

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



**“PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS: ESCUDO  
ESENCIAL DE LA RESPUESTA INMUNE”**

**INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO  
Opción: TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA**

**RODOLFO VILLARRUEL FRANCO**

**LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JALISCO, MARZO DEL 2004**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. RODOLFO VILLARRUEL FRANCO  
PRESENTE.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**, opción Trabajo monográfico de actualización con el título "**PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS: ESCUDO ESENCIAL DE LA RESPUESTA INMUNE**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo el **DR. ALFONSO ISLAS RODRÍGUEZ** y como Asesor la **M.C. ROSARIO HUIZAR LÓPEZ**.

**ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 16 de marzo del 2004

  
**DRA. MÓNICA ELIZABETH ROJAS LÓPEZ**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**  
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

  
**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. DR. ALFONSO ISLAS RODRÍGUEZ.- Director del Trabajo  
c.c.p. M.C. ROSARIO HUIZAR LÓPEZ.- Asesor del Trabajo  
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN  
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
P R E S E N T E

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo monográfico de actualización que realizó el pasante:

**RODOLFO VILLARRUEL FRANCO** código **193164865** con el título: **PEPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS: ESCUDO ESENCIAL DE LA RESPUESTA INMUNE** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y, en su caso, programación de fecha de examen respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 01 de Marzo del 2004

**DIRECTOR**

  
Dr. Alfonso Islas Rodríguez



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**ASESOR**

  
M.C. María del Rosario Huizar López

**SINODALES**

- 1.- Dra. Galina Petrovna Zaitseva
  - 2.- M.C. Ramón Reynoso Orozco
  - 3.- Dr. Eduardo Vázquez Valls
- SUPL. Q.F.B Josefina Casas Solís

  
FIRMA

  
FIRMA

  
FIRMA

  
FIRMA

## **DEDICATORIA**

**A mis padres:**

Por quienes soy lo que soy. A ti mamá por darme el ejemplo de la tenacidad y la fuerza, y por enseñarme que en esta vida hay que entregarse a los demás, a ti papá, por ser el principal impulsor de mis deseos de superarme y por ver en ti el ejemplo de un verdadero científico, pero gracias sobre todo a ambos por su amor incondicional.

**A mis hermanas:**

Por ser los dos soles de mi familia y por quienes me esfuerzo por superarme para que puedan ver en mi un ejemplo.

**A Shantall:**

Por haber aparecido en el momento exacto, y por darme todo su apoyo y comprensión, pero sobre todo por ser la mujer que amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios, por el simple hecho de estar vivo y bendecirme siempre.**

**A la Universidad de Guadalajara por recibirme y formarme.**

**A mi director de tesis, Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez, a quien me puedo preciar de llamarlo maestro, gracias por sus consejos y por confiar en mi.**

**A la M. C. María del Rosario Huizar López, por asesorarme durante este trabajo y desde el primer día que llegué al laboratorio, gracias chayo por tus consejos y tu amistad.**

**A todos mis maestros que a lo largo de la carrera aportaron sus conocimientos y experiencia.**

**A mis compañeros y amigos de la facultad: Gustavo, Jorge, Verónica, Lusmila, Flor, Ramón, y a muchos otros que desde el comienzo estuvieron conmigo y que aún cuando ahora algunos de ellos ya no siguieron por este camino, su amistad fue valiosa para mi.**

**A todos mis amigos, en especial a Carlos y Mauricio por contar con ustedes.**

**A Shantall, gracias de nuevo mi amor, por estar ahí junto conmigo aun cuando a veces las cosas se han puesto difíciles, te amo.**

**A toda mi familia por hacerme sentir que soy parte de un círculo que me protege.**

**A mis padres, porque sin ustedes y su apoyo no estaría escribiendo esto.**

## CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
2. PRINCIPIOS DE LA INMUNIDAD INNATA.....	3
Barreras externas en contra de infecciones.....	4
Componentes Celulares del Sistema Inmune Innato.....	5
3. PRINCIPIO DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.....	16
Fases de la Respuesta Inmune Adaptativa.....	17
Células involucradas en la Respuesta Inmune Adaptativa.....	19
Respuesta Inmune Celular.....	20
Respuesta Inmune Humoral.....	22
4. PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS.....	23
Clasificación de los Péptidos Naturales Antimicrobianos.....	24
Péptidos Antimicrobianos en Plantas.....	25
Péptidos Antimicrobianos en Insectos.....	28
Péptidos Antimicrobianos en Vertebrados.....	32
5. ESTRUCTURA DE LOS PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS.....	46
Péptidos Antimicrobianos con estructura $\alpha$ -hélice.....	46
Péptidos Antimicrobianos con estructura de hoja- $\beta$ .....	47
6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PEPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS.....	50
7. REGULACIÓN DE LOS GENES DE PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS.....	53
8. PERSPECTIVAS DE LOS PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS.....	57
Nuevos Antibióticos.....	57
El papel de los Péptidos Naturales Antimicrobianos en inflamación, angiogénesis y función celular.....	62
9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	65
10. BIBLIOGRAFÍA.....	69

## INDICE DE TABLAS.

Tabla I. Familias de péptidos antimicrobianos encontrados actualmente en plantas.....	25
Tabla II. Péptidos antimicrobianos derivados de insectos.....	32
Tabla III. Familias y nomenclatura de péptidos antimicrobianos de acuerdo a su estructura molecular.....	49
Tabla IV. Compañías involucradas en el desarrollo de péptidos antimicrobianos como drogas.....	61
Tabla V. Actividades no-microbidas de péptidos antimicrobianos mediadas por receptores específicos.....	64

## INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura tridimensional de una defensina vegetal.....	28
Figura 2. Estructura tridimensional de una defensina de insectos.....	31
Figura 3. Estructura tridimensional de una $\alpha$ -defensina.....	35
Figura 4. Estructura tridimensional de una $\beta$ -defensina.....	36
Figura 5. Ejemplos de modelos moleculares de diferentes clases estructurales de Péptidos Naturales Antimicrobianos.....	50
Figura 6. Los 3 principales mecanismos de acción de los Péptidos Naturales Antimicrobianos sobre las membranas microbianas.....	52
Figura 7. Mecanismo de activación de Péptidos Naturales Antimicrobianos en insectos .....	55



## RESUMEN.

La mayoría de organismos como plantas, insectos y mamíferos, conviven diariamente con una gran cantidad de microorganismos tanto patógenos como no patógenos. En el curso de su evolución, estos organismos han desarrollado una serie de estrategias para evitar la infección causada por microorganismos patógenos, que a su vez han evolucionado para sobrevivir. Dichas estrategias conforman el Sistema Inmunológico, que está compuesto por la Respuesta Inmune Innata (RII) y la Respuesta Inmune Adquirida (RIA). En la primera de estas respuestas se incluyen los Péptidos Naturales Antimicrobianos (PNA's). Estos péptidos poseen cargas positivas (catiónicas) que les permiten unirse a los fosfolípidos cargados negativamente y que se encuentran en las membranas externas de los microorganismos.

Los PNA's se clasifican de acuerdo a su conformación estructural o al organismo que los produce, aunque por el momento no existe una clasificación general que sea aceptada en su totalidad. Los péptidos pueden ser inducibles, y algunos de ellos se expresan constitutivamente.

El mecanismo mediante el cual los PNA's eliminan a los microorganismos es mediante la formación de poros en la membrana externa de los agentes infecciosos, tanto en bacterias con pared como en las que no lo tienen. En la actualidad se conocen tres modelos para explicar la acción antimicrobiana de los PNA's, estos son: de barril, de canal agregado y de alfombra. Su acción microbicida incluye a bacterias Gram +, bacterias Gram -, algunas especies de hongos y algunos virus envueltos.

Debido al mecanismo de acción que presentan los PNA's, resulta difícil para los microorganismos modificar la estructura de su membrana mediante alguna mutación, por

lo que estos péptidos tienen un gran potencial como agentes terapéuticos. En los últimos años se han investigado algunas otras propiedades de los PNA's y se ha comprobado que además de ser microbicidas, también funcionan como mediadores entre la RII y la RIA, participan en la proliferación celular y presentan a su vez propiedades angiogénicas.

Por lo anterior, en los últimos años se han incrementado considerablemente las investigaciones tanto para descubrir nuevos péptidos y nuevas propiedades como para su posible utilización terapéutica.

Durante la realización de este trabajo, la metodología utilizada para recavar la información fue la revisión de artículos recientes obtenidos de diversas fuentes, como lo son revistas especializadas, consulta de artículos vía internet así como visitas a diferentes bibliotecas.

El objetivo principal de este trabajo es el dar a conocer información básica y actual relacionada con los péptidos naturales antimicrobianos para contribuir a un conocimiento mas amplio sobre este tema, debido a su importancia biológica y médica que han obtenido durante los últimos años.

## 1.-INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.

El sistema inmune (SI) de los seres vivos esta equipado con una serie de mecanismos que los protegen de los microorganismos patógenos, que de otra forma, debido a su nivel evolutivo, tomarían ventaja para dañar al huésped. La evolución ha hecho que el SI desarrolle respuestas en contra de cualquier elemento extraño ó peligroso. La respuesta inmune en los vertebrados se divide en dos grandes categorías: Innata y Adaptativa. La respuesta inmune innata (RII) es considerada la primer línea de defensa, presenta un reconocimiento de amplio espectro y una rápida eliminación de los microorganismos invasores.

Las evidencias más recientes indican que las células del sistema inmune innato pueden regular a la Respuesta Inmune Adquirida (RIA) al identificar las proteínas microbianas y activar, a través de macrófagos y células dendríticas, a los linfocitos T que aún no han tenido contacto con el antígeno (Fearon, 1997; Medzhitov, 1997). Debido a que las respuestas patógeno-específicas de la RIA ocurren lentamente, las células de la Respuesta Inmune Innata (RII) cuentan con sustancias antimicrobianas que actúan rápidamente y controlan el crecimiento de un gran número de microorganismos potencialmente patógenos. Otras sustancias causan daño estructural en su membrana como hacen los péptidos naturales antimicrobianos (PNA's) (White S.H., 1995). Estos péptidos, presentan una función muy importante contra microorganismos patógenos (Gallo, 1994; Harder, 1997; Medzhitov, 1997).

Los organismos eucarióticos como plantas, invertebrados y vertebrados (incluidos los humanos) conviven normalmente con microorganismos que usualmente no infectan al hospedero. La razón de lo anterior, se debe a la existencia de las barreras físicas y a la producción de los péptidos antimicrobianos que funcionan como un escudo químico controlando

el crecimiento de los microorganismos patógenos y juegan un papel primordial para eliminarlos en las primeras fases de la infección (Matzinger, 2002).

La barrera de péptidos antimicrobianos es una parte esencial en la RII (Beutler, 2000). Estos péptidos son constitutivos e inducibles, por sustancias secretadas por microorganismos. La mayoría de estos eliminan a los microorganismos al formar poros en su membrana celular (Schröder., 1999). Los primeros indicios de que existían péptidos catiónicos con actividad microbicida fueron en las plantas. Desde hace 50 años se sabe que las tioninas realizan una función antimicrobiana en las plantas e inhiben el crecimiento de bacterias y hongos *in vitro* (Stuart, 1942.). Además en 1972 por primera vez se demostró que las tioninas inhiben el crecimiento de un número considerable de bacterias patógenas sugiriendo por lo tanto que este péptido juega un papel protector muy importante. (Fernandez de Caley, 1972)

Los primeros trabajos que se realizaron en el campo de los péptidos antimicrobianos en animales fueron reportados a principios de los 80's, en el laboratorio de Hans Boman y colaboradores, ellos inyectaron bacterias a pupas de un tipo de polilla del género *Cecropia*, después de siete días detectaron en la hemolinfa de las pupas la presencia de un péptido catiónico de 37 aminoácidos con actividad antimicrobiana hacia las bacterias Gram-negativas (Steiner, 1981).

A mediados de los 80's Robert Lehrer y colaboradores reportaron las estructuras de una clase abundante de péptidos almacenados en células polimorfonucleares de humanos y conejos. Estos péptidos llamados defensinas presentaban actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Selsted, 1985; Selsted, 1984).

En 1987 Michael Zasloff descubrió que la piel de la rana *Xenopus laevis* contenía glándulas multicelulares ricas en péptidos catiónicos antimicrobianos, mismos que denominó magaininas (Zasloff, 1987). Estos péptidos alteran la permeabilidad de las células bacterianas causando un trastorno en el metabolismo y provocando lisis celular. (Boman, 1995). El mecanismo implicado de la acción antimicrobiana es abordado por Matzuzaki en 1997 y explica como los PNA's interactúan con la membrana citoplasmática debido a su carga positiva.

En la década de 1990, hubo una rápida expansión en el campo de los péptidos antimicrobianos. Actualmente, además de estar bien establecido que las respuestas de péptidos antimicrobianos son un elemento común en los phyla inferiores, se han reconocido sitios de producción de estos péptidos en mamíferos (Gallo, 1998).

El presente trabajo pretende recopilar la información básica existente con relación a los péptidos naturales antimicrobianos, que son parte esencial de la RII, para contribuir a un conocimiento más amplio sobre este tema que durante los últimos años ha tenido gran importancia biológica y médica.

## **2.-PRINCIPIOS DE LA INMUNIDAD INNATA.**

La inmunidad innata proporciona al hospedero una importante y rápida primera línea de defensa que impide la invasión de los patógenos y/o su diseminación en el organismo, previa a la RIA. Los lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos (LTAs) son moléculas que se encuentran en la superficie de las bacterias, pero no en las células eucarióticas por lo que su reconocimiento específico por el sistema inmune innato indica la presencia de una infección (Janeway, 1989; Janeway, 1992). La RII utiliza poblaciones de células: asesinas naturales,

células dendríticas, macrófagos y polimorfonucleares así como componentes solubles: péptidos antimicrobianos, sistema del complemento, factor de necrosis tumoral (TFN), interleucina 1 (IL-1), interleucina 12 (IL-12) e interleucina 18 (IL-18) para la eliminación de elementos extraños o propios que pongan en peligro la supervivencia del huésped.

Tradicionalmente se ha considerado que la inmunidad innata produce una rápida e incompleta defensa antimicrobiana en el huésped hasta que se genera la RIA más lenta pero definitiva. También tiene un papel adicional para determinar a qué antígenos responde la RIA y la naturaleza de esa respuesta, distinguiendo entre diferentes clases de bacterias patógenas, virus y hongos. Los distintos componentes de la RII además de sus funciones de defensa e inmunorregulación de las respuestas adaptativas, juegan un papel importante en el desarrollo de los procesos autoinmunes (Fearon, 1997; Shi, 2001). Las células del SII están localizadas en los bordes epiteliales y reconocen antígenos no procesados, carbohidratos o ácidos nucleicos expresados por los patógenos utilizando diferentes receptores. En cambio los linfocitos T y B expresan receptores antígeno-específicos como parte de la RIA pero es la inmunidad innata la que enseña a éstas células antígeno-específicas a reconocer que elementos necesita una respuesta inmune (Hoffmann, 1999)

## **BARRERAS EXTERNAS EN CONTRA DE INFECCIONES:**

La forma más sencilla que tiene un organismo de evitar alguna infección es el evadir el ingreso del microorganismo al cuerpo. La primera línea de defensa es la piel, la cual es impermeable a la mayoría de los agentes infecciosos. Numerosas bacterias no pueden sobrevivir mucho tiempo en la piel debido a los efectos inhibitorios de ciertas sustancias como son el ácido

láctico, los ácidos fáticos y los péptidos antimicrobianos, además del pH bajo existente en este tipo de secreciones (Beutler, 2000)

El moco secretado por las membranas que se encuentran en las superficies internas del cuerpo actúa como una barrera de protección, para bloquear la adherencia de las bacterias hacia las células epiteliales. Una vez que han sido atrapadas por el moco, las bacterias son eliminadas mediante movimientos mecánicos como lo son el movimiento ciliar, el toser o estornudar. Muchos de los fluidos corporales que se secretan contienen componentes bactericidas como el ácido en los jugos gástricos, la espermina y el zinc en el semen, la lactoperoxidasa en leche, las lisozimas en lagrimas, secreciones nasales, saliva, y como una línea de defensa importante se ha comenzado a estudiar extensivamente durante la última década, los péptidos naturales antimicrobianos que se encuentran en muchas de las secreciones ya mencionadas anteriormente (Roitt, 2001).

Si los microorganismos llegan a penetrar estas líneas de defensa se activan otros tipos celulares.

## **COMPONENTES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE INNATO**

Los polimorfonucleares (PMN) son células pertenecientes al SII, contienen gránulos citoplasmáticos con un núcleo lobulado característico, existen tres tipos de PMN: neutrófilos, basófilos y eosinófilos.

## **NEUTRÓFILO :**

Se origina de una célula madre hematopoyética precursora de otros elementos celulares de la sangre, es la célula blanca dominante en el torrente sanguíneo. Es una célula que no se divide y presenta vida corta, su núcleo posee múltiples núcleos lobulados en forma de collar de cuentas y en su citoplasma se encuentran gránulos que no se tiñen mediante técnicas histológicas, como son la hematoxilina-eosina a diferencia de los gránulos de los eosinófilos y basófilos. Estos gránulos pueden ser de dos tipos: los gránulos azurófilos que se desarrollan en una fase temprana, éstos tienen una morfología lisosomal clásica y contienen mieloperoxidasa junto con la mayoría de moléculas efectoras antimicrobianas no-oxidativas incluyendo las defensinas, las cuales son péptidos antimicrobianos que incrementan la permeabilidad de la membrana bacteriana y los gránulos secundarios específicos que contienen lactoferrina, gran cantidad de lisosima, fosfatasa alcalina y citocromo *b58* de unión a membrana. Las reservas de glucógeno pueden ser utilizadas durante la glucólisis permitiendo a los neutrófilos funcionar bajo condiciones anaeróbicas (Roitt, 2001).

## **BASÓFILO:**

Los basófilos son células redondas cuyo tamaño oscila entre 10 y 13  $\mu\text{m}$ , el núcleo de cromatina densa posee generalmente dos o tres lóbulos unidos por puentes cromatínicos, en ocasiones difíciles de visualizar debido a la presencia de muchas granulaciones basófilas propias de esta célula. Los gránulos basófilos se disponen encima del núcleo con un tamaño entre 0.2 y 1  $\mu\text{m}$ , adquiere una coloración rojo violácea oscura y tiene una forma poligonal. En ocasiones los gránulos basófilos se disponen en el interior de las vacuolas citoplasmáticas y presentan



metacromasia (diferencia de coloración) con los colorantes azul de metileno y azul de toluidina adquiriendo una tonalidad rojiza mientras que el resto de las estructuras celulares se tiñen de color azul. La metacromasia se debe a la riqueza de estos gránulos en mucopolisacáridos ácidos sulfatados, ricos en histamina, heparina, glucógeno y determinadas enzimas (peroxidasa). A diferencia de los mastocitos, éstos no contienen cloacetatoesterasa, ni fosfatasa alcalina. Otra característica diferencial entre los gránulos basófilos y los del mastocito, es la solubilidad de los primeros por lo que el citoplasma del basófilo aparece en ocasiones con numerosas vacuolas que no son mas que gránulos parcialmente extraídos (Janeway, 2001a).

### **EOSINÓFILO:**

Los eosinófilos tienen un tamaño similar a los neutrófilos, se caracterizan morfológicamente por contener en su citoplasma gránulos acidófilos. Dichos gránulos tienen una forma redonda de entre 0.5 y 1.5  $\mu\text{m}$ , ocupan todo el citoplasma de la célula y se tiñen de color naranja o marrón anaranjado con las coloraciones panópticas. A diferencia de los gránulos basófilos nunca se disponen por encima del núcleo. Desde el punto de vista ultraestructural los eosinófilos poseen distintos tipos de granulación:

1-Primaria: Se localiza la lipofosfolipasa también denominada proteína del cristal de Charcot Leyden, éstos gránulos no tienen centro cristalóide y constituyen aproximadamente un 5% de la granulación del eosinófilo.

2-Secundaria: Con centro cristalóide que representa más del 95% de la granulación en el eosinófilo maduro.

3- Microgránulos o estructuras tubulovesiculares: Son ricos en fosfatasa ácida y proteínas catiónicas, citoquímicamente se caracterizan por poseer gran cantidad de mieloperoxidasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa.

La peroxidasa se dispone fundamentalmente en la matriz de los gránulos y posee características diferenciales bioquímicas, antigénicas y ontogénicas con respecto a la peroxidasa de los neutrófilos, también contienen proteínas catiónicas y mucosustancias sulfatadas: poseen un alto contenido de fosfolipasa y lisofosfolipasa. Por el contrario está desprovisto de fosfatasa alcalina y lactoferrina. Su papel biológico principal es modular la reacción anafiláctica al ser capaces de inactivar sustancias liberadas por los mastocitos, además de controlar la infección por ciertos parásitos, cuyo ataque no tiene lugar por mecanismos de fagocitosis sino por adherencia y citotoxicidad al segregar diversas sustancias nocivas (Benjamini, 2000a; Roitt, 2001).

### **MACRÓFAGO:**

Los macrófagos son fagocitos del sistema inmune y están distribuidos ampliamente en los tejidos corporales, donde juegan un papel crítico en la inmunidad innata. Estas células derivan de los premonocitos de la médula ósea los cuales después de que se diferencian en monocitos sanguíneos, finalmente se alojan en los tejidos como macrófagos maduros donde constituyen el sistema fagocítico mononuclear. Están presentes en el tejido conectivo, alrededor de la membrana basal de las venas de pequeño calibre y particularmente concentrados en pulmones, hígado, bazo y nódulos linfáticos.

A diferencia de los polimorfonucleares éstas son células que tienen un periodo de vida mayor, tienen un retículo endoplasmático rugoso complejo bastante grande, así como varias

mitocondrias. La propiedad fundamental de un macrófago es su capacidad de fagocitar y eliminar materiales extraños, peligrosos y poco funcionales. La fagocitosis puede facilitarse por la presencia de antígeno recubierto con anticuerpo proceso conocido como opsonización. Además los anticuerpos de diversas especificidades pueden fijarse a la superficie del macrófago a través de su receptor para la porción Fc (fracción cristalizable) de la inmunoglobulina que induce funciones efectoras en dicha célula (Janeway, 2001a; Roitt, 2001).

### **CÉLULAS DENDRÍTICAS:**

Estas células recogen y transfieren la información a las células del sistema inmune adaptativo, son las únicas células inductoras de respuestas inmunes primarias proporcionando un nexo de unión esencial entre la inmunidad innata y adquirida. Las células dendríticas inmaduras migran del torrente sanguíneo hacia los tejidos donde se establecen y tienen propiedades tanto fagocíticas como pinocíticas, ingestando grandes cantidades del fluido extracelular circundante, al detectar algún patógeno estas células maduran y migran a los nódulos linfáticos. Las células dendríticas tienen dos diferentes subpoblaciones celulares en la línea mieloide: las células de Langerhans y las células dendríticas intersticiales y una más en la línea linfoide (Benjamini, 2000a; Roitt, 2001).

### **MASTOCITOS:**

Son células grandes de forma redonda (20-30  $\mu\text{m}$ ) al microscopio de luz, se caracterizan por presentar el citoplasma lleno de gránulos basófilos que se tiñen de azul con azul de toluidina. Su núcleo es esférico y está situado en el centro de la célula.

Estas células se ubican de preferencia próximas a los vasos sanguíneos, los gránulos que presentan contienen heparina y proteoglicano sulfatado de alrededor de 750 kD que forma la matriz de los gránulos. A esta macromolécula se asocian varias moléculas de bajo peso cargadas positivamente como la histamina; pteasas neutras y factores quimiotácticos para eosinófilos y neutrófilos. Su superficie muestra largas prolongaciones muy finas, su citoplasma contiene pocos organelos y sus gránulos pueden presentar un grado variable de compactación .

En su membrana se ubican receptores para el fragmento Fc de la IgE, anticuerpo secretado por las células plasmáticas. Cuando la IgE anclada en su receptor se une a su antígeno se produce una señal hacia el citoplasma de la célula cebada, que estimula la síntesis de leucotrieno y su liberación extracelular. El leucotrieno induce la exocitosis de los gránulos y entre las sustancias liberadas destaca la histamina, provocando la permeabilidad de las vénulas por lo que aumenta el líquido de la matriz extracelular conjuntiva produciendo edema, originando así una reacción de hipersensibilidad.

La principal función de las células cebadas o mastocitos es almacenar los mediadores químicos de la respuesta inflamatoria (Serra, 1994).

### **CÉLULAS NK:**

Las células NK o asesinas naturales, se desarrollan en la médula ósea a partir de una célula progenitora común de origen linfoide y circulan por la sangre, son más largas que los linfocitos B y T, tienen gránulos citoplasmáticos distintivos, se identifican por su habilidad de matar *in vitro* a ciertas líneas celulares linfoides que son tumorales, todo esto previo a la inmunización o la activación. El mecanismo de eliminación de las células NK es el mismo que

utilizan las células T citotóxicas que se generan en la respuesta inmune adaptativa: los gránulos citotóxicos son vertidos hacia la superficie de la célula blanco y las proteínas efectoras que contienen éstos penetran la membrana celular e inducen la muerte celular programada (apoptosis) (Roitt, 2001). Las células NK son activadas como respuesta a interferones o citocinas producidas por macrófagos, en la fase temprana de la infección protegen al huésped de una gran variedad de patógenos intracelulares. Las células NK tienen un mecanismo de reconocimiento para distinguir entre células infectadas y no infectadas, se cree que un mecanismo probable es que reconoce alteraciones en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, otro mecanismo pudiera ser los cambios en las glucoproteínas de la superficie celular inducidas por bacterias o virus en la infección, sin embargo aún no está claro su sistema de reconocimiento entre lo propio y lo no propio (Janeway, 2001b) .

### **SISTEMA DEL COMPLEMENTO:**

El Sistema del Complemento se considera como un componente fundamental del SII, es uno de los principales mecanismos efectores de la inmunidad dependiente de anticuerpos, tiene varias funciones importantes, entre ellas:

- La eliminación de un número importante de microorganismos patógenos.
- La estabilización de una relación entre las respuestas inmunes innata y adaptativa.
- Favorecer la eliminación de complejos inmunes y los productos del daño tisular.

El sistema del complemento está constituido por más de 30 proteínas que se encuentran en el plasma y la superficie de muchas células. Existen tres vías para la activación de este

sistema: la vía clásica, vía alterna y la vía de lectina que une manosa. Las tres formas de activación confluyen en la ruptura enzimática de la molécula C3 que conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana, un complejo lipofílico de proteínas plasmáticas que abre poros en la superficie celular y lleva a la lisis de las células (Janeway, 2001b)

### **COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.**

Las moléculas que integran el sistema del complemento son glicoproteínas con diferentes propiedades fisicoquímicas. Algunas se designan como componentes y se abrevian con la letra C, estas son: C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 y C9. El C1 a su vez está formado por tres subcomponentes C1q, C1r, C1s, los dos últimos con actividad de proteasa. Varias proteínas del complemento son catalizadas durante la activación del sistema y los fragmentos se designan con sufijos en subíndices (por ejemplo, C3 se divide en dos fragmentos C3a y C3b). Normalmente, los fragmentos más grandes se designan como “b” y los pequeños como “a”. La nomenclatura cambia para C2, por razones históricas: el fragmento mayor se denomina C2a y el menor C2b (Roitt, 2001).

### **ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.**

#### VÍA CLÁSICA.

Ésta comienza cuando el anticuerpo se une a una superficie celular, generalmente la de un microorganismo patógeno y termina con la lisis de esa célula. Las proteínas de esta vía son designadas de C1 a C9. Posteriormente se evidenció que no existe un orden secuencial entre éstas y la reacción, ya que C1 es seguido por C4, C2, C3 y C5, con recuperación de la secuencia C6 a C9.

Los responsables de la activación de la vía clásica del complemento son los siguientes:

- **Complejos antígeno-anticuerpo.** La activación del complemento por la vía clásica requiere de la presencia de complejos antígeno-anticuerpo. Mientras que los antígenos pueden ser solubles o particulados, los anticuerpos pueden ser de la clase IgM y/o IgG (inmunoglobulina M y G respectivamente).
- **C1, el componente de reconocimiento.** La activación del complemento se inicia cuando dos o más fragmentos Fc (fracción cristalizante) de los anticuerpos en los complejos inmunes reaccionan con el componente C1; la interacción ocurre a través del subcomponente C1q, requiriendo para ello al menos una molécula de IgM o dos moléculas de IgG situadas en estrecha proximidad.
- **Enzimas del complemento.** C1 está constituido por 3 subcomponentes (una molécula de C1q, dos de C1r y dos de C1s, unidas entre sí por iones de calcio). C1r y C1s son proenzimas que al activarse (al unirse el C1q a los fragmentos Fc de los anticuerpos), adquieren actividad de proteasa. C1r actúa sobre C1s, C1s sobre C4 y C2, sus substratos moleculares. Los productos formados son C4b, C2a y dos péptidos pequeños (C4a y C2b). C4b se une firmemente a la superficie del antígeno e incluso al anticuerpo, y junto con C2a, en presencia de magnesio, forman un complejo enzimático con actividad de C3 convertasa. La C3 convertasa hidroliza a C3, generando C3b y C3a. El fragmento C3b se une a la C3-convertasa para dar origen a la convertasa de C5 (C4b2a3b), la cual hidroliza a C5 produciendo un fragmento grande (C5b) y un péptido pequeño (C5a). C3a y C5a son péptidos con efectos biológicos diversos. Cada componente o complejo

enzimático activado modifica a muchas moléculas, de manera que la activación de una sola molécula de C1, culmina con la activación de cientos de miles de moléculas de los últimos componentes del complemento en un fenómeno biológico de activación en cascada (Roitt, 2001)

#### VÍA DE LA LECTINA QUE UNE MANOSA.

La lectina que se une a la manosa (LUM) se parece estructuralmente y funcionalmente al subcomponente C1q y es un miembro de la familia de las lectinas calcio-dependientes, las colectinas. La LUM que es una molécula de reconocimiento del sistema inmune innato, se une a grupos terminales de manosa de una variedad de bacterias.

Esta proteína activa al complemento a través de dos proteasas con serina, conocidas como MASP1 y MASP2 (Mannose Associated Serine Proteases 1 and 2 por sus siglas en inglés, Serin Proteasa Asociadas a Manosa en español SPAM), las cuales a su vez son funcional y estructuralmente similares a C1r y C1s, respectivamente. Las proteínas MASP1 y MASP2 activadas por la proteína LUM unida a azúcares actúan sobre C4 y C2 para formar C3 convertasa C4b2a que transforma a C3 en C3b y su fragmento C3a. El complejo C4b2a activa a C5 produciendo C5b y C5a; de aquí en adelante la activación del resto de los componentes del complemento (C6, C7, C8 y C9) ocurre como en las vías clásica y alterna a ese nivel.

Además de su alta afinidad a la manosa, la lectina LUM también se une a moléculas con residuos de N-acetilglucosamida, fucosa, maltosa y glucosa, presente en la superficie de varios microorganismos y exhibe actividad microbicida a través del efecto lítico de los últimos componentes del complemento o al promover su fagocitosis (Berrón, 2003)



## VÍA ALTERNA.

La vía alterna fue la segunda en descubrirse, sus proteínas son llamadas también factores y están seguidas por una letra, como el factor B, factor H, factor D, factor I, factor P, etc. La vía alterna se activa cuando una molécula de C3b se une a una célula blanco. La molécula de C3b se combina con el factor B de la proteína plasmática, que una vez unido a C3b, es activado por el factor D de la proteína plasmática, dando dos fragmentos, Ba y Bb, este complejo es una convertasa de C3 (C3b,Bb) y se estabiliza por la fijación de otra proteína plasmática, la properdina.

La convertasa de C3 (C3b,Bb) rompe C3, con lo cual genera más moléculas de C3b, que se combinan con otra moléculas de factor B para originar más moléculas de C3b, Bb, las cuales a su vez rompen más moléculas de C3. La característica central de la vía alterna es constituir una asa de retroalimentación positiva que amplifica el acontecimiento original de reconocimiento, la fijación de muchas moléculas de C3b a la célula blanco permitirá la fijación de C5 y su rotura en C5a y C5b por la acción de la enzima C3b, Bb, que ahora es denominada convertasa de C5.

## COMPLEJO DE ATAQUE A MEMBRANA.

El daño celular es causado por el complejo de ataque a membrana (MAC por sus siglas en inglés, CAM en español), el cual está formado por los componentes C5b, C6, C7, C8 y un polímero de C9. En los eritrocitos, la formación de MAC ocurre cuando el complejo C5b6 interactúa con los fosfolípidos, gangliosidos y ácido siálico de la membrana celular. Esto propicia alteraciones en la estructura de la membrana que facilitan la penetración parcial de C8 y la polimerización e inserción de C9. El MAC causa la destrucción lítica de las células al

favorecer la desorganización de los lípidos de la membrana y al producir en ella poros a través de los cuales ocurre la salida y entrada de agua, iones y macromoléculas (Berrón, 2003)

### **3.-PRINCIPIO DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.**

La Respuesta Inmune Adaptativa (RIA) se desarrolla cuando los agentes infecciosos no son eliminados por los mecanismos innatos de defensa y se genera por la presencia excesiva de antígenos, se hace efectiva solo después de varios días; tiempo requerido para que los linfocitos T y B reconozcan a dichos antígenos, se diferencien y conviertan en células efectoras.

La RIA presenta varias características distintivas como son:

**Especificidad:** Respuesta dirigida a determinada molécula antigénica y no a otra similar. La porción del antígeno que es reconocida por los linfocitos se denomina determinante antigénico ó epítope. Esta fina especificidad existe porque los linfocitos contienen receptores de membrana capaces de identificar y distinguir diversos antígenos. Se plantea que todos los individuos tienen numerosos clones (conjunto de células derivadas de una sola célula precursora única), cuya progenie cuenta con los receptores de superficie de la célula que les dio origen y pueden responder a determinantes antigénicos específicos para ellas. Así el desarrollo de clones antígeno-específicos ocurre previo o independiente a la exposición del antígeno el cual selecciona un clon específico preexistente y lo activa hasta provocar su proliferación y diferenciación (Benjamini, 2000b).

**Memoria:** Ésto se refiere al incremento en la intensidad de respuesta ante los subsiguientes contactos con el mismo antígeno y a que pasado mucho tiempo y si se vuelve a tener contacto con el mismo Ag o determinante antigénico se monta una respuesta más efectiva.

**Heterogeneidad o Diversidad:** El número total de linfocitos con diferentes especificidades en un individuo ha recibido el nombre de repertorio linfocítico, cuya extraordinaria diversidad es el resultado de la variabilidad en la estructura de los sitios donde se unen los antígenos en los receptores linfocíticos.

**Multifactorialidad:** La R.I depende de múltiples factores, tanto del agente biológico que la origina como del hospedero que responde. El tipo, virulencia, cantidad o dosis del agente agresor y su vía de penetración pueden generar varios tipos de respuestas; pero también la edad y la conformación genética del hospedero pueden ser elementos determinantes (Villafuerte., 1990).

## **FASES DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA**

La RIA se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales: respuesta inmune humoral (RIH) donde los antígenos producidos por las células B juegan un papel preponderante y respuesta inmune celular (RIC) donde los linfocitos T son las células fundamentales.

Ambas respuestas comienzan con la activación de los linfocitos en los órganos linfoides secundarios por las células presentadoras de antígenos (CPA), que llegan a estos órganos a través de la circulación linfática y desencadenan las siguientes fases:

1. Fase de reconocimiento: Consiste en la unión del antígeno (elemento extraño que causa una respuesta inmunitaria específica) a los receptores específicos existentes en la membrana de los linfocitos maduros. Los linfocitos B que median la inmunidad humoral, expresan moléculas de anticuerpos sobre su superficie las cuales se unen a proteínas extrañas, polisacáridos o lípidos en su forma soluble; los linfocitos T responsables de la inmunidad celular, expresan los llamados receptores de célula T (TCR) que reconocen pequeñas secuencias de péptidos antigénicos, pero solamente si éstos se encuentran unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre las CPA, los primeros en efectuar este reconocimiento son los linfocitos T cooperadores (CD4, el término CD, se refiere a cluster designation o designación de grupo en español).
  
2. Fase de activación: Se denomina así a la secuencia de eventos que se producen en los linfocitos como resultado del reconocimiento antigénico específico, todos los linfocitos experimentan dos cambios:
  - a) Proliferación: Expansión de los clones antígeno-específicos y amplificación de la respuesta protectora, en la que asume una función preponderante el linfocito T CD4 capaz de activar a los linfocitos B y linfocitos T citotóxicos (CD8).
  - b) Diferenciación: (Etapa en la cual se forman las células efectoras y de memoria). Las primeras producen diversas sustancias que pueden interactuar con el antígeno como los anticuerpos y las linfocinas; las segundas son los

linfocitos parcialmente diferenciados, es decir que no llegan a convertirse en células efectoras aún.

3. Fase efectora: Una vez que los linfocitos T diferenciados se convierten en células efectoras migran hacia los sitios de agresión, donde desarrollan sus funciones de eliminación de los patógenos mientras los linfocitos B las ejecutan en los propios órganos periféricos. Muchas de estas acciones efectoras promueven la participación de células no linfoides y de mecanismos de inmunidad innata, a saber: anticuerpos opsonizantes que favorecen la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos, anticuerpos que activan el sistema de complemento; inmunoglobulinas E que estimulan la degranulación de los mastocitos, citocinas segregadas por los linfocitos T necesarios para estimular la inmunidad natural (Martínez, 2000).

### **CÉLULAS INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA.**

Existen tres grandes tipos celulares involucrados en la inmunidad adquirida y se requieren una serie de interacciones entre éstos para que se den las respuestas inmunes. Dos de estos tipos celulares provienen de una célula precursor linfoide pero que se diferencian en líneas de desarrollo distintas. Una línea se diferencia en el timo y se conoce como linfocito T; la otra se diferencia en la médula ósea y se conoce como linfocito B. Las células de las series linfocíticas T y B difieren en muchos aspectos funcionales pero comparten una propiedad importante de la

RIA, presentan una especificidad hacia un antígeno. Por lo tanto las funciones de reconocimiento y reacción más importantes de la RIA las realizan los linfocitos.

Las células presentadoras de antígenos (CPA) tales como los macrófagos y las células dendríticas constituyen el tercer tipo celular que participan en la RIA, aunque estas células carecen de receptores antígeno-específicos como los linfocitos, su función es el procesar y presentar el antígeno a los receptores específicos (receptores de células T [TCR] en los linfocitos T). Las CPA poseen en su superficie dos tipos de moléculas especiales que participan en la presentación del antígeno. Estas moléculas son denominadas MHC clase I y MHC clase II, están codificadas por un conjunto de genes responsables del rechazo o la aceptación de tejido transplantado.

El antígeno ya procesado se une de forma no covalente a las moléculas de MHC clase I o II (o ambas) y es entonces presentado a los receptores antígeno-específicos ubicados en la superficie de los linfocitos T. Los antígenos que son presentados a las moléculas MHC de clase I participan a su vez y activan a una subpoblación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (células T citotóxicas), mientras que el antígeno MHC clase II resulta en la activación de otra subpoblación celular de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (las células T cooperadoras) .

### **RESPUESTA INMUNE CELULAR:**

El reconocimiento antígeno-específico de la RIC está dado por los linfocitos T, cada uno tiene en su superficie muchos receptores antigénicos idénticos y estos linfocitos se dirigen al sitio donde se encuentra el antígeno y desarrollan su función cuando interactúan con el mismo. Hay varias subpoblaciones de células T de las cuales cada una puede presentar la misma especificidad

para un antígeno determinado, aunque cada subpoblación puede presentar funciones diferentes.

Las funciones adscritas a varios subgrupos de células T son los siguientes :

1.-Cooperación con células B para la producción de anticuerpos. Tales células son denominadas células T cooperadoras y funcionan al secretar citocinas que proveen varias señales de activación para las células B. Las citocinas son sustancias solubles o mediadora de la respuesta inmune secretadas por células.

2.-Efectos inflamatorios. Durante la activación, una subpoblación de células T secretan citocinas que inducen la migración y activación de monocitos y macrófagos, originando las llamadas reacciones de hipersensibilidad retardada.

3.- Efectos citotóxicos. Las células T en este subgrupo se transforman en células asesinas que al contacto con la célula blanco sintetizan y secretan proteínas con acción citotóxica capaces de producir la muerte de las mismas. Estas células son denominadas células T citotóxicas este tipo de células actúan contra células eucarióticas extrañas y contra células del cuerpo infectadas por virus u otros microorganismos de vida intracelular.

4.- Efectos regulatorios. Las células T cooperadoras pueden dividirse en diferentes subgrupos de acuerdo a la producción de citocinas que secretan, un primer subgrupo celular que secreta IL-2 (interleucina 2), INF $\gamma$  (interferón gamma) y TNF $\beta$  (factor de necrosis tumoral beta) y otro que secreta IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Estos subgrupos celulares son denominados TH1 (T cooperadores 1) y TH2 (T cooperadores 2) respectivamente. Los TH1 ejercen sus acciones sobre los macrófagos y la respuesta inmune celular, en tanto que los TH2 fundamentalmente activan los linfocitos B y como consecuencia la respuesta inmune humoral.

## **RESPUESTA INMUNE HUMORAL:**

La inmunidad humoral se efectúa mediante anticuerpos en el suero ó séricos que son las proteínas producidas por las células B en la respuesta inmune adaptativa. Las células B inicialmente son activadas cuando se unen los antígenos a moléculas específicas de membrana que se convertirán en las inmunoglobulinas (Ig) (receptores de células B), que son expresadas por estas células. Una vez identificado el Ag las células B reciben la señal para transformarse en células plasmáticas y empezar a secretar la Ig específica, un proceso que inicia la respuesta total de anticuerpos cuyo propósito es eliminar al antígeno del huésped.

Los anticuerpos son una mezcla heterogénea de globulinas séricas las cuales comparten la habilidad de unirse individualmente a antígenos específicos. Todas las globulinas séricas con actividad hacia los antígenos se conocen como inmunoglobulinas.

Las moléculas de inmunoglobulinas tienen estructuras en común que las capacita para realizar dos funciones: 1) reconocer y unirse específicamente a una entidad estructural única en un antígeno llamado epítope y 2) desarrollar una función común biológica después de haberse combinado con el antígeno. Básicamente cada molécula de inmunoglobulina consiste de dos cadenas ligeras idénticas entre si y dos cadenas pesadas también idénticas entre si unidas por un puente disulfuro.

La porción de la molécula que se une al antígeno consiste de una área compuesta por las regiones amino terminales de las cadenas pesadas y ligeras. Por lo tanto cada molécula de inmunoglobulina es simétrica y capaz de unirse a dos epítopes idénticas que estén presentes en el mismo antígeno o en diferentes moléculas. (Benjamini, 2000a)



Ninguna de los dos tipos de RI pueden verse como elementos aislados uno del otro, ya que como se ha visto ambos interactúan entre ellos aún cuando también tienen diferencias. Como se ha mencionado los Péptidos Naturales Antimicrobianos (PNA's) son componentes esenciales en la RII que ayudan a la eliminación temprana de microorganismos patógenos, a continuación se ahondará en el tema principal de este trabajo.

#### 4-. PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS

Los péptidos naturales antimicrobianos (PNA's) son moléculas con regiones hidrofóbicas, cargadas y separadas espacialmente. Este contraste estructural es importante para los mecanismos de acción de los PNA's, éstos difieren en tamaño, secuencia de aminoácidos y ciertos motivos estructurales. Sin embargo, su forma de actuar es muy parecida. La principal ventaja que presentan estos péptidos es que pueden funcionar sin la necesidad de presentar una alta especificidad o memoria. Se denominan antimicrobianos porque presentan una actividad inusual de amplio espectro, esto incluye la habilidad para matar o neutralizar bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos (levaduras), parásitos (planarias y nematodos), células cancerosas, virus cubiertos como el VIH y el virus del herpes simples. Cada tipo de PNA presenta una actividad distinta (Hancock, 2000) .

Los PNA's evitan la autodestrucción de las células del hospedero ya sea mediante un almacenamiento intracelular o por especificidad hacia un componente microbiano que no está presente en las células del hospedero (Boman, 1995) .

Las familias de genes de PNA's se localizan en diferentes regiones cromosomales dependiendo de la especie. El primer producto traduccional es un prepropéptido que consiste en

una secuencia N- terminal señalizadora para el retículo endoplasmático, un pro segmento y un péptido catiónico C- terminal que presenta una función antimicrobiana después de la división. El prosegmento es generalmente aniónico en carga y podría tener varias funciones biológicas, incluyendo el plegamiento correcto de la porción C- terminal, el tráfico intracelular o la inhibición de la actividad del péptido maduro. El propéptido se divide en etapas posteriores mediante un proceso intracelular o después de haber sido secretado al espacio extracelular mediante cortes enzimáticos en ambos casos (Bals, 2000).

Los PNA's tienden a encontrarse en aquellas partes del cuerpo que están mas en contacto con patógenos del ambiente. Por lo que se encuentran en la piel, oídos, ojos, superficies epiteliales, incluyendo la lengua, traquea, pulmones, intestino, medula ósea y testículos entre otros (Hancock, 2000).

## **CLASIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS**

Los Péptidos Naturales Antimicrobianos se encuentran dispersos en la mayoría de los seres vivos. De esta forma se han caracterizado diferentes PNA's en varios organismos que van desde las plantas hasta los vertebrados superiores (Boman, 1995). En el presente trabajo, analizaremos a los PNA's de acuerdo al tipo de organismo que los produce: plantas, insectos y vertebrados así como por su estructura. Debido a la novedad de este tópico podríamos encontrar muchos otros organismos que producen también PNA's para su sobrevivencia.

## **PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN PLANTAS.**

Las plantas no presentan ningún sistema inmune adaptativo; sin embargo, comparten con los animales ciertos componentes del sistema inmune innato, en el cual ya sea constitutivamente o mediante la detección de señales microbianas patógenas, ciertas sustancias químicas se producen para controlar o eliminar el crecimiento microbiano (Schröder, 1999). A continuación se encuentra una tabla con las familias de PNA's en plantas que se conocen actualmente.

<b>Tioninas (6 cisteínas)</b>
<b>Tioninas (8 cisteínas)</b>
<b>Defensinas Vegetales</b>
<b>Péptidos tipo-heveininas</b>
<b>Péptidos tipo- nudo</b>

**Tabla 1:** Familias de péptidos antimicrobianos encontrados actualmente en plantas (Schroeder, 1999) .

Las tioninas comprenden una familia de PNA's ricos en cisteínas que contienen de 45 a 47 aminoácidos; están subdivididas en dos subgrupos que poseen ya sea cuatro o tres puentes disulfuro. Las secuencias de tioninas son altamente divergentes, los residuos conservados están restringidos a las seis cisteínas relativamente en posiciones idénticas. Se sabe que las tioninas tienen una actividad inhibitoria hacia bacterias Gram-positivas y Gram- negativas así como a hongos patógenos, aunque esta actividad funguicida se inhibe en presencia de  $Ca^{2+}$  a concentraciones mayores de 5mM, mas sin embargo no se inhibe en presencia de  $Mg^{2+}$  o

caciones monovalentes (Cammue 1995; Terras, 1993b). En contraste, se ha observado que la actividad fungicida se potencializa al agregarse otros péptidos ricos en cisteína (Terras, 1993a).

Se ha encontrado que la expresión de algunos genes de tioninas están en las flores y hojas, mientras que otros se han observado en cantidades menores en las semillas. La inducción de la expresión de los genes de las tioninas después de la exposición a un patógeno, puede involucrar metiljasmonato (un complejo con acción similar a las hormonas estructuralmente relacionado con las prostaglandinas, que son sintetizadas mediante la liberación de un ácido  $\alpha$ -linoleico proveniente de las membranas fosfolípídicas) como una señal endógena transductora; se ha observado que éste compuesto se acumula después de que la planta sufre algún daño (Creelman, 1992)

El ácido salicílico otro compuesto endógeno con acción similar a las hormonas, controla la expresión de otros componentes antimicrobianos en las plantas, pero no induce la producción de tioninas (García Olmedo, 1995.).

Las tioninas se encuentran en cantidades mas abundantes en la epidermis de las plantas por lo que se propone a los PNA's como primera línea de defensa química (Reimann-Philipp, 1989).

Por otra parte, las plantas producen unos péptidos ricos en cisteínas denominados defensinas vegetales. Estas actúan al igual que las tioninas en contra de un amplio espectro de microorganismos patógenos, sin embargo presenta una actividad mas fuerte hacia hongos y en menor proporción hacia bacterias (Broekaert, 1997; Terras, 1993b).

En la actualidad se propone que las defensinas vegetales juegan un papel muy importante en la protección de la semilla durante su desarrollo, de hecho las defensinas forman el 30% de las

proteínas liberadas durante la germinación de la semilla. La mayoría de las defensinas vegetales parecen ser inducibles, mostrando una respuesta sistémica en contra de una infección causada por hongos patógenos (Broekaert, 1997; Penninckx 1996).

Además de las tioninas y las defensinas vegetales existen otras dos familias de PNA's que son ricas en cisteínas. La primera de ellas originalmente llamada proteína de transferencia de lípidos debido a su habilidad para transferir fosfolípidos, ha mostrado actividades variables en contra de diferentes microorganismos. La otra familia esta formada por las heveínas y los péptidos antimicrobianos tipo "nudo", los cuales son ricas en cisteínas y tienen un plegamiento característico en forma de nudo (Chagolla-Lopez, 1994). Éstos inhiben un amplio intervalo de hongos y bacterias Gram positivas. Al igual que las tioninas, la actividad antimicrobiana de estos péptidos es sensible en presencia de cationes divalentes arriba de una concentración de 1mM. El patrón de expresión de estos péptidos en diversas partes de la planta es por el momento aún incierto, pero parece ser que se encuentra principalmente en la semilla (Schröder, 1999). A continuación se esquematiza la estructura de una defensina vegetal de la cual se tiene mayor información.



**Figura 1.** Estructura tridimensional de una defensina vegetal (Hoffmann, 1999).

## **PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN INSECTOS.**

Los primeros estudios realizados poco después de la primera guerra mundial enfocados hacia los PNA's en insectos, mostraban que las inyecciones de cultivos bacterianos en éstos, inducían la aparición de sustancias bacteriolíticas (Hoffmann, 1992). Sin embargo, fue hasta 1980 que los primeros PNA's encontrados en insectos aparte de la lisozima fueron caracterizados.

Boman y colaboradores fueron capaces de analizar la estructura del mayor factor bactericida inducible proveniente de los gusanos de seda (*Hyalophora cecropia*) que habían sido inyectados con bacterias a la que llamó cecropina. Las estructuras primarias de las cecropinas A y B fueron reportadas en 1981, junto con información que mostraba su especificidad antibacterial y su incapacidad para atacar células de insectos o de mamíferos (Steiner, 1981).

Todas las cecropinas tienen una extensión hidrofóbica en la parte C terminal unida por una prolina, glicina o ambas, son péptidos catiónicos de alrededor de 4 kD. Ambas tipos de

cecropinas A y B en insectos son altamente activas en contra de diferentes cepas de *E. coli* y otras bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas aeruginosa*; en éste caso son mas potentes que la tetraciclina (Schröder, 1999) Las cecropinas también actúan en contra de algunos microorganismos Gram positivos como *Bacillus megaterium*, hasta ahora no se ha encontrado algún efecto citotóxico en contra de hongos u otras células eucarióticas (Sergey, 2002)

En los sistemas reproductivos de algunos insectos se producen PNA's característicos. La mosca *Drosophila* produce andropina un péptido de 32 residuos con estructura de doble hélice, y su gen ligado al grupo de las cecropinas (Samakovlis, 1991). Este gen es inducido al momento del apareamiento (más no por infección) y se expresa solamente en los individuos machos y no en larvas o pupas. Se han aislado también dos péptidos femeninos de la mosca *Cerratitis capitata* denominados ceratotoxinas (Marchini, 1993). Estos péptidos son helicoidales presentan una actividad antibacterial y hemolítica, y son estructuralmente parecidos a las cecropinas y a la toxina melitina encontrada en el veneno de la abeja.

Las apidaecinas encontradas en la hemolinfa de abejas inmunizadas fueron los primeros PNA's con concentraciones inusuales de prolina (29%) y arginina (17%) (Casteels, 1989). Las apidaecinas están compuestas por 18 aminoácidos y muestran una gran actividad en contra de varias bacterias Gram negativas comunes. Sin embargo, no presentan ninguna actividad bactericida contra cuatro especies diferentes de bacterias del género *Bacillus*. Las abejas tienen también otros 3 PNA's mas largos: abaecina (con 34 residuos y 29% de prolina), hymenoptaecina (con 93 residuos y 18% de glicina) y defensinas (con 51 residuos y 6 cisteinas). Éstos cuatro polipéptidos pertenecientes a diferentes grupos químicos tienen diferentes

precursores, posiblemente también presenten una organización genética diferente. Sin embargo, todos son inducidos mediante una infección bacterial.

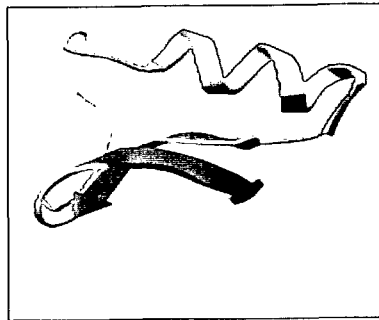
La mosca *Drosophila* produce también un tipo de péptido antimicrobiano denominado drosomicina con una longitud de 5kDa, contiene cuatro puentes disulfuro que actúan principalmente en contra de hongos (Fehlbaum, 1994). Un estudio sobre este péptido demostró su expresión en varios sitios epiteliales que tienen contacto directo con el ambiente externo; incluyendo los tractos respiratorios, reproductivos y digestivos (Ferrandon, 1998)

La drosocina es un péptido microbicida que también es producido por *Drosophila* y que es activo en contra de bacterias Gram negativas, la producción de estos péptidos depende de la activación de diferentes receptores de membrana. La Metchnikowina es un péptido rico en prolina que está también presente en la mosca *Drosophila* y tiene actividad bactericida y fungicida. Se ha observado que el gen no se induce en individuos deficientes en receptores Toll o inmunodeficientes, sin embargo si se activa en individuos que presentan las dos mutantes. Al ser regulados, la expresión del gen de la metchnikowina puede activarse por señales que se generen durante una infección bacterial o micótica. La región 5' del gen de la metchnikowina contiene varios motivos *cis*-regulatorios implicados como promotores de los genes inmunes de los insectos (Levashina, 1995)

También existe otro grupo de PNA's en insectos llamadas defensinas, éste tipo de péptidos se encuentran tanto en plantas como en insectos y animales superiores. Las defensinas de los insectos están compuestas de 38 a 43 aminoácidos y tienen 6 cisteínas unidas en tres puentes cisteínicos intramoleculares. Éstas moléculas son moderadamente catiónicas primordialmente afectan a bacterias Gram positivas y son el grupo más extendido de PNA's en



insectos. Muchas defensinas son expresadas constitutivamente a bajos niveles y son inducidas mediante la inyección de bacterias en larvas (Lambert, 1989). Los principales sitios de expresión son el cuerpo graso y las células epiteliales de la traquea, su concentración en la hemolinfa de los insectos puede alcanzar hasta los 200  $\mu\text{M}$  después de alguna herida. En la siguiente figura se muestra la estructura tridimensional de una defensina de insectos, misma que ha obtenido una gran atención para su estudio.



**Figura 2.** Estructura tridimensional de una defensina de insectos. (Hoffmann, 1999)

Las respuestas antimicrobianas en los insectos parecen mostrar un grado de especificidad. En *Drosophila* una discriminación entre varias clases de microorganismos ocurre debido a que los genes que codifican para los péptidos antibacteriales y fungicidas son expresados diferencialmente después de la inyección de distintos microorganismos. De hecho, la infección de *Drosophila* con hongos patógenos hace que se inicie un tipo de respuesta específica al producirse únicamente péptidos con actividad fungicida (Lemaitre, 1995). En la siguiente tabla se muestra la presencia de puentes de cisteína, inducibilidad y acción antimicrobiana de algunos de los péptidos más estudiados en insectos

Péptido Antimicrobiano	Puentes de Cisteína	Inducibilidad	Actividad en contra de		
			Bacterias Gram +	Bacterias Gram -	Hongos
Cecropinas	No	Si	(+)	+++	(+)
Drosocina	No	Si	(+)	+++	—
Apidaecinas	No	Si	(+)	+++	—
Diptericina	No	Si	(+)	+++	—
Metchnikowina	No	Si	+++	+++	+++
Defensinas	3	Si	+++	(+)	—
Drosomicina	4	Si	—	—	+++

Tabla II: Péptidos antimicrobianos derivados de insectos (Schroeder, 1999).

## PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN VERTEBRADOS.

Un grupo de vertebrados que ha sido estudiado extensivamente por la presencia de PNA's son las ranas. Los extractos de la piel de rana son un recurso basto de péptidos activos farmacológicamente, han sido utilizados con propósitos medicinales desde hace siglos y se utilizan aún en algunos países de Sudamérica. En 1962 Kiss y Michl notaron la presencia de péptidos antimicrobianos y hemolíticos en las secreciones de la piel de la rana *Bombina variegata* y esto llevó al aislamiento de un péptido antimicrobiano denominado "bombinina". (Csordas, 1970; Kiss, 1962). En la década de los noventas se encontraron varios péptidos relacionados con la bombinina, en dos especies relacionadas *Bombina variegata* y *Bombina orientalis*. Todos ellos contienen 27 aminoácidos con una región C-terminal constante y un

segmento N- terminal variable. Todas pueden formar estructuras en forma de hélice, no son hemolíticas y presentan una alta actividad en contra de diferentes cepas de stafilococos (Simmaco, 1993).

Años después Michael Zasloff observó que las heridas recientes producidas en ranas *Xenopus laevis* no se infectaban y en 1987 aisló los péptidos naturales antimicrobianos llamados "magaininas" a partir de la piel de la rana del mismo género. Estudios posteriores realizados por Zasloff en la piel de *Xenopus* derivaron en el hallazgo de otros dos péptidos con actividad bactericida denominados PGLa (peptidil-glicina-leucina-carboxamida) y PGS (peptidil-glicina-serina) (Soravia, 1998; Zasloff, 1987). Tanto las magaininas, el PGLa y el PGS se encuentran no solamente en la piel de la rana sino también en el tejido estomacal (Moore, 1991). Estos péptidos actúan sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos y protozoarios (Bessalle, 1992; Cuervo, 1988).

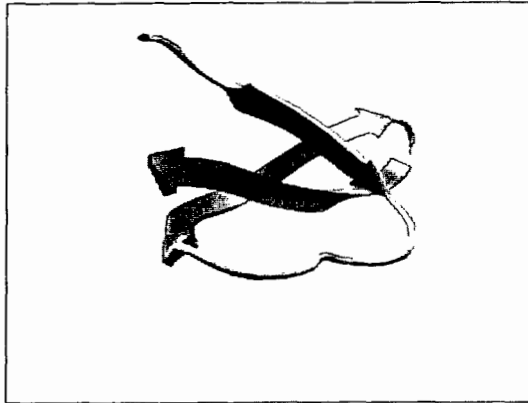
Se han encontrado péptidos homólogos con actividad antimicrobiana denominados brevinina-1 y brevinina-1E, aislados de *Rana brevipoda* y *Rana esculenta* respectivamente. Estos péptidos presentan una carga positiva neta y contienen 24 aminoácidos incluyendo dos prolinas y presentan además una actividad de amplio espectro (Simmaco, 1993).

La secreción de la piel de *Phyllomedusinae* que es una subfamilia de ranas que se encuentran en Centro y Sudamérica, ha demostrado contener muchos péptidos diferentes. Entre los que presentan actividad antimicrobiana están las dermaseptinas, son péptidos de alrededor de 34 aminoácidos y tienen una conformación de hélice anfipática. Estos péptidos son muy activos en contra de una gran variedad de hongos (Mor, 1994).

Lo estudios experimentales demuestran que los anfibios han evolucionado para limitar la proliferación de microorganismos en su piel, sin embargo en los vertebrados superiores también se encuentran presentes análogos de éstos péptidos.

Los PNA's aislados en mamíferos pueden estar presentes dentro de los gránulos de los neutrófilos, en secreciones de células epiteliales o como producto de la degradación de alguna proteína (Boman, 1995). Los neutrófilos que tienen una función microbicida notable contienen una variedad de proteínas microbianas y péptidos que incluyen proteínas bactericidas incrementadoras de la permeabilidad de membrana, proteínas catiónicas antimicrobianas, lisosima, lactoferrina, batenecinas, defensinas, indocilinas y catelicidinas. (Ganz, 1997; Hancock, 1995). Otros tipos celulares incluyendo células epiteliales (que producen  $\beta$ -defensinas), plaquetas (que producen las proteínas microbicidas de plaquetas) entre otros, también producen sustancias antimicrobianas (Ganz, 1997). Los péptidos más estudiados en mamíferos, han sido las defensinas que se dividen en  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$ -defensinas.

$\alpha$ -DEFENSINAS.- Las  $\alpha$ -defensinas se producen en grandes cantidades (5-10 mg/kg de peso corporal por día) en la médula ósea durante la maduración de los leucocitos polimorfonucleares. Son sintetizados como prepeptidos de un tamaño de alrededor de 10 kDa que son almacenados en gránulos citoplasmáticos (Schröder, 1997), como péptidos tienen de 29 a 35 residuos de longitud con un tamaño de entre 3 y 4 kDa contienen tres puentes disulfuro en alineaciones 1-6, 2-4, 3-5 y tienen una estructura triple de hoja plegada  $\beta$  con un bucle  $\beta$  que contiene aminoácidos catiónicos. La primera  $\alpha$ -defensina se aisló a partir de neutrófilo en 1985 (Ganz T., 1995). A continuación se muestra una figura tridimensional de una  $\alpha$ -defensina.



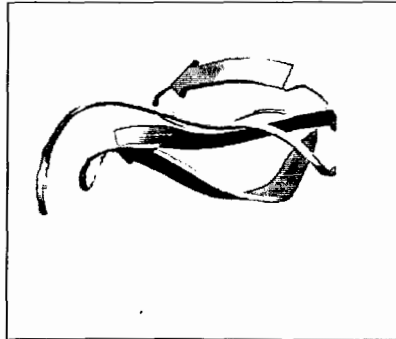
**Figura 3.** Estructura tridimensional de una  $\alpha$ -defensina (Hoffmann, 1999).

En humanos se han identificado alrededor de 6  $\alpha$ -defensinas, los péptidos 1-4 (HNP-1 a HNP-4) están localizados en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, donde son la principal proteína que contribuye a la eliminación de tipo oxígeno-independiente de microorganismos fagocitados (Ganz, 1995; Selsted, 1995). Las defensinas humanas 5 y 6 se encuentran primordialmente en las células de Paneth del intestino delgado y en células epiteliales del tracto urogenital femenino (Quayle, 1998).

Las defensinas intestinales producidas por las células de Paneth, pueden distinguirse de las fagocíticas por la capacidad de ser secretadas activamente y no ser dirigidas hacia los fagolisosomas. Las  $\alpha$ -defensinas difieren en su espectro antimicrobiano y potencia relativa: ésta última parece corresponder a la carga positiva neta. El efecto antimicrobiano de las  $\alpha$ -defensinas abarca bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos en fase de levadura y filamentosos, muchos virus cubiertos y especies de micobacterias (Schröder, 1997).

Además de su acción antimicrobiana, las  $\alpha$ -defensinas de los neutrófilos humanos atraen directamente células T circulantes en la sangre que expresan antígenos CD4/CD45RA y CD8; las  $\alpha$ -defensinas también atraen células dendríticas inmaduras ya sea *in vivo* o después de haber sido inyectadas bajo la piel de mamíferos (Chertov, 2000).

**$\beta$ -DEFENSINAS-** A diferencia de los roedores y humanos, los neutrófilos del ganado y pájaros no parecen producir  $\alpha$ -defensinas. En cambio las defensinas mieloides pertenecen a una familia estructuralmente relacionada llamada  $\beta$ -defensinas. En los neutrófilos bovinos se han identificado 13 genes de  $\beta$ -defensinas (Selsted, 1993). Estos péptidos de 4 kDa contienen de 38 a 42 aminoácidos y son altamente catiónicos, contienen seis residuos de cisteína conectados mediante puentes disulfuro cuyo arreglo espacial es diferente al arreglo que presentan las  $\alpha$ -defensinas. El arreglo de puentes disulfuro que presentan es 1-5, 2-4, 3-6. En la siguiente figura se esquematiza la estructura tridimensional de una  $\beta$ -defensina.



**Figura 4.** Estructura tridimensional de una  $\beta$ -defensina (Hoffmann, 1999)

Tres  $\beta$ -defensinas (Gal1 $\alpha$ , Gal1, y Gal2) fueron aisladas de leucocitos de pollos domésticos (*Gallus gallus*), estos péptidos presentan de 36 a 39 aminoácidos incluyendo numerosas argininas y lisinas (Evans, 1994).

La primer defensina derivada del epitelio aislada en mamíferos fue la denominada TAP (péptido antimicrobiano traqueal), que se encuentra en la mucosa traqueal de bovinos. Se observó que TAP presenta una actividad *in vitro* en contra de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración mínima inhibitoria (12 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ), así como en contra de *Candida albicans* en dosis de 6 a 12  $\mu\text{g/mL}$ . TAP tiene una expresión tejido-específica ya que solo se encontró en mucosa traqueal y en menor grado en pulmones, específicamente se encontró en las células epiteliales columnares de la traquea y bronquios. A diferencia de las  $\alpha$ -defensinas TAP es un péptido antimicrobiano inducible ya que mediante experimentos en los cuales se utilizaron cepas bacterianas atenuadas y lipopolisacárido (LPS) bacteriano, las células traqueales bovinas iniciaron la expresión del ácido ribonucleico (RNAm) (Diamond, 1996).

La lengua de los bovinos presenta muy poca susceptibilidad a las infecciones además cuando éstas sufren algún tipo de daño, tienen la propiedad de sanar rápidamente. Estas observaciones permitieron que se investigara el aislamiento de una nueva  $\beta$ -defensina denominada LAP (péptido antimicrobiano de pulmón).

LAP es una  $\beta$ -defensina inducible, tanto bacterias muertas como LPS inducen, de manera dosis dependiente la expresión del RNAm en células cultivadas de epitelio traqueal (Russell, 1996). LAP presenta gran homología con TAP, tiene una actividad antimicrobiana hacia *E.coli* y *Candida albicans*. Mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se vio que

el RNAm de LAP se expresa en tejidos de lengua y pulmón; incluyendo bronquios, traquea, colon y recto más no en tracto urogenital (Schonwetter, 1995).

En 1997 un estudio de hibridización *in situ* demostró que el RNAm para LAP se expresa ampliamente en varios epitelios, pero se encontró en niveles más altos en aquellos tejidos que tienen una exposición constante o son colonizados por microorganismos (Stolzenberg, 1997).

Un estudio realizado en 1998 reveló que el intestino delgado distal y el colon de las vacas también expresan una  $\beta$ -defensina denominada  $\beta$ -defensina entérica (EBD). El RNAm de EBD se localizó en células epiteliales del colon y criptas del intestino delgado, en el cual se observó una alta expresión cuando se estimuló con *Cryptosporidium parvum* (Tarver, 1998).

El descubrimiento de las  $\beta$ -defensinas en el epitelio del ganado estimuló la búsqueda de  $\beta$ -defensinas humanas. En 1995 fue descubierta la primer  $\beta$ -defensina humana denominada hBD-1 (beta defensina humana 1). La hBD-1 se aisló a partir de hemofiltrado humano obtenido de pacientes con enfermedades renales en estado terminal, es un péptido básico de 3.9 kDa con 36 aminoácidos (Bensch, 1995).

Debido a que la hBD-1 se aisló de filtrados de sangre llevó a la hipótesis de que las células del riñón representan un recurso celular amplio, utilizando técnicas de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa- retro transcriptasa) el riñón y las glándulas salivales mostraron la expresión de RNAm cuando se realizaron 25 ciclos. A los 30 ciclos la próstata, placenta y traquea dieron resultados positivos a la hBD-1 mientras que el timo, testículos e intestino delgado fueron levemente positivos. Los leucocitos periféricos sanguíneos, bazo y el músculo esquelético están desprovistos de hBD-1. Utilizando análisis de northern blot (técnica utilizada



para estudiar la expresión de RNAm) solo el riñón y páncreas mostraron la expresión de RNAm para hBD-1 (Zhao, 1996) .

No se ha comprobado la actividad antimicrobiana de hBD-1 aislada originalmente del hemofiltrado, la síntesis química de hBD-1, ha demostrado que ésta es activa contra bacterias Gram-negativas a concentraciones que fluctuaban de 60 a 500 µg/ml (Goldman, 1997) .

Se cree que la hBD-1 es la principal responsable en la eliminación de bacterias Gram-negativas en las vías respiratorias ya que el análisis de hibridización *in situ* revela la presencia del RNAm que codifica para hBD-1, posteriormente fue corroborado mediante ensayos de northern blot (Goldman, 1997; Zhao, 1996) .

El hallazgo del RNAm para hBD-1 en diferentes epitelios de diversos órganos llevó a la hipótesis de que este péptido también se expresaba en la piel. Experimentos posteriores demostraron que hBD-1 también se encuentra en queratinocitos suprabasales de piel saludable, así como en ductos sudoríparos presentes en la dermis (Fulton, 1997).

Posteriormente se llevaron a cabo experimentos en piel humana con el fin de encontrar nuevos péptidos antimicrobianos, se utilizaron escamas de piel provenientes de individuos con psoriasis debido a que los psoriaticos, aunque presentan una enfermedad dermatológica no son muy susceptibles a infecciones cutáneas. Para enriquecer los péptidos antimicrobianos previo a su purificación se utilizó una columna de afinidad, donde las bacterias habían sido unidas covalentemente a la matriz. Con esta técnica fue posible aislar un nuevo péptido antimicrobiano que tiene una secuencia aminoacídica similar a la de TAP, LAP y hBD1 indicando que ésta era la segunda β-defensina humana, por lo tanto fue llamada hBD-2 (Harder, 1997).

La hBD-2 consiste de 41 aminoácidos siendo un polipéptido básico de 4-kDa, en cuanto a su actividad antimicrobiana se ha visto que es altamente efectiva en contra de bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa*, mientras que la bacteria Gram-positiva *S. aureus* es inhibida a concentraciones mayores de 100 µg/mL. Además presenta una actividad microbicida contra *C. albicans* bastante efectiva. La hBD-2 tiene un precursor de 64 residuos parecido a hBD-1, TAP y LAP. Es un péptido inducible ya que al utilizar, cultivos de queratinocitos provenientes de la piel estimulados con bacterias Gram-negativas atenuadas (mediante calor) producen el péptido. El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induce la transcripción de hBD-2 en keratinocitos (Harder, 1997).

La hBD-2 además de estar presente en la piel también se encuentra en pulmón y tráquea, la capacidad de este péptido para matar a *P. aeruginosa*, indica que hBD-2 es un componente químico presente en las vías respiratorias y sirve como escudo para protegernos de infecciones causadas por bacterias Gram-negativas en el pulmón (Harder, 1997).

Las  $\beta$ -defensinas epiteliales también son quimiotáctica, la hBD-2 atrae selectivamente células T periféricas (CD4/CD45RO), así como células dendríticas inmaduras. El receptor que se utiliza en este caso es el receptor 6 quimiocina (CCR6), el cual también reconoce a la proteína selectiva inflamatoria atrayente de macrófagos 3  $\alpha$  (MIP 3 $\alpha$ ) de las células dendríticas. La migración celular se dirige con mayor precisión hacia los sitios específicos donde se produce algún daño (Zasloff, 2002).

**$\theta$ -DEFENSINAS-** Recientemente se encontró una nueva subfamilia de defensinas mientras se realizaban experimentos con monos rhesus. Esta nueva subfamilia es llamada  $\theta$ -

defensinas debido a la forma cíclica que presentan los péptidos. La primera  $\theta$ -defensina que se aisló se denominó defensina rhesus teta 1 o DRT-1, además de otras siete  $\alpha$ -defensinas, siendo la DRT-1 la que mayor efecto antimicrobiano presenta y la que relativamente se encuentra en mayor abundancia. Son 18 los aminoácidos que conforman a la DRT-1 entre los que destacan seis cisteínas. La estructura densa de cisteínas que presenta difiere de las estructuras de las  $\alpha$  y  $\beta$ -defensinas, las uniones peptídicas que posee son las que forman la estructura cíclica característica de la DRT-1 y que le dan una semejanza con la letra griega teta.

La DRT-1 es fuertemente catiónica y posee una carga neta de +5 a un pH de 7.0, no es el producto directo de una síntesis de proteínas sino que se forma al unirse dos péptidos lineares de nueve residuos mediante una reacción de ligamiento cabeza-cola, esto quiere decir que las células del mono rhesus tienen una vía de procesamiento postraduccional capaz de realizar estas reacciones y esta vía también podría ser capaz de formar otros polipéptidos cíclicos (Tang, 1999).

De hecho se han encontrado otras dos  $\theta$ -defensinas, éstas son conocidas como DRT-2 y DRT-3. Las pequeñas  $\alpha$ -defensinas precursoras lineares que se unen para formar las  $\theta$ -defensinas son conocidas como demidefensinas. Tres de estas demidefensinas han sido encontradas en la médula ósea de los monos rhesus, se conocen como demidefensinas 1, 2 y 3 respectivamente. La DRT-1 esta formada por la unión de la demidefensina 1 y 2, mediante las reacciones de ligamiento ya mencionadas, la DRT-2 esta compuesta por dos copias de demidefensina 1 unidas de la misma forma. La DRT-3 esta compuesta a su vez por dos copias de demidefensina 2, aún no se sabe con exactitud cual es la función de la demidefensina 3.

La habilidad de las demiddefensinas para unirse en diferentes combinaciones y formar diferentes  $\theta$ -defensinas es bastante interesante debido a que un gran número de éstas pueden formarse a partir de un número limitado de demiddefensinas (Leonova, 2001).

La DRT-1 a concentraciones de 2 a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tienen acción bactericida en contra de Gram-positivas tales como *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*, bacterias gram-negativas como *E. Coli*, *Salmonella typhimurium* y hongos (principalmente *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*). En cada caso la habilidad de los organismos de sobrevivir fue reducida en un 99% después de dos horas de incubación cuando la dosis de DRT-1 se incrementó, los niveles de actividad cayeron hasta un nivel que no era detectable (Tang, 1999)

Mediante experimentos realizados con DRT-1, 2 y 3, además de un péptido sintético obtenido a partir de una secuencia homologa a las demiddefensinas en humanos, se ha observado que tanto las DRT's como el péptido sintético denominado retrociclina, protegen completamente a las células  $\text{CD4}^+$  de la acción de los virus HIV1, T-tropic y M-tropic. Esta protección se produce en las fases tempranas de la infección mediante la unión desigual de las DRT's y la retrociclina a la membrana celular (Cole, 2002)

**CATELICIDINAS-** Muchos péptidos antimicrobianos estructuralmente diversos son sintetizados en el carboxilo terminal de un precursor de entre 15 y 18 kDa, que contiene un dominio de catelina altamente conservado de 100 residuos (Zanetti, 1995). La palabra catelina es un acrónimo del término inhibidor de catepsina L y los precursores de PNA's que contienen catelinas son llamados catelicidinas. Aunque la función del dominio de catelina es aún incierto,

la distribución tan amplia de las catelicidinas en los mamíferos sugiere que debe de tener un valor considerable.

Las catelicidinas se han estudiado extensivamente en ganado vacuno y cerdos. Cuando estos péptidos son secretados por los neutrófilos, sufren una proteólisis limitada típicamente por una enzima parecida a una elastasa, esto libera al carboxilo terminal del péptido antimicrobiano (Panyutich, 1997). Las funciones del dominio catelina son aún desconocidas; posiblemente éste dominio previene una proteólisis indiscriminada que podría resultar dañina para el péptido antimicrobiano o una proteólisis prematura que pudiera dañar a la célula hospedera. Alternativamente el dominio catelina puede estar involucrado en el transporte intracelular o conferir estabilidad durante el almacenaje en los gránulos de los neutrófilos (Ganz, 1998).

La única catelicidina humana se denomina LL-37/hCAP18 y fue aislada de la médula ósea humana (Agerberth, 1995; Gudmundsson, 1995). Se expresa en células mieloides encontrándose en gránulos pero también se localiza en piel inflamada. Se ha visto que la LL-37/hCAP-18 es regulada por estímulos inflamatorios (Frohm, 1997). En las vías respiratorias este péptido es producido por los mismos tipos celulares que producen las  $\beta$ -defensinas y son secretadas en el fluido de superficie de vías respiratorias (Bals, 1998). Adicionalmente la LL-37 se origina también a partir de neutrófilos que invaden las vías respiratorias, no se sabe aún el procesamiento en células epiteliales. Además de presentar actividad antimicrobiana hacia bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos la LL-37 se une y neutraliza al LPS y protege en contra de un shock endotoxico realizado en un modelo murino de septicemia (Bals, 1999).

La LL-37 atrae neutrófilos junto con monocitos y ciertas células T periféricas, parece actuar a través de un receptor para péptidos formil similares a receptor tipo 1 (familia de receptores de citocinas que presentan motivos estructurales conservados en sus dominios extracelulares y se unen a citocinas con un plegamiento de 4 bandas alfa helicoidales), que puede reconocer ligandos tales como los péptidos formil bacterianos. Como ya se comentó, LL-37 es inducida dentro de células epiteliales y de pulmón en estados de inflamación además de su acción antimicrobiana atrae diferentes tipos celulares hacia el sitio donde se ha producido el daño (Zasloff, 2002).

**PROTEGRINAS-** Son PNA's muy potentes que contienen de 16 a 18 aminoácidos aislados originalmente de leucocitos porcinos (Kokryakov, 1993). Poseen una estructura de hoja  $\beta$  que es estabilizada por dos puentes disulfuros intramoleculares (Fahrner, 1996; Harwig, 1995). A diferencia de las defensinas éstos pequeños péptidos mantienen una actividad en concentraciones fisiológicas de cloruro de sodio. Las protegrinas presentan actividad antimicrobiana contra organismos como *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* y *C. albicans* (Cho, 1998; Qu, 1997). Debido a que las protegrinas son muy pequeñas para atravesar las bicapas lipídicas en forma de monómeros, se cree que una oligomerización de varios péptidos es esencial para una acción destructiva sobre la membrana bacterial (Lehrer, 1999).

**GRANULOSINA-** Es un péptido que pertenece a la familia de péptidos parecidos a saposinas, éstos péptidos se encuentran en los gránulos de las células T citotóxicas humanas y células NK. Esta familia también incluye a los amebaporos, péptidos citotóxicos y antimicrobianos del protozoo parásito *Entamoeba histolytica*. La granulosa mata extracelularmente a *Mycobacterium tuberculosis* y otros patógenos *in vitro* (Stenger, 1998), en combinación con la perforina, se incrementa su efecto. La combinación de granulosa y

moléculas parecidas a perforina, podrían activar a las células T para matar a muchos patógenos intracelulares (Lehrer, 1999).

**HISTATINA-** Son proteínas humanas que se encuentran en la saliva, son pequeñas y ricas en histidina. Presentan una actividad antimicrobiana hacia *Candida albicans* especialmente en un ambiente de pH ácido, bajo condiciones de relativa fuerza iónica. Las estructuras primarias de las dos principales integrantes de esta familia (histatina 1 y 3 ) han sido estudiadas y han revelado que éstas tienen una longitud de 38 y 32 aminoácidos, respectivamente. Los miembros más pequeños de la familia de las histatinas, incluyendo la histatina 5 de 24 aminoácidos se originan a partir de las histatinas 1 y 3 mediante un proceso post-traduccional.

Los mecanismos fungicidas de las histatinas no son muy claros aún, no son membranólíticas y su forma de eliminar a *C. albicans* parece deberse a la unión de éstas a una proteína de 67 kDa presente en *C. albicans* que se ha encontrado en los lisados y las fracciones crudas de membranas (Edgerton, 1998).

**DERMICIDINA-** Este péptido ha sido uno de los últimos en describirse siendo diferente a todos los péptidos antimicrobianos descubiertos anteriormente. Es un péptido que se expresa específicamente en las glándulas sudoríparas de los humanos y mediante el sudor es transportado a las superficie epitelial. Tiene una longitud de 47 aminoácidos, con una estructura anfipática de  $\alpha$ -hélice. Bajo condiciones de pH y concentraciones de sal parecidas a las que se encuentran en el sudor, este péptido es activo contra cepas bacterianas como *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *Candida albicans*. Aún hacen falta estudios sobre este péptido en específico, sin embargo esto da un impulso a la investigación sobre posibles deficiencias en la expresión de éste y otros péptidos y su relación en enfermedades cutáneas (Schitteck, 2001).

Recientemente se ha descubierto que en la cavidad gástrica, específicamente en mucosa gástrica de humanos ratones y otros vertebrados, la histona 2-A se sintetiza en mayor cantidad que la requerida para empaquetar el DNA de las células de la mucosa gástrica y se acumula en gránulos citoplasmáticos secretores. Una vez secretada, la histona es procesada por pepsina y transformada en péptido antimicrobiano denominado buforina II, que permanece adherido a la capa mucosa que cubre la superficie del estómago y por lo tanto provee al estómago con una capa protectora antimicrobiana (Kim, 2000; Zasloff, 2002).

## **5.-ESTRUCTURA DE LOS PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS.**

Como ya se ha mencionado, los péptidos antimicrobianos en plantas y animales son típicamente catiónicos (contienen un exceso de residuos de arginina y lisina) y son también moléculas anfipáticas. Algunos son  $\alpha$ -hélices especialmente cuando se encuentran en solventes que promueven su estructura, como lo es el trifluoroetanol o al mezclarse con membranas fosfolípicas aniónicas. Otros contienen estructuras de hoja- $\beta$  que son estabilizados mediante puentes disulfuro de cisteínas algunas veces asociados con dominios de  $\alpha$ -hélice.

### **PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CON ESTRUCTURA DE $\alpha$ -HELICE.**

Los péptidos antimicrobianos que presentan estructura de  $\alpha$ -hélice como las cecropinas están ampliamente distribuidos en los invertebrados, aunque en su mayoría han sido estudiados en los ordenes Lepidoptera (mariposas y polillas) y Diptera (moscas). Los péptidos  $\alpha$ -hélice parecidos a las cecropinas también existen en otros ordenes de insectos, en la sangre de



protocordados marinos así como en el intestino porcino (Lee, 1989; Zhao, 1997). Las magaininas también pertenecen a la familia de péptidos antimicrobianos con estructura de  $\alpha$ -hélice, sus estructuras y su relación con modelos de membranas y microorganismos se han estudiado extensivamente (Bechinger, 1993; Ludtke, 1996) .

En los mamíferos los leucocitos contienen catelicidinas, que son péptidos con un precursor conservado N-terminal (llamado catelina) seguido de un péptido antimicrobiano. Los péptidos antimicrobianos  $\alpha$ -hélice asociados a catelina se encuentran en las células sanguíneas de los humanos, ganado y roedores (Zanetti, 1995)

## **PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CON ESTRUCTURA DE HOJA- $\beta$**

A diferencia de los péptidos anfífilos con estructura  $\alpha$ -hélice, las defensinas representan una clase inusual de antimicrobianos debido a que están estabilizadas mediante tres puentes disulfuro y tienen una  $\beta$ -horquilla como su principal característica estructural. Este motivo es la característica que unifica y define a todas las defensinas que son de otra forma muy diversas en términos de origen evolutivo. Se han podido conocer varias estructuras de defensinas mediante métodos como los rayos-x y NMR (Resonancia Magnética Nuclear), que nos permiten conocer como es que las defensinas interactúan con modelos de membranas.

Todas las defensinas son catiónicas, todas tienen arginina como residuo catiónico predominante y presentan conexiones típicas de cisteína. Las comparaciones estructurales revelan que las defensinas en los neutrófilos de los conejos se encuentran en forma de monómeros cuando están en solución. Mientras que las  $\alpha$ -defensinas humanas se presentan como

dímeros posiblemente estabilizados por uniones de hidrógeno y uniones hidrofóbicas (White, 1995).

La propiedad anfipática de los PNA's es necesaria para la ruptura de la membrana y la formación de poros. Un estudio realizado por Hill y colaboradores, describió al dímero HNP-3 con una forma de canasta que tiene un fondo hidrofóbico (exponiendo las superficies de las  $\beta$ -horquillas) y una cima polar (conteniendo las regiones N- y C-) (Hill, 1991).

En los últimos años se han propuesto otros dos grupos que conjuntan a los péptidos de acuerdo a su composición general y a su estructura terciaria. El tercer grupo está conformado por péptidos que presentan una predominancia de uno o mas aminoácidos, mientras que el cuarto esta formado por péptidos con estructura en espiral. La diversidad de estos péptidos es tan grande que resulta difícil categorizarlos en una clasificación que sea aceptada generalmente (Koczulla, 2003). En las siguientes tablas se muestran los cuatro grupos de péptidos de acuerdo a su estructura mostrando ejemplos de cada grupo así como su localización en especie y órgano y que tipo de actividad presentan.

<b>PÉPTIDO</b>	<b>ESPECIE Y ÓRGANO</b>	<b>ACTIVIDAD</b>
<b>GRUPO I: <math>\alpha</math>-helicoidales, lineares, sin cisteína</b>		
Bombininas	Rana, piel	Antimicrobiana
Cecropinas	Insectos, hemocitos y esperma	Antimicrobiana
LL-37	Humanos, neutrófilos y células epiteliales	Antimicrobiana
Magaininas	Rana, piel	Antimicrobiana
Stielinas	Tunicados, hemocitos	Antimicrobiana
Clavaninas	Tunicados, hemocitos	Antimicrobiana
Melittina	Abejas, veneno	Antimicrobiana
<b>GRUPO II: Estructura hoja-<math>\beta</math> estabilizada por dos o tres puentes disulfuro</b>		
Protegrinas	Cerdo, intestino	Antimicrobiana
Defensinas	Vertebrados, células inmunes y epitelio	Antimicrobiana y quimiotáctica
Defensinas de insectos	Insectos, hemocitos	Antimicrobiana
$\theta$ -Defensinas	Monos, neutrófilos	Antimicrobiana
Defensinas vegetales	Plantas, semillas y hojas	Antimicrobiana
Drosomicina	Insectos, hemocitos	Antimicrobiana
<b>GRUPO III: Péptidos con una predominancia de dos o tres aminoácidos.</b>		
PR39	Cerdo, intestino y neutrófilos	Angiogénica y cicatrizante
Bac5, Bac7	Vaca, neutrófilos	Antimicrobiana
Drosocina	Drosophila, hemolinfa	Antimicrobiana
Metchnikowina	Drosophila, hemolinfa	Antimicrobiana
<b>GRUPO IV: Péptidos con estructura en espiral</b>		
Bactenecina	Vaca, neutrófilos	Antimicrobiana
Ranalexina	Rana, piel	Antimicrobiana

**Tabla III** : Familias y nomenclatura de péptidos antimicrobianos de acuerdo a su estructura molecular (Koczulla & Bals, 2003).



**Figura 5.** Ejemplos de modelos moleculares de diferentes clases estructurales de PNA's: A) Estructura de hoja  $\beta$ -plegada (hBD2), B) Estructura de  $\alpha$ -hélice (magainina), C) Estructura en espiral (bactenecina) (Zhao, 2003).

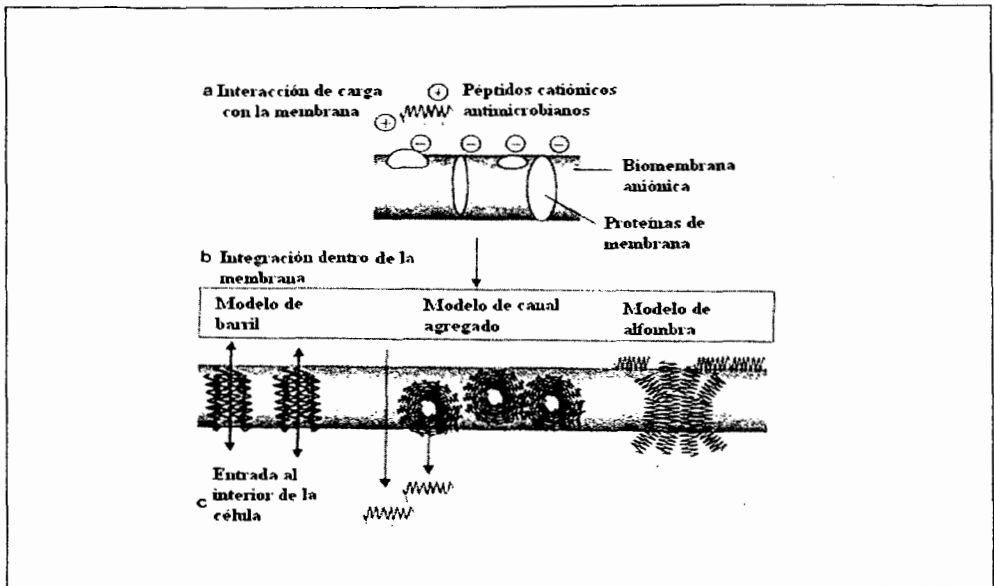
## 6.-MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS.

Es difícil conocer la actividad de un péptido o la estructura secundaria que formará solamente mediante su secuencia. La mayoría de los péptidos sin puentes disulfuro tienen estructuras variables en el agua y forman una estructura solamente cuando se unen a una membrana u otro ambiente hidrofóbico (Bello, 1982; Falla, 1996). Por ejemplo las cecropinas y la melitina se pliegan en forma de  $\alpha$ -hélices anfipáticas cuando se encuentran en ambientes

membranosos. Es sabido que la naturaleza tanto catiónica como hidrofóbica de los péptidos es muy importante al momento de la interacción inicial entre el péptido y la membrana bacteriana.

La unión inicial depende de las interacciones electrostáticas entre los péptidos cargados positivamente y las moléculas cargadas negativamente de la superficie en el microorganismo. El paso secundario, resulta en la modificación de las propiedades biofísicas causadas por interacciones directas con el péptido.

Hasta la fecha se ha propuesto tres mecanismos de acción de los péptidos para permeabilizar las membranas de los microorganismos: 1) Un modelo llamado “barril” que implica la formación de canales transmembranales de una forma voltaje-dependiente con moléculas no-polares orientadas hacia los lípidos de membrana, haciendo que se forme un poro hidrofílico que atraviesa la membrana, 2) El modelo “canal agregado” que implica la agregación de péptidos en grupos sin ninguna estructura definida sobre la membrana, permitiendo así la formación dinámica de poros de duración corta ocasionando la pérdida de la homeostasis intracelular. Los PNA’s también pueden entrar al espacio intracelular a través de este modelo y unirse mediante diferencia de cargas al material genético del microorganismo. 3) Finalmente está el modelo “alfombra”, que describe el cubrimiento de la membrana celular microbiana por una alfombra o cubierta de PNA’s . La integridad de la membrana se colapsa por la formación de agujeros de gusano que se forman por el plegamiento de la capa de lípidos sobre si misma (Boheim, 1974; Heller, 2000; Koczulla, 2003; Wu, 1999). En la siguiente figura se sintetizan los tres modelos de acción de los PNA’s.



**Figura 6:** Los 3 principales mecanismos de acción de los PNA's sobre las membranas microbianas (Koczulla, 2003; Matsuzaki, 1998)

Por lo tanto, una consecuencia de éstos mecanismos físicos de acción (basado en interacciones iónicas e hidrofóbicas) es que para una bacteria es muy difícil el convertirse resistente a tales péptidos y el producir mutantes no es del todo fácil tampoco. Las interacciones que se describen en los tres modelos anteriores se proponen con el objetivo de provocar la pérdida de las funciones de la membrana incluyendo la eliminación del potencial de membrana, la pérdida de iones, metabolitos y la alteración de la permeabilidad de la membrana. La selectividad parcial de los PNA's hacia las células procarióticas parece depender de la diferente composición lipídica asociada con diferentes cantidades de carga negativa de las membranas de

los microorganismos comparadas con células eucarióticas (Koczulla, 2003). El efecto antimicrobiano de un péptido individual, depende de su estructura y secuencia de aminoácidos. Además de su actividad antimicrobiana, existen algunos péptidos como las catelicidinas y las defensinas que pueden unirse al LPS (lipopolisacárido) e inactivar las funciones biológicas de ésta endotoxina (David., 2001). Esta actividad ha sido utilizada para reducir la mortalidad en modelos murinos de choque endotóxico mediante la aplicación de péptidos derivados de LL-37/hCAP-18 (Kirikae, 1998). De manera que los PNA's tienen una actividad de defensa del hospedero con una actividad antimicrobiana directa y representan moléculas efectoras del sistema inmune innato.

## **7.-REGULACIÓN DE LOS GENES DE PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS.**

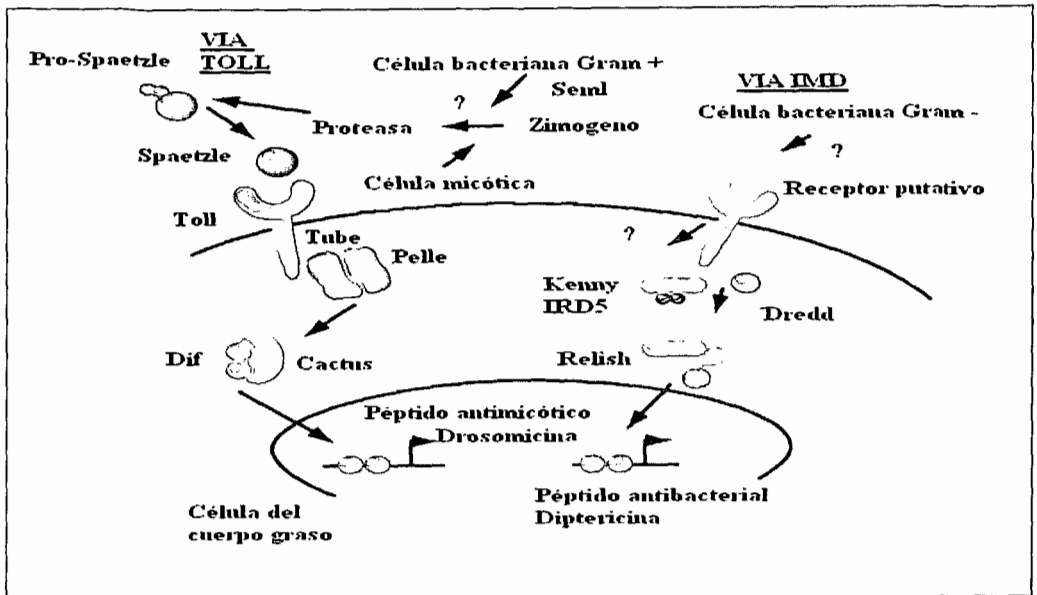
Los genes encargados que codifican PNA's en insectos se expresan en células sanguíneas, epiteliales y en el cuerpo graso de los insectos, un órgano homólogo al hígado en vertebrados que secreta proteínas y péptidos directamente a la hemolinfa de los insectos. Las regiones próximas al extremo 5' tienen secuencias que se unen a los factores de transcripción "Rel", análogos a los motivos de unión del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) presentes en los mamíferos. Estas regiones reguladoras están implicadas en el desarrollo temprano de *Drosophila*, muchas de ellas están asociadas con una función de defensa. La ruta que regula la producción de péptidos en insectos, involucra la iniciación de la señal a través de la generación proteolítica de la proteína Spaetzle a partir de su precursor; la interacción de Spaetzle con un receptor presente en la superficie de las células de *Drosophila* llamado receptor Toll; la

comunicación subsecuente mediante una serie de proteínas intracelulares que da como resultado una modificación química del Cactus (proteína mediadora) citoplasmático, el cual es liberado de su unión física con la proteína Dif (factor inmune dorsal); la translocación de Dif dentro del núcleo, y posterior unión a una secuencia de DNA cercana al gen antimicrobiano activa finalmente la transcripción. La drosomicina un PNA antifúngico, parece ser regulado mediante este circuito (Imler, 2001).

Se ha observado que en moscas mutantes que no expresan el circuito Toll-Drosomicina todavía pueden expresar otros PNA's tales como la cecropina y la diptericina. El circuito encargado de la producción de estos péptidos se denomina la vía *imd* (inmunodeficiente), regulado por una vía que es activada por una proteína relacionada a Dif, llamada relish. Tal como Dif, relish se encuentra en el citoplasma, pero en contraste, esta última debe de ser dividida mediante eventos posteriores.

Las evidencias sugieren que la vía Toll está implicada en la defensa contra organismos micóticos y bacterias Gram<sup>+</sup>, mientras que la vía *imd* responde contra eventos patogénicos ocasionados por bacterias Gram<sup>-</sup>, estas dos vías están diseñadas intrínsecamente para responder a diferentes insultos fisiológicos. A continuación se encuentra una figura donde se esquematiza la regulación génica de PNA's en insectos.





**Figura 7:** Mecanismo de activación de PNA's en insectos, procedimientos homólogos suceden en animales y plantas. (Zasloff, 2002) .

La expresión de las  $\beta$ -defensinas es estimulada por la presencia de lipopolisacáridos (LPS), interleucina- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) . El análisis de las regiones reguladoras del extremo 5' de varios genes inducibles de péptidos antimicrobianos epiteliales en mamíferos y ranas, revelan sitios de unión para NF $\kappa$ B. Se ha visto que cuando se presenta un estímulo correcto hay un incremento en los niveles de NF $\kappa$ B intracelular, así como su translocación dentro del núcleo y la activación del gen antimicrobiano correspondiente.

La actividad inductora de la IL- $1\beta$  implica un papel para el receptor de IL-1 (IL-1R) en la producción de defensinas epiteliales. El IL-1R pertenece a la familia de receptores Toll y ambos

responden a un ligando de origen proteico, el cual debe de ser procesado proteolíticamente. En mamíferos la IL-1 es liberada por los monocitos, macrófagos, células dendríticas o por células epiteliales dañadas. La homología entre los receptores en insectos y vertebrados a llevado a formular la hipótesis de que el sistema inmune innato utiliza receptores especializados para reconocer patrones únicos y específicos de constituyentes químicos microbianos que están presentes cuando los microbios atacan a los organismos multicelulares.

Estudios recientes han demostrado que existen por lo menos diez receptores tipo Toll (TLR's por sus siglas en inglés) presentes en humanos. Como conclusión, el modelo actual sugiere que productos microbianos como el LPS se unen directamente a estos TLR's , en algunos casos asociados con proteínas de unión específicas que pudieran incrementar la especificidad. Sin embargo, aún hacen falta estudios para conocer las interacciones ligando-receptor y el circuito intracelular utilizado para modular la expresión génica de los PNA's.

En plantas, la señal inicial es transmitida por receptores de patrones altamente específicos que son análogos a Toll y a los TLR's humanos, a su vez activan respuestas relativamente específicas en contra de organismos específicos un concepto llamado estrategia defensiva gen por gen (Akira, 2001; Kiyoshi 2003; Zasloff, 2002).

## 8.-PERSPECTIVAS DE LOS PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS.

### Nuevos antibióticos.

El futuro de los PNA's hacia una aplicación clínica, se fundamenta en la gran preocupación entre los microbiólogos clínicos sobre la cada vez más común resistencia de las bacterias a la mayoría de antibióticos clásicos. Hasta hace poco existían algunas cepas bacterianas resistentes a todos los antibióticos comunes menos a la vancomicina, sin embargo se ha visto que también han logrado crear una resistencia a esta última (Swartz, 1994). Debido a esta resistencia, se proponen a los PNA's para ser utilizados como agentes terapéuticos. Por lo tanto la identificación de péptidos nuevos y no citotóxicos, producidos en humanos y animales es un objetivo importante.

El uso clínico extensivo de la polimixina, un péptido membrano-activo selectivo demostró claramente que las moléculas que actúan mediante la discriminación de microorganismos patógenos, en base a las diferencias en el diseño de sus membranas podrían desarrollarse como terapéuticos administrados sistémicamente. Desgraciadamente la polimixina se asocia con ciertas toxicidades por lo que no se acepta ya que el daño renal tubular es resultado en parte de nuestra incapacidad para metabolizar a este péptido (Storm, 1977). La magainina ha mostrado que actúa sinérgicamente con ciertos antibióticos "estándar", en la quimioterapia de infecciones causadas por bacterias Gram-negativas. En 1991 Darveau realizó un estudio utilizando ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida e infectados con *Escherichia coli* y tratándolos con Magainina 2 y cefalosporina. La Magainina 2 que por sí sola no presentaba eficacia en este campo, si aumentó la eficacia de la cefalosporina cuya actividad había sido reducida en éstos animales tratados. La sinergia entre estos dos agentes antibióticos se cree que

es el resultado del efecto permeabilizante del péptido que daña la integridad de la pared bacteriana y facilita la entrada del antibiótico al interior de la célula (Darveau, 1991) .

Una variante de la magainina denominada MSI-78 se encuentra en experimentos clínicos de fase clínica tres en los cuales se tratan a 926 pacientes para probar la eficacia de este péptido en contra de úlceras diabéticas polimicrobianas. Los resultados han demostrado efectos similares a aquellos que habían sido tratados con ofloxacina, pero con menos efectos secundarios. También el péptido híbrido de cecropina-melitina ha mostrado tener actividad antimicrobiana tópica en contra de infecciones oculares en conejos causadas por *P. aeruginosa* (Hancock, 1998; Nos-Barbera, 1997) .

Hay una cantidad importante de evidencia publicada donde se demuestra que las infecciones sistémicas son tratadas eficientemente con péptidos antimicrobianos como las protegrinas de hoja  $\beta$ , la cual es activa contra cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, e infecciones causadas por *Enterococcus faecalis* y *P. aeruginosa* resistentes a vancomicina (Steinberg, 1997). Estos hallazgos indican que los PNA's tiene la capacidad de ser utilizados como antibióticos inyectables en contra de microorganismos resistentes a antibióticos convencionales.

Además, debido a que algunos péptidos como la polimixina interactúan con endotoxinas bacterianas, presentan una propiedad terapéutica adicional de gran valor, por lo que es posible rescatar a un ratón de un shock endotóxico mediante la administración del péptido vía intravenosa. De tal forma que como agentes terapéuticos humanos los PNA's, al ser desarrollados podrían exhibir actividad antibiótica y neutralizante de endotoxinas, una

combinación de propiedades que podrían ser benéficas en el tratamiento de infecciones bacterianas (Jacob, 1994).

La colonización microbiana y su crecimiento en las superficies de materiales poliméricos sintéticos, es un problema que complica el uso de artículos médicos como los catéteres intravenosos, una posible solución es la utilización de péptidos de magainina debido a la capacidad que tienen de unirse a superficies poliméricas insolubles y retener su actividad antimicrobiana (Zasloff, 2002). Sin embargo, el problema específico es el alto costo de la síntesis química en la producción de los PNA's. Es posible sintetizar la mayoría de PNA's incluyendo las  $\beta$ -defensinas con sus complejos puentes disulfuro, pero los costos son demasiado altos y esto impide su producción en grandes cantidades.

Se han desarrollado estrategias de expresión biológica para evitar este problema. Varios grupos han desarrollado sistemas recombinantes de baculovirus para la expresión de  $\beta$ -defensinas y han obtenido péptidos activos, puros y estructuralmente correctos en cantidades de miligramos (Koczulla, 2003). Los PNA's también se han producido en plantas transgénicas y en bacterias (De Bolle, 1996; Harrison, 1999; Okamoto, 1998). Las defensinas también se han producido en la leche de animales transgénicos. Después de la producción biológica, se necesita de un proceso de purificación para evitar la contaminación con proteínas del hospedero que pudieran inducir una respuesta inmune del paciente (Yarus, 1996).

La secuencia que codifica para PNA's puede también ser transferida a células blanco mediante una transferencia de genes, como se ha visto en modelos de animales que sobreexpresan la producción de LL-37 o la transferencia de histatina 3 a las glándulas salivales (Bals, 1998; Bals, 1999).

Otro aspecto interesante sería el estimular la expresión de PNA's mediante pequeños compuestos químicos, la aplicación del aminoácido esencial L-isoileucina en las células epiteliales de las vías respiratorias, estimula la expresión de defensinas epiteliales (Fehlbaum, 1994). Las compañías biotecnológicas, han formado alianzas para realizar estudios en humanos utilizando PNA's, aún después de varios estudios preclínicos realizados por éstas compañías, sigue habiendo preguntas sin responder acerca de la producción, costos, labilidad a las proteasas *in vivo* y si pudiesen causar alguna toxicidad (Koczulla, 2003)

En el caso de dos péptidos naturales producidos en laboratorio, han sido considerados para tratar úlceras estomacales causadas por *Helicobacter pylori* (nisina) y mucositis oral (iseganan). Se ha iniciado en adultos saludables un estudio de fase 1 de seguridad con iseganan en aerosol con el objetivo de utilizar este péptido en pacientes con fibrosis quística que presenten infecciones crónicas de pulmón causadas por *P. aeruginosa*. Ambos han pasado los estudios de fase clínica 1 satisfactoriamente y actualmente se encuentran en una evaluación clínica mayor.

Una compañía canadiense (Micrologix, Biotech Inc., Vancouver, Columbia Británica, Canadá) recientemente incluyó a dos agentes (MBI-594AN y MBI-226) en la fase II de estudios en infecciones asociadas con catéteres e infecciones serias de acné (Koczulla, 2003). En la siguiente tabla se encuentran algunos de los péptidos que están siendo utilizados en investigaciones clínicas en diferentes fases, así como el nombre de la compañía productora y la enfermedad a tratar para cada péptido.

NOMBRE DE COMPAÑÍA	NOMBRE DEL PEPTIDO	ENFERMEDAD A TRATAR Y DESARROLLO CLÍNICO
Magainin Pharmaceuticals Inc (PA, USA)	Pexiganan	Ulceras infectadas de pie diabético (fase III, uso local) .
Micrologix Biotech Inc. (Vancouver, Canada)	MBI-594AN	Acné (fase III, uso local ), terminada.
	MBI-226	Sepsis causada por catéteres (fase III, uso local) .
Intrabiotics (Mountain View, CA, USA)	Iseganan	Mucositis (fase II, uso topico-oral
	(IB-367; protegerina)	fallido)
Intrabiotics (Mountain View, CA, USA)	Iseganan	Infecciones pulmonares en fibrosis Quística (fase II, uso local inhalativo).
	(IB-367; protegerina)	
Xoma Corp. (Berkeley, CA, USA)	Neuprex	Meningitis (fase III, uso sistémico) .
Demegen (Pittsburg, PA, USA)	P-113	Candidiasis oral, mucositis (fase II, uso oral)
	D2AD21	Heridas de quemaduras, heridas infectadas (fase I uso local) .
Cubist Pharmaceutical (Lexington, MA, USA)	Daptomicina	Sepsis (fase III)
AM (Pharma, Bilthoven, Holanda)	Lactoferricina-B	Antimicótico (fase preclínica, uso sistémico)
Entomed (Illkirch, Francia)	Heliomicina	Antibacteriano (fase preclínica, uso sistémico)
Trimeris (Durham, NC, USA)	Enfuvirtide	Antiviral (HIV) (fase III completada)

**Tabla IV :** Compañías involucradas en el desarrollo de péptidos antimicrobianos como drogas (Koczulla & Bals, 2003) .

## **EL PAPEL DE LOS PÉPTIDOS NATURALES ANTIMICROBIANOS EN INFLAMACIÓN, ANGIOGÉNESIS Y FUNCIÓN CELULAR.**

Además de su actividad antimicrobiana, los PNA's presentan otros efectos biológicos. En base a su actividad de membrana, los PNA's tienen una toxicidad dependiente de concentración hacia células eucarióticas. Altas concentraciones de  $\alpha$ -defensinas se han encontrado en secreciones de pacientes con fibrosis quística (Soong, 1997) y bronquitis crónica (Panyutich, 1993), donde estas sustancias podrían contribuir a la inflamación.

Además de su toxicidad inespecífica, algunos péptidos se unen a receptores celulares en bajas concentraciones, activan vías de señalización intracelular y estimulan varias funciones celulares. Las  $\alpha$ -defensinas son capaces de estimular una variedad de células mediante mecanismos que aún no han sido identificados, atraen células T humanas  $CD4^+/CD45RA^+$  ó  $CD8^+$ , células dendríticas inmaduras y monocitos (Chertov, 1996; Yang, 2000).

La hBD-1 y hBD-2 se unen a un receptor de quimiosinas conocido como CCR-6. Este receptor se encuentra en células dendríticas inmaduras y en células T inmaduras ( $CD4^+/CD45RA^+$ ), éstos hallazgos han sido interpretados como la unión entre los mecanismos de inmunidad innata y adquirida mediados por la acción de las defensinas. Se ha encontrado que LL-37 se une a un receptor para péptidos formil similares a receptor tipo 1, que se expresa en una variedad de células incluyendo neutrófilos, monocitos y linfocitos. Al unirse a este receptor, LL-37 empieza a atraer neutrófilos, monocitos y células T  $CD4^+$ , y activa a los mastocitos (Koczulla, 2003).



En los últimos dos años se ha visto que el péptido PR-39, estimula la angiogénesis al unirse a la subunidad  $\alpha 7$  del proteasoma 26S y modula la vía proteasoma-ubiquitina sin tener efecto alguno en la actividad proteosomática (Li J, 2000). Este efecto inhibitorio selectivo que tiene el péptido sobre la vía proteosomática también da como resultado una actividad anti-inflamatoria al bloquear la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  el cual es un inhibidor de NF- $\kappa$ B. PR-39 es quimioatrayente para neutrófilos, contribuye a la cicatrización al estimular la expresión de sindecanos (Elsbach, 2003; Koczulla, 2003).

El impacto de estas funciones no-antimicrobianas, en la patogénesis de una enfermedad aún no es conocido. Las funciones no-microbicidas ofrecen oportunidades importantes para investigar que papel juegan los PNA's en las enfermedades inflamatorias. A continuación se muestra una tabla indicando algunas funciones no microbicidas que tienen algunos péptidos, así como los receptores y los tipos celulares donde actúan.

PEPTIDO	RECEPTOR	TIPO CELULAR	FUNCION
Hbd-1, Hbd-2	CCR-6	Células dendríticas inmaduras, linfocitos T, Mastocitos.	Quimotáctica, liberación de citocinas e histamina.
Hbd-3, Hbd-4	?	Monocitos	Quimotáctica
Mbd-2, Mbd-3	CCR-6	Células dendríticas inmaduras, linfocitos T	Quimotáctica
LL-37	FPRL1	Monocitos, neutrófilos, células epiteliales y endoteliales	Quimiotáctica, activación celular
$\alpha$ -defensinas	?	Células epiteliales, linfocitos T, células dendríticas inmaduras y monocitos.	Quimiotáctica, activación celular, liberación de citocinas.
<p>CCR: Siglas en inglés para receptor de quimiosina; FPRL1: Siglas en inglés para receptor para péptidos formil similares a receptor tipo 1.</p>			

**Tabla V:** Actividades no-microbicidas de péptidos antimicrobianos mediadas por receptores específicos. (Koczulla & Bals, 2003)

## 9.-DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Los péptidos naturales antimicrobianos (PNA'S) son moléculas efectoras del sistema inmune innato. Se han aislado una gran variedad de péptidos de muchas especies pertenecientes a todos los reinos, desde la mosca *Drosophila* hasta a el humano y se han clasificado de acuerdo a su estructura y contenido de aminoácidos. Respecto a la clasificación estructural, la mayoría de los PNA's presentan aspectos generales similares entre sí, sin embargo, en su secuencia de aminoácidos difieren bastante a excepción de ciertos residuos constantes como la cisteína, ésto sugiere que cada péptido ha evolucionado probablemente de forma convergente para actuar de manera óptima en el ambiente en el cual es producido y en contra de microorganismos locales. Además, los PNA's tienen múltiples papeles como reguladores de inflamación, influenciando diversos procesos como la proliferación celular, inducción de la respuesta inmune, cicatrización de heridas, liberación de citocinas, quimiotaxis y el balance proteasa-antiproteasa. Sin embargo, la amplia diversidad de los PNA's, hace difícil su diseño sintético con el objeto de que conserven su potencia y presenten las mismas actividades que tienen cuando provienen de una fuente natural (Koczulla, 2003; Zasloff, 2002)

La producción de PNA's sintetizados químicamente en algunos casos como las  $\alpha$  y  $\beta$  defensinas, presentan menor actividad que aquellos obtenidos de fuentes naturales, ésto puede deberse a conexiones incorrectas entre cisteínas y tener como resultado un plegamiento incorrecto de la molécula. Una alternativa para corregir ésto, es la síntesis recombinante, aunque el expresar PNA's en bacterias o levaduras puede crear una situación de autodestrucción que se puede evitar utilizando un vector que incluya un constructo para una proteína de fusión, como se ha hecho con el factor de necrosis tumoral humano (TNF $\alpha$ ) y la cecropina A. Como ya se

mencionó, existen en el mercado algunos PNA's producidos por compañías farmacéuticas que se encuentran en fases avanzadas de estudios preclínicos, tal es el caso de la daptomicina, que está en la fase III utilizándose en casos de septicemia, ésto es de gran importancia ya que esta enfermedad afecta a miles de persona cada año. De igual forma, existen otros ejemplos de PNA's que se encuentran por terminar los estudios preclínicos y que se están utilizando para tratar de controlar y curar enfermedades tales como la meningitis (con el péptido Neuprex) y el SIDA (con el péptido Enfuviridae) ambas también en fase III de investigación.

Otra posible razón de el porqué en algunos casos los PNA's sintetizados químicamente no son tan efectivos como los que provienen de fuentes naturales, se debe a que la acción *in vivo* de los PNA's se acompaña de un trabajo cooperativo de algunos factores existentes *in vivo* y que *in vitro* no se han reproducido aún.

Otro punto de discusión es la aparente selectividad de los PNA's hacia microorganismos externos y la inocuidad que presentan la mayoría de éstos péptidos hacia las células del hospedero. Para explicar este fenómeno se han realizado estudios con liposomas que contienen colesterol y liposomas sin la presencia del mismo, aquellos que contienen colesterol no son atacados por los péptidos. La presencia de colesterol en las membranas de las células eucarióticas, así como su menor carga negativa de membrana comparada con la de los microorganismos, puede explicar en algunos casos el porqué las células del hospedero no son destruidas por los PNA's.

Faltan muchos aspectos por estudiar acerca de los PNA's, aún cuando en los últimos años las investigaciones sobre este tema se hayan incrementado considerablemente, preguntas como los costos de producción, la labilidad hacia las proteasas *in vivo* y toxicidades tal vez aún no conocidas, siguen sin ser contestadas.

Por lo anteriormente discutido, nuestro grupo de trabajo ha considerado importante el estudio de los PNA's debido a su presencia en todos los organismos vivos superiores y a su diversidad de funciones. Por lo tanto, este trabajo pretende ser una guía para el aprendizaje básico de los PNA's.

Podemos concluir que los PNA's han surgido como sustancias efectoras en la RII y funcionan no solamente como agentes microbicidas endógenos sino que también son capaces de realizar funciones que van desde mediadores de inflamación hasta promotores angiogénicos. El estudio de éstos, ha mejorado el entendimiento de cómo un organismo superior puede sobrevivir en un ambiente hostil que se encuentra lleno de microorganismo patógenos. Muchos de los antibióticos que se utilizan hoy en día son productos del metabolismo de algún hongo. Sin embargo, algunas cepas han evolucionado para volverse resistentes, debido a que los PNA's tienen un mecanismo de acción totalmente diferente al de los antibióticos comunes, éstos péptidos, han estado funcionando como un escudo químico de defensa durante millones de años en plantas y animales, podrían llenar los requerimientos como una alternativa terapéutica por medios naturales.

En un futuro se deberán considerar los siguientes puntos:

- 1- La identificación de nuevos PNA's.
- 2- El análisis de las funciones biológicas más relevantes de los PNA's que incluyen tanto su actividad antimicrobiana así como otras posibles funciones.

- 3- El desarrollo de PNA's como nuevos medicamentos, esto involucra mejores estrategias para la identificación de posibles péptidos candidatos, la modificación en cuanto a su perfil farmacológico y finalmente su producción a gran escala.
  
- 4- El estudio de la biología de los PNA's debe permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en casos de enfermedades infecciosas e inflamatorias.

## BIBLIOGRAFÍA.

- AGERBERTH, G., ODEBERG, KOGNER, BOMAN, GUDMUNDSSON. (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is a cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 195-199.
- AKIRA, K., TSUNEYASU. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* **8**, 675-680.
- BALS, R. (2000). Antimicrobial peptides and peptide antibiotics. *Med Klin* **95**, 496-502.
- BALS, W., MEEGALLA. (1998). Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest* **103**, 113-7.
- BALS, W., MOSCIONI. (1999). Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun* **67**, 6084-6049.
- BECHINGER, Z., OPELLA. (1993). Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.* **2**, 2077-2084.
- BELLO, B., GRANADOS. (1982). Conformation and aggregation of melittin: dependence on pH and concentration. *Biochemistry* **21**, 461-465.
- BENJAMINI, R. C., GEOFFREY SUNSHINE. (2000a). Elements of Innate and Aquired Immunity. In *Immunology a short course*, pp. 21-22. Wiley-Liss, New York.
- BENJAMINI, R. C., GEOFFREY SUNSHINE. (2000b). Introduction and Overview. In *Immunology*, pp. 7-10. Wiley-Liss, New York.
- BENSCH, R., MAGERT, SCHULZ-KNAPPE, FORSSMANN. (1995). hBD-1: A novel b-defensin from human plasma. *FEBS Lett.* **368**, 331-335.

- BERRÓN, P., ZARAGOZA, RODRÍGUEZ, BLANCAS. (2003). El sistema del complemento. Vías clásica y de lectina que se une a la manosa. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* **12**, 46-52.
- BESSALLE, H., GORIA, SHALIT, FRIDKIN. (1992). Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extensions. *Antimic. Agents Chemother.* **36**, 313-317.
- BEUTLER, B. (2000). The Toll-Like Receptors as the Primary Sensors of the Innate Immune System. *The Immunologist* **8**, 124-131.
- BOHEIM, G. (1974). Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. *J Membr Biol* **19**, 277-303.
- BOMAN, H. G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immun.* **13**, 61-92.
- BROEKAERT, C., DE BOLLE, THEVISSSEN, DE SAMBLANX, OSBORN. (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci* **16**, 297-323.
- CAMMUE, T. K., HENDRIKS M, EGGERMONT K, GODERIS IJ, PROOST P, VAN DAMME J, OSBORN RW, GUERBETTE F, KADER JC, BROEKAERT WF. (1995). A potent antimicrobial protein from onion (*Allium cepa* L.) seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Pysiol* **109**, 445-455.
- CASTEELS, A., JACOBS, VAECK, TEMPST. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* **8**, 2387-2391.
- CHAGOLLA-LOPEZ, B.-L., PATTHY, SÁNCHEZ, PONGER. (1994). A novel  $\alpha$ -amylase inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) seeds. *J Biol Chem* **269**, 23675-23680.



- CHERTOV, O., MICHEL DF, XU L. (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* **271**, 2935-2940.
- CHERTOV, O., YANG, D., HOWARD, O. M., OPPENHEIM, J. J. (2000). Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol. Rev.* **177**, 68-78.
- CHO, T., DINH, LEHRER. (1998). Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**, 28486-2493.
- COLE, A. M., TERESA HONG, LEE MING BOO, TUNG NGUYEN, CHENGQUAN ZHAO, GREG BRISTOL, JEROME A. ZACK, ALAN J. WARING, OTTO O. YANG, ROBERT I. LEHRER. (2002). Retrocyclin: A Primate Peptide That Protects Cells From Infection by T- and M-Tropic Strains of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1813-1818.
- CREELMAN, T., MULLET. (1992). Jasmonic acid/ methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4938-4941.
- CSORDAS, M. (1970). Isolation and structure of a haemolytic polypeptide from the defensive secretion of european *Bombina* species. *Monatsh. Chem.* **101**, 182-189.
- CUERVO, R., HOUGHTEN. (1988). The magainins: sequence factors relevant to increased antimicrobial activity and decreased hemolytic activity. *Peptide Res.* **1**, 81-86.
- DARVEAU, R. P. (1991). b-lactam antibiotics potentiate Magainin 2 antimicrobial activity in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1153-1159.
- DAVID., S. (2001). Towards a rational development of anti-endotoxin agents: novel approaches to sequestration of bacterial endotoxins with small molecules. *J Mol Recognit* **14**, 370-87.

- DE BOLLE, O., GODERIS. (1996). Antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* **31**, 993-1008.
- DIAMOND, R., BEVINS. (1996). Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5156-5160.
- EDGERTON, K., LO, CHRZAN, STRAUBINGER, RAJ. (1998). Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **273**, 20438-20447.
- ELSBACH, P. (2003). What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *J. Clin. Invest.* **111**, 1643-1645.
- EVANS, B., WUNDERLICH, HARMONG. (1994). Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. *J Leukoc Biol* **56**, 661-665.
- FAHRNER, D., HARWIG, LEHRER, EISENBERG, FEIGON. (1996). Solution structure of protegrin-1, a broadspectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem Biol* **3**, 543-550.
- FALLA, K., HANCOCK. (1996). Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.* **271**, 19298-19303.
- FEARON, D. (1997). Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* **388**, 323-324.
- FEHLBAUM, B., MICHAUT, LAGUEUX, BROEKAERT, HETRU, HOFFMANN. (1994). Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J Biol Chem* **269**, 33159-33163.

- FERNANDEZ DE CALEYA, G.-P., GARCIA OLMEDO, CARBONERO. (1972). Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. *Appl Microbiol* **23**, 998-1000.
- FERRANDON, J., CRIQUI. (1998). A drosomycin -GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll Pathway. *EMBO J* **17**, 1217-1227.
- FROHM, A., AHANGARI, STAHL-BACKDAHL, LIDEN, WIGZELL, GUSMUNDSSON. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* **272**, 15258-15263.
- FULTON, A., ZASLOFF, BULL, QUINN, SCHRÖDER. (1997). Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet* **350**, 1750-1751.
- GALLO, H. (1998). Antimicrobial Peptides: An emerging Concept in Cutaneous Biology. *Journal of Invest. Dermat.* **111**, 739-743.
- GALLO, K., BERNFIELD, KOZAK, ZANETTI, MERLUZZI, GENNARO. (1994). Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc. Natl. Acad.* **91**, 11035-11039.
- GANZ, L. (1995). Defensins. *Pharmacol Ther* **66**, 191-205.
- GANZ, L. (1997). Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr. Opin. Hematol.* **4**, 53-58.
- GANZ, L. (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 41-44.
- GANZ T., L. R. (1995). Defensins. *Pharmacol Ther* **66**, 191-205.
- GARCIA OLMEDO, M., SEGURA, MORENO. (1995.). The defensive role of non-specific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol* **3**, 72-74.

- GOLDMAN, A., STOLZENBERG, KARI, ZASLOFF, WILSON. (1997). Human b-defensin-1 is a saltsensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**, 553-560.
- GUDMUNDSSON, M., CHOWDHARY, JOHANSSON, ANDERSSON, BOMAN. (1995). Structure of the gene for porcine peptide antibiotic PR-39, a cathelin gene family member: comparative mapping of the locus for the human peptide antibiotic FALL-39. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**, 7085-7089.
- HANCOCK, C. (1998). The therapeutic potential of cationic peptides. *Expert Opin. Invest. Drugs* **7**, 167-174.
- HANCOCK, F., BROWN. (1995). Cationic Bactericidal Peptides. *Adv. Microbiol. Physiol.* **37**, 135-175.
- HANCOCK, R. E. (2000). Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs*. **9**, 1723-9.
- HARDER, B., CHRISTOPHERS, SCHRODER. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**, 861.
- HARRISON, M., MARCUS. (1999). Purification and characterization of a plant antimicrobial peptide expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **15**, 171-7.
- HARWIG, K., SWIDEREK, ALESHINA, ZHAO, LEHRER. (1995). Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Lett.* **362**, 65-69.
- HELLER, W., LEHRER. (2000). Membrane thinning effect of the beta-sheet antimicrobial protegrin. *Biochemistry* **39**, 139-45.
- HILL, Y., SELSTED, EISENBERG. (1991.). Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: Mechanisms of membrane permeabilization. *Science* **251**, 1481-1485.

- HOFFMANN, H. (1992). Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol Today* **13**, 411-415.
- HOFFMANN, K., JANEWAY, EZEKOWITZ. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-8.
- IMLER, J. L. H., J. A. (2001). Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* **11**, 304-311.
- JACOB, Z. (1994). Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin. *Ciba Found Symp.* **186**, 197-216.
- JANEWAY, J. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1**, 1-13.
- JANEWAY, J. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**, 6-11.
- JANEWAY, T., WALPORT, SHLOMCHIK. (2001a). Innate Immunity. In *Immunobiology*, pp. 82-83. Garland Publishing, New York.
- JANEWAY, T., WALPORT, SHLOMCHIK. (2001b). An Introduction to Immunobiology and Innate Immunity. In *Immunobiology*, pp. 3-11. Garland Publishing, New York.
- KIM, H. S. (2000). Pepsin mediated processing of the cytoplasmic histone 2A to the strong antimicrobial peptide Buforin I. *J. Immunol.* **165**, 3268-3274.
- KIRIKAE, H., YAMASU. (1998). Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial peptide (CAP18) derived peptide against murine endotoxemia. *Infect Immun* **66**, 1861-8.
- KISS, M. (1962). On the venomous skin secretion of the orange specked frog *Bombina variegata*. *Toxicon* **1**, 33-39.
- KIYOSHI, T., AKIRA. (2003). Toll-Like Receptors. *Annu. Rev. Immun.* **21**, 335-376.

- KOCZULLA, B. (2003). Antimicrobial Peptides: Current Status and Therapeutic Potential. *Drugs* **63**, 389-406.
- KOKRYAKOV, H., PANYUTICH, SHEVCHENKO, ALESHINA, SHAMOVA, KORNEVA, LEHRER. (1993). Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.* **327**, 231-236.
- LAMBERT, K., DIMARCO, WICKER, REICHHART, DUNBAR, LE PAGE, DORSSELAER, HOFFMANN, FOTHERGILL, HOFFMANN. (1989). Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 262-266.
- LEE, B., SUN, ANDERSSON, JORNVAL, MUTT, BOMAN. (1989). Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9159-9162.
- LEHRER, G. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 23-27.
- LEMAITRE, K.-M., MICHAUT, NICOLAS, MEISTER, GEORGEL, REICHHART, HOFFMANN. (1995). A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9465-9469.
- LEONOVA, K., ALESHINA. (2001). Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity. *J Leukoc Biol* **70**, 461-464.
- LEVASHINA, O., BULET, REICHHART, HETRU, HOFFMANN. (1995). Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur. J. Biochem.* **233**, 694-700.
- LI J, P. M., VOLK R. (2000). PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* **6**, 49-55.

- LUDTKE, H., HELLER, HARROUN, YANG, HUANG. (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochem.* **35**, 13723-13728.
- MARCHINI, G., AMONS, BERNINI, DALLAI. (1993). Purification and primary structure of ceratotoxin-a and ceratotoxin-b, 2 antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta, Diptera). *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **5**, 591-598.
- MARTÍNEZ, R., RODRÍGUEZ, RÍOS. (2000). Respuestas Inmunes Innata y Adaptativa. *MEDISAN* **4**, 64-74.
- MATSUZAKI, K. (1998). Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta.* **1376**, 391-400.
- MATZINGER, P. (2002). The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* **296**, 301-305.
- MEDZHITOV, P.-H., JANEWAY CA. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptative immunity. *Nature* **388**, 394-397.
- MOORE, B., BRASSEUR, TOMASSINI, TURNER, ECK, ZASLOFF. (1991). Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **266**, 19851-19857.
- MOR, N. (1994). Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *Eur. J. Biochem.* **219**, 145-154.
- NOS-BARBERA, P., MORILLA, UBACH, ANDREU, PATERSON. (1997). Effect of hybrid peptides of cecropin A and melittin in an experimental model of bacterial keratitis. *Cornea* **16**, 101-106.
- OKAMOTO, M., OHSHIMA. (1998). Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol* **39**, 57-63.

- PANYUTICH, P., KRAPIVIN. (1993). Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J Lab Clin Med* **122**, 202-7.
- PANYUTICH, S., BOUTZ, ZHAO, GANZ. (1997). Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted propeptidases. *Infect Immun* **65**, 978-985.
- PENNINCKX, E., TERRAS, THOMMA, DE SAMBLANX, BUCHALA, METRAUX, MANNERS, BROEKAERT. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309-2323.
- QU, H., YANG, CHO, TAN, LEHRER. (1997). Peptidase structure and activity against *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **65**, 636-639.
- QUAYLE, P., NUSSBAUM, WANG. (1998). Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* **152**, 1247-1258.
- REIMANN-PHILIPP, B., BATSCHAUER, SCHAFER, APEL. (1989). The effect of light on the biosynthesis of leaf-specific thionins in barley, *Hordeum vulgare*. *Eur J Biochem* **182**, 283-289.
- ROTT, P. (2001). Innate Immunity. In *Essential Immunology*, pp. 1-4. Blackwell Science, Milan.
- RUSSELL, D., TARVER, SCANLIN, BEVINS. (1996). Coordinate induction of two antibiotic genes in tracheal epithelial cells exposed to the inflammatory mediators lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* **64**, 1565-1568.
- SAMAKOVLIS, K., KIMBRELL, ENGSTROM, HULTMARK. (1991). The andropin gene and its product, a male specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **10**, 163-169.



- SCHITTEK, H., SAUER, BAUER, KALBACHER, STEVANOVIC, SCHIRLE, SCHROEDER, BLIN, MEIER, RASSNER, GARBE. (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology* **2**, 1133-37.
- SCHONWETTER, B. S., STOLZENBERG E.D., AND ZASLOFF M. (1995). Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* **267**, 1645-1648.
- SCHRÖDER, J.-M. (1997). Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet* **350**, 1750-1751.
- SCHRÖDER, J. (1999). Epithelial Peptide Antibiotics. *Biochemical Pharmacology* **57**, 121-134.
- SELSTED, H., GANZ, SCHILLING. (1985). Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* **76**, 1436-1439.
- SELSTED, O. (1995). Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends Cell Biol* **5**, 114-119.
- SELSTED, S., LEHRER. (1984). Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides from rabbit granulocytes. *Infect Immun* **45**, 150-154.
- SELSTED, T., MORRIS, MCGUIRE, NOVOTNY, SMITH, HENSCHEN, CULLOR. (1993). Purification, primary structures, and antibacterial activities of b-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* **268**, 6641-6648.
- SERGEY, C., KIM, BEKKER, PLESKACH, FILATOVA, ANIKIN, PLATONOV, PHILIPPE BULET. (2002). Antiviral and antitumor peptides from insects. *PNAS* **90**, 12628-12632.
- SERRA, B. (1994). El mastocito. *Medicina Cutánea IberoLatinoAmericana* **22**, 159-164.
- SHI, L., SARVETNICK. (2001). Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction. *Trends Immunol* **22**, 97-101.

- SIMMACO, M., BARRA, BOSSA. (1993). Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta*. *FEBS Lett.* **324**, 159-161.
- SOONG, G., ELLISON. (1997). Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. *Inflamm Res* **46**, 98-102.
- SORAVIA, M., ZASLOFF. (1998). Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. .  
*FEBS Lett* **228**, 337-340.
- STEINBERG, H., FUJII, KUNG, HO, CHENG, LOURY, FIDDLES. (1997). Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimic. Agents Chemother.* **41**, 1738-1742.
- STEINER, H., ENGSTROM, BENNICH, BOMAN. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246-248.
- STENGER, H., TEITELBAUM, DEWAN, NIAZI, FROELICH, GANZ, THOMA-USZYNSKI, MELIAN, BOGDAN. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**, 121-125.
- STOLZENBERG, A., ACKERMANN, WHITLOCK, ZASLOFF. (1997). Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 8686-8690.
- STORM, R., SWANSON. (1977). Polymixin and related peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 723-763.
- STUART, H. (1942.). Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline protein from unbleached wheat flour. *Cereal Chem* **19**, 288-300.
- SWARTZ, M. N. (1994). Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 2420-27.

- TANG, Y., OSAPAY, TRAN, MILLER, QUELETTE, SELSTED. (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated  $\alpha$ -defensins. *Science* **286**, 498-502.
- TARVER, C., DIAMOND, RUSSELL, ERDJUMENT-BROMAGE, TEMPST, COHEN, JONES, SWEENEY, WINES, HWANG, BEVINS. (1998). Enteric  $\beta$ -defensin: Molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* **66**, 1045-1056.
- TERRAS, S., THEVISSSEN, OSBORN, VANDERLEYDEN, CAMMUE, BROEKAERT. (1993a). Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiol* **103**, 1311-1319.
- TERRAS, T., VAN LEUVEN, OSBORN, VANDERLEYDEN, CAMMUE, BROEKAERT. (1993b). A new family of basic cysteine-rich antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett* **316**, 233-240.
- VILLAFUERTE., I. (1990). *Agresión por agentes biológicos y respuesta del hospedero*. Editorial Pueblo y Educación, La Habana.
- WHITE S.H., W. W. C., SELSTED ME. (1995). Structure, function and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **5**, 114-119.
- WHITE, W., SELSTED. (1995). Structure, function and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **5**, 114-119.
- WU, M., BENZ. (1999). Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmatic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 7235-42.

- YANG, C., CHERTOV. (2000). Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* **68**, 9-14.
- YARUS, R., COLE. (1996). Production of active bovine tracheal antimicrobial peptide in milk of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14118-21.
- ZANETTI, G., ROMEO. (1995). Cathelicidins: A novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* **374**, 1-5.
- ZASLOFF, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5449-5453.
- ZASLOFF, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
- ZHAO, H. (2003). Mode of action of antimicrobial peptides. Academic Dissertation thesis, University of Helsinki.
- ZHAO, L., LEE, LEHRER. (1997). cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela clava*. *FEBS Lett* **412**, 144-148.
- ZHAO, W., LEHRER. (1996). Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* **396**, 319-322.