

Diseño, síntesis, caracterización y evaluación *in vitro* de la actividad de los péptidos antimicrobianos contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos

Design, synthesis, characterization and *in vitro* evaluation of antimicrobial peptides against pathogenic bacteria resistant to antibiotics

✉ Claudia Ortiz López

Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), Escuela de Microbiología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Artículo de posesión para el ingreso como miembro correspondiente a la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales el 10 de diciembre del 2019

Resumen

Los péptidos antimicrobianos han atraído mucha atención como nuevos agentes terapéuticos contra enfermedades infecciosas. En este estudio se hizo el diseño racional *in silico* de 18 péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas resistentes utilizando el programa DEPRAMP desarrollado en el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología de la Universidad Industrial de Santander. Posteriormente, los péptidos diseñados se sintetizaron en fase sólida con el método de 9-fluorenilmetoxicarbonilo en medio ácido. Se obtuvieron secuencias cortas de 17 aminoácidos con un grado de pureza entre 95 y 98 %, estructura secundaria de hélice alfa, carga neta catiónica (entre +3 y +6), punto isoeléctrico entre 10,04 y 12,03 e índice de hidropatía entre -0,62 y 1,14. Todos los péptidos antimicrobianos mostraron actividad antibacteriana y bactericida *in vitro* frente al menos una de las cepas patógenas estudiadas: *Escherichia coli* O157: H7, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Los péptidos antimicrobianos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W registraron la mejor actividad antibacteriana, alcanzando una concentración mínima inhibitoria (CMI₉₉) en rangos de 0,5 a 25 µM frente a las tres cepas evaluadas, de las cuales *Escherichia coli* O157: H7 fue la más sensible frente al péptido antimicrobiano GIBIMP5F8W, con una CMI₉₉ de 0,5 µM y una concentración mínima bactericida de 10 µM, en tanto que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* fue la más resistente, con una CMI de más de 100 µM frente a más de cinco péptidos antimicrobianos. La toxicidad de los péptidos sobre los eritrocitos produjo un porcentaje de hemólisis menor al 40 % en concentraciones de 50 µM. Por su parte, en las líneas celulares de carcinoma de pulmón A549 y HepG2, el único compuesto que presentó toxicidad fue GIBIM-P5F8W, presentando un 36% de células viables en concentraciones de 100 µM del péptido en la línea celular A549.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos; resistencia microbiana; actividad antimicrobiana.

Abstract

Antimicrobial peptides have attracted much attention as new therapeutic agents against infectious diseases. In this work, we made the rational *in silico* design of 18 cationic peptides with antimicrobial activity against resistant pathogenic bacteria using the DEPRAMP software developed in the GIBIM research group. Subsequently, the designed peptides were synthesized in solid phase using the Fmoc strategy in an acid medium. Then, sequences of 17 amino acids were obtained with a degree of purity between 95 and 98%, secondary structure α -helix, net cationic charge (between +3 and +6), pI between 10.04 to 12.03, and hydrophobicity index between -0.62 and 1.14. All antimicrobial peptides showed antibacterial and bactericidal activity *in vitro* against at least one of the pathogenic strains studied: *Escherichia coli* O157: H7, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* Resistant to Methicillin. The GIBIM-P5S9K and GIBIM-P5F8W antimicrobial peptides presented the best antibacterial activities reaching MIC₉₉ in ranges of 0.5 to 25 µM against the three strains evaluated. *E. coli* O157: H7 was the

Correspondencia:

Claudia Cristina Ortiz López; ortize@uis.edu.co, **Recibido:** 25 de marzo de 2019, **Aceptado:** 8 de octubre de 2019, **Editor:** Luis Fernando García

most sensitive strain to the GIBIMP5F8W presenting 0.5 μM MIC₉₀ and 10 μM MBC, and *P. aeruginosa* was the most resistant strain with MIC values over 100 μM against more than five antimicrobial peptides. The toxicity of peptides in erythrocytes produced a hemolysis percentage of less than 40% in concentrations of 50 μM . On the other hand, in the lung carcinoma cell lines A549 and HepG2, the only compound that presented toxicity was GIBIM-P5F8W, presenting 36% of viable cells in concentrations of 100 μM of the peptide in the A549 cell line.

Keywords: Antimicrobial peptides; microbial resistance; antimicrobial activity.

Introducción

Microorganismos resistentes a antibióticos. Uno de los mayores problemas actuales en salud pública es la resistencia de los microorganismos a los compuestos antimicrobianos. El uso indiscriminado de antibióticos potentes y de amplio espectro ha generado altas tasas de resistencia antimicrobiana (Schmidt, 2017). El problema se ha agravado aún más por la resistencia desarrollada por muchos patógenos frente a más de un compuesto antimicrobiano, por lo cual se les clasifica como patógenos resistentes a múltiples medicamentos (*multiple drug resistance*, MDR) (Mathur & Singh, 2013; Reuken, et al., 2017). Por ejemplo, el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) ha informado que en Europa cada año mueren 25.000 personas debido a infecciones causadas por bacterias multiresistentes, que ocasionan costos adicionales de atención médica y pérdidas de productividad de al menos 1.500 millones de euros cada año (Li & Webster, 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha clasificado los patógenos de interés prioritario para el desarrollo de nuevos antibióticos (World Health Organization, WHO, 2017) de la siguiente manera: prioridad 1, crítica: *Acinetobacter baumannii* resistente a los carbapenémicos; *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos; *Enterobacteriaceae* resistentes a los carbapenémicos y productoras de betalactamasa de espectro extendido (ESBL); prioridad 2, elevada: *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina; *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina; *Helicobacter pylori* resistente a la claritromicina; *Campylobacter* spp. resistentes a las fluoroquinolonas; *Salmonellae* resistentes a las fluoroquinolonas; *Neisseria gonorrhoeae* resistente a la cefalosporina y a las fluoroquinolonas, y prioridad 3, media: *Streptococcus pneumoniae* sin sensibilidad a la penicilina; *Haemophilus influenzae* resistente a la ampicilina y *Shigella* spp. resistentes a las fluoroquinolonas. En este contexto, las bacterias Gram negativas *E. coli* O157:H7 y *P. aeruginosa*, así como la Gram positiva *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), se han convertido en patógenos de gran relevancia y han impulsado la búsqueda de nuevos tratamientos para combatir las infecciones que ocasionan (Brogan & Mossialos, 2016).

Estructura, propiedades bioquímicas y actividad de los péptidos antimicrobianos. Aunque el número y la diversidad de los péptidos antimicrobianos en la naturaleza son elevadas (véase la base de datos en <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>),

hay formas estructurales que la mayoría de ellos comparten (Cruz, et al., 2014; 2017; 2018; Prada, et al., 2016; Kumar, et al., 2018). En general, los péptidos antimicrobianos son relativamente cortos (12 a 30 aminoácidos), de naturaleza catiónica (cargados positivamente con un valor de pH neutro) y anfífilos, con una proporción significativa de residuos hidrofóbicos. La naturaleza catiónica de la mayoría de ellos favorece un cierto grado de selectividad por los fosfolípidos de la membrana microbiana y presenta una carga generalmente catiónica (+2 a +9) y un promedio de 40 a 50 % de residuos hidrofóbicos. Estas propiedades son importantes en su mecanismo de acción antimicrobiano (Lohner, 2001).

Inicialmente, las actividades líticas de los péptidos antimicrobianos se atribuyeron a las estructuras helicoidales (Jenssen, et al., 2006). Sin embargo, se ha sugerido que tanto la estructura helicoidal como la conformación flexible son importantes para mejorar la potencia y la selectividad de los péptidos antimicrobianos no solo frente a las células bacterianas, sino también a las eucariotas (por ejemplo, para su actividad citotóxica en células plasmodiales o cancerosas). Esta flexibilidad estructural en las estructuras helicoidales de péptidos se ha asociado con la introducción cuidadosa de residuos de prolina en la secuencia del péptido antimicrobiano (Vermeer, et al., 2012).

A pesar de sus propiedades físicas similares, las homologías de secuencia de los péptidos antimicrobianos son muy limitadas y exhiben un amplio conjunto de estructuras secundarias que permiten clasificarlos a partir de sus estructuras tridimensionales (Jenssen, et al., 2006). La clasificación de los péptidos antimicrobianos es difícil debido a su gran diversidad. Según la composición de aminoácidos de los péptidos, y el tamaño y las estructuras que los conforman, los péptidos antimicrobianos pueden dividirse en varias categorías: a) péptidos con estructuras de hélice alfa, como la catelicidina humana; b) péptidos con estructuras de hoja beta estabilizadas por puentes disulfuro, como las defensinas humanas; c) péptidos con estructuras extendidas, como la indolicidina, y d) péptidos ricos en glicina, como el Pg-AMP1, y péptidos con estructuras de bucle, como las defensinas cíclicas (Li, et al., 2012).

Los mecanismos de actividad antimicrobiana de los péptidos antimicrobianos varían desde la permeabilización de la membrana hasta las acciones sobre un conjunto de moléculas intracelulares diana que incluyen las actividades inmunomoduladoras. Los péptidos pueden destruir la estructura de la membrana bacteriana produciendo la lisis celular o mediante la interacción entre péptido y membrana pueden conducir a la formación de poros transitorios y transportar

el péptido dentro de la célula, poniéndolo en contacto con dianas intracelulares donde se pueden enlazar al ADN, el ARN y las proteínas, y provocar procesos como la inhibición de la síntesis de la pared celular o la síntesis de proteínas; además, pueden interferir en la citocinesis bacteriana por filamentación celular *in vitro* o *in vivo* (Teixeira, *et al.*, 2012; Li, *et al.*, 2017).

Diseño, síntesis y caracterización de péptidos antibacterianos. Aunque los péptidos antimicrobianos se han considerado fármacos antibióticos prometedores, son sensibles al efecto de las condiciones ambientales (pH y fuerza iónica) y a la acción de las proteasas, lo que podría limitar su aplicación terapéutica (Malik, *et al.*, 2016). Además, son potencialmente citotóxicos para las células humanas, lo que en algunos casos ocasiona alergia, y su producción a escala industrial puede ser muy costosa (Pfalzgraff, *et al.*, 2018).

Se ha propuesto una variedad de estrategias para mejorar la estabilidad de los péptidos frente a la degradación proteolítica. Entre ellas, se han ensayado la modificación química de extremos terminales de péptidos (Danial, *et al.*, 2012); la alteración de sus estructuras secundarias flexibles (Rozeck, *et al.*, 2003); la estabilización de las estructuras secundarias (Houston, *et al.*, 1998); el desarrollo de péptidos análogos mediante la sustitución con aminoácidos no naturales (por ejemplo, usando el enantiómero D) (Lee, *et al.*, 2011; Cruz, *et al.*, 2018); el aumento del contenido alfa helicoidal en la estructura de péptidos mediante modificaciones covalentes (Uteng, *et al.*, 2003); la modificación de la propiedad hidrófoba, la longitud y la carga neta (Rydlo, *et al.*, 2006); el acortamiento de péptidos antimicrobianos naturales (Lee, *et al.*, 2011), y el diseño *in silico* de péptidos antimicrobianos utilizando los algoritmos genéticos (Prada, *et al.*, 2016). Además, han surgido estrategias de diseño racional basadas en el alineamiento de secuencias de los péptidos antimicrobianos en una plantilla. En estudios previos (Yang, *et al.*, 2017) se ha modificado un único aminoácido en la secuencia, con el objetivo de determinar las posiciones y los residuos que son importantes para la actividad antimicrobiana. Algunos péptidos, como la cecropina, la manganina, la temporina, la protegrina y la lactoferrina, se han utilizado como plantillas de péptidos antimicrobianos (Merlino, *et al.*, 2017).

Una vez que se ha diseñado *in silico* la nueva secuencia de un péptido antimicrobiano, se debe hacer su síntesis. Una de las metodologías más utilizadas en la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) es la basada en el 9-fluorenilmetilcarboxil (Fmoc), debido a sus altos rendimientos (Jaradat, 2018). Este mecanismo consiste en la elongación de una cadena peptídica anclada a un soporte sólido mediante la adición sucesiva de aminoácidos que se unen a través de un enlace amida (enlace peptídico) entre el grupo carboxilo del aminoácido entrante y el grupo amino del aminoácido previamente ligado al soporte hasta obtener la secuencia del péptido deseado. Los dos métodos de síntesis peptídica habitualmente usados son el Fmoc y el basado

en el *terc*-butiloxicarbonilo (*t*-Boc), los cuales difieren en los reactivos y condiciones empleadas para llevarlos a cabo (Jaradat, 2018).

En cuanto a la purificación del péptido antimicrobiano sintetizado, el grado de pureza se determina usualmente mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (*reversed phase high-performance liquid chromatography*, RP-HPLC) (Aguilar, 2004). Para la determinación de la masa molecular del péptido, se utilizan la espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS), dada su sensibilidad, velocidad y alto grado de especificidad molecular (Irina, *et al.*, 2011), y el dicroísmo circular (DC), técnica alternativa de espectroscopía de absorción electrónica, que permite determinar la estructura secundaria del péptido. Hoy existen métodos de deconvolución que utilizan bases de datos y permiten establecer una estructura muy acertada (Bakshi, *et al.*, 2014). En este contexto, en el presente estudio se describen el diseño, la síntesis, la purificación, la caracterización bioquímica y la evaluación antimicrobiana de péptidos antimicrobianos contra *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos.

Materiales y métodos

Materiales. Los aminoácidos L obtenidos con el Fmoc se adquirieron en IRIS Biotech GmbH (Germany). La resina de rink-amida, y los reactivos y disolventes orgánicos para la síntesis de péptidos se obtuvieron en Merck Novabiochem® (Germany). El 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) y el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (ACC) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Se usó Agua Milli-Q® con una resistividad de 18,3 M Ω a 25 °C para la preparación de todas las soluciones.

Microorganismos. Las tres cepas bacterianas, *E. coli* O157: H7, *P. aeruginosa* y SARM, fueron donadas por la Escuela de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana. Las líneas celulares de tipo epitelial de carcinoma de pulmón humano A549 y la HepG2 fueron donadas por el Laboratorio de oxidación de cultivos celulares y biológicos de la Universidad Federal de Rio de Janeiro (Brasil).

Los medios de cultivo Müller Hilton (MH), la infusión de cerebro y corazón (BHI) y el Luria Bertani (LB) se adquirieron de Oxoid (Basingstoke, Inglaterra). El medio M199 se adquirió de Gibco (Invitrogen, CA). Los reactivos de lisostafina, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO) y Tritón® X-100 se obtuvieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Para obtener las diferentes concentraciones de péptido, se preparó una solución madre con una concentración de 1 mg de péptido por ml de agua o 1 mM de tampón de fosfato de sodio con pH de 7.2.

Diseño bioinformático de péptidos. El diseño de nuevos péptidos con potencial antimicrobiano se hizo mediante el uso de máquinas de soporte vectorial (*support vector machines*, SVM) utilizando el modelo denominado relación cuantitativa entre estructura y actividad (*quantitative structure-activity*

relationship, QSAR), para el reconocimiento de patrones y la creación de algoritmos que permitieran detectar la actividad antibacteriana mediante una estrategia de optimización basada en algoritmos genéticos, con la cual se hace una búsqueda de péptidos antimicrobianos con rangos establecidos de carga, carácter hidrófobo, punto isoeléctrico e índice de inestabilidad, y que se denominó DEPRAMS (programa desarrollado en nuestro grupo GIBIM) (Trindade, *et al.*, 2014). Las secuencias peptídicas se alinearon con la herramienta BLASTP y el método de alineamiento múltiple de secuencia Clustal W, con el fin de obtener residuos conservados en los nuevos péptidos diseñados, y cambiar aminoácidos de la secuencia del péptido para dar origen a péptidos análogos también con propiedades antimicrobianas. Como moldes se usaron diferentes proteínas homólogas, todas publicadas en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Se utilizó la base de datos denominada CAMP para determinar teóricamente los valores de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos diseñados (propiedad hidrófoba, índice alifático, carga neta, punto isoeléctrico, peso molecular y porcentaje teórico de ser un péptido antimicrobiano según dichas características) (Conlon, *et al.*, 2011).

Síntesis de péptidos antimicrobianos. Los péptidos se obtuvieron mediante la síntesis química en fase sólida (*solid-phase peptide synthesis*, SPPS), empleando la estrategia Fmoc en bolsas de polipropileno. Para sintetizar el péptido desde su extremo C-terminal se empleó una resina de rinkamida 4MBHA (capacidad: 0,63 meq/gramo). Las bolsas cargadas con 100 mg de resina se marcaron y sellaron. Los aminoácidos correspondientes en cada secuencia se acoplaron con N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) como agente activador y O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N,N-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) como agente anti-racémico (7 equivalentes de DIPEA por 5 equivalentes de TBTU) para acoples de menos de 3 horas, y N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) con el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) para los acoples de 12 horas (Strateva & Yordanov, 2009). El indicador azul de bromofenol (1 % p/v en dimetilformida, DMF) se añadió a la solución al finalizar cada etapa de acoplamiento para verificar de forma cualitativa la eficiencia de los acoples en la reacción. La desprotección del grupo Fmoc se llevó a cabo por piperidina al 20 % v/v en DMF mediante dos lavados de 10 minutos cada uno (Babu & Gopi, 1998). Finalizada la elongación del péptido, se hizo el clivaje con el objetivo de desprender el péptido de la resina usada como soporte de la síntesis. Los péptidos se clivaron de la resina con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y trihidroxopropilsilano (TFA/H₂O/TIS, 95:2,5:2,5); posteriormente, se dejaron en agitación durante 3 horas, después se filtró la resina y, por último, se precipitó la solución filtrada con 5 mL de éter frío. La aparición de un sólido blanco lechoso correspondiente al péptido sintetizado se centrifugó a 3500 rpm y a 4 °C durante 15 minutos (Broekman, *et al.*, 2011). Los péptidos se

purificaron mediante RP-HPLC (Jasco Corporation, Tokio, Japón) usando una columna Vydac® C18 y una mezcla de H₂O con TFA al 0,1 % (v/v) y acetonitrilo (ACN) que contenía TFA al 0,1 % (v/v) como fase móvil. Para la elución de los péptidos se utilizó el siguiente programa de gradiente: 30 minutos con 5 a 70 % de la segunda mezcla con flujo de 1 mL/min, y detección en una longitud de onda (λ) de 220 nm (Jofré, *et al.*, 2011).

Caracterización de los péptidos sintéticos. La masa molar de los péptidos purificados se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF como se ha descrito previamente (Fields & Noble, 2009), usando un espectrómetro de masas Bruker UltrafleXtrem™ en modo reflectrón y utilizando el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) como matriz. Posteriormente, se determinó la actividad antimicrobiana de los péptidos contra *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* y SARM mediante microdilución en caldo.

La estructura secundaria de los péptidos se determinó mediante dicroísmo circular (DC) (Aguilar, 2004) utilizando un espectrómetro CD (J-815, Jasco Corporation, Japón). Los péptidos se ajustaron a una concentración final de 200 μ M en una solución al 30 % (v/v) de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), preparando 200 μ L de volumen final que contenían 60 microlitros de 2,2,2 TFE, agua y una muestra de péptido. La concentración del péptido se determinó con base en su peso molecular y su coeficiente de extinción molar. En el coeficiente de extinción molar calculado se tuvo en cuenta el número de residuos de triptófano y tirosina. Se calculó el respectivo volumen de péptido para obtener una concentración final de 200 μ M. La elipticidad molar [θ] de cada péptido se calculó mediante la siguiente ecuación: [θ]=3298.2 $\Delta\epsilon$, donde ϵ es el coeficiente de extinción molar.

La concentración de los péptidos se determinó midiendo la absorbancia de las soluciones a 220 nm con la ecuación de Lambert-Beer y teniendo en cuenta la absorción del enlace peptídico.

Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro de los péptidos antimicrobianos libres. Para determinar la actividad antimicrobiana de los péptidos diseñados y sus análogos contra *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* y SARM, en la estimación de los valores de la CIM se utilizó el método de microdilución en placas de 96 pozos según los protocolos descritos por varios autores (Abercrombie, *et al.*, 2015; Cruz, *et al.*, 2017).

Para determinar la CMI, la absorbancia de las microplacas se midió en un espectrofotómetro de microplaca Elisa (BIO-RAD, Imark™) a 595 nm, 37 °C y 200 rpm. Inicialmente, se preparó un pre-inóculo tomando 2 a 3 colonias de *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* y SARM previamente sembradas en agar BHI para SARM y LB para *P. aeruginosa* y *E. coli*, e incubando a 37 °C durante 24 horas. Las microplacas contienen diluciones seriadas de los péptidos antimicrobianos libres (0,5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 μ M). La CMI se definió como la menor concentración de péptido antimicrobiano que produjera una inhibición del

crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI_{50} y CMI_{99} corresponden a las dosis que inhiben el 50 y el 99 % del crecimiento, respectivamente. La CMB se define como la concentración en la cual hubo 100 % del crecimiento bacteriano en comparación con el control positivo utilizado (la bacteria en crecimiento en el medio de cultivo apropiado) (Yoon, *et al.*, 2014; Cruz, *et al.*, 2014).

Evaluación del efecto de las sales en la actividad antibacteriana de los péptidos antimicrobianos. Para evaluar la sensibilidad salina de los péptidos más activos, se preparó una solución madre de 200 mM para cada sal (NaCl, KCl y $MgCl_2$) y se esterilizó para tomar el volumen respectivo de cada una y obtener concentraciones finales de 150 mM de NaCl, 4.5 mM de KCl y 1 mM de $MgCl_2$ en el pocillo de la microplaca, con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana según el procedimiento ya descrito.

Determinación de la actividad hemolítica de los péptidos

La actividad hemolítica de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y sus análogos se determinó midiendo en eritrocitos de carnero la hemólisis inducida por estos compuestos, como se ha hecho en estudios previos (Lozano, *et al.*, 2010), y utilizando concentraciones del péptido antimicrobiano de 5 a 100 μM . Como control positivo se utilizó una suspensión que contenía los eritrocitos y Tritón® X-100 al 1 % (v/v). Esta combinación produce el 100 % de hemólisis. El porcentaje de hemólisis se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Hemólisis (\%)} = (A_s - A_0) / (A_{100} - A_0) \times 100 \%$$

donde A_s es la absorbancia de la muestra, A_{100} es la absorbancia de los eritrocitos sometidos a lisis completa en 0,1 % de Tritón® X-100 y A_0 es la absorbancia en ausencia completa de hemólisis.

Determinación de la citotoxicidad de los péptidos antimicrobianos *in vitro*. La citotoxicidad de los péptidos con mayor actividad antimicrobiana se determinó *in vitro* con el método publicado por Lozano, *et al.* (2010) y Chaudhary (2016). Para el ensayo se cultivaron las líneas celulares de carcinoma de pulmón humano A549 y HepG2 en medio Eagle modificado (EMEM) complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % (p/v), en el cual se colocaron 7.500 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos con un volumen final de 0,2 mL; a continuación, se incubaron en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5 % (v/v), a 37 °C durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas (Multiskan de Thermo Scientific™). El control positivo de la lisis celular se hizo con Triton X-100 al 0,1 % (v/v), el cual ocasionó una lisis del 100 %.

Análisis estadístico. Los datos experimentales se representan como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se examinaron mediante un análisis unidireccional de la varianza utilizando el sistema SPSS 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.). Se consideró que un valor de $p < 0,05$ indicaba una diferencia estadísticamente significativa.

Resultados y discusión

Diseño de nuevos péptidos antimicrobianos. Los péptidos y sus análogos se diseñaron *in silico* como péptidos antibacterianos de tipo hélice alfa y se visualizaron con el programa PEP-FOLD 3.5. En la figura 1 se presentan los seis péptidos denominados GIBIM-P1 a GIBIM-P6, los cuales se usaron posteriormente como plantilla para el desarrollo de 12 nuevos análogos. La estructura secundaria se simuló

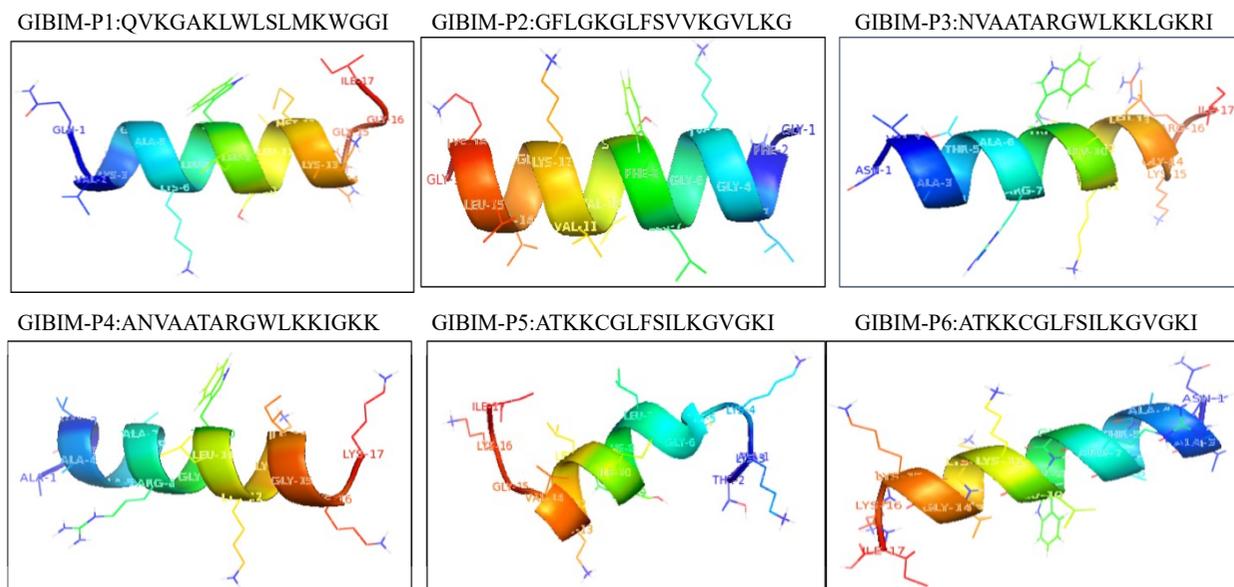


Figura 1. Simulación de la estructura secundaria de los péptidos diseñados usados como secuencia original. La construcción de la estructura secundaria *in silico* (teórica) se realizó en la base de datos pep-fold 3.5 teniendo en cuenta la estructura cristalográfica de las proteínas que contiene la base de datos, mediante homología de secuencia, utilizando el algoritmo DEPRAMS.

en línea usando el servidor de predicción PEP-FOLD 3.5 (<http://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3>).

Las secuencias de los péptidos inicialmente diseñados y de sus análogos se presentan en la Tabla 1. Las modificaciones en la secuencia de los péptidos GIBIM-P2 a GIBIM-P5, usadas para diseñar los análogos peptídicos, buscaban aumentar la carga neta positiva, la naturaleza hidrófoba y el porcentaje de probabilidad de ser un péptido antimicrobiano, propiedades fisicoquímicas directamente relacionadas con la actividad antimicrobiana (Il'ina, *et al.*, 2011; Bakshi, *et al.*, 2014). Por esta razón, el diseño de los péptidos análogos GIBIM-P3A6K, GIBIM-P5T2K y GIBIM-P5S9K, y los residuos de alanina (A), treonina (T) y serina (S) se reemplazaron por lisina (K) para aumentar el carácter catiónico de los péptidos (Teixeira, *et al.*, 2012; Sengupta, *et al.*, 2008; Vila-Farrés, *et al.*, 2012).

En el diseño de los péptidos análogos GIBIM-P2G17I, GIBIM-P2G17L, GIBIM-P4A1I, GIBIM-P4A1V y GIBIM-P4N2F, los aminoácidos que aparecen subrayados se cambiaron por isoleucina (I), leucina (L), valina (V) y fenilalanina (F), respectivamente, para aumentar su carácter hidrófobo (Yu, *et al.*, 2017). Por último, en los péptidos

antimicrobianos GIBIM-P3A3G, GIBIM-P3T5S y GIBIM-P5F8W, los aminoácidos subrayados se sustituyeron por asparagina (N), glicina (G), serina (S) y triptófano (W), respectivamente, para aumentar la probabilidad de ser péptido antimicrobiano (Yang, *et al.*, 2017).

La naturaleza catiónica de los péptidos antimicrobianos representa el principal factor de contacto con la superficie bacteriana de carga opuesta a través de interacciones electrostáticas para facilitar su acción (Yeaman & Yount, 2003). Además, la presencia de aminoácidos específicos en la posición precisa de la cadena peptídica es igualmente crucial para la expresión de la actividad antimicrobiana. Esto sucede probablemente porque los aminoácidos poseen una gran variedad de propiedades fisicoquímicas y cada uno tiene un único grupo funcional de cadena lateral. Además, la asignación de aminoácidos en la posición precisa de la cadena peptídica aseguraría la integridad estructural y la estabilidad de los péptidos antimicrobianos de forma conservada para garantizar la interacción específica con la diana. En cuanto a su característica de hidrófobos, esta les permite a los péptidos penetrar en las células e inducir la lisis de las membranas (Aoki & Ueda, 2013). Además, el aumento de la naturaleza hidrófoba de la secuencia de aminoácidos

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos diseñados y sus análogos

Péptido	Secuencia	Carga Neta	T _R ^a (min)	PM ^b (Da)	[M+H] ⁺ _c (Da)	PAP (%) ^d	pI ^e	Índice Inestabilidad	GRAVY ^f
GIBIM-P1	QVKGAKLWLSLMKWGGI-NH ₂	+3	1,91	1913,10	1914,33	96,5	10,30	5,65	0,28
GIBIM-P2	GFLGKGLFSVVKGVKLG-NH ₂	+3	1,91	1704,03	1706,52	99,3	10,30	-17,25	0,89
GIBIM-P2G17I	GFLGKGLFSVVKGVKLI-NH ₂	+3	1,91	1760,10	1762,66	99,5	10,30	-17,25	1,18
GIBIM-P2G17L	GFLGKGLFSVVKGVKLL-NH ₂	+3	1,93	1760,10	1762,74	99,5	10,30	-17,25	1,14
GIBIM-P2G13N	GFLGKGLFSVVKNVKLG-NH ₂	+3	1,92	1761,06	1764,78	99,3	10,30	-12,26	0,71
GIBIM-P3	NVAATARGWLKKGKRI-NH ₂	+5	1,89	1880,15	1882,95	96,7	12,02	23,13	-0,29
GIBIM-P3A3G	NV G AATARGWLKKGKRI-NH ₂	+5	1,90	1866,13	1869,99	96,4	12,02	13,14	0,42
GIBIM-P3T5S	NVAAS A RGWLKKGKRI-NH ₂	+5	1,89	1866,13	1868,10	97,2	12,02	23,13	-0,29
GIBIM-P3A6K	NVAAT K RGWLKKGKRI-NH ₂	+6	1,88	1938,19	1939,26	98,0	12,03	42,31	-0,62
GIBIM-P4	ANVAATARGWLKKGKRI-NH ₂	+5	1,90	1811,10	1812,20	98,7	11,33	3,95	-0,37
GIBIM-P4A1I	I N VAAATARGWLKKGKRI-NH ₂	+5	1,89	1853,13	1853,78	99,3	11,33	3,95	-0,21
GIBIM-P4A1V	V N VAAATARGWLKKGKRI-NH ₂	+5	1,88	1839,11	1839,86	98,9	11,33	3,95	-0,23
GIBIM-P4N2F	F V VAAATARGWLKKGKRI-NH ₂	+5	1,89	1844,10	1846,91	98,5	11,33	3,95	0,00
GIBIM-P5	ATKKCGLSILKGVGKI-NH ₂	+4	1,89	1762,04	1762,96	97,0	10,04	-4,23	0,56
GIBIM-P5T2K	A K KKCGLSILKGVGKI-NH ₂	+5	1,89	1789,10	1791,10	96,6	10,20	-4,23	0,37
GIBIM-P5S9K	ATKKCGL F ILKGVGKI-NH ₂	+5	1,90	1803,11	1804,19	96,0	10,20	-18,06	0,38
GIBIM-P5F8W	ATKKCGL W SILKGVGKI-NH ₂	+4	1,90	1801,05	1802,24	97,0	10,04	9,70	0,35
GIBIM-P6	NVAATARGWLKKGKRI-NH ₂	+5	1,89	1853,13	1855,43	98,5	11,33	-1,04	-0,21

^aT_R: tiempo de retención en min; ^bPeso Molecular; ^cRelación masa/carga; ^dProbabilidad de ser péptido antimicrobiano; ^ePunto Isoeléctrico; ^fPromedio del índice de Hidropatía; ^b Peso molecular; ^c Relación masa/carga; ^d Probabilidad de ser péptido antimicrobiano; ^e Punto isoelectrico; ^f Promedio del índice de hidropatía

de los péptidos antimicrobianos se correlaciona con su baja selectividad y toxicidad en las células mamíferas. Asimismo, la estructura anfipática de los péptidos antimicrobianos facilita su interacción con la membrana celular y su posterior inserción en la matriz de los fosfolípidos (Tossi, *et al.*, 2000).

Por lo anterior, en el diseño de los péptidos análogos GIBIM-P3A6K, GIBIM-P5T2K y GIBIM-P5S9K, los residuos de alanina (A), treonina (T) y serina (S), respectivamente, se reemplazaron por lisina (K) para aumentar el carácter catiónico de los péptidos. En el diseño de los péptidos análogos GIBIM-P2G17I, GIBIM-P2G17L, GIBIM-P4A1I, GIBIM-P4A1V y GIBIM-P4N2F, los aminoácidos subrayados se cambiaron por isoleucina (I), leucina (L), valina (V) y fenilalanina (F), respectivamente, con el fin de aumentar su carácter hidrófobo. Por último, en los péptidos GIBIM-P2G13N, GIBIM-P3A3G, GIBIM-P3T5S y GIBIM-P5F8W, los aminoácidos subrayados se sustituyeron por asparagina (N), glicina (G), serina (S) y triptófano (W), respectivamente, con el fin de aumentar la probabilidad de que constituyeran péptidos antimicrobianos.

Los 18 péptidos antimicrobianos diseñados tuvieron una probabilidad de serlo mayor al 96 % y un índice de ines-tabilidad menor de 40, lo que garantiza que tendrían un tiempo de vida media *in vivo* mayor a 16 horas (Tripathi, *et al.*, 2017), excepto en el caso del péptido GIBIM-P3A6K. Las características fisicoquímicas de los péptidos se presentan en la Tabla 1. Los péptidos GIBIM-P6, GIBIM-P3, GIBIM-P4 y los análogos de los dos últimos obtuvieron la mayor carga neta positiva (entre 5 y 6), seguidos del péptido GIBIM-P5 y sus análogos (carga neta entre 4 y 5). No obstante, los péptidos más hidrofóbicos fueron GIBIM-P2G17I y GIBIM-P2G17L, con un índice de hidropatía de 1,18 y 1,14, respectivamente. Las modificaciones en las secuencias peptídicas originales no afectaron la estructura secundaria de hélice alfa de los 12 análogos, la cual conservó la misma estructura anfipática.

Síntesis y caracterización de los péptidos. Los 18 péptidos alcanzaron un grado de pureza aproximado de 95 a 98 % (Tabla 1). Cuando se determinó la pureza del péptido sintetizado, se midió la absorbancia en tres longitudes de onda: 210, 220 y 280 nm. La primera no se tomó en cuenta porque absorbió la mayoría de los enlaces presentes en la muestra. La segunda correspondía a la absorción del enlace peptídico y la tercera a los grupos de anillos aromáticos que se encuentran en las cadenas laterales de los aminoácidos fenilalanina (F), triptófano (W) y tirosina (Y). Si los péptidos poseen alguno de estos aminoácidos en la secuencia, pueden cuantificarse a 280 nm. Sin embargo, si este grupo de aminoácidos no está presente en la secuencia, se cuantifica la concentración del péptido a 220 nm teniendo en cuenta la absorción del enlace peptídico.

En todos los casos fue posible confirmar la secuencia primaria de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y sus análogos mediante el análisis de masas MALDI-TOF. Las masas moleculares teórica y experimental de cada

péptido se presentan en la tabla 1. Los resultados obtenidos mediante el análisis con esta técnica sugieren que los péptidos se sintetizaron satisfactoriamente, ya que los datos experimentales de unidades de masa (m/z) para cada uno concordaron con sus respectivas masas moleculares obtenidas teóricamente.

Además, se determinó la proyección de la rueda helicoidal de Schiffer-Edmundson para cada péptido (no se muestran los datos). Los diagramas revelaron una conformación de carácter anfipático para los péptidos, mostrando que todos los residuos hidrófilos de estos compuestos están situados en un lado de la hélice, en tanto que los residuos hidrófobos están en el otro lado de esta.

En cuanto a la estructura secundaria de los péptidos sintéticos y análogos, se determinó el espectro de dicroísmo circular en condiciones simuladas de membrana en presencia de TFE/H₂O a una concentración de 30 % (v/v). Los péptidos adoptaron una estructura de hélice alfa y exhibieron un mínimo de dos bandas negativas a 205 y 215 nm, lo que indica que adoptan una estructura de hélice alfa bien definida (Figura 2). En la Tabla 2 se observa que todos los péptidos tuvieron un porcentaje helicoidal mayor al 2,4 % (v/v), siendo el análogo GIBIM-P2G17L el de menor estructura helicoidal, en tanto que el péptido GIBIM-P3 exhibió la mayor estructura helicoidal, la cual se tomó como referencia (100 %). Estos resultados indicaron que la cara hidrófoba no disruptiva a lo largo de la cara no polar del péptido estabiliza la estructura helicoidal.

Evaluación de la actividad antibacteriana de los péptidos antimicrobianos. Los péptidos catiónicos diseñados inhibieron el crecimiento de las bacterias estudiadas de

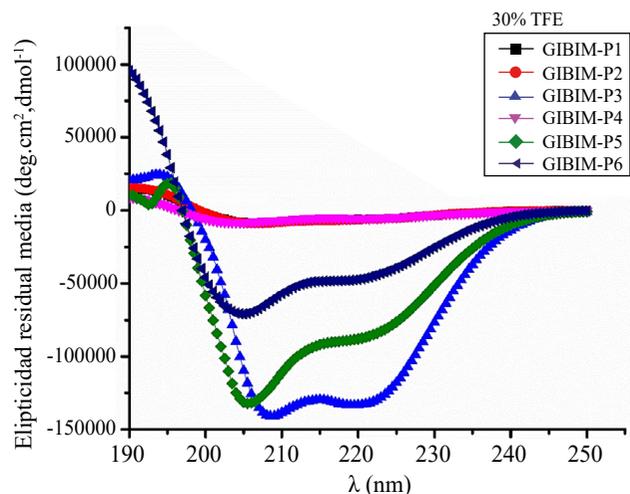


Figura 2. Espectros de DC de los péptidos diseñados. Se promediaron los valores de tres *scans* por muestra, y las concentraciones de péptido se fijaron a 150 μ M. Los péptidos análogos adoptaron una estructura alfa-helicoidal similar (datos no mostrados). Todos los péptidos tuvieron un porcentaje de estructura helicoidal mayor al 2.4%, siendo el análogo GIBIM-P2G17L con el menor contenido

Tabla 2. Datos del DC dicroísmo circular de los péptidos

Péptido	$[\theta]_{222}^*$	% Hélice
GIBIM-P1	-5584,01	4,3
GIBIM-P2	-6078,55	4,6
GIBIM-P2G17I	-11985,60	9,2
GIBIM-P2G17L	-3162,54	2,4
GIBIM-P2G13N	-5916,88	4,5
GIBIM-P3	-130804,00	100,0
GIBIM-P3A3G	-85721,20	65,5
GIBIM-P3T5S	-5493,67	4,2
GIBIM-P3A6K	-8515,40	6,5
GIBIM-P4	-5253,31	4,0
GIBIM-P4A1I	-4241,47	3,2
GIBIM-P4A1V	-82558,70	63,1
GIBIM-P4N2F	-40880,20	31,3
GIBIM-P5	-85015,50	65,0
GIBIM-P5T2K	-34259,10	26,2
GIBIM-P5S9K	-23084,00	17,6
GIBIM-P5F8W	-19221,30	14,7
GIBIM-P6	-44706,50	34,2

forma dependiente de la dosis de la concentración (Tabla 3). En general, al menos 11 de los 18 péptidos evaluados mostraron ser activos frente a las cepas patógenas en una concentración igual o inferior a 100 μM . En todos los ensayos de actividad antibacteriana se usó la ofloxacina como control positivo, ya que es un antibiótico de amplio espectro contra bacterias Gram positivas y negativas.

El péptido con mayor actividad antibacteriana frente a las cepas evaluadas fue el GIBIM-P6, con una CMI_{99} de 5,0 μM frente a *E. coli* O157: H7, y de 10 μM contra SARM y *P. aeruginosa*. En segundo lugar, los tres péptidos antimicrobianos GIBIM-P4, GIBIM-P3 y GIBIM-P5 presentaron una CMI_{99} de 50 μM frente a *E. coli* O157:H7, de 25 μM frente a SARM y de 10 μM frente a *P. aeruginosa*. No obstante, los análogos de péptidos antimicrobianos incrementaron su actividad antibacteriana. Por ejemplo, los péptidos antimicrobianos análogos GIBIM-P5F8W y GIBIM-P5S9K exhibieron, respectivamente, una CMI_{99} de 5,0 y de 25 μM frente a *S. aureus*; de 50 y 100 μM frente a *E. coli* O157: H7 y, más interesante aún, de 10 μM frente a *P. aeruginosa*. Estos análogos se diseñaron a partir de la sustitución de un aminoácido de la secuencia del péptido GIBIM-P5, con lo cual se logró aumentar su carácter hidrófobo (cambiando F por W) y su carga (cambiando S por K). Por el contrario, algunas modificaciones fueron desfavorables y disminuyeron la actividad de los análogos con respecto al péptido de referencia, lo cual indica que las sustituciones en la región

C-terminal no producen efecto sobre el carácter hidrófobo y, por lo tanto, no afectan la actividad antimicrobiana. Sin embargo, otros estudios han demostrado que este tipo de sustituciones pueden afectar la estabilidad del péptido antimicrobiano (Berthold, *et al.*, 2013).

Por otro lado, la actividad de los péptidos antimicrobianos GIBIM-P1, GIBIM-P3 y GIBIM-P4 presentaron importantes valores de CMI_{99} de 50 μM y 25 μM frente a *E. coli* O157:H7 y SARM, respectivamente. Cabe resaltar que todos los péptidos antimicrobianos diseñados y sintetizados se encontraban en forma de amidas en la región C-terminal, con el fin de neutralizar la carga negativa creada por el grupo carboxílico C-terminal. Esta modificación se añade para evitar la degradación enzimática, favorecer la imitación de proteínas nativas y, en algunos casos, evitar la unión del extremo C-terminal de los péptidos con iones de hidrógeno u otros grupos reactivos que podrían ocasionar interferencia en los ensayos (Kim, *et al.*, 2011).

Los péptidos antimicrobianos son moléculas muy específicas, por este motivo pueden interactuar de forma diferente con las bacterias patógenas y afectar su actividad. Así, si se compara la actividad de los péptidos antimicrobianos (Tabla 4) frente a las dos cepas Gram negativas *P. aeruginosa* y *E. coli* O157:H7, es posible observar que presentan un mayor efecto sobre esta última cepa. En la Tabla 3 se observa una CMI_{99} de 10 μM frente a *E. coli* O157:H7 cuando se cultiva en presencia del péptido control (es decir, en ausencia de sales), en tanto que en presencia de Mg^{+2} , la CMI_{99} aumenta a 12,5 μM . Este efecto podría deberse a que la permeabilidad de membrana externa de esta bacteria es extremadamente escasa, haciendo que las bombas de eflujo constituyan un mecanismo de defensa contra estas moléculas (Andersson, *et al.*, 2016).

Los péptidos antimicrobianos GIBIM-P1, GIBIM-P3 y GIBIM-P5S9K presentaron una elevada actividad antibacteriana contra SARM, alcanzando valores comparables a los de otros péptidos cíclicos anfífilicos y sus análogos, los cuales han sido diseñados contra patógenos multirresistentes, como es el caso del péptido cíclico [R4W4], el péptido antimicrobiano más potente contra SARM descrito hasta la fecha, con una CMI_{99} de 2,67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Oh, *et al.*, 2014). Asimismo, se demostró el potencial de la estrategia propuesta para diseñar y optimizar péptidos: el GIBIM-P5S9K aumentó diez veces la actividad antimicrobiana comparado con el péptido original GIBIM-P5 contra *E. coli* y cuatro veces contra SARM, y fue más eficiente que el GIBIM-P5T2K frente a estas bacterias. Las modificaciones en el GIBIM-P5T2K y el GIBIM-P5S9K se hicieron en la cara hidrófoba de la hélice alfa. En ambos casos el reemplazo fue similar: Thr y Ser se cambiaron por Lys.

Los resultados sugieren que el aumento de la actividad antimicrobiana no se debe exclusivamente al aumento de la carga positiva global del péptido, sino a la distribución de cargas positivas a lo largo de su estructura. De hecho, el GIBIM-P3A6K (con la carga neta positiva más alta, +6)

Tabla 3. Actividad antibacteriana de los péptidos GIBIM-P1 a GIBIM-P6 y análogos

Péptido	Secuencia	<i>E. coli</i> O157:H7 (µM)		SARM (µM)		<i>P. aeruginosa</i> (µM)		Hemólisis (µM)	Toxicidad en macrófagos peritoneales (µM)
		^a CMI ₉₉	^b CMB	CMI ₉₉	CMB	CMI ₉₉	CMB	^c HC ₅₀	^d EC ₅₀
GIBIM-P1	QVKGAKLWLSLMKWGGI-NH ₂	50	>100	25	>100	>100	>100	> 50	10,0
GIBIM-P2	GFLGKGLFSVVKGVKLG-NH ₂	100	>100	75	>100	>100	>100	> 50	-----
GIBIM-P2G17I	GFLGKGLFSVVKGVKLI-NH ₂	50	>100	75	>100	>100	>100	> 50	-----
GIBIM-P2G17L	GFLGKGLFSVVKGVKL-NH ₂	>100	>100	50	100	>100	>100	> 50	4,0
GIBIM-P2G13N	GFLGKGLFSVVKNVKLG-NH ₂	100	>100	100	>100	100	>100	> 50	8,0
GIBIM-P3	NVAATARGWLKKGKRI-NH ₂	50	100	25	75	>100	>100	> 50	>25
GIBIM-P3A3G	NVGAATARGWLKKGKRI-NH ₂	75	>100	100	>100	50	>100	> 50	-----
GIBIM-P3T5S	NVAASARGWLKKGKRI-NH ₂	100	>100	75	>100	75	>100	> 50	-----
GIBIM-P3A6K	NVAATKRGWLKKGKRI-NH ₂	75	100	>100	>100	100	>100	> 50	-----
GIBIM-P4	ANVAATARGWLKKGK-NH ₂	50	75	50	75	100	>100	> 50	-----
GIBIM-P4A1I	INVAATARGWLKKGK-NH ₂	>100	>100	50	100	25	>100	> 50	-----
GIBIM-P4A1V	VNVAATARGWLKKGK-NH ₂	50	>100	75	>100	25	>100	> 50	-----
GIBIM-P4N2F	AFVAATARGWLKKGK-NH ₂	75	>100	100	>100	50	>100	> 50	-----
GIBIM-P5	ATKKCGLFSILKGVGKI-NH ₂	100	>100	100	>100	10	>100	> 50	-----
GIBIM-P5T2K	AKKKCGLFSILKGVGKI-NH ₂	50	>100	75	100	25	>100	> 50	-----
GIBIM-P5S9K	ATKKCGLFKILKGVGKI-NH ₂	10	50	25	75	10	>100	> 50	4,0
GIBIM-P5F8W	ATKKCGLWSILKGVGKI-NH ₂	0,5	10	5,0	50	10	75	> 50	2,5
GIBIM-P6	NVAATARGWLKKGK-NH ₂	5,0	25	10	25	10	>100	> 50	13,0
Ofloxacina		8,8	>8,8	3,6	>5,5	2,8	5,5	-----	-----

Los datos que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

^aConcentración Mínima Inhibitoria; ^bConcentración Mínima Bactericida; ^cHC₅₀ Concentración hemolítica al 50%; ^dEC₅₀ concentración efectiva al 50%

Tabla 4. Actividad antibacteriana de los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W en presencia de NaCl 150 mM, KCl 4.5 mM y MgCl₂ 1 mM, respectivamente, expresada en CMI₉₉ (µM)

Péptidos	<i>E. coli</i> O157:H7				SARM				<i>P. aeruginosa</i>			
	Control	Na ⁺¹	K ⁺¹	Mg ⁺²	Control	Na ⁺¹	K ⁺¹	Mg ⁺²	Control	Na ⁺¹	K ⁺¹	Mg ⁺²
GIBIM-P5S9K	10	10	10	12,5	25	25	25	25	10	10	10	10
GIBIM-P5F8W	0,5	0,5	0,5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	10	10	10	10

no aumentó su actividad en comparación con el GIBIM-P3, a pesar de que el efecto electrostático entre el péptido y la membrana bacteriana es impulsado por las interacciones iónicas entre los grupos catiónicos del péptido y la cabeza aniónica de los fosfolípidos, como ya se ha evidenciado (Shai, *et al.*, 2002). Esto es muy importante si se tiene en cuenta que tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas desarrollan diferentes estrategias para

generar resistencia a los péptidos antimicrobianos, aunque las estructuras celulares de su envoltura son distintas (Joo, *et al.*, 2016).

Los péptidos antimicrobianos GIBIM-P1, GIBIM-P3 y GIBIM-P4N2F presentaron menor actividad que otros péptidos de composición similar (Zhu, *et al.*, 2014), probablemente porque la ubicación de los residuos de Trp en la secuencia no permite la interacción π-catión, con una

estabilización concomitante de los anillos indoles aromáticos y una mayor actividad antibacteriana (Eband, *et al.*, 1999; Schibli, *et al.*, 2002; Chan, *et al.*, 2006). En el caso del GIBIM-P5F8W, su porcentaje de homología es del 92 % en 11 aminoácidos con el péptido antimicrobiano anfíbio escuelentin (Tennessen & Blouin, 2010). Este péptido potenció su actividad 220 veces comparado con el péptido inicial GIBIM-P5 frente a *E. coli* O157:H7 (MIC₉₉=0.5 µM) y SARM (MIC₉₉=5.0 µM), respectivamente.

La sustitución del aminoácido de Trp en una de las regiones hidrófobas tiene un papel importante en el aumento de la actividad antimicrobiana y ha sido estudiada por otros autores (Chen, *et al.*, 2005; Lee, *et al.*, 2013). Este resultado indica la importancia especial del aminoácido de Trp en la región media de la secuencia peptídica, y demuestra que este residuo no solo se divide más favorablemente en la interfase de membrana, sino que también es más hidrófobo y tiene una mayor afinidad por fases hidrofóbicas voluminosas que otros residuos aromáticos (Zhu, *et al.*, 2014). Otro péptido antimicrobiano muy activo fue el GIBIM-P6, el cual exhibió actividad frente a *E. coli* O15.H7, con una MIC₉₉ de 5,0 µM. Asimismo, frente a SARM y *P. aeruginosa* registró una MIC₉₉ de 10,0 µM. Sin embargo, este compuesto se oxida fácilmente a temperatura ambiente y su manipulación a nivel experimental fue muy complicada.

En este contexto, al combinar un método que utiliza un modelo computacional para correlacionar las propiedades fisicoquímicas de un péptido y un diseño racional que identifica los aminoácidos conservados, se obtuvieron seis péptidos con la mejor actividad antimicrobiana, es decir, cuatro péptidos diseñados (GIBIM-P3, GIBIM-P4, GIBIM-P5 y GIBIM-P6) y dos péptidos análogos (GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W), siendo estos dos últimos muy eficaces y adecuados como candidatos a ser agentes antimicrobianos. Sin embargo, algunos de los nuevos péptidos producidos en este estudio tienen actividad antibacteriana comparable o superior a péptidos como el cecropin B, el cecropin P1 y el hepcidin (Sengupta, *et al.*, 2008; Vila-Farrés, *et al.*, 2012).

Además, el GIBIM-P5S9K registró un 92 % de homología en diez aminoácidos con el péptido antimicrobiano anfíbio esculentina. Esto significa que, de alguna manera, el algoritmo puede imitar la evolución natural en algunos péptidos antimicrobianos.

Por otra parte, uno de los múltiples obstáculos para el uso de péptidos antimicrobianos en la clínica es la disminución de la actividad antimicrobiana en presencia de sales fisiológicas, debido a que los cationes compiten por los sitios de unión a la membrana bacteriana con carga negativa (Zhu, *et al.*, 2014; Kandasamy & Larson, 2006). Por lo tanto, se determinó el efecto de algunas sales en concentraciones fisiológicas en la actividad antimicrobiana de los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W. Como se observa en la Tabla 3, los péptidos presentaron el mismo efecto antibacteriano independientemente de la sal utilizada. Sin embargo, los péptidos GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W disminuyeron su actividad frente a la cepa bacteriana de *E. coli* O157:H7 en presencia de la sal con mayor carga catiónica (MgCl₂, mM). En estudios previos (Kandasamy & Larson, 2006) se ha evidenciado que la unión de péptido y lípido es más fuerte con concentraciones más bajas de sal. Los péptidos alteran los lípidos, pero este efecto disminuye a medida que aumenta la concentración de sal. Además, es probable que los residuos catiónicos de los péptidos compitan con los cationes monovalentes y divalentes de las sales en los mismos sitios de unión de la región de la cabeza hidrofóbica del lípido y por ello disminuyan su actividad.

Toxicidad *in vitro* de los péptidos activos. Para ser útiles en la aplicación terapéutica, los péptidos antimicrobianos deben ser selectivos frente a las células procariontas, por tal razón, se evaluó la actividad hemolítica y la toxicidad en líneas celulares. Los resultados de la hemólisis indicaron que ninguno de estos péptidos presentó una actividad hemolítica superior al 40 % con una concentración de los péptidos de 50 µM (Figura 3), pues para ser hemolíticos debían producir una hemólisis mayor al 50 % con concentraciones de 25 µM con respecto al control (Fernandez-Reyes, *et al.*, 2010).

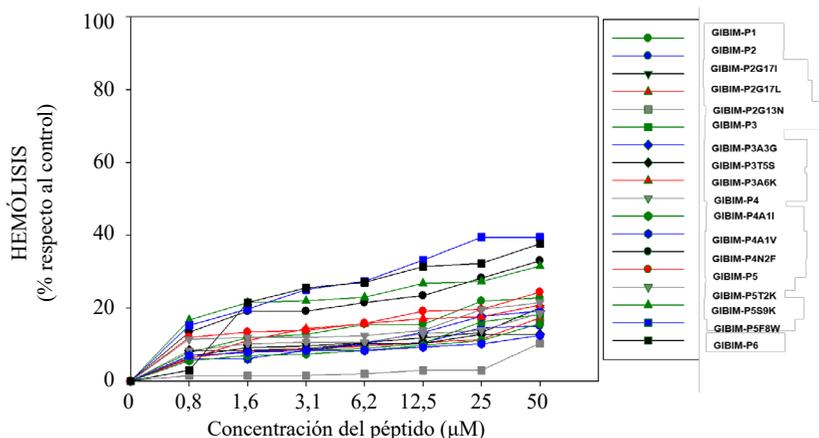


Figura 3. Actividad hemolítica de los PAMs diseñados y sus análogos frente a eritrocitos de carnero. Se utilizaron concentraciones del péptido comprendidas entre 5 y 100 µM, usando como control positivo una suspensión que contenía los eritrocitos y Tritón X-100 al 1%(v/v).

Por otro lado, se evaluó el efecto citotóxico de los péptidos antimicrobianos en la línea celular A549 de tejido pulmonar, la cual se incubó en presencia de diferentes concentraciones de los péptidos con mayor actividad antibacteriana (Figura 4A). Estos péptidos no registraron ninguna citotoxicidad detectable, incluso en una concentración de 100 μM , con excepción del péptido GIBIM-P5F8W, el cual presentó un porcentaje de células viables por debajo del 50 % (36,8 %) con 100 μM (lo que es 200 a 10 veces mayor que la CMI de las cepas evaluadas). Además, la viabilidad de esta línea celular incubada con el péptido GIBIM-P5S9K a 100 μM (que es cuatro veces mayor que la CMI), fue del 50 % en comparación con las células no tratadas. Los péptidos se consideran citotóxicos cuando, a

una concentración cuatro veces por encima de la MIC presentan un porcentaje de células viables menor al 50 % (Nakhjavani, *et al.*, 2014).

Además, en la evaluación de la citotoxicidad de los péptidos antimicrobianos más activos frente a las células HepG2 de carcinoma humano, se observó que los péptidos GIBIM-P3 y GIBIM-P4 promovieron el crecimiento celular en algunas de las concentraciones evaluadas (Figura 4B). Estos resultados son similares a los obtenidos por Yang, *et al.* (2017), en los cuales el péptido GRP (VPLPAGGGTVLTKMYPRGNHWAVGHLM-NH₂) sirvió como un mitógeno para las células HepG2, dando lugar a una mejor proliferación, una reducción de la apoptosis y la aceleración de la progresión del ciclo celular. Por su parte, los péptidos GIBIM-P5, GIBIM-P5S9K, GIBIM-P5F8W y GIBIM-P6 presentaron un porcentaje de viabilidad celular de 94,5, 90,7, 88,6 y 72,3 %, respectivamente. Los ensayos citotóxicos *in vitro* demostraron que los péptidos evaluados no presentaron efectos sobre la viabilidad de los eritrocitos y las líneas celulares A549 y HepG2.

Los resultados obtenidos sugieren que los péptidos más activos, GIBIM-P5S9K y GIBIM-P5F8W, pueden servir como agentes terapéuticos frente a infecciones causadas por *E. coli* O157:H7, SARM y *P. aeruginosa*, ya que presentan una elevada actividad antimicrobiana y un bajo efecto citotóxico.

Conclusiones

En el presente estudio se demostró que es posible diseñar y sintetizar péptidos con secuencias cortas (17 Aa) y con actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos utilizando el análisis bioinformático racional. Asimismo, mediante técnicas de diseño racional es posible mejorar las propiedades bioquímicas de los péptidos, incrementar su actividad antibacteriana y mitigar su toxicidad. Por ejemplo, el aumento de las cargas positivas de los péptidos, así como el aumento de su naturaleza hidrófoba, incidieron positivamente en la actividad antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y SARM. La actividad antibacteriana de los péptidos antimicrobianos sintetizados frente a *E. coli* fue mayor que la actividad antibacteriana frente a SARM y *P. aeruginosa*. Las CMI contra *E. coli* fueron de 0,5 μM , 5,0 y 10 μM con los péptidos GIBIM-P5F8W, GIBIM-P6 y GIBIM-P5S9K, respectivamente, siendo valores menores a los publicados en los artículos consultados. La toxicidad de los péptidos en los eritrocitos produjo un porcentaje de hemólisis menor al 40 % a 50 μM , y en las líneas celulares A549 y HepG2 el único compuesto que presentó toxicidad fue el GIBIM-P5F8W, el cual dejó un 36 % de células viables con 100 μM en la línea A549. Además, los péptidos de GIBIM-P3 y GIBIM-P4 indujeron el crecimiento de las células HepG2 en ciertas concentraciones. Por último, se encontró que los péptidos antimicrobianos más potentes frente a las bacterias patógenas fueron el GIBIM-P5S9K y el GIBIM-P5F8W. Estos adoptan una estructura helicoidal alfa

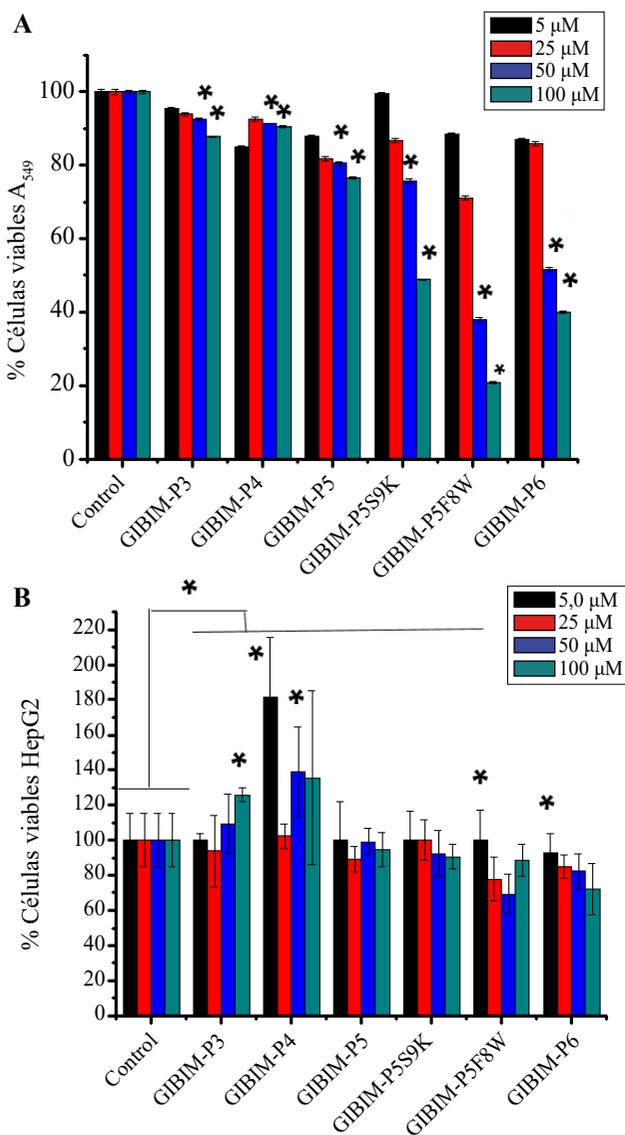


Figura 4. Citotoxicidad de los péptidos más activos en líneas celulares. A) Línea celular A₅₄₉ y B) línea celular HepG2. Los datos que se muestran resultan del promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *P<0.05.

en ambientes diseñados para imitar membranas celulares y son capaces de permear la membrana de bacterias patógenas de una manera dependiente de la dosis. Además, pueden considerarse como compuestos selectivos debido a su baja toxicidad en las células eucariotas.

Agradecimientos

La autora desea agradecer a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander, por su apoyo a través del proyecto de financiación interna 1823, y a Colciencias por el apoyo brindado a través del contrato 110265740828. Agradece, asimismo, la colaboración de la Dra. Jenniffer Cruz Laiton, el Dr. Rodrigo Torres, el biólogo Nicolás Gómez, MSc, y la Dra. Fanny Guzmán.

Conflicto de intereses

La autora declara no tener ningún conflicto de intereses con respecto a los resultados de la investigación aquí publicados.

Referencias

- Abercrombie, J. J., Leung, K. P., Chai, H., Hicks, R. P.** (2015). Bioorganic & Medicinal Chemistry Spectral and biological evaluation of a synthetic antimicrobial peptide derived from 1-aminocyclohexane carboxylic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **23** (6):1341-1347.
- Aguilar, M.** (2004). HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols, Human press. Totowa, New Jersey, United States p. 251.
- Andersson, D. I., Hughes, D., Kubicek-Sutherland, J. Z.** (2016). Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist. Updat.* **26**: 43-57.
- Aoki W & Ueda M.** (2013). Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. *Pharmaceuticals*. **6**: 1055-1081.
- Babu, V. V. S. & Gopi, H. N.** (1998). Rapid and efficient synthesis of peptide fragments containing α -Aminoisobutyric acid using Fmoc-amino acid chlorides / potassium salt of 1-Hydroxybenzotriazole. **39**: 1049-050.
- Bakshi, K., Liyanage, M., Volkin, D., Middaugh, C.** (2014). Circular dichroism of peptides, *Methods Mol. Biol.* **1088**: 247-253.
- Berthold, N., Czihal, P., Fritsche, S., Sauer, U., Schiffer, G., Knappe, D., Alber, G., Hoffmann, R.** (2013). Novel apidaecin 1b analogs with superior serum stabilities for treatment of infections by Gram-negative pathogens, *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 402-409.
- Broekman, D. C., Frei, D. M., Gylfason, G. A., Steinarsson, A., Jörnvall, H., Agerberth, B., Maier, V. H.** (2011). Cod cathelicidin: Isolation of the mature peptide, cleavage site characterisation and developmental expression. *Developmental and Comparative Immunology*. **35** (3): 296-303.
- Brogan, D. M. & Mossialos, E.** (2016). A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility, *Global Health*. **12**: 1-7.
- Chan, D. I., Prenner, E. J., Vogel, H. J.** (2006). Tryptophan and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**: 1184-1202.
- Chaudhary, A. S.** (2016). A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotic's discovery, *Acta Pharm. Sin. B.* **6**: 552-556.
- Chen, Y., Mant, C. T., Farmer, S. W., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., Hodges, R.S.** (2005). Rational Design of alpha-Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index, *J Biol.Chem.* **280**: 12316-12329.
- Conlon, J. M., Mechkarska, M., Coquet, L., Jouenne, T., Leprince, J., Vaudry, H., King, J. D.** (2011). Peptides characterization of antimicrobial peptides in skin secretions from discrete populations of *Lithobates chiricahuensis* (Ranidae) from central and southern Arizona. *Peptides*. **32** (4): 664-669.
- Cruz, J., Ortiz, C., Guzmán, F., Fernández-Lafuente, R., Torres, R.** (2014). Antimicrobial peptides: Promising compounds against pathogenic microorganisms. *Curr Med Chem.* **21** (20): 2299-321.
- Cruz, J., Flórez, J., Torres, R., Urquiza, M., Gutiérrez, J. A., Guzmán, F., Ortiz, C.** (2017). Antimicrobial activity of a new synthetic peptide loaded in polylactic acid or Poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanotechnology*. **28** (13): 5102.
- Cruz J, Rondón-Villareal P, Torres R., Urquiza M., Álvarez C., Abengózar MA., Sierra D., Rivas L., Fernández-Lafuente R., Ortiz C.** (2018) Design of bactericidal peptides against *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Medicinal Chemistry*. **14**: 1-12.
- Danial, M.; van Dulmen, T.H.; Aleksandrowicz, J.; Pötgens, A.J.; Klok, H.A.** (2012). Site-specific PEGylation of HR2 peptides: Effects of PEG conjugation position and chain length on HIV-1 membrane fusion inhibition and proteolytic degradation. *Bioconj. Chem.* **23**: 1648-1660.
- Epanand, R. M. & Vogel, H. J.** (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**: 11-28.
- Fernández-Reyes, M., Díaz, D., de la Torre, B. G., Cabrales-Rico, A., Vallès- Miret, M., Jiménez-Barbero, J., Andreu, D., Rivas, L.** (2010). Lysine N^ε-Trimethylation, a Tool for Improving, *J. Med. Chem.* **53**: 5587-5596.
- Houston, M. E., Jr., Kondejewski, L.H., Karunaratne, D.N., Gough, M., Fidai, S., Hodges, R.S., Hancock, R.E.** (1998). Influence of preformed alpha-helix and alpha-helix induction on the activity of cationic antimicrobial peptides. *J. Pept. Res.* **52**: 81-88.
- Il'ina, A.P., Kulikova, O. G., Maltsev, D. I., Krasnov, M. S., Rybakova, E., Skripnikova, V. S., Kuznetsova, E. S., Buryak, A. K., Yamskova, V. P., Yamskov, A.** (2011). MALDI-TOF mass spectrometric identification of novel intercellular space peptides, *Appl. Biochem. Microbiol.* **47**: 118-122.
- Jaradat, D.M.M.** (2018) Thirteen decades of peptide synthesis: Key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. *Amino Acids*. **50** (1): 39-68. Doi: 10.1007/s00726-017-2516-0
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E.W.** (2006). Peptide antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 491-511.

- Jofré, C., Guzmán, F., Cárdenas, C., Albericio, F., Marshall, S.H.** (2011) A natural peptide and its variants derived from the processing of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) displaying enhanced antimicrobial activity: A novel alternative for the control of bacterial diseases. *Peptides*. **32**: 852-858.
- Joo, H.S., Fu, C.I., Otto, M.** (2016) Bacterial Strategies of Resistance to Antimicrobial Peptides, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **371**: 20150292.
- Kandasamy, S. K. & Larson, R. G.** (2006). Effect of salt on the interactions of antimicrobial peptides with zwitterionic lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr*. **1758**: 1274-1284.
- Kim, J. Y., Park, S. C., Yoon, M. Y., Hahm, K. S., Park, Y.** (2011). C-terminal amidation of PMAP-23: Translocation to the inner membrane of Gram-negative bacteria, *Amino Acids*. **40**: 183-195.
- Kim, J.S., Joeng, J. H., Kim, Y.** (2017) Design, Characterization, and Antimicrobial Activity of a Novel Antimicrobial Peptide Derived from Bovine Lactophorin. *J Microbiol Biotechnol*. **27**: 759-767.
- Kumar P., Kizhakkedathu J.N., Straus S.** (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility *In Vivo*. *Biomacromolecules*. **8** (1): 4.
- Lee, S.H., Kim, S.J., Lee, Y.S., Song, M.D., Kim, I.H., Won, H.S.** (2011). De novo generation of short antimicrobial peptides with simple amino acid composition. *Regul. Pept*. **166**: 36-41.
- Lee, J.K., Park, S.C., Hahm, K.S., Park, Y.** (2013). Antimicrobial HPA3NT3 peptide analogs: Placement of aromatic rings and positive charges are key determinants for cell selectivity and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta*. **1828**: 443-54.
- Li, B., Webster, T. J.** (2018). Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections. *J Orthopaedic Res*. **36** (1): 22-32. doi:10.1002/jor.23656
- Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z.** (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. **37** (2): 207-15. Doi: 10.1016/j.peptides.2012.07.001
- Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., Beuerman, R. W.** (2017). Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Frontiers in Neuroscience*. **11**: 73. Doi: 10.3389/fnins.2017.00073
- Lohner, K.** (2001). The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In: *Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies*, Lohner, K. (Editor). Horizon Scientific Press: Wymondham, Norfolk, p. 149-165.
- Lozano, D., Díaz, L., Echeverry, M., Pineda, S., Máttar, S.** (2010). *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (SARM) positivos para PVL aislados en individuos sanos de Montería-Córdoba, *Universitas Scientiarum*. **1352**: 159-165.
- Malik, E., Dennison, S. R., Harris, F., Phoenix, D. A.** (2016). pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. **9** (4): 67. doi:10.3390/ph9040067
- Mathur, P. & Singh, S.** (2013). Multidrug resistance in bacteria: A serious patient safety challenge for India. *Journal of Laboratory Physicians*. **5** (1): 5-10.
- Merlino, F., Carotenuto, A., Casciaro, B., Martora, F., Loffredo, M. R., Di Grazia, A., Yousef, A. M., Brancaccio, D., Palomba, L., Novellino, E., Galdiero, M., Iovene, M.R., Mangoni, M.L., Grieco, P.** (2017). Glycine-replaced derivatives of [Pro 3 ,DLeu 9]TL, a temporin L analogue: Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and hemolytic activities, *Eur. J. Med. Chem*. **139**: 750-761.
- Nakhjavani, M., Zarghi, A., H Shirazi, F.** (2014). Cytotoxicity of selected novel chalcone derivatives on human breast, lung and hepatic carcinoma cell lines, *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*. **13**: 953-958.
- Niederman, M. S.** (2001). Impact of antibiotic resistance on clinical outcomes and the cost of care. *Crit. Care Med*. **29**: N114-20.
- Oh, D., Sun, J., Nasrolahi-Shirazi, A., LaPlante, K.L., Rowley, D.C., Parang, K.** (2014). Antibacterial Activities of Amphiphilic Cyclic Cell-Penetrating Peptides against Multidrug Resistant Pathogens, *Mol. Pharm*. **5**: 161-171.
- Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., Weindl, G.** (2018). Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. *Front Pharmacol*. **9**: 281-304.
- Prada, Y. A., Guzmán, F., Rondón, P., Escobar, P., Ortiz, C., Sierra, A., Torres, R., Mejía-Ospino, E.** (2016). A New Synthetic Peptide with In vitro Antibacterial Potential Against *Escherichia coli* O1 57:H7 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Probiotics & Antimicro. Prot*. **8**: 134-140.
- Reuken, P. A., Torres, D., Baier, M., Löffler, B., Lübbert, C., Lippmann, N., Stallmach, A., Bruns, T.** (2017). Risk Factors for Multi-Drug Resistant Pathogens and Failure of Empiric First-Line Therapy in Acute Cholangitis. *PLoS one*. **12** (1): e0169900. Doi: 10.1371/journal.pone.0169900
- Rozek, A., Powers, J.P., Friedrich, C.L., Hancock, R.E.** (2003). Structure-based design of an indolicidin peptide analog with increased protease stability. *Biochemistry*. **42**: 14130-14138.
- Rydlo, T., Rotem, S., Mor, A.** (2006). Antibacterial properties of der-maseptin S4 derivatives under extreme incubation conditions. *Antimicrob. Agents Chemother*. **50**: 490-497.
- Schibli, D. J., Epand, R. F., Vogel, H. J. Epand, R. M.** (2002). Tryptophan-rich antimicrobial peptides: Comparative properties and membrane interactions. *Biochem. Cell Biol*. **80**: 667-677.
- Sengupta, D., Leontiadou, H., Mark, A.E., Marrink, S. J.** (2008). Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim. Biophys. Acta*. **1778**: 2308-2317.
- Shai, Y.** (2002). Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides, *Biopolymers*. **66**: 236-248.
- Schmidt, C.** (2017) Living in a microbial world. *Nature Biotechnology*. **35** (5): 401-403.
- Strateva, T. & Yordanov, D.** (2009). *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance, *J. Med. Microbiol*. **58**: 1133-1148.
- Tavares, L. S., Rettore, J. V., Freitas, R. M., Porto, W. F., Duque, A. P. Singulani, Jde L, Silva, O. N., Detoni, Mde L, Vasconcelos, E. G., Dias, S. C., Franco, O. L., Santos,**

- M de O.** (2012). Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds. *Peptides*. **37**: 294-300.
- Teixeira, V., Feio, M. J., Bastos, M.** (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* **51**: 149-177.
- Tennessen J. A. & Blouin, M. S.** (2010). A revised leopard frog phylogeny allows a more detailed examination of adaptive evolution at ranatuerin-2 antimicrobial peptide loci. *Immunogenetics*. **62**: 333-343.
- Tossi A, Sandri L, Giangaspero A.** (2000). Amphipathic, a helical antimicrobial peptides activity. *Biopolymers*. **55**: 4-30.
- Trindade, F., Amado, F., Pinto, J., Ferreira, R., Maia, C., Henriques, I., Vitorino, R.** (2014). ScienceDirect Salivary peptidomic as a tool to disclose new potential antimicrobial peptides. *Journal of Proteomics*. **115**: 49-57.
- Tripathi, A. K., Kumari, T., Harioudh, M. K., Yadav, P. K., Kathuria, M., Shukla, P.K., Mitra, K., Ghosh, J. K.** (2017) Identification of GXXXXG motif in Chrysopsin-1 and its implication in the design of analogs with cell-selective antimicrobial and anti-endotoxin activities. *Sci. Rep.* **7**: 3384-3400.
- Uteng, M., Hauge, H.H., Markwick, P.R., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J., Muhle-Goll, C.** (2003). Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an in- sserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry*. **42**: 11417- 11426.
- Vermeer, L.S., Lan, Y., Abbate, V., Ruh, E., Bui, T.T., Wilkinson, L.J., Kanno, T., Jumagulova, E., Kozłowska, J., Patel, J., McIntre, C.A., Yam, W.C., Ciu, G., Atkinson, R.A., Lam, J.K., Bansal, S.S, Drake, A.F., Mitchell, G.H., Mason, A.J.** (2012). Conformational flexibility determines selectivity and antibacterial, antiplasmodial, and anticancer potency of cationic-helical peptides. *J. Biol. Chem.* **287**: 34120-34133.
- Vila-Farrés, X., Giralt, E., Vila, J.** (2012). Update of peptides with antibacterial activity, *Curr. Med. Chem.* **19**: 6188-98.
- World Health Organization – WHO.** (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Fecha de consulta: 23 de marzo de 2019. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Yang, N., Liu, X., Teng, D., Li, Z., Wang, X., Mao, R., Wang, X., Hao, Y., Wang, J.** (2017). Antibacterial and detoxifying activity of NZ17074 analogues with multi-layers of selective antimicrobial actions against *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. *Sci. Rep.* **7**: 3392-3411.
- Yeaman, M. & Yount, N.** (2003) Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* **55**: 27-55.
- Yoon, J. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Kim, K. H., Lee, S. H., Park, Y. K., Chae, B. J.** (2014). Effects of dietary supplementation of synthetic antimicrobial peptide-A3 and P5 on growth performance, apparent total tract digestibility of nutrients, fecal and intestinal microflora and intestinal morphology in weanling pigs. *Livestock Science*. **159**: 53-60.
- Yu, H., Wang, C., Feng, L., Cai, S., Liu, X., Qiao, X., Shi, N., Wang, H., Wang, Y.** (2017). Cathelicidin-trypsin inhibitor loop conjugate represents a promising antibiotic candidate with protease stability. *Sci. Rep.* **7**: 2600-2617.
- Zhu, X., Dong, N., Wang, Z., Ma, Z., Zhang, L., Ma, Q., Shan, A.** (2014). Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. *Acta Biomater.* **10**: 244-257.