

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos y mecanismos de resistencia de los patógenos

Sanchez, M. L.

Facultad de Medicina, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

**Contacto:** Sánchez, M.L.; mercedessanchez57@yahoo.com.ar; mercedes.sanchez@conicet.gov.ar

## Resumen

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud internacional que atañe a los gobiernos, lo que los obliga a tomar medidas sanitarias, evaluar costos en la producción y distribución de medicamentos y alertar sobre la necesidad de implementar campañas informativas para la erradicación de los vectores que producen las enfermedades infecciosas. La disminución progresiva en la efectividad de los antibióticos de elección enfatiza la necesidad de producir nuevas drogas y formas farmacéuticas<sup>1</sup>. Los péptidos antimicrobianos han sido aislados de especies de todos los reinos y son clasificados de acuerdo a su estructura de motivos aminoacídicos. Algunos péptidos antimicrobianos constituyen el producto de largos períodos de co-evolución de organismos superiores con microorganismos y son considerados como la primera línea de defensa inmunológica. Los péptidos antimicrobianos presentan un amplio espectro de interacciones con las membranas biológicas de los microorganismos con el fin de lisar las células. En general, son secuencias aminoacídicas cortas de entre 12 y 100 unidades y usualmente catiónicos, con una carga positiva neta (entre +2 y +9), anfipáticos y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. En el año 2004 fue descrita una base de datos "The Antimicrobial Peptide Database [APD] ([aps.unmc.edu/AP/main.php](http://aps.unmc.edu/AP/main.php))" y posteriormente su segunda versión [APD2], que permitió a los usuarios buscar las familias peptídicas; por ejemplo, bacteriocinas, ciclótidos y defensinas; así como también encontrar el origen del péptido: peces, batracios y aves, péptidos modificados post-traduccionalmente (amidación, oxidación, lipidación, glicosilación de D-amino ácidos, etc.), además de identificar los blancos de unión de los péptidos: membranas, proteínas, ADN/ARN, lipopolisacáridos o azúcares<sup>2</sup>. Finalmente, la base de datos contiene información para la predicción de péptidos y el diseño de los mismos y provee de conexiones para acceder a las otras bases de datos.

## Abstract

Antibiotic resistance is a main problem of international health that concerns the governments to work on sanitary regulation, evaluate costs in the production and distribution of medicines and develop information campaigns in order to eradicate the vectors that produce infectious diseases. The progressive overuse of antibiotics generates microbial resistance and reinforce the need to produce new drugs and pharmaceutical forms<sup>1</sup>. Anti-microbial peptides have been isolated from species of all kingdoms and are classified according to the structure of their aminoacidic motifs. Some anti-microbial peptides constitute the product of several periods of co-evolution of superior organisms with microorganisms and are considered as the first line of immunological defense. Anti-microbial peptides showed a wide spectrum of interactions with the cell membranes of microorganisms in order to produce cellular lysis. In general, they are short amino acid sequences of 12 to 100 units and usually cationic, with a net positive charge (between +2 and +9) and amphipathic. They are widely distributed in nature. In 2004, it was described "The Antimicrobial Peptide Database [APD] ([aps.unmc.edu/AP/main.php](http://aps.unmc.edu/AP/main.php))" and its second version [APD2], allowed to search for peptidic families such as bacteriocins, cyclotides and defensins; peptide sources including post-translational modified peptides such as lipidation, glycosylation of D-amino acids and; peptide targets such as membranes, proteins, ADN/ARN, lipopolysaccharides or sugars<sup>2</sup>. Finally, the database contains information for the prediction and design of peptides and provides links to other databases.

## Introducción

Los péptidos antimicrobianos tienen múltiples roles como mediadores de la inflamación, influyendo en diversos procesos tales como la proliferación, la inducción de la respuesta inmunológica, la cicatrización de heridas, la liberación de citoquinas, la quimotaxis y el balance proteasas-antiproteasas.

Las heridas crónicas son aquellas que presentan una fase inflamatoria causada por un desbalance entre factores de crecimiento y proteasas. Éste se debe a la presencia excesiva de citoquinas pro-inflamatorias, a la reducción de los factores de crecimiento, a los cambios en la deposición de colágeno y matriz, así como, a la proliferación celular y síntesis proteica anormales e incrementada apoptosis.

En el tratamiento de heridas crónicas es esencial la reducción de la carga bacteriana, la cicatrización y la reepitelialización [Consenso de Cicatrización de Heridas, Sociedad Argentina de Dermatología, 2008].

Los péptidos antimicrobianos presentan una eficacia que está relacionada con la evolución contra patógenos que se han vuelto refractarios a los antibióticos tradicionales. La evidencia indica que estos péptidos poseen como blanco la membrana celular en su integridad, la bioenergética y otras características esenciales de los microbios que pueden presentar una menor tasa de mutación que los blancos convencionales de los antibióticos<sup>3,4</sup>.

Las sustancias antimicrobianas fueron descubiertas hace un largo tiempo atrás. La primera, fue la lisozima de saliva humana por Alexander Fleming en 1922. Sin embargo, el aislamiento y caracterización de muchos péptidos antimicrobianos con secuencias aminoácidas definidas no comenzó hasta los años 80.

Muchos de estos compuestos son considerados como una promesa terapéutica y se está realizando un trabajo internacional con el objetivo de comprender los mecanismos de acción, la reducción de la toxicidad no deseada, el incremento en la resistencia a la degradación proteica, la mejora de su vida media sérica y la producción a gran escala de manera costo-efectiva.<sup>3-8</sup>

Inicialmente, los métodos cromatográficos fueron utili-

zados para la identificación de nuevos péptidos antimicrobianos. Posteriormente, con el reconocimiento de los motivos de secuencia peptídicos, la bioinformática permitió identificar péptidos a nivel genómico. Así, las coordenadas estructurales son depositadas en el banco de datos proteicos (Protein Data Bank, PDB)<sup>9</sup> y la estructura de un péptido particular puede ser vista utilizando un código en PDB provisto por la APD2<sup>2</sup>.

Con el objeto de realizar búsquedas de péptidos antimicrobianos modificados químicamente, se creó un sistema de códigos que comienza con XX. Así, la fosforilación, la lipidación, la glicosilación, la amidación C-terminal, la ciclización peptídica, la oxidación y los D-aminoácidos están representados por una letra que se ejemplifica en la tabla I.

Las proteínas están representadas por BBPP, el ADN por BBD y los lipopolisacáridos (LPS) por BBL<sup>10</sup>. Los péptidos pueden formar oligómeros consigo mismo (BBB), en soluciones acuosas por incremento de la concentración peptídica o sales. El código BBBm indica la oligomerización peptídica en entornos de membrana.

Los blancos moleculares de los péptidos antimicrobianos no están restringidos a las membranas bacterianas, también pueden ser otras moléculas<sup>5,6,7,11,12,13</sup>.

En una búsqueda realizada por Wang, el código ZZH es usado para péptidos anti-HIV que se unen al blanco microbiano, ZZHa corresponde a péptidos con actividad anti-HIV de animales, ZZHb a péptidos anti-HIV de bacterias, ZZHp, a péptidos anti-HIV obtenidos por síntesis química.

En los distintos organismos, la frecuencia de uso de los aminoácidos varía. En la figura 1 se indican los porcentajes de los 20 aminoácidos en los péptidos antimicrobianos descritos en bacterias, plantas, batracios e insectos.

## Diversos mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos:

Los péptidos antimicrobianos catiónicos tienen como blanco las membranas bacterianas aniónicas. En los últimos años, se han realizado avances significativos en la elucidación de blancos moleculares de los péptidos antimicrobianos. Los mismos pueden interactuar con una variedad de blancos molecu-

**Tabla 1. Código de letras para la búsqueda de péptidos antimicrobianos con modificaciones químicas y blancos de unión. The Antimicrobial Peptide Database 2 (Wang, Li y col. 2009)**

Código	Modificación química	Código	Blanco de unión
XXA	Amidación C-terminal	BBMm	Membranas
XXC	Ciclización	BBB	Agregación peptídica
XXO	Oxidación	BBPP	Proteínas/Enzimas
XXP	Fosforilación	BBN	ARN/ADN
XXD	Amino ácidos D	BBS	Azúcares
XXG	Glicosilación	BBL	Lipopolisacáridos (LPS)
XXL	Lipidación	BBII	Iones metálicos (por ej. Fe <sup>3+</sup> )

lares (incluyendo membranas) o dentro de la célula<sup>14</sup>.

La pared celular bacteriana posee proteínas que son el blanco de los péptidos antimicrobianos. Algunos de ellos forman fibras y nanoredes por auto-ensamblaje y pueden ser estudiados por cristalografía de rayos X. Las propiedades de asociación entre moléculas (*docking*) pueden encontrarse en la base de datos PDB. Un ejemplo de esta interacción es la que presenta la dermicidina humana. La forma activa consta de 47 aminoácidos. Como puede verse en su estructura cristalina (PDB=2YMK), ésta se pliega en una larga alfa-hélice y luego 6 copias del péptido se ensamblan para formar dos trímeros unidos por zinc, formando así, un poro que penetra la membrana bacteriana (Figura 2). Esto permite a los iones, fluir a través de la membrana celular, para finalmente lisar la bacteria<sup>15</sup>. Por otro lado, el péptido de neutrófilos humano tiene como blanco al lípido II, un precursor de la pared celular que bloquea la biosíntesis de las paredes celulares bacterianas<sup>16</sup>. También, ha sido posible identificar pequeñas moléculas miméticas que se unen a las paredes celulares bacterianas<sup>17,18</sup>. Existen lípidos específicos de las membranas fúngicas que pueden ser reconocidos por algunas defensinas<sup>19-21</sup>.

Así también, la porción hidrocarbonada de las bacterias puede ser específicamente reconocida por RegIII, una proteína de la familia de las lectinas, resultando en la muerte de las bacterias Grampositivas<sup>22</sup>. El péptido murino RegIII $\beta$  se asocia con la porción del lípido A de los lipopolisacáridos de bacterias Gramnegativas<sup>23</sup>.

La lisozima humana se une a la cadena del péptido-glicano, pero también corta las secuencias de azúcares, inhibiendo así, la síntesis de la pared celular bacteriana<sup>24</sup>. Además, algunos péptidos se pueden asociar con proteínas de la superficie celular para interferir con el reconocimiento y la entrada de virus como el HIV-1. La asociación del péptido SLPI (inhibidor secretorio de serino proteasas) con la anexina II humana puede interferir en la unión de la fosfatidilserina de la cubierta externa viral del HIV-1 a la misma proteína en macrófagos humanos<sup>25</sup>.

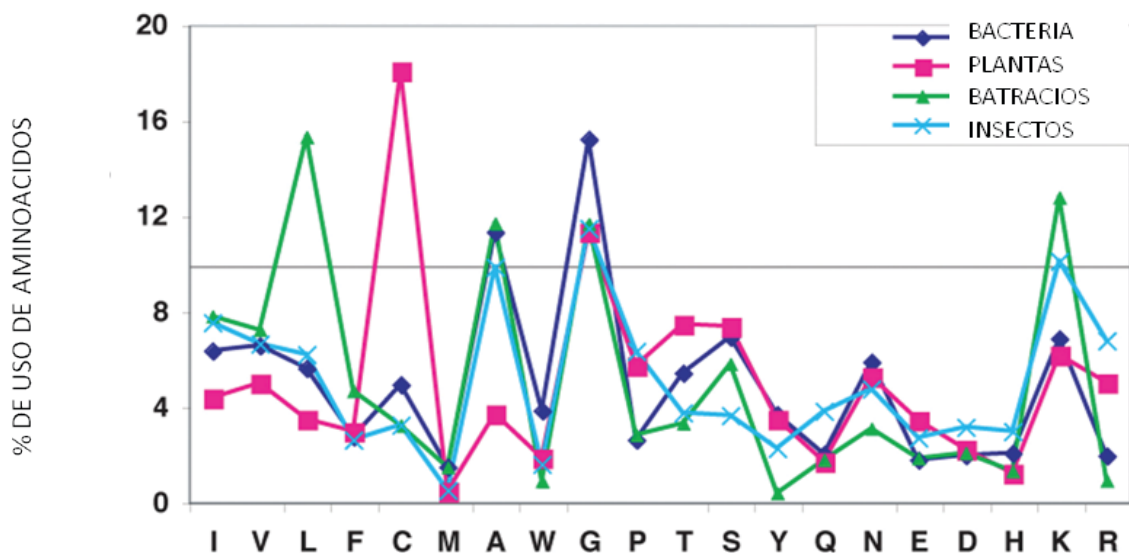
Las membranas internas de las bacterias pueden ser también el blanco de algunos péptidos antimicrobianos. La catelicidina LL-37 es una estructura helicoidal anfipática que conduce a la disrupción de la membrana bacteriana en 3 pasos. El péptido catiónico puede reconocer y recubrir la superficie aniónica de la bacteria, luego se une a la membrana externa y la atraviesa para, finalmente, alcanzar la membrana interna<sup>26</sup>. Otro péptido denominado hepcidina 25 y su isoforma hepcidina 20 presentan la habilidad de perturbar las membranas bacterianas de una forma dependiente del pH, siendo la misma más evidente a pH ácido. En esta condición, las histidinas son cargadas positivamente y así se vuelven más efectivas en la disrupción de la membrana<sup>27</sup>.

La bacteria *Bifidobacterium breve* puede inducir la expresión de RegIII $\gamma$  en el intestino del ratón actuando en el camino de MyD88-Ticam 1<sup>28</sup>. Su ortólogo en humanos es la molécula RegIII $\alpha$ , una lectina que se une al péptidoglicano de las bacterias Grampositivas. Sin embargo, adopta una estructura hexamérica de poro haciendo a la membrana permeable para matar a la bacteria<sup>28</sup>. Estos poros tienen cierta reminiscencia con los que forman las toxinas<sup>29-31</sup>. Esta estructura también provee la base de una muerte selectiva de las bacterias Grampositivas tales como *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *E. faecalis*, pero no bacterias Gramnegativas. Esto se debe a que los lipopolisacáridos, el mayor componente de las membranas externas de las bacterias Gramnegativas, inhiben la actividad de formación de poro de RegIII $\alpha$ <sup>32</sup>.

### Péptidos que penetran la célula y blancos intracelulares

Existen otros péptidos antimicrobianos que ejercen su acción por unión con el ADN. La buforina es un ejemplo<sup>33</sup>. Este péptido es derivado de la histona 2A de unión al ADN. Además, SLPI, una pequeña proteína que inhibe la elastasa y la catepsina G, presenta actividad contra la *E. coli* por unión a ácidos nucleicos<sup>34</sup>. La histatina 5 tiene acción sobre las membranas pro-

Figura 1.



duciendo daño y se han propuesto dos modelos para explicar este mecanismo de acción<sup>35</sup>. En el tratamiento de *C. albicans*, la histatina 5 induce el eflujo de ATP e incrementa la permeabilidad celular a pequeñas moléculas, conduciendo a un desbalance iónico. Las células responden activando los mecanismos de estrés osmótico para minimizar la pérdida de iones. La inactivación del gen TRK1 que codifica para un sistema de captación de  $K^+$  hace que la histatina 5 sea ineficaz. Un segundo modelo, propone que la actividad de la histatina 5 para matar se pierde cuando se utiliza una mutante de la respiración mitocondrial o luego del tratamiento con azida, que inhibe el metabolismo celular<sup>36</sup>. Por otro lado, la internalización de histatinas también está facilitada por la unión del péptido a la proteína de shock térmico Ssa2p en la superficie de *C. albicans*<sup>37</sup>. Esta interferencia con la respiración mitocondrial puede ser responsable de la formación de especies reactivas del oxígeno, lo que lleva a la muerte celular<sup>38</sup>. Un estudio de microarreglos permitió unificar estos dos modelos<sup>39</sup>, porque el estrés oxidativo puede ser producido como un efecto secundario del estrés osmótico. El efecto de la histatina 5 está facilitado en presencia de sorbitol, un agente osmótico, pero no del agente oxidante  $H_2O_2$ . Un péptido antifúngico derivado de la proteína GAPDH, el GAPDH<sup>2,32</sup> puede también penetrar *C. albicans* para inducir apoptosis<sup>40</sup>.

Ha sido también descrito que algunos péptidos antimicrobianos pueden penetrar las células inmunológicas y activarlas para conseguir una respuesta inmune. Los péptidos derivados de cromogranina A pueden penetrar los neutrófilos, unirse a la calmodulina citoplasmática e inducir el influjo de  $Ca^{2+}$  conduciendo a la activación de neutrófilos y a la activación del sistema inmune<sup>41</sup>.

La granulinsina es una molécula efectora en los gránulos citotóxicos de los linfocitos T citotóxicos y las células "natural killer". Puede matar patógenos intracelulares en células infectadas, en presencia de perforina e inducir un efecto citotóxico contra las células tumorales. Aunque la perforina y la granulinsina pueden co-localizar<sup>42</sup>, no resulta claro si trabajan juntas para producir la muerte bacteriana. La perforina puede formar poros que permiten preferentemente la entrada de moléculas catiónicas<sup>43</sup>. Así, la granulinsina podría penetrar en la célula por los poros abiertos por la perforina.

### Inhibición de ácidos nucleicos y síntesis proteica

Algunos péptidos antimicrobianos pueden atravesar espontáneamente las membranas bacterianas interna y externa, teniendo como blanco moléculas como los ácidos nucleicos y las proteínas<sup>44</sup>.

La molécula buforina II está compuesta por 21 aminoácidos, es catiónica, lineal y es un ejemplo de una proteína que puede pasar a través de la membrana celular sin permeabilización, la que posteriormente se acumula en el citoplasma<sup>45</sup>. Este péptido presenta una región bisagra constituida por el aminoácido prolina (Pro11) que resulta muy importante en la penetración del péptido en la célula<sup>45,46</sup>. Una vez en el citoplasma, la buforina II se une al ADN y ARN como fue demostrado para *Es-*

*cherichiacoli*<sup>47</sup>. La alta afinidad de este péptido por los ácidos nucleicos, *in vitro*, puede ser explicada por la identidad de secuencia entre la buforina II y la región N-terminal de la histona H2A. Este péptido presenta actividad anti-endotoxina<sup>48</sup>.

Otros péptidos antimicrobianos actúan inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos. La indolicidina, uno de los péptidos catiónicos más pequeños, actúa promoviendo una significativa depolarización de la membrana e inhibiendo la síntesis de ADN.

La puroindolina actúa también inhibiendo la síntesis de ADN. Algunos péptidos de esta familia inhiben la transcripción<sup>49</sup>.

Entre las catelicidinas, es posible encontrar al péptido PR-39 que atraviesa la célula, sin causar daño en la membrana y bloquea la síntesis de ADN y proteínas en la bacteria<sup>50-52</sup>. Algunos estudios proponen que PR-39 actúa como un inhibidor no-competitivo y reversible del proteosoma 20S, bloqueando la degradación del inhibidor de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ . Como resultado, la expresión génica dependiente de NF- $\kappa$ B es suprimida<sup>53,54</sup>. Los múltiples efectos de PR-39 en las células blanco puede reflejar su habilidad para unirse selectivamente a las proteínas citosólicas conteniendo dominios SH3<sup>55</sup>.

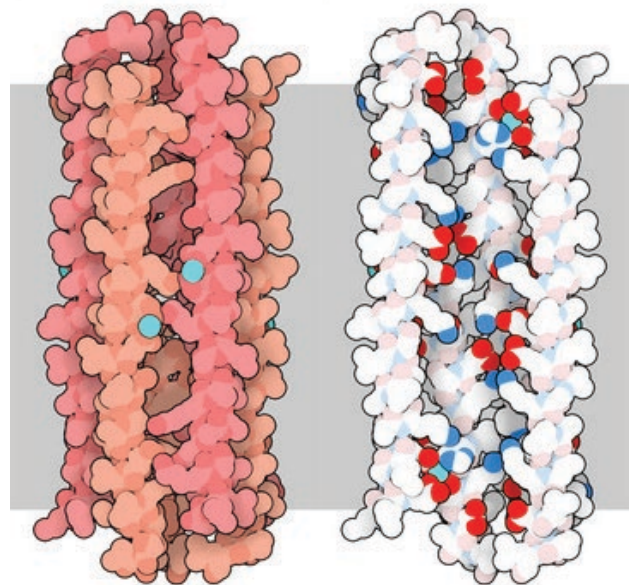
### Diversos mecanismos de resistencia a los péptidos anti-microbianos

Existe una co-evolución entre los péptidos antimicrobianos y los mecanismos de resistencia a dichos péptidos<sup>56</sup>. Los mecanismos de resistencia más comunes involucran cambios en la superficie celular bacteriana y el bloqueo del acceso de un péptido antimicrobiano a sus blancos, afectando su unión y/o su penetración a las células.

### Remodelado de la superficie

Las bacterias Grampositivas y Gramnegativas modifican los componentes de sus paredes celulares para reducir la carga

**Figura 2. Estructura tridimensional de la dermicidina humana.**



negativa neta del lípido A de los lipopolisacáridos por agregado de compuestos conteniendo aminas tales como la etanolamina y la 4-amino-4-deoxi-T-arabinosa (Ara4N) al grupo fosfato. El *V. cholerae* puede modificar el lípido A por adición de glicina o diglicina<sup>57</sup>. La palmitoilación del lípido A también promueve la resistencia a los péptidos antimicrobianos. La *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Y. enterocolitica* y otras bacterias entéricas incrementan la acilación del lípido A en respuesta a la activación del regulón Pho-P-PhoQ. Por otro lado, las mutantes responsables de estas modificaciones revelan una incrementada permeabilidad a los péptidos antimicrobianos<sup>58</sup>. Algunas bacterias, como la *S. entérica* utilizan un sistema regulatorio de dos componentes PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB para sensar la presencia de factores en el tejido del huésped, tales como los péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMPs), lo que resulta en la activación de las enzimas responsables para las modificaciones de los lipopolisacáridos y la resistencia a estos péptidos catiónicos.

En este caso, cuando está activado, el operón regula la síntesis y la unión de grupos Ara4N positivamente cargados al lípido A. La superficie de células de *S. typhimurium* creciendo *in vitro* en medio de cultivo LB o en placas, presenta principalmente lipopolisacáridos nomodificados mientras que la versión altamente modificada de los lipopolisacáridos es la predominante cuando las células son crecidas *in vivo*<sup>59</sup>. Los sistemas PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB son también activados en *P. aeruginosa* en respuesta a los péptidos antimicrobianos o bajas concentraciones de cationes divalentes resultando en la resistencia a polimixina B y otros péptidos antimicrobianos catiónicos<sup>60-62</sup>. Otro patógeno, *Y. pestis*, también depende de un sistema regulatorio de dos componentes para responder a los péptidos antimicrobianos, ya que las mutantes de la vía de PhoPQ tienen una sobrevida intracelular disminuida en los polimorfonucleares<sup>63</sup>. En forma similar, se ha encontrado que en *S. aureus*, los péptidos antimicrobianos inducen la expresión de dos operones, el regulón de la pared celular *VraSR* y el operón *vraDE*. Entre los genes activados en esta respuesta, existe un transportador ABC, una posible peptidasa y una pequeña proteína desconocida. El *vraDE* parece estar involucrado principalmente en la resistencia a varios antibióticos activos en la pared celular y otros agentes antimicrobianos, incluyendo a los péptidos<sup>64</sup>.

*H. pylori* es una bacteria Gramnegativa que coloniza la mucosa estomacal y puede causar úlcera péptica y cáncer gástrico. La estrategia de estas bacterias para eludir los péptidos antimicrobianos consiste en la desfosforilación de la fracción de lípido A de los lipopolisacáridos por la adición de un grupo fosfoetanolamina<sup>65</sup>. Las mutantes de *H. pylori* que son incapaces de remover los grupos fosfato son altamente sensitivas a polimixina y también más reconocidas por el receptor TLR 4 del sistema inmune innato<sup>66</sup>.

Las principales estrategias usadas por las bacterias Grampositivas para reducir las cargas negativas en sus superficies es la incorporación de D-alanina en los ácidos teicoicos, mediada por el operón *dlt*, la incorporación de L-lisina al fosfatidilglicerol y la modificación de lipopolisacáridos con aminoarabinosa<sup>67-69</sup>.

El ácido lipoteicoico es un polímero anfifílico unido a la mem-

brana citoplasmática a través de un anclaje glicolipídico. Puede estar involucrado en procesos tales, como el control de la forma celular, la actividad enzimática autolítica y el mantenimiento de la homeostasis catiónica. La D-alanina se puede incorporar al ácido teicoico unido a membrana a través de un proceso de dos etapas que involucra a la enzima activadora de D-alanina y a la enzima ligasa de la proteína transportadora D-alanil-D-alanina.

*Streptococcus* del grupo B interactúa con los péptidos antimicrobianos catiónicos de varias maneras:

- 1.- La D-alanilación de los ácidos teicoicos incrementa la resistencia de la bacteria a un subgrupo de péptidos, existiendo una correlación directa entre la resistencia, el largo de los péptidos y la densidad de carga.
- 2.- La resistencia debida a la carga aniónica reducida de los ácidos teicoicos no es atribuida a una cantidad disminuida de péptidos unidos a la bacteria.
- 3.- La D-alanilación mayormente altera la conformación de los ácidos teicoicos, lo que resulta en un incremento de la densidad de la pared celular, como fue observado por microscopía electrónica de transmisión, y reduce la penetración de péptidos antimicrobianos catiónicos a través de la pared celular. Por microscopía de fuerza atómica, se ha podido revelar un incremento en la rigidez de la superficie de la pared celular en la cepa salvaje en comparación con la mutante *dlTA*. Se ha propuesto que se produce una disminución en la flexibilidad y permeabilidad de la pared celular, más que una reducción en las interacciones electrostáticas del péptido con la superficie celular<sup>67</sup>.

Otra modificación que puede estar relacionada con la resistencia a péptidos antimicrobianos es la producción de una cápsula. Los polisacáridos capsulares pueden actuar como un escudo, no permitiendo las interacciones entre la superficie microbiana y los péptidos anti-microbianos. La cápsula de *K. pneumoniae* hace que las células sean más resistentes a las defensinas, lactoferrina y polimixina B, mientras que las mutantes acapsulares se unen más a los péptidos antimicrobianos, que las cepas salvajes<sup>70</sup>. La cápsula de *N. meningitidis* contribuye a la resistencia a LL-37<sup>71</sup>.

En *C. jejuni*, la resistencia a  $\alpha$ -defensinas, catelicidinas (LL-37) y polimixina B parece estar relacionada a los lipooligosacáridos producidos por este microorganismo, ya que la mutante con lipooligosacárido truncado presenta una aumentada susceptibilidad en comparación con la cepa salvaje<sup>72</sup>.

## Entrampamiento

Algunas moléculas secretadas pueden unir y neutralizar la actividad microbicida de los péptidos antimicrobianos. Las proteínas SIC producidas por *S. pyogenes* M1 se unen a varios péptidos, bloqueando su actividad antimicrobiana en estadios tempranos de la infección<sup>73-75</sup>. Estas proteínas SIC se unen más eficientemente a LL-37 que al péptido de neutrófilos humanos HNP-1. Las mutantes deficientes en SIC son más sensibles al LL-37 que las cepas salvajes. M1 actuaría como un escudo protector, uniéndose y entrampando a los péptidos antimicrobianos antes de que ellos puedan

alcanzar la membrana celular y matar al patógeno<sup>76</sup>.

Los *pili* también pueden contribuir al entrapamiento de los péptidos antimicrobianos. PiIB de *S. grupo B* secuestra LL-37 y mCRAMP [péptido antimicrobianomurino relacionado a la catelicidina], incrementando la resistencia de estos péptidos<sup>77</sup>.

La estafiloquinasa de *S. aureus*, además de su capacidad de unión a plasminógeno, puede unir también HNP-1 y HNP-2. Esta quinasa induce la liberación de HNPs de neutrófilos y la formación de un complejo resulta en la pérdida de la actividad antimicrobiana de esas moléculas defensivas.

La degradación de las moléculas del huésped por proteasas de patógenos también es un mecanismo que implica el secuestro y la resistencia a varios péptidos antimicrobianos. Las proteasas extracelulares secretadas por *P. aeruginosa* y *E. faecalis* degradan el proteoglicano decorina, produciendo dermatán sulfato que protege a la bacteria de la muerte mediada por HNP-1 a través de su unión a la  $\alpha$ -defensina<sup>78</sup>.

## Conclusiones

La resistencia que desarrollan ciertos microbios a los antibióticos es un problema, por el cual muchos investigadores y compañías farmacéuticas investigan alternativas terapéuticas en el campo de la microbiología. Por ello, es necesario conocer los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos naturales y sintéticos, así como los mecanismos de evasión que los microorganismos emplean con el fin de diseñar nuevas drogas farmacológicas útiles en la terapéutica.

De esta forma, se ha descrito la base de datos con la cual comienza el estudio de los diversos péptidos con actividad antimicrobiana y las características que deben tenerse en cuenta, si se quiere incurrir en el mundo del diseño de péptidos terapéuticos.

## Referencias bibliográficas

- Rice LB. Do we really need new anti-infective drugs? *Curr Opin Pharmacol* 2003;3(5):459-63.
- Wang G, Li X, Wang Z, APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* 2009;37(Database issue):D933-7.
- Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Curr Opin Immunol* 1994;6(4):584-9.
- Yount NY, Yeaman MR. Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:337-60.
- Zaslöf M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415(6870):389-95.
- Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 2003;254(3):197-215.
- Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 2006;24(12):1551-7.
- Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 2009;30(3):131-41.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 2000;28(1):235-42.
- Wang G. Tool developments for structure-function studies of host defense peptides. *Protein Pept Lett* 2007;14(1):57-69.
- Wang Z, Wang G. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res* 2004;32(Database issue):D590-2.
- Daly NL, Chen YK, Rosengren KJ, Marx UC, Phillips ML, Waring AJ, Wang W, Lehrer RI, Craik DJ. Retrocyclin-2: structural analysis of potent anti-HIV theta-defensin. *Biochemistry* 2007;46(35):9920-8.
- Yamasaki K, Gallo RL. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol* 2008;18(1):11-21.
- Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals (Basel)* 2014;7(5):545-94.
- Song C, Weichbrodt C, Salnikov ES, Dynowski M, Forsberg BO, Bechinger B, Steinem C, de Groot BL, Zachariae U, Zeth K. Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(12):4586-91.
- de Leeuw E, Li C, Zeng P, Li C, Diepeveen-de Buin M, Lu WY, Breukink E, Lu W. Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II. *FEBS Lett* 2010;584(8):1543-8.
- Derouaux A, Turk S, Olrichs NK, Gobec S, Breukink E, Amoroso A, Offant J, Bostock J, Mariner K, Chopra I, Vernet T, Zervosen A, Joris B, Frère JM, Nguyen-Distèche M, Terrak M. Small molecule inhibitors of peptidoglycan synthesis targeting the lipid II precursor. *Biochem Pharmacol* 2011;81(9):1098-105.
- Varney KM, Bonvin AM, Pazgier M, Malin J, Yu W, Ateh E, Oashi T, Lu W, Huang J, Diepeveen-de Buin M, Bryant J, Breukink E, Mackerell AD Jr, de Leeuw EP. Turning defense into offense: defensin mimetics as novel antibiotics targeting lipid II. *PLoS Pathog* 2013;9(11):e1003732.
- Sagaram US, El-Mounadi K, Buchko GW, Berg HR, Kaur J, Pandurangi RS, Smith TJ, Shah DM. Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin MtDef4: identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. *PLoS One* 2013;8(12):e82485.
- Poon IKh, Baxter AA, Lay FT, Mills GD, Adda CG, Payne JA, Phan TK, Ryan GF, White JA, Veneer PK, van der Weerden NL, Anderson MA, Kvensakul M, Hulett MD. Phosphoinositide-mediated oligomerization of a defensin induces cell lysis. *Elife*;3:e01808.
- Silva PM, Gonçalves S, Santos NC. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *Front Microbiol* 2014;5:97. Review.
- Lehotzky RE, Partch CL, Mukherjee S, Cash HL, Goldman WE, Gardner KH, Hooper LV. Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(17):7222-7.
- Miki T, Holst O, Hardt WD. The bactericidal activity of the C-type lectin RegIII $\beta$  against Gram-negative bacteria involves binding to lipid A. *J Biol Chem* 2012;287(41):34844-55.
- Formanek H. A three dimensional model of the digestion of peptidoglycan by lysozyme. *Biophys Struct Mech* 1977;4(1):1-14.
- Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, Jin W, Swisher J, Hardegen N, Wild CT, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor

- binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *J Exp Med* 2004;200(10):1337-46.
26. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 1999;341(Pt 3):501-13.
  27. Maisetta G, Vitali A, Scorciapino MA, Rinaldi AC, Petruzzelli R, Brancatisano FL, Esin S, Stringaro A, Colone M, Luzi C, Bozzi A, Campa M, Batoni G. pH-dependent disruption of *Escherichia coli* ATCC 25922 and model membranes by the human antimicrobial peptides hepcidin 20 and 25. *FEBS J* 2013;280(12):2842-54.
  28. Natividad JM, Hayes CL, Motta JP, Jury J, Galipeau HJ, Philip V, Garcia-Rodenas CL, Kiyama H, Bercik P, Verdu EF. Differential induction of antimicrobial REGIII by the intestinal microbiota and *Bifidobacterium breve* NCC2950. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(24):7745-54.
  29. Birck C, Damian L, Marty-Detraves C, Lougarre A, Schulze-Briese C, Koehl P, Fournier D, Paquereau L, Samama JP. A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by the crystal structure of *Xerocomus chrysenteron* lectin XCL. *J Mol Biol* 2004;344(5):1409-20.
  30. Parker MW, Feil SC. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 2005;88(1):91-142. Review.
  31. Mechaly AE, Bellomio A, Gil-Cartón D, Morante K, Valle M, González-Mañas JM, Guérin DM. Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins. *Structure* 2011;19(2):181-91.
  32. Mechaly AE, Bellomio A, Gil-Cartón D, Morante K, Valle M, González-Mañas JM, Guérin DM. Structural insights into the oligomerization and architecture of eukaryotic membrane pore-forming toxins. *Structure* 2011;19(2):181-91.
  33. Wang G, Mishra B, Epand RF, Epand RM. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(9):2160-72.
  34. Miller KW, Evans RJ, Eisenberg SP, Thompson RC. Secretory leukocyte protease inhibitor binding to mRNA and DNA as a possible cause of toxicity to *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1989;171(4):2166-72.
  35. den Hertog AL, van Marle J, van Veen HA, Van't Hof W, Bolscher JG, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane. *Biochem J* 2005;388(Pt 2):689-95.
  36. Gyurko C, Lendenmann U, Troxler RF, Oppenheim FG. *Candida albicans* mutants deficient in respiration are resistant to the small cationic salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(2):348-54.
  37. Li XS, Sun JN, Okamoto-Shibayama K, Edgerton M. *Candida albicans* cell wall ssa proteins bind and facilitate import of salivary histatin 5 required for toxicity. *J Biol Chem* 2006;281(32):22453-63.
  38. Helmerhorst EJ, Breeuwer P, van't Hof W, Walgreen-Weterings E, Oomen LC, Veerman EC, Amerongen AV, Abee T. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* 1999;274(11):7286-91.
  39. Vylkova S, Jang WS, Li W, Nayyar N, Edgerton M. Histatin 5 initiates osmotic stress response in *Candida albicans* via activation of the Hog1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Eukaryot Cell* 2007;6(10):1876-88.
  40. Wagener J, Schneider JJ, Baxmann S, Kalbacher H, Borelli C, Nuding S, Kuchler R, Wehkamp J, Kaeser MD, Mailänder-Sánchez D, Braunsdorf C, Hube B, Schild L, Forssmann WG, Korting HC, Liepke C, Schaller M. A peptide derived from the highly conserved protein GAPDH is involved in tissue protection by different antifungal strategies and epithelial immunomodulation. *J Invest Dermatol* 2013;133(1):144-53.
  41. Aslam R, Atindehou M, Lavaux T, Haïkel Y, Schneider F, Metz-Boutigue MH. Chromogranin A-derived peptides are involved in innate immunity. *Curr Med Chem* 2012;19(24):4115-23.
  42. Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S, Krensky AM, Rollinghoff M, Nunes Sarno E, Burdick AE, Rea TH, Modlin RL. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med* 2001;7(2):174-9.
  43. Stewart SE, Kondos SC, Matthews AY, D'Angelo ME, Dunsstone MA, Whisstock JC, Trapani JA, Bird PI. The perforin pore facilitates the delivery of cationic cargos. *J Biol Chem* 2014;289(13):9172-81.
  44. Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski Lda S, Silva-Pereira I, Kyaw CM. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* 2013;4:353.
  45. Cho JH, Sung BH, Kim SC. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788(8):1564-9.
  46. Xie Y, Fleming E, Chen JL, Elmore DE. Effect of proline position on the antimicrobial mechanism of buforin II. *Peptides* 2011;32(4):677-82.
  47. 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.
  48. Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, Del Prete MS, Viticchi C, Kamysz W, Łempicka E, Saba V, Scalise G. Potential therapeutic role of cationic peptides in three experimental models of septic shock. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(7):2132-6.
  49. Haney EF, Petersen AP, Lau CK, Jing W, Storey DG, Vogel HJ. Mechanism of action of puromycin derived tryptophan-rich antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2013;1828(8):1802-13.
  50. Boman HG, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* 1993;61(7):2978-84.
  51. Chan YR, Zanetti M, Gennaro R, Gallo RL. Anti-microbial activity and cell binding are controlled by sequence determinants in the antimicrobial peptide PR-39. *J Invest Dermatol* 2001;116(2):230-5.
  52. Bals R, Wilson JM. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(4):711-

20. Review.
53. Gao Y, Lecker S, Post MJ, Hietaranta AJ, Li J, Volk R, Li M, Sato K, Saluja AK, Steer ML, Goldberg AL, Simons M. Inhibition of ubiquitin proteasome pathway-mediated I kappa B alpha degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. *J Clin Invest* 2000;106(3):439-48.
  54. Anbanandam A, Albarado DC, Tirziu DC, Simons M, Veeraghavan S. Molecular basis for proline- and arginine-rich peptide inhibition of proteasome. *J Mol Biol* 2008;384(1):219-27.
  55. Kaneider NC, Djanani A, Wiedermann CJ. Heparan sulfate proteoglycan-involving immunomodulation by cathelicidin antimicrobial peptides LL-37 and PR-39. *ScientificWorldJournal* 2007;7:1832-8. Review.
  56. Peschel A, Sahl HG. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(7):529-36. Review.
  57. Hankins JV, Madsen JA, Giles DK, Brodbelt JS, Trent MS. Amino acid addition to *Vibrio cholerae* LPS establishes a link between surface remodeling in gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(22):8722-7.
  58. Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, Hackett M, Miller SI. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 1998;95(2):189-98.
  59. Strandberg KL, Richards SM, Tamayo R, Reeves LT, Gunn JS. An altered immune response, but not individual cationic antimicrobial peptides, is associated with the oral attenuation of Ara4N-deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. *PLoS One* 2012;7(11):e49588.
  60. McPhee JB, Lewenza S, Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2003;50(1):205-17.
  61. Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol* 2004;186(2):575-9.
  62. McPhee JB, Bains M, Winsor G, Lewenza S, Kwasnicka A, Brazas MD, Brinkman FS, Hancock RE. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg<sup>2+</sup>-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2006;188(11):3995-4006.
  63. O'Loughlin JL, Spinner JL, Minnich SA, Kobayashi SD. *Yersinia pestis* two-component gene regulatory systems promote survival in human neutrophils. *Infect Immun* 2010;78(2):773-82.
  64. Pietiäinen M, François P, Hyryläinen HL, Tangomo M, Sass V, Sahl HG, Schrenzel J, Kontinen VP. Transcriptome analysis of the responses of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial peptides and characterization of the roles of *vraDE* and *vraSR* in antimicrobial resistance. *BMC Genomics* 2009;10:429.
  65. Tran AX, Whittimore JD, Wyrick PB, McGrath SC, Cotter RJ, Trent MS. The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin. *J Bacteriol* 2006;188(12):4531-41.
  66. Cullen TW, Giles DK, Wolf LN, Ecobichon C, Boneca IG, Trent MS. *Helicobacter pylori* versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa. *PLoS Pathog* 2011;7(12):e1002454.
  67. Kristian SA, Datta V, Weidenmaier C, Kansal R, Fedtke I, Peschel A, Gallo RL, Nizet V. D-alanylation of teichoic acids promotes group A streptococcus antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J Bacteriol* 2005;187(19):6719-25.
  68. Andrä J, Goldmann T, Ernst CM, Peschel A, Gutschmann T. Multiple peptide resistance factor (MprF)-mediated Resistance of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial peptides coincides with a modulated peptide interaction with artificial membranes comprising lysyl-phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 2011;286(21):18692-700.
  69. Saar-Dover R, Bitler A, Nezer R, Shmuel-Galia L, Firon A, Shimoni E, Trieu-Cuot P, Shai Y. D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B streptococcus by increasing the cell wall density. *PLoS Pathog* 2012;8(9):e1002891.
  70. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 2004;72(12):7107-14.
  71. Jones A, Geörg M, Maudsdotter L, Jonsson AB. Endotoxin, capsule, and bacterial attachment contribute to *Neisseria meningitidis* resistance to the human antimicrobial peptide LL-37. *J Bacteriol* 2009;191(12):3861-8.
  72. Keo T, Collins J, Kunwar P, Blaser MJ, Iovine NM. *Campylobacter* capsule and lipooligosaccharide confer resistance to serum and cationic antimicrobials. *Virulence* 2011;2(1):30-40.
  73. Frick IM, Akesson P, Rasmussen M, Schmidtchen A, Björck L. SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *J Biol Chem* 2003;278(19):16561-6.
  74. Fernie-King BA, Seilly DJ, Lachmann PJ. The interaction of streptococcal inhibitor of complement (SIC) and its proteolytic fragments with the human beta defensins. *Immunology* 2004;111(4):444-52.
  75. Pence MA, Rooijackers SH, Cogen AL, Cole JN, Hollands A, Gallo RL, Nizet V. Streptococcal inhibitor of complement promotes innate immune resistance phenotypes of invasive M1T1 group A *Streptococcus*. *J Innate Immun* 2010;2(6):587-95.
  76. Lauth X, von Köckritz-Blickwede M, McNamara CW, Myskowski S, Zinkernagel AS, Beall B, Ghosh P, Gallo RL, Nizet V. M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J Innate Immun* 2009;1(3):202-14.
  77. Maissey HC, Quach D, Hensler ME, Liu GY, Gallo RL, Nizet V, Doran KS. A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *FASEB J* 2008;22(6):1715-24.
  78. Schmidtchen A, Frick IM, Björck L. Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. *Mol Microbiol* 2001;39(3):708-13.