

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS: ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y APLICACIONES

ANTIMICROBIAL PEPTIDES: STRUCTURE, FUNCTION AND APPLICATIONS

Pablo Gutiérrez^{1,2} y Sergio Orduz¹

Resumen

Los péptidos antimicrobianos recientemente descubiertos corresponden a una primera línea de defensa contra los patógenos. Se han descrito provenientes de bacterias, insectos, plantas y vertebrados, y se conocen varios grupos de péptidos antimicrobianos dependiendo de su estructura: alfa-helicoidales, de estructura extendida y de composición irregular, para los que se han propuesto varios modelos de interacción con las membranas de las bacterias, pero, en general, los péptidos causan poros líticos. En la mayoría de los casos estos péptidos son sintetizados ribosomalmente, algunos como preproteínas. Se ha propuesto una serie de aplicaciones para el control de infecciones bacterias, especialmente aquellas localizadas en la piel o en las mucosas. Se han desarrollado plantas transgénicas que expresan péptidos antimicrobianos y se ha logrado reducir la incidencia de enfermedades.

Palabras clave: péptidos, antimicrobiano, alfa hélice, antibiótico.

Abstract

Antimicrobial peptides recently discovered belong to the first line of defense against invading pathogens. They have been described from bacteria, insects, plants and vertebrates, and are classified in several groups depending on their structure, alpha-helicoidal, extended structure, and of irregular composition. Several mechanism of action have been proposed to explain the interaction with bacterial membranes, but in general, they cause lytic pores. In most of the cases, these peptides are ribosomally synthesized, some of them as pre-proteins. Several applications have been proposed to control bacterial infections, especially skin infections or in the mucosal areas. Transgenic plants have been also developed, and it has been possible to reduce disease incidence.

Key words: peptides, antimicrobial, alpha helix, antibiotic.

INTRODUCCIÓN

La primera generación de antibióticos nació en 1920 con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, lo que estimuló la búsqueda y desarrollo de la mayoría de los antibióticos tradicionales. El primer uso en gran escala de estos compuestos se dio durante la Segunda Guerra Mundial cuando se utilizaron grandes cantidades de penicilina para controlar infecciones bacterianas en los soldados heridos. Infortunadamente, en la actualidad el uso irracional de los antibióticos ha generado una nueva crisis de salud públi-

ca debido a la aparición de cepas resistentes a algunos de los antibióticos considerados como de mayor efectividad, siendo uno de los ejemplos más conocidos el de la aparición de variantes de *Staphylococcus aureus* resistentes a la vancomicina. Esta situación de resistencia a los antibióticos ha dado lugar a una justificada alarma y generado gran interés en el estudio y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (Hancock, 1999; Hancock, 2000).

Recibido: febrero de 2003; aprobado para publicación: marzo de 2003.

¹Unidad de Biotecnología y Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), apartado 7378, Medellín, Colombia. E-mail: sorduz@cib.org.co.

²Dirección actual: McGill University, Department of Biochemistry, McIntyre Medical Science Building, 3655 Promenade Sir William Osler, Montréal, Québec H3G 1Y6, Canadá.

A pesar de que algunos péptidos antimicrobianos habían sido descritos previamente, sólo empezaron a ser tomados en serio desde 1987, cuando Michael Zasloff, del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Pensilvania, observó mientras trabajaba con oocitos de la rana *Xenopus laevis* que sus tejidos raramente sufrían infecciones, a pesar de las cirugías realizadas. Esto lo llevó a la identificación del compuesto activo producido por la rana, un péptido de 23 aminoácidos que llamó maganina (Zasloff, 1987). Nuevas pruebas permitieron determinar que este compuesto era activo contra una amplia variedad de bacterias actuando de manera específica y con rangos de actividad sorprendentes; se desencadenó así un gran interés en el estudio y actividad de péptidos similares en otros organismos.

Los péptidos antimicrobianos se encuentran en todos los organismos vivos incluyendo insectos, bacterias, vertebrados y plantas, donde son componentes integrales del sistema inmune (Zasloff, 2002). Estos péptidos poseen, además, toxicidad selectiva que permite atacar de manera específica las células blanco mediante mecanismos que, al parecer, dificultan la aparición de fenómenos de resistencia (Van 't Hof *et al.*, 2001). En esta revisión pretendemos dar una mirada global sobre el conocimiento actual de estos novedosos agentes microbicidas, incluyendo detalles sobre su estructura, función, mecanismos de expresión y su uso potencial como agentes terapéuticos.

PROPIEDADES ESTRUCTURALES

Los péptidos antimicrobianos conforman un grupo heterogéneo de moléculas de difícil clasificación (tabla 1); sin embargo, existen tres características principales que los distinguen: su tamaño está entre 12 y 50 aminoácidos, la gran mayoría posee carga neta positiva y generalmente son capaces de adoptar estructuras anfipáticas cuando se encuentran en solución en un medio no polar. A pesar de presentar una gran variabilidad estructural se les puede agrupar en cuatro categorías:

Péptidos alfa-helicoidales. Son los más conocidos y estudiados. Su estructura es casi exclusivamente helicoidal. En solución se encuentran en

estado desnaturalizado y necesitan una superficie no polar para estabilizar su estructura terciaria. El análisis de la estructura primaria mediante modelos helicoidales revela la presencia de altos momentos hidrofóbicos (figura 1), debido a la distribución de los aminoácidos polares y no polares. Se clasifican aquí los derivados de las cecropinas, maganinas, dermaseptinas y la melitina, entre otros. Este grupo, por su simplicidad, es el que ha recibido mayor atención por su potencial de síntesis industrial y sus aplicaciones comerciales. Aunque la mayoría de ellos están cargados positivamente, se conocen unos cuantos casos de péptidos helicoidales hidrófobos o con carga negativa cuya especificidad es reducida. El péptido negativo mejor estudiado es la alameticilina, que puede formar agregados que atraviesan la bicapa lipídica (Benachir y Lafleur, 1995). La gramicidina A es un péptido helicoidal hidrofóbico que forma una hélice diestra y se puede dimerizar en la membrana para permitir el paso selectivo de cationes (Ketchum *et al.*, 1993). Tanto la alameticilina como la gramicidina son sintetizados por microorganismos mediante mecanismos en los que no intervienen los ribosomas (Kleinkauf y von Dohren, 1990). Debido a su poca selectividad por las membranas bacterianas, su uso como agentes farmacológicos es limitado. Uno de los péptidos catiónicos mejor estudiados es la maganina, que puede formar poros líticos de mayor tamaño respecto a los de la alameticilina, pero que sin embargo no llevan a la lisis total de la membrana (Matsuzaki, 1999; Matsuzaki *et al.*, 1998).

La importancia de la conformación helicoidal ha sido comprobada mediante la incorporación de D-aminoácidos con los que se disminuye drásticamente la actividad antibacteriana (Chen *et al.*, 1988). Sin embargo, en el caso de la pardaxina, la incorporación de D-aminoácidos lo convierten en una estructura beta que retiene la actividad antimicrobiana y con pérdida en la actividad hemolítica, demostrando que la hélice anfipática no siempre es un requisito para la actividad antimicrobiana (Oren *et al.*, 1999).

Péptidos de estructura extendida. Son péptidos que en su mayoría tienen alto contenido de hojas beta (figura 2). Los péptidos extendidos deben

Tabla 1. Características de algunos de los péptidos antimicrobianos más estudiados

Péptido	Tamaño (aminoácidos)	Origen	Espectro de actividad	Características	Sitios de producción
Abaecina	34-39	Abejas	G ⁺ , G ⁻	Alto contenido de prolina	Hemolinfa
Bombinina	20-27	Ranas	G ⁺ , G ⁻	D-aloisoleucina en posición 2	Mucosa de la piel
Bactenecina	12	Vacuno	G ⁺ , G ⁻	Catelicidina, cíclico	Neutrófilos
Cecropinas	22-39	Insectos	G ⁺ , G ⁻	Carga positiva neta entre 2 y 7	Hemocitos, hemolinfa larval, esperma
Clavaninas	23	Tunicados	G ⁺ , G ⁻ , H	Helicoidal	Hemocitos
Defensinas alfa	29-34	Mamíferos	G ⁺ , G ⁻ , H	3 hebras beta	Neutrófilos, células de paneth
Defensinas beta	35-37	Mamíferos	G ⁺ , G ⁻ , H	3 hebras beta	Mucosa epitelial, células de paneth, lengua, traquea
Defensinas de plantas	29-37	Plantas	G ⁺ , G ⁻ , H	2 hebras beta y una hélice alfa	Hojas, semillas
Dermaseptinas	27-34	Ranas	G ⁺ , G ⁻ , H	Helicoidal	Mucosa de la piel
Drosocina	19	Drosophila	G ⁺ , G ⁻	Glicosilado y rico en prolina	Hemolinfa
Estielinas	24	Tunicados	G ⁺ , G ⁻	Helicoidal, rico en fenilalanina	Hemocitos
Histatina	7-38	Humano	G ⁺ , G ⁻ , H	Ricas en histidina	Saliva
Indolicina	13	Vacuno	G ⁺ , G ⁻	Rica en triptófano, estructura extendida	Neutrófilos
Lactoferricina	25	Humano, vacuno	G ⁺ , G ⁻ , H	Derivado de la lactoferrina	Intestino
Lebosina	32	Gusano de seda	G ⁺ , G ⁻	Glicosilado y rico en prolina	Hemolinfa
Maganinas	21-23	Ranas	G ⁺ , G ⁻ , H	Helicoidal	Mucosa de la piel
Melitina	25	Abejas	G ⁺ , G ⁻	Helicoidal	Veneno
MGD-1	38	Mejillones	G ⁺ , G ⁻	Contiene aminoácidos modificados	Plasma
Polifemusinas	18	Cangrejos	G ⁺ , G ⁻ , H	2 hebras beta antiparalelas	Hemocitos
Protegrinas	16, 18	Cerdo	G ⁺ , G ⁻ , H	2 hebras beta antiparalelas	Intestino
Ranalexina	20	Ranas	G ⁺ , G ⁻	Lineal, extremo C terminal positivo	Mucosa de la piel
Sapocina	40	Insectos	G ⁺ , G ⁻	2 hebras beta y una hélice alfa	Hemocitos
Taquilepsinas	17-19	Cangrejos	G ⁺ , G ⁻ , H	2 hebras beta antiparalelas	Hemocitos
Tioninas	45	Plantas	G ⁺ , G ⁻	2 hebras beta antiparalelas	Hojas, semillas

G⁺: bacterias grampositivas; G⁻: bacterias gramnegativas; H: hongos.

curvarse para permitir la formación de una hoja. Esta conformación es muy poco favorable debido a la gran disminución en la entropía al pasar de un péptido completamente desplegado a uno estructurado ya que la compensación entálpica mediante la formación de puentes de hidrógeno es mucho menor que en los péptidos helicoidales. Es por esta razón que en la mayoría de estos pép-

tidos es necesaria la presencia de enlaces adicionales. Generalmente son péptidos de estructura cíclica formada mediante puentes disulfuro como en las defensinas (Lehrer y Ganz, 2002), taquilepsinas (Matsuzaki, 1999), protegrinas (Miyasaki y Lehrer, 1998) y lactoferrinas (Hwang *et al.*, 1998); o mediante la ciclización del esqueleto peptídico como en las gramicidinas

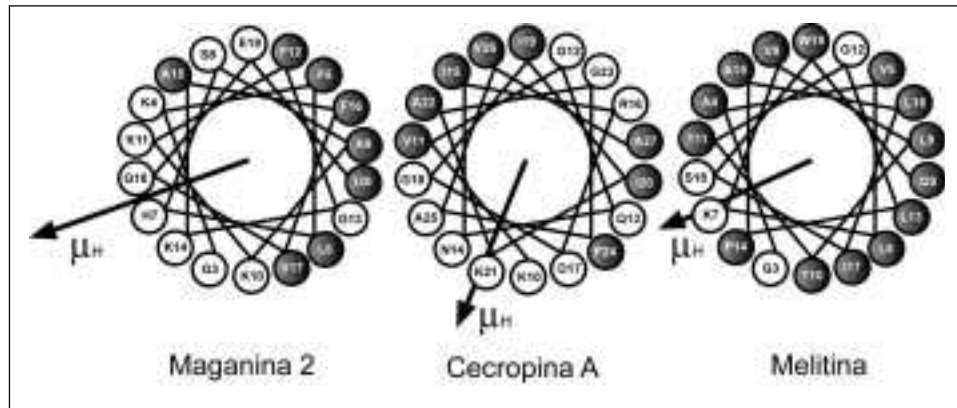


Figura 1. Distribución de aminoácidos en algunos péptidos helicoidales. Los residuos hidrofóbicos aparecen en negro y la flecha representa el vector del momento hidrofóbico, μ_H , calculado con la ecuación de Eisenberg ($|\mu_H| = [\sum_{n=1}^N Hn \cdot \sin(n \cdot 100)]^2 + [\sum_{n=1}^N Hn \cdot \cos(n \cdot 100)]^2$) (Eisenberg, 1984) y usando valores de la solubilidad relativa de los aminoácidos en agua, etanol y dioxano (Levitt, 1976; Nozaki y Tanford, 1971). Las letras representan el tipo de aminoácido: Alanina, A; arginina, R; asparagina, N; aspartato, D; cisteína, C; glutamina, Q; glutamato, E; glicina, G; histidina, H; isoleucina, I; leucina, L; lisina, K; metionina, M; fenilalanina, F; prolina, P; serina, S; treonina, T; triptófano, W; tirosina, Y y valina, V

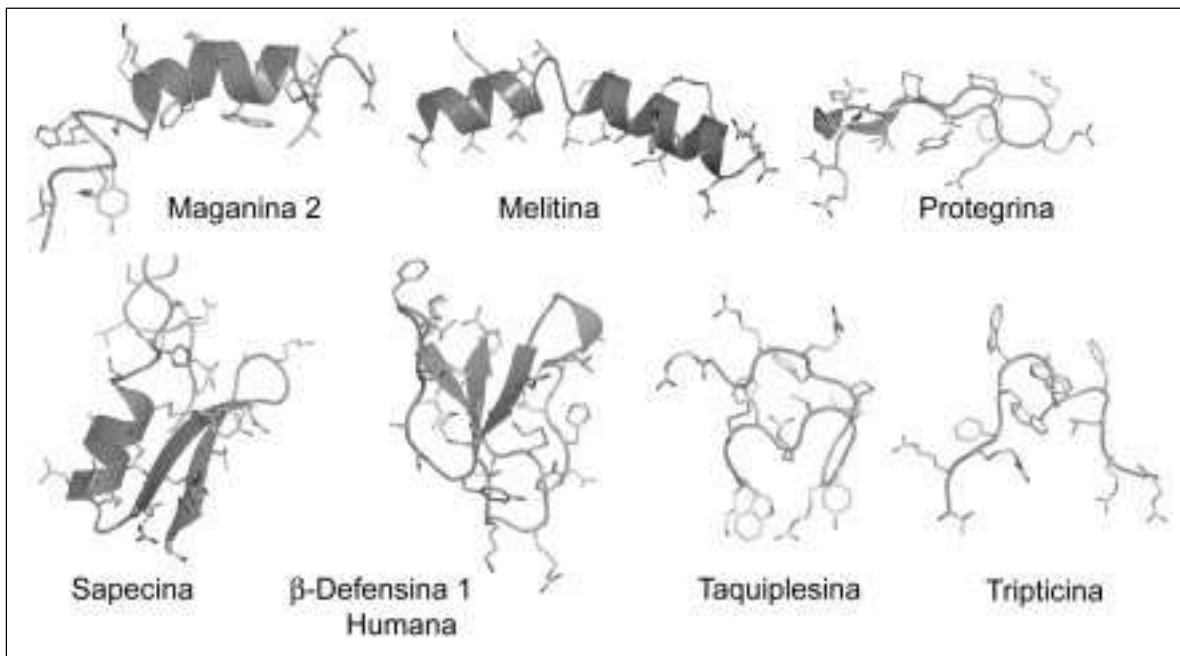


Figura 2. Diversidad estructural de los péptidos antimicrobianos. Maganina 2, melitina, protegrina 1, sapecina, defensina humana, taquipesina 1 y tripticina. Los códigos de Protein Data Bank (PDB) son en su orden: 1DUM, 2MLT, 1PG1, 1L4V, 1KJ5, 1MA5, 1D6X. Las imágenes fueron realizadas con el programa PyMOL (Warren L. DeLano, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>)

(Prenner *et al.*, 1999), polimixina B (Pristovsek y Kidric, 1999) o tirocidinas (Paradies, 1989). Las defensinas son los compuestos más estudiados dentro de este grupo.

Péptidos de composición irregular. Tienen una composición inusual de aminoácidos. Los más comunes poseen alto contenido de histidinas como las histatinas; prolina-arginina, PR-39; pro-

lina-fenilalanina, profenina (Brewer *et al.*, 1998; Tsai y Bobek, 1998; Helmerhorst *et al.*, 1999a) o triptófano como la indolicina y triptisina (Selsted *et al.*, 1992; Lawyer *et al.*, 1996). En este último caso, el enriquecimiento en triptófano parece estar relacionado con la tendencia de este aminoácido a posicionarse en la interfase membrana/agua (Yau *et al.*, 1998). La indolicina es capaz de permeabilizar las membranas sin causar su desintegración gracias a la formación de canales conductores (Subbalakshmi y Sitaram, 1998).

En un cuarto grupo se pueden incluir una serie de péptidos con grupos químicos atípicos en las proteínas, como la presencia de enlaces tioester en los antibióticos (Breukink y de Kruijff, 1999) o los peptaiboles que contienen altas proporciones de α -aminoácido isobutírico, poseen un grupo 1,2 amino alcohol en el extremo C-terminal y generalmente están acilados en el extremo N-terminal para favorecer su partición en membranas (Sansom, 1993). En la figura 2 se muestra la estructura de algunos de los péptidos más comunes.

Mecanismo de acción

Los péptidos antimicrobianos tienen un efecto rápido, del orden de minutos bajo condiciones *in vitro*, y un amplio espectro de actividad que incluye bacterias gramnegativas y grampositivas, hongos, virus encapsulados, parásitos e incluso células cancerosas (Giangaspero *et al.*, 2001; Zasloff, 2002) pero su mecanismo de acción es muy distinto al de los antibióticos tradicionales los cuales actúan como inhibidores específicos de procesos vitales en las células blanco (síntesis de la pared celular, de proteínas y de ácidos nucleicos) o en la inhibición de rutas metabólicas importantes, entre otros. La gran variedad estructural de los péptidos antimicrobianos sugiere que su actividad no está dirigida a blancos celulares concretos como enzimas o receptores, sino más bien a características comunes de las membranas bacterianas. Existe amplia evidencia de que la permeabilización de la membrana inducida por los péptidos es el resultado de su interacción con la matriz lipídica de la membrana celular (Wade *et al.*, 1990; Dathe y Wieprecht, 1999; Epanand y Vogel, 1999). En las bacterias gramnegativas, tan-

to la membrana externa como la interna poseen moléculas aniónicas orientadas hacia el exterior de la célula, mientras que la mayoría de los péptidos son catiónicos. Su interacción con fosfolípidos cargados negativamente explicaría su especificidad por las membranas bacterianas y no por los lípidos zwitteriónicos de la capa extracelular de las células eucarióticas. Respecto a la forma como los péptidos destruyen la membrana, es posible que induzcan lisis completa de la bacteria, o que la perturben de una manera tal que permita la salida de componentes celulares esenciales, a la vez que se disipa el potencial de membrana. Sin embargo, aún no está clara la manera como se dan estos procesos, y tampoco se sabe si esta alteración tiene relación directa con su actividad, ya que al parecer no siempre hay una correlación entre la potencia antimicrobiana y la capacidad de permeabilización, que para algunos no es más que un mecanismo de entrada para alcanzar un blanco específico donde se causaría un efecto citotóxico (Lehrer *et al.*, 1989; Park *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2000).

Hasta el momento, sólo hay consenso sobre el mecanismo inicial de lisis que consiste en el reconocimiento de los fosfolípidos mediante interacciones electrostáticas y una vez unidos a la membranas los péptidos sufrirían una reorganización estructural, pasando de un estado desnaturado a una estructura de carácter anfipático, estabilizada por la interfase lipídica con el medio acuoso (Van 't Hof *et al.*, 2001) (figura 3A). Se cree que es debido a este tipo de interacciones que la membrana incrementa su permeabilidad, mecanismo que aún no se tiene bien establecido y para el cual existen tres modelos principales:

Modelo de alfombra. En este modelo se ha propuesto que los péptidos se distribuyen sobre la superficie de la membrana, cubriéndola hasta alcanzar una concentración límite, la cual se colapsa debido a la formación de pequeñas micelas en un mecanismo similar al de los detergentes (Shai, 1999) (figura 3B). Éste ha sido el modelo propuesto para las maganinas (Mor *et al.*, 1994), dermaseptinas (Strahilevitz *et al.*, 1994) y cecropinas (Shai, 1995) entre otros, y ha sido sustenta-

do también con experimentos de dispersión de neutrones en las que se ha mostrado que la membrana se repliega sobre sí misma formando poros aproximadamente dos veces más grandes que los de la alameticina (Ludtke *et al.*, 1996). El efecto tóxico depende de una alta concentración de péptido ya que a bajas concentraciones tan sólo se logra la liberación de pequeñas moléculas y en forma moderada (Juretic *et al.*, 1989; Westerhoff *et al.*, 1989; Grant *et al.*, 1992).

Modelo del barril. Según este modelo, una vez que el péptido se une al exterior de la membrana, se agrupan en una especie de barril que delimita un poro, en el cual las cadenas laterales de los aminoácidos no polares entran en contacto con las colas alifáticas de los ácidos grasos al interior de la bicapa lipídica, mientras que las cadenas hidrofílicas quedan expuestas al solvente (Boheim, 1974) (figura 3C). El tamaño del poro se incrementa a medida que se unen nuevos péptidos, causando la muerte celular debido a la pérdida de componentes intracelulares y al desbalance osmótico.

El tamaño de los poros ha sido medido mediante difracción de neutrones, que en el caso de la alameticina tiene un diámetro de 18 Å (He *et al.*, 1996). Sin embargo, este modelo ha sido cuestionado principalmente por la alta repulsión electrostática que generaría la agrupación de los péptidos. Por otra parte, algunos estudios de permeabilidad han demostrado que las dimensiones de los componentes celulares no corresponden con el tamaño esperado de los poros. Al parecer, este mecanismo sólo sería apropiado para péptidos altamente hidrofóbicos (He *et al.*, 1996).

Modelo de canal agregado. Tanto el modelo del barril como el de alfombra predicen que la muerte de la bacteria se da paralelamente a una pérdida del potencial de membrana, ocasionada por la alteración de su integridad. Sin embargo, a pesar de que la permeabilización de la membrana parece ser necesaria para la actividad antimicrobiana, varios estudios sugieren que por sí solo esto no es suficiente para explicar el efecto antibiótico (Lichtenstein *et al.*, 1988; Ganz y Lehrer, 1995). Estudios en bicapas lineales han muestra-

do que sólo a altas concentraciones de péptido y bajo alto potencial transmembranal se observan los efectos de conductancia asociados a la formación de poros pero sin ninguna correlación con la capacidad antimicrobiana (Wu *et al.*, 1999).

El modelo del canal agregado es similar al del barril pero los poros carecerían de una estructura regular (figura 3D). La principal diferencia de este modelo con los anteriores es la formación de poros transitorios que facilitan la penetración intracelular de los péptidos. Los canales agregados podrían explicar el tamaño variable y la duración de los eventos de conductancia membranal observados en bicapas planares. También es consistente con este modelo el hecho de que muchos péptidos inducen inversiones lipídicas a concentraciones menores de las necesarias para la liberación de algunos componentes internos. Bajo este escenario, la muerte de las células bacterianas puede ser causada por la pérdida de moléculas pequeñas o por la translocación de los péptidos e inhibición de diversos blancos, tales como la estimulación de enzimas autolíticas (Oh *et al.*, 2000), interferencia con la síntesis de ADN o de proteínas (Carlsson *et al.*, 1991; Boman *et al.*, 1993) o unión al ADN (Park *et al.*, 1998).

Regulación y expresión

La gran mayoría de los péptidos sintetizados por organismos multicelulares son producidos por los procesos normales de transcripción genética y de traducción ribosomal y en algunos casos se ven seguidos por un procesamiento proteolítico. Sin embargo, algunos de los péptidos producidos por microorganismos presentan aminoácidos poco comunes y muchos de ellos son sintetizados por mecanismos no ribosomales, en procesos altamente específicos (Kleinkauf y von Dohren, 1990; Nissen-Meyer y Nes, 1997). Las maganinas son sintetizadas como preproteínas que contienen seis copias del péptido que luego serán cortadas para liberar las moléculas individuales (Ketchem *et al.*, 1993). Algo similar ocurre con las cecropinas que son sintetizadas como preproteínas de 62 aminoácidos, los que darán lugar a péptidos entre 35 y 37 aminoácidos (Xanthopoulos *et al.*, 1988; Gudmundsson *et al.*, 1991).

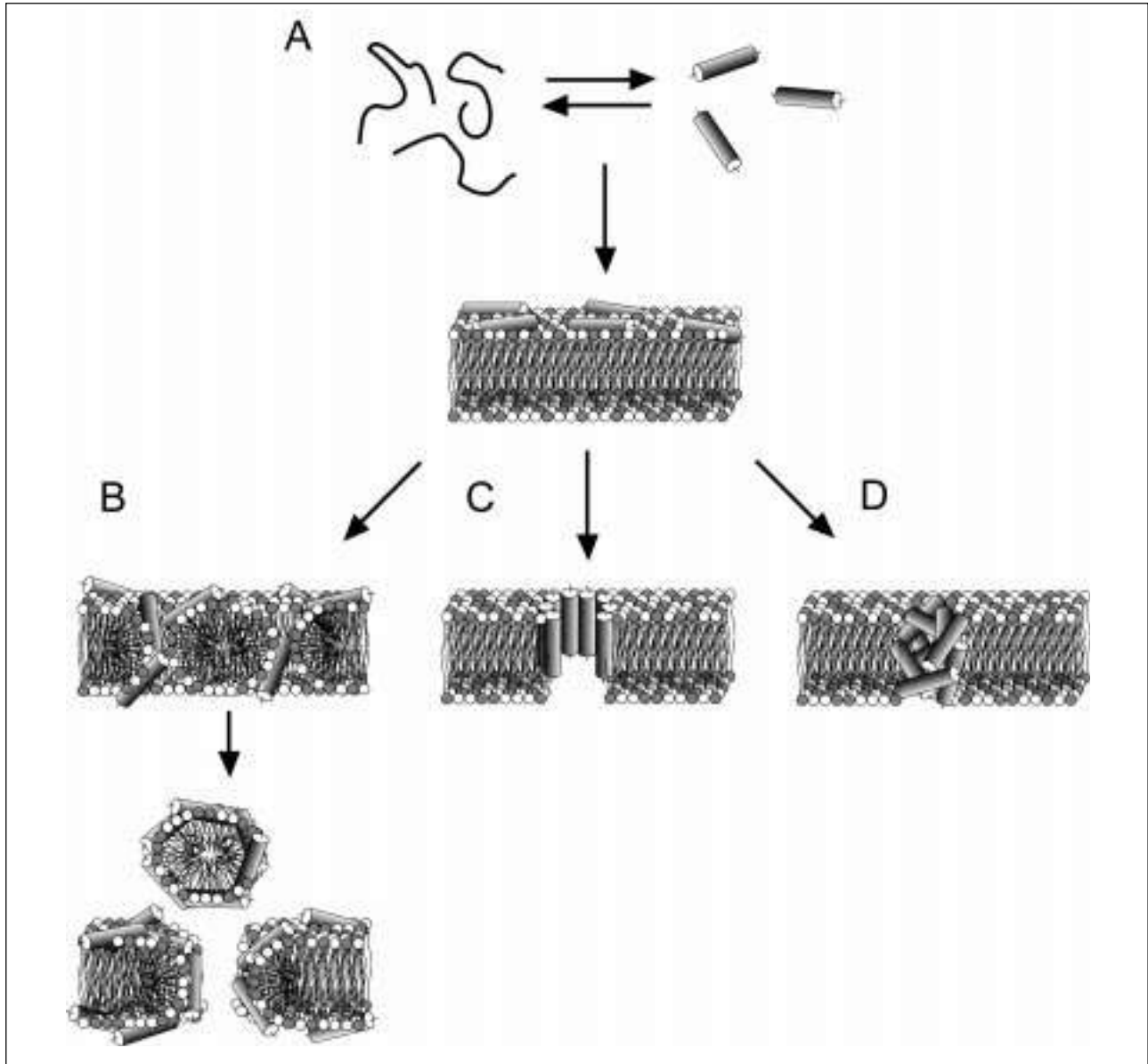


Figura 3. Mecanismos propuestos para la actividad de los péptidos antimicrobianos. Los modelos son similares en la etapa inicial, en la cual los péptidos se incorporan a las membranas en una disposición anfipática, A. En el modelo de la alfombra, luego de alcanzar la concentración límite de péptidos, la membrana se desintegra dando lugar a la formación de poros y a la disolución de la membrana en micelas cubiertas de péptido, B. En el modelo del barril se ha propuesto que los aminoácidos se agrupan en una estructura regular que delinea un poro transmembranal, C. En el modelo del canal agregado los péptidos forman agregados irregulares que no destruyen la integridad membranal pero que permiten el paso de iones. Estos poros son de carácter transitorio y permiten la entrada de los péptidos al interior de la célula donde podrían atacar blancos específicos, D

Se ha demostrado que varios péptidos catiónicos son liberados mediante la ruptura de proteínas con baja actividad antibacteriana, como por ejemplo la lactoferrina bovina que, al ser procesada por la pepsina, libera un péptido de 25 aminoácidos (lac-

toferricina B) dotado de un gran potencial bacteriostático (Bellamy *et al.*, 1992). Parece que este cambio en la potencia antimicrobiana tiene que ver con cambios en la estructura secundaria, los que dan lugar a una estructura anfipática adecua-

da para la unión a las membranas negativas de las bacterias, cuando ocurre la transformación de una estructura helicoidal en la proteína intacta a un péptido con estructura extendida.

Los péptidos antimicrobianos de los mamíferos son producidos principalmente en superficies externas como la piel y los pulmones o permanecen almacenados en los gránulos de los neutrófilos (Hoffmann *et al.*, 1999). Su síntesis, por lo general, es inducida como respuesta a infecciones mediante la detección de moléculas bacterianas (lipopolisacáridos, ácido lipoteicoico, lipoproteínas o peptidoglicanos) por receptores celulares específicos (TLRs), los cuales causan la liberación de factores nucleares (como el NF- κ B) capaces de traslocarlos al núcleo para desencadenar allí la expresión de los genes responsables de las proteínas de fase aguda de infección (Baeuerle y Henkel, 1994). Otros péptidos, como las histatinas y la β -defensina-1 humana, son producidos de manera constitutiva. El tipo de respuesta varía dependiendo de si la infección es causada por hongos, bacterias grampositivas o gramnegativas.

Algunas enfermedades hereditarias están asociadas con problemas de expresión de péptidos antimicrobianos. Por ejemplo, la deficiencia por el factor del complemento C9 en la cual los pacientes presentan una concentración de defensinas diez veces menor de lo normal, lo que condiciona la existencia de mayor riesgo frente a algunos tipos de infecciones (Ganz *et al.*, 1988; Horiuchi *et al.*, 1998). Adicionalmente, algunos péptidos antimicrobianos también son capaces de regular la producción de interleuquinas (Van Wetering *et al.*, 1997; Welling *et al.*, 1998) o de estimular el sistema del complemento (Van den Berg *et al.*, 1998). En insectos y plantas también se han encontrado elementos de respuesta similares a la de los mamíferos (Engstrom *et al.*, 1993; Kappler *et al.*, 1993; Dangl y Jones, 2001; López *et al.*, 2003).

Aplicaciones

La mayor parte del esfuerzo farmacológico ha sido enfocado hacia la producción de antibióticos tópicos ya que su uso es más seguro y representa riesgo mucho menor de efectos adversos a

largo plazo respecto a los antibióticos sistémicos. Se ha demostrado que los péptidos antimicrobianos pueden ser utilizados en la prevención de infecciones y su amplio espectro antimicrobiano los pone en consideración como agentes de control de enfermedades sexualmente transmitidas como *Neisseria*, *Chlamydia* y *Herpes* (HSV) (Yasin *et al.*, 2000). También se ha pensado en su uso como sondas que faciliten el acceso de los antibióticos existentes a las células bacterianas gracias a su gran afinidad por este tipo de membranas (Darveau *et al.*, 1991; Giacometti *et al.*, 2000). Se ha demostrado en modelos animales mejoría frente a las infecciones recurrentes en pacientes con fibrosis quística mediante la transferencia de constructos genéticos (Bals *et al.*, 1999) y se ha planteado la posibilidad de hacer modificaciones en macrófagos humanos para permitir la expresión de b-defensinas para aumentar su actividad frente a la tuberculosis (Kisich *et al.*, 2001). Algunos péptidos, como las maganinas, pueden conservar su actividad luego de ser unidas covalentemente a algunos polímeros (Haynie *et al.*, 1995), lo que representaría una posible solución a los problemas de contaminación en materiales clínicos. La introducción de genes que codifican compuestos antimicrobianos en plantas y animales ha sido exitosa en la transferencia de resistencia frente a algunas enfermedades de la papa (Osusky *et al.*, 2000) y del tabaco (DeGray *et al.*, 2001).

Uno de los problemas potenciales de la utilización in vivo de los péptidos antimicrobianos es su sensibilidad a la fuerza iónica del medio. Por ejemplo, la histatina 5 tiene un LC₅₀ de 2 μ M frente a *Candida albicans* en un tampón de fosfato de potasio 1 mM, pero a 50 mM su LC₅₀ es mayor a 100 μ M (Helmerhorst *et al.*, 1999b). Ello dificulta la extrapolación de la información obtenida in vitro y la comparación de su actividad bajo condiciones diferentes. Quizás una solución a este problema sea la utilización de péptidos de organismos adaptados a vivir en condiciones de alta salinidad como cangrejos, peces y otros animales marinos. Los péptidos también son relativamente sensibles a la degradación proteolítica, lo cual representa una gran desventaja para su utili-

zación clínica. Se ha propuesto que la formación de complejos con proteínas negativas o lipolifílicas puede protegerlos de la proteólisis in vivo (Perinpanayagam *et al.*, 1995; Sorensen *et al.*, 1999). En este caso los péptidos con grupos químicos poco usuales, como los peptaiboles, representan una alternativa gracias su gran resistencia frente a la proteólisis. También es posible realizar modificaciones en los enlaces peptídicos como la alquilación de los nitrógenos del esqueleto peptídico (Ostresh *et al.*, 1996). La utilización de péptidos compuestos de aminoácidos dextrógi-

ros también evita la acción de las enzimas proteolíticas, las cuales sólo son activas frente a secuencias de aminoácidos levógiros. Otro inconveniente es el de su producción a un costo razonable, ya que la síntesis artificial de los péptidos resultaría entre cinco y veinte veces más costoso que el de los antibióticos tradicionales (Van 't Hof *et al.*, 2001). Sin embargo, la gran cantidad de nuevas ideas en la lucha contra los agentes infecciosos aportados por los péptidos antimicrobianos hacen de ellos un área de investigación interesante en el futuro próximo.

REFERENCIAS

- Baueerle PA, Henkel T.** 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Ann Rev Immunol* 12:141-179.
- Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM.** 1999. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immunol* 67:6.084-6.089.
- Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M.** 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta* 1.121:130-136.
- Benachir T, Lafleur M.** 1995. Study of vesicle leakage induced by melittin. *Biochim Biophys Acta* 1.235:452-460.
- Boheim G.** 1974. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. *J Membr Biol* 19:277-303.
- Boman HG, Agerberth B, Boman A.** 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immunol* 61:2.978-2.984.
- Breukink E, De Kruijff B.** 1999. The lantibiotic nisin, a special case or not?. *Biochim Biophys Acta* 1.462:223-234.
- Brewer D, Hunter H, Lajoie G.** 1998. NMR studies of the antimicrobial salivary peptides histatin 3 and histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biochem Cell Biol* 76:247-256.
- Carlsson A, Engstrom P, Palva ET, Bennich H.** 1991. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription. *Infect Immunol* 59:3.040-3.045.
- Chen HC, Brown JH, Morell JL, Huang CM.** 1988. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. *FEBS Lett* 236:462-466.
- Dangl JL, Jones JD.** 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411(6.839):826-833.
- Darveau RP, Cunningham MD, Seachord CL, Cassiano-Clough L, Cosand WL, Blake J, Watkins CS.** 1991. Beta-lactam antibiotics potentiate magainin 2 antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1.153-1.159.
- Dathe M, Wierprecht T.** 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* 1.462:71-87.
- DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J, Daniell H.** 2001. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol* 127:852-862.
- Eisenberg D.** 1984. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Ann Rev Biochem* 53:595-623.
- Engstrom Y, Kadalayil L, Sun SC, Samakovlis C, Hultmark D, Faye I.** 1993. kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. *J Mol Biol* 232:327-333.
- Epand RM, Vogel HJ.** 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action'. *Biochim Biophys Acta* 1.462:11-28.
- Friedrich CL, Moyles D, Beveridge TJ, Hancock RE.** 2000. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2.086-2.092.
- Ganz T, Lehrer RI.** 1995 'Defensins', *Pharmacol Ther* 66:191-205.
- Ganz T, Metcalf JA, Gallin JI, Boxer LA, Lehrer RI.** 1988. Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and "specific" granule deficiency. *J Clin Invest* 82:552-556.
- Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Scalise G.** 2000. *In vitro* activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 38:115-118.
- Giangaspero A, Sandri L, Tossi A.** 2001. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *Eur J Biochem* 268:5.589-5.600.
- Grant EJr, Beeler TJ, Taylor KM, Gable K, Roseman MA.** 1992. Mechanism of magainin 2a induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* 31:9.912-9.918.
- Gudmundsson GH, Lidholm DA, Asling B, Gan R, Boman HG.** 1991. The cecropin locus. Cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. *J Biol Chem* 266:11.510-11.517.
- Hancock RE.** 1999. Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential? *Drugs* 57:469-473.
- Hancock RE.** 2000. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs* 9:1.723-1.729.
- Haynie SL, Crum GA, Doele BA.** 1995. Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. *Antimicrob Agents Chemother* 39:301-307.
- He K, Ludtke SJ, Heller WT, Huang HW.** 1996. Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers. *Biophys J* 71:2.669-2.679.

- Helmerhorst EJ, Breeuwer P, Van't Hof W, Walgreen-Weterings E, Oomen LC, Veerman EC, Amerongen AV, Abee T.** 1999a. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* 274:7.286-7.291.
- Helmerhorst EJ, Reijnders IM, Van 't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV.** 1999b. A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides', *FEBS Lett* 449:105-110.
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA.** 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284(5.418):1.313-1.318.
- Horiuchi T, Nishizaka H, Kojima T, Sawabe T, Niho Y, Schneider PM, Inaba S, Sakai K, Hayashi K, Hashimura C, Fukumori Y.** 1998. A non-sense mutation at Arg95 is predominant in complement 9 deficiency in Japanese. *J Immunol* 160:1.509-1.513.
- Hwang PM, Zhou N, Shan X, Arrowsmith CH, Vogel HJ.** 1998. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry* 37:4.288-4.298.
- Juretic D, Chen, HC, Brown JH, Morell JL, Hendler RW, Westerhoff HV.** 1989. Magainin 2 amide and analogues. Antimicrobial activity, membrane depolarization and susceptibility to proteolysis. *FEBS Lett* 249:219-223.
- Kappler C, Meister M, Lagueux M, Gateff E, Hoffmann JA, Reichhart JM.** 1993. Insect immunity. Two 17 bp repeats nesting a kappa B-related sequence confer inducibility to the dipterin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*. *Embo J* 12:1.561-1.568.
- Ketchum RR, Hu W, Cross TA.** 1993. High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. *Science* 261(5.127):1.457-1.460.
- Kisich KO, Heifets L, Higgins M, Diamond G.** 2001. Antimycobacterial agent based on mRNA encoding human beta-defensin 2 enables primary macrophages to restrict growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immunol* 69:2.692-2.699.
- Kleinkauf H, Von Dohren H.** 1990. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem* 192:1-15.
- 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.
- Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, Selsted ME.** 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest* 84:553-561.
- Lehrer RI, Ganz T.** 2002. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 14:96-102.
- Levitt M.** 1976. A simplified representation of protein conformations for rapid simulation of protein folding. *J Mol Biol* 104:59-107.
- Lichtenstein AK, Ganz T, Nguyen TM, Selsted ME, Lehrer RI.** 1988. Mechanism of target cytolysis by peptide defensins. Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity. *J Immunol* 140:2.686-2.694.
- López L, Morales G, Ursic R, Wolff M, Lowenberger C.** 2003. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease, *Insect Biochem Mol Biol* 33(4):439-447.
- Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L, Huang HW.** 1996. 'Membrane pores induced by magainin'. *Biochemistry* 35(43):13.723-13.728.
- Matsuzaki K.** 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1.462:1-10.
- Matsuzaki K, Mitani Y, Akada KY, Murase O, Yoneyama S, Zasloff M, Miyajima K.** 1998. Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa', *Biochemistry* 37:15.144-15.153.
- Miyasaki KT, Lehrer RI.** 1998. Beta-sheet antibiotic peptides as potential dental therapeutics. *Int J Antimicrob Agents* 9:269-280.
- Mor A, Hani K, Nicolas P.** 1994. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *J Biol Chem* 269:31.635-31.641.
- Nissen-Meyer J, Nes IF.** 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol* 167:67-77.
- Nozaki Y, Tanford C.** 1971. The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale. *J Biol Chem* 246:2.211-2.217.
- Oh JT, Cajal Y, Skowronska EM, Belkin S, Chen J, Van Dyk TK, Sasser M, Jain MK.** 2000. Cationic peptide antimicrobials induce selective transcription of *micF* and *osmY* in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1.463:43-54.
- Oren Z, Hong J, Shai Y.** 1999. A comparative study on the structure and function of a cytolytic alpha-helical peptide and its antimicrobial beta-sheet diastereomer. *Eur J Biochem* 259:360-369.
- Ostresh JM, Blondelle SE, Dorner B, Houghten RA.** 1996. Generation and use of nonsupport-bound peptide and peptidomimetic combinatorial libraries. *Methods Enzymol* 267:220-234.
- Osusky M, Zhou G, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Misra S.** 2000. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nat Biotechnol* 18:1.162-1.166.
- Paradies HH.** 1989. Structure of tyrocidine micelles in isotropic aqueous solution. *J Pharm Sci* 78:230-234.
- Park CB, Kim HS, Kim SC.** 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions', *Biochem Biophys Res Commun* 244:253-257.
- Perinpanayagam HE, Van Wuyckhuysse BC, Ji ZS, Tabak LA.** 1995. Characterization of low-molecular-weight peptides in human parotid saliva. *J Dent Res* 74:345-350.
- Prenner EJ, Lewis RN, McElhaney RN.** 1999. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 1.462:201-221.
- Pristovsek P, Kidric J.** 1999. Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modeling study. *J Med Chem* 42:4.604-4.613.
- Sansom MS.** 1993. Alamethicin and related peptaibols—model ion channels. *Eur Biophys J* 22:105-124.
- Selsted ME, Novotny MJ, Morris WL, Tang YQ, Smith W, Cullor JS.** 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* 267:4.292-4.295.

- Shai Y.** 1995. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem Sci* 20:460-464.
- Shai Y.** 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462:55-70.
- Sorensen O, Bratt T, Johnsen AH, Madsen MT, Borregaard N.** 1999. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. *J Biol Chem* 274:22.445-22.451.
- Strahilevitz J, Mor A, Nicolas P, Shai Y.** 1994. Spectrum of antimicrobial activity and assembly of dermaseptin-b and its precursor form in phospholipid membranes. *Biochemistry* 33:10.951-10.960
- Subbalakshmi C, Sitaram N.** 1998. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett* 160:91-96.
- Tsai H, Bobek LA.** 1998. Human salivary histatins: promising antifungal therapeutic agents. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:480-497.
- Van den Berg RH, Faber-Krol MC, Van Wetering S, Hiemstra PS, Daha MR.** 1998. Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins. *Blood* 92:3.898-3.903.
- Van 't Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ, Amerongen AV.** 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem* 382:597-619.
- Van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SP, Van Sterkenburg MA, Daha MR, Dijkman JH, Hiemstra PS.** 1997. Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. *Am J Physiol* 272(5 Pt 1):L888-896.
- Wade D, Boman A, Wahlin B, Drain CM, Andreu D, Boman HG, Merrifield RB.** 1990. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4.761-4.765.
- Welling MM, Hiemstra PS, Van den Barselaar MT, Paulusma-Annema A, Nibbering PH, Pauwels EK, Calame W.** 1998. Antibacterial activity of human neutrophil defensins in experimental infections in mice is accompanied by increased leukocyte accumulation'. *J Clin Invest* 102:1.583-1.590.
- Westerhoff HV, Juretic D, Hendler RW, Zasloff M.** 1989. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6.597-6.601.
- Wu M, Maier E, Benz R, Hancock RE.** 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38:7.235-7.242.
- Xanthopoulos KG, Lee JY, Gan R, Kockum K, Faye I, Boman HG.** 1988. The structure of the gene for cecropin B, an antibacterial immune protein from *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 172:371-376.
- Yasin B, Pang M, Turner JS, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI, Wagar EA.** 2000. Evaluation of the inactivation of infectious *Herpes simplex* virus by host-defense peptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:187-194.
- Yau WM, Wimley WC, Gawrisch K, White SH.** 1998. The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* 37:14.713-14.718.
- 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 USA* 84:5.449-5.453.
- Zasloff M.** 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415(6.870):389-395.

