicina (1MYN)
- c. proteina antifúngica 1 (defensina de plantas RsAFP1) (1AYJ)
- d. defensina A de insecto (1ICA)
- e. noxiustoxina (1SXM)
- f. brazzeina (1BRZ)

B. En estas secuencias se incluyen las dos defensinas de alacrán, la sapecina B de *Sarcophaga peregrina* (SAPB\_SARPE), la defensina A (DEFA\_MYTED), la defensina de *Aeschna cyanea* (DEFI\_AESCY), y la royalisina de *Apis mellifera* (DEFI\_APIME).

Enseguida se incluyen las secuencias de la drosomicina, de la defensina de plantas RsAFP1, y de la tionina gama 1P.

**Figura 9.** Defensinas de mamífero.

A. Estructuras de los dos tipos de defensina.

- a. beta defensina 12 de neutrófilo de bovino (1BNB)
- b. alfa defensina 3 de humano (HNP3). La orientación de la estructura de la parte superior es la misma que la de de **a.** y en la vista inferior se puede apreciar la estructura de canasta descrita en la introducción.

B. Las dos primeras secuencias corresponden a alfa defensinas; las cinco siguientes a beta Defensinas, y la última a la big defensin de *Tachypleus tridentatus*.

## Características principales de los péptidos antimicrobianos (1)

### A. Alfa helicoidales

#### Actividad contra

Nombre	Origen	Tamaño (no. de aa)	Número de isoformas	Bacterias gram +	Bacterias gram -	Hongos filamentosos	Eritrocitos (conc. de 100% de lisis)	Similitudes	Modo de expresión	Características estructurales y modificaciones post- traduccionales. Notas.
cecropinas	<i>H. cecropia</i> <i>S. peregrina</i> <i>S. clava</i>	35 a 37	20	X	X					estructura hélice-doblez-hélice presentan amidación
cecropina P1	intestino de cerdo	31			X			con cecropinas		hélice sin doblez
andropina	<i>D. melanogaster</i>	34		X					constitutiva	presenta una elevada proporción de residuos ácidos
magaininas	<i>X. leavis</i>	21-26	6	X	X				constitutiva	
clavaninas	<i>S. clava</i>	23	4	X	X			ligera con magaininas		los residuos de aminoácidos positivos son de histidina
lycotoxinas	<i>L. carolinensis</i>	25 y 27	2	X	X		Lycot I lisa 50% a 200 µM)	ligera con magainina 1		péptidos provenientes del veneno de esta araña
dermaseptinas	<i>P. sauvagei</i> <i>P. bicolor</i>	24-34	11	X	X	X	Dms4 a 1 µM Dms3 a 80 µM B3 y B4 a 30 µM		constitutiva	
pleurocidina	<i>P. americanus</i>	25		X	X			con dermaseptinas		
caerinas	<i>Litoria</i> sp.	23-25	7	X	X				constitutiva	dos hélices anfipáticas, con la segunda cambiada de orientación 140° con respecto a la 1ª
misgurina	<i>M. anguillicaudatus</i>	21		X	X					
BMAP 27 y 28	bovino	27 y 28		X	X		BMAP28 a 100 µM			
LL 37	granulocitos, testículo y piel de humano	37		X	X				constitutiva inducible	expresión constitutiva en granulocito y testículo; inducible en lesiones cutáneas

## Características principales de los péptidos antimicrobianos (2)

### A. Alfa helicoidales (Cont.)

#### Actividad contra

Nombre	Origen	Tamaño (no. de aa)	Número de isoformas	Bacterias gram +	Bacterias gram -	Hongos filamentosos	Eritrocitos (conc. de 100% de lisis)	Similitudes	Modo de expresión	Características estructurales y modificaciones post-traduccionales. Notas.
bombininas	<i>B. variegata</i>	20-24	6	X	X		entre 15 y 50 $\mu\text{M}$			Tres péptidos presentan como segundo residuo D-aloisoleucina
melitina	<i>A. mellifera</i>	26		X	X		0.9 $\mu\text{M}$		constitutiva	Alfa hélice N-terminal hidrofóbica; hélice C-terminal de carácter básico. Péptido mayoritario del veneno de abeja
pardaxina	<i>P. marmoratus</i>	33		X	X		X			Hélice N-terminal hidrofóbica y C-terminal anfipática
temporinas	<i>R. temporaria</i>	10-13	10	X	X	X	Temp1 a 3 $\mu\text{M}$			Presentan amidación
crabrolina	<i>V. crabro</i>	13		X	X		32 $\mu\text{M}$	con temporinas		Carácter hidrofóbico (sólo una Arg) Presenta amidación. Se aisló del veneno de este abejorro

### B. Con un puente disulfuro

#### Actividad contra

Nombre	Origen	Tamaño (no. de aa)	Número de isoformas	Bacterias gram +	Bacterias gram -	Hongos filamentosos	Eritrocitos (conc. de 100% de lisis)	Similitudes	Modo de expresión	Características estructurales y modificaciones post-traduccionales. Notas.
bactenecina	bovino	12		X	X					
brevininas, ranalexina, rugosinas, gaegurinas y esculentinas	<i>R. brevipoda</i> <i>R. porsa</i> <i>R. catesbeiana</i> <i>R. rugosa</i> <i>R. esculenta</i>	20-46	15	X	X		Br1E a 0.5 $\mu\text{M}$			Todos ellos tienen dos residuos de Cys en las posiciones 1 y 7 contadas a partir del C-terminal. El N-terminal es variable.
thanatina	<i>P. maculiven.</i>	21		X	X	X		con brevinina 1		

## Características principales de los péptidos antimicrobianos (3)

### B. Con un puente disulfuro (Cont.)

#### Actividad contra

Nombre	Origen	Tamaño (no. de aa)	Número de isoformas	Bacterias gram +	Bacterias gram -	Hongos filamentosos	Eritrocitos (conc. de 100% de lisis)	Similitudes	Modo de expresión	Características estructurales y modificaciones post- traduccionales. Notas.
thanatina	<i>P. maculovenris</i>	21		X	X	X		con brevinina I		presenta amidación

### C. Con dos puentes disulfuro

#### Actividad contra

Nombre	Origen	Tamaño (no. de aa)	Número de isoformas	Bacterias gram +	Bacterias gram -	Hongos filamentosos	Eritrocitos (conc. de 100% de lisis)	Similitudes	Modo de expresión	Características estructurales y modificaciones post- traduccionales. Notas.
taquiplesinas	<i>T. tridentatus</i>	17-18	4				La I entre 50 y 100 $\mu$ M			Forman una hoja beta antiparalela. Se incluyen dos isoformas aisladas también de cangrejo llamadas poli-phemusinas
IbAMPs	<i>I. balsamina</i>	20	4	X	X	X				
MBP1	<i>Z. mays</i>	33		X	X	X				
protegrinas	cerdo	16-18			X	X		con taquiplesinas y defensinas alfa		Presentan amidación, la cual es importante para la actividad.

## Características principales de los péptidos antimicrobianos (4)

### D. Con tres o cuatro puentes disulfuro

Nombre	Origen	Tamaño (no. de aa)	Número de isoformas	Actividad contra				Similitudes	Modo de expresión	Características estructurales y modificaciones post- traduccionales. Notas.
				Bacterias gram +	Bacterias gram -	Hongos filamentosos	Eritrocitos (conc. de 100% de lisis)			
defensinas de insecto	insectos, arácnidos y moluscos	39-43	30 aprox.	X				estructural con tioninas y defensinas planta drosomicina toxinas alacrán y brazzeina		Motivo estructural C $\alpha$ $\beta$
drosomicina	<i>D. melanogaster</i>	44				X				
defensinas de planta	células periféricas de semillas	45-54	20 aprox.			X			constitutiva	Existen dos grupos de defensinas y otro no antifúngico llamado tioninas $\gamma$
tioninas beta	diversos órganos de plantas	45	?			X				Estructura en forma de L invertida; en el brazo vertical un par de hélices antiparalelas. En el horizontal una corta hoja beta antiparalela.
alfa defensinas	neutrófilos, macrófagos y células intestinales de mamífero	29-35	10 aprox.	X				estructural con beta defensinas	constitutiva en neutrófilos	Dos hojas beta antiparalelas que forman un pasador y se unen con una tercer hebra beta más flexi- ble situada en el amino terminal
beta defensinas	tejido epitelial de mamífero	38-42	10 aprox.	X					inducible o constitutiva, dependiendo del tejido	
big defensin	<i>T. tridentatus</i>	79		X	X			mismo arreglo de Cys que beta defensinas		Péptido híbrido con N-terminal hidrofóbico y C-terminal seme- jante a beta defensinas.
penaédinas	<i>P. vannamei</i>	50 y 62	2	X					constitutiva	Péptidos híbridos con N-terminal rico en Pro y C-terminal con 6 Cys.

## Características principales de los péptidos antimicrobianos (5)

### E. Ricos en ciertos aminoácidos

#### Actividad contra

Nombre	Origen	Tamaño (no. de aa)	Número de isoformas	Bacteri- as gram +	Bacteri- as gram -	Hongos filamentosos	Eritrocitos (conc. de 100% de lisis)	Similitu- des	Modo de expresión	Características estructurales y modificaciones post- traduccionales. Notas.
PR-39	intestino de cerdo y heridas de ratón	39		X	X					Péptido amidado con 49% de Pro, con 14 de estos residuos en disposición Pro-Pro. No causa lisis en membranas modelo.
Bac 5 y Bac 7	neutrófilos de bovino	42 y 59		X	X			con un péptido de <i>C. maenas</i>		Bac5, 18 de 19 Pro están como Pro-Pro. Bac7 tiene Pro cada dos residuos.
Homólogo de Bac7	<i>C. maenas</i>	6.5 kDa		X	X					28 residuos del N-terminal tienen 60% de identidad con Bac7
apidaecina	<i>A. mellifera</i>	18	3		X			ligera con abaecina y dipterocinas	inducible	33% de Pro. No causa lisis en membranas.
abaecina	<i>A. mellifera</i>	34			X				inducible	30% de Pro
dipterocinas	<i>P. terranova</i>	82	5		X					Los primeros 18 residuos son similares a las apidaecinas. El resto es rico en Gly (25%)
metchnikowina	<i>D. melanogaster</i>	26		X		X			inducible	
lumbricina	<i>L. rubellus</i>	29		X	X	X				15% de Pro. Carga neta de +1 (10 residuos básicos y 9 ácidos)
drosocina	<i>D. melanogaster</i>	19			X				inducible	33% de Pro, agrupadas como Pro-Arg-Pro. O-glicosilado en Thr.
formaecinas	<i>M. gulosa</i>	16	2		X				inducibles	30% de Pro, ordenadas sin ningún motivo aparente. O-glicosilado en Thr
indolicidina	neutrófilos de bovino	13		X	X		20 µM			Presenta amidación. Contiene el % molar de Trp más alto conocido.
péptido rico en Trp	médula de puerco	13		X	X	X				Contiene tres Trp.