



**DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE ACCIÓN DE PÉPTIDOS FRENTE A  
BACTERIAS: REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE DE LAS METODOLOGÍAS  
EMPLEADAS**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ  
2022**



**DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE ACCIÓN DE PÉPTIDOS FRENTE A  
BACTERIAS: REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE DE LAS METODOLOGÍAS  
EMPLEADAS**

Karen Tatiana Díaz Rodríguez

**Orientadora Interna**

MSc. Sandra Mónica Estupiñán Torres

**Orientadores externos**

Dr. rer. nat. Zuly Jenny Rivera Monroy

MSc. Héctor Manuel Pineda Castañeda

**Grupo de Investigación:**

Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP)

Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ  
2022**



**DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE ACCIÓN DE PÉPTIDOS FRENTE A  
BACTERIAS: REVISIÓN DEL ESTADO DEL ARTE DE LAS METODOLOGÍAS  
EMPLEADAS**

Nota \_\_\_\_\_

Jurados

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ  
2022**

## DEDICATORIA

*En primer lugar, a Dios quien me ha permitido llegar al final de mi carrera con sabiduría e iluminando mi camino; a mis padres Oscar y Marisol quienes con su amor y esfuerzo han hecho realidad un sueño más y a la familia Díaz Rodríguez por acompañarme en el proceso de mi formación como bacterióloga.*

## AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a mi padre Oscar, a mi madre Marisol y a mi tía Sandra por confiar en mí y que sin su apoyo este sueño no se habría hecho posible.

Gracias a mis asesores Sandra Mónica Estupiñán, Zuly Jenny Rivera que durante todo el trabajo me guiaron y me acompañaron y en especial a Héctor Manuel Pineda quien me brindó su conocimiento, sus consejos y su tiempo para que este trabajo llegara a su culminación.

De igual manera, mis agradecimientos al grupo de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP) de la Universidad Nacional de Colombia, resaltando la colaboración del Profesor Javier Eduardo García y Yerly Vargas Casanova que con sus ideas aportaron al desarrollo de mi trabajo final.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, a la facultad de Ciencias de la Salud y a mis profesores que con la enseñanza de sus valiosos conocimientos me hicieron crecer día a día como profesional.

Y finalmente a todos quienes indirectamente me han ayudado a la realización de este logro, gracias a cada uno de ustedes por su paciencia, dedicación y apoyo incondicional.

## TABLA DE CONTENIDO

Introducción	12
1. Antecedentes	15
2. Marco teórico	18
2.1 Diversidad de los PAMs	18
2.2 Características fisicoquímicas de los PAMs	19
2.2.1 Estructura	19
2.2.2 Relación estructura-actividad	21
2.3 PAMs en la clínica	23
2.4 Mecanismo de acción de los PAMs	28
2.4.1 Mecanismo membranolítico de los PAMs	29
2.4.2 Mecanismo no membranolítico de los PAMs	31
3. Diseño metodológico	32
3.1 Tipo de investigación	33
3.2 Universo, población y muestra	34
3.2.1 Universo	34
3.2.2 Población	34
3.2.3 Muestra	34
3.3 Criterios de inclusión	34
3.4 Criterios de exclusión	34
3.5 Pregunta de investigación	35
4. Metodología	35
4.1 Revisión bibliográfica	35
5. Resultados y discusión	35
5.1 Revisión bibliográfica	35
5.2 Metodologías usadas en la determinación de mecanismos de acción	37
5.2.1 Metodologías asociadas a membrana	37
5.2.1.1 Dinámica molecular (DM)	38
5.2.1.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	39
5.2.1.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	41

5.2.1.4	Microscopía confocal láser de barrido (CLSM)	43
5.2.1.5	Microscopía electrónica de transmisión (MET)	45
5.2.1.6	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	47
5.2.1.7	Microscopía de fluorescencia	49
5.2.1.8	Citometría de flujo	51
5.2.1.9	Tinción y liberación de colorantes	54
5.2.2	Metodologías asociadas a pared celular	56
5.2.3	Metodologías asociadas a blancos intracelulares	59
5.2.3.1	Inhibición de la replicación	60
5.2.3.1.1	Ensayo de desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL)	60
5.2.3.1.2	Ensayo de retardo en gel	61
5.2.3.2	Inhibición de síntesis de proteínas	63
6.	Conclusiones	65
7.	Referencias	67
	ANEXOS	75
	Anexo 1. Diagrama de flujo de las metodologías a utilizar en la identificación del mecanismo de acción de péptidos con actividad antibacteriana.	75
	Anexo 1.1. Metodologías utilizadas en la identificación de mecanismos de acción membranolíticos.	76
	Anexo 1.2. Metodologías utilizadas en la identificación de mecanismos de acción sobre la pared bacteriana.	77
	Anexo 1.3. Metodologías utilizadas en la identificación de mecanismos de acción intracelulares.	78
	Anexo 2. Esquema de las metodologías utilizadas para la evaluación del mecanismo de acción en cada uno de los blancos bacterianos.	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de PAMs por su origen. ....	18
<b>Figura 2.</b> Estructuras de los péptidos antimicrobianos. (a) $\alpha$ helicoidal (magainina), (b) Hoja $\beta$ (defensina) y (c) Bobina extendida (indolicidina). Los residuos cargados positivamente son de color <b>azul</b> , mientras que los hidrófobos son <b>rojos</b> . ....	20
<b>Figura 3.</b> a) Representación $\alpha$ -helicoidal de una estructura anfipática con áreas hidrófilas ( <b>rojas</b> ) e hidrófobas ( <b>azules</b> ). b) Agrupación de residuos hidrófilos e hidrófobos de varios péptidos antimicrobianos.....	22
<b>Figura 4.</b> Interacción de péptidos catiónicos con membranas animales y bacteriana	29
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de acción propuestos para los PAMs en bacterias .....	31
<b>Figura 6.</b> Diseño metodológico. ....	33
<b>Figura 7.</b> Idioma de referencias consultadas.....	35
<b>Figura 8.</b> Tipos de referencias Bibliográficas. ....	36
<b>Figura 9.</b> Años de publicación de las referencias utilizadas.....	37
<b>Figura 10.</b> Estructura de la composición externa de (a) bacterias Gram-positivas y (b) bacterias Gram-negativas .....	38
<b>Figura 11.</b> Imagen AFM a pH 4 que muestra fragmentos similares a poros en una bicapa de POPC incubada con pHD108 .....	43
<b>Figura 12.</b> Imágenes microscópicas de fluorescencia confocal en células de <i>E. coli</i> . La microscopía muestra la localización de buforina IIb (A), Buf IIIa (B), Buf IIIb (C), Buf IIIc (D) y Buf IIId (E), además como comparación se incluye una imagen de <i>E. coli</i> tratada con magainin II (F) .....	44
<b>Figura 13.</b> Imágenes de MET de <i>E. coli</i> MC1000 donde las células muestran fuertes defectos de membrana y se detectó una estructura gris desconocida alrededor de la bacteria.....	46
<b>Figura 14.</b> Imágenes MET con inmunomarcaje con oro representativas de células de <i>S. aureus</i> y la localización de CATH-2 a 40 $\mu$ M (A) y 80 $\mu$ M (B).....	47



<b>Figura 15.</b> Imágenes de células de <i>S. aureus</i> ATCC25923 tratadas con LHP7. Las flechas rojas indican el encogimiento de las células (b), la fuga del contenido de las células (c) y la ruptura de las células (d), respectivamente .....	49
<b>Figura 16.</b> Microscopía de fluorescencia de células bacterianas tratadas con C16-K-RBB2 durante 2h), (1a) Control de DAPI, (1b) Control de PI, (2a) SARM, teñido con DAPI y tratado con compuesto, (2b) SARM, teñido con PI y tratado con compuesto, (3a) Control de DAPI, (3b) Control de PI (4a) <i>E. coli</i> , teñido con DAPI y tratado con compuesto, (4b) <i>E. coli</i> , teñido con PI y tratado con compuesto. ....	51
<b>Figura 17.</b> Imágenes de permeabilización de la membrana celular de <i>S. aureus</i> con colorantes Syto-9 (permeable a la membrana) y Yoduro de propidio (tinción intercalante de ADN).....	54
<b>Figura 18.</b> Imágenes crioelectrónicas de células salvajes de <i>K. pneumoniae</i> tratadas con: a) tampón HEPES; b) en 6µM caerin; c) 380µM caerin, las flechas indican la presencia de agujeros o grietas en la membrana externa; y d) 6µM de melitina, la flecha de doble punta señala hinchazón del periplasma y discontinuidad de la membrana citoplasmática indicada por la flecha.....	59
<b>Figura 19.</b> Electroforesis en gel de agarosa de a) péptido 73, b) péptido 77 y c) IDR 1018, incubado con ADN plásmido de 60ng.....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de las propiedades y características de los PAM.....	23
<b>Tabla 2.</b> Antibióticos basados en péptidos disponibles comercialmente .....	25
<b>Tabla 3.</b> PAMs en evaluaciones preclínicas .....	26



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

## RESUMEN

En la última década, se ha trabajado en el hallazgo de nuevas moléculas peptídicas con actividad antibacteriana frente a microorganismos de importancia clínica actual, como lo son aquellos del grupo *ESKAPE* (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus spp.*), causantes de enfermedades como la gastroenteritis, neumonía, endocarditis, infecciones intrahospitalarias e infecciones cutáneas. En esta revisión, se discute sobre los antecedentes, características y mecanismos de acción propuestos para los PAMs, por medio de una recopilación de diferentes artículos experimentales enfocados principalmente a las técnicas que han permitido la elucidación del mecanismo de acción, entre ellas se encuentran técnicas y ensayos como la microscopía de fluorescencia, microscopía electrónica, microscopía de fuerza atómica, ensayos moleculares e inmunoenzimáticos, entre otros. Estos ensayos han permitido avanzar en la comprensión e interpretación de la interacción de PAMs con los microorganismos lo que ayuda a diseñar mejoras en la estructura de los PAMs que puedan potenciar su actividad antibacteriana.

**PALABRAS CLAVE:** PAMs, mecanismo de acción, extracelular, intracelular, antibacteriano, *in-vivo*, *in-vitro*.

Estudiante: Karen Tatiana Díaz Rodríguez

## Introducción

El aumento de los casos de resistencia antibacteriana que se han presentado en la última década de manera acelerada ha generado varios frentes de investigación, uno de los cuales consiste en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antibacteriana. Los péptidos antimicrobianos (PAMs), han surgido como una alternativa prometedora ya que son moléculas de origen animal, vegetal e incluso humano, forman parte del sistema inmune de muchos organismos y se ha propuesto que pueden ser útiles para futuros usos en la clínica que por ser parte del sistema inmune de muchos organismos son moléculas prometedoras para futuros usos en la clínica.

Fue en 1939, cuando se aislaron las primeras sustancias con potencial antibacteriano de origen procariota, los primeros estudios se enfocaron en las metodologías de extracción que ayudaron a aislar la secuencia peptídica responsable de la actividad y no hacia los mecanismos asociadas a la interacción de estas moléculas con las células bacterianas<sup>1</sup>, la atención estaba en ensayos de extracción de PAMs a partir de cultivos microbianos, cuya presencia exhibía una actividad tanto *in vitro* como *in vivo* frente a un gran número de bacterias<sup>2,3</sup>. Los ensayos microbiológicos y de observación microscópica eran los que mayor utilidad presentaban en las primeras investigaciones. Para la identificación de nuevas proteínas, con actividad antibacteriana, como la Lactoferrina bovina (LFb) aislada de la leche, fue necesario implementar nuevas técnicas, como la electroforesis en gel<sup>4</sup> y, para finales de la década de los 80's, ensayos moleculares como la degradación enzimática y técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) que permitieron el estudio e identificación de una serie de PAMs y proteínas antimicrobianas de leucocitos, incluidas las  $\alpha$ -defensinas de conejos<sup>5,6</sup> y humanos<sup>7</sup>.

A lo largo de los años, la llegada de nuevas tecnologías analíticas usadas en la investigación se ha convertido en un apoyo que permite un acercamiento al entendimiento de los mecanismos de acción de diferentes compuestos con actividad

antibacteriana. En 1998 se publicó uno de los primeros resultados sobre el estudio del mecanismo de acción de PAMs sobre la membrana bacteriana a través de ensayos de fluorescencia y un experimento de retardo de gel utilizando la Buforina II (TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK) marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), para este caso se determinó que la Buforina II inhibe las funciones celulares al unirse al ADN y al ARN de las células después de penetrar en la membrana bacteriana<sup>8</sup>. Desde inicios del siglo XXI hasta la fecha, se han introducido diferentes técnicas instrumentales como la microscopía, con incorporación de ondas electromagnéticas acopladas a un haz de electrones para obtener mayor resolución de imagen o incluso otras como la microscopía de fuerza atómica (AFM) que recorren la superficie celular captando fuerzas del orden de los nanonewtons<sup>9,10</sup>.

En el 2017 se logró visualizar el mecanismo de acción del péptido proveniente de la catelicidina-2 de pollo CATH-2 (RFGRFLRKIRRFKVTITIQGSARF) frente a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) resistente a la meticilina (WKZ-2, aislado humano); donde la microscopía confocal de imágenes demostró que CATH-2 se une directamente a las bacterias y provoca la permeabilización de la membrana y la contracción celular la cual fue demostrada mediante tinciones con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y yoduro de propidio (PI)<sup>11</sup>. En otros estudios, se evaluó el mecanismo del péptido NK-18 (KILRGVCKKIMRTFLRRI-NH<sub>2</sub>) contra cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) CMCC44102 y *S. aureus* CMCC26003 a través de ensayos de microscopía electrónica de barrido (MEB), este permitió observar alteraciones y formación de ampollas en la superficie celular; igualmente los ensayos de liberación de calceína proporcionaron evidencia de la ruptura de la membrana celular<sup>12</sup>. En los últimos reportes sobre mecanismos de acción de PAMs, tal como se logró con el péptido CATH-2 contra aislados clínicos de *S. aureus*, el inmunomarcaje ha sido una técnica innovadora y una estrategia diferente de identificación de mecanismos de acción en modelos *in vitro*, permitiendo en este caso la localización del péptido en los

pliegues de la membrana, sugiriendo que estos son agregados de poros en forma de toroides<sup>11</sup>.

Como estos, son diversos los ensayos que se han venido publicando en los últimos años cuya finalidad ya no se centra únicamente en encontrar, aislar y caracterizar moléculas con actividad antibacteriana sino de comprender más a fondo su mecanismo de acción para finalmente mejorar y desarrollar alternativas prometedoras de fármacos antibacterianos. En el presente documento se recopilan y detallan las metodologías y las técnicas reportadas hasta la fecha enfocadas específicamente a la determinación de mecanismos de acción de PAMs (naturales o sintéticos) y cómo estas han permitido un acercamiento de este tipo de moléculas a la clínica como posibles agentes terapéuticos.

## 1. Antecedentes

A finales de 1920, Alexander Fleming en estudios con eucariotas identificó la lisozima, considerada este el primer caso informado de un péptido con actividad antimicrobiana<sup>13</sup>, en 1939 se logró el aislamiento de las primeras moléculas de origen bacteriano (*Bacillus brevis*) con potencial terapéutico nombradas gramicidinas del cual se observó una cura exitosa sobre heridas en la piel de cobaya infectadas con *Clostridium perfringens*<sup>14,15</sup>, luego en las décadas de 1950 y 1960 se demostró que las moléculas catiónicas eran responsables de la capacidad de los neutrófilos humanos para inhibir el crecimiento bacteriano<sup>16,17</sup>. A partir de allí, los estudios se centraron en el aislamiento, síntesis y/o modificación y evaluación de la actividad de PAMs como: i) la adición de aminoácidos (cisteína) involucrados en la estabilización de la molécula, ii) ensayos *in vitro* sobre el mecanismo de acción en modelos animales como moscas y larvas<sup>18</sup>, y iii) aislamiento de nuevos PAMs de secreciones y tejidos de mamíferos, anfibios, insectos y humanos<sup>19,20,21</sup>, esta recopilación de resultados permitieron crear hipótesis sobre las interacciones de los PAMs con las membranas bacterianas que posteriormente fueron confirmadas mediante técnicas y/o metodologías asociadas a la determinación de mecanismo de acción<sup>22</sup>. Las primeras investigaciones se caracterizan por el estudio de la actividad antibacteriana (Concentración Mínima Inhibitoria CMI y Concentración Mínima bactericida CMB) de péptidos sintéticos o naturales evaluada principalmente a través de ensayos de susceptibilidad<sup>23,24,25</sup>, así como también se caracteriza por el hallazgo y aislamiento de nuevos compuestos peptídicos que inducían una mayor acción inhibitoria y respuesta inmune frente a bacterias patógenas; inicialmente las investigaciones proponían hipótesis que finalmente se terminaban confirmando o descartando años después con el avance de nuevas técnicas de laboratorio que facilitaban esclarecer el mecanismo de acción e interacción de péptido-célula.

Con la finalidad de verificar los mecanismos de acción propuestos actualmente, se inició el uso de técnicas de electroforesis en gel<sup>26,27</sup> así como secuenciación del genoma<sup>27</sup> y ensayos de dicroísmo circular (CD)<sup>28</sup> entre otras de naturaleza química que permitieran evidenciar cómo actuaban estas moléculas de estudio frente a los microorganismos. Para finales de los años 90 se tuvo un enfoque más claro acerca de la integridad de la membrana bacteriana, se centró la atención en la interacción de los PAMs con los componentes principales que constituyen la membrana como los son los lípidos y/o polisacáridos; tal fue el caso como lo reportó Wimley *et al*, en donde evidenciaron a través la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) la unión del péptido HNP-2 (CYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC) en vesículas lipídicas, así como la permeabilidad de la membrana por medio de ensayos de fluorescencia (ANTS-DPX, DOPE, DOPC) que permitieron observar la liberación de contenido citoplasmático de las vesículas inducida por la acción de HNP-2<sup>28,29</sup>. Para 1998 se introdujeron ensayos de microscopía con mejoras ópticas que favorecieron la observación de las disrupciones y alteraciones en la membrana como: i) la microscopía electrónica<sup>30,31</sup>, ii) microscopía de barrido láser confocal (CLSM)<sup>8</sup>, iii) microscopía de fluorescencia<sup>32</sup> iv) microscopía de fuerza atómica<sup>33</sup> v) microscopía electrónica de transmisión (MET) o vi) microscopía de barrido, al igual que se llegó a conocer el modo en el que intervienen los PAMs formadores de poros sobre la membrana, identificándose tres modelos (barril duela, toroidal y de tapete)<sup>34</sup>. Para la primera década del 2000 y teniendo más conocimiento en el campo de las moléculas peptídicas, se comenzó con la búsqueda de otros targets bacterianos diferentes a membrana, donde mediante un ensayo de retardo en gel se pudo visualizar la unión de péptidos como la Buforina II a proteínas de replicación celular como el ADN y ARN<sup>8</sup>, el lípido II sobre la pared celular<sup>32</sup>, membrana mitocondrial<sup>35</sup> y unión a proteínas<sup>36</sup>.

En los últimos 10 años, el uso de ensayos *in vitro* ha permitido esclarecer diversos mecanismos de acción exhibidos por los PAMs, esto ha llevado a que las investigaciones se centren en la modificación estructural de secuencias con el fin de



potenciar la actividad antibacteriana y reducir los efectos adversos que puedan llegar a presentar en el huésped. Hasta la fecha aún se siguen utilizando todos los ensayos que desde un inicio sirvieron en el proceso y poco a poco se han incluido otros como los inmunoensayos; como lo fue el ensayo de MET modificado con marcaje inmunológico con oro logrando evaluar la translocación del péptido catelicidina-2 de pollo CATH-2 luego de la adherencia a la membrana bacteriana<sup>11,37</sup>. Con base en las técnicas y metodologías anteriormente mencionadas, la investigación futura sobre la incorporación de PAMs como nuevos antimicrobianos no debe centrarse solo en la presencia de la actividad, sino, aplicar ensayos que muestren de manera clara el comportamiento de estos compuestos en las diferentes etapas del proceso de muerte bacteriana.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Diversidad de los PAMs

Bajo la necesidad de desarrollar nuevos compuestos para combatir las infecciones bacterianas, los péptidos antimicrobianos (PAMs) han ganado atención rápidamente como una nueva fuente de agentes antibacterianos con gran potencial clínico. Hasta la fecha se registran más de 3000 secuencias las cuales se encuentran en prácticamente todas las formas de vida, estas suelen ser obtenidas con frecuencia de fuentes de i) origen natural (leche, veneno, sangre, saliva), ii) aislados bacterianos, iii) plantas, iv) vertebrados e invertebrados, entre las que destacan las defensinas, magaininas, catelicidinas, entre otros<sup>38</sup>, figura 1. También pueden ser de origen sintético los cuales pueden ser sintetizados y modificados *in vitro* o mediante síntesis orgánica como la síntesis de péptidos en fase sólida, entre estos encontramos péptidos como KSL (KKVVFVKVFK) y MSI-843 (Oct-OOLLOOLOOL-NH<sub>2</sub>)<sup>38</sup>; los PAMs reportados suelen contener menos de 100 aminoácidos, incluir residuos cargados positivamente (lisina, arginina e histidina) y parte de sus residuos son hidrófobos (> 50%)<sup>39</sup>.

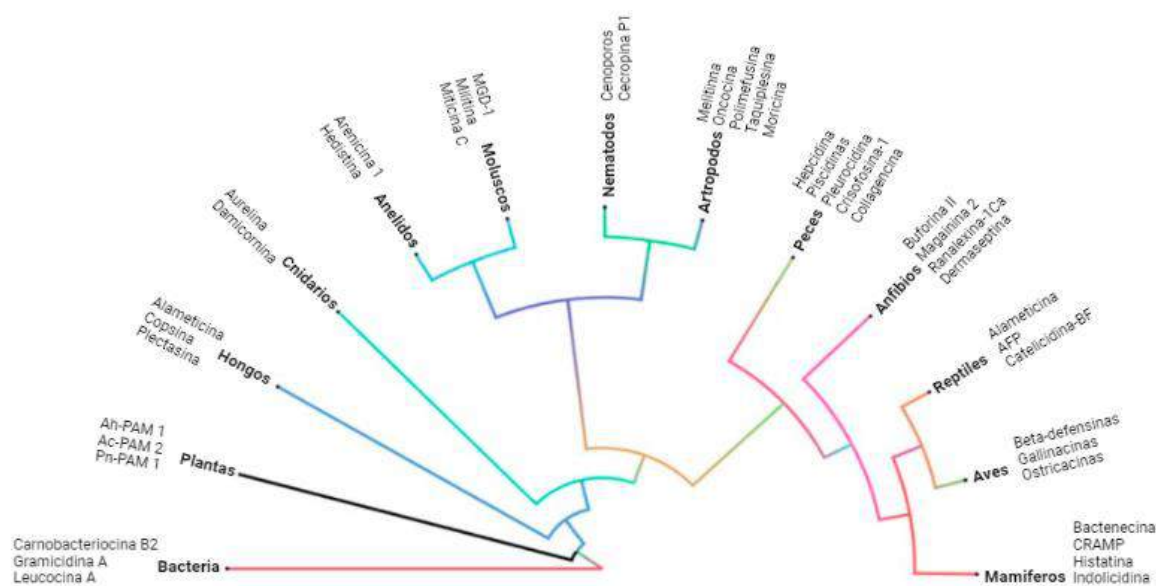


Figura 1. Clasificación de PAMs por su origen<sup>40</sup>.

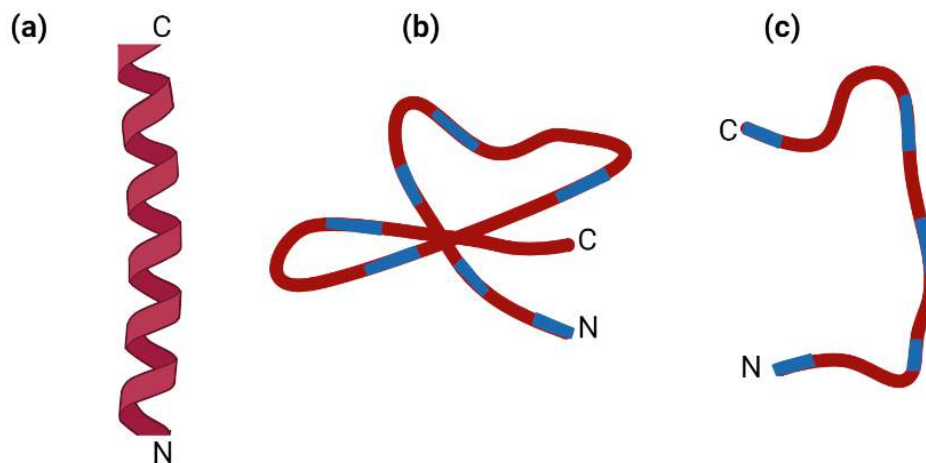
## 2.2 Características fisicoquímicas de los PAMs

### 2.2.1 Estructura

Estudios sobre la relación estructura-actividad de péptidos antimicrobianos han revelado que hay muchos factores que afectan su especificidad y la actividad biológica. Factores como: i) la carga, ii) la estructura, iii) la hidrofobicidad, iv) la anfipaticidad son fundamentales sobre la actividad antibacteriana.

En cuanto a las características estructurales los PAMs se clasifican en: i) PAMs con estructura de alfa hélice, predominan en la matriz extracelular de ranas e insectos y por lo general estos péptidos se estructuran cuando entran en contacto con micelas y liposomas<sup>40</sup>. Estos PAMs tienen una estructura helicoidal anfipática al entrar en contacto con la membrana bacteriana, así como la mayoría contienen alrededor del 50% de residuos hidrófobos promoviendo el contacto con la membrana<sup>41</sup>. Al intentar comprender mejor este modelo se han reportado resultados de simulaciones a múltiples escalas y experimentos de fluorescencia *in vitro* en vesículas unilaminares grandes (LUV) brindando una explicación general del efecto de un péptido helicoidal<sup>42</sup>. ii) PAMs con estructura hoja  $\beta$ , se estabilizan mediante enlaces disulfuro y se organizan para crear una molécula anfipática, suelen ser moléculas cíclicas, se conocen alrededor de 400 péptidos incluyendo la familia de las defensinas, aunque para el 2017 por medio de simulaciones de dinámica molecular (DM) se analizaron los poros formados por el péptido de protegrina-1(RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH<sub>2</sub>) sobre la superficie de la membrana bacteriana de cepas Gram-positivas y Gram-negativas; es importante resaltar que debido a la estructura que presenta, estos péptidos están más ordenados en solución acuosa y no experimentan cambios tan drásticos como los péptidos helicoidales tras la interacción de la membrana<sup>43,44</sup>. Finalmente, iii) aquellos llamados bobina extendida que carecen de las estructuras secundarias a menudo son ricos en ciertos aminoácidos, incluidos residuos de glicina, arginina, triptófano, prolina e histidina, así como su estructura se estabiliza solo por

puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals con los lípidos de la membrana<sup>41</sup>, ver Figura 2.



**Figura 2.** Estructuras de los péptidos antimicrobianos. (a)  $\alpha$  helicoidal (magainina), (b) Hoja  $\beta$  (defensina) y (c) Bobina extendida (indolicidina). Los residuos cargados positivamente son de color **azul**, mientras que los hidrófobos son **rojos**<sup>38</sup>.

En la actualidad se han diseñado PAMs con modificaciones estructurales de la cadena de aminoácidos con el objetivo de i) generar péptidos más cortos, que sintéticamente sean más viables y económicos ii) aumentar la actividad antibacteriana, iii) reducir la toxicidad. Lo anterior se pudo observar por lo reportado por Mahlapuu *et. Al.*, donde los cambios estructurales en el motivo mínimo de la lactoferricina bovina (LfcinB) RRWQWR pueden influir en la actividad antimicrobiana de los péptidos resultantes, al igual que otros grupos reportaron que la polivalencia del motivo RRWQWR aumenta la actividad antibacteriana<sup>45</sup>. Igualmente, Cárdenas *et. al.*, al realizar algunas sustituciones de aminoácidos de arginina (Arg) por lisina (Lys), demostraron que secuencias con sustitución del tipo Arg/Lys presentaron una actividad antibacteriana similar a la de los péptidos con Arg contra *E. coli* ATCC 25922 y ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923, así como también aislados clínicos del instituto nacional de cancerología de Colombia; sugiriendo que dicha sustitución no afecta significativamente a la actividad

antibacteriana, pero fue significativa en ensayos de sinergia con antibióticos como ciprofloxacino y frente a la reducción de la actividad hemolítica<sup>46</sup>.

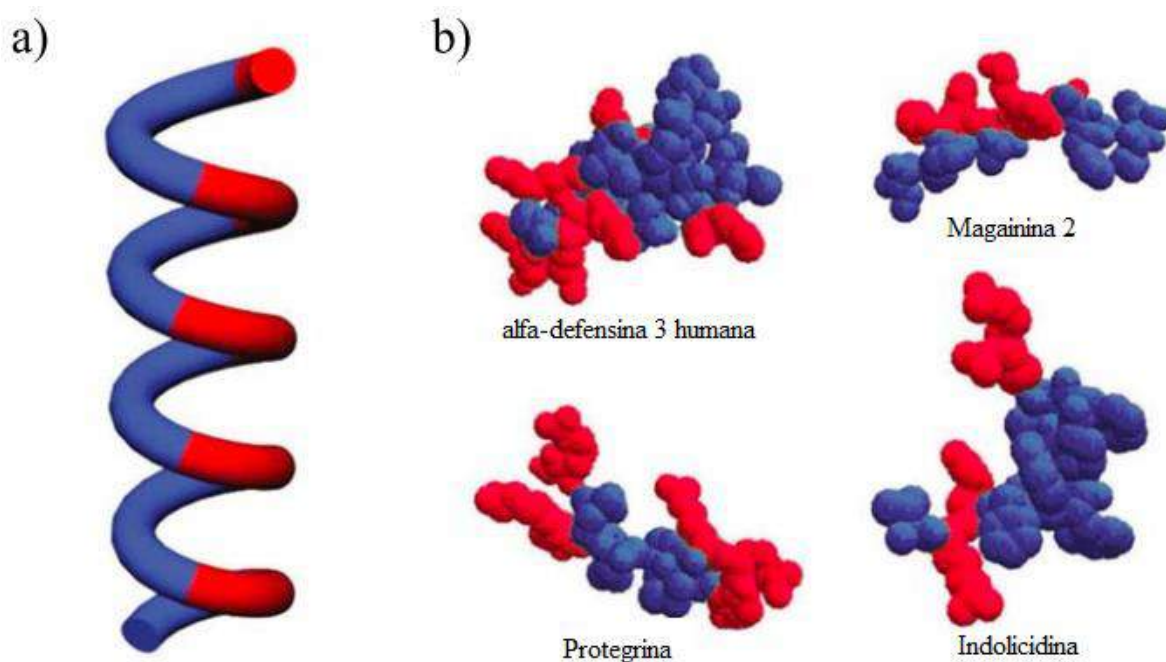
### **2.2.2 Relación estructura-actividad**

Otra de las características importantes en la actividad de los péptidos antimicrobianos es su carga neta, la mayoría de ellos tienen una carga neta positiva, que va desde +1 hasta +9, puesto que la interacción inicial con la membrana es principalmente electrostática, permitiendo un aumento en la concentración de las moléculas peptídicas unidas a la interfaz de la membrana<sup>41</sup>. Sin embargo, por lo general siempre hay una carga óptima para la actividad, con una mayor carga más allá de este valor, resultaría en una disminución de la actividad, así como se demostró para los análogos de magainina 2 (GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-HN<sub>2</sub>), donde una carga mayor hace que la actividad aumente mientras que la hidrofobicidad y la estructura permanecen constantes, pero que con cualquier adición de residuos catiónicos más allá del punto ideal disminuye notablemente la efectividad del péptido<sup>47</sup>. El efecto de la carga sobre la actividad también se ha demostrado para los análogos de melitina (GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH<sub>2</sub>) en los que la eliminación de la cola catiónica C-terminal resultó en una disminución de cinco veces en la actividad hemolítica y una disminución significativa en la unión a la membrana<sup>48</sup>. En la actividad de los PAMs, también la carga de la membrana bacteriana juega un papel fundamental en la unión y selectividad de dichas moléculas teniendo en cuenta que estos tienen afinidad por los lípidos cargados negativamente como el fosfatidilglicerol (PG) y la cardiolipina en las membranas microbianas<sup>48</sup>.

Así mismo, la hidrofobicidad es una característica esencial para la interacción con las membranas, ya que controla la internalización del péptido en ella. Los PAMs normalmente contienen aproximadamente un 50% de residuos hidrófobos, los estudios han demostrado que aumentar la hidrofobicidad hasta un porcentaje mínimo puede aumentar la actividad frente las membranas celulares microbianas<sup>49</sup>, pero un

aumento adicional de esta más allá de un valor óptimo se ha correlacionado con una pérdida de la actividad y un aumento en la toxicidad en células de mamíferos<sup>41</sup>.

Tanto la carga, la estructura y la hidrofobicidad son importantes en la actividad antibacteriana de los PAMs, pero también lo es su estructura anfipática, incluso se ha demostrado que la anfipaticidad es más importante que la hidrofobicidad y la estructura secundaria para promover una fuerte unión del PAM a la membrana bacteriana. Casi todos los PAMs forman algún tipo de estructura anfipática al interactuar con la membrana y esta característica hace referencia a la proporción y la ubicación de los dominios hidrófilos (se une a los fosfolípidos) e hidrófobos (se une a los lípidos) en el péptido<sup>41</sup>, ver Figura 3.



**Figura 3.** a) Representación  $\alpha$ -helicoidal de una estructura anfipática con áreas hidrófilas (rojas) e hidrófobas (azules). b) Agrupación de residuos hidrófilos e hidrófobos de varios péptidos antimicrobianos. Tomada de: Curr Top Med Chem<sup>41</sup>.

En la Tabla 1, se presenta un resumen de las propiedades y características de los PAM.

**Tabla 1.** Resumen de las propiedades y características de los PAM.

Propiedad	Característica	Ejemplo	Ref.
Carga neta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Catiónicos (+1, +9)</li> <li>• Presencia de residuos de Lys, Arg, His</li> </ul>	LfcinB 20-25 (RRWQWR)	38
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aniónicos</li> <li>• Requieren Zinc como cofactor</li> <li>• Contienen regiones homopoliméricas de aspartato</li> </ul>	Surfactante pulmonar ovino (H-DDDDDDDD-OH) (H-GADDDDD-OH) (H-GDDDDDD-OH)	50,51
Hidrofobicidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contiene cerca de 50% de residuos hidrófobos (Trp, Val, Leu, Met, Tyr)</li> </ul>	LfcinB 20-25 (RRWQWR)  Melitina (GIGAVLKVLTTGLPALIS WIKRKRQQ-NH <sub>2</sub> )	38,52,53
Anfipaticidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proporciones hidrófilas e hidrófobas en la estructura peptídica</li> </ul>	Buforina II (TRSSRAGLQFPVGRVHR LLRK)  Protegrina-1 (RGGRLCYCRRRFCVCG R-NH <sub>2</sub> )	40,41

### 2.3 PAMs en la clínica

La capacidad que tienen los péptidos de actuar por diferentes mecanismos sobre distintos blancos no solo aumenta su eficacia antimicrobiana, sino que además disminuye las posibilidades a que se genere resistencia, así como reduce las posibilidades de adquirirlas simultáneamente sobre diferentes blancos de acción. De igual forma, puede que un péptido antimicrobiano presente distintos mecanismos de acción y tenga el mismo efecto antimicrobiano que los antibióticos convencionales, pero con efectos secundarios mínimos<sup>39</sup>. Esta terapia combinada con antibióticos actuales puede de la misma manera reducir la fácil aparición de resistencia a estos, así

como lo reportó Browne *et. al.*, donde la terapia de combinación con el péptido antimicrobiano DP7 (VQWRIRVAVIRK) erradicó la resistencia a la vancomicina y la azitromicina en aislados clínicos de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* y a su vez potenció la actividad generando sinergia con componentes del sistema inmunitario<sup>39</sup>.

Aunque en la actualidad, el número de estudios con PAMs va en aumento, se conocen muy pocas moléculas de naturaleza peptídica usadas en las últimas fases de investigación clínica; actualmente, hay alrededor de diez antimicrobianos basados en PAMs disponibles comercialmente (Tabla 2). Al igual que muchos de los antibióticos tradicionales, siete de estos compuestos peptídicos se aislaron de especies bacterianas, los tres restantes son derivados semisintéticos de compuestos ya existentes. Una limitante, es que todos estos fármacos basados en PAMs actúan sobre la membrana celular bacteriana, ya sea directamente (lisis de la membrana) o indirectamente (inhibición de la síntesis de la pared celular) facilitando el desarrollo apresurado de mecanismos de resistencia<sup>39</sup>.



**Tabla 2.** Antibióticos basados en péptidos disponibles comercialmente<sup>39</sup>.

Antibiótico	Origen	Objetivo	Clase	Mecanismo de acción	Indicación
Bacitracina	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacterias Gram-positivas	Péptido cíclico	Inhibe la síntesis de la pared celular	Infecciones de la piel
Dalbavancina	Teicoplanina	Bacterias Gram-positivas	Lipoglucopeptido	Inhibe la síntesis de la pared celular	Infecciones de la piel
Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Bacterias Gram-positivas	Lipopeptido	Lisis de membrana	Infecciones de la piel
Colistina	<i>Bacillus polymyxa</i>	Bacterias Gram-negativas	Péptido cíclico	Lisis de membrana	Infecciones por gramnegativos multirresistentes
Gramicidina D	<i>Bacillus brevis</i>	Bacterias Gram-positivas y algunas Gram-negativas	Mezcla de tres polipeptidos	Mezcla de tres polipeptidos	Infecciones de la piel y ojos
Oritavancina	Derivado de vancomicina	Bacterias Gram-positivas	Lipoglucopeptido	Lisis de membrana e inhibe la síntesis de la pared celular	Infecciones de la piel
Polimixina B	<i>Bacillus polymyxa</i>	Bacterias Gram-negativas	Polipeptido	Lisis de membrana	Infecciones del tracto urinario y del torrente sanguíneo
Teicoplanina	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Bacterias Gram-positivas	Glicopeptido	Inhibe la síntesis de la pared celular	Infecciones graves por grampositivos
Vancomicina	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Bacterias Gram-positivas	Glicopeptido	Inhibe la síntesis de la pared celular	Infecciones graves por grampositivos

Aunque la toxicidad es una de las principales limitaciones para efectuar un adecuado uso de las vías de administración, la poca correlación entre la actividad antimicrobiana *in vitro* y su eficacia *in vivo* es uno de los mayores obstáculos para el avance de estos fármacos hacia el desarrollo clínico, puesto que los PAMs que muestran valores bajos de CMI/CMB *in vitro* pueden perder su actividad *in vivo* debido a una rápida degradación proteolítica o unión a proteínas en el hospedero<sup>45</sup>. Su baja estabilidad metabólica es considerada otro factor importante que limita la aplicación clínica, dado principalmente a: i) una mala penetración en la mucosa intestinal, ii) tiempos de vida media cortos en el plasma sanguíneo y iii) la rápida eliminación de la circulación por el hígado y los riñones. Por lo anterior, la aplicación tópica es la vía de administración más común, sobre la herida o en el sitio de la cirugía, la aplicación en las mucosas como aerosoles nasales y similares; sin embargo, incluso tras la administración cutánea los péptidos son susceptibles a la degradación por parte de las enzimas proteolíticas tisulares<sup>45</sup>. Los costos de producción es considera otra de las limitaciones, los costos en los procesos también pueden retrasar el desarrollo clínico de los PAMs, sin embargo, hoy en día se cuenta con una serie de péptidos que se encuentran en alguna de las fases de ensayos pre-clínicos destinados a infecciones cutáneas como Omiganan (MBI226, CLS001) o Lytixar (LTX-109) así como algunos dirigidos a infecciones por catéter (CP22, MX-226) o infecciones por Gram-positivos (Mersacidin) entre otros (Tabla 3), desde la fase I a la fase preclínica<sup>45</sup>.

**Tabla 3.** PAMs en evaluaciones preclínicas<sup>45</sup>.

PAM	Origen	Fase clínica	Indicación	Administración
Pexiganan (MSI-78)	Análogo de magainina (Piel de rana)	Fase III	Úlceras del pie diabético infectadas	Crema tópica
Lytixar (LTX-109)	Peptidomimético antimicrobiano sintético	Fase I/II	Infecciones cutáneas por Gram-positivos no complicadas, impétigo y colonización nasal por <i>S. aureus</i>	Hidrogel tópico

hLF1-11	Derivada de la lactoferricina (humana)	Fase I/II	Bacteriemia e infecciones fúngicas en receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas inmunocomprometidos	Tratamiento intravenoso (en solución salina)
Novexatin (NP-213)	Derivada de defensinas (humana)	Fase II	Onicomycosis (infección por hongos en las uñas)	Tratamiento tópico
LL-37	LL-37 (humana)	Fase I/II	Úlceras venosas de la pierna difíciles de curar	Solución a base de alcohol polivinílico para administración en el lecho de la herida
PXL01	Derivada de la lactoferricina (humana)	Fase II	Prevención de la formación de adherencias posquirúrgicas en cirugía de la mano	Hidrogel a base de ácido hialurónico para administración en el sitio quirúrgico
Isegran (IB-367)	Derivado de protegrina 1 (leucocitos porcinos)	Fase II	Mucositis oral en pacientes que reciben radioterapia por cáncer de cabeza y cuello	Solución oral
Omiganan	Derivado de indolicidina (bovina)	Fase II/III	Infecciones de catéter y rosácea	Gel tópico

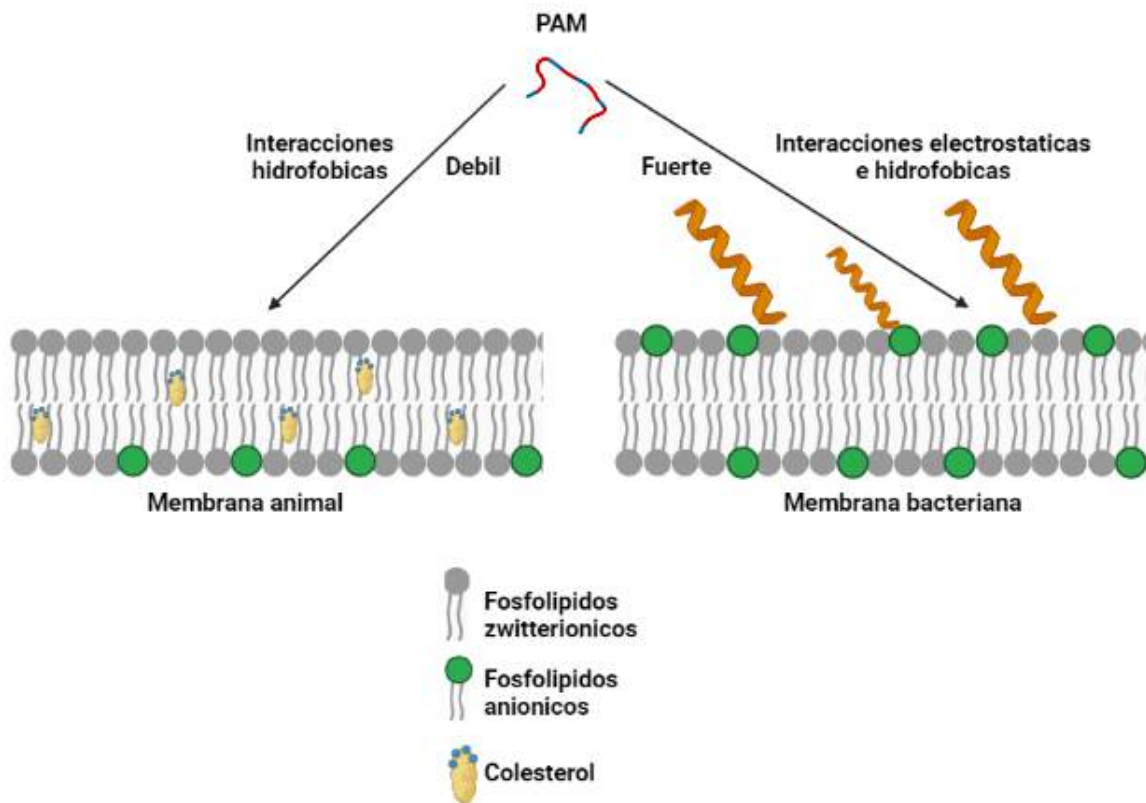
Por lo tanto, el desarrollo terapéutico de PAMs debe centrarse en optimizar cada compuesto para adaptarse al método más adecuado de administración, ya que se ha observado que modificaciones sintéticas como: i) la ciclación de los PAMs, ii) la incorporación de D-aminoácidos y análogos de aminoácidos no naturales, y iii) miméticos de péptidos con diferentes estructuras principales pueden reducir la toxicidad y/o aumentar la estabilidad y permitir mayores opciones de administración de fármacos<sup>45,54,55</sup>.

## 2.4 Mecanismo de acción de los PAMs

Desde el descubrimiento de los PAMs, los estudios de mecanismo de acción se han centrado principalmente en su actividad membranolítica, pero con el avance de las técnicas se ha logrado definir que también existen blancos intracelulares. Bajo este contexto, se ha dividido el mecanismo de acción en dos categorías: i) aquellos dirigidos a membrana y a ii) blancos intracelulares. Los PAMs que se dirigen a la membrana pueden tener o no tener interacciones a través de receptores, en la vía mediada por receptores como ejemplo se encuentran aquellos producidos principalmente por bacterias, como la nisina el cual tiene dos dominios: el primero se une con gran afinidad a la molécula de lípido II, un precursor de la pared celular y el segundo es el dominio formador de poros incrustado en la membrana; por otro lado, entre aquellos que actúan a través de la unión a membrana con lipopolisacáridos (LPS) de la superficie externa de bacterias Gram-negativas y ácidos teicoicos de bacterias Gram-positivas están la melitina, cecropina A (KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKA GPAVAVVGQATQIAK-Am) y magainina (H<sub>2</sub>N-GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKSCOOH)<sup>38,56</sup>.

La mayoría de los PAMs se dirigen a la membrana y funcionan al interactuar con los componentes de esta sin tener que relacionarse con los receptores necesariamente, esta relación se da debido a que la superficie externa de las bacterias Grampositivas y Gramnegativas contiene ácido teicoico y lipopolisacáridos los cuales le confiere una carga neta negativa que permite la atracción electrostática inicial con PAMs de carga catiónica; algo muy importante a recalcar es la selectividad que hacen los PAMs entre la membrana bacteriana y la membrana de las células eucariotas<sup>38</sup>. La capa exterior de la bicapa lipídica en las membranas bacterianas se compone principalmente de lípidos cargados negativamente, como fosfatidilglicerol y cardiolipina, mientras que la de las membranas animales se compone de fosfolípidos zwitteriónicos como fosfatidilcolina, esfingomiélin y otros de carácter neutro como el colesterol, en este tipo de membranas la mayoría de los lípidos cargados negativamente se encuentran en

internamente orientados hacia el citoplasma (Figura 4). Posteriormente a las interacciones electrostáticas iniciales, los péptidos tienden a acumularse en la superficie y autoensamblarse en la membrana bacteriana alcanzado una concentración óptima; a partir de este punto el mecanismo de acción se comienza a clasificar en dos modelos: i) modelos de poro transmembrana y ii) modelos sin poro<sup>38</sup>.



**Figura 4.** Interacción de péptidos catiónicos con membranas animales y bacterianas<sup>38</sup>.

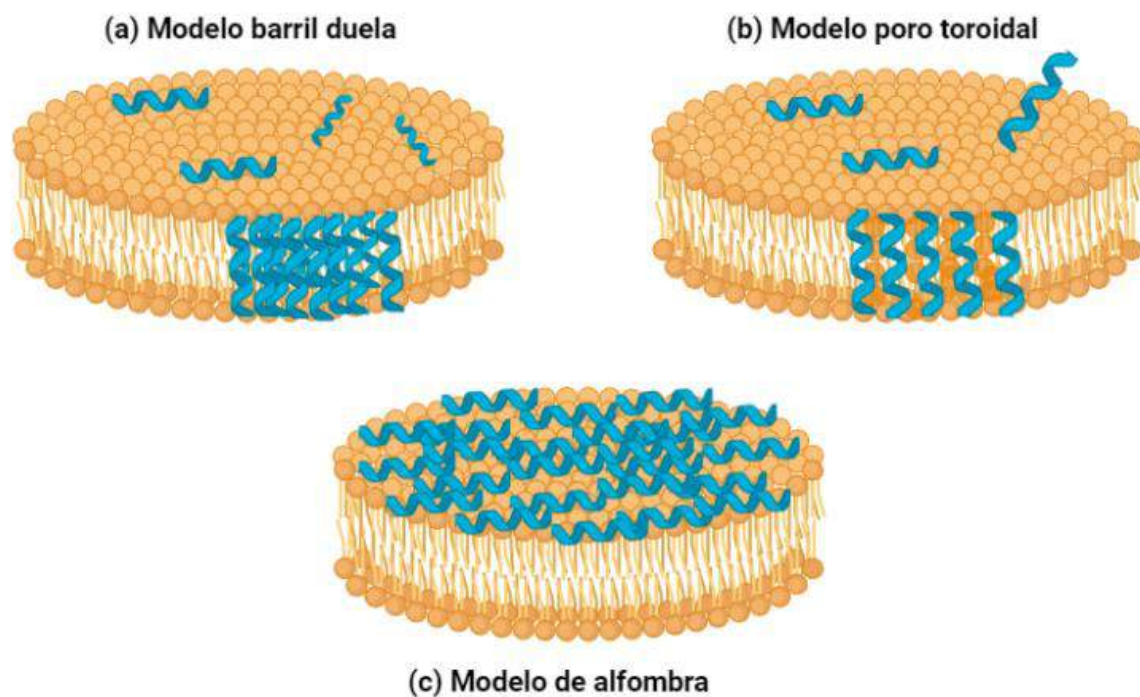
### 2.4.1 Mecanismo membranólítico de los PAMs

La internalización de los péptidos se da principalmente por las cargas presentes en la membrana bacteriana, esto debido a la presencia de fosfolípidos como el fosfatidilglicerol, la cardiolipina y por el ácido teicoico en bacterias Gram-positivas y los LPS en las Gram-negativas, que le proporcionan una carga negativa neta lo cual las convierten en un blanco de elección para los PAMs. Por otro lado, péptidos catiónicos permiten la interacción con la fracción hidrofílica de los fosfolípidos, mientras que la porción hidrofóbica interactúa con el núcleo hidrofóbico de la bicapa

lipídica permitiendo el acceso del péptido a través de la membrana; la formación de poros que se da a partir de estas interacciones se clasifican en tres grupos principalmente<sup>38</sup>. El primero, el modelo de barril duela los PAMs se dirigen inicialmente a la membrana, pero estos se insertan perpendicularmente en la bicapa lipídica lo que promueve interacciones péptido-péptido donde aquí la estructura anfipática (hoja  $\alpha$  y/o  $\beta$ ) es esencial en el mecanismo de formación de poros, puesto que las regiones hidrofóbicas interactúan con los lípidos de la membrana y los residuos hidrofílicos forman la luz de los canales (Figura 5 (a)). Se ha demostrado que solo unos pocos PAMs, como la alameticina (Ace-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phl), pardaxina (GFFALIPKIISSP GGKTLISAVGSALSSSGGQE) y la protegrina (RGGRLCYCRRRFC VCVGR), forman poros de barril duela<sup>38</sup>. En cuanto al segundo modelo, poro toroidal, los péptidos también se insertan perpendicularmente en la bicapa lipídica, pero ya no se presentan interacciones del tipo péptido-péptido, en cambio, estos inducen una curvatura de la bicapa lipídica por los poros formados a causa de la relación que hay entre los lípidos de la membrana y los péptidos (Figura 5 (b)). Como los poros son temporales tras la desintegración, algunos péptidos se trasladan al citoplasma y se dirigen a los componentes intracelulares; algunos ejemplos son la magainina 2, lacticina Q (MAGFLKVVQLLAKYGSKAVKWAWANKGKILDWLNAGQAIDWVVS KIKQILGI K), aureina 2.2 (GLFDIVKKVVGALGSL-CO-NH<sub>2</sub>) y melitina. Finalmente, ambos modelos de formación de poros (poro toroidal y barril) conducen a la despolarización de la membrana y a la muerte celular<sup>38</sup>.

Los PAMs también pueden actuar sin formar poros en la membrana, a este tercer modelo se le conoce como modelo de alfombra. En este caso, los péptidos se acomodan en paralelo a la bicapa lipídica y alcanzan una concentración ideal para cubrir la superficie de la membrana, formando así una "alfombra" (Figura 5 (c)), esto produce interacciones desfavorables en la superficie de la membrana y en consecuencia se perderá la integridad por medio de la producción de micelas; aquí la diferencia es que

este modelo no requiere interacciones péptido-péptido y tampoco necesita que el péptido se inserte para formar canales transmembrana. Se han reportado que la cecropina A, la indolicidina (ILPWKWPWWPWR-Am), la aureína 1.2 (GLFDIIKKIAESF-NH<sub>2</sub>) y la LL-37 (NH<sub>2</sub>-LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLR NLVPRTES-COOH) presentan este tipo de modelo como mecanismo de acción<sup>38</sup>.



**Figura 5.** Mecanismos de acción propuestos para los PAMs en bacterias<sup>38</sup>.

#### 2.4.2 Mecanismo no membranólítico de los PAMs

Se ha demostrado que los péptidos catiónicos de defensa del huésped modulan la inmunidad y la función de las células inmunitarias en condiciones fisiológicas y que estas actividades son la función principal de estos péptidos *in vivo*; así que además de matar directamente las bacterias, los PAMs, también pueden reclutar y activar células inmunitarias, resultando en una mayor destrucción microbiana y/o control de la inflamación, esto debido a que los péptidos son producidos por muchas células inmunitarias, como los neutrófilos y los macrófagos, células encargadas de encontrar invasores. Algunos PAMs pueden producir diferentes respuestas inmunitarias como: i) la reducción de los niveles de citoquinas proinflamatorias; ii) modulación de la

expresión de quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno; iii) estimulación de la angiogénesis; iv) mejora de la cicatrización de heridas; (v) activación de leucocitos; y vi) diferenciación de macrófagos y leucocitos<sup>57,58</sup>. En el 2013 para los péptidos reguladores de defensa innatos IDR: IDR-1002 (VQRWLIVWRIRK-NH<sub>2</sub>), IDR-HH<sub>2</sub> (VQLRIRVAVIRA-NH<sub>2</sub>) e IDR-1018 (VRLIVAVRIWRR-NH<sub>2</sub>) lograron demostrar la capacidad de protección frente a infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis* en modelos animales, esto se observó por medio de ensayos de microscopía electrónica con la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* tratada a altas concentraciones de péptidos IDR, y mediante ensayos de fluorescencia y citometría de flujo en cultivos celulares, cuyos resultados llevaron a que los autores concluyeran que la administración intrapulmonar repetida de péptidos IDR-HH<sub>2</sub> y IDR-1018 conduce a una supresión del crecimiento del bacilo y a la reducción del área neumónica en el modelo experimental de tuberculosis pulmonar en ratones<sup>59</sup>. Tewary *et. al.*, presentaron el papel de dos alarminas potentes, la beta defensina humana 2 (HBD2, GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP) y la beta defensina humana 3 (HBD3, GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK) en la mejora de la producción de IFN- $\alpha$  por células dendríticas plasmocitoides humanas y en la promoción de la inflamación; aquí fueron útiles ensayos de luciferasa para evaluar la transfección de las células con su plásmido, microscopía confocal para determinar el contorno celular y calorimetría de titulación isotérmica en el estudio de las interacciones ADN-proteína. Los resultados brindaron apoyo a la hipótesis de que las alarminas interactúan con diferentes receptores de células huésped para promover el reclutamiento y la activación de células inflamatorias<sup>60</sup>.

### 3. Diseño metodológico

Para el desarrollo de la monografía se tuvieron en cuenta algunas pautas; en primer lugar, se designó el tema que abarcaría el documento, posteriormente se propusieron



algunos criterios como un filtro de búsqueda documental, delimitando la información a la cual se quería acceder. Al seleccionar las fuentes a consultar, se creó una base de datos donde se recopilaron los artículos, tabulándose de acuerdo al año de publicación, autores, tema general, microorganismos de estudio y metodología utilizada y finalmente se da inicio a la lectura e interpretación de la información encontrada para la elaboración del marco teórico del documento.



Figura 6. Diseño metodológico.

### 3.1 Tipo de investigación

Esta investigación es de carácter documental, descriptivo y explicativo, en la cual se recopilaron y analizaron los datos obtenidos en otras investigaciones con el fin de generar un compilado de estudios que permitan al lector o investigador ahondar en la búsqueda de metodologías asociadas al mecanismo de acción de péptidos antibacterianos.

## **3.2 Universo, población y muestra**

### **3.2.1 Universo**

Información disponible en bases de datos en inglés y español: artículos de investigación, artículos de revisión, informes, libros y páginas web relacionadas con las metodologías asociadas al mecanismo de acción de moléculas peptídicas.

### **3.2.2 Población**

Información disponible en bases de datos en inglés y español: artículos de investigación, artículos de revisión, informes, libros y páginas web relacionadas con las metodologías asociadas al mecanismo de acción de péptidos dirigidos a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

### **3.2.3 Muestra**

Información disponible en bases de datos en inglés y español: artículos de investigación, artículos de revisión, informes, libros y páginas web relacionadas con las metodologías asociadas al mecanismo de acción de péptidos dirigidos a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, en especial aquellas especies de importancia en salud pública (*ESKAPE*).

## **3.3 Criterios de inclusión**

- Tipo de actividad: antibacteriana
- Tipo de metodología: microscopía, tinciones, analítica
- Tipo de blanco de acción: intracelular, membranolítico

## **3.4 Criterios de exclusión**

- Moléculas peptídicas con otras actividades que no sean antibacterianas
- Mecanismos de acción diferentes a la membrana o blancos intracelulares

### 3.5 Pregunta de investigación

¿Cuáles son las metodologías que permiten la identificación del mecanismo de acción de los péptidos antibacterianos sobre los diferentes blancos?

## 4. Metodología

### 4.1 Revisión bibliográfica

Para la elaboración de este trabajo se recolectó información a través de diferentes bases de datos (PUBMED, Nature, Oxford AcadeCMIIs Journal, Mendeley, Sciencedirect, SpringerLink, entre otras), seguido a ello se creó una recopilación de artículos, tesis y demás referencias bibliográficas a fines a la investigación, los cuales se leerán, interpretarán y analizarán para posteriormente escribir la revisión.

## 5. Resultados y discusión

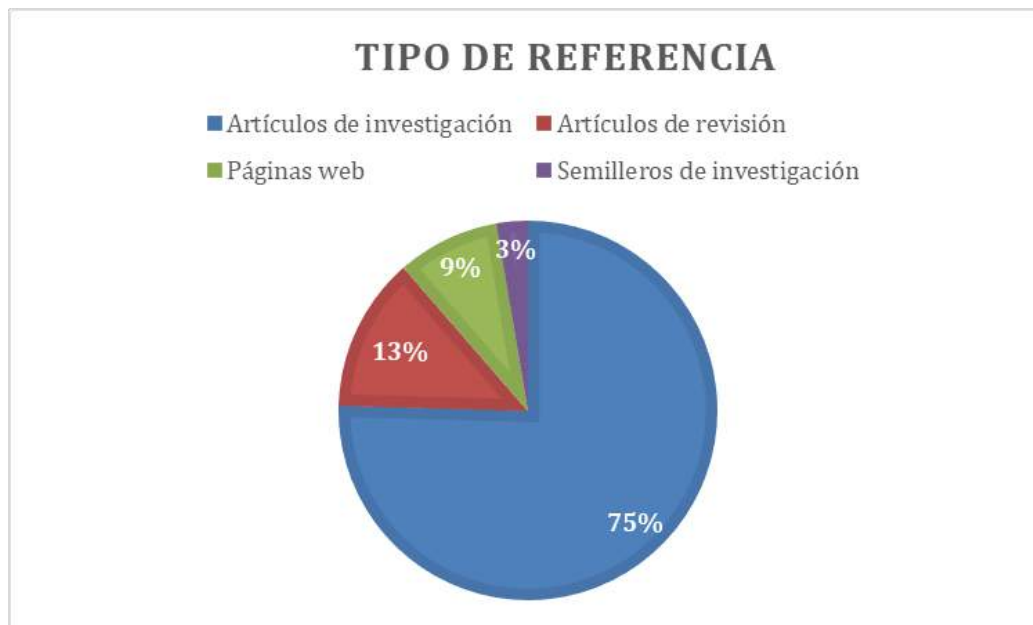
### 5.1 Revisión bibliográfica

De las fuentes consultadas el 89% están escritas en inglés frente al 11% que se consultaron en español como se observa en la Figura 7.



Figura 7. Idioma de referencias consultadas.

En los tipos de referencias consultadas los artículos de investigación corresponden a un 75%, un 9% de las referencias corresponden a páginas web, el 13% fueron artículos de revisión y un pequeño porcentaje del 3% fueron documentos de semilleros de investigación o revistas institucionales.



**Figura 8.** Tipos de referencias Bibliográficas.

Los años de publicación de las referencias bibliográficas consultadas están en un rango de tiempo desde 1922 a 2021, donde la mayoría de las referencias utilizadas para el desarrollo de esta revisión fueron publicadas en los años del 2013 al 2021 y un bajo porcentaje de referencias no cuentan con fecha de publicación.

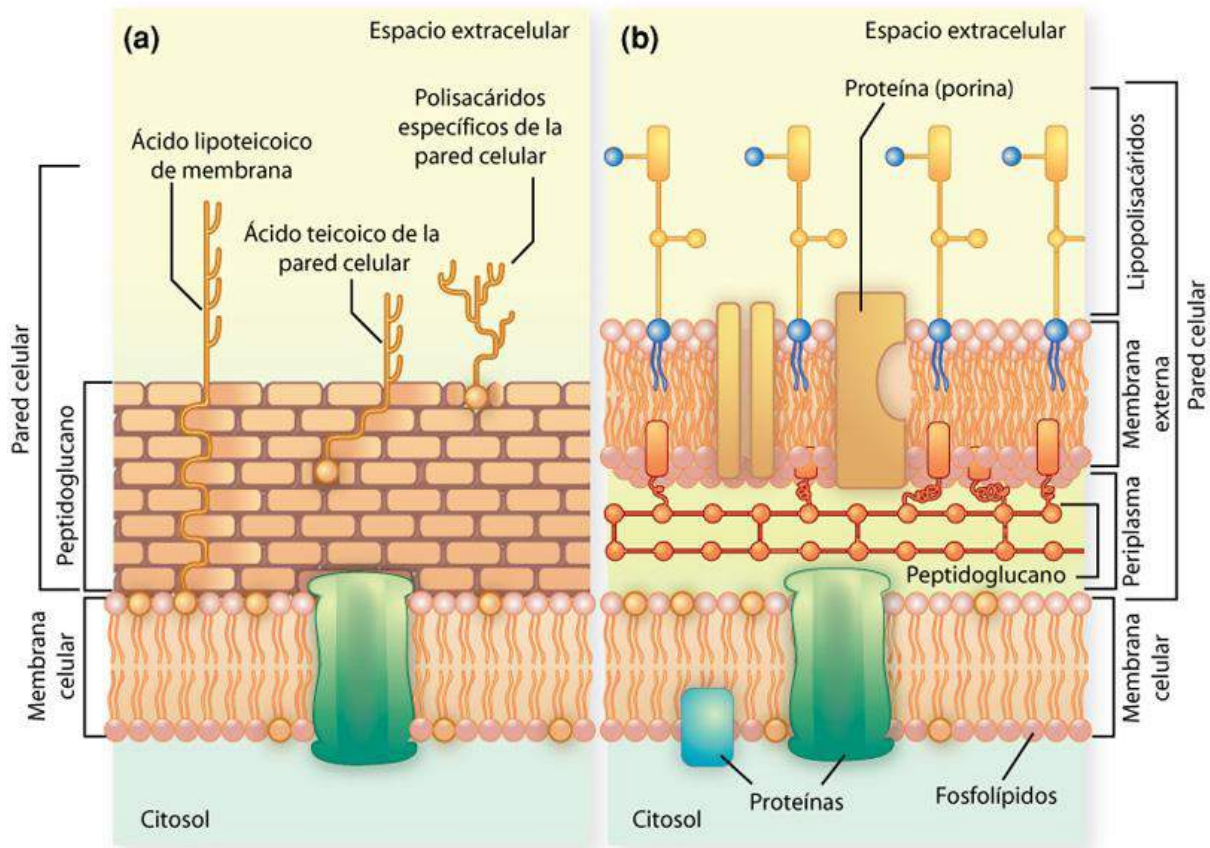


**Figura 9.** Años de publicación de las referencias utilizadas.

## **5.2 Metodologías usadas en la determinación de mecanismos de acción**

### **5.2.1 Metodologías asociadas a membrana**

La carga catiónica de los péptidos hace que se acumulen fácilmente en superficies cargadas negativamente de bacterias Gram-negativas (membrana externa) o Gram-positivas (pared celular), teniendo en cuenta que estas presentan superficies externas muy diferentes (Figura 10). A diferencia de las bacterias Gram-positivas, en bacterias Gram-negativas por un mecanismo de intercambio de carga, los PAMs pueden atravesar la membrana externa donde los péptidos compiten con cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  unidos a los lipopolisacáridos, para luego tener acceso a la pared celular, así como a blancos intracelulares<sup>61</sup>. Independiente de la conformación estructural bacteriana, varios estudios se han enfocado en determinar el mecanismo que utilizan diferentes compuestos después de la interacción inicial con las membranas, y el tipo de poro formado en ella.



**Figura 10.** Estructura de la composición externa de (a) bacterias Gram-positivas y (b) bacterias Gram-negativas. Tomada de: <https://biotechmind.wordpress.com/tag/gram-positivo/>

### 5.2.1.1 Dinámica molecular (DM)

La Dinámica Molecular, es una técnica de simulación por computadora la cual permite predecir la interacción de átomos y moléculas, siendo capaz de reproducir de manera aproximada el movimiento de las partículas. En la DM las partículas interactúan unas con otras mediante fuerzas haciendo que cambien sus posiciones convirtiéndose en un proceso cíclico de interacción y movimiento. Esta técnica, por lo general es usada en el campo de la biofísica y la ciencia de materiales, donde su campo de acción aplica a sistemas biológicos como proteínas. Para ello puede utilizarse cualquier lenguaje de programación, actualmente existen varios programas capaces de llevar a cabo las simulaciones y en general pueden utilizarse con diversos programas, algunos de ellos son; LAMMPS, OpenMM, CHARMM, NAMD y GROMACS<sup>62</sup>. Miahjlovic *et. al.*, con

el fin de investigar la formación de un tipo de poro en particular creado por péptidos derivados de melitina y alameticina utilizaron simulaciones de DM donde encontraron que la melitina forma poros toroidales mientras que la alameticina forma poros en forma de barril en membranas modelo<sup>63</sup>; así mismo, Lipkin *et. al.*, corroboraron bajo simulaciones previas que la protegrina-1 puede formar barriles  $\beta$  estables y arcos tetrámicos (medios barriles) en membranas sintéticas, esta investigación se amplió a otros péptidos con estructura similar como, taquipesina (KWCFRVCYRGICYRRCR), androctonina (RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY), gomesina (ACRRLCYKQRCVITYCRGR) y  $\theta$ -defensina (GFCRCLCRRGVCRCICTR)<sup>64</sup>. Igualmente, Lorenzo *et. al.*, se enfocaron en estudiar el efecto de la dimerización en el mecanismo de acción de la aureína 1.2 (AU 1.2) y un dímero AU ligado a lisina (AU)<sub>2</sub>K y su interacción con superficies análogas de membrana, utilizando simulaciones de DM donde la AU mostró estructuras desordenadas en solución acuosa mientras que (AU)<sub>2</sub>K exhibió una estructura de  $\alpha$  hélice. En cuanto al mecanismo de acción, los experimentos de liberación de carboxifluoresceína con LUV mostraron que ambos péptidos pueden permeabilizar las vesículas, aunque la fuga depende del aumento en la concentración de los péptidos. Los experimentos de microscopía mostraron que ambos péptidos inducen la formación de los poros y el dímero finalmente provoca la ruptura de las vesículas<sup>65</sup>.

### **5.2.1.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)**

Es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se ha implementado en estudios cuantitativos, cinéticos y termodinámicos. La aplicación fundamental de la espectroscopia de RMN es la determinación estructural, ya sea de moléculas orgánicas o biológicas y para ello es necesario la realización de diferentes tipos de experimentos de los cuales se obtiene una determinada información, esta técnica se ha empleado en química orgánica, química inorgánica y bioquímica, así como también ha terminado por extenderse a otros campos, como la medicina, en donde se obtienen imágenes por resonancia

magnética<sup>66</sup>. Para la elucidación estructural, los experimentos más utilizados son: i) espectro monodimensional de <sup>1</sup>H el cual da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula, ii) espectro monodimensional de <sup>13</sup>C que da información de los carbonos de la molécula, iii) espectros bidimensionales homonucleares que indican qué hidrógenos están unidos a qué carbonos<sup>66</sup>.

A partir de ensayos de RMN y simulaciones moleculares, se ha logrado demostrar la capacidad de la protegrina para formar barriles  $\beta$  en los poros de la membrana, así como se observa que la  $\theta$ -defensina y la androctonina carecen de suficientes residuos hidrofóbicos para una unión eficiente a la membrana, mientras que la taquiplesina se orienta paralelamente a la superficie de la membrana y para la gomesina se sugirió un mecanismo de alfombra a altas concentraciones<sup>64</sup>. En otros estudios relacionados con la evaluación de los péptidos en el mecanismo de acción y formación de poros membranolíticos, evaluaron la unión de monómeros y dímeros de protegrina a las membranas utilizando modelos implícitos de membrana (MIM) y ensayos de RMN de estado sólido cuyos resultados orientan a que la forma más probable de estos oligómeros es de  $\beta$ -barriles, en donde el grupo hidrofóbico de protegrina está orientado hacia el lípido y los enlaces S-S (puentes disulfuro) recubren la luz del poro<sup>67</sup>. Raheem *et. al.*, mediante RMN evaluaron el péptido secretado por el anfibio *Litoria aurea*, aureína 2.2 y sus análogos, los péptidos 73 (RLWDIVRRVWGWL-CONH<sub>2</sub>) y 77 (RLWDIVRRVWGWL-CONH<sub>2</sub>); donde encontraron que los péptidos no adoptan una estructura helicoidal  $\alpha$  continua, es decir, los análogos no eran helicoidales desde el residuo 1–13 como el péptido original<sup>68</sup>. En 2018 esta misma técnica se utiliza con el propósito de obtener más información sobre la destrucción a nivel atómico de células bacterianas tales como *E. coli* DH5 $\alpha$ , *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) y *S. aureus* (ATCC 25923); para ello se realizaron experimentos de RMN en presencia de dos péptidos basados en leucina-lisina P4 (NH<sub>2</sub>-LKWLKKL-CONH<sub>2</sub>) y P5 (NH<sub>2</sub>-LRWLRRL-CONH<sub>2</sub>) tras la interacción con las células microbianas y la liberación de metabolitos dependiente del tiempo de

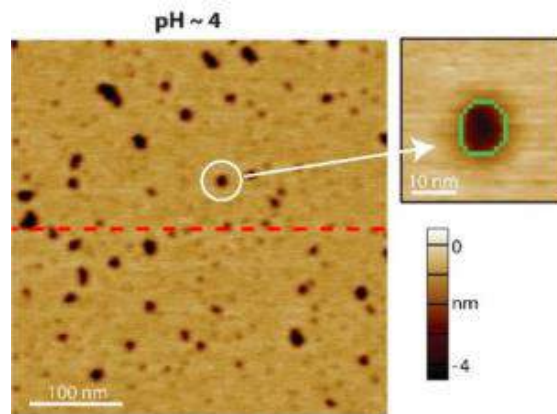


células lesionadas y muertas<sup>69</sup>, también se utilizaron mediciones de RMN en estado sólido con el fin de evaluar el efecto de los péptidos SS (SS-31) en la estructura de bicapa laminar, concluyendo que incluso a la concentración más alta utilizada el péptido SS-31 este no causó alteraciones estructurales importantes sobre las membranas modelo<sup>35</sup>; finalmente Laadhari *et. al.*, se centraron en la interacción de caerina 1.1 (GLLSVLGSAKHVLPVVPVIAEHL-NH<sub>2</sub>) y aureina 1.2 con bacterias Gram-positivas y Gram-negativas mediante RMN en estado sólido de <sup>2</sup>H informando que aureina 1.2, que actúa a través de un mecanismo de alfombra, demostró ser más perjudicial para la membrana en *E. coli* BL21 que caerina 1.1 que se sabe que forma poros transmembrana; con esto sugieren que el mecanismo de acción de los PAMs mencionados depende del entorno de la membrana y de la concentración de péptido en la superficie de la membrana lipídica<sup>70</sup>.

### **5.2.1.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

El Microscopio de Fuerza Atómica es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los nanonewtons. Al rastrear la muestra se recorre la superficie de muestras sólidas, semisólidas y relativamente planas mediante una sonda o punta de forma piramidal o cónica, de la cual se obtiene información morfológica en 3D a partir de imágenes topográficas de las mismas, así como parámetros superficiales tales como rugosidad, tamaño, distribución (homogeneidad) de partículas, entre otras; también se ha empleado en la determinación de otras propiedades de los materiales, tales como fuerzas de atracción, repulsión, viscosidad, elasticidad y dureza y generalmente el Modo de repiqueteo (del inglés "tapping mode") es uno de los modelos de uso más comunes en muestras biológicas, principalmente en medio líquido para obtener imágenes de muestras que sólo son estables en soluciones acuosas<sup>71</sup>. En esta técnica, la pantalla de visualización permite distinguir detalles en la superficie de la muestra con una amplificación de varios millones de veces; este tipo de microscopía puede realizar dos tipos de medidas: i) imagen y ii) fuerza.

En cuanto al mecanismo de alfombra Majewska *et. al.*, pudo determinar la interacción del péptido de catelicidina humana LL-37 a través un modelo de membrana lipídica multicomponente (BLM), que imita la membrana celular bacteriana, también se hizo uso de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS), imágenes AFM de alta resolución que muestran los efectos de la desintegración de la membrana y espectroscopía de reflexión-absorción infrarroja con modulación de polarización (PM-IRRAS) que muestra que la introducción de LL-37 provoca cambios en las cadenas de acilo de fosfolípidos; reuniendo los resultados de las técnicas anteriores lograron argumentar que LL-37 provoca cambios en la conformación en las moléculas de fosfolípidos, lo que conduce a la desintegración de la membrana, afectando el equilibrio eléctrico y la resistencia de esta, sugiriendo un mecanismo de alfombra para LL-37<sup>72</sup>. Para el 2019, se reportó una familia de péptidos de administración pH-dependiente (pHD) que causan poración en membranas bacterianas a bajas concentraciones; para entender su mecanismo de acción, evaluaron las relaciones estructura-función a través de mediciones del efecto del pH y concentración de péptidos en la unión a imitaciones de membrana, la estructura del péptido y la formación de poros de tamaño macromolecular en las membranas utilizando AFM la cual proporcionó una visualización directa de la estructura topográfica en las bicapas lipídicas<sup>73</sup>(Figura 11); en el 2020 Mescola *et. al.*, realizaron la evaluación del mecanismo de acción de la daptomicina, un lipopéptido cíclico con gran afinidad por los fosfolípidos cargados negativamente unidos al grupo principal de PG y que ha sido utilizado en la clínica desde el año 2003 para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram-positivas pero del cual aún no se conoce claramente su mecanismo de acción; basados en la AFM demostraron que la daptomicina afecta el comportamiento termodinámico de los lípidos que contienen fracciones de PG permitiendo una penetración más profunda en la bicapa lipídica en las regiones donde está presente este grupo de cabeza<sup>74</sup>.



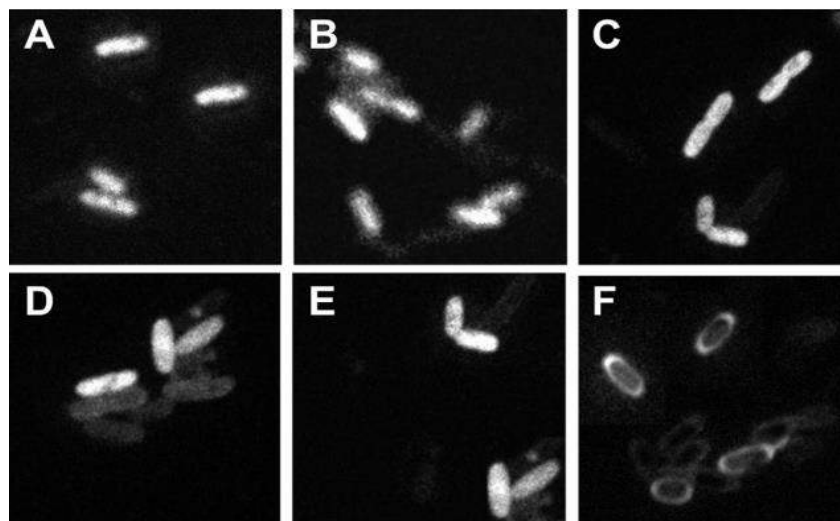
**Figura 11.** Imagen AFM a pH 4 que muestra fragmentos similares a poros en una bicapa de POPC incubada con pHD108 (Copyright. Journal of the American Chemical Society)<sup>73</sup>.

Es casi seguro que muchos PAMs se unen con gran afinidad a componentes presentes en la pared celular en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, por lo tanto, se ha postulado que la unión y la atracción de los péptidos a estos componentes pueden iniciar la destrucción bacteriana mediando la entrada del PAM en la bacteria. En bacterias Gram-positivas, se cree que la interacción con ácidos lipoteicoicos (LTA) facilita la penetración de los péptidos a través de la capa gruesa de peptidoglicano (PGN), quizás porque este actúa como una escalera, lo que permite que los PAMs alcancen y actúen sobre la membrana citoplasmática<sup>75</sup>.

#### 5.2.1.4 Microscopía confocal láser de barrido (CLSM)

La CLSM es una técnica que combina el microscopio de fluorescencia con la imagen electrónica, permitiendo obtener imágenes de mayor calidad mediante técnicas de filtrado que eliminan la luz proveniente fuera de foco sobre la muestra deseada permitiendo controlar la profundidad de campo siendo visibles las regiones que quedan enfocadas y el resto de la muestra aparecerá en negro. Esta herramienta es valiosa para obtener imágenes de alta resolución en la reconstrucción 3D de estructuras biológicas marcadas con fluorocromos y para el estudio de especímenes donde es de interés explorar su superficie; aquí la fluorescencia puede ser usada para excitar un colorante fluorescente determinado, para ubicar moléculas químicas

específicas asociadas a la muestra o incluso moléculas diferentes que pueden ser identificadas simultáneamente en la misma muestra por detección de fluorescencias distintas. Una de las ventajas de CLSM es que se trata de un método no invasivo y la muestra va a conservar sus características originales<sup>76</sup>. En el 2012 con el fin de dilucidar el mecanismo de acción del péptido de la buforina Jang *et. al.*, evaluaron la especificidad de la buforina Iib (RAGLQFPVGRLLRLLRLLR) sobre cepas bacterianas de *Bacillus subtilis* ATCC 62037, *S. aureus* ATCC 15752 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175, el cual gracias a ensayos de captación de 1-N-fenilnaptilamina (NPN) lograron determinar la actividad de permeabilización de la membrana externa de los péptidos y mediante CLSM evaluaron su localización en las diferentes cepas de estudio<sup>77</sup> (Figura 12). Di Xi *et. al.*, evaluaron la actividad del péptido trihíbrido-LHP7 en la membrana celular de *S. aureus* ATCC25923, evaluaciones llevadas a cabo con marcadores como FITC/plectasina y PI a través de imágenes de CLSM que confirmaron que LHP7 indujo una acción destructora permeabilizadora de la membrana, así como ensayos de fluorescencia no indicaron una despolarización total del potencial de membrana después del tratamiento con este péptido<sup>78</sup>.

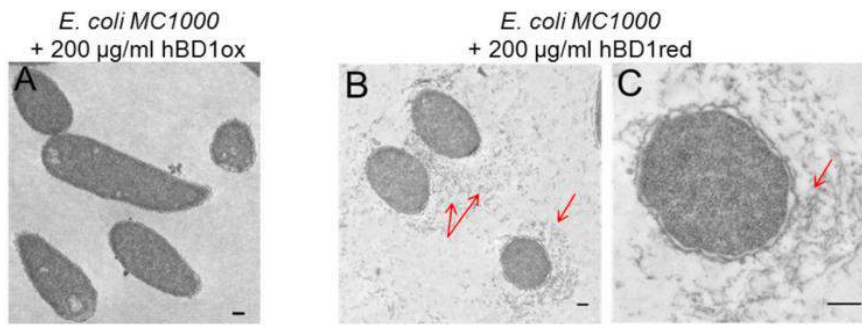


**Figura 12.** Imágenes microscópicas de fluorescencia confocal en células de *E. coli*. La microscopía muestra la localización de buforina Iib (A), Buf IIIa (B), Buf IIIb (C), Buf IIIc (D) y Buf IIId (E), además como comparación se incluye una imagen de *E. coli* tratada con magainin II (F) (Copyright. Elsevier)<sup>77</sup>.

### 5.2.1.5 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

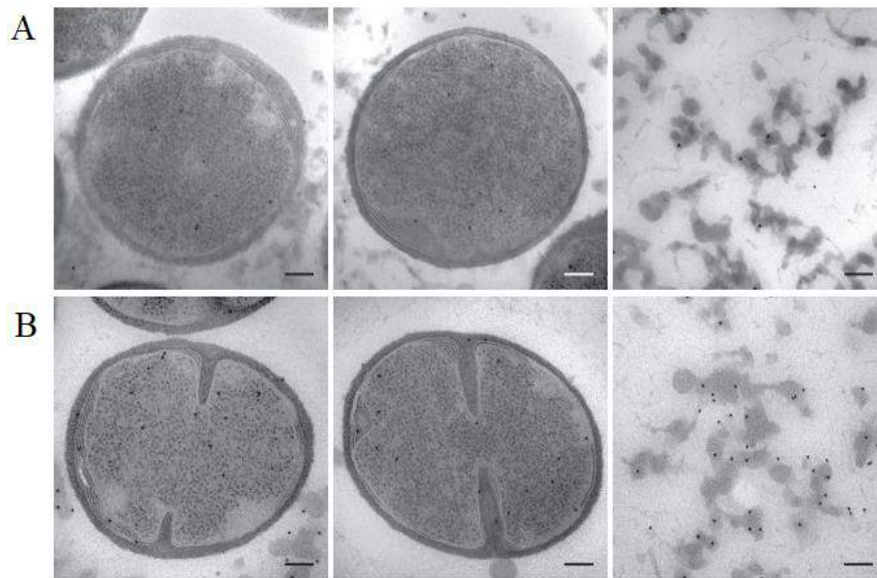
La MET es una técnica basada en un microscopio que hace uso de un haz de electrones para visualizar un objeto, pudiendo disminuirlo hasta un millón de veces a diferencia de un microscopio óptico el cual su potencia amplificadora está limitada por la longitud de onda de la luz visible. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden utilizarse en el estudio de minerales y de células a nivel molecular, así como también se utiliza en la microbiología para observar la estructura de virus; otra de sus utilidades es en la anatomía patológica, para poder dar un diagnóstico partiendo de la ultraestructura celular<sup>79</sup>. Se han realizado una serie de adaptaciones del MET para la observación de muestras biológicas trayendo consigo el desarrollo de equipos especiales para el procesamiento de estas y así poder obtener cortes de tejido ultrafinos que sean capaces de soportar el haz de electrones, así como métodos histológicos con fijadores químicos y agentes contrastantes especiales para la preparación de las muestras.

Como modificaciones de esta técnica está la microscopía crioelectrónica en la que la muestra se estudia a temperaturas criogénicas, evitando así la generación de artefactos; es una técnica que permite observar directamente sin tinciones ni fijaciones. En el 2017 Raschig *et. al.*, reportaron que la  $\beta$ -defensina 1 humana - hBD1 (DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK) es un péptido antimicrobiano endógeno que ha mostrado diferentes actividades antibacterianas entre sus formas oxidada (hBD1ox) y reducida (hBD1red), por ello estudiaron los mecanismos de acción contra cepas Gram-negativas de *E. coli* DSM 10729 y Gram-positivas como *S. aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* DSM 20044 utilizando MET, evidenciaron una estructura semejante a una red de naturaleza desconocida que rodea a las bacterias tratadas con la forma reducida pero no oxidada de hBD1<sup>80</sup> (Figura 13).



**Figura 13.** Imágenes de MET de *E. coli* MC1000 donde las células muestran fuertes defectos de membrana y se detectó una estructura gris desconocida alrededor de la bacteria (Copyright. Pathogens)<sup>80</sup>.

También la combinación de la microscopía con inmunomarcaje (Inmuno-MET) con partículas de oro es otra de las variaciones de este ensayo, que proporciona una visión clara de la localización en tiempo real y el mecanismo de acción de los péptidos a evaluar, asociándose un aumento de las partículas a la unión y agregación de estas moléculas peptídicas a la membrana bacteriana y a una posible interacción con blancos intracelulares<sup>11,37</sup>. Así lo podemos ver en los ensayos realizados para la caracterización y visualización de las acciones antibacterianas de CATH-2<sup>11</sup> (Figura 14), posteriormente usaron técnicas como MET de tinción negativa e inmunoMET con el fin de detectar cambios en la superficie bacteriana de *E. coli* ATCC 25922, ATCC4157, K12, LMC500, MC4100 y 506 (O78K80), después del tratamiento con el péptido y así lograr determinar su localización respectivamente<sup>37</sup>.



**Figura 14.** Imágenes MET con inmunomarcaje con oro representativas de células de *S. aureus* y la localización de CATH-2 a 40μM (A) y 80μM (B) (Copyright. American Society for Microbiology)<sup>11</sup>.

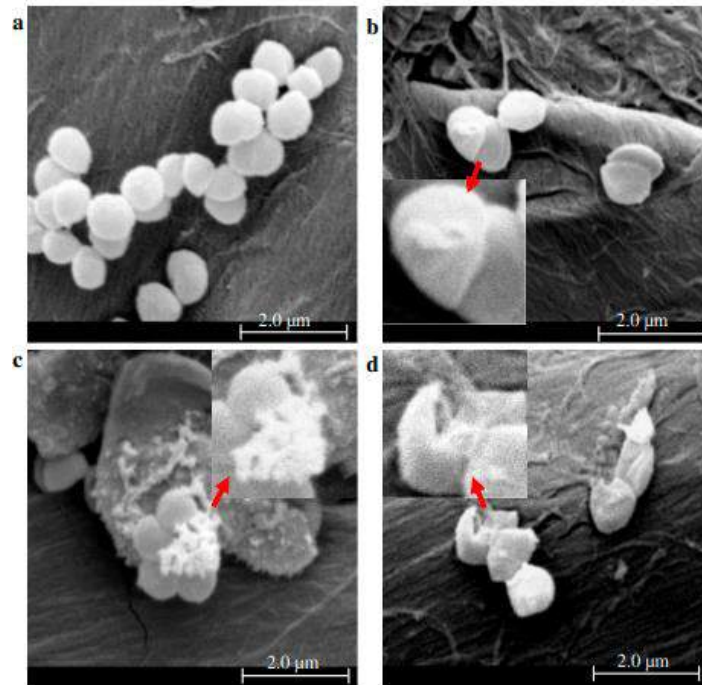
### 5.2.1.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Esta técnica hace uso de un tipo de microscopio electrónico capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra la cual se obtiene mediante la visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía con la muestra. A diferencia de una imagen óptica, el microscopio electrónico de barrido no forma una imagen real del objeto, sino que construye una imagen virtual. La MEB posee una gran profundidad de campo, que permite enfocar gran parte de la muestra de forma que las características más mínimas de esta pueden ser examinadas con gran amplificación<sup>81</sup>. La microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (por sus siglas en inglés FE-SEM) es una de las mejoras que ofrece esta tecnología; al igual que MEB utiliza un haz de electrones sobre la superficie de la muestra, la diferencia está en que FE-SEM brinda información con mayor resolución y con un rango de energía mucho mayor, brindando imágenes con un aumento entre 10x y 1.000.000x con mayor profundidad de campo que da una apariencia tridimensional, del mismo modo permite minimizar cargas sobre la muestra a observar causando menos daños. Con las anteriores características, permite

la observación topográfica, composicional, textural y cristalográfica de distintos tipos de especímenes<sup>82,83</sup>.

Para el 2015 se reportó un estudio acerca del mecanismo de acción de la taquiplesina I (NH<sub>2</sub>-KWCFRVCYRGICYRRRCR-CONH<sub>2</sub>) en membranas bacterianas de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923; para esta evaluación la integridad de la membrana celular y la lesión y muerte celular se investigaron mediante análisis de citometría de flujo de las células después de una tinción con diacetato de carboxifluoresceína o PI, los resultados indicaron que la taquiplesina I mata las bacterias al actuar sobre la membrana celular siendo esta el objetivo principal. Los cambios morfológicos inducidos por la taquiplesina en *S. aureus* también se observaron mediante MEB y MET donde la membrana celular se dañó, pero no se observó rotura de la misma, a diferencia de su acción sobre la membrana de bacterias Gram-negativas como (*E.coli*) que se observaron fibras que se extendían desde la superficie celular, deformación celular y ruptura de la membrana y la pared celular<sup>84</sup>. Retomando los estudios realizados por Di Xi *et. al.*, en el proceso de evaluar la actividad del péptido trihíbrido-LHP7 en la membrana celular de *S. aureus* ATCC 25923, también usaron técnicas de microscopía como MET y MEB en las células tratadas con dicho péptido en el cual observaron contracción celular, engrosamiento de la pared celular, fuga de contenido celular y alteración celular<sup>78</sup> (Figura 15). Yibing *et. al.*, usaron el péptido antimicrobiano A12L/A20L (Ac-KWKSFLKT FKSLKKTVLHTLLKAISS-CONH<sub>2</sub>) de 26 residuos como base para diseñar una serie de péptidos diastereoisómeros D y L y así estudiar el mecanismo de acción antibacteriano contra cepas Gramnegativas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922 al igual que en cepas Grampositivas como *S. aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633; esto mediante MEB con un aumento de 30K, siendo posible determinar los cambios morfológicos de la superficie celular antes y después de interactuar con los péptidos diastereoisómeros, en donde evidenciaron una menor interacción con la membrana eucariota zwitteriónica y un efecto significativo de daño a la membrana en las células bacterianas<sup>85</sup>.





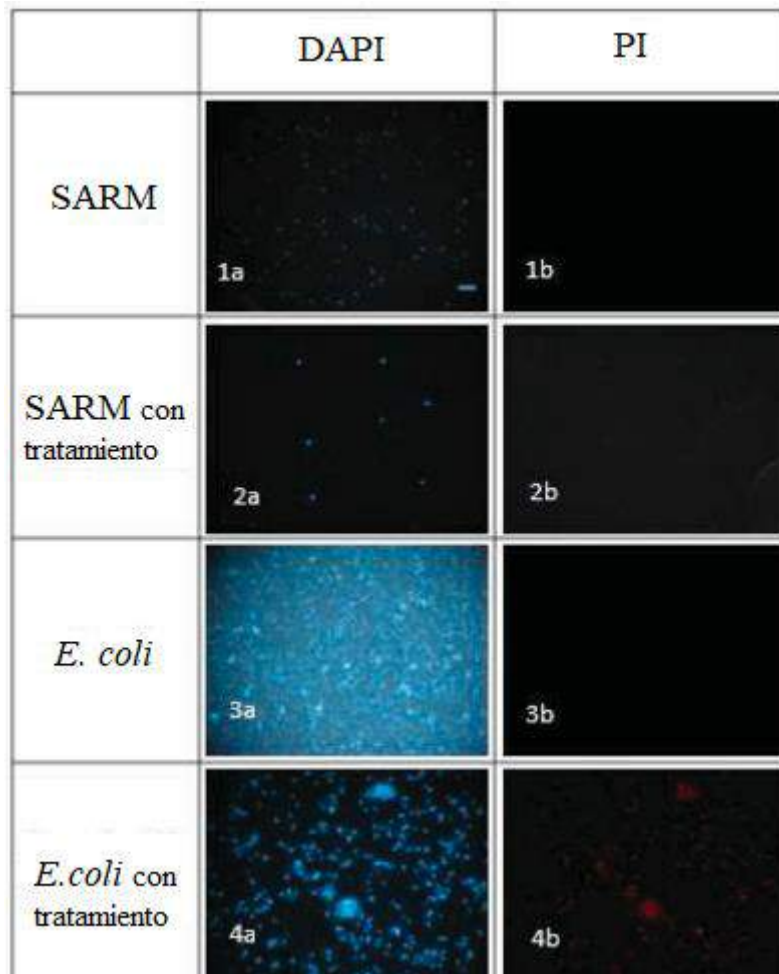
**Figura 15.** Imágenes de células de *S. aureus* ATCC25923 tratadas con LHP7. Las flechas rojas indican el encogimiento de las células (b), la fuga del contenido de las células (c) y la ruptura de las células (d), respectivamente (Copyright. Biometals)<sup>78</sup>.

### 5.2.1.7 Microscopía de fluorescencia

La fluorescencia, es conocida como un fenómeno de luminiscencia de vida corta y es la propiedad que tienen algunas moléculas como los fluorocromos y fluoróforos. Esta técnica es una forma especial de microscopía óptica, en el cual los objetos marcados con fluorocromos mediante tinción de anticuerpos o marcado con proteínas fluorescentes son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda y la imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y que ahora devuelven una luz con mayor longitud de onda<sup>86</sup>. La técnica de microscopía de fluorescencia se utiliza para detectar sustancias con autofluorescencia o sustancias marcadas con fluorocromos, además permite determinar la distribución de una sola especie de molécula, su cantidad y ubicación en el interior de la célula, así como estudios de localización e interacción y procesos intra y extracelulares<sup>86</sup>.

Para el 2016 Memarian *et. al.*, deciden estudiar el mecanismo de acción del péptido híbrido antimicrobiano PV3 (KKWRKLLKKLKLL) contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 y multidrogosresistentes (MDR) donde además de utilizar ensayos de imagen como microscopía de fluorescencia, FE-SEM, también hicieron énfasis en la eficacia de PV3 sobre las biopelículas de *pseudomonas* por medio de ensayos de tinción e imagen y así demostraron que PV3 redujo la biomasa del biofilm pero también redujo de manera significativa la viabilidad de las bacterias incrustadas en el biofilm de una manera dependiente de la concentración<sup>87</sup>; en relación a esto también la actividad antibiofilm del péptido TGH1 (TWEMVSGKKKNGVVLMIK) fue evaluada frente a Gram-negativos como *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 y demostrando la efectividad de este PAM para prevenir la formación de biopelículas en rangos de concentración inferiores a 1xCMi, así como el daño de membrana observado tras el tratamiento con PV3 durante 30 minutos, pudiéndose observar que la estructura de la membrana bacteriana comienza a perderse por la vacuolización celular y después de 2h de tratamiento, la forma de las células se vuelve irregular, con una membrana celular completamente colapsada junto con la salida del contenido citoplasmático<sup>88</sup>. Así mismo, Singh *et. al.*, hicieron uso de esta técnica para mostrar la actividad antibacteriana de péptidos heterogéneos  $\alpha/\alpha$ -AA lipidados (derivado de ácidos nucleicos peptídicos quirales (PNA)  $\alpha$ ) contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, donde la microscopía de fluorescencia en la cual se usó DAPI para teñir células bacterianas vivas y muertas y PI solo para teñir las células muertas, mostró después de 2 horas de tratamiento fluorescencia roja en PI, con lo cual los autores sugieren que el mecanismo de acción de estos péptidos heterogéneos es la ruptura de la membrana bacteriana con mayor expresión en bacterias Gram-negativas<sup>89</sup>(Figura 16); también, diversos estudios han demostrado que la microscopía de fluorescencia es una técnica importante y muy utilizada cuando de evaluar la permeabilización de la membrana se trata, desde péptidos aislados de veneno de *Polybia paulista* (polybia-MPI) (IDWKLLDAAKQIL-NH<sub>2</sub>) y sus análogos<sup>90</sup>, aquellos provenientes de la piel de los anfibios como la rana *Xenopus clivii* (CPF-C1) (GFGSLLGKALRLGANVL-

NH<sub>2</sub>)<sup>91</sup> hasta péptidos quiméricos de penetración celular como el transportan 10 (AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH<sub>2</sub>), donde el ensayo de microscopía generalmente va acompañado de tinciones celulares con PI y FITC principalmente<sup>92</sup>.



**Figura 16.** Microscopía de fluorescencia de células bacterianas tratadas con C16-K-RBB2 durante 2h, (1a) Control de DAPI, (1b) Control de PI, (2a) SARM, teñido con DAPI y tratado con compuesto, (2b) SARM, teñido con PI y tratado con compuesto, (3a) Control de DAPI, (3b) Control de PI (4a) *E. coli*, teñido con DAPI y tratado con compuesto, (4b) *E. coli*, teñido con PI y tratado con compuesto. (Copyright. Eur J Med Chem)<sup>89</sup>.

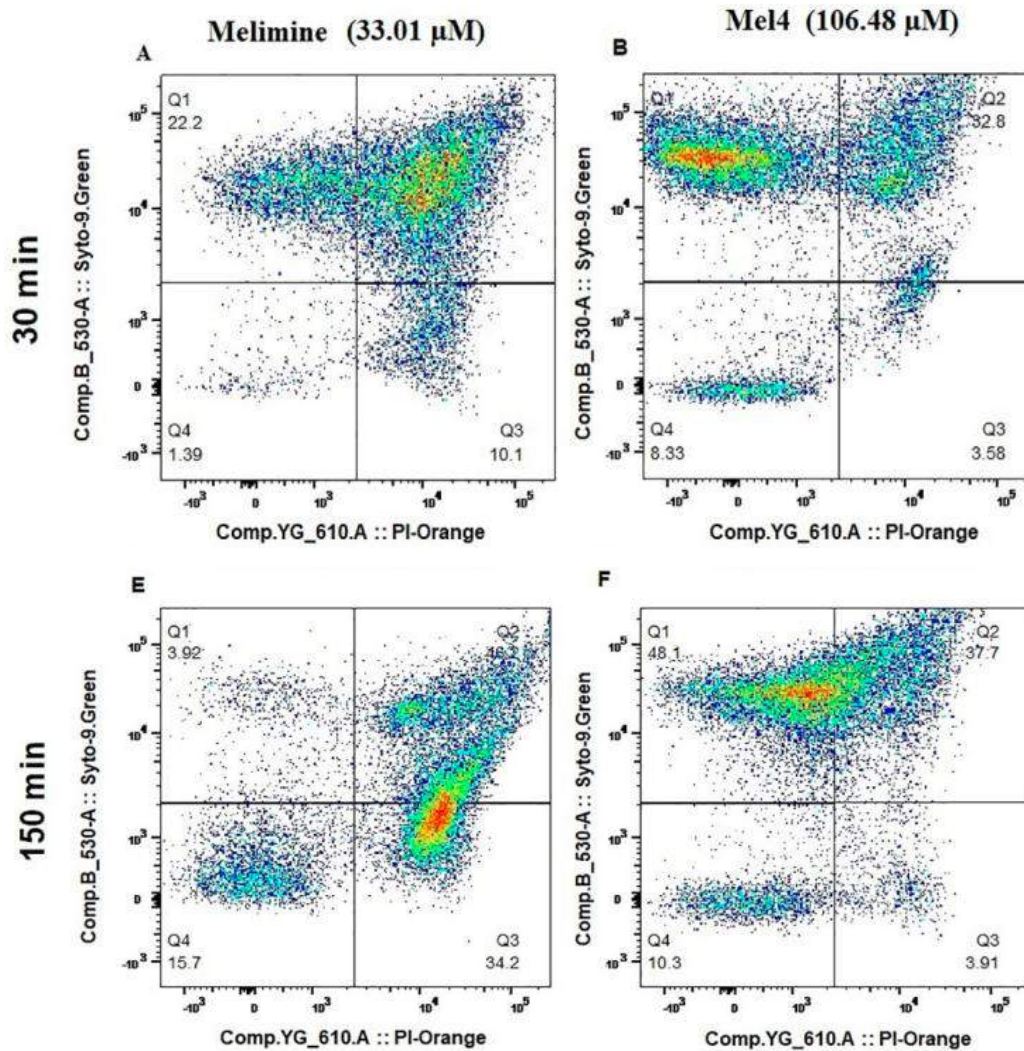
### 5.2.1.8 Citometría de flujo

Es una técnica de análisis basada en la fluorescencia que permite identificar a diferentes poblaciones celulares simultáneamente por medio de luz láser, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño y complejidad de las células y clasificándolas según sus características morfológicas y presencia de biomarcadores, aunque también

permite el análisis multiparamétrico simultáneo de otras características físicas y químicas, evaluando un promedio de dos mil partículas por segundo. En esta técnica las células suspendidas en un fluido atraviesan un finísimo tubo sobre el que incide un rayo de luz láser y esta luz que es transmitida y dispersa al pasar las células se recoge por medio de unos dispositivos de detección<sup>93</sup>. El marcaje celular generalmente consiste en anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos que cuando son excitados emiten fluorescencia de distintas tonalidades a diferentes longitudes de onda. La citometría de flujo tiene muchos alcances en la investigación, acción en campos como la microbiología, hematología, inmunología, citología, patología, así como en el monitoreo del contenido de ADN, expresión fenotípica, flujo de calcio, proliferación y apoptosis<sup>93,94</sup>.

Con ayuda de las anteriores técnicas de laboratorio ya mencionadas se han publicado resultados de ensayos que han ayudado a elucidar algunos de los mecanismos de acción como la actividad antiestafilocócica (*S. aureus* ATCC 6538 y aislados clínicos) de Mel4 (KNKRKRRRRRRGGRRRR) y su péptido precursor melimina (TLISWIKNKRKQRP RVSRRRRRRGGRRRR), Yasir *et. al.*, evaluaron la interacción de los péptidos con LTA con la membrana citoplasmática utilizando colorantes como DiSC (3)-5, Sytox green, Syto-9 y PI. Para examinar la despolarización de la membrana, midieron la liberación del colorante sensible al potencial de membrana con yoduro de 3,3'-dipropiltiadicarbocianina (DiSC35), se utilizaron colorantes Sytox Green y PI para determinar si los péptidos podrían dañar las membranas citoplásmicas y finalmente con el uso de citometría de flujo determinar la capacidad de los compuestos peptídicos para permeabilizar la membrana citoplasmática de *S. aureus*. Ambos péptidos terminaron dando como resultado la lisis celular y la muerte después de 24 horas de exposición, así como sugieren que los dos tienen una relación con LTA pero Mel4 expresa su interacción de manera más débil<sup>95</sup> (Figura 17). De la misma manera han investigado el mecanismo de acción de péptidos derivados de melitina como la MDP1 (GIGAVLKVLTTGLPALIKRKRQQ) y MDP2 (GIGAVLKWLPALIK RKRQQ) contra

cepas ATCC y aislados clínicos de *S. aureus* ATCC 6538 y cepas Gramnegativas (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853); los resultados reportados para los ensayos de citometría de flujo, liberación de ADN y calceína indicaron una actividad antibacteriana dependiente del tiempo, los análisis MEB demostraron efectos dependientes de la dosis y el tiempo de los péptidos sobre las bacterias con la formación de vesículas o poros así como la lisis celular; con lo anterior los autores lograron demostrar que MDP1 y MDP2 tienen la capacidad de alterar la integridad de las membranas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas provocando la muerte a través de daños en la membrana<sup>96</sup>. Ya para el 2017, Raschig *et. al.*, con el fin de observar la permeabilización de membrana usando liposomas generados a partir de *E. coli* con la propósito de imitar una membrana citoplasmática humana, compuesta de POPC: colesterol (3:2), los ensayos fueron controlados a través de señales fluorescentes en respuesta a diferentes concentraciones de los péptidos en donde desmostaron después de un tiempo fuga del contenido intracelular en los liposomas bacterianos pero no en los modelos de liposomas humanos; para evaluar más a fondo el posible ataque de hBD1red contra la membrana citoplasmática bacteriana emplearon un ensayo de citometría de flujo, en donde detectaron la despolarización de la membrana donde aproximadamente el 80% de las bacterias presentan membranas despolarizadas por parte del péptido reducido<sup>80</sup>. Finalmente, estos ensayos permitieron que los autores concluyeran que los péptidos antibacterianos en mención actúan con frecuencia en la membrana celular bacteriana ocasionando la formación de poros, la ruptura del potencial de membrana y la muerte celular bacteriana repentina<sup>80</sup>.



**Figura 17.** Imágenes de permeabilización de la membrana celular de *S. aureus* con colorantes Syto-9 (permeable a la membrana) y Yoduro de propidio (tinción intercalante de ADN) (Copyright. PLoS One)<sup>95</sup>.

### 5.2.1.9 Tinción y liberación de colorantes

Una tinción o coloración es una técnica que hace parte de uno de los métodos de tinción *in vitro* y que se considera un coadyuvante en microscopía para mejorar el contraste en la imagen vista al microscopio. Los colorantes son sustancias que usualmente se utilizan en biología y medicina para resaltar estructuras en tejidos biológicos que van a ser observados con la ayuda de diferentes tipos de microscopía; estos pueden ser utilizados para aumentar la definición y examinar grandes cortes. El ensayo de permeabilización de tintes implica el tratamiento de las células con un surfactante suave el cual tiene como finalidad disolver la membrana celular para

permitir que las grandes moléculas de colorante puedan acceder a las estructuras del interior de las células<sup>68</sup>. En varios estudios se utilizan colorantes sensibles al potencial de membrana como DiSC35 y piranina para evaluar los impactos en el potencial eléctrico transmembrana y el gradiente de pH, respectivamente, así como también se trabaja con ensayos de absorción de tintes fluorescentes como naranja de acridina, yoduro de propidio, SYTOX Green, NPN, o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosidoentre (ONPG), entre otros<sup>68,97</sup>.

En otros ensayos utilizados para esclarecer el mecanismo de acción de estas moléculas peptídicas, están aquellos que permiten observar la fuga del contenido citoplasmático y/o el proceso de muerte celular mediada por la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros. Bin *et. al.*, dilucidan el mecanismo de un péptido aislado del ciempiés *Scolopendra subspinipes mutilans* al cual se denominó péptido similar a la lactoferricina B (LBLP) (RMKKLGNHVKVSCERNTKRCKAI); los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular se midieron utilizando H2DCFDA, un indicador de ROS permeable a las células, esta sonda no es fluorescente en su forma natural; sin embargo, se somete a un proceso dentro de la célula que da como resultado la formación de un producto fluorescente (diclorofluoresceína), resultados que indicaron una mayor intensidad de fluorescencia intracelular para *E. coli* BW25113 después de la despolarización de la membrana celular<sup>98</sup>. Igualmente, ensayos como la fuga de dextrano y la evaluación de la fuga de moléculas pequeñas en vesículas fueron empleadas en el trabajo de Kim *et. al.*, en el proceso de relación del mecanismo de acción de péptidos llamados péptidos de administración pH-dependiente (pHD)<sup>73</sup>.

Teniendo en cuenta que estructuralmente la composición de la membrana en bacterias Gram-negativas tiene algunos cambios que las diferencian, también se ha visto necesario estudiar e identificar el mecanismo de los PAMs sobre estas estructuras; Sun *et. al.*, realizaron la modificación del péptido de 11 residuos de LFCinB18–28 (KCRRWQWRMKK) mediante sustitución de aminoácidos y se investigaron las actividades antibacterianas en *E. coli* UB1005 y los mecanismos de acción de los

péptidos modificados KW-WK (KWRRWQWRRWK), FP-PF (FPRRWQWRRRPF), FW-WF (FWRRWQWRRRF) y KK-KK (KKRRWQWRRRKK). Con la finalidad de evaluar la capacidad de permeabilización de la membrana externa bacteriana emplearon ensayos de absorción de NPN siendo a 1  $\mu$ M el valor alcanzado para la permeabilidad de la membrana externa superior al 50%; la capacidad de permeabilización de la membrana celular interna bacteriana la evaluaron mediante el ensayo ONPG. Al haber una rotura de la membrana celular, el tinte DiSC3-5 ingresa a las células el cual su concentración se analizó midiendo la intensidad de la fluorescencia de modo que esta iba aumentando gradualmente en *E. coli* UB1005, también usaron PI para marcar con fluorescencia los ácidos nucleicos en las células bacterianas al ser interrumpida la integridad de la membrana citoplasmática<sup>99</sup>. NK-18 por otro lado, es un derivado de una proteína de mamífero (NK-lisina) cuyo potencial en la clínica fue evaluado frente a *E. coli* CMCC 44102 y *S. aureus* CMCC 26003 mediante el ensayo de permeabilidad de la membrana externa usando la sonda fluorescente NPN, demostrando que NK-18 puede inducir la incorporación de dicha sonda en la membrana celular bacteriana cuya fluorescencia iba en aumento dependiendo de la dosis y tiempo de interacción con el péptido; así como también el efecto de NK-18 sobre membrana interna se midió a través de la liberación de  $\beta$ -galactosidasa citoplásmica, puesto que esta solo puede liberarse como consecuencia de una alteración y/o compromiso en la membrana interna bacteriana<sup>12</sup>.

### 5.2.2 Metodologías asociadas a pared celular

Experimentos recientes de células unidas a sondas fluorescentes han revelado que los PAMs pueden no estar únicamente distribuidos sobre la superficie bacteriana, sino que también están asociados con la división y la remodelación de la pared, por lo tanto, pueden interferir en estos procesos y causar lisis celular. Dado que aún se estudia la penetración de los péptidos en la membrana celular y su entrada en la célula, se han publicado ensayos que ofrecen la oportunidad de analizar los mecanismos antibacterianos en otros blancos siendo los componentes de la pared celular que están

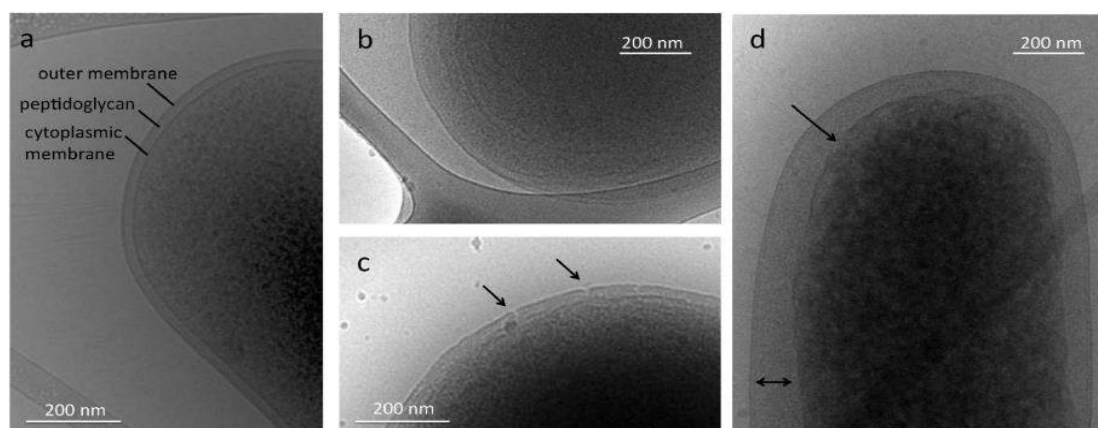


cargados negativamente como el ácido teicoico y el ácido lipoteicoico importantes para la acción de los PAMs<sup>61</sup>. En estudios realizados se evidencia que GL13K (GKIIKLGASLKLL-NH<sub>2</sub>), causa daños en la pared celular en la bacteria oral Gram-positiva *Streptococcus gordonii* previniendo la formación y crecimiento de biopelículas; en especial, las imágenes FE-SEM revelaron dos tipos de morfologías de pared rota: i) ruptura de la pared celular bacteriana y ii) aquellas que muestran bacterias con paredes celulares rotas que no conservaron sus protoplastos, dejando estructuras vacías en forma de caparazón de la pared bacteriana<sup>100</sup>.

El mecanismo de acción sobre la pared fue ilustrado mediante el uso de la oritavancina, un lipoglucopeptido análogo de la vancomicina, que presenta un conjunto de mecanismos que van desde la inhibición de la síntesis PGN, la perturbación de la integridad de la membrana hasta la actividad bactericida. Se ha informado que este péptido se une a la fracción alanina-alanina del lípido II y también al puente de pentaglicina inhibiendo la síntesis de peptidoglicano mediante la inhibición de la transglicosilación y la transpeptidación, siendo el grupo 4'clorobifenilo de la oritavancina el que permite la interacción con el lípido II y el anclaje a la pared celular, provocando la perturbación de esta. Utilizando tintes de fluorescencia como 3,3'-dipropiltiacarbocianina, Zhanel *et. al.*, determinaron la despolarización de la membrana en *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) después de la exposición a oritavancina, demostrando efectivamente la actividad e induciendo a una fuga rápida de liposomas<sup>101</sup>. Otro ejemplo significativo por resaltar es la nisina derivada de *Lactococcus lactus*, que logró inhibir principalmente la síntesis de PGN. Además, se ha establecido que el lípido II precursor de la PGN unido a la membrana actúa como una fracción de acoplamiento para atraer la nisina a la membrana y promover la inserción del péptido, lo que conduce a la permeabilización<sup>102</sup>.

Por lo tanto, como en los casos anteriores, la unión a PGN puede servir como acción inicial para desencadenar la muerte bacteriana. Se han reportado estudios que incluyen lectinas de la familia de lectinas de tipo C (RegIII); las cuales poseen una

estructura globular con cuatro dominios funcionales dos de ellos encargados de la internalización en el membrana<sup>102</sup>. RegIII reconocen las bacterias uniéndose al PGN a través del motivo Glu-Pro-Asn ubicado en la estructura, demostrándose mediante estudios espectroscópicos de RMN. Se observa que el motivo es necesario para la inhibición del crecimiento de bacterias, ya que una mutación puntual del residuo Glu (E) exhibe una afinidad reducida por PGN *estafilocócica* y una disminución de 6 veces en la actividad antimicrobiana contra especies Gram-positivas como *Listeria monocytogenes* EGD-e. Sin embargo, aún no se tiene muy claro cuál es el mecanismo por el cual las lectinas matan a las bacterias, pero los autores sugieren que la lectina RegIII $\alpha$  permeabiliza las membranas de *Listeria monocytogenes* EGD-e, como se muestra por una mayor captación del colorante fluorescente impermeable a la membrana SYTOX green<sup>103</sup>. Mularski *et. al.*, presentan imágenes AFM después de la interacción del péptido caerin 1.1 frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae* AJ218 los cuales señalan daños localizados en la pared celular bacteriana, lo que asegura un mecanismo de acción de formación de poros, que continuaron creciendo convirtiéndose en grandes agujeros que también se observaron mediante MEB. Con el fin de observar el efecto de la actividad de caerin 1.1 en el citoplasma y las membranas externas, las células tratadas las visualizaron mediante microscopía crioelectrónica<sup>104</sup>, de las cuales 60 células que se visualizaron a una concentración de 6  $\mu$ M 5 células mostraron daño donde la membrana citoplásmica ya no es visible y el peptidoglicano solo es parcialmente evidente, otras 20 células mostraron discontinuidades de membrana o de peptidoglicano y las 35 células restantes no mostraron daño visible; a 380 $\mu$ M aun siendo tratadas con este péptido 27 de 37 células visualizadas no tenían una membrana citoplasmática diferenciada y solo capas de peptidoglicano parcialmente visibles, 19 de estas células mostraron grietas o agujeros en la membrana y otras 9 células mostraron discontinuidades en la membrana<sup>105</sup>(Figura 18).



**Figura 18.** Imágenes crioelectrónicas de células salvajes de *K. pneumoniae* tratadas con: a) tampón HEPES; b) en 6 $\mu$ M caerin; c) 380 $\mu$ M caerin, las flechas indican la presencia de agujeros o grietas en la membrana externa; y d) 6 $\mu$ M de melitina, la flecha de doble punta señala hinchazón del periplasma y discontinuidad de la membrana citoplasmática indicada por la flecha (Copyright. Elsevier)<sup>105</sup>.

### 5.2.3 Metodologías asociadas a blancos intracelulares

Inicialmente se proponía que la permeabilización de la membrana era el único mecanismo de acción de los PAMs, pero se ha demostrado que algunos ejercen mecanismos de acción alternativos que actúan sobre diferentes blancos. Una vez que los PAMs han cruzado las barreras externas, las cuales hacen parte la membrana externa y la pared celular, respectivamente, puede resultar sencilla su interacción con la membrana plasmática y los blancos intracelulares uniéndose y desarrollando su acción inhibitoria sobre estos. Se ha reportado que además de actuar en la pared y membrana celular, los PAMs pueden inhibir el plegamiento de proteínas, la actividad enzimática o actuar intracelularmente en las mitocondrias, en el ADN/ARN o enzimas esenciales<sup>38</sup>. La capacidad que tienen las moléculas peptídicas para interactuar con múltiples blancos o múltiples péptidos para interactuar con un solo objetivo puede limitar el desarrollo de resistencia bacteriana, por ello es importante trabajar en conjunto con mecanismos de acción de antibióticos convencionales que ayuden a potencializar dicha actividad, o incluso puede ser relevante el trabajo conjunto con otros péptidos para dilucidar aún más las acciones sinérgicas y antagónicas de estos

compuestos ya que finalmente, la presencia de un objetivo intracelular puede actuar en conjunto con la actividad de permeabilización de la membrana<sup>38</sup>.

### 5.2.3.1 Inhibición de la replicación

#### 5.2.3.1.1 Ensayo de desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL)

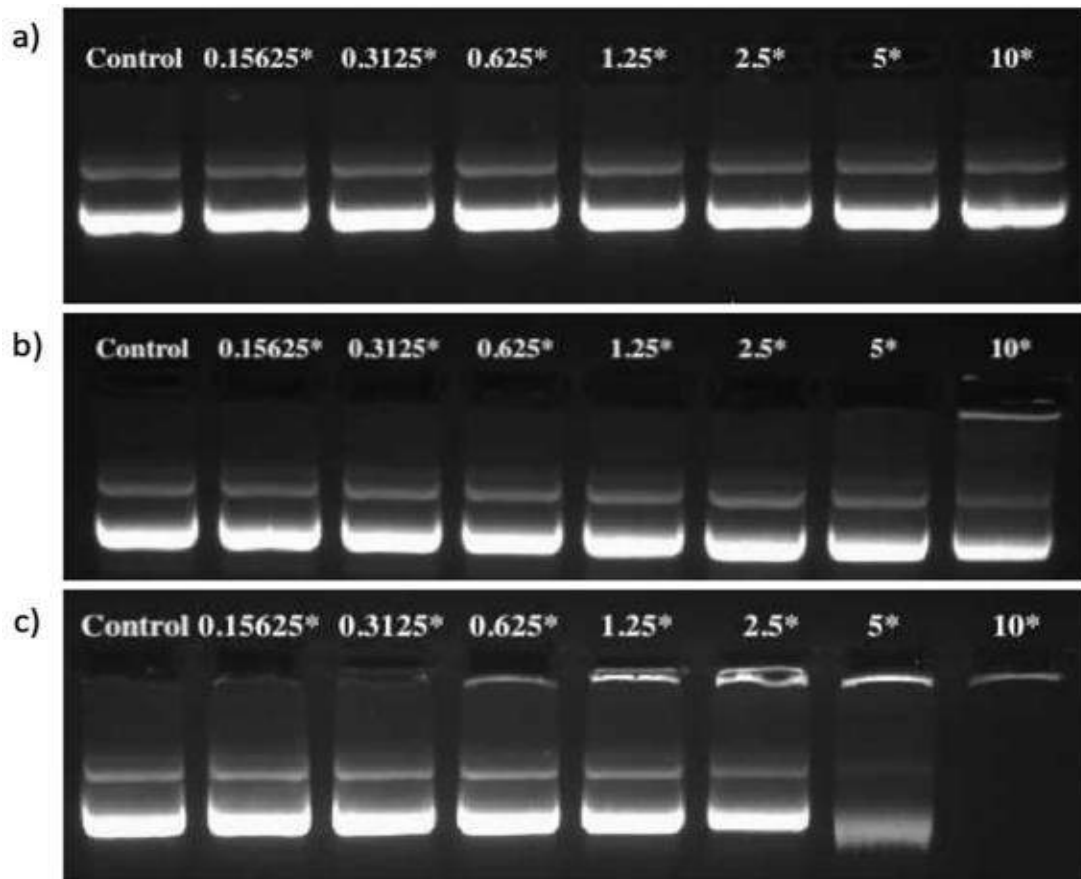
Esta técnica se emplea comúnmente para detectar células que experimentan la apoptosis. En este ensayo, una enzima llamada terminal desoxinucleotidil transferasa cataliza la adición de dUTP nucleótidos a los extremos 3' libre de ADN fragmentado y mediante el uso de dUTPs que están marcados secundariamente con sustancias fluorescentes se pueden identificar específicamente las células apoptóticas. Con esto también se podrían marcar células que han sufrido daño severo en el ADN<sup>106</sup>. Se ha reportado que el péptido Clavanin A (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF-NH<sub>2</sub>), de 23 residuos aislado de los hemocitos del tunicado solitario *Styela clava*, es capaz no solo de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas, sino también de potenciar su mecanismo de acción frente a blancos intracelulares como ácidos nucleicos (ADN) en presencia del ion Zn(II) contra cepas de *E. coli* TD172. Teniendo evidencia de que ClavA-Zn(II) puede causar daños al ADN, para ello han empleado el ensayo de desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL), que marca fluorescentemente las roturas de cadena para permitir la cuantificación del daño en el ADN causado por ClavA-Zn(II), el cual es constante y en un 75% más alto que ClavA por sí solo obteniendo niveles similares de daño después de 4 horas<sup>107</sup>. En otros ejemplos, las especies reactivas de oxígeno (ROS) se asocian con el daño causado al ADN puesto que es su blanco más importante, se ha mencionado que ROS reacciona con diferentes componentes del ácido nucleico para dañarlo al inducir lesiones en los azúcares y bases, provocando roturas de las cadenas del mismo que pueden ser letales a menos que se reparen; Lee *et. al.*, para determinar si LBLP (RMKKLGNHKVSCERNTKRCRKAI) rompe las hebras de ADN a través de la generación de ROS, se empleó el ensayo TUNEL, donde las células tratadas con LBLP

mostraron una mayor intensidad de fluorescencia (44,51 %) sugiriendo que dicho péptido rompe las hebras de ADN mediante la generación de ROS y provocando en este caso la fragmentación del ADN en *E. coli*<sup>98</sup>.

#### 5.2.3.1.2 Ensayo de retardo en gel

El retardo en gel es una técnica que permite saber si hay algún péptido que reconoce una secuencia de ADN determinada, para ello se utiliza un fragmento de ADN corto (entre 50 y 300 nt) marcado radiactivamente, se incuba con diferentes concentraciones del PAM y se observa mediante una electroforesis si la molécula peptídica está presente, el complejo ADN-péptido migra más lentamente, mientras que, si el ADN no es reconocido, este migrará más rápidamente en el frente electroforético<sup>108</sup>. Así mismo, estudios realizados por Raheem *et. al.*, informan sobre el péptido de la aureína 2.2 y sus análogos los péptidos 73 y 77 los cuales son ricos en arginina y triptófano donde por medio de ensayos de retardo en gel mostraron que los péptidos no funcionaban por perturbación de la membrana y además que los péptidos 73 y 77 actuaban como PAMs de penetración celular con blancos intracelulares, que al parecer no era el ADN<sup>68</sup> (Figura 19). En 2014, retomando los estudios con LHP7, se utilizaron ensayos de retardo en gel para evaluar la afinidad de unión del péptido por ADN pregenómico (pADN) y ADN genómico (gADN), resultados que indicaron la formación de un complejo LHP7-pADN y gADN frente a *S. aureus* ATCC 25923, así mismo la afinidad de unión a gDNA la evaluaron mediante el análisis de espectros de dicroísmo circular (CD) interpretando los espectros formados de ADN al unirse con LHP7; adicional a esto, también evaluaron el ciclo celular por citometría de flujo, con la incubación de células de *S. aureus* con LHP7 durante 30 min, donde la proporción de células en fase I pareció aumentar del 8,71 al 12,09 % pero la población de células en fase I aumentó hasta el 15,68 % a medida que la incubación en presencia del péptido aumentó a 60 min, indicando que LHP7 indujo la detención de células en la fase I<sup>78</sup>. Aún se siguen reportando nuevas moléculas peptídicas como es el caso de Lasioglossin III (LL-III) (VNWKKILGKIIKVVK-NH<sub>2</sub>), un péptido antimicrobiano

catiónico derivado del veneno de la abeja eusocial *Lasioglossum laticeps*, que al observar que este compuesto es capaz de permeabilizar la membrana sin alterarlas optaron por buscar un objetivo intracelular; teniendo en cuenta esto y junto con el ensayo de retardo en gel y experimentos de disminución de la fluorescencia se combinaron diferentes concentraciones del péptido con una cantidad de ADN plasmídico que permitió que observaran un retraso significativo del ADN, lo que llevó a los autores a demostrar claramente una interacción ADN/LL-III<sup>109</sup>. El ensayo de retardo de gel ha sido hasta el momento el más acertado para evaluar la interacción de los PAMs con el ADN como blanco específico, por ello en otros reportes se han encontrado resultados similares de distintos péptidos frente a bacterias de carácter Grampositivo y Gramnegativo<sup>110,111</sup> siendo uno de los estudios más relevantes aquellos dirigidos a la molécula de buforina II puesto que fue uno de los primeros PAMs que se encontró con dicho blanco de acción<sup>77</sup>. Como ejemplo de lo anterior para ver el ADN inmovilizado y para investigar la unión del ADN genómico de *E. coli* a BF2-A (RAGLQFPVGRVHRLLRK) y BF2-C (RAGLQFPLGRLLRLLRLLR) se realizaron tomas de imágenes AFM. A partir de esto se obtuvieron imágenes representativas de ADN libre e imágenes de complejos péptidos-ADN, indicando que la mayoría de las cadenas de ADN podrían ser absorbidas por las moléculas peptídicas de BF2-A o BF2-C<sup>112</sup>.



**Figura 19.** Electroforesis en gel de agarosa de a) péptido 73, b) péptido 77 y c) IDR 1018, incubado con ADN plásmido de 60ng (Copyright. Elsevier)<sup>68</sup>.

### 5.2.3.2 Inhibición de síntesis de proteínas

Continuando en la búsqueda de nuevos sitios de acción de los PAMs, se ha encontrado a través de ensayos que las proteínas intracelulares también son cruciales en la actividad de estas moléculas y que los PAMs dirigidos a blancos intracelulares pueden ser un gran potencial para el desarrollo de agentes antimicrobianos. En el 2016, fue utilizada una enciclopedia de genes y genomas de Kioto, además del análisis COG, también se usaron otras herramientas bioinformáticas (GO y KEGG) para analizar los blancos proteicos de cada PAM: bacterenecina 7 (Bac7) (PFPLPRPIPRPGPRPFPLPRPRRPLRPPRPRIRR), un híbrido de pleurocidina y dermaseptina (P-Der) y péptido rico en prolina-arginina (PR-39) (PFRPPFRPPFGPPIRPPLRPPFFPPPRRPLYPPRPRRR) además de incluir lactoferricina B (LfcinB) (FARRVCTISPAGLKKMRWQWRRCKF) contra *E. coli*. Los

autores sugieren que Bac7 se une a la proteína de choque térmico DnaK, así como interviene sobre el metabolismo de las purinas y la histidina quinasa, LfcinB ataca actividades relacionadas con la transcripción y varios procesos biosintéticos de carbohidratos celulares, P-Der afecta varios procesos catabólicos de moléculas pequeñas y PR-39 reconoce las proteínas involucradas asociadas con ARN (unión de ARN, complejo de ribonucleoproteínas y biogénesis de ribosomas, proceso metabólico de ARN, modificación de ARN y procesamiento de ncRNA). Adicionalmente, encontraron que todos los péptidos evaluados se dirigen a la arginina descarboxilasa, que es una enzima crucial para la supervivencia de *E. coli* K12 en ambientes extremadamente ácidos<sup>113</sup>. Sola *et. al.*, identificaron nuevos PAMs ricos en prolina (PrPAM) cada uno en una especie de cetáceo diferente; *Orcinus orca*, *Delphinapterus leucas*, *Balaenoptera acutorostrata*, *Lipotes vexillifer*, *Tursiops truncatus* y *Neophocaena asiaeorientalis* y se ha evaluado su mecanismo de acción *in vitro*, en especial su actividad dirigida a proteínas intracelulares en especies bacterianas del grupo *ESKAPE*; para ello llevaron a cabo ensayos de transcripción/traducción evaluando la inhibición de la síntesis a través de una luciferasa reportera confirmando su potente actividad como inhibidores de la síntesis de proteínas<sup>114</sup>.

En 2019 Stepek *et. al.*, buscaron identificar nuevos antibióticos y se documentó la caracterización de un péptido dirigido a proteínas de unión a penicilina, se pudo aislar un  $\beta$ -péptido  $\alpha$ -cetoamida que exhibe una excelente actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* y una unión a una proteína de unión a penicilina; un análisis quimioproteómico facilitó la identificación de una serie de proteínas de la membrana bacteriana como posibles blancos, el cual se validaron mediante estudios de afinidad de unión con la proteína de unión a penicilina aplicando el ensayo de termoforesis a microescala, con esto lograron identificar cuatro proteínas de unión a estas moléculas, entre estos la proteína de unión a penicilina 4 (pbp4) que sería un objetivo prometedor para mediar en la actividad peptídica, ya que está involucrada en la biosíntesis esencial de la pared celular bacteriana<sup>36</sup>.



## 6. Conclusiones

Los PAMs son moléculas prometedoras para tratar microorganismos resistentes a múltiples fármacos, puesto que cuentan con diferentes mecanismos de acción dirigidos a distintos blancos en la célula. En los últimos años, los ensayos microscópicos y técnicas analíticas mencionadas en la presente revisión se han utilizado para impulsar el desarrollo de estos péptidos como agentes terapéuticos, lo cual ha permitido que se realicen cambios en su estructura y en sus características físico-químicas con el fin de potenciar su actividad.

A partir de la recopilación de información, se concluye que las técnicas químico-analíticas facilitan el proceso de extracción, permite evaluar las estructuras peptídicas y aclarar la interacción de los péptidos con estructuras bacterianas, generalmente con la membrana celular, dilucidando así su mecanismo de acción como formador de poros y disruptores de membrana.

Los diferentes ensayos de microscopía ofrecen un acercamiento de cual podría ser el blanco principal de acción de cualquier molécula peptídica brindando imágenes de alta resolución en cuanto a modificaciones estructurales, localización y cantidad de estas moléculas tanto intra como extracelularmente. Aunque todas las metodologías son útiles para conocer el mecanismo de acción de los PAMs es importante elegir la que mejor se adapte al presupuesto y al objetivo de la investigación, pues aunque es cierto que todas presentan resultados excelentes habrán unas que se ajusten mejor a las necesidades del investigador.

Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica, se resalta la necesidad de seguir trabajando en nuevas metodologías (químicas, microscópicas, computacionales, moleculares) o realizar modificaciones sobre las que ya se tienen, que aporten información adicional sobre la actividad de los péptidos y profundizar el estudio frente a otros blancos de acción, ampliando el espectro de actividad de estas moléculas.

Está claro que aún falta trabajar en otros aspectos importantes de la actividad como la estabilidad enzimática y la toxicidad celular, condiciones que no han permitido que muchas de estas moléculas lleguen a las últimas fases de evaluación clínica. Es por esto por lo que los ensayos de laboratorio, tanto *in vitro* como *in vivo*, conducirán al avance de futuras alternativas terapéuticas.

Esta revisión recopiló artículos de investigación, reportes e información relacionada con las diferentes técnicas actuales que permiten la identificación de mecanismos de acción sobre diferentes cepas bacterianas de interés en salud pública, en especial aquellas agrupadas en el grupo *ESKAPE*, con la finalidad de que en los próximos años estas moléculas peptídicas sean un apoyo frente a la situación de resistencia bacteriana que se incrementa cada vez más con el tiempo.

## 7. Referencias

1. Park CB, Kim MS, Kim SC. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo* gargarizans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;218(1):408–13.
2. J.Dubos I. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus isolation of a sporulating bacillus capable of lysing the living cells of gram-positive microorganisms. --the method employed for the discovery. *J Exp Med*. 1939;70(1):1–10.
3. Mice IIN. STUDIES ON A BACTERICIDAL A G E N T E X T R A C T E D FROM A SOIL BACILLUS EXPERIMENTAL PI ~ EU ~ OCOCCUS INFECTIONS IN MICE Downloaded from jem . rupress . org on March 18 , 2015 In the preceding paper a description was given of the preparation and prope. 1939;(Table I):11–7.
4. Topps J., Elliott RC. © 1965 Nature Publishing Group. *Nat Publ Gr*. 1965;205(5007):498–9.
5. Selsted ME, Brown DM, DeLange RJ, Harwig SS, Lehrer RI. Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. *J Biol Chem*. 1985;260(8):4579–84.
6. Selsted ME, Brown DM, DeLange RJ, Lehrer RI. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J Biol Chem*. 1983;258(23):14485–9.
7. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*. 1985;76(4):1427–35.
8. Park CB, Kim HS, Kim SC. 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*. 1998;244(1):253–7.
9. Liu Y, Han F, Xie Y, Wang Y. Comparative antimicrobial activity and mechanism of action of bovine lactoferricin-derived synthetic peptides. 2011;1069–78.
10. Torcato IM, Huang YH, Franquelim HG, Gaspar D, Craik DJ, Castanho MARB, et al. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2013;1828(3):944–55.
11. Schneider VAF, Coorens M, Bokhoven JLMT, Posthuma G, Dijk A van, Veldhuizen EJA, et al. Imaging the Antistaphylococcal Activity of CATH-2: Mechanism of Attack and Regulation of Inflammatory Response. *mSphere*. 2017 Dec;2(6).
12. Yan J, Wang K, Dang W, Chen R, Xie J, Zhang B, et al. Two Hits Are Better than One: Membrane-Active and DNA Binding-Related Double-Action Mechanism of NK-18, a Novel Antimicrobial Peptide Derived from Mammalian NK-Lysin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):220.
13. Fleming A, B PRSL. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and

- secretions. Proc R Soc London Ser B, Contain Pap a Biol Character. 1922;93(653):306–17.
14. Gause GF, Brazhnikova MG. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds [3]. Vol. 154, Nature. 1944. p. 703.
  15. Van Epps HL. René Dubos: unearthing antibiotics. J Exp Med. 2006 Feb;203(2):259.
  16. HIRSCH JG. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med. 1956;103(5):589–611.
  17. Zeya HI, Spitznagel JK. Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. II. Composition, properties, and mechanism of antibacterial action. J Bacteriol. 1966;91(2):755–62.
  18. Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem. 1980;16:7–16.
  19. Maloy WL, Kari UP. Structure–activity studies on magainins and other host defense peptides. Biopolymers. 1995;37(2):105–22.
  20. Hancock REW, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(16):8856–61.
  21. Simmaco M, Mignogna G, Barra D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? Biopolymers. 1998;47(6):435–50.
  22. Phoenix DA, Dennison SR, Harris F. Antimicrobial Peptides: Their History, Evolution, and Functional Promiscuity. Antimicrob Pept. 2013;1–37.
  23. H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstom, H. Bennich HGB. Cecropin.pdf. 1981. p. 5820.
  24. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(15):5449–53.
  25. Brogden KA, Ackermann M, Huttner KM. Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(7):1615–7.
  26. Smeaton JR, Elliott WH. Isolation and properties of a specific bacterial ribonuclease inhibitor. BBA Sect Nucleic Acids Protein Synth. 1967;145(3):547–60.
  27. Selsted ME, Tang YQ, Morris WL, McGuire PA, Novotny MJ, Smith W, et al. Purification, primary structures, and antibacterial activities of  $\beta$ - defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. J Biol Chem. 1993;268(9):6641–8.
  28. Wimley WC, Selsted ME, White SH. Interactions between human defensins and lipid bilayers: Evidence for formation of multimeric pores. Protein Sci. 1994;3(9):1362–73.
  29. Tytler EM, Anantharamaiah GM, Walker DE, Mishra VK, Palgunachari MN, Segrest JP. Molecular Basis for Prokaryotic Specificity of Magainin-Induced Lysis. Biochemistry. 1995;34(13):4393–401.
  30. Steiner H, Andreu D, Merrifield RB. Binding and action of cecropin and

- cecropin analogues: Antibacterial peptides from insects. *BBA - Biomembr.* 1988;939(2):260–6.
31. Matsuzaki K, Sugishita KI, Harada M, Fujii N, Miyajima K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1997 Jul;1327(1):119–30.
  32. Hasper HE, Kramer NE, Smith JL, Hillman JD, Zachariah C, Kuipers OP, et al. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science (80- )*. 2006;313(5793):1636–7.
  33. Li A, Lee PY, Ho B, Ding JL, Lim CT. Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2007;1768(3):411–8.
  34. Abee T. Pore-Forming Bacteriocins of Gam+ and Self Protection.Pdf. 1995;129:1–9.
  35. Mitchell W, Ng EA, Tamucci JD, Boyd KJ, Sathappa M, Coscia A, et al. The mitochondria-targeted peptide SS-31 binds lipid bilayers and modulates surface electrostatics as a key component of its mechanism of action. *J Biol Chem.* 2020 May;295(21):7452.
  36. Stepek IA, Cao T, Koetemann A, Shimura S, Wollscheid B, Bode JW. Antibiotic Discovery with Synthetic Fermentation: Library Assembly, Phenotypic Screening, and Mechanism of Action of  $\beta$ -Peptides Targeting Penicillin-Binding Proteins. *ACS Chem Biol.* 2019;14(5):1030–40.
  37. Schneider VAF, Coorens M, Ordonez SR, Tjeerdsma-Van Bokhoven JLM, Posthuma G, Van Dijk A, et al. Imaging the antimicrobial mechanism(s) of cathelicidin-2. *Sci Rep.* 2016 Sep;6.
  38. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules.* 2018;8(1).
  39. Browne K, Chakraborty S, Chen R, Willcox MDP, Black DS, Walsh WR, et al. A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct;21(19):1–23.
  40. Ahmed TAE, Hammami R. Recent insights into structure–function relationships of antimicrobial peptides. *J Food Biochem.* 2019;43(1):1–8.
  41. Lee T-H, N. Hall K, Aguilar M-I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. *Curr Top Med Chem.* 2015;16(1):25–39.
  42. Tuerkova A, Kabelka I, Králová T, Sukeník L, Pokorná Š, Hof M, et al. Effect of helical kink in antimicrobial peptides on membrane pore formation. *Elife.* 2020 Mar;9.
  43. Vega Chaparro SC, Valencia Salguero JT, Martínez Baquero DA, Rosas Pérez JE. Effect of Polyvalence on the Antibacterial Activity of a Synthetic Peptide Derived from Bovine Lactoferricin against Healthcare-Associated Infectious Pathogens. *Biomed Res Int.* 2018;2018.
  44. Lipkin R, Pino-Angeles A, Lazaridis T. Transmembrane Pore Structures of  $\beta$ -

- hairpin Antimicrobial Peptides by All-Atom Simulations. *J Phys Chem B*. 2017 Oct;121(39):9126.
45. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:1–12.
  46. Cárdenas-Martínez KJ, Grueso-Mariaca D, Vargas-Casanova Y, Bonilla-Velásquez L, Estupiñán SM, Parra-Giraldo CM, et al. Effects of Substituting Arginine by Lysine in Bovine Lactoferricin Derived Peptides: Pursuing Production Lower Costs, Lower Hemolysis, and Sustained Antimicrobial Activity. *Int J Pept Res Ther* [Internet]. 2021;27(3):1751–62. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10207-x>
  47. Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, Bienert M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett*. 2001 Jul;501(2–3):146–50.
  48. Hall K, Lee TH, Aguilar MI. The role of electrostatic interactions in the membrane binding of melittin. *J Mol Recognit*. 2011;24(1):108–18.
  49. Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT, Hodges RS. Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Apr;51(4):1398.
  50. Brogden KA, De Lucca AJ, Bland J, Elliott S. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(1):412–6.
  51. Brogden KA, Ackermann M, Huttner KM. Detection of Anionic Antimicrobial Peptides in Ovine Bronchoalveolar Lavage Fluid and Respiratory Epithelium. *Infect Immun*. 1998;66(12):5948.
  52. Huertas Méndez NDJ, Vargas Casanova Y, Gómez Chimbi AK, Hernández E, Leal Castro AL, Melo Diaz JM, et al. Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules*. 2017;22(3):1–10.
  53. Huertas N de J, Monroy ZJR, Medina RF, Castañeda JEG. Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKRRQWQWRMKKGLA Sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Molecules*. 2017;22(6).
  54. Mejía E, Benítez J, Ortiz M. Péptidos antimicrobianos, una alternativa para el combate de la resistencia bacteriana/Antimicrobial peptides, an alternative to combat bacterial resistance. *Acta Biológica Colomb*. 2020;2(2):294–302.
  55. Vargas-Casanova Y, Rodríguez-Mayor AV, Cardenas KJ, Leal-Castro AL, Muñoz-Molina LC, Fierro-Medina R, et al. Synergistic bactericide and antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or palindromic peptides containing the RWQWR motif against Gram-positive and Gram-negative strains. *RSC Adv*. 2019 Mar;9(13):7239–45.
  56. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolym* -

- Pept Sci Sect. 2002;66(4):236–48.
57. Hilchie AL, Wuertth K, Hancock REW. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol.* 2013;9(12):761–8.
  58. Hancock REW, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(4):243–54.
  59. Rivas-Santiago B, Castañeda-Delgado JE, Rivas Santiago CE, Waldbrook M, González-Curiel I, León-Contreras JC, et al. Ability of Innate Defence Regulator Peptides IDR-1002, IDR-HH2 and IDR-1018 to Protect against Mycobacterium tuberculosis Infections in Animal Models. *PLoS One.* 2013 Mar;8(3).
  60. Tewary P, de la Rosa G, Sharma N, Rodriguez LG, Tarasov SG, Howard OMZ, et al. BETA DEFENSIN 2 AND 3 PROMOTE THE UPTAKE OF SELF OR CpG DNA, ENHANCE IFN- $\alpha$  PRODUCTION BY HUMAN PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS AND PROMOTE INFLAMMATION. *J Immunol.* 2013 Jul;191(2):865.
  61. Bechinger B, Gorr SU. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J Dent Res.* 2017 Mar;96(3):254.
  62. Cárdenas Espinosa LP. Dinámica molecular como técnica de simulación. *Rev Habitus Semilleros Investig.* 2009;(1):29–32.
  63. Mihajlovic M, Lazaridis T. Antimicrobial Peptides in Toroidal and Cylindrical Pores. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Aug;1798(8):1485.
  64. Lipkin RB, Lazaridis T. Implicit Membrane Investigation of the Stability of Antimicrobial Peptide  $\beta$ -barrels and arcs. *J Membr Biol.* 2015 Nov;248(3):469.
  65. Lorenzón EN, Riske KA, Troiano GF, Da Hora GCA, Soares TA, Cilli EM. Effect of dimerization on the mechanism of action of aurein 1.2. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2016 Jun;1858(6):1129–38.
  66. Departamento de Química Física U de V. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear. *Fundam Química Orgánica.* 2011;193–207.
  67. Lazaridis T, He Y, Prieto L. Membrane Interactions and Pore Formation by the Antimicrobial Peptide Protegrin. *Biophys J.* 2013 Feb;104(3):633.
  68. Raheem N, Kumar P, Lee E, Cheng JTJ, Hancock REW, Straus SK. Insights into the mechanism of action of two analogues of aurein 2.2. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2020 Jun;1862(6):183262.
  69. Pandit G, Ilyas H, Ghosh S, Bidkar AP, Mohid SA, Bhunia A, et al. Insights into the Mechanism of Antimicrobial Activity of Seven-Residue Peptides. *J Med Chem.* 2018;61(17):7614–29.
  70. Laadhari M, Arnold AA, Gravel AE, Separovic F, Marcotte I. Interaction of the antimicrobial peptides caerin 1.1 and aurein 1.2 with intact bacteria by 2H solid-state NMR. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2016 Dec;1858(12):2959–64.
  71. Gonzáles MCR, Castellon-Urbe J. Microscopio de Fuerza Atómica. *Eninvie.* 2005;6.
  72. Majewska M, Zamlyny V, Pieta IS, Nowakowski R, Pieta P. Interaction of LL-37 human cathelicidin peptide with a model microbial-like lipid membrane. *Bioelectrochemistry.* 2021 Oct;141:107842.

73. Kim SY, Pittman AE, Zapata-Mercado E, King GM, Wimley WC, Hristova K. Mechanism of Action of Peptides That Cause the pH-Triggered Macromolecular Poration of Lipid Bilayers. *J Am Chem Soc.* 2019;141(16):6706–18.
74. Mescola A, Ragazzini G, Alessandrini A. Daptomycin Strongly Affects the Phase Behavior of Model Lipid Bilayers. *J Phys Chem B.* 2020;124(39):8562–71.
75. Malanovic N, Lohner K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals.* 2016 Sep;9(3).
76. Microscopio Confocal de Barrido Láser - CONICET Rosario.
77. Jang SA, Kim H, Lee JY, Shin JR, Kim DJ, Cho JH, et al. Mechanism of action and specificity of antimicrobial peptides designed based on buforin IIb. *Peptides [Internet].* 2012;34(2):283–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.01.015>
78. Xi D, Wang X, Teng D, Mao R, Zhang Y, Wang X, et al. Mechanism of action of the tri-hybrid antimicrobial peptide LHP7 from lactoferricin, HP and plectasin on *Staphylococcus aureus*. *BioMetals.* 2014;27(5):957–68.
79. ¿Qué es el Microscopio Electrónico de Transmisión?
80. Raschig J, Mailänder-Sánchez D, Berscheid A, Berger J, Strömstedt AA, Courth LF, et al. Ubiquitously expressed Human Beta Defensin 1 (hBD1) forms bacteria-entrapping nets in a redox dependent mode of action. *PLoS Pathog.* 2017 Mar;13(3).
81. Ipohorski M, Bozzano PB. Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *Cienc Invest.* 2013;63(3):43–53.
82. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo: Servicio de Microscopía Electrónica : UPV.
83. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM/FESEM) - Universidad de Almería.
84. Hong J, Guan W, Jin G, Zhao H, Jiang X, Dai J. Mechanism of tachyplesin I injury to bacterial membranes and intracellular enzymes, determined by laser confocal scanning microscopy and flow cytometry. *Microbiol Res.* 2015 Jan;170:69–77.
85. Huang Y, He L, Li G, Zhai N, Jiang H, Chen Y. Role of helicity of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides to improve specificity. *Protein Cell.* 2014 Aug;5(8):631.
86. Así funciona un microscopio de fluorescencia - Cromtek.
87. Memariani H, Shahbazzadeh D, Sabatier JM, Memariani M, Karbalaehmahdi A, Bagheri KP. Mechanism of action and in vitro activity of short hybrid antimicrobial peptide PV3 against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;479(1):103–8.
88. Yang S, Dong Y, Aweya JJ, Xie T, Zeng B, Zhang Y, et al. Antimicrobial activity and acting mechanism of Tegillarca granosa hemoglobin-derived peptide (TGH1) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb Pathog.* 2020;147:104302.
89. Singh S, Nimmagadda A, Su M, Wang M, Teng P, Cai J. Lipidated  $\alpha/\alpha$ -AA heterogeneous peptides as antimicrobial agents. *Eur J Med Chem.* 2018 Jul;155:398.
90. Wang K, Yan J, Dang W, Liu X, Chen R, Zhang J, et al. Membrane active antimicrobial activity and molecular dynamics study of a novel cationic

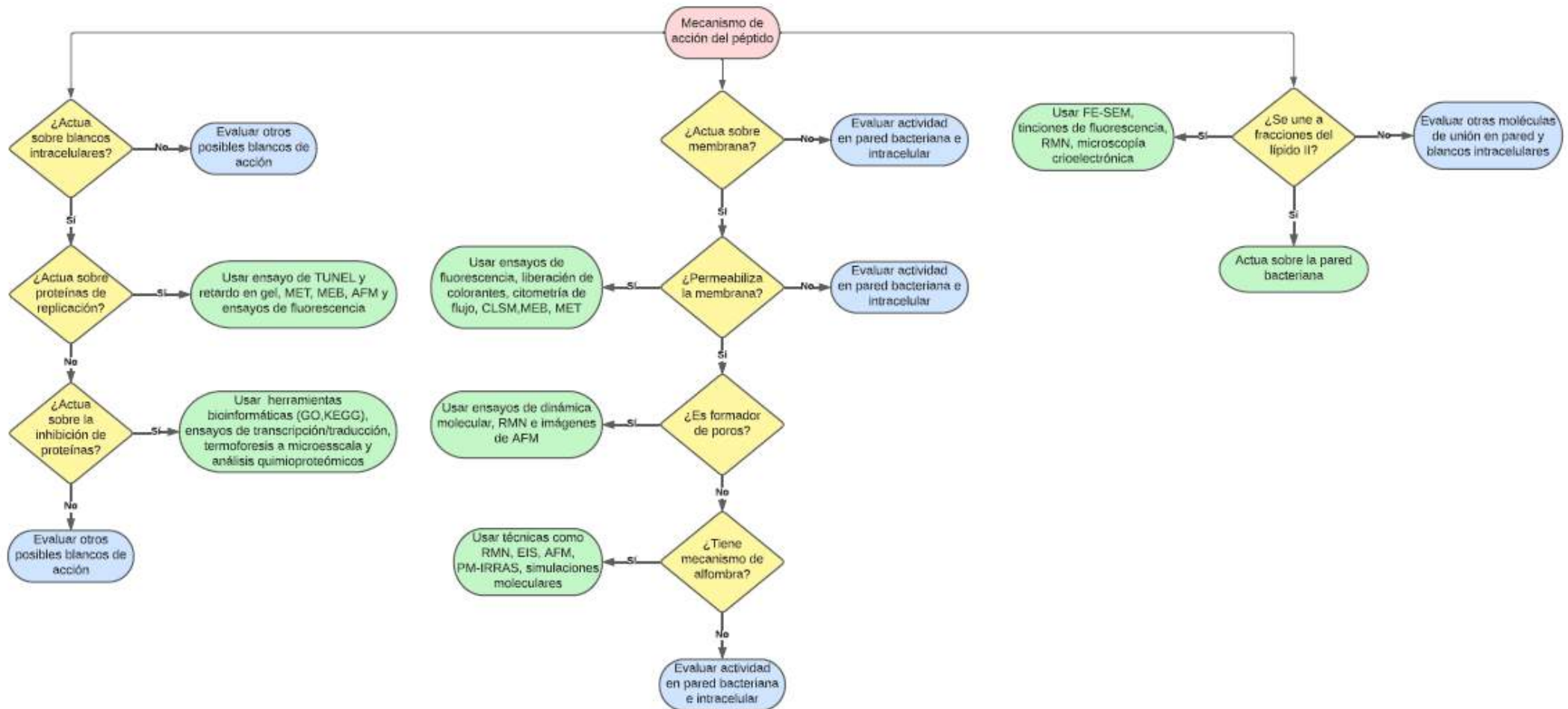


- antimicrobial peptide polybia-MPI, from the venom of *Polybia paulista*. *Peptides*. 2013;39(1):80–8.
91. Xie J, Gou Y, Zhao Q, Wang K, Yang X, Yan J, et al. Antimicrobial activities and membrane-active mechanism of CPF-C1 against multidrug-resistant bacteria, a novel antimicrobial peptide derived from skin secretions of the tetraploid frog *Xenopus clivii*. *J Pept Sci*. 2014;20(11):876–84.
  92. Xie J, Gou Y, Zhao Q, Li S, Zhang W, Song J, et al. Antimicrobial activities and action mechanism studies of transportan 10 and its analogues against multidrug-resistant bacteria. *J Pept Sci*. 2015;21(7):599–607.
  93. CITOMETRÍA DE FLUJO: VÍNCULO ENTRE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y LA APLICACIÓN CLÍNICA.
  94. Jocelyn Carolina P-L, Wendolaine S-C, Héctor R-R, Carlos J. *Portafolio Científico*. 18(2):julio-diciembre.
  95. Yasir M, Dutta D, Willcox MDP. Mode of action of the antimicrobial peptide Mel4 is independent of *Staphylococcus aureus* cell membrane permeability. *PLoS One*. 2019 Jul;14(7).
  96. Akbari R, Hakemi Vala M, Hashemi A, Aghazadeh H, Sabatier JM, Pooshang Bagheri K. Action mechanism of melittin-derived antimicrobial peptides, MDP1 and MDP2, de novo designed against multidrug resistant bacteria. *Amino Acids*. 2018;50(9):1231–43.
  97. Madanchi H, Ebrahimi Kiasari R, Seyed Mousavi SJ, Johari B, Shabani AA, Sardari S. Design and Synthesis of Lipopolysaccharide-Binding Antimicrobial Peptides Based on Truncated Rabbit and Human CAP18 Peptides and Evaluation of Their Action Mechanism. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020;12(4):1582–93.
  98. Lee B, Hwang JS, Lee DG. Antibacterial action of lactoferricin B like peptide against *Escherichia coli*: reactive oxygen species-induced apoptosis-like death. *J Appl Microbiol*. 2020;129(2):287–95.
  99. Sun C, Li Y, Cao S, Wang H, Jiang C, Pang S, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of bovine lactoferricin derivatives with symmetrical amino acid sequences. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):1–20.
  100. Chen X, Hirt H, Li Y, Gorr SU, Aparicio C. Antimicrobial GL13K Peptide Coatings Killed and Ruptured the Wall of *Streptococcus gordonii* and Prevented Formation and Growth of Biofilms. *PLoS One*. 2014 Nov;9(11).
  101. Zhanel GG, Schweizer F, Karlowsky JA. Oritavancin: Mechanism of Action. *Clin Infect Dis*. 2012 Apr;54(suppl\_3):S214–9.
  102. Malanovic N, Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2016 May;1858(5):936–46.
  103. Lehotzky RE, Partchb CL, Mukherjee S, Casha HL, Goldman WE, Gardner KH, et al. Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr;107(17):7722–7.
  104. Florez Ariza A, Guerra Giraldez D. Crío-miCrosCopía eleCtróniCa. resolviendo

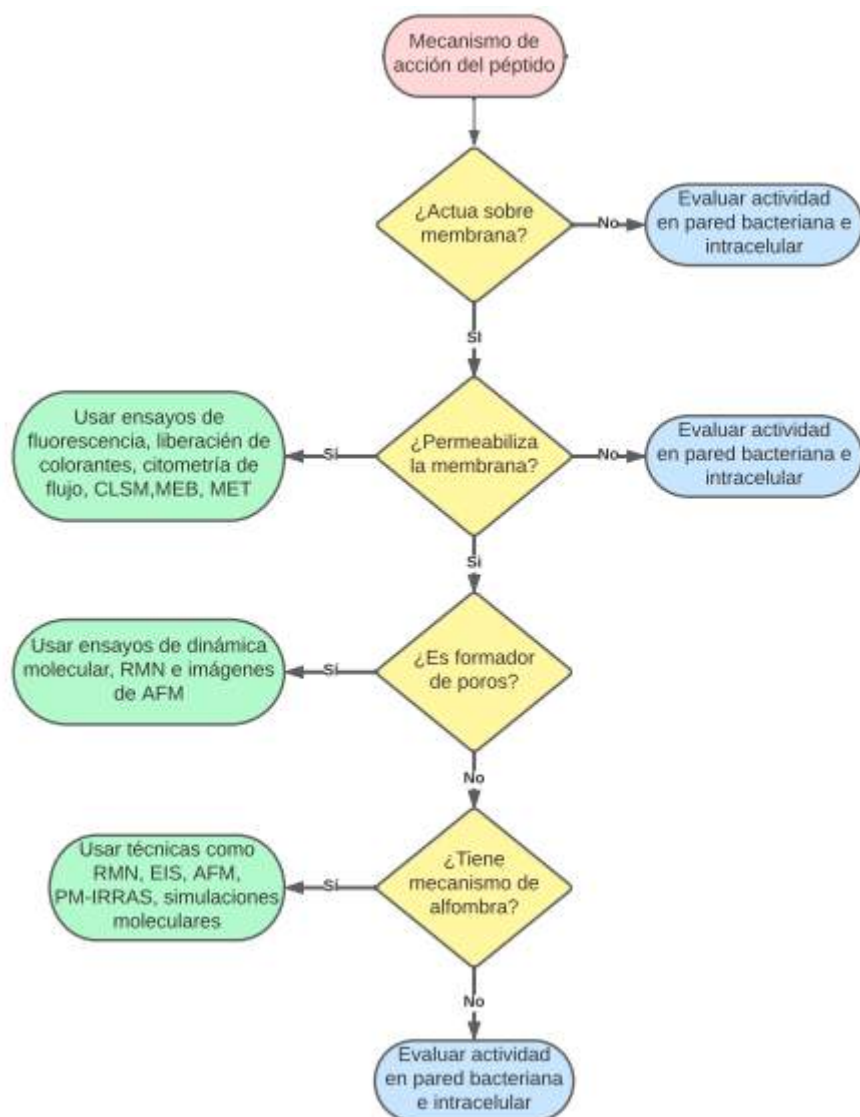
- la estructura molecular de la vida al detalle atómico Cryo-electron microscopy. Solving the molecular structure of life at the atomic detail.
105. Mularski A, Wilksch JJ, Hanssen E, Strugnell RA, Separovic F. Atomic force microscopy of bacteria reveals the mechanobiology of pore forming peptide action. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2016 Jun;1858(6):1091–8.
  106. DeCS.
  107. Juliano SA, Serafim LF, Duay SS, Heredia Chavez M, Sharma G, Rooney M, et al. A Potent Host Defense Peptide Triggers DNA Damage and Is Active against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *ACS Infect Dis.* 2020;6(5):1250–63.
  108. Garner MM, Revzin A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* 1981 Jul;9(13):3047–60.
  109. Battista F, Oliva R, Vecchio P Del, Winter R, Petraccone L. Insights into the Action Mechanism of the Antimicrobial Peptide Lasioglossin III. *Int J Mol Sci* 2021, Vol 22, Page 2857. 2021 Mar;22(6):2857.
  110. Han X, Kou Z, Jiang F, Sun X, Shang D. Interactions of designed trp-containing antimicrobial peptides with dna of multidrug-resistant-pseudomonas aeruginosa. *DNA Cell Biol.* 2021;40(2):414–24.
  111. Zhong L, Liu J, Teng S, Xie Z. Identification of a Novel Cathelicidin from the *Deinagkistrodon acutus* Genome with Antibacterial Activity by Multiple Mechanisms. *Toxins (Basel).* 2020 Dec;12(12).
  112. Hao G, Shi YH, Tang YL, Le GW. The intracellular mechanism of action on *Escherichia coli* of BF2-A/C, two analogues of the antimicrobial peptide Buforin 2. *J Microbiol.* 2013;51(2):200–6.
  113. Ho YH, Shah P, Chen YW, Chen CS. Systematic Analysis of Intracellular-targeting Antimicrobial Peptides, Bactenecin 7, Hybrid of Pleurocidin and Dermaseptin, Proline–Arginine-rich Peptide, and Lactoferricin B, by Using *Escherichia coli* Proteome Microarrays. *Mol Cell Proteomics.* 2016 Jun;15(6):1837.
  114. Sola R, Mardirossian M, Beckert B, De Luna LS, Prickett D, Tossi A, et al. Characterization of Cetacean Proline-Rich Antimicrobial Peptides Displaying Activity against ESKAPE Pathogens. *Int J Mol Sci* 2020, Vol 21, Page 7367. 2020 Oct;21(19):7367.

## ANEXOS

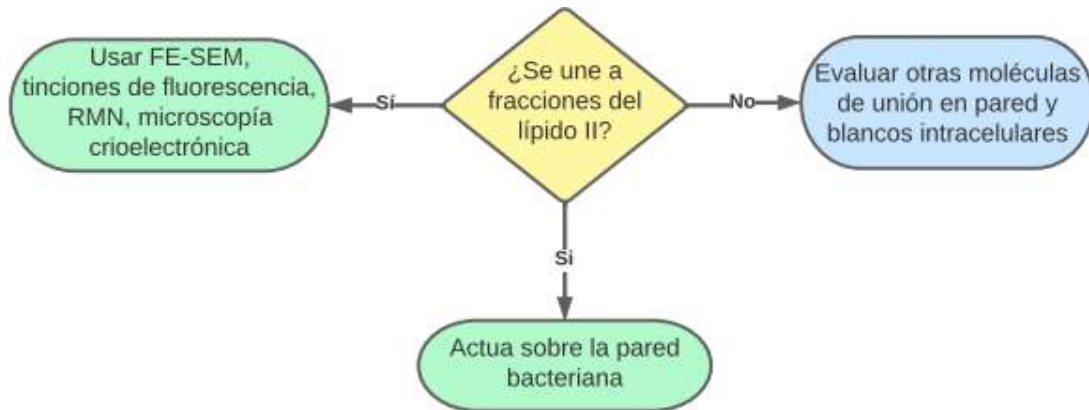
**Anexo 1.** Diagrama de flujo de las metodologías a utilizar en la identificación del mecanismo de acción de péptidos con actividad antibacteriana.



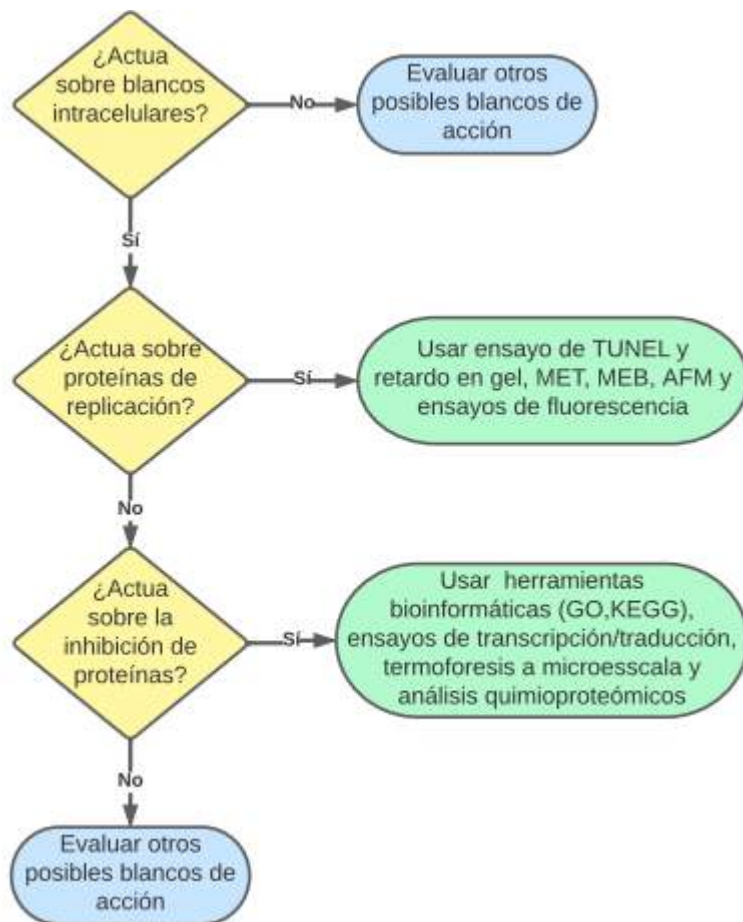
## Anexo 1.1. Metodologías utilizadas en la identificación de mecanismos de acción membranolíticos.



**Anexo 1.2.** Metodologías utilizadas en la identificación de mecanismos de acción sobre la pared bacteriana.



**Anexo 1.3.** Metodologías utilizadas en la identificación de mecanismos de acción intracelulares.



**Anexo 2.** Esquema de las metodologías utilizadas para la evaluación del mecanismo de acción en cada uno de los blancos bacterianos.

