



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Tema: Análisis bioinformático de péptidos con actividad antimicrobiana

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Acosta Bustos Daniela Estefanía

Tutor: PhD. Mario Daniel García Solís

Ambato - Ecuador

Marzo - 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Título y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 07 de febrero del 2022.

PhD. Mario Daniel García Solís

CC: 1103605471

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Daniela Estefanía Acosta Bustos manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación titulado, previo a la obtención del título de Ingeniería Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Daniela Estefanía Acosta Bustos

C.I. 180518991-5

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, mismo que ha sido de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

C.I. 180316027-2

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 171434885-9

Ambato, 09 de marzo del 2022.

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, demás apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Daniela Estefanía Acosta Bustos

C.I. 180518991-5

AUTORA

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado principalmente a Dios, por ser mi guía y una fuente inagotable de sabiduría e inspiración en el transcurso de mi vida, mediante el cual he adquirido la fuerza necesaria para alcanzar cada una las metas que me he propuesto.

A mis padres, en especial a mi querida madre Elena, quien ha sido una mujer que ha luchado día y noche para ayudarme a cumplir cada uno de mis sueños y anhelos. Sin su amor, trabajo y sacrificio realizado durante todos estos años, no hubiese podido llegar hasta aquí, ni convertirme en la mujer que ahora soy.

A mis hermanos: María José, Andrés, José Luis por ser mis compañeros de aventura y ser mi motivación más grande para salir adelante. Gracias por haber sido mi fortaleza en los momentos difíciles.

A mis entrañables amigos: Andrés Sánchez, Santiago Apolo, Ricardo Vásquez, Wilmer Tene, Joel Chiliquina, Mateo Aguaguña, Pablo Ilvis, Jeaneth Sisa, por todo este tiempo en el cual hemos compartido momentos inolvidables que han marcado mi vida universitaria. No solo fueron mis amigos, sino que se convirtieron en mi segunda familia.

Dedico de manera especial a Saúl Villacís, por haber sido mi apoyo en los momentos más difíciles de la vida, en los cuales estaba a punto de darme por vencida. Gracias por haber sido ese amigo y hermano incondicional, por haberme cuidado y extendido la mano siempre y sobre todo por hacerme ver todo el potencial que hay en mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato y particularmente a mi amada Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por haberme acogido en sus aulas y darme la oportunidad de formarme no solo como profesional, sino también como una persona con calidad humana.

De manera especial, quiero agradecer a mi tutor PhD. Mario Daniel García Solís por toda la paciencia, apoyo y dedicación puesto para el desarrollo de este proyecto, así como por toda la inspiración y pasión que ha demostrado en las aulas de clase, llegando así a convertirse en un modelo a seguir para muchos estudiantes.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PORTADA	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.2 Péptidos antimicrobianos	2
1.1.3 Fuentes de obtención de péptidos antimicrobianos	4
1.1.3.1 Péptidos antimicrobianos de vertebrados	4
1.1.3.2 Péptidos antimicrobianos de invertebrados	5
1.1.3.3 Péptidos antimicrobianos de plantas	6
1.1.3.4 Péptidos antimicrobianos de hongos	6
1.1.3.5 Péptidos antimicrobianos de bacterias	7
1.1.4 Clasificación y estructura de los péptidos antimicrobianos	8
1.1.4.1 Familia α	8
1.1.4.2 Familia β	9
1.1.4.3 Familia $\alpha+\beta$	9
1.1.4.4 Familia NI $\alpha\beta$	9
1.1.4.5 Grupo I	10
1.1.4.6 Grupo II	10
1.1.4.7 Grupo III	11
1.1.4.8 Grupo IV	11

1.1.5 Mecanismos de acción	11
1.1.5.1 Modelo de agregados	12
1.1.5.2 Modelo toroidal	12
1.1.5.3 Modelo de la duela de barril.....	12
1.1.5.4 Modelo de tapete	13
1.1.5.5 Mecanismo de no permeación de membrana	13
1.2 Objetivos	15
1.2.1 Objetivo General.....	15
1.2.2 Objetivos Específicos	15
CAPÍTULO II.....	16
METODOLOGÍA.....	16
2.1 Materiales y equipos	16
2.1.1 Materiales	16
2.1.2 Equipos.....	16
2.2 Métodos.....	16
2.2.1 Obtención de la secuencia y estructura tridimensional de péptidos con actividad antimicrobiana	16
2.2.2 Análisis de homología de secuencia.....	17
2.2.3 Análisis de homología estructural	17
2.2.4 Alineamiento múltiple de secuencias	18
2.2.5 Análisis filogenético.....	18
CAPÍTULO III.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1 Obtención de la secuencia y estructura de péptidos con actividad antimicrobiana.....	19
3.2 Análisis de homología de secuencia y estructural.....	20
3.2.1 Cecropinas	20
3.2.2 Magaininas	22
3.2.3 Bombininas.....	24
3.2.4 Dermaseptinas	26
3.2.5 Catelicidinas	27
3.2.6 Brevininas.....	29
3.2.7 Esculentinas.....	31
3.2.8 Ranatuerinas	32

3.2.9 Defensinas	34
3.2.10 Drosocinas	36
3.2.11 PR-39.....	38
3.2.12 Gaegurinas.....	40
3.3 Alineamiento múltiple de secuencias	41
3.3.1 Grupo I	41
3.3.2 Grupo II.....	42
3.3.3 Grupo III.....	43
3.3.4 Grupo IV	44
3.4 Análisis filogenético	45
3.4.1 Cecropinas.....	45
3.4.2 Magaininas	47
3.4.3 Dermaseptinas	48
3.4.4 Brevininas.....	49
3.4.5 Esculentinas.....	50
3.4.6 Ranalexinas	51
3.4.7 Defensinas	52
CAPÍTULO IV	53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
4.1 Conclusiones	53
4.2 Recomendaciones	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes sitios anatómicos que están involucrados en la producción y secreción de PAMs	5
Figura 2. PAMs agrupados en función de la torsión del esqueleto peptídico en solución	8
Figura 3. Ejemplos de estructuras secundarias de PAMs	10
Figura 4. Interacción inicial péptido-membrana.....	11
Figura 5. Mecanismo de acción de PAMs	14

Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de cecropinas	22
Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de magaininas	24
Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de bombininas	25
Figura 9. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de dermaseptinas	27
Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de catelicidinas	29
Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de brevininas	31
Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de esculentinas	32
Figura 13. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de ranalexinas	24
Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de defensinas	36
Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de drosocinas	38
Figura 16. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de PR-39	39
Figura 17. Alineamiento múltiple de secuencias y modelo tridimensional de gaegurinas	41
Figura 18. Alineamiento múltiple de secuencias y modelos tridimensionales sobrepuestos del Grupo I	42
Figura 19. Alineamiento múltiple de secuencias y modelos tridimensionales sobrepuestos del Grupo II	43
Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencias y modelos tridimensionales sobrepuestos del Grupo III	44
Figura 21. Alineamiento múltiple de secuencias y modelos tridimensionales sobrepuestos del Grupo IV	45
Figura 22. Árbol filogenético de cecropinas	46
Figura 23. Árbol filogenético de magaininas	47
Figura 24. Árbol filogenético de dermaseptinas	48
Figura 25. Árbol filogenético de brevininas	49
Figura 26. Árbol filogenético de esculentinas	50
Figura 27. Árbol filogenético de ranalexinas	51
Figura 28. Árbol filogenético de defensinas	52

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Clasificación de los péptidos antimicrobianos en función de su estructura	62
Anexo 2. Péptidos antimicrobianos estudiados: Código PDB y UniProt	67
Anexo 3. Alineamiento múltiple de secuencias de 126 diferentes péptidos antimicrobianos	67

RESUMEN

En el presente proyecto de investigación se estudió el potencial antibacteriano de diversas proteínas como respuesta al creciente desarrollo de resistencia de los microorganismos patógenos a los compuestos antimicrobianos convencionales. Para esto, se analizó 126 péptidos alojados en las bases de datos PDB y UniProt. Las proteínas analizadas pertenecen a diversas especies y se han clasificado en 12 grupos, tales como cecropinas, magaininas, bombininas, dermaseptinas, catelicidinas, brevininas, esculentinas, ranalexinas, defensinas, drosocinas, PR-39 y gaeugerinas. El alineamiento múltiple de secuencias mostró que los péptidos poseen regiones altamente conservadas, las cuales generan patrones de plegamiento responsables de su actividad. Al ordenar los 126 péptidos en 4 grupos de acuerdo a su estructura secundaria, se identificó una elevada conservación entre péptidos de diferentes clases y origen, lo cual explica las similitudes que presentan al interactuar con la bicapa fosfolipídica de los microorganismos. Comprobando que el mecanismo de acción más empleado es el de “duela de barril”, pues la anfipaticidad de estas moléculas permiten que el extremo hidrofóbico interactúe con el núcleo lipídico, mientras que el extremo hidrofílico se dirige hacia el interior, produciendo un poro acuoso. Finalmente, se construyó un árbol filogenético por el método de máxima verosimilitud para cada clase de péptidos antimicrobianos, concluyendo que las secuencias analizadas mantienen una misma línea evolutiva y mecanismo de acción. En síntesis, este estudio ofrece un punto de partida para la identificación de péptidos de interés mediante el uso de bases de datos abiertas, los cuales potencialmente poseen actividad antimicrobiana.

Palabras Clave: Bioinformática, péptidos antimicrobianos, actividad antimicrobiana, resistencia microbiana.

ABSTRACT

This project was made with the purpose of studying the great antimicrobial potential of different proteins like response to developing of resistance of pathogenic microorganisms to conventional antimicrobial compounds. To reach this goal, a total of 126 peptides was collected and analyzed from the PDB and UniProt. The analyzed proteins belong to various species and have been into 12 groups such as cecropins, magainins, bombinins, dermaseptins, cathelicidins, brevinins, esculentins, ranalexins, defensins, drosocins, PR-39 and gaeugerins. Multiple sequence alignment showed that peptides have highly conserved regions, which generate folding patterns responsible for their activity. When ordering the 126 antimicrobial peptides into 4 groups according to their secondary structure, a high conservation was identified between peptides of different classes and origin, this explains the similarities that these peptides present when interacting with the phospholipid bilayer of microorganisms, proving that the most used mechanisms of action is the “barrel stave” mode, the amphipathicity of these molecules allows the hydrophobic end to interact with the lipid core of the membrane, while the hydrophilic end is directed inwards, producing an aqueous pore. Finally, a phylogenetic tree was constructed by the maximum likelihood method for each class of antimicrobial peptides. From this analysis it was concluded that although the analyzed sequences belong to different species, these are related because they maintain the same evolutionary line and mechanism of action. In summary, this study offers a starting pint for the identification of peptides of interest through the use of open databases, which potentially antimicrobial activity.

Keywords: Bioinformatics, antimicrobial peptides, antimicrobial activity, antimicrobial resistance.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

Según **Villarruel, et al., (2004)**, la primera evidencia de un péptido con actividad microbicida se observó en plantas superiores, las cuales producían una molécula llamada tionina (una pequeña proteína de 45 a 48 aminoácidos) que inhibía el crecimiento y proliferación de hongos y bacterias. Posteriormente, varias familias de péptidos con actividad antimicrobiana fueron identificadas y caracterizadas, como por ejemplo las cecropinas y magaininas, que fueron aisladas e identificados en insectos y anfibios, respectivamente (**Tornirelli & Simonetta, 2013**).

Por otra parte, en 1939 fue descubierta la tirotricina que está compuesta por diversos polipéptidos cíclicos y lineales con actividad antimicrobiana. Su principal característica está ligada a la protección del huésped frente a infecciones producidas por neumococos (**Muñoz, 2017**). Poco después, en 1941, se logró identificar la tirocidina la cual tiene una alta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas. Ese mismo año, se logró aislar de *Triticuma estivum* la purotionina, un péptido antimicrobiano que tiene la capacidad de actuar contra hongos y bacterias patógenas (**González, et al., 2017**).

Sin embargo, no fue sino hasta la década de los 80 cuando se llevaron a cabo los primeros trabajos de investigación donde se inyectaron bacterias a pupas de un tipo de polilla del género *Cecropia*. Como resultado de este experimento, pocos días después se pudo observar que las especies inyectadas contaban con la presencia de un péptido catiónico formado por 37 aminoácidos que poseía una alta actividad antimicrobiana, especialmente contra bacterias Gram negativas (**Villarruel, et al., 2004**). Estas investigaciones permitieron que en el año 1956 se reporte el primer péptido antimicrobiano de origen animal aislado de células leucocitarias de conejos. Cabe destacar que hasta la actualidad se han descubierto alrededor de 5000 péptidos con actividad antimicrobiana de origen natural, tanto en células eucariotas de humanos, animales, plantas, hongos, insectos, así como en células procariotas de bacterias (**Olascoaga, et al., 2019**).

1.1.2 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) se definen como un mecanismo de defensa innato que actúa durante las etapas iniciales de un proceso infeccioso que es producido en las superficies epiteliales del anfitrión. De manera general, este mecanismo está presente en diferentes organismos como plantas, insectos, vertebrados e invertebrados, así como también en algunas bacterias Gram negativas, tales como *E. coli* (Oñate, et al., 2016).

El modo de acción de los PAMs se basa en la interacción del péptido con la célula microbiana ya sea a través de la permeabilización de su membrana, la interrupción de la síntesis de proteínas o de la replicación del material genético o interactuando con las funciones inmunomoduladores del huésped (Téllez & Castaño, 2010). Los PAMs presentan una actividad antimicrobiana con alta eficiencia debido a que son moléculas altamente selectivas y su acción es relativamente rápida. Además, diversas investigaciones han demostrado que cubren un amplio espectro de microorganismos (excluyendo aquellos que poseen resistencia contra los péptidos microbicidas), esto incluye bacterias Gram positivas, Gram Negativas, hongos y virus (Oñate, et al., 2016). Es preciso destacar que los PAMs no presentan únicamente actividad microbicida, sino que también presentan múltiples actividades inmunomoduladoras, lo cual permite la cicatrización de heridas, la aceleración de la angiogénesis y la modulación de la apoptosis. Estas respuestas inmunitarias están relacionadas con las células B y células T, que se activan tras una previa exposición a procesos infecciosos y el reconocimiento de los patógenos, proporcionando de esta manera una reacción inmunitaria rápida y efectiva, de tal manera que actúa como una primera línea de defensa que limita el crecimiento y proliferación de diversos microorganismos patógenos (Castrillón, et al., 2007).

Según Tsutsumi, et al., (2006), el mecanismo de acción microbicida de los PAMs se debe a que la mayoría de los péptidos antimicrobianos son moléculas catiónicas con regiones hidrofóbicas, lo que le permite que sea soluble en ambientes acuosos y membranas ricas en lípidos. Otra de las características es que son anfipáticos a pH fisiológico debido al gran contenido de arginina y lisina que tiene en su estructura. Esta característica permite que las cargas positivas de los péptidos antimicrobianos interactúen con la superficie de la membrana bacteriana, la cual posee una carga negativa. Las regiones hidrofóbicas interaccionan con los componentes hidrofóbicos de la bicapa lipídica, dando paso a un reordenamiento estructural que resulta en la traslocación de los

péptidos a través de la membrana y de la interacción con dianas intracelulares produciendo un efecto membranolítico **(Martínez, 2020)**.

Estas estructuras polipeptídicas se caracterizan por ser relativamente pequeñas, ya que están formadas por un conjunto de entre 12 y 60 aminoácidos. Por esta razón, los PAMs difieren de los antibióticos convencionales debido a que estas biomoléculas son codificadas por genes y se sintetizan a partir de un fragmento de ARNm que es leído por ribosomas con menos de 100 residuos de aminoácidos, mientras que los antibióticos provenientes de hongos y bacterias son producto de rutas metabólicas que incorporan aminoácidos exóticos **(Castrillón, et al., 2007)**.

Actualmente, existe una gran preocupación por el rápido incremento de pacientes que presentan infecciones causadas por microorganismos multirresistentes a las drogas actualmente disponibles. Sin embargo, pese a que se ha realizado avances en el diseño de nuevas drogas experimentales, algunas de ellas presentan una elevada toxicidad en animales. Por tal motivo, es imperativo identificar nuevas opciones terapéuticas que sean capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos multirresistentes y que presenten una buena tolerabilidad en el ser humano. Varios estudios han sugerido que los PAMs son moléculas prometedoras para el tratamiento de enfermedades infecciosas debido a que sus aplicaciones son ilimitadas. Por esta razón, los esfuerzos se han centrado en la identificación y purificación de PAMs provenientes de mamíferos, plantas e insectos con miras a emplearlos en situaciones donde los antibióticos de primera línea ya no son eficientes **(Olascoaga, et al., 2019)**. Únicamente en Estados Unidos, en el año 2012, se pudo observar un aumento en el 20% en la aprobación de péptidos con actividad antimicrobiana por parte de la FDA (Food and Drug Administration), lo cual es un indicador del creciente interés clínico que existe en el uso de los PAMs. Sin embargo, su salida al mercado tiene cierto grado de complejidad debido a que los posibles medicamentos deben tener una tolerabilidad similar o superior a la de fármacos ya existentes a nivel comercial. Además, deben tener una farmacocinética y farmacodinámica mejorada con una baja toxicidad y un alto nivel de seguridad **(Martínez, 2020)**.

1.1.3 Fuentes de obtención de péptidos antimicrobianos

1.1.3.1 Péptidos antimicrobianos de vertebrados

Los péptidos antimicrobianos, al ser quimiotácticos para monocitos y células T, tienen un papel muy importante en la transición de la inmunidad innata a inmunidad adaptativa de algunas especies de vertebrados, debido a que los PAMs provocan la desestabilización de membrana microbiana (**Rivillas, 2008**). Los PAMs presentes en humanos son probablemente los PAMs más estudiados, ya que tienen la capacidad de activar diversos mecanismos de respuesta del sistema inmunológico, tales como la fagocitosis o la liberación de prostaglandinas, aumentando de esta manera la cantidad de células inmunes en el sitio expuesto a una infección bacteriana y reparando las heridas rápidamente mediante la cicatrización. En este caso, generalmente existen dos grandes grupos de PAMs que son las defensinas y catelicidinas (**Olascoaga, et al., 2019**). Las defensinas y catelicidinas son péptidos producidos por diferentes tipos de células presentes en todo el cuerpo, tal como se observa en la **Figura 1**. Dentro de este conjunto de células, se pueden encontrar células epiteliales del tracto respiratorio y genitouterino, queratinocitos, neutrófilos, células de Paneth y células asesinas naturales (NK) presentes en glándulas endocrinas (**Castañeda, et al., 2009**). Por otra parte, varios estudios se han centrado en el análisis de los PAMs producidos por ranas debido a que, cuando estos animales presentan heridas en la piel, no desarrollan ningún tipo de infección pese a que habitaban en aguas estancadas. Esto llevó al aislamiento y purificación de varios péptidos provenientes de la piel de diferentes especies de ranas, dentro de los que se destacan las xenopinas, magaininas y bombininas. Además, se ha determinado que los gránulos presentes en los leucocitos de animales vertebrados generalmente tienen una elevada concentración de defensinas- α , la cual posee actividad antimicrobiana altamente eficiente contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como para diferentes hongos filamentosos, virus y levaduras como *Candida albicans* (**Montaño & Vargas, 2002**).

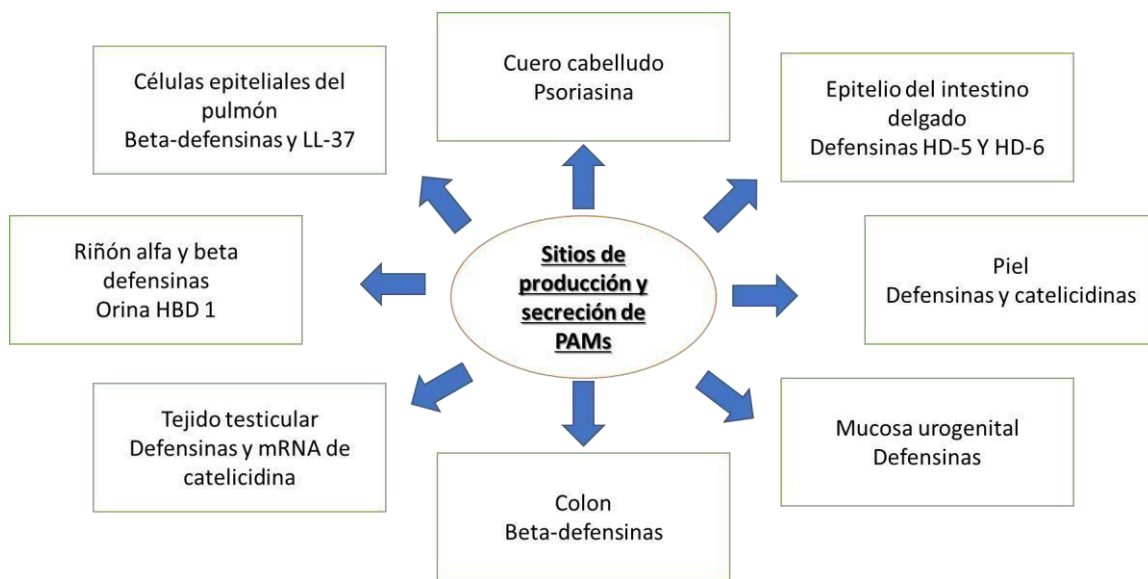


Figura 1. Diferentes sitios anatómicos que están involucrados en la producción y secreción de PAMs
Modificado de: (Castañeda, et al., 2009).

1.1.3.2 Péptidos antimicrobianos de invertebrados

La principal característica de los animales invertebrados es que, al carecer de una inmunidad adaptativa, estos poseen una inmunidad natural extremadamente alta que les permite protegerse de agentes patógenos gracias a su éxito evolutivo, permitiéndoles así el dominio de diversos hábitats debido a su alta capacidad de supervivencia (**Ratcliffe, 2007**). Esta capacidad de supervivencia está relacionada con los mecanismos de protección que poseen, por ejemplo, la producción de oxígeno activo, aglutinación celular, melanización, fagocitosis y la liberación de PAMs (**Montaño & Vargas, 2002**). Una de las especies más estudiadas dentro de esta clasificación es *Drosophila melanogaster*. Esta especie ha permitido el descubrimiento de diferentes mecanismos con los que actúa el sistema inmune en invertebrados. Un ejemplo de esto son los receptores “*Toll*”, los cuales están conservados únicamente en organismos superiores (**Acevedo, 2009**). Dentro de este grupo también se han estudiado diferentes especies de animales invertebrados marinos, tales como cangrejos de diferentes especies como *Tachypleus tridentatus*, *T. gigas* y *Carcinosepius rotundicauda*, además del camarón blanco *Penaeus vannamei*, el cual ha sido el punto de partida para la obtención de especies resistentes a enfermedades infecciosas por medio de la manipulación de los genes que codifican para péptidos antimicrobianos (**Bachère, et al., 2000**).

Los péptidos antimicrobianos más representativos obtenidos a partir de organismos invertebrados son las cecropinas, las taquiplesinas, la melitina y las defensinas. Sin embargo, una de las más importantes son las polifemusinas, las cuales son considerados péptidos con un gran potencial microbicida debido a que muestra una actividad con el HIV en humanos, además, al igual que los otros PAMs, este es capaz de inhibir el crecimiento y proliferación de bacterias Gram Positivas y Gram negativas (**Masuda, et al., 2002**). Es importante resaltar que el sitio de producción y secreción de PAMs en invertebrados se da en el cuerpo graso, que es el equivalente al hígado de los vertebrados (**Montaño & Vargas, 2002**).

1.1.3.3 Péptidos antimicrobianos de plantas

De manera general, las plantas siempre están expuestas a diferentes organismos patógenos tales como hongos y bacterias. Pese a ello, una importante característica de las plantas es que, al no poseer un sistema inmunitario, tienen un mecanismo de defensa mediante el cual producen sustancias con actividad antimicrobiana (**Rivillas, 2008**).

Según **Broekaert, et al., (2005)**, las plantas no pueden producir inmunoglobulinas, sin embargo, sus hojas, flores, semillas o tubérculos son capaces de producir sustancias que controlan el crecimiento de microorganismos patógenos, actuando principalmente como antifúngicos. Una de estas sustancias más representativas son las thioninas, las cuales son PAMs que actúan contra hongos y bacterias Gram positivas. Estas sustancias tienen la capacidad de degradar la pared celular, dañar el ribosoma, formar poros en la membrana, inhibir el ciclo celular e inhibir la síntesis de ADN (**Selitrennikoff, 2001**).

1.1.3.4 Péptidos antimicrobianos de hongos

Los péptidos antimicrobianos presentes en hongos se caracterizan porque son moléculas de cadenas cortas, generalmente compuestas de 20 aminoácidos, de los cuales una alta cantidad son α -dialquilados. Entre los más estudiados se encuentran la alameticina, antimamoebina, cefaibol, zervamicina, tricotoxina, crisopermina y los peptaiboles. Estos PAMs actúan formando canales iónicos en las membranas de lípidos, lo cual les otorga su actividad antibiótica (**Rivillas, 2008**).

Por otra parte, las proteínas “*killer*” son otro tipo de péptidos que producen los hongos y levaduras para inhibir el crecimiento y proliferación de células fúngicas. Estas proteínas se encargan de unir la toxina a un receptor específico presente en la superficie celular,

para posteriormente interferir en la síntesis de la pared celular, la síntesis de ADN, la síntesis de (1,3)- β -glucano o la detención del ciclo celular. Es importante mencionar que los hongos son resistentes a sus propias toxinas. (Selitrennikoff, 2001).

1.1.3.5 Péptidos antimicrobianos de bacterias

Al igual que en las plantas, la producción de péptidos antimicrobianos en bacterias se considera como un mecanismo de defensa debido a que, para asegurar su supervivencia, los microorganismos compiten entre sí por los nutrientes presentes en un medio. En ese sentido, los PAMs secretados por bacterias no proveen de una protección contra infecciones puesto que su función es contribuir a la conservación de las células bacterianas (Montaño & Vargas, 2002). Es importante señalar que los PAMs producidos por una gran cantidad de bacterias, tienen una actividad antimicrobiana extremadamente potente a comparación de los PAMs obtenidos de otras especies ya mencionas (Riley, 2008).

Por otra parte, debido a su alta actividad microbicida, los péptidos producidos por bacterias tienen un amplio espectro debido a que tienen actividad sobre bacterias de otros géneros e incluso sobre bacterias de la misma especie (Cotter, et al., 2005). Por ejemplo, las bacterias Gram positivas producen bacteriocinas que se caracterizan por ser moléculas catiónicas, permeables y anfifílicas. Las más destacadas de este grupo son la nicina, subtilina y epidermina, las cuales actúan contra las bacterias por medio de la formación de poros en la membrana, provocando la lisis celular (Ryan, et al., 2002).

Las bacterias Gram negativas por otro lado, producen dos tipos de PAMs que son las colicinas, generalmente producidas por *E. coli*, y las microcinas producidas por Enterobacterias. Estas últimas, al ser altamente modificadas presentan tres mecanismos de acción que son la inhibición de la replicación del ADN, la inhibición de enzimas metabólicas e interferencia de los procesos energéticos (Ryan, et al., 2002).

1.1.4 Clasificación y estructura de los péptidos antimicrobianos

De manera general, los péptidos antimicrobianos tienen diferentes clasificaciones dependiendo de la secuencia de aminoácidos, la composición de la estructura secundaria, la hidrofobicidad, la anfipaticidad y el tamaño. Una de las clasificaciones más comunes de los PAMs se basa en la agrupación en función de la estructura tridimensional que toma el péptido en solución. En la **Figura 2** se puede observar a los péptidos antimicrobianos agrupados en función de la torsión del esqueleto peptídico en solución, donde se puede identificar hélices α lineales unidas mediante bucles, además de láminas β antiparalelas y una combinación entre láminas β y hélices α (**Martínez, 2020**).

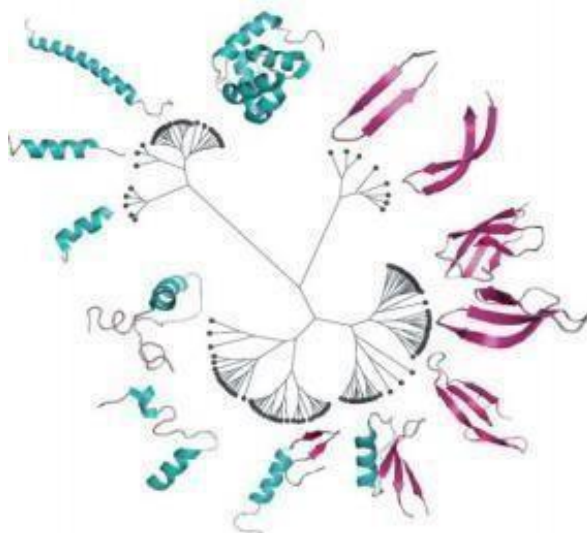


Figura 2. PAMs agrupados en función de la torsión del esqueleto peptídico en solución (**Martínez, 2020**).

Los péptidos antimicrobianos también pueden ser clasificados en cinco grupos de acuerdo a su estructura tridimensional y composición general.

1.1.4.1 Familia α

En la familia α se encuentran PAMs generalmente son producidos en cerdos, ranas y humanos, como por ejemplo las cecropinas, magaininas, y catelicidinas (**Anexo 1**) (**Guaní, 2011**). Entre sus características más relevantes se puede mencionar que son moléculas lineales con una estructura secundaria α -helicoidal conformada por un conjunto de entre 28 a 34 aminoácidos (**Figura 3a**). Además, los miembros de esta familia

son péptidos anfipáticos en disolventes apolares y tienen un gran contenido de residuos leucina, glicina y lisina y carecen de cisteínas (**Wang, et al., 2010**).

1.1.4.2 Familia β

Esta familia de péptidos se caracteriza por presentar una estructura secundaria de lámina β , también conocida como hoja plegada β (**Figura 3b**). A diferencia de la familia α , este conjunto de PAMs son ricos en cisteína, debido a que la mayoría de estas moléculas forman tres puentes disulfuro intramolecular (**Beltrán, 2014**).

Dentro de este grupo se encuentran las defensinas que son producidas por diferentes mamíferos. También se puede destacar las protegrinas presentes en los cerdos y la drosomicina aislada de la mosca (**Guaní, 2011**).

1.1.4.3 Familia $\alpha+\beta$

Este grupo de PAMs presentan una estructura secundaria con regiones α -helicoidales y hoja plegada β y, además, estas regiones pueden ser separadas o intercaladas (**Figura 3c**). Uno de los PAMs más representativos de este grupo es la β -defensina 2. De manera general, las defensinas β , son secretadas por células epiteliales y leucocitos de algunas especies de vertebrados, además, estas moléculas también pueden ser producidas por algunas plantas e insectos (**Beltrán, 2014**).

1.1.4.4 Familia ni $\alpha\beta$

Este grupo de PAMs es bastante sencillo debido a que no adoptan una estructura α -helicoidales ni hoja plegada β , sin embargo, son estructuras muy ricas en triptófano (**Figura 3d**). La indocidilina producida por bovinos es el péptido más estudiado de esta familia (**Anexo 1**). Cabe mencionar que su estructura presenta diferentes patrones en soluciones acuosas, sin embargo, estas se vuelven estables en presencia de fosfolípidos (**Beltrán, 2014**).

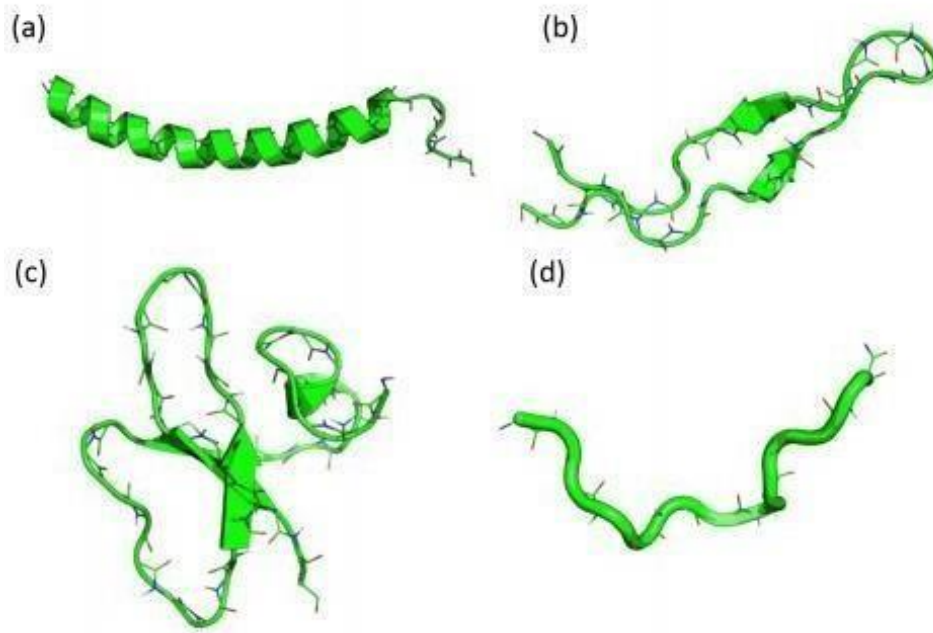


Figura 3. Ejemplos de estructuras secundarias de PAMs. (a) Familia α (ej. Cathelicidina). (b) Familia β (ej. Lactoferrina). (c) Familia $\alpha+\beta$ (ej. B-defensina2). (d) Familia ni $\alpha\beta$ (ej. Indolicidina) (Beltrán, 2014).

Por otra parte, los PAMs también pueden ser clasificados de acuerdo a su función y composición en aminoácidos, tal como se muestra a continuación:

1.1.4.5 Grupo I

Este grupo de péptidos antimicrobianos tiene en su estructura entre 5 y 70 aminoácidos, además, tienen un alto contenido de ácido glutámico y ácido aspártico. Estas moléculas tienen una alta actividad contra varios insectos, bacterias, hongos y plagas, y son producidos por ovinos, bovinos y humanos (Tornirelli & Simonetta, 2013).

1.1.4.6 Grupo II

Estos tienen una longitud de 40 aminoácidos y un alto contenido de lisina, arginina e histidina, que representa el 30-50% del total de la secuencia del péptido (Tornirelli & Simonetta, 2013). Estos PAMs generalmente son producidos por anfibios, insectos, bacterias y plantas y tienen una actividad microbicida contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Castañeda, et al., 2009).

1.1.4.7 Grupo III

Por su parte, este grupo está constituido por 44 péptidos catiónicos y tienen un alto contenido de prolina, arginina, prolina y fenilalanina, que representan el 49%, 33%, 57% y 19% de su composición, respectivamente (Castañeda, et al., 2009).

1.1.4.8 Grupo IV

Esta clasificación tiene la singularidad de que está formado por péptidos catiónicos y aniónicos que tienen un alto contenido de cisteína. Además, su estructura está conformada por 29-35 aminoácidos. Dentro de este grupo, se registra alrededor de 90 β -defensinas de humanos, 54 defensinas de artrópodos y 58 de plantas (Castañeda, et al., 2009).

1.1.5 Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción de los PAMs se orientan principalmente a intercalarse o formar interacciones con la membrana celular (Wang, et al., 2010). En primera instancia, los péptidos que se unen a la membrana forman interacciones electrostáticas entre la carga positiva del PAM y la carga negativa de la bicapa fosfolipídica. Esto provoca que exista una atracción entre el péptido y la membrana por oposición de cargas (Figura 4) (Beltrán, 2014).

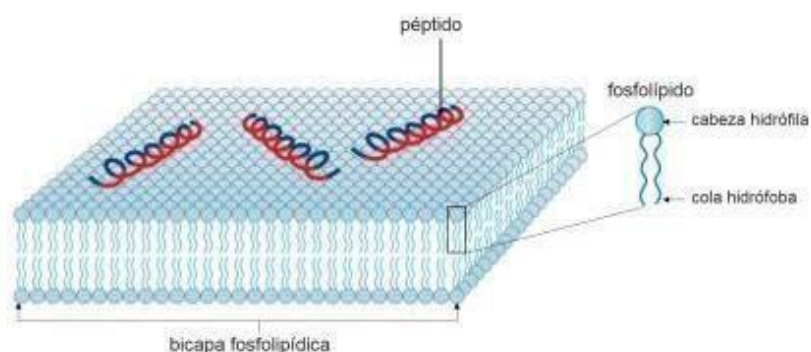


Figura 4. Interacción inicial péptido-membrana. Las cargas opuestas permiten la interacción. Las regiones hidrofílicas se muestran en rojo, mientras que las regiones hidrofóbicas se encuentran en azul (Beltrán, 2014).

Por otra parte, los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos orientados a la membrana se detallan a continuación:

1.1.5.1 Modelo de agregados

Este modelo se basa en el transporte de péptidos mediante la permeabilización de la membrana por medio de canales de diferentes tamaños (**Powers et al., 2005**). Este modelo propone que las estructuras α -helicoidales se unen a la membrana externa de la bicapa lipídica. Posteriormente se incrustan a través de la membrana y provocan la ruptura de la membrana debido al arrastre de los lípidos. Cabe resaltar que los péptidos, al no tener una orientación en particular, dan paso a la formación de un complejo supramolecular péptido-lípido que es el encargado de mediar el transporte de los PAMs a través de la bicapa fosfolipídica (**Figura 5a**) (**Matsuzaki, 2008**).

La actividad antimicrobiana de estos péptidos se debe a la permeabilidad que se genera en la membrana celular. La formación de agregados péptido-lípido genera interacciones con las cadenas lipídicas por medio de sus superficies hidrofóbicas e hidrofílicas. De esta manera el medio externo es capaz de interactuar con las cabezas de fosfolípidos, dando paso a la formación de canales acuosos que permiten el paso de iones y péptidos que actúan sobre blancos citoplasmáticos (**Rivillas, 2008**).

1.1.5.2 Modelo toroidal

En este modelo se puede observar cómo los péptidos se insertan a la bicapa lipídica perpendicularmente (**Figura 5b**). Aquí las regiones hidrofóbicas están relacionadas con el núcleo del lípido, mientras que las regiones hidrofílicas están asociadas con las cabezas de los fosfolípidos, lo que permite que la membrana se curve hacia el interior formando parte del poro acuoso (**Yeman & Yount, 2003**).

1.1.5.3 Modelo de la duela de barril

La principal característica de este modelo es la formación de un poro acuoso debido al agrupamiento de estructuras α -helicoidales anfipáticas, cuyas superficies hidrofóbicas interactúan con el núcleo lipídico de la membrana, mientras que las superficies hidrofílicas se dirigen hacia el interior, produciendo un poro acuoso (**Figura 5c**) (**Rivillas, 2008**).

Este mecanismo de acción comienza cuando los monómeros se unen a una estructura α -helicoidal, enlazándose a la membrana. Posteriormente, las hélices se insertan dentro del núcleo de la membrana, de tal forma que los nuevos monómeros recubren a los anteriores,

incrementando el tamaño del poro. Mediante este mecanismo es posible la inhibición y eliminación de bacterias únicamente con concentraciones micromolares (**Beltrán, 2014**).

Sin embargo, los péptidos que actúan mediante este mecanismo deben ser altamente hidrofóbicos. Además, con el objetivo de facilitar la penetración en el núcleo apolar de la bicapa lipídica, estos PAMs deben ser capaces de reconocerse entre sí cuando se encuentran en el estado de enlace con la membrana para que se pueda dar paso a la formación de poros transmembranales y deben ser de cadena corta para que sean capaces de atravesar la bicapa, por lo que este modelo es funcional para péptidos líticos no selectivos (**Rivillas, 2008**).

1.1.5.4 Modelo de tapete

A diferencia del modelo de barril, en el mecanismo de tapete los péptidos no se insertan en el núcleo, ni tienen que adoptar una forma específica para enlazarse a la membrana, sin embargo, estos deben tener un balance entre la hidrofobicidad y la carga neta positiva, debido a que se dan interacciones electrostáticas (**Rivillas, 2008**).

Mediante este mecanismo la región hidrofóbica se dirige hacia la membrana, mientras que la superficie hidrofílica se dirige hacia la solución o solvente con el objetivo de alcanzar una concentración umbral, para que de esta manera la membrana sea permeada (**Figura 5d**). Cabe destacar que, durante este proceso, para que los péptidos lleguen a la membrana deben atravesar los polisacáridos ácidos (LPS), mediante una absorción autopromovida, donde los péptidos interactúan con la superficie de los LPS provocando el desplazamiento de los cationes divalentes que neutralizan las cargas negativas de los polisacáridos ácidos, induciendo de esta manera al rompimiento de la membrana externa (**Shai, 2002**).

1.1.5.5 Mecanismo de no permeación de membrana

Los mecanismos mencionados anteriormente buscan interactuar con la membrana citoplasmática, a través de su permeabilización, sin embargo, existen otros métodos de no permeación de membrana, tales como la inhibición de la síntesis de proteínas de membranas, inhibición de la síntesis de ADN, rompimiento de la cadena de ADN, síntesis de proteínas de estrés, producción de peróxido de hidrógeno o la activación de mecanismos de autodestrucción celular, como por ejemplo apoptosis en células eucariotas o autólisis en células procariotas (**Figura 5e**) (**Rivillas, 2008**).

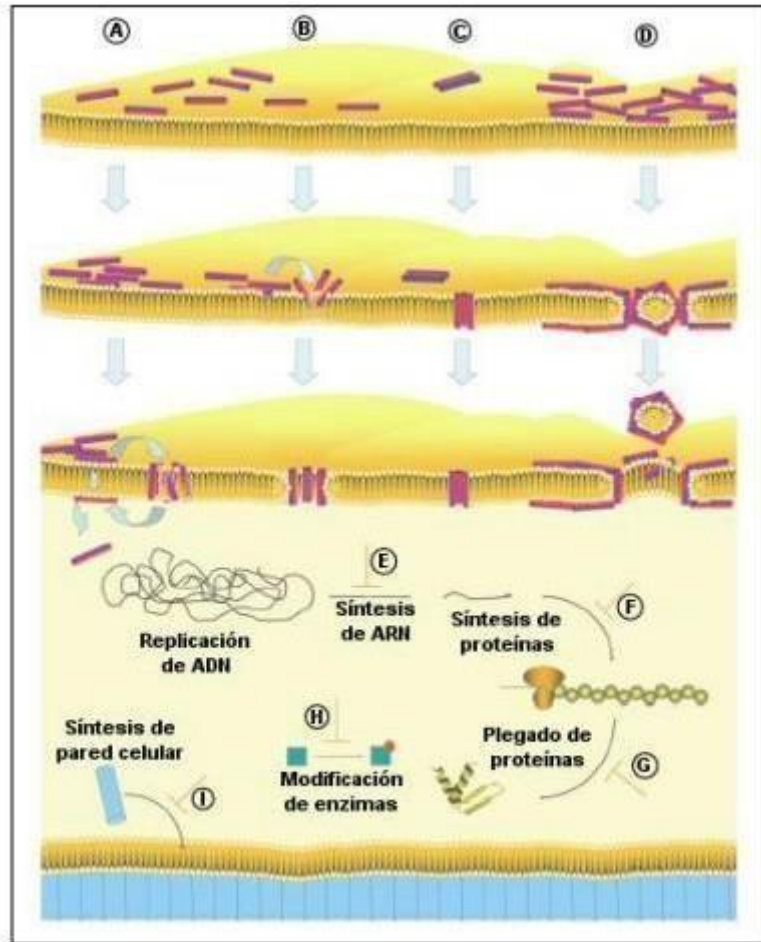


Figura 5. Mecanismo de acción de PAMs. (A) Modelo de agregados. (B) Modelo toroidal. (C) Modelo de duela de barril. (D) Modelo de tapete. (E) Mecanismos de no permeación membranar (Rivillas, 2008)

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

- Efectuar un análisis bioinformático de diferentes péptidos con actividad antimicrobiana a través del uso de diversas bases de datos y herramientas computacionales.

1.2.3 Objetivos Específicos

- Analizar la homología estructural de diferentes péptidos con actividad antimicrobiana.
- Determinar patrones estructurales responsables de ejercer actividad antimicrobiana.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre las diferentes proteínas identificadas.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales y equipos

2.1.1 Materiales

Bases de datos:

- Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB (RCSB PDB)
- UniProt

Programas digitales:

- T-Coffee
- BoxShade
- MEGA X
- PDBeFold
- Uniprot
- Protein Data Bank

2.1.2 Equipos:

- Computadora personal
- Módem de internet

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención de la secuencia y estructura tridimensional de péptidos con actividad antimicrobiana

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica donde se determinó los códigos identificadores de diferentes péptidos con actividad antimicrobiana. Para esto se empleó la base de datos RCSB PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, PDB), la cual forma

parte del Protein Data Bank. Luego de recopilar los códigos identificadores de los PAMs a analizarse, estos fueron ingresados en el motor de búsqueda de la plataforma y posteriormente se dio click en el ícono “Search”, el cual luego de unos segundos arrojó los resultados correspondientes a los diferentes organismos en los cuales se ha estudiado el péptido antimicrobiano de interés. Además, se pudo apreciar también su estructura en 3D, así como información acerca de los estudios realizados, literatura de revisión, entre otros. Asimismo, dentro de la plataforma se tuvo acceso a diferentes archivos que fueron descargados, de entre los cuales se pudo obtener la estructura tridimensional de los péptidos en formato PDB, así como la secuencia de aminoácidos en formato FASTA. Para este punto se dio click en la opción “Download Files” y a continuación se seleccionó el botón “PDB format” para obtener la estructura en 3D, mientras que para obtener la secuencia de aminoácidos se seleccionó “FAST sequence” (Espín, 2021).

2.2.2 Análisis de homología de secuencia

Para este análisis se obtuvo las secuencias de aminoácidos de los péptidos, las cuales fueron descargadas en formato FASTA de la base de datos UnitProt (Universal Protein). Luego, se procedió a realizar un alineamiento local básico que fue la base para establecer la similitud existente entre el PAM de interés y otros péptidos que fueron identificados con anterioridad, lo cual facilitó el análisis donde se seleccionó aquellos péptidos con un mayor porcentaje de identidad. Para este fin, se utilizó la herramienta BLAST, la cual es parte de la plataforma de UnitProt. Una vez seleccionada la herramienta, esta se abrió en una nueva pestaña donde se pegó una copia de la secuencia de aminoácidos y se seleccionó los siguientes parámetros establecidos por defecto: Target database, E- Threstold, Matrix, Filtering, Hits y Gapped. Posteriormente, se dio click en la opción “Run Blast” que dio inicio al alineamiento. Una vez terminado este proceso, apareció una lista con todas las coincidencias encontradas en la base de datos, donde se pudo observar información acerca del porcentaje de identidad, el cual indicó la homología de secuencias y un score del alineamiento (Sánchez, 2021).

2.2.3 Análisis de homología estructural

De acuerdo con la metodología descrita por Ramos, (2021), para el análisis de la homología estructural de los PAMs seleccionados para el estudio, se utilizó la plataforma PDBeFold, la cual permitió llevar a cabo una comparación de la identidad a partir de la estructura del péptido. Para esto se seleccionó la opción “Launch PDBeFold”, de la cual

se desplazó una ventana donde se ingresó el código identificador del PAM de interés y se seleccionó los parámetros tales como: Source, Lowest acceptable match (%), Match individual chains, Match connectivity, Best match only y Unique matches only, que se encontraban ya establecidos por defecto. Una vez finalizada la búsqueda, se obtuvo una lista que contenía todas las estructuras que poseían similitud estructural con la proteína objetivo, las cuales fueron ordenadas según el %SSEs.

2.2.4 Alineamiento múltiple de secuencias

Para llevar a cabo el alineamiento múltiple de secuencias, se utilizó la metodología empleada por **Espín, (2021)**. Para esto, primero se hizo una recopilación de las secuencias de los péptidos que se utilizaron para el estudio en formato FASTA. Las secuencias fueron copiadas en un solo archivo txt., que fue la base para realizar el alineamiento múltiple. Para esto se utilizó la herramienta bioinformática denominada “T-Coffee”. Una vez compiladas las secuencias en un archivo txt., se ingresó al servidor del programa y se dio click en la opción “Submit”, el cual generó un archivo descargable que tiene el formato “.fasta_aln”, donde se pudo ver el respectivo alineamiento. Para realizar una presentación mucho más estética se empleó la herramienta llamada “Boxshade”, a través de la cual se pudo agregar colores que permitieron realizar el análisis con más facilidad. Para realizar este proceso se cargó el archivo “.fasta_aln” anteriormente descargado. Finalmente, se obtuvo un nuevo documento en formato “RTF_new”, dentro del cual se pudo determinar los aminoácidos no conservados y los aminoácidos altamente conservados.

2.2.5 Análisis filogenético

Para llevar a cabo un análisis filogenético se empleó la metodología descrita por **Balseca, (2021)**, la cual implica el uso de la herramienta “MEGA X”, la cual permitió realizar el análisis de secuencias de las proteínas escogidas y ver filogenias. Para esto se seleccionó e ingresó las secuencias previamente alineadas y en formato FASTA. Una vez ingresada la secuencia de estudio, se seleccionó la opción “Align” y luego “Align by ClusalW”, una vez obtenida la matriz se guardó el archivo con extensión “.mas”. Luego se procedió a abrir el archivo nuevo y se seleccionó la opción “Analyze” y luego “Find Best DNA/Protein models”. Se desplegó un cuadro con los mejores modelos y se seleccionó el primero. Finalmente, se construyó el árbol presionando en el icono “Phylogeny”, luego “Construct Test Maximun Likelihood” y se desplegó el árbol construido.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención de la secuencia y estructura tridimensional de péptidos con actividad antimicrobiana

Para llevar a cabo el análisis bioinformático de péptidos con actividad antimicrobiana, se recopiló información de las bases de datos Protein Data Bank (PDB), y UnitProt. Del análisis efectuado en estas bases de datos, y a través de la herramienta PDBeFold, se logró identificar 126 péptidos procedentes de diferentes especies, de las cuales se obtuvieron sus secuencias de aminoácidos. Por otra parte, se realizó un análisis de estructura en función del porcentaje homología estructural (IDENTITY (%)), la comparación entre las secuencias probablemente homólogas (E-VALUE) y la cantidad de elementos de estructura coincidente (SCORE) (**ANEXO 2**). Para facilitar su análisis, los 126 péptidos antimicrobianos fueron clasificados en 12 grupos de acuerdo con la composición de aminoácidos, la secuencia y su tamaño, siendo las dermaseptinas, defensinas y cecropinas los grupos más representativos (**Tabla 1**).

Tabla 1. *Péptidos antimicrobianos identificados mediante homología estructural y de secuencia.*

Clasificación		Número de péptidos identificados
1	Cecropinas	20
2	Magaininas	5
3	Bombininas	3
4	Dermaseptinas	25
5	Catelicidinas	6
6	Brevininas	15
7	Esculentinas	9
8	Ranalexinas	10
9	Defensinas	23
10	Drosocinas	4
11	PR-39	2

12	Gaegurinas	4
TOTAL		126

Una vez obtenidas las secuencias de aminoácidos en formato FASTA de cada PAM, se realizó un alineamiento múltiple de carácter local de todas las secuencias con el fin de identificar elementos similares dentro de los 12 grupos de PAMs. Sin embargo, se observó que no existe homología de estructura primaria entre las 126 secuencias analizadas, lo que indica que su actividad antimicrobiana no se debe a la presencia de regiones conservadas en su secuencia (**ANEXO 3**). Esta observación correlaciona con el hecho de que cada grupo de PAM posee un mecanismo de acción diferente, el cual está estrechamente relacionado con su estructura primaria y secundaria. Por esta razón, se procedió a hacer análisis de identidad de secuencia y homología estructural separados para cada clasificación.

3.2 Análisis de homología de secuencia y estructural

3.2.1 Cecropinas

En primer lugar, se realizó el análisis de homología a partir de 20 secuencias obtenidas de diferentes tipos de cecropinas. Tras llevar a cabo un alineamiento de las cadenas de las proteínas, se puede observar que existen tres bloques conservados, los cuales están formados principalmente por aminoácidos como Glicina (G), Leucina (L), Lisina (K), Prolina (P), ácido Glutámico (E), Alanina (A) y Fenilalanina (F) (**Figura 6A**). Se conoce que estos aminoácidos cumplen con un papel fundamental dentro en la estructura de las cecropinas debido a que le otorgan la función de defensa contra organismos patógenos, tales como virus y en el caso de las cecropinas contra bacterias tanto Gram positivas como negativas (**Álvarez, 2020**).

Como se mencionó anteriormente, el análisis de los bloques conservados permite observar que a lo largo de la cadena del péptido existen tres regiones homologas en la mayoría de las secuencias. Pese a esto, no existe estudios que esclarezcan la forma en la cual el bloque 1 y 3 contribuyen con la función antimicrobiana del péptido. En cuanto al bloque 2, se puede observar que en la cecropina GK, A1, A2, BT2, BT1, CT2, CT1, AP, AQ, AG y AD se encuentra conservado el motivo GKKL, el cual, según estudios basados en la relación estructura-actividad, está relacionado con la capacidad antibacteriana de las cecropinas mediante un mecanismo bacteriolítico que permite la permeabilización de

liposomas a través de la formación de canales selectivos en la bicapa lipídica por medio de la interacción con los fosfolípidos de la membrana (**Boman et al., 2000; Díaz, 2000**). En relación al resto de cecropinas, se puede observar que no se conserva el motivo en su totalidad. Por ejemplo, en las cecropinas P1, P2, P2C, P3 y P4 se conserva únicamente el motivo KKL, en la cecropina X y A, el fragmento KK y en la cecropina 1, 2 y B2 no existe ese conjunto de aminoácidos. Se cree que la variación en la conservación del motivo GKKL se debe a evolución natural de la proteína en las diferentes especies, aspecto que ha sido aprovechado para la síntesis de análogos de las cecropinas. Además, este motivo ha sido objeto de introducción de sustituciones con el fin de establecer qué aminoácidos son importantes para la actividad microbicida (**Díaz, 2000**).

Por otra parte, según lo expuesto por **Villarruel et al., (2004)**, las cecropinas tienen una longitud aproximada de entre 35 y 39 aminoácidos. Sin embargo, en la **Figura 6A** se puede evidenciar que esta condición no se cumple en todos los péptidos analizados debido a que existen secuencias mucho más cortas, como CRP A (19 aa), CRP 1 (25 aa), CRP 2 (29 aa), CRP B2 (19 aa), CRP GK (31 aa) y CRP P1 (30 aa). Se estima que estas diferencias se deben a que las secuencias analizadas provenientes de especies con diferente raíz filogenética, como ranas de la familia *Xenopus* gusanos redondos de la familia *Ascaris* y varios insectos de clasificación inferior de la familia *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* y *Papilio*.

En cuanto al análisis estructural de las cecropinas, se tomó como modelo a la cecropina GK (CRP GK) ya que se conoce su estructura 3D (código PDB 2MMM) y además presenta los tres bloques que se encuentran conservados en la mayoría de cecropinas consideradas en este estudio. Para ilustrar y analizar la estructura tridimensional de CRP GK, se utilizó la herramienta "PyMol". En la **Figura 6B**, se puede observar que este péptido adopta una conformación de hélice α anfipática. Cabe mencionar que la principal característica de este péptido es que es catiónico debido a que su extremo carboxilo terminal se encuentra amidado. Además, las hélices forman ángulos de 70°-100° y tienen un peso molecular promedio de 4kD (**Huante, 2009**). Por su lado, al hablar de este PAM como una estructura anfipática se tiene que los residuos presentes en la región N-Terminal tienen una carga positiva debido a la disgregación del grupo amino. Por lo tanto, este extremo es hidrofílico, mientras que el extremo C-Terminal es hidrofóbico ya que adquiere una carga negativa debido a la disociación del grupo carboxilo. Como

consecuencia, la región N-terminal puede interactuar con la superficie de la membrana, dándole a la molécula una actividad antimicrobiana (Shin, et., 2000).

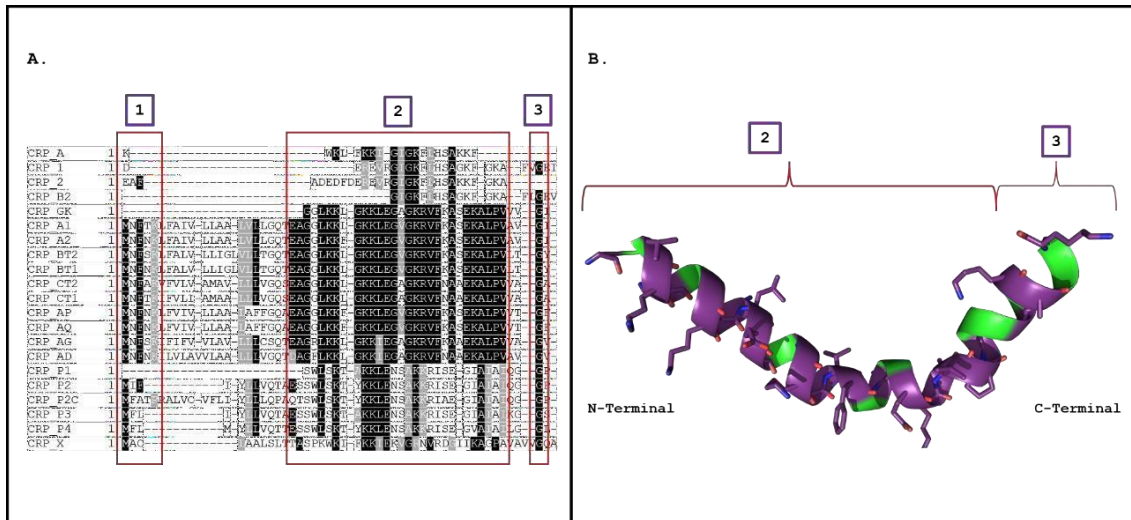


Figura 6. (A) Alineamiento múltiple de secuencias de cecropinas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Cecropina GK de *Aedes aegypti*. (Código PDB: 2MMM). En violeta se marca los residuos conservados, en verde los no conservados, en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.2.2 Magaininas

Para el estudio de la homología estructural de las magaininas, se logró identificar únicamente cinco secuencias en la base de datos de UniProt las cuales fueron determinadas a partir del análisis de secreciones producidas en la piel de ranas de la familia *Xenopus* (Lorenzón, 2015). Como resultado del alineamiento múltiple de secuencias, se observó la presencia de un bloque con un alto grado de conservación, el cual abarca prácticamente la longitud total de la secuencia (Figura 7A). Esto sugiere que las magaininas tienen un elevado grado de conservación entre especies. Por lo tanto, se podría inferir que, debido al bajo grado de evolución natural de estos PAMs, existe un gran potencial para aplicar metodologías de evolución dirigida mediante el análisis racional de su secuencia. En efecto, existen algunos estudios que reportan la síntesis de un gran número de análogos de magaininas con el fin de incrementar su actividad antimicrobiana (Lorenzón, 2015). Además, el alto grado de similitud de secuencias entre las magaininas también sugiere una elevada conservación de la estructura tridimensional y de su mecanismo de acción (Thompson, et al., 2000). Además, se puede observar que el bloque conservado es rico en aminoácidos como Glicina (G), Leucina (L), Lisina (K), Alanina (A), Serina (S), Histidina (H) y Fenilalanina (F).

Dentro de la diversidad de péptidos que han sido estudiados, las magaininas se caracterizan por ser uno de los primeros PAMs descubiertos. De manera particular, la magainina 2 ha sido uno de los PAMs más estudiados desde su descubrimiento y aislamiento de la piel de la rana africana *Xenopus laevis*. Debido a esto, ha sido posible conocer casi por completo la función que cumple cada uno de los aminoácidos que conforman su estructura primaria “GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS”. Estudios previos han determinado que la función de las magaininas está estrechamente relacionada con su función, lo cual explica su elevado grado de conservación (**Figura 7A**). Se conoce que las regiones conservadas permiten que el péptido forme poros toroidales en la membrana plasmática tanto de microorganismos como de células tumorales. Posteriormente, el PAM se integra en el citoplasma inhibiendo el metabolismo bacteriano, lo cual explica por qué tienen un espectro con una actividad antimicrobiana bastante amplia, no solo para bacterias, sino también para hongos y parásitos (**Tamba et al., 2010; Téllez & Castaño, 2010**).

Por otro lado, para el análisis de su estructura tridimensional se tomó como modelo a la estructura con código PDB 4MGP, correspondiente a la Magainina 2 encontrada en *Xenopus laevis*. En la **Figura 7B.**, se observa que estos péptidos poseen una estructura helicoidal anfipática y lineal, similar a la de las cecropinas, con una longitud de 23 aminoácidos y un peso molecular de 2466 g/mol. Es importante resaltar que las propiedades anfipáticas de las magaininas están relacionadas con los aminoácidos que forman su estructura, en este caso la fenilalanina y leucina que cumplen un rol fundamental cuando este tipo de péptidos interacciona con las membranas microbianas (**Tornirelli & Simonetta, 2013**). Sin embargo, como ya se explicó anteriormente, la anfipaticidad de las moléculas también está ligada al grupo amino y carboxilo de los extremos N-Terminal y C-Terminal.

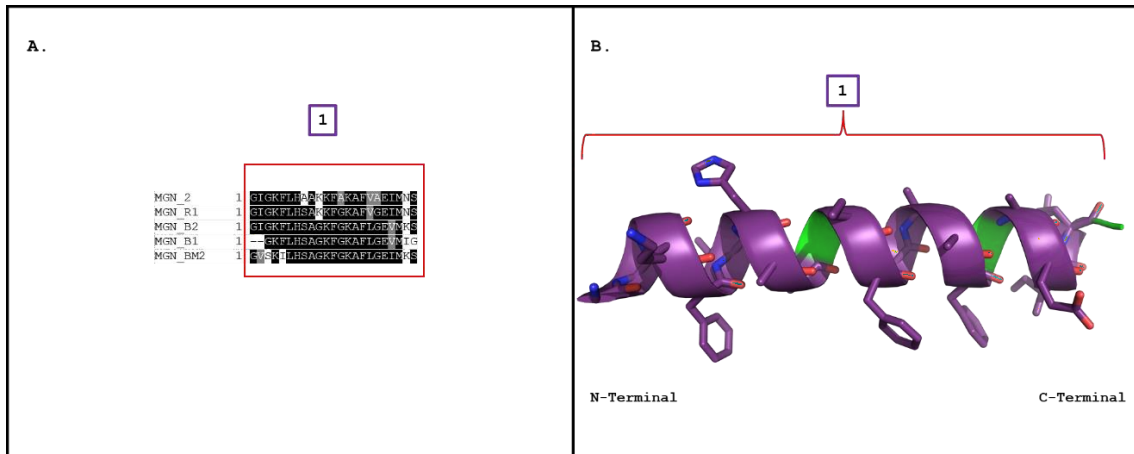


Figura 7. (A) Alineamiento de secuencias de magaininas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Magainina 2 de *Xenopus laevis*. (Código PDB: 4MGP). En violeta se marca los residuos conservados, en verde los no conservados, en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.2.3 Bombininas

El alineamiento múltiple de secuencias para las bombininas se realizó tomando en cuenta únicamente 3 secuencias obtenidas de anfibios de la especie *Bombinina variegata*. Al realizar el análisis de homología empleando la herramienta “BLAST” de UniProt, se observó que únicamente estas tres cadenas poseen un porcentaje de identidad de entre el 95 y 100%, mientras que el resto de las coincidencias no correspondieron a bombininas y mostraron porcentajes de identidad menores al 60%. Esto indica que pese a que existen algunos péptidos que comparten cierta identidad con las bombininas, estos no comparten la misma función y posiblemente no poseen actividad antimicrobiana. Posterior a esto, tras llevar a cabo un alineamiento local, se pudo observar que las bombininas presentan una elevada conservación de secuencia, la cual se extiende a todos los aminoácidos que componen la secuencia. Como se observa en la **Figura 8A**, las bombininas son ricas en Glicina (G), Leucina (L), Isoleucina (I), Lisina (K), Prolina (P), Valina (V) y Alanina (A), los cuales son residuos hidrofóbicos. Además, cerca del extremo C-terminal se observa la presencia dos Lisinas (K), las cuales presentan carga positiva. Por lo tanto, mantienen la estructura típica de los PAMs, con un elemento hidrofóbico y otro hidrofílico cargado positivamente que les permite interactuar con la membrana plasmática microbiana.

Como bien se sabe, las bombininas provienen de la piel de los anfibios por lo que han generado un gran interés biológico debido a que son péptidos bioactivos puesto que muestran actividades antimicrobianas importantes para el sistema inmunológico de estas especies (Zangger et al., 2008). Debido a esto, ha sido posible saber cómo interactúan

los aminoácidos que conforman estas estructuras, especialmente, de las bombininas H, siendo la bombinina H2 uno de los péptidos más estudiados. **Mangonayo et al., (2000)** describieron como este conjunto de moléculas interactuar con las membranas dianas, causando la muerte celular a través de varios mecanismos. Las bombininas causan la perturbación de la membrana, no solo permeabilizándola sino también alterando su curvatura. Además, modifican el gradiente electroquímico transmembrana, e inducen la formación de un poro de duela de barril, el cual es un poro cilíndrico que consiste en ensamblar monómeros en la periferia. Estas características han permitido hipotetizar que existe una baja posibilidad de desarrollo de resistencia bacteriana frente a las bombininas (**Sekiya et al., 2019**).

Por otra parte, en la **Figura 8B** se puede observar que la estructura tridimensional de las bombininas es similar a las ya descritas anteriormente. Sin embargo, la principal diferencia radica en que estos péptidos forman hélices α helicoidales, pero no son anfipáticas por lo que no son solubles en soluciones acuosas. Cabe recordar que la estructura helicoidal de un péptido es conocido por estar relacionado con su función antibiótica (**Mangonayo et al., 2000**). La bombinina H2 (**Figura 8B**) (código PDB 2AP7) se caracteriza porque el 25% de su composición total está formada por residuos de glicina, lo que permite que estos PAMs puedan existir no solo en forma de alfa hélice, sino también en diferentes conformaciones estructurales. Por lo tanto, la estructura final del péptido también está relacionada con factores como la composición y estado físico de la bicapa de fosfolípidos, debido a la flexibilidad estructural conferida por las glicinas (**Zangger et al., 2008**).

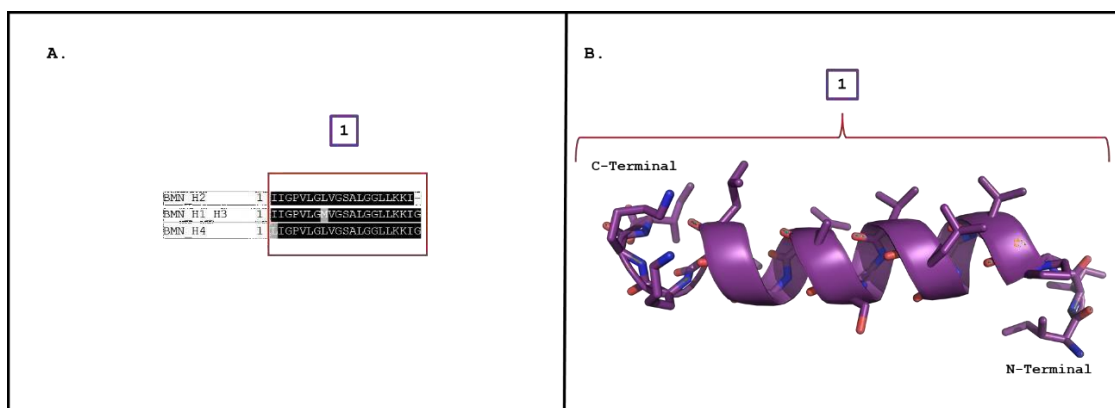


Figura 8. (A) Alineamiento de secuencias de bombininas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Bombinina H2 de *Bombina variegata*. (Código PDB: 2AP7). En violeta se marca los residuos conservados, en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.2.4 Dermaseptinas

Para el análisis de las dermaseptinas se recopilaron y estudiaron 25 secuencias distintas. Tras llevar a cabo un alineamiento múltiple de las secuencias se pudo observar la presencia de tres bloques conservados, los cuales son ricos en Glicina (G), Leucina (L), Lisina (K), Valina (V), Ácido Glutámico (E), Alanina (A), Serina (S) y Triptófano (W), tal como se observa en la **Figura 9A**. De este conjunto de residuos, la lisina es la más importante dentro de las dermaseptinas debido a que le otorgan características anfipáticas a la molécula, gracias a las interacciones electrostáticas con las cabezas polares negativas de los fosfolípidos de la membrana. Esto permite que la parte anfipática interactúe con el interior hidrofóbico de la membrana adoptando una posición transmembrana. Como resultado, se genera una alteración del gradiente de iones provocando la inserción del péptido y posteriormente la disrupción de la membrana bacteriana. Pese a esto, las dermaseptinas tienen una baja actividad antimicrobiana, pero una potente actividad hemolítica (**Sánchez, 2016**). Cabe mencionar que además estos sitios dan una idea acerca de donde se encuentran los receptores proteicos. En cuanto al bloque 1, estudios realizados por **Rudi et al., 2010**, acerca de la estructura secundaria y selectividad de las dermaseptinas demuestra que la región comprendida entre los residuos de triptófano (W) y lisina (K), dotan al péptido de su característica hidrofóbica.

Por otra parte, se puede observar que no existe un elevado porcentaje de homología de secuencia entre las diferentes dermaseptinas por lo que se sugiere una posible conservación cruzada y relación filogenética entre las dermaseptinas de diferentes especies como *Homo sapiens*, *Gorilla*, *Pan paniscus* y diversas clases de *Phyllomedusa*, (**Thompson et al., 2000**). En relación a la longitud de estos péptidos se sabe que, según **Villarruel et al., (2004)**, estos están formados principalmente por 34 residuos de aminoácidos. Sin embargo, se puede observar que existen secuencias mucho más cortas, tales como DRP 4, DRP DA2, DRP DI2, DRP K, DRP J7, DRP DA4, DRP H6, DRP H9, DRP 1 y DRP S4, las cuales principalmente no contienen el motivo GGLGKLGKDAVEDLESV, que es extremadamente conservado en las dermaseptinas DRM S, DRM G, DRM PA, DRM PT, DRM CA, DRM, DRM ML, DRM C, DRM P, DRM CS y DRM MN.

De manera general, para el análisis estructural se tomó como punto de partida a la Dermaseptina K (código PDB 2K9B), encontrada en *Phyllomedusa distincta*. En la **Figura 9B.**, se observa que estos péptidos son estructuras lineales similares a las cecropinas, magaininas, y bombininas, cuyos aminoácidos se encuentran acoplados en forma de una hélice α anfipática. Además, se puede observar que en este modelo tridimensional existe un asa en el extremo N-Terminal, el cual es únicamente una extensión de la proteína y está integrado a por uno o más residuos de triptófano y/o prolina (**González, et al., 2017**). Por su parte, análisis espectroscópicos y computacionales han demostrado que la actividad antimicrobiana de las dermaseptinas se centra en la región N-Terminal, ya que juegan un papel importante en la interacción con la membrana peptídica (**Rudi et al., 2010**).

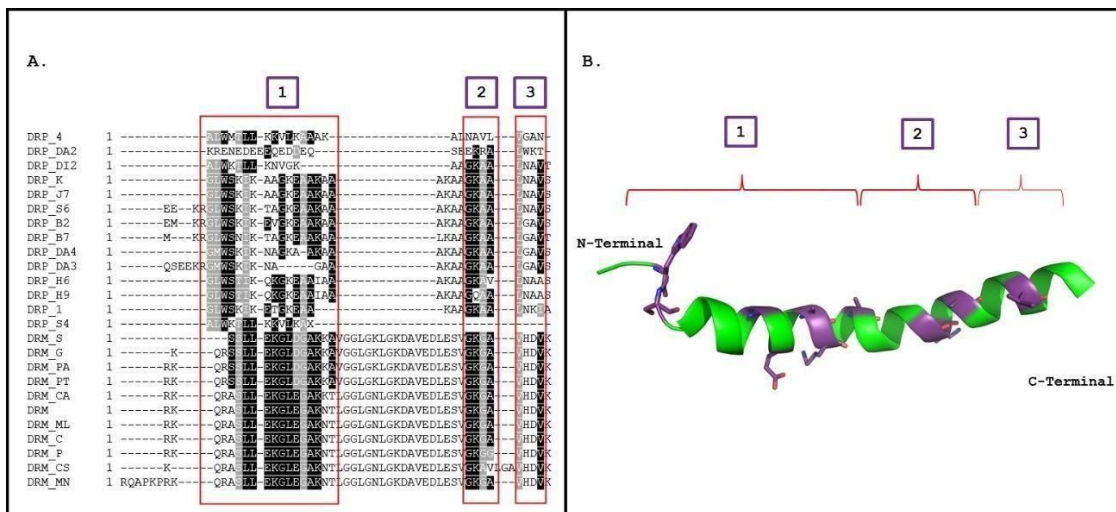


Figura 9. (A) Alineamiento de secuencias de dermaseptinas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Dermaseptina K de *Phyllomedusa distincta*. (Código PDB: 2K9B). En violeta se marca los residuos conservados, en verde los no conservados, en azules nitrógenos y en rojo los oxígenos.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.2.5 Catelicidinas

El análisis de homología de las catelicidinas se llevó a cabo a partir de 6 secuencias encontradas en especies similares de mamíferos como *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bison*, *Ovis aries*, *Capra hircus* y *Lipotes vexillifer*. Una vez realizado el alineamiento múltiple de las cadenas de las proteínas, se puede observar que existen dos bloques conservados, los cuales están formados principalmente por aminoácidos como Arginina (R), Prolina (P), además de Leucina (L), Valina (V), Ácido aspártico (D), ácido Glutámico (E), Asparagina (N), Glutamina (Q) y Serina (S), tal como se observa en la **Figura 10A**. Esto correlaciona con los resultados obtenidos por **Villarruel, et al., (2004)**, quienes

determinaron que las catelicidinas son péptidos catiónicos de hasta 43 aminoácidos y un peso de 18kDa ricos en prolina y arginina. El contenido de prolina y arginina con respecto a la composición total de la secuencia es de 49% y 29% respectivamente. El 22% restante está conformado por el resto aminoácidos enunciados anteriormente. En este caso, la prolina es la molécula más importante de la secuencia debido a que cumple un papel primordial dentro de los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos, puestoa que se une a los ribosomas de los microbios, evitando de esta manera la traducción de proteínas (**Hanson, et al., 2016**). Asimismo, estudios realizados por **Niidome et al., (2000)** acerca de la estructura y propiedades en bacterenecinas demuestran que las regiones ricas en prolina y arginina son las encargadas de darle a la molécula su actividad antimicrobiana y participar en el mantenimiento de la conformación del péptido. De manera específica, el papel de acción antibacteriana se da en las regiones repetidas donde está presente el motivo RPPX y PRPX, siendo X un residuo hidrofóbico. Al comparar estas características con los resultados presentados en la **Figura 10A.**, se puede observar que en el bloque 1 está presente el motivo RPP en la posición 30, 31 y 32 de la secuencia, mientras que en el bloque 2 el motivo PRP se ubica en la posición 51, 52 y 53, respectivamente, Sin embargo, esta región también se encuentra repetida en varias zonas del bloque 1. En cuanto a su mecanismo de acción, al ser péptidos catiónicos ricos en arginina y prolina, primero interactúan con la superficie cargadas negativamente de las bacterias, de tal manera que se produce una interacción con la membrana plasmática lo que conlleva a una ruptura de la estructura de la membrana externa y la disipación del potencial transmembrana y la muerte celular (**Wu & Hancoks, 2000**). Cabe resaltar que estos péptidos antimicrobianos tienen actividad exclusivamente en bacterias Gram negativas.

Por otra parte, para el análisis estructural de estos PAMs, se tomó como ejemplo a la catelicidina 3, ya que es el único péptido de este grupo del cual se tiene un registro de la estructura tridimensional disponible Protein Data Bank, bajo el código PDB 4JWC. En la **Figura 10B**, se observa la representación tridimensional de la catelicidina 3, donde los aminoácidos no forman hélices α o hélices β , sino que adquieren una conformación lineal, debido a que la prolina inhibe estas estructuras. Generalmente, estas moléculas tienen una longitud de hasta 24 residuos y se caracterizan por ser catiónicas y anfipáticas. La anfipaticidad de la estructura le permite a las catelicidinas la penetración en las membranas plasmáticas bacterianas y provoca una desestabilización de los lípidos,

mientras que la carga positiva de la molécula, contribuye a la actividad antimicrobiana a través de la interacción electrostática con las membranas bacterianas cargadas negativamente (Holani et al., 2016).

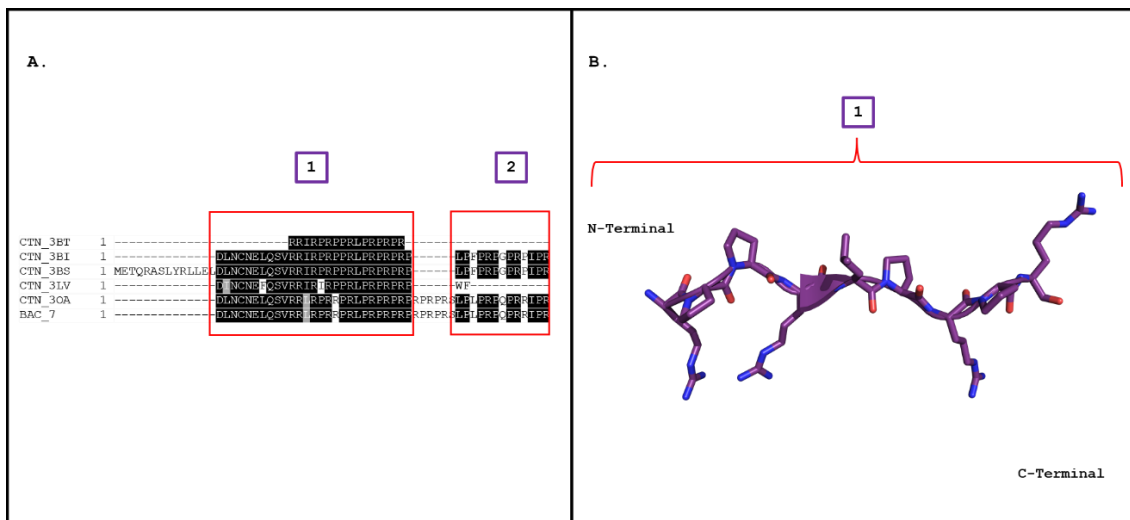


Figura 10. (A) Alineamiento de secuencias de catelicidinas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Catelicidina 3 de *Bos taurus*. (Código PDB: 4JWC). En violeta se marca los residuos conservados, en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.2.6 Brevininas

Para el estudio de la homología de las brevininas se recopilaron 15 secuencias. Las brevininas están presentes en las secreciones producidas por la piel de ranas europeas y japonesas de diferentes familias, así como en su sistema digestivo. Como resultado del alineamiento múltiple de secuencias de este grupo de péptidos antimicrobianos, se pudo identificar la presencia de cuatro bloques con una alta conservación de residuos (Figura 11A). Esto principalmente se debe a que las secuencias analizadas a especies similares, y correlaciona con resultados publicados para esta clasificación (Thompson, et al., 2000). Por otra parte, se puede observar que estos bloques están formados por aminoácidos como Glicina (G), Leucina (L), Isoleucina (I), Treonina (T), Asparagina (A), Serina (S), Valina (V), Lisina (K), Ácido glutámico (E), Ácido aspártico (D) y Fenilalanina (F), los cuales hacen de las brevininas antibióticos potentes. Es preciso mencionar que los residuos leucina y fenilalanina presentes en la estructura dotan al péptido de propiedades anfipáticas debido a su interacción con la membrana bacteriana. Además, se conoce que las brevininas intervienen en la síntesis de proteínas (Tornirelli & Simonetta, 2013).

Según **Savelyeva et al., (2014)**, las brevininas son uno de los péptidos antibacterianos más ubicuos, por esta razón es que este grupo de PAMs es considerado como una “superfamilia”. Las primeras brevininas se estudiaron en 1992, las cuales fueron aisladas de la secreción de la piel de la rana brevípoda porsa, donde se demostró que tenían una potencial actividad microbica. Estos resultados motivaron la realización de otras investigaciones acerca de la relación estructural y funcional, así como de sus propiedades antimicrobianas. Varios de estos estudios se han centrado en el motivo FLPLLA, donde se ha demostrado que esta sección de la secuencia le otorga una actividad antibacteriana y hemolítica al péptido. Al analizar el alineamiento múltiple de secuencias, se puede observar que este fragmento se encuentra en el bloque 4 (**Figura 11A**). Interesantemente, se puede ver que, de manera general, el segundo residuo de leucina al extremo N-terminal no se encuentra altamente conservado y cambia por metionina, valina o isoleucina. Se han sintetizado péptidos análogos en los que el fragmento FLPLLA se ha transpuesto a una ubicación central, dando como resultado una reducción considerable en la actividad hemolítica. Cabe resaltar que, aún no ha sido posible describir de manera acertada el mecanismo de acción de estas estructuras, pero se sugiere que la unión y la mejora de permeabilidad de la membrana lipídica desempeñan un papel fundamental en sus funciones (**Kwon et al., 2000; Savelyeva et al., 2014**).

Por otro lado, para el análisis estructural se tomó como modelo a Brevinina 1BYa (código PDB 6R96.) encontrada en las secreciones de la piel de *Rana boylii*. En la **Figura 11B.**, se observa que generalmente estos péptidos están conformados por 24 residuos de aminoácidos que se ensamblan en forma de α hélice anfipática, siendo la región hidrófoba la N- Terminal, mientras que la C-Terminal está delimitada por un puente intra disulfuro que es una característica estructural común de los péptidos antibacterianos de este tipo de especies de ranas, ya que contribuye a la actividad microbica y hemolítica de esta estructura. Además, también es posible visualizar una región de bisagra en el centro y dos colas largas ubicadas en los extremos, los cuales son únicamente una extensión de la proteína y son indispensables para mantener la conformación de las estructuras, sin afectar la actividad antimicrobiana del PAM.

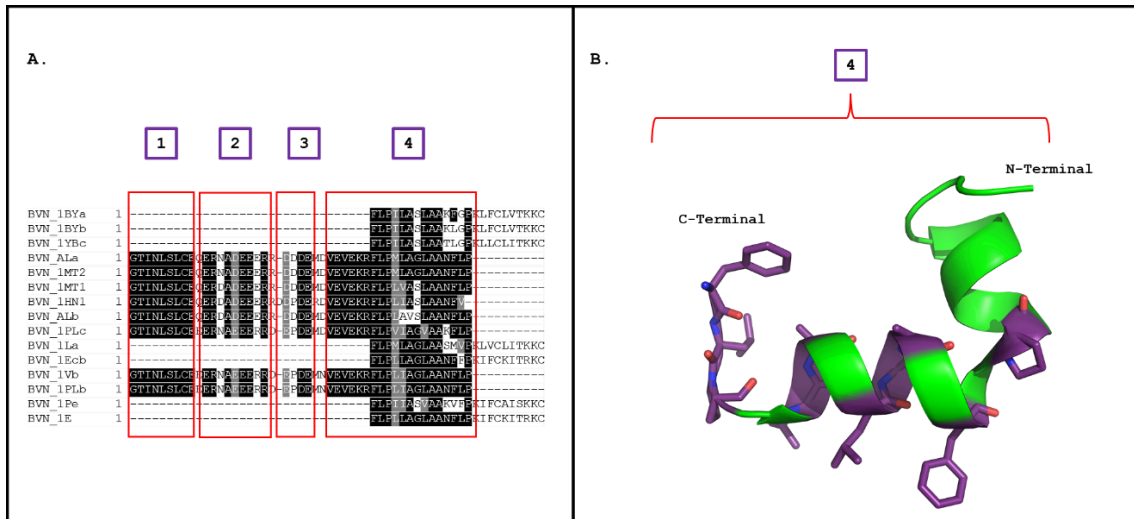


Figura 11. (A) Alineamiento de secuencias de brevininas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Brevinina 1BYa de *Rana Boyleii*. (Código PDB: 6R96). En violeta se marca los residuos conservados, en verde los no conservados, en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.2.7 Esculentinas

El estudio de homología de las esculentinas se llevó a cabo a partir de 9 secuencias aisladas de la piel de diferentes anfibios, tras llevar a cabo el alineamiento múltiple de secuencias se observa un único bloque donde existe un alto porcentaje de conservación (**Figura 12A**). Se estima que el alto grado de conservación se debe a que estas secuencias fueron obtenidas de especies similares de anfibios y que su estructura tridimensional y actividad es virtualmente la misma (**Thompson, et al., 2000**). Por otra parte, se puede observar que este bloque está formado por residuos de como Glicina (G), Leucina (L), Isoleucina (I), Treonina (T), Asparagina (A), Serina (S), Valina (V), Lisina (K), Metionina (M), Ácido glutámico (E), Ácido aspártico (D) y Fenilalanina (F), los cuales les otorgan características antimicrobianas a estos péptidos, especialmente contra *E. coli*,

S. aureus y *P. aeruginosa*. Por otra parte, estudios realizados por **Casciari et al., 2017**, acerca de las propiedades del péptido antimicrobiano esculentina, demostró que la región “GIFSKLAGKKIKNLLISGLK” está relacionada con la potente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y una actividad ligeramente más débil contra Gram positivas, debido a que se produce una interacción entre el péptido, el cual está cargado positivamente y los componentes de la superficie de la membrana celular que tienen una carga negativa, desestabilizando la pared microbiana y dando paso a la formación de poros. Sin embargo, cabe mencionar que la interacción del PAM con la membrana también está dado por otros parámetros fisicoquímicos tales como la longitud, hidrofobicidad, anfipaticidad y helicidad del péptido.

Por otra parte, para llevar a cabo el análisis estructural se tomó como modelo a Esculentina 1 (código PDB 6N6M.) encontrada en las secreciones de la piel de la rana verde centro europea *Pelophylax lessonae*. En la **Figura 12B.**, se observa que generalmente estos péptidos tienen una extensión de hasta 46 aminoácidos que se distribuyen formando una α hélice anfipática y en su extremo C-Terminal posee una cola en forma de asa compuesta por aproximadamente 7 aminoácidos. Según **Mangoni et al., 2003**, se ha demostrado que las esculentinas adoptan una estructura α helicoidal en las vesículas lipídicas, las cuales imitan el carácter aniónico de las membranas microbianas, eliminando en un corto periodo de tiempo debido a la fuga del material citosólico debido a la formación de poros en la membrana.

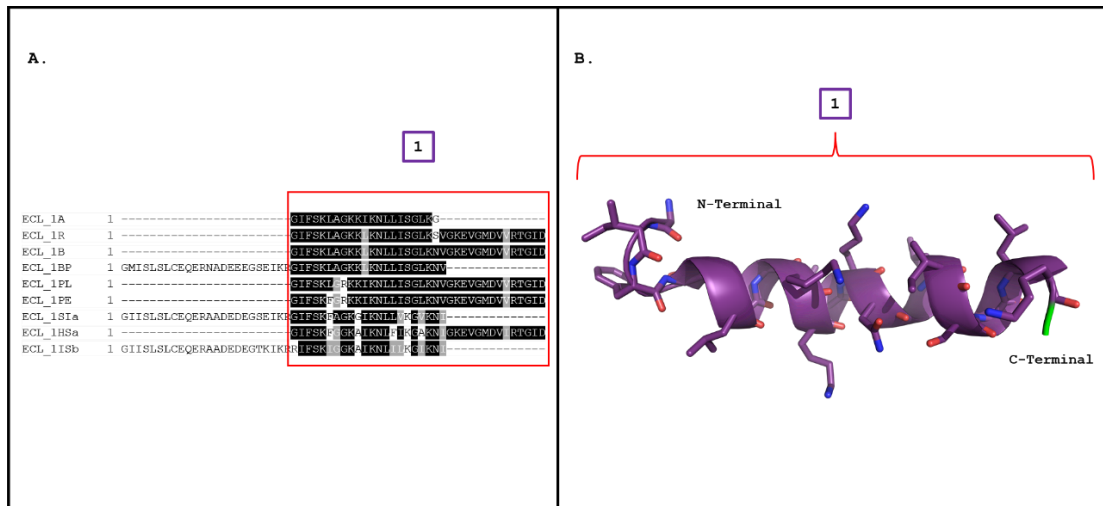


Figura 12. (A) Alineamiento de secuencias de esculentinas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Esculentina 1a de *Pelophylax lessonae*. (Código PDB: 2N6M). En violeta se marca los residuos conservados, en verde los no conservados, en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.
Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.2.8 Ranatuerinas

Para el análisis de homología de este grupo de PAMs, se estudiaron 10 tipos de ranatuerinas. Tras llevar a cabo un alineamiento múltiple de las secuencias se pudo observar dos bloques conservados, los cuales son ricos en Glicina (G), Cisteína (C), Leucina (L), Lisina (K), Valina (V), Ácido Glutámico (E), Alanina (A), Treonina (T) e Isoleucina (I), tal como se observa en la **Figura 13A**. Sin embargo, la lisina es uno de los residuos principales que intervienen en el mecanismo de acción de las ranatuerinas, mediante la destrucción del gradiente iónico a través de la formación de canales iónicos en las membranas celulares, interrumpiendo de esta manera la función normal de la membrana (**Goraya, et al., 2000**). Por otra parte, el análisis del motivo “CKITGC” de

las ranatuerinas demuestra que este fragmento le otorga a la molécula el mecanismo inhibitor, mediante el cual se forman poros dentro de las membranas microbianas, alterando las funciones metabólicas esenciales a través de la lisis de células bacterianas. No obstante, se cree que no existe un mecanismo único por el cual estos PAMs producen la muerte de las células bacterianas, tanto Gram positivas como Gram negativos (**Subasinghage et al., 2008**).

En cuanto al análisis estructural de las ranatuerinas, estos péptidos comprenden entre 27 y 35 residuos de aminoácidos de longitud y se caracterizan porque poseen una estructura tridimensional en forma de hélice alfa comprendida por dominios con puentes disulfuro con seis residuos de aminoácidos cerca de la región C-Terminal del péptido, tal como se observa en la **Figura 13B**. Según **Subasinghage et al., 2008**, estos péptidos adoptan una estructura alfa helicoidal debido a que esto permite recubrir la membrana celular como una alfombra, con la cara hidrofóbica orientada hacia los componentes lipídicos y los residuos polares hacia las cabezas de los fosfolípidos. De esta forma, a medida que su concentración aumenta y se acerca al valor de concentración mínima inhibitoria, las ranatuerinas interrumpen la curvatura de la bicapa lipídica, lo que conduce a la permeabilización de la membrana y finalmente a su desintegración. Este mecanismo se ve facilitado por la formación de poros transmembrana transitorios que permiten el paso de moléculas de bajo peso molecular, generando un desequilibrio osmótico. Cabe mencionar que la actividad antibacteriana de este PAM también está determinada por una interacción entre la hidrofobicidad, anfipaticidad y alfa helicidad (**Shai, 2002**).

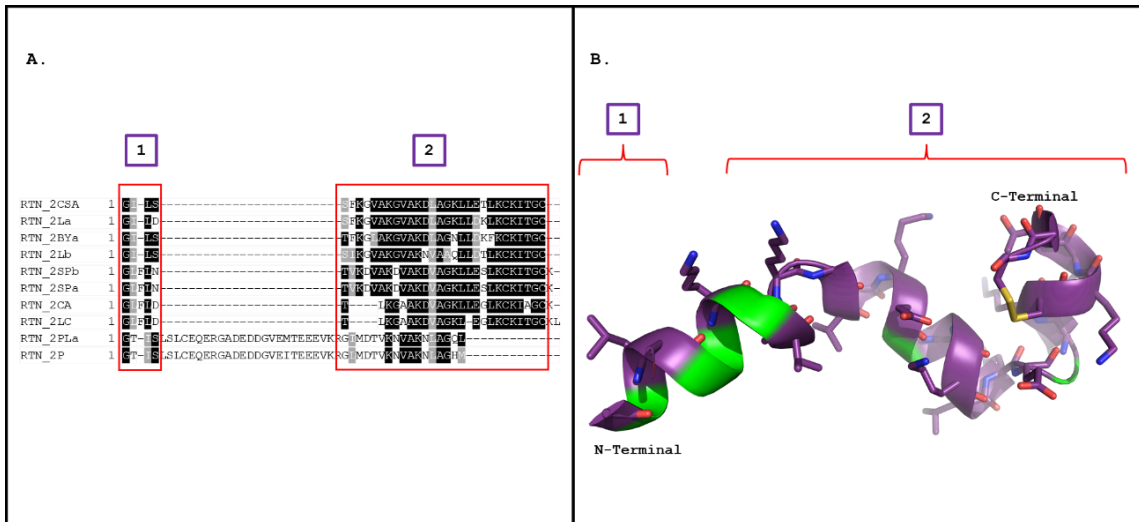


Figura 13. (A) Alineamiento de secuencias de ranatuerinas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Ranatuerina 2CSA de *Rana cascadae*. (Código PDB: 2K10). En violeta se marca los residuos conservados, en verde los no conservados, en azul los nitrógenos, en rojo los oxígenos y en amarillo los azufres. Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.2.9 Defensinas

Para llevar a cabo el estudio de la homología de las defensinas se consideraron un total de 23 secuencias diferentes. Como resultado del alineamiento múltiple de secuencias, se pudo observar que en las defensinas existen 3 bloques altamente conservados (**Figura 14A**). Este resultado sugiere que, pese a ser secuencias obtenidas de diversas especies tales como primates (*Pan troglodytes*, *Gorilla*, *Macaca fascicularis*, *Homo sapiens*), bovinos (*Bos taurus*) y roedores (*Mus musculus*), todas las secuencias analizadas presentan elementos restos de aminoácidos clave para mantener la estructura y función de estos PAMs. Se conoce que las defensinas son los únicos péptidos que parecen estar conservados entre organismos diferentes tales como animales vertebrados e invertebrados y plantas, por lo que se consideran como una “superfamilia de proteínas” (**Duret et al., 2009; Rodríguez, 2009**).

Por otra parte, se puede observar que estos bloques están formados principalmente por aminoácidos como Glicina (G), Cisteína (C), Treonina (T), Arginina (R) y Ácido glutámico (E). De estos, el análisis de las regiones homólogas muestra que todas las secuencias tienen en común la presencia de cisteína y glicina (**Figura 14A**). La función de los residuos de cisteína es formar puentes disulfuro, de tal manera que limita la deformación de la proteína debido a que le brinda una mayor estabilidad, mientras que la glicina dota a la estructura de una forma más compacta. Sin embargo, se conoce en estructuras helicoidales la glicina puede provocar una desestabilidad debido a que le

permite a la estructura una mayor libertad en su movimiento (**Mathews, 2003**). **Taylor et al., 2007**, al estudiar la relación entre la estructura y la actividad de las defensinas, identificaron que el fragmento “GXC” (siendo X cualquier residuo) es el motivo conservado más importante para estos PAMs debido a que es el responsable de la formación de la estructura y el plegado correcto. Este motivo se encuentra al extremo C-terminal del bloque 2. Por otro lado, ya que la identidad de secuencias de las defensinas es relativamente baja (en este estudio se ubica alrededor del 29%) no se ha podido identificar otros motivos clave para ejercer su actividad antimicrobiana. Por esta razón, la mayoría de estudios se han enfocado en la similitud estructural de estas proteínas (**Shafee et al., 2016**). En el análisis estructural, las defensinas se describen como péptidos catiónicos compuestos por 18 a 42 aminoácidos, de los cuales seis son residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuro, tal como se ve en la **Figura 14B**. Otra de las características de estos péptidos es que poseen un peso que oscila entre 5 y 75 kDa, y se pueden ensamblar como α y/o β defensinas, dependiendo del tipo de enlace disulfuro que posean (**Luengas, 2001**).

Para el análisis estructural se tomó como punto de partida a la defensina 6 (código PDB 3QTE) de *Homo sapiens*, la cual se ensambla en forma de hélice β antiparalela y cuya función no está limitada a ser un péptido antimicrobiano, sino que de manera general, las β defensinas poseen también actividad inmunomoduladoras, proporcionando un vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa. Por su parte, las defensinas plegadas de forma helicoidal están ligadas con el anclaje del PAM a la pared celular bacteriana, por lo que las estructuras hélice α son importantes en la especificidad de las funciones de las defensinas, ya sea con respecto a sus propiedades antimicrobianas o quimioatrayentes. Además, es importante resaltar que los sitios de anclaje de estas moléculas están sujetos a la región N-Terminal (**Taylor et al., 2007**). Del análisis de la estructura de la defensina 6 se puede concluir que los residuos conservados se ubican en el bloque central o “core” del PAM, que incluye los tres puentes disulfuro, mientras que los residuos no conservados se ubican hacia los extremos (**Figura 14B**). Esto permite inferir que la conservación de residuos está estrechamente ligada a mantener la estructura secundaria típica de este tipo de PAMs.

En cuanto al mecanismo de acción, al ser moléculas catiónicas por su elevado contenido de Lisina (K) y arginina (R) (**Figura 14A**), las defensinas actúan sobre componentes con

carga negativa de la membrana y de la pared celular de los microorganismos. Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de acción se basa en la formación de poros que contribuyen en el proceso de desintegración de la membrana y posterior lisis y muerte celular. Luego de esta interacción, las defensinas tienen la capacidad de permanecer en la superficie celular o se internalizan por medio de un receptor y la traslocación no específica de membrana. Además, las defensinas también pueden actuar bajo el mecanismo “modelo de alfombra”, mediante el cual varias moléculas se asientan en la superficie de la célula provocando su necrosis (Rodríguez, 2009; Taylor et al., 2007).

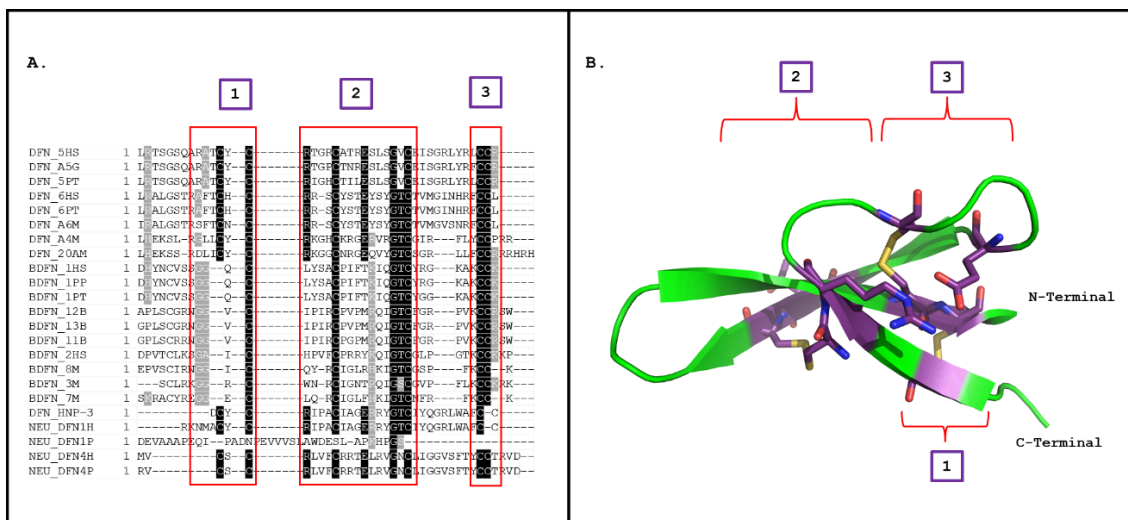


Figura 14. (A) Alineamiento de secuencias de defensinas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Defensina 6 de *Homo sapiens*. (Código PDB: 3QTE). En violeta se marca los residuos conservados, en verde los no conservados, en azul los nitrógenos, en rojo los oxígenos y en amarillo los azufres. Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.2.10 Drosocinas

El décimo grupo del cual se llevó a cabo un análisis de la homología corresponde a los péptidos drosocinas. Para este estudio se identificaron únicamente cuatro secuencias, las cuales fueron seleccionadas en base a su porcentaje de identidad, el cual se ubica por encima del 75%. Dentro de este grupo de secuencias se pudo evidenciar dos bloques altamente conservados (Figura 15A.), los cuales son ricos en Prolina (P) y constituyen alrededor del 25% del total de residuos de este tipo de péptidos (Valadéz, 2011). Se conoce que esta característica le permite a las drosocinas ligarse al dominio de unión a la proteína kinasa CDK-2, implicada en la división celular, y a la membrana microbiana, provocando daño a largo plazo a las células bacterianas y eventualmente provocándoles la muerte debido a que la drosocina se transloca hasta el citosol e inhibe la división del

microorganismo (**González et al., 2017; Kumari et al., 2015**). Además, se puede observar la presencia de otros aminoácidos, pero en menor proporción, tales como Treonina (T), Arginina (R), Serina (S), Histidina (H), Valina (V), Alanina (A), Leucina (L), Isoleucina (I) y Ácido aspártico (D). De este conjunto de residuos, la treonina pese a estar en menor proporción, es el aminoácido más importante dentro de esta estructura debido a que es necesario para la actividad antimicrobiana, ya que actúa por medio de la inhibición de la maquinaria celular y la replicación bacteriana (**Hanson, et al., 2016**).

Estudios realizados por **Bulet et al., 2000**, acerca de la actividad de las drosocinas demuestran que la actividad de estos péptidos antimicrobianos está relacionada con el triplete “TSH”, presente en las secuencias de drosocina nativa. Sin embargo, en la **Figura 15A** se puede observar que este motivo se conserva únicamente en DRC_DS y DRC_DP, esto debido a que se han realizado estudios donde se han modificado por sustitución o deleción el residuo de treonina en varias secuencias con el fin de encontrar análogos más potentes en cuanto a su actividad antimicrobiana (**Biondi et al., 2002**). Asimismo, estudios realizados por **McManus et al., 2000**, demuestran que el fragmento “PRP” presente en varias posiciones de la secuencia (**Figura 15A**), está relacionado con el mecanismo de reacción que implica la interacción con un receptor estereo específico, el cual permite el paso de compuestos por difusión sin gasto de energía, de tal forma que la proteína sufre un cambio mediante el cual se libera en el interior de la membrana, matando a la célula en cuestión de minutos.

Para llevar a cabo el análisis estructural, se tomó la Drosocina encontrada en *Drosophila melanogaster* (código PDB 3EZR) como referencia. La principal característica de esta estructura es que tienen una longitud aproximada de 18-34 aminoácidos, con un alto contenido de prolina, los cuales están ordenados tridimensionalmente en forma de alfa hélice y hoja plegada beta antiparalela lo que los hace muy activos contra bacterias Gram negativas (**Figura 15B**). Además, tienen un peso de aproximadamente 20 kDa. Cabe mencionar que su estructura tiene diversos patrones en soluciones acuosas; sin embargo, en presencia de fosfolípidos son estables. En este caso, la conformación helicoidal cumple un rol importante debido a que permite una inserción eficaz del péptido en las membranas microbianas y su posterior permeabilización (**Biondi et al., 2002; Kumari et al., 2015**).

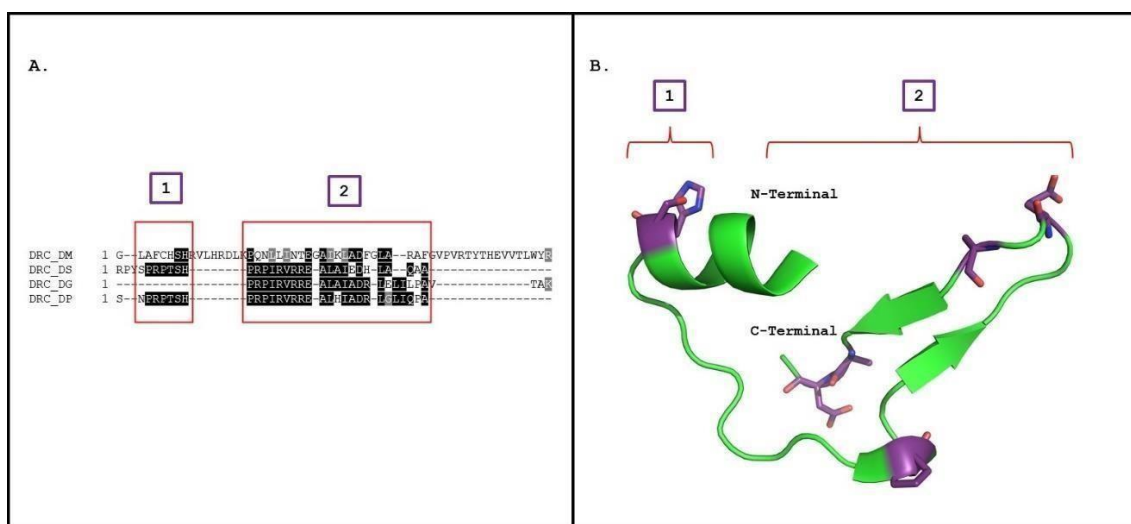


Figura 15. (A) Alineamiento de secuencias de drosocinas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Drosocina de *Drosophila melanogaster* (Código PDB: 3EZR). En violeta se marca los residuos conservados, en verde los no conservados, en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.2.11 PR-39

De manera general, los péptidos PR-39 son derivados de las catelicidinas y están presentes principalmente en cerdos y bovinos. Para el análisis de homología se consideró el péptido PR-39 encontrado en *Sus scrofa*, el cual es una especie de jabalí. En la **Figura 16A.**, se observa la presencia de tres bloques con zonas altamente conservadas, las cuales están constituidas principalmente por Prolina (P), que corresponde al 49% del total de la secuencia, 24% de Arginina (R) y el 5% corresponde a otros aminoácidos como Triptófano (W), Fenilalanina (F) y Glicina (G). Estos residuos le dotan a la molécula la capacidad de actuar como bactericidas a través de un mecanismo que bloquea la síntesis del material genético de bacterias Gram negativas. Además, la prolina cumple un rol importante ya que permite cambios en la dirección de la cadena y limita la posibilidad de movimientos aleatorios del péptido (**Rivas et al., 2006; Villarruel, et al., 2004**).

De acuerdo con **Bergman et al., 2000**, tras estudiar las secuencias de PR-39 se ha concluido que el motivo “PP” son una necesidad química para la conformación funcional de estos péptidos. Al relacionar con los resultados obtenidos, se puede verificar la presencia de este fragmento en el bloque 3 de la **Figura 16A.** Asimismo, se observa la presencia del fragmento conservado “RP” en el bloque 1, el cual es esencial para su actividad antimicrobiana (**Holani et al., 2016**). A diferencia de los péptidos analizados anteriormente, este tipo de PAM no mata las bacterias mediante la formación de poros,

sino que los PR-39 tienen la capacidad de atravesar la membrana sin provocar daños en la misma debido a que interactúan con el transportador tipo permeasa de la membrana interna de las bacterias. Una vez que el péptido ha ingresado en la célula bacteriana, su mecanismo de acción se basa en la interferencia de la síntesis de proteínas y material genético. También puede actuar alterando la biosíntesis de la pared celular y bloqueando chaperonas que se encargan del correcto plegamiento de proteínas, provocando un desbalance de NADH y ATP, dando paso a una apoptosis celular (Alem, 2015).

Para el estudio estructural se tomó como referencia la proteína PR-39 con código PDB 4EZO (Figura 16B). Esta proteína es un péptido lineal enriquecido en prolina, por lo que inhibe la formación de hélices α y hélices β . Generalmente estas moléculas tienen una extensión de hasta 39 residuos y se caracterizan por ser catiónicas y anfipáticas. La anfipaticidad de la estructura le permite al PAM la penetración en las membranas plasmáticas bacterianas y provoca una desestabilización de los lípidos, mientras que la carga positiva de la molécula (debido a su contenido de arginina), contribuye a la actividad antimicrobiana a través de la interacción electrostática con las membranas bacterianas cargadas negativamente. Además, cabe mencionar que en PR-39, la región N-Terminal que es altamente catiónica, es la clave en el funcionamiento de los dominios de unión, la función peptídica y la actividad antimicrobiana (Holani et al., 2016).

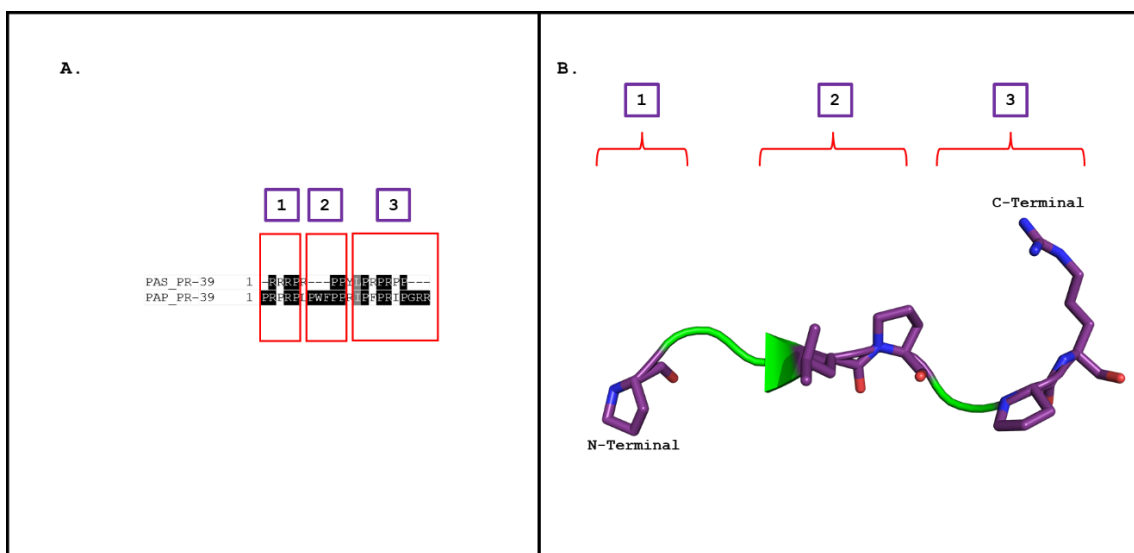


Figura 16. (A) Alineamiento de secuencias de PR-39. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de PR-39 de *Sus scrofa*. (Código PDB: 4EZO). En violeta se marca los residuos conservados, en verde los no conservados, en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos. Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.1.12 Gaegurinas

Finalmente, dentro de las gaegurina se identificó a la gaegurina 4 y gaegurina 5, los cuales tienen actividad antimicrobiana, pero han sido poco estudiados, por lo que no existe mucha información disponible acerca estos PAMs. La razón por la cual se incluyeron estas moléculas en el presente estudio es su alto grado de homología, lo cual indica que guardan una relación no solo funcional, sino también de su origen evolutivo. Además, son miembros de la subfamilia de péptidos antimicrobianos aislados de la piel de Rana rugosa (Kwon et al., 2000). En la **Figura 17A**. se muestra el alineamiento de ambas secuencias donde se observa la presencia de dos bloques con un alto porcentaje de conservación separados por un residuo no conservado que puede ser una Leucina (L) o una Fenilalanina (F). Además, se observa que ambos péptidos están formados por aminoácidos como Glicina (G), Isoleucina (I), Leucina (L), Lisina (K), Fenilalanina (F), Alanina (A), Valina (V), Glutamina (Q), Ácido aspártico (D), Serina (S), Treonina (T) y Cisteína (C), los cuales le otorgan un amplio espectro de actividades antimicrobianas.

A diferencia de los PAMs analizados anteriormente, el estudio de las gaegurinas se basa en el análisis de la función de su estructura tridimensional. Estas moléculas se caracterizan por ser un péptido de 37 aminoácidos y contienen dos residuos de cisteína en el extremo C-Terminal, que están relacionados con la formación de un puente disulfuro intracatenario (Miranda, 2009). La particularidad de estas proteínas es que su extremo C-Terminal recibe el nombre de “rana box” o “caja de rana” y cumple con la función de “ancla” contribuyendo a la formación de canales en la membrana de los microorganismos. Generalmente, estos péptidos adoptan un patrón estructural hélice-torcedura-hélice, tal como se ve en la **Figura 17B**. Estas estructuras están conectadas por una torcedura en el residuo de glicina de la posición 24, formando un ángulo que puede ir desde 60° a 150°. Debido a esta torcedura en glicina, es poco probable que los demás residuos de estos PAMs participen en la formación de poros de iones, por lo que se sugiere que el extremo N-terminal al ser altamente anfipático, se inserta en la región hidrofóbica de la membrana como un oligómero y la caja de rana que está cargada positivamente se ancla en la superficie de la membrana, dando paso a la formación del poro (Yong-Ha et al., 2006).

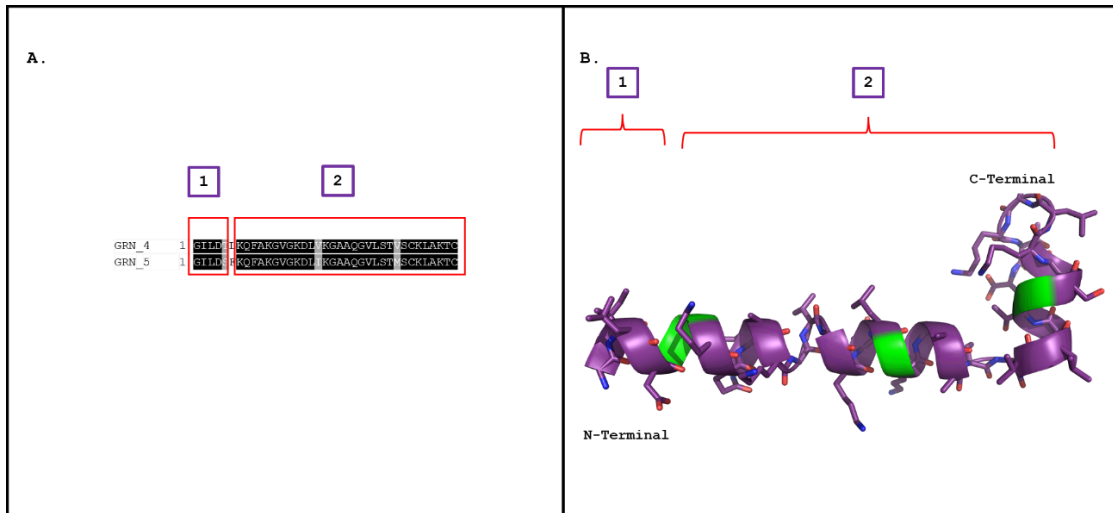


Figura 17. (A) Alineamiento de secuencias de gaeugerinas. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelo tridimensional de Gaegurina 4 de *Glandirana rugosa*. (Código PDB: 2G9L). En violeta se marca los residuos conservados, en verde los no conservados, en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.3 Alineamiento múltiple por grupos de PAMs

Con fines investigativos, una vez obtenidos los resultados de los alineamientos individuales de las secuencias y haber realizado un análisis de homología estructural para cada tipo de péptido, se procedió a realizar otro ensayo. Esta vez los PAMs fueron clasificados en cuatro grupos, los cuales fueron estudiados en función de su disposición tridimensional, composición de aminoácidos y origen. El objetivo de este estudio es analizar la homología de secuencias con el fin de determinar una relación evolutiva compartida entre las secuencias relacionada a su actividad antimicrobiana y estructura.

3.3.1 Grupo I

En el primer grupo estudiado fue conformado por las cecropinas, magaininas, bombininas y dermaseptinas, debido a que, según **Wang et al., (2013)**, estas estructuras tienen se caracterizan por tener un alto contenido de Glicina (G), Lisina (K) y Leucina (L) en su estructura. El análisis múltiple de las secuencias (**Figura 18A**) muestra que estos residuos se agrupan en un solo bloque conservado. Estos aminoácidos brindan a este grupo de una actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas como: *S. typhimurium*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y Gram positivas como: *Bacillus megaterium*. Esto se explica debido a que actúan por medio de mecanismos que son capaces de provocar cambios en la permeabilidad de la membrana (**Castañeda, et al., 2009**). Es importante resaltar que en este análisis también se puede observar espacios en

varias secuencias alineadas, lo que indica que este motivo conservado es susceptible de mutaciones como inserciones o deleciones de aminoácidos (Just, 2001).

Por otra parte, en la **Figura 18B**, se muestra la superposición de las estructuras tridimensionales de las diferentes clases de PAMs que conforman este grupo. Generalmente, este grupo adopta una forma de hélice α ; sin embargo, en sistemas acuosos pueden ser lineales. Además, al ser estructuras anfipáticas, tienen una superficie hidrofóbica y otra hidrofílica que les permite interactuar con los lípidos de la membrana y cuando las lisinas que conforman estas estructuras entran en contacto con agua, moléculas polares e iones, las membranas proteicas forman canales iónicos que posibilitan la solubilidad de la proteína en soluciones acuosas (Montaño & Vargas, 2002).

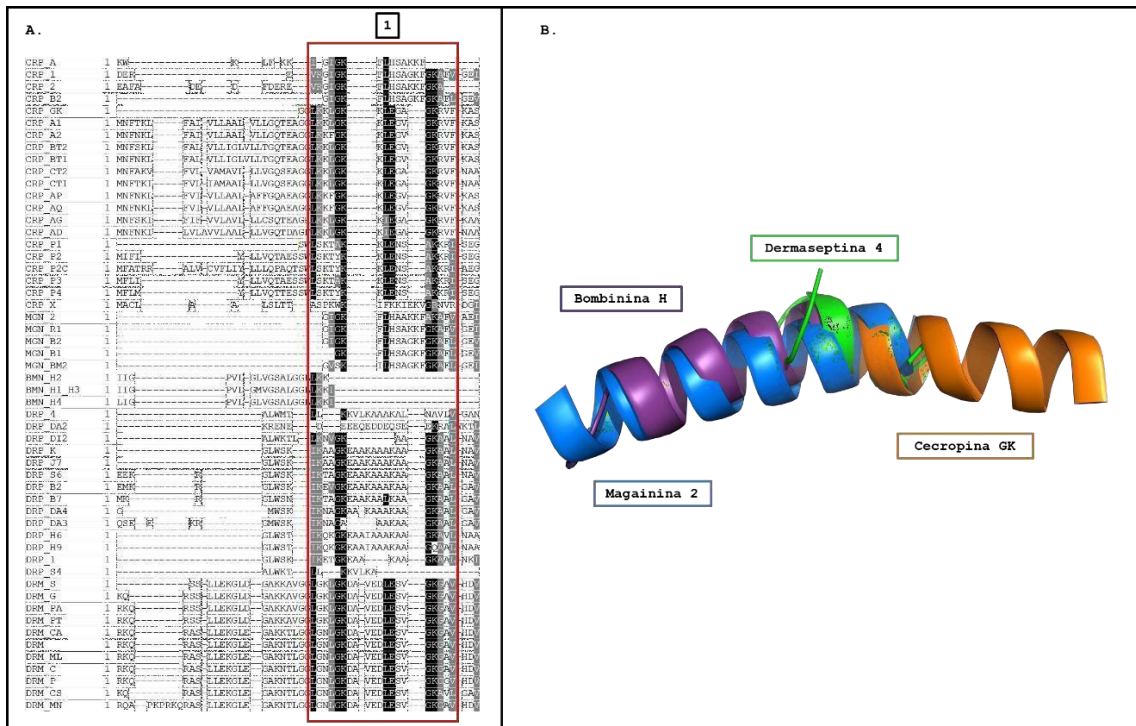


Figura 18. (A) Alineamiento múltiple de secuencias del Grupo I. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelos tridimensionales sobrepuestos de péptido antimicrobianos del Grupo I.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.3.2 Grupo II

En segundo lugar, se estudió a las brevininas, esculentinas, ranalexinas y gaeugerinas, las cuales se caracterizan porque han sido aisladas de diversas especies de anfibios. Según Tornirelli & Simonetta, (2013), este grupo se destaca por ser ricos en lisina, arginina e

histidina, sin embargo, en la **Figura 19A** se puede observar que las zonas conservadas están compuestas por aminoácidos como glicina, alanina y leucina, que le permiten al péptido antimicrobiano evitar la traducción de proteínas. Como ventaja, estos PAMs tienen un amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Por otra parte, se puede observar que poseen estructuras similares y al sobreponer estas estructuras se puede observar que alinean en regiones específicas. De manera general, estas estructuras tienen una longitud promedio de 40 aminoácidos, la cual forma una estructura helicoidal en el espacio. Cabe destacar que estas estructuras se caracterizan porque en sus extremos forman un asa (**Figura 19B**).

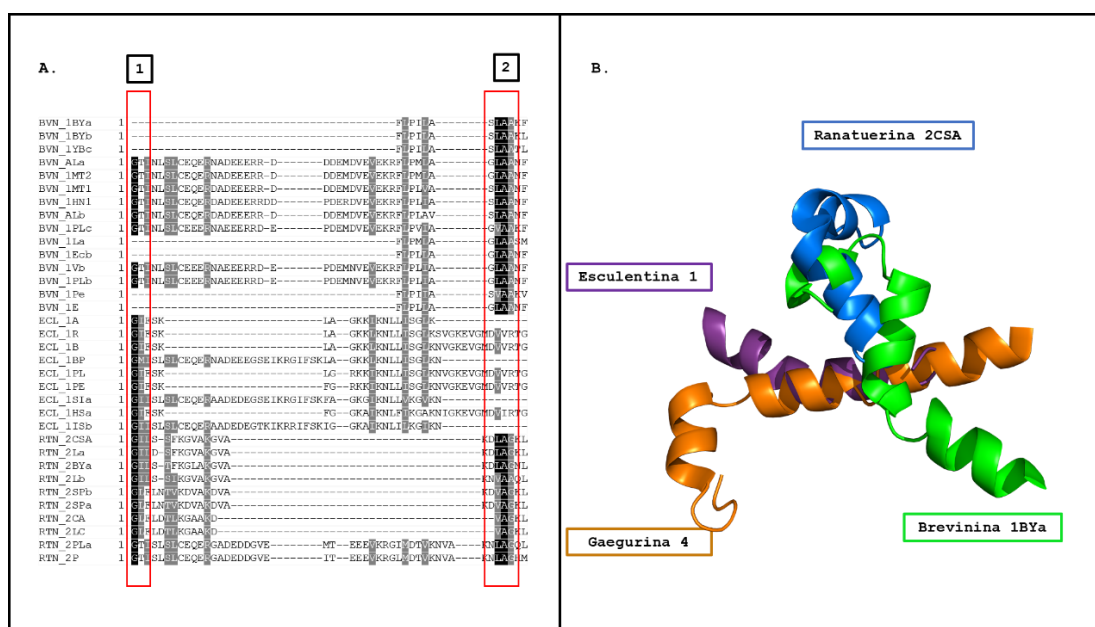


Figura 19. (A) Alineamiento múltiple de secuencias del Grupo II. En negro se marca las regiones homólogas. (B) Modelos tridimensionales sobrepuestos de péptidos antimicrobianos del Grupo II.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.3.3 Grupo III

Por su parte, en la **Figura 20A**, se observa el tercer grupo formado por bacterenecinas, drosocinas y PR-39 los cuales tienen un alto grado de similitud. Según **Castañeda, et al., (2009)**, este grupo en particular se destaca por su alto contenido de arginina y prolina, los cuales representan alrededor del 49% y 33% respectivamente. Sin embargo, se puede notar también la presencia de otros aminoácidos tales como valina, glutamina y ácido aspártico. De manera general, estos residuos dotan de propiedades antimicrobianas al péptido gracias a que intervienen en los mecanismos de permeabilización de la membrana

microbiana, siendo activos principalmente en bacterias Gram negativas, tales como *E. coli*. En la **Figura 20B** se puede observar que, pese a que estos PAMs comparten una identidad de secuencia significativa, no presentan una similitud de su estructura 3D, ya que las drosocinas y gaegurina son estructuras helicoidales, mientras que las catelicidinas y PR-39 se ensamblan en una hélice β .

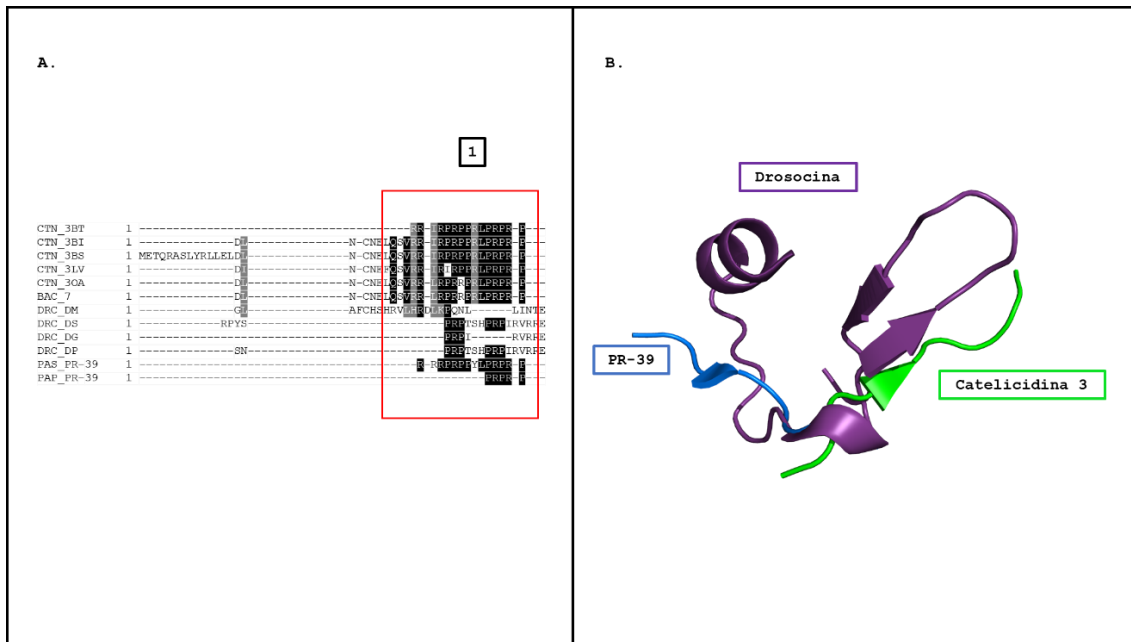


Figura 20. (A) Alineamiento múltiple de secuencias del Grupo III. En negro se marca las regiones homólogas.

(B) Modelo tridimensional sobrepuestos de péptidos antimicrobianos del Grupo III.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.3.4 Grupo IV

Finalmente, el último grupo corresponde a las defensinas. La principal singularidad de esta clasificación es que son estructuras ricas en cisteína, por lo que forman puentes disulfuro que estabilizan la estructura de las hojas plegadas β (**Figura 21B**). Es importante hacer énfasis en que las defensinas al ser péptidos pequeños (29-34 aminoácidos) y con baja conservación de secuencias, pueden presentar diversas vías de plegamiento, razón por la cual también se pueden ver como una combinación estructural entre hélices β y hélices α (**Arolas, et al., 2006**). Por otra parte, dentro de las zonas conservadas se puede observar la presencia de los aminoácidos glicina y triptófano (**Figura 21A**), los cuales dotan de propiedades microbicidas a los péptidos a través de la interferencia en la síntesis del material genético. Este grupo de PAMs actúa frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Cabe recalcar que algunos de ellos cumplen también con un papel antifúngico (**Rivas et al., 2006**).

estas secuencias. Además, de este grupo se puede observar una relación entre los taxones CRP AP y CRP AQ, mientras que para el clado formado por CRP A1 y CRP A el valor de soporte determinado por el programa es inferior a 70, lo cual sugiere que la relación entre los dos taxones no es concluyente. Por otra parte, se observa una relación cercana entre los clados 1, 2 y 3. Las distancias de cada taxón indican que existe un alto nivel de conservación de secuencias. Así también se evidencia que los taxones CRP BT2 y CRP BT1 están relacionados entre sí. Por otra parte, se observa una relación entre las cecropinas CRP CT2 y CRP CT1, las cuales a su vez comparten un ancestro en común con los clados ya mencionados. Finalmente, en el árbol filogenético se puede constatar que el péptido CRP P2C se encuentra más lejanamente emparentado a los otros grupos. Esto se explica debido a que, a diferencia de las demás secuencias que fueron aisladas de diferentes especies de mosquitos, la de este péptido pertenece al parásito *Toxocara canis*, el cual se encuentra en el intestino de perros y otros cánidos.

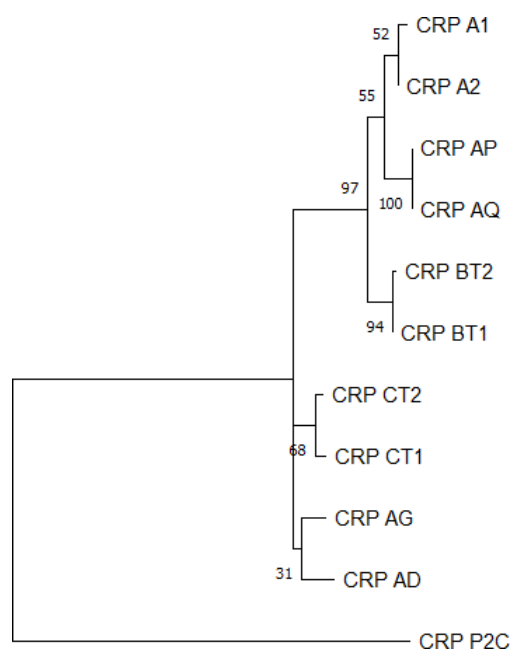


Figura 22. Árbol filogenético generado por el método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud) con un bootstrap de 1000 réplicas, a partir de las secuencias de aminoácidos de los péptidos antimicrobianos cecropinas. Este árbol fue inferido basándose en un modelo de matriz LG. Los números en los nodos del árbol representan los valores de soporte bootstrap de búsqueda.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.4.2 Magaininas

En cuanto a las magaininas, en la **Figura 23**, se muestra el árbol filogenético obtenido a partir del análisis de cuatro secuencias de estos PAMs, donde se puede observar la formación de 2 clados. De manera particular, se puede observar que, pese a que los péptidos que forman el clado 1 comparten un ancestro en común, el taxón MGN 2 presenta un mayor grado de evolución en relación con MGN R1. De forma similar, MGN BM2 aparentemente presenta un mayor número de cambios en su secuencia con respecto a MGN B2. La relación filogenética existente entre estos dos grupos se puede explicar debido a que estos todos los péptidos fueron aislados de diversas especies de anfibios anuros de la familia *Pipidae*.

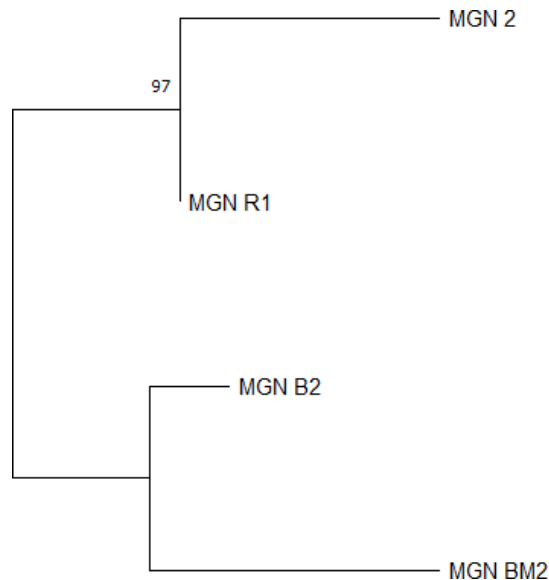


Figura 23. Árbol filogenético generado por el método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud) con un bootstrap de 1000 réplicas, a partir de las secuencias de aminoácidos de los péptidos antimicrobianos magaininas. Este árbol fue inferido basándose en un modelo de matriz Dayhoff. Los números en los nodos del árbol representan los valores de soporte bootstrap de búsqueda.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.4.3 Dermaseptinas

En la **Figura 24**, se muestran las relaciones filogenéticas estimadas por el método de máxima verosimilitud para las diez secuencias del grupo de péptidos correspondiente a las dermatoseptinas. En el árbol filogenético se observa la presencia de 2 grupos. El primer grupo está formado por 6 clados que comparten un ancestro en común. Además, se puede evidenciar que en este grupo el clado perteneciente al péptido DRM CA se encuentra más lejanamente emparentado a los otros clados. Pese a esto, se tiene una coincidencia considerable entre los clados 1, 2, 3, 4 y 5, el cual corresponde al 65% de las réplicas analizadas mediante bootstrap. Así también, se puede observar que todos los clados comparten una relación particularmente cercana con un ancestro en común y entre sí, a excepción del taxón DRM P, cuyo ramal tiene una longitud visiblemente más larga, lo que indica que tiene una relación evolutiva mucho más lejana que los demás clados. Por su parte, el grupo 2 está compuesto por el clado 7 y 8, los cuales comparten un ancestro en común. Aquí se puede ver que el péptido DRM G, DRM PT y DRM PA guardan una relación muy cercana debido a la longitud de sus ramales.

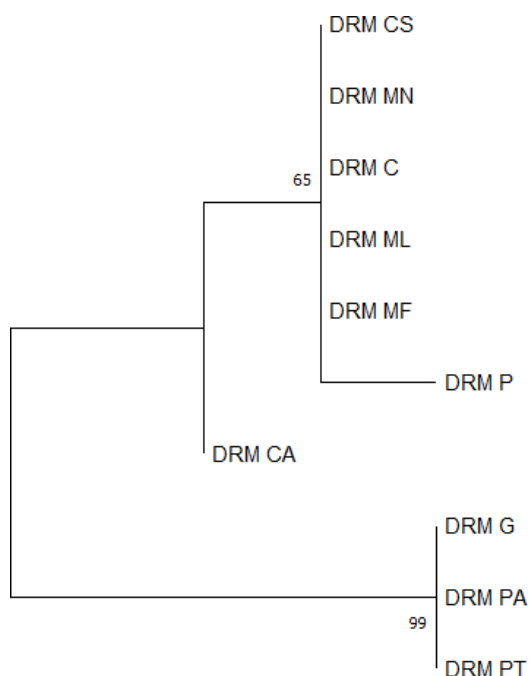


Figura 24. Árbol filogenético generado por el método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud) con un bootstrap de 1000 réplicas, a partir de las secuencias de aminoácidos de los péptidos antimicrobianos dermatoseptinas. Este árbol fue inferido basándose en un modelo de matriz Dayhoff. Los números en los nodos del árbol representan los valores de soporte bootstrap de búsqueda.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.4.4 Brevininas

En las brevininas por su parte, en la **Figura 25** se muestran las relaciones filogenéticas obtenidas a partir del análisis de ocho secuencias de esta clasificación de PAMs. En primer lugar, se puede observar que las secuencias se encuentran distribuidas en 5 clados, los cuales forman 2 grupos. El primer grupo está formado por 2 subgrupos. En la primera división se ve que el péptido BVN 1HN1 comparte un ancestro en común con el clado 1. A pesar de que los taxones del clado 1 comparten un ancestro en común, el péptido BVN ALb tiene un mayor número de procesos evolutivos en relación al péptido BVN 1MT1. De los resultados obtenidos para el clado 3 formado por los taxones BVN 1MT2 y BVN ALa se puede inferir que las dos secuencias se encuentran estrechamente relacionadas. Con relación al grupo 2, este está conformado por 2 clados. Aquí se observa que el clado 4, formado por el taxon BVN 1PLc comparte un ancestro en común con el clado 5. El PAM BVN 1PLc muestra una mayor distancia con respecto a BVN 1Vb y BVN 1PLb.

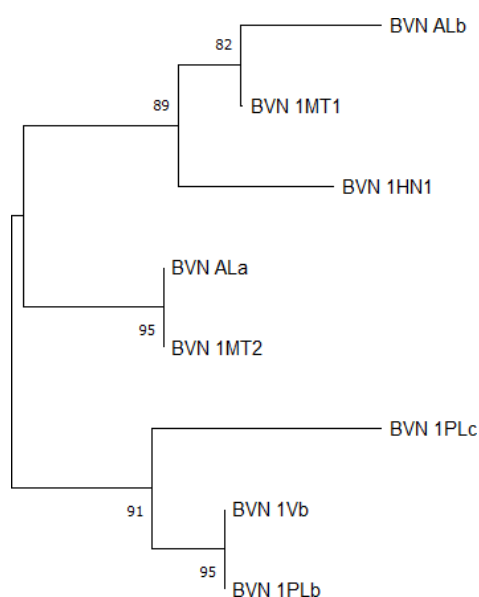


Figura 25. Árbol filogenético generado por el método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud) con un bootstrap de 1000 réplicas, a partir de las secuencias de aminoácidos de los péptidos antimicrobianos brevininas. Este árbol fue inferido basándose en un modelo de matriz LG. Los números en los nodos del árbol representan los valores de soporte bootstrap de búsqueda.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.4.5 Esculentinas

En la **Figura 26**, se muestran las relaciones filogenéticas estimadas por el método de máxima verosimilitud para las ocho secuencias del grupo esculentinas. En primera instancia, se puede observar que el árbol filogenético tiene 2 grupos principales. El grupo 1 está formado por 2 subdivisiones. La primera división está conformada por 2 clados, donde se observa que el péptido ECL 1HSa tiene un ancestro en común con el clado 1 y tienen una relación evolutiva muy cercana entre sí. Sin embargo, el valor de soporte bootstrap es bajo (48) lo cual sugiere la posibilidad de que el clado conformado por ECL 1PL, ECL 1PE y ECL 1HSa tenga una estructura diferente. Los péptidos que conforman el clado 3, ECL 1R y ECL 1B, se encuentran estrechamente relacionados. Por su parte, en el grupo 2 se puede observar que el taxón ECL 1ISb comparte un ancestro en común con el clado. Sin embargo, se puede ver que el taxón ECL 1BP se encuentra mucho más alejado del nodo.

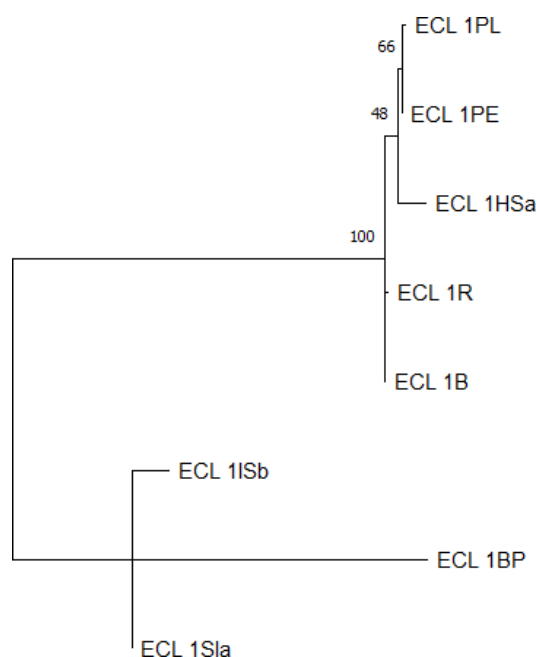


Figura 26. Árbol filogenético generado por el método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud) con un bootstrap de 1000 réplicas, a partir de las secuencias de aminoácidos de los péptidos antimicrobianos esculentinas. Este árbol fue inferido basándose en un modelo de matriz LG. Los números en los nodos del árbol representan los valores de soporte bootstrap de búsqueda.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.3.6 Ranalexinas

En la **Figura 27**, se muestran las relaciones filogenéticas estimadas para las seis secuencias de ranalexinas. De manera general, se puede observar que del árbol derivan 4 clados, los cuales han sido distribuidos en 2 grupos. El primero formado por RTN 2La y RTN 2BYa. Estos dos PAMs a su vez están relacionados con RTN 2Lb. De este primer grupo, el péptido RTN 2CSA es el que menos cambios evolutivos presenta en su secuencia. Por su parte, en el grupo 2 se están relacionadas las secuencias de los péptidos RTN 2CA y RTN 2LC.

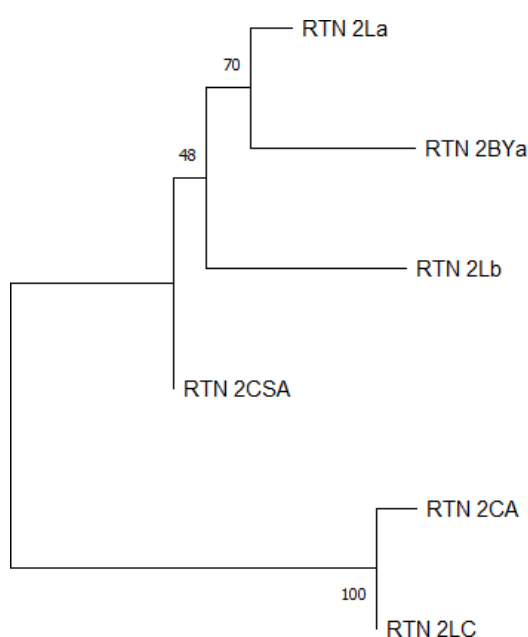


Figura 27. Árbol filogenético generado por el método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud) con un bootstrap de 1000 réplicas, a partir de las secuencias de aminoácidos de los péptidos antimicrobianos ranalexinas. Este árbol fue inferido basándose en un modelo de matriz Dayhoff. Los números en los nodos del árbol representan los valores de soporte bootstrap de búsqueda.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

3.3.7 Defensinas

Finalmente, la relación filogenética de las defensinas fue obtenida a partir del análisis de seis secuencias de esta clasificación, tal como se observa en la **Figura 28**. De manera general, en el árbol filogenético se evidencia la presencia de 4 clados que se encuentran distribuidos en 2 grupos. En el grupo 1 se puede observar que el clado 2, formado por el taxón DFN 5AG comparte un ancestro en común con el clado 1 y tiene una relación evolutiva muy estrecha. En cuanto al grupo 2, se tiene que el péptido DFN A6M que conforma el clado 3, comparte un ancestro en común con el clado 4. Además, se puede evidenciar que los taxones DFN 6HS y DFN 6PT se encuentran estrechamente relacionados.

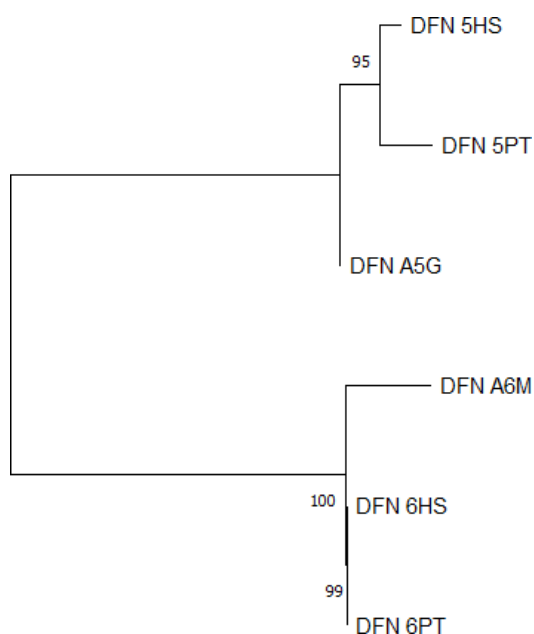


Figura 28. Árbol filogenético generado por el método Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud) con un bootstrap de 1000 réplicas, a partir de las secuencias de aminoácidos de los péptidos antimicrobianos defensinas. Este árbol fue inferido basándose en un modelo de matriz JTT. Los números en los nodos del árbol representan los valores de soporte bootstrap de búsqueda.

Elaborado por: Acosta, D., (2021).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- El estudio general de diferentes péptidos con actividad antimicrobiana permitió analizar nuevas alternativas a la situación actual de resistencia a los antibióticos de diversos microorganismos, siendo el principal objetivo efectuar un análisis bioinformático de diferentes PAMs a través del uso de diversas bases de datos y herramientas computacionales, las cuales permitieron llevar a cabo una investigación más detallada en base a su conformación estructural.
- El desarrollo de este proyecto permitió analizar la homología estructural de diferentes péptidos con actividad antimicrobiana. Además, se identificó que las estructuras de los péptidos antimicrobianos estudiados se caracterizan por ser anfipáticas, lo cual está ligado con sus mecanismos de acción ya que sus superficies hidrofóbica e hidrofílica les permite interactuar con los lípidos de la membrana, y ejercer su actividad.
- Se logró determinar patrones estructurales responsables de ejercer actividad antimicrobiana a partir de un alineamiento múltiple de secuencias estableciendo regiones conservadas a lo largo de la secuencia, las cuales están relacionadas con su comportamiento antimicrobiano. Pese a eso, no todas las regiones homologas han sido caracterizadas, por lo este estudio puede servir como un punto de partida para futuras investigaciones acerca del rol que cumplen estas regiones conservadas que conforman la secuencia de los diferentes péptidos con actividad antimicrobiana.
- Finalmente, se determinó las relaciones filogenéticas existentes entre las diferentes proteínas identificadas usando el método Máxima Verosimilitud, donde se pudo observar que, pese a que las secuencias de los péptidos fueron aisladas de diferentes especies mantienen una relación evolutiva y funcional.

4.2 Recomendaciones

- Realizar un estudio funcional-estructural más profundo de los diferentes tipos de péptidos antimicrobianos tomando en cuenta los diversos motivos conservados a lo largo de la secuencia y su relación con la funcionalidad de la proteína.
- Realizar un ensayo de laboratorio con el fin de comprobar su actividad bactericida en vivo al experimentar con pruebas de resistencia antimicrobiana y potenciar su uso clínico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, A. (2009). *Aislamiento y purificación de péptidos con actividad antimicrobiana*. Mexico : Universidad Nacional Autónoma de México .
- Alem, D. (2015). *Purificación, caracterización y evaluación funcional de péptidos antimicrobianos en la agricultura* . Uruguay : Universidad de la República .
- Álvarez, D. (2020). *¿Cuáles son las principales funciones de los aminoácidos?* Obtenido de medac.es: <https://medac.es/blogs/sanidad/las-funciones-los-aminoacidos>
- Arolas, J., Aviles, F., Chang, J.-Y., & Ventura, S. (2006). Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle. *Trends in Biochemical Sciences*, 292-301.
- Bachère, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A., & Rodríguez, J. (2000). *Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology*. Guayaquil : ELSEVIER .
- Balseca, E. (2021). *Análisis filogenético de Komagataeibacter xylinus K2G30=UMCC2756 para la producción de biofilms a partir de suero lácteo* . Ambato : Universidad Técnica de Ambato .
- Beltrán, J. (2014). *Métodos para la selección de características y clasificación de péptidos antimicrobianos* . Baja California: CICESE .
- Bergman, T., Lee, J., Ager, B., Carlquist, M., Buman, I., & Jorn, H. (2000). *Pig intestine isolation of a new member of the proline-arginine-rich antibacterial peptide family*. Suecia: Department of Microbiology, Stockholm University.
- Bioindi, L., Filira, F., Genaro, R., Benincasa, M., Scolaro, B., Rocchi, R., & Gobbo, M. (2002). *Antimicrobial peptides: synthesis and antibacterial activity of linear and cyclic drosocin and apidaecin 1b analogs*. Italia : Universidad de Padua .
- Boman, A., Hans, G., & Meerifield, R. (2000). *Design, synthesis and antibacterial activity of cecropin-like model peptides* . New York: Rockefeller University.
- Broekaert, W., Terras, F., Cammue, B., & Osborn, R. (2005). *Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System*. United Kingdom : F.A. Janssens Laboratory of Genetics.
- Bulet, P., Urge, L., Ohresser, S., Hetru, C., & Otvos, L. (2000). *Extended Scale Chemical Synthesis and Activity Range of Drosocin, an O-Glycosylated Antibacterial Peptide from Drosophila*. Francia : Strasbourg Institute of Molecular and Cell Biology.

- Casciaro, B., Cappiello, F., Cacciafesta, M., & Mangoni, M. (2017). *Promising approaches to optimize the biological properties of the antimicrobial peptide Esculentin 1a NH2*. Roma: Frontiers in Chemistry .
- Castañeda, J., Ortega, J., Venegas, A., Aquino, A., López, J., Estrada, S., & Estrada, I. (Enero-Abril de 2009). Péptidos antimicrobianos: péptidos con multiples funciones. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 18(1), 16-29.
- Castrillón, L., Palma, A., & Padilla, C. (Abril de 2007). Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. *Dermatología Rev Mex*, 51(2), 57-67.
- Centro Nacional de Información Biotecnológica . (23 de Febrero de 2021). *Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU.* Obtenido de blast.ncbi.nlm.nih.gov: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Corrales, L., & Ciro, G. (21 de Mayo de 2010). PEPTIDES WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY PRODUCED BY ISOLATED NATIVE MICROORGANISMS. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 17(2), 181-190.
- Cotter, P., Hill, C., & Ross, R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol*, 777-788.
- Díaz, P. (2000). *PÉPTIDOS HÍBRIDOS CECROPINA A-MELITINA CON ACCIÓN LEISHMANICIDA*. Madrid : UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
- Duret, L., Mouchiroud, D., & Gouy, M. (Junio de 2009). *HOVERGEN: Homologous Vertebrate Genes Database*. Obtenido de hovergen.php: <http://pbil.univ-lyon1.fr/databases/hovergen.php>
- Espín, D. (2021). *Cribado virtual de inhibidores de la enzima ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp) del virus SARS-CoV-2, empleando librerías de compuestos y homología estructural con ARN polimerasas virales*. Ambato : Universidad Técnica de Ambato .
- González, M., San Juan, J., Ernesto, F., & Otero, A. (2017). Péptidos antimicrobianos: potencialidades terapéuticas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*.
- Goraya, J., Knoop, F., & Conlon, M. (2000). *Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the America bullfrog, Rana Catesbeiana* . Omaha: Facultad de Medicina de la Universidad de Creighton.
- Guaní, E. (2011). *“Inducción de péptidos antimicrobianos en epitelio de vías respiratorias”*. México: Instituto Politécnico Nacional.

- Hanson, M., Hamilton, P., & SJ, P. (2016). *Genes inmunes y péptidos antimicrobianos divergentes en moscas del subgénero Drosophila*. *Biología Evolutiva BMC*.
- Holani, R., Shah, C., Haji, Q., Inglis, D., & Uwiera, R. (2016). *Proline-arginine-rich cathelicidin (PR-39): structure, expression and functional involvement in intestinal health*. Canada : ELSEVIER.
- Huante, A. (2009). *Expresión del péptido cecropia A-1 de Droshopila melanogaster en células endoteliales de bovino* . Michoacán : Universidad Michoacana de San José Nicolás de Hidalgo .
- Instituto Jane Goodall . (2016). *Primos Evolutivos*. Obtenido de <https://janegoodall.es/es/primosevolutivos.html>
- Just, W. (2001). *Computational complexity of multiple sequence alignment with SP-score*. *J Comput Biol* .
- Kumari, S., Srivastava, N., Kaur, K., Talat, S., & Lele, D. (16 de Enero de 2015). Understand the importance of glycosylated threonine and the stereospecific action of Drosocin, a proline-rich antimicrobial peptide. *EuropeanJournal of Medicinal Chemistry*.
- Kwon, M.-Y., Hong, S.-Y., & Lee, K.-H. (2000). *Structure-activity analysis of brevinin amide 1E, an antimicrobial peptide from Rana Esculenta* . Corea del Sur : ELSEVIER.
- Kwon, Y., Carlson, B., Jin Mo, P., & Jae Lee, B. (2000). *Structural organization and expression of the rana rugosa gaegurin 4 gene*. Seúl : ELSEVIER .
- Lorenzón, E. (2015). *Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureína 1.2 e Magainina 2*. Araraquara : Universidade Estadual Paulista.
- Luengas, E. (2001). Defensinas: una nueva perspectiva en antibioticoterapia. *Revista de la Facultad de Medicina*, 207-209.
- Mangoni, M., Fiocco, D., Mignogna, G., Barra, D., & Simmaco, M. (2003). *Functional characterization of fragment 1-18 of esculentin-1b, an antimicrobial peptide from Rana esculenta*.
- Mangoni, M., Saugar, J. M., Dellisanti, M., Simmaco, M., & Rivas, L. (2005). *Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity*. *J Biol Chem*.
- Masuda, M., Nakashima, H., Ueda, T., Ikoma, H., Otaka, R., Terakawa, A., . . .Murakami, T. (2002). *Anti-HIV synthetic peptide, T-22 ((Tyr5,12,Lys7))- polyphemusin II*. *Biochem*.

- Martínez, M. (2020). *Nuevos péptidos antimicrobianos como estrategia frente al problema de la resistencia a los antibióticos, evaluación in vitro e in vivo. Análisis de un mecanismo de protección mediado por NDM-1 en Galleria mellonella*. Argentina: Universidad Nacional de Quilmes.
- Mathews, C. (2003). *Bioquímica*. Addison Wesley.
- Matsuzaki, K. (2008). Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys*, 391-400.
- McManus, A., Otvos, L., Hoffmann, R., & Craik, D. (2000). *Conformational NMR Studies of the Antimicrobial Peptide Drosocin and its Non-Glycosylated Derivative: Effects of Glycosylation on the Conformational Solution*. Pensilvania: University of Queensland.
- Miranda, C. (2009). *Análisis peptidómico de la secreción cutánea de la rana *Eupemphix nattereri* con énfasis en la prospección de péptidos antimicrobianos*. Brasilia DF : Universidad de Brasilia .
- Ministerio de Salud Pública. (2019). *Plan Nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana*. Quito: MINISTERIO DE SALUD PUBLICA DEL ECUADOR .
- Mongonayo, L., Grovale, N., Giorb, A., Mign, G., Simmaco, M., & Barrba, D. (2000). *Structure-function relationships in bombininas H, antimicrobial peptides from Bombina Frog skin secretion*. Roma : ELSEVIER .
- Montaño, K., & Vargas, F. (2002). *PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS: UN MECANISMO DE DEFENSA ANCESTRAL CON MUCHO FUTURO*. Universidad Nacional Autónoma de México. Caracas: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.
- Muñoz, C. (02 de Febrero de 2017). *PERCADO DIGITAL*. Obtenido de Historia de los antibióticos : <https://percano.mx/blog-percano/historia-de-los-antibioticos-ultima-parte/>
- Niidome, T., Mihara, H., Oka, M., Saiki, T., Yoshida, K., & Oayagi, H. (2000). *Structure and Property of Proline / Arginine Rich Region Model Peptides in Bactenecin 5*. Osaka : Osaka Prefectural University.
- Olascoaga, K., Sanchez, Grecia, Carmona, I., Galicia, M. d., Gómez, A., . . . Castañeda, J. (2019). *PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS, UNA ALTERNATIVA PROMETEDORA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS*. *Karger Kompass Neumol*, 15-21. doi:: 10.1159/000501946

- Peña, C. (2011). *Métodos de Interferencia Filogenética*. Finland: Department of Biology, University of Turku.
- Powers, J., Ramamoorthy, A., & Hancock, R. (2005). Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes. *Biochemistry*.
- Quizhpe, A., Murray, M., Muñoz, G., Peralta, J., & Calle, K. (2011). *Recuperar la salud integral y la armonía de los ecosistemas, para contener la resistencia bacteriana a los antibióticos*. Cuenca: ReAct Global.
- Ramos, M. (2021). *Cribado virtual de inhibidores de la enzima Mpro del virus SARS-Cov-2 empleando librerías de compuestos y homología estructural con proteasas de virus patógenos de animales*. Ambato : Universidad Técnica de Ambato.
- Ratcliffe, N. (2007). *INVERTEBRATE IMMUNITY - A PRIMER FOR THE NON-SPECIALIST*. United Kingdom: University College of Swansea.
- Riley, M. (2008). Molecular mechanism of evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 255-278.
- Rivas, S., Sada, E., Hernandez, R., & Tsutsumi, V. (2006). *PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA INMUNIDAD INNATA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS*. Mexico : Departamento de Salud publica de Mexico .
- Rivillas, L. (2008). *AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE LAS SEMILLAS DE *Amaranthus hypochondriacus**. México: Universidad Nacional Autónoma de Mexico.
- Ryan, M., Jack, R., Josten, M., Sahl, H., Jung, G., Ross, P., & Hills, C. (September de 2002). Extensive Post-translational Modification, Including Serine to D-Alanine Conversion, in the Two-component Lantibiotic, Lacticin 3147. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(53).
- Rodríguez, S. (2009). *Prospección de defensinas y esnaquinas de plantas nativas para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos*. Uruguay: Universidad de la Republica.
- Rudi, J., Muller, D. S., Simonetta, A., & Tonarelli, G. (2010). *Péptido antimicrobiano quimérico de dermaseptina-s1 y tigerinina-1: Estructura secundaria y selectividad hacia membranas*. Santa Fé : Universidad Nacional del Litoral.
- Sánchez, A. (2021). *Cribado virtual de inhibidores de la enzima Mpro del virus SARS-CoV-2 empleando librerías de compuestos y homología estructural con proteasas de virus patógenos humanos*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

- Sánchez, Y. (2016). *Diseño de péptidos antimicrobianos derivados de Dermaseptina S4*. Medellín : Universidad Nacional de Colombia.
- Savelyeva, A., Ghavami, S., Davoodpour, P., & Asoodeh, A. (2014). *An overview of the Brevinin superfamily: structure, function and clinical perspectives* . Novosibirsk : Universidad Estatal de Novosibirsk (NSU), Novosibirsk, Rusia.
- Sekiya, Y., Shimizu, K., Kitahashi, Y., Ohyama, A., Kawamura, I., & Kawano, R. (2019). *Electrophysiological analysis of membrane rupture by bombinin and its isomer using the lipid bilayer system*. Yokohama: Applied Bio Materials .
- Selitrennikoff, R. (2001). Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity . *J. Gen. Microbial*, 169-176.
- Shafee, T., Anderson, M., Hulleth, M., & Kha Phan, T. (2016). *Convergent evolution of the sequence, structure and function of defensins*. Australia : International Springer .
- Shai, Y. (2002). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys* , 55-70.
- Shai, Y. (2002). *Mode of action of active membrane antimicrobial peptides*. Biopolymers.
- Shin, S., Kang, J., Hahm, K., Kim, K., & KIM, Y. (2000). *NMR structural characterization of cecropin A(1-8) - magainin 2(1-12) and cecropin A(1-8) melittin(1-12) hybrid peptides*. Seoul: Munksgaard International Publishers Ltd.
- Subasinghage, A., & Conclon, M. H. (2008). *Conformational analysis of the broad spectrum antibacterial peptide, ranatuerin-2CSa: identification of a full-length helix-turn-helix motif*. Dublin : ELSEVIER.
- Taylor, K., Brran, P., & Julia, D. (2007). *structure activity of defensin peptides in B-defensin peptides* . Edimburgo : Wiley InterScience.
- Téllez, G., & Castaño, J. (2010). *Antimicrobial peptides*. Armenia : Universidad del Quindío .
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. (2000). *The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. PubMed Central.
- Tornirelli, G., & Simonetta, A. (25 de Octubre de 2013). PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE ORGANISMOS PROCARIOTAS YEUCARIOTAS COMO AGENTES TERAPEUTICOS Y CONSERVANTES DE ALIMENTOS. *Revista FABICIB*, 137-177.

- Tsutsumi, V., Sada, E., Hernández, R., & Rivas, B. (Febrero de 2006). Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases. *Salud Pública de México*, 18(1).
- Universidad Nacional de Colombia . (2001). Defensinas: una nueva perspectiva en antibioticoterapia . *Revista de la Facultad de Medicina* , 207-209.
- Valadéz, J. (2011). *Modulación de la Inmunidad innata del Lepidótero plaga Trichoplusia ni (Hubner) expuesto a Bacillus thuringiensis* . México : Universidad Autónoma de Nuevo León .
- Villarruel, R., Huizar, R., Corrales, M., Sanchez, T., & Islas, A. (3 de Diciembre de 2004). Péptidos naturales antimicrobianos: Un escudo esencial de la respuesta inmune. *Red de revistas científicas de América Latina*, VI(3), 170-179.
- Wang, G., Li, X., & Zasloff, M. (2010). A Database View of Naturally Occurring Antimicrobial Peptides: Nomenclature, Classification and Amino Acid Sequence Analysis. *CABI*, 1-21.
- Wu, M., & Hancoks, R. (2000). *Interaction of the bactericidal cyclic antimicrobial cationic peptide with the Interaction of the bactericidal cyclic antimicrobial cationic peptide with the*. Vancouver: Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Columbia Británica.
- Yeman, M., & Yount, N. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS*, 27-55.
- Yong-Ha, P., Hyung Lee, S., Hyoung Kim, D., Sung Kim, J., & Wook Chi, S. (2006). *Solution structure and mode of interaction with the membrane of an antimicrobial peptide gaegurin 4*. Republica de Corea: ELSEVIER .
- Zangger, K., GoBler, R., Khatai, L., Lohner, K., & Jilek, A. (2008). *Structures of the rich diastereomeric peptides in glycine bombinin H2 and H4*. Austria :ELSEVIER.

ANEXOS

ANEXO 1: Clasificación de los péptidos antimicrobianos en función de su estructura

FAMILIA I					
Nombre	Origen	Estructura	Tamaño de la Secuencia	Gen	Actividad Antimicrobiana
Cecropinas I, A, B, D, P1	Drosophila Cerdo Bombyx Cecropia Sarcophaga	2 hélices anfipáticas	35-39 aa	Genes de cecropina, controlados por el factor de transcripción Cif	Gram -: <i>S. typhimurium</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>P. aeruginosa</i> . Gram +: <i>Bacillus megaterium</i>
Andropinas	Drosophila	2 hélices anfipáticas	32 aa	Ligado al clúster de cecropina	Antibacteriana y hemolítica
Ceratotoxinas	<i>Cerratis capitata</i>	2 hélices anfipáticas	-	-	Antibacteriana y hemolítica
Seminalplasmina	Semen de toro	2 hélices anfipáticas	47 aa	FALL-39	Antibacteriana: <i>E. coli</i> y hemolítica
Magaininas	Piel y estómago de Xenopus	2 hélices anfipáticas	23 aa	-	Gram +, Gram -, protozoarios y hongos

Bombinina H3-H5	Especies de Bombina y Rana	No forma hélice anfipática	27-34 aa	-	Antibacteriana y hemolítica
Dermaseptina	<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	2 hélices anfipáticas	34 aa	-	Fungicida
FAMILIA II					
Brevinina 1 Brevinina 2 Brevinina 1E Brevinina 2E	Piel de rana Rana japonesa Rana Europea	Forma de asa en el extremo C y una cola larga	7 aa	-	Antibióticos potentes Brevinina 2: Hemolítico fuerte
Esculentina	Rana Esculenta	Forma de asa en el extremo C y una cola larga	7 aa	-	Antibacteriana: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Ranalexina	Rana	Forma de asa en el extremo C y una cola larga	20 aa	-	Amplio espectro: Gram + y Gram-
FAMILIA III					

Apidecinas Abaecina Hymenoptaecina Defensina	Miel de abeja	Formado por un hélice alfa y lámina beta	18 aa	-	Antibacteriana contra Gram – que provocan infecciones bacterias en la abeja
Drosocina	Drosophila	Formado por hélice alfa y lámina beta. Ricos en prolina	19 aa	-	-
Bac 5 Bac 7	Neutrófilos de bovino	Está formado por hélice alfa y lámina beta	43-59 aa	-	Antibacteriana contra Gram -
PR-39	Intestino porcino Médula ósea	Su estructura es rica en prolina y arginina	39 aa	-	Antibacteriana contra Gram – bloqueando la síntesis de ADN
Indolicidina	Neutrófilos de bovino	Dentro de su estructura se encuentran 5 triptófanos	13 aa	-	Antibacteriana: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
Coleoptericina Holotricina 2	Escarabajo	En su estructura posee	7-8 kDa	-	-

		glicina 12%, prolina 10%			
Atacinas Gloverinas	Insectos	Ricos en prolina y glicina	Proteínas 14-20 kDa.	-	Afectan células en crecimiento. Bloqueo de transcripción <i>omp</i> en superficie bacteriana
FAMILIA IV					
Defensinas	PMN de conejo Fagocitos de mamíferos y humanos Células de Paneth de ratones	Está formado por 3 puentes disulfuro	29-34 aa	Cromosoma 8 en humanos y ratones	Antibacteriana contra Gram + y Gram - Fungicida
α-defensinas	Fagocitos de humano, conejo, rata, cuyes y tráquea bovina	6 cistinas unidas	-	-	-
β-defensinas	Neutrófilos de bovino Células epiteliales Células de Paneth de ratón	Hoja plegada beta	-	-	Se inactiva con iones en moco traqueal-fibrosis quística
Galanicinas	Neutrófilos de pollos	Semejante a β -defensinas	-	-	Antibacteriana contra Gram +
NK lisina	Intestino porcino	Tiene una estructura	.	-	Algunas bacterias, antitumoral, no lisa eritrocitos.

		similar a la proteína NK65 en humano			
Amibaporos	<i>E. histolytica</i>	-		-	Lisis bacteriana

Nota: Clasificación de los PAMs de acuerdo a sus propiedades químicas, bioquímicas y estructura tridimensional. Villarruel, et al., (2004). *Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune*. Tomado de: Red de Revistas Científicas de América Latina. Centro Universitario de Ciencias de la Salud de Guadalajara. México.

ANEXO 2: Péptidos antimicrobianos estudiados: código PDB y UniProt

TIPO	NOMBRE	ABREVIATURA	ESPECIE	CÓDIGO PDB/ CÓDIGO UNIPROT	E-VALUE	SCORE	IDENTITY (%)
CECROPINAS	Cecropina A (1-8)	<i>CRP A</i>	<i>Xenopus ruwenzoriensis</i>	1D9J C0HKN6	4.5e-3	87	100.0
	Cecropina	<i>CRP</i>	<i>Xenopus laevis</i>	P11006	1.6e-2	87	100.0
	Cecropina B2	<i>CRP B2</i>	<i>Xenopus borealis</i>	C0HK84	8.4e-1	73	91.7
	Cecropina GK	<i>CRP GK</i>	<i>Aedes aegypti</i>	2MMM A0A6E8P802	5.9e-23	218	100.0
	Cecropina A1	CRP A1	<i>Aedes albopictus</i>	P81417	6.7e-20	199	91.7
	Cecropina A2	CRP A2	<i>Aedes albopictus</i>	Q963B0	8.8e-19	192	88.9
	Cecropina B Tipo 2	CRP BT2	<i>Aedes albopictus</i>	Q963A9	4.1e-18	188	88.9

	Cecropina B Tipo 1	CRP BT1	Aedes albopictus	Q9Y0Y0	4.1e-18	188	88.9
	Cecropina C Tipo 2	CRP CT2	Aedes albopictus	Q963A8	8.1e-18	186	86.1
	Cecropina C Tipo 1	CRP CT1	Aedes albopictus	Q9Y0X9	8.1e-18	186	86.1
	Cecropina A	CRP AP	<i>Culex pipiens</i>	Q86PR6	1.2e-17	185	86.1
	Cecropina A	CRP AQ	<i>Culex quinquefasciatus</i>	B0WWG8	1.2e-17	185	86.1
	Cecropina A	CRP AG	<i>Anopheles gambiae</i>	P82290	6.3e-16	174	84.8
	Cecropina A	CRP AD	<i>Anopheles darlingi</i>	W5JK17	7.1e-16	174	82.4
	Cecropina P1	CRP P1	Ascaris suum	2N92 P14661	6.3e-23	223	100.0
	Cecropina P2	CRP P2	Ascaris suum	Q5H7N6	1.4e-20	209	96.8
	Cecropina P2	CRP P2C	<i>Toxocara canis</i>	A0A0B2VYR4	1.9e-19	203	93.5

	Cecropina P3	CRP P3	Ascaris suum	Q5H7N5	1.8e-19	202	93.5
	Cecropina P4	CRP P4	Ascaris suum	Q5H7N4	3.1e-15	175	87.1
	Cecropina	CRP X	Papilio xunthus	2LA2 A0A0N1IQG2	3.1e-15	175	87.1
MAGAININAS	Magainina 2	MGN 2	<i>Xenopus laevis</i>	4MGP P11006	2.5e-11	147	87.0
	Magainina R1	<i>MGN R1</i>	<i>Xenopus ruwenzoriensis</i>	C0HKN6	7.5e-13	147	87.0
	Magainina B2	<i>MGN B2</i>	<i>Xenopus borealis</i>	C0HK84	1.5e-6	109	69.6
	Magainina B1	<i>MGN B1</i>	<i>Xenopus borealis</i>	C0HK83	1.6e-3	90	68.4
	Magainina BM2	<i>MGN BM2</i>	<i>Xenopus boumbaensis</i>	C0HKL6	1.9e-3	90	60.9

BOMBININAS	Bombinina H2	<i>BMN H2</i>	<i>Bombina variegata</i>	2AP7 P82285	1.8e-11	137	100.0
	Bombinina H1/H3	<i>BMN H1/H3</i>	<i>Bombina variegata</i>	P82282	1.8e-10	131	95.0
	Bombinina H4	<i>BMN H4</i>	<i>Bombina variegata</i>	2AP8 P82284	3.9e-10	129	100.0
DERMASEPTINAS	Dermaseptina 4	<i>DRP 4</i>	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	2DD6 P80280	3.1e-3	86	92.3
	Dermaseptina DA2	<i>DRP DA2</i>	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	O93452	3.3e-1	75	100.0
	Dermaseptina DI2	<i>DRP DI2</i>	<i>Phyllomedusa distincta</i>	P83639	1.3	70	84.6
	Dermaseptina K	<i>DRP K</i>	<i>Phyllomedusa distincta</i>	2K9B P83638	2.9e-24	223	100.0
	Dermaseptina J7	<i>DRP J7</i>	<i>Phasmahyla jandaia</i>	P86639	2.9e-24	223	100.0
	Dermaseptina S6	<i>DRP S6</i>	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	Q7T3K9	1.5e-20	211	93.9

	Dermaseptina B2	<i>DRP B2</i>	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	P31107	3.4e-18	196	90.9
	Dermaseptina B7	<i>DRP B7</i>	<i>Phyllomedusa bicolor</i>	Q90ZK3	1.2e-14	173	81.8
	Dermaseptina DA4	<i>DRP DA4</i>	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	P0DTD5	1.0e-15	171	87.5
	Dermaseptina DA3	<i>DRP DA3</i>	<i>Agalychnis dacnicolor</i>	O93453	1.1e-12	160	81.2
	Dermaseptina H6	<i>DRP H6</i>	<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	P84599	1.0e-12	153	81.2
	Dermaseptina H9	<i>DRP H9</i>	<i>Pithecopus hypochondrialis</i>	P84880	2.1e-12	151	81.2
	Dermaseptina I	<i>DRP I</i>	<i>Phyllomedusa tarsius</i>	P84921	9.3e-12	146	72.7
	Dermaseptina S4	<i>DRP S4</i>	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>	2DCX P80280	3.1e-3	86	92.3
	Dermcidina	DRM S	<i>Homo Sapiens</i>	2YMK P81605	2.5e-31	282	100.0
	Dermcidina	DRM G	<i>Gorilla</i>	A0A2I2ZCZ9	2.5e-31	282	100.0

	Dermcidina	<i>DRM PA</i>	<i>Pan paniscus</i>	A0A2R9C2S7	2.5e-31	282	100.0
	Dermcidina	<i>DRM PT</i>	<i>Pan troglodytes</i>	H2Q650	2.5e-31	282	100.0
	Dermcidina	<i>DRM CA</i>	<i>Colobus angolensis palliatus</i>	A0A2K5I090	1.1e-27	259	89.6
	Dermcidina	<i>DRM MF</i>	<i>Macaca fascicularis</i>	G7PHX5	9.3e-27	253	87.5
	Dermcidina	<i>DRM ML</i>	<i>Mandrillus leucophaeus</i>	A0A2K5ZGK9	9.3e-27	253	87.5
	Dermcidina	<i>DRM C</i>	<i>Cercocebus atys</i>	A0A2K5MP37	9.3e-27	253	87.5
	Dermcidina	<i>DRM P</i>	<i>Papio anubis</i>	A0A2I3LEF6	5.6e-26	248	85.4
	Dermcidina	<i>DRM CS</i>	<i>Chlorocebus sabaues</i>	A0A0D9QZ87	1.1e-24	240	82.4
	Dermcidina	<i>DRM MN</i>	<i>Macaca nemestrina</i>	A0A2K6C6U7	2.6e-22	224	86.0

CATELICIDINAS	Catelicidina 3	<i>CTN 3BT</i>	<i>Bos taurus</i>	4JWC P19661	7.4e-9	127	100.0
	Catelicidina 3	<i>CTN 3BI</i>	<i>Bos indicus</i>	A0A6P5DNN5	7.4e-9	127	100.0
	Catelicidina 3	<i>CTN 3BS</i>	<i>Bison</i>	A0A6P3J261	7.4e-9	127	100.0
	Catelicidina 3	<i>CTN 3LV</i>	<i>Lipotes vexillifer</i>	A0A340WCK1	1.8e-6	111	93.8
	Catelicidina 3	<i>CTN 3OA</i>	<i>Ovis aries</i>	P50415	1.0e-5	106	87.5
	Bac 7	<i>BAC 7</i>	<i>Capra hircus</i>	A0A452ELY4	1.0e-5	106	87.5
BREVININAS	Brevinina 1BYa	<i>BVN 1BYa</i>	<i>Rana Boyllii</i>	6R96 P84111	1.4e-13	152	95.7
	Brevinina 1BYb	<i>BVN 1BYb</i>	<i>Rana Boyllii</i>	P84112	1.4e-11	140	91.3

	Brevinina 1BYc	<i>BVN 1YBc</i>	<i>Rana Boyllii</i>	P84113	4.1e-7	113	78.3
	Brevinina ALa	<i>BVN ALa</i>	<i>Amolops loloensis</i>	A0SN38	6.0e-3	91	69.6
	Brevinina 1MT2	<i>BVN 1MT2</i>	<i>Amolops mantzorum</i>	E1B241	6.0e-3	91	69.6
	Brevinina 1MT1	<i>BVN 1MT1</i>	<i>Amolops mantzorum</i>	E1B240	8.5e-3	90	69.6
	Brevinina 1HN1	<i>BVN 1HN1</i>	<i>Odorrana haunanensis</i>	E7EKC4	1.7e-2	88	65.2
	Brevinina ALb	<i>BVN ALb</i>	<i>Amolops loloensis</i>	A0SN42	2.6e-1	80	70.8
	Brevinina 1PLc	<i>BVN 1PLc</i>	<i>Lithobates palustris</i>	A7WNV4	3.6e-1	79	60.9
	Brevinina 1La	<i>BVN 1La</i>	<i>Rana luteiventris</i>	P82825	2.1e-1	78	65.2
	Brevinina 1Ecb	<i>BVN 1Ecb</i>	<i>Pelophylax ridibundus</i>	P86150	2.9e-1	77	60.9

	Brevinina 1Vb	<i>BVN 1Vb</i>	<i>Odorrana versabilis</i>	Q1JS93	7.1e-1	77	60.9
	Brevinina 1PLb	<i>BVN 1PLb</i>	<i>Lithobates palustris</i>	A7WNV3	7.1e-1	77	60.9
	Brevinina 1Pe	<i>BVN 1Pe</i>	<i>Lithobates pipiens</i>	P82845	4.2e-1	76	62.5
	Brevinina 1E	<i>BVN 1E</i>	<i>Pelophylax saharicus</i>	P84839	4.2e-1	76	60.9
ESCULENTINAS	Esculentina 1A	<i>ECL 1A</i>	<i>Pelophylax lessonae</i>	2N6M P40843	6.0e-11	140	100.0
	Esculentina 1R	<i>ECL 1R</i>	<i>Pelophylax ridibundus</i>	P86018	1.7e-9	131	95.0
	Esculentina 1B	<i>ECL 1B</i>	<i>Pelophylax saharicus</i>	P84841	1.7e-9	131	95.0
	Esculentina 1B	<i>ECL 1BP</i>	<i>Pelophylax lessonae</i>	P40844	4.4e-9	131	95.0
	Esculentina 1	<i>ECL 1PL</i>	<i>Pelophylax lessonae</i>	P32414	2.8e-7	117	90.0

	Esculentina 1	<i>ECL 1PE</i>	<i>Pelophylax saharicus</i>	P84840	1.1e-5	107	85.0
	Esculentina 1SIa	<i>ECL 1SIa</i>	<i>Odorrana ishikawae</i>	F1T149	4.0e-3	91	75.0
	Esculentina 1HSa	<i>ECL 1HSa</i>	<i>Odorrana hosii</i>	P0C8T8	8.9e-1	75	70.0
	Esculentina 1ISb	<i>ECL 1ISb</i>	<i>Odorrana ishikawae</i>	F1T150	5.4	70	65.0
RANALEXINAS	Ranatueringa 2csa	<i>RTN 2CSA</i>	<i>Rana cascadae</i>	2K10 V9GZ92	2.6e-23	221	100.0
	Ranatueringa 2La	<i>RTN 2La</i>	<i>Rana luteiventris</i>	P82828	1.3e-20	200	90.6
	Ranatueringa 2BYa	<i>RTN 2BYa</i>	<i>Rana boylei</i>	P84114	8.0e-17	177	81.2
	Ranatueringa 2Lb	<i>RTN 2Lb</i>	<i>Rana luteiventris</i>	P82829	1.2e-16	176	81.2
	Ranatueringa 2SPb	<i>RTN 2SPb</i>	<i>Lithobates septentrionalis</i>	P0DQK4	2.9e-12	150	84.6

	Ranaturina 2SPa	<i>RTN 2SPa</i>	<i>Lithobates septentrionalis</i>	P0DQK3	2.9e-12	150	84.6
	Ranaturina 2Ca	<i>RTN 2CA</i>	<i>Lithobates clamitans</i>	P82878	2.2e-7	119	81.8
	Ranaturina 2	<i>RTN 2LC</i>	<i>Lithobates catesbeianus</i>	P82742	6.0e-6	110	81.8
	Ranaturina 2PLa	<i>RTN 2PLa</i>	<i>Lithobates palustris</i>	A7WNV6	3.4e-5	109	72.7
	Ranaturina 2P	<i>RTN 2P</i>	<i>Lithobates pipiens</i>	Q8QFQ4	4.8e-5	108	72.7
DEFENSINAS	Defensina 5	<i>DFN 5HS</i>	<i>Homo sapiens</i>	4E82 Q01523	5.8e-25	240	96.9
	Defensina Alpha 5	<i>DFN A5G</i>	<i>Gorilla</i>	G3RJ35	4.6e-19	202	84.4
	Defensina 5	<i>DFN 5PT</i>	<i>Pan troglodytes</i>	Q5G861	4.5e-17	189	81.2
	Defensina 6	<i>DFN 6HS</i>	<i>Homo sapiens</i>	3QTE Q01524	6.0e-26	247	96.9

	Defensina 6	<i>DFN 6PT</i>	<i>Pan troglodytes</i>	Q5G860	6.0e-26	247	96.9
	Defensina Alpha 6	<i>DFN A6M</i>	<i>Macaca fascicularis</i>	G7PCC7	2.7e-21	217	87.1
	Alpha defensina 4	<i>DFN A4M</i>	<i>Mus musculus</i>	2LEW P28311	8.6e-26	245	96.9
	Alpha defensina 20	<i>DFN 20AM</i>	<i>Mus musculus</i>	Q45VN2	1.8e-6	118	64.5
	Beta defensina 1	<i>BDFN 1HS</i>	<i>Homo sapiens</i>	1IJV P60022	1.1e-27	249	100.0
	Beta defensina 1	<i>BDFN 1PP</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>	P61263	1.1e-27	249	100.0
	Beta defensina 1	<i>BDFN 1PT</i>	<i>Pan troglodytes</i>	P60023	2.0e-25	235	97.2
	Beta defensina 12	<i>BDFN 12B</i>	<i>Bos taurus</i>	1BNB P46170	6.2e-32	270	100.0
	Beta defensina 13	<i>BDFN 13B</i>	<i>Bos taurus</i>	P46171	8.4e-32	270	100.0

	Beta defensina 11	<i>BDFN 11B</i>	<i>Bos taurus</i>	P46169	7.9e-28	249	94.6
	Beta defensina 2	<i>BDFN 2HS</i>	<i>Homo sapiens</i>	1FD4 015263	6.8e-33	282	100.0
	Beta defensina 8	<i>BDFN 8M</i>	<i>Mus musculus</i>	1E4R Q91V82	1.8e-27	246	100.0
	Beta defensina 3	<i>BDFN 3M</i>	<i>Mus musculus</i>	Q9WTL0	6.9e-9	130	63.9
	Beta defensina 7	<i>BDFN 7M</i>	<i>Mus musculus</i>	Q91V70	1.6e-7	122	67.7
	Defensina HNP-3	<i>DFN HNP-3</i>	<i>Homo sapiens</i>	1DFN P59666	1.1e-26	250	100.0
	Neutrophil Defensina 1	<i>NEU DFNIH</i>	<i>Homo sapiens</i>	P59665	2.1e-25	242	100.0
	Neutrophil Defensina 1	<i>NEU DFNIP</i>	<i>Pan troglodytes</i>	Q5G863	5.3e24	233	96.6
	Neutrophil Defensina 4	<i>NEU DFN4H</i>	<i>Homo sapiens</i>	6DMQ	1.5e-26	251	97.0

				P12838			
	Neutrophil Defensina 4	<i>NEU DFN4P</i>	<i>Pan troglodytes</i>	Q5G862	1.5e-26	251	97.0
DROSOCINAS	Drosocina	<i>DRC DM</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	3EZR P36193	9.5	62	100.0
	Drosocina	<i>DRC DS</i>	<i>Drosophila simulans</i>	Q6XMH8	9.5	62	100.0
	Drosocina	<i>DRC DG</i>	<i>Drosophila guanche</i>	A0A3B0J2E2	9.5	62	100.0
	Drosocina	<i>DRC DP</i>	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	A0A6I8UU05	9.5	62	100.0
PR-39	Proteína Antibacteriana PR-39	<i>PAS PR-39</i>	<i>Sus scrofa</i>	4EZO P80054	4.9e-8	121	100.0
	Proteína Antibacteriana PR-39	<i>PAP PR-39</i>	<i>Physeter macrocephalus</i>	A0A455AGF7	1.5e-3	91	86.7
GAEGURINAS	Gaegurina 4	<i>GRN 4</i>	<i>Glandirana rugosa</i>	2G9L P80398	8.6e-24	227	100.0
	Gaegurina 5	<i>GRN 5</i>	<i>Glandirana rugosa</i>	P80956	8.4e-22	207	89.2

ANEXO 3: Alineamiento múltiple de secuencias de 126 diferentes péptidos antimicrobianos

```

CRP_A      9 .....GIG-KFHSAK-KF.....
CRP_1     7 .....GIG-KFHSAG-KFG.....KAFVGE

CRP_2     15 .....GIG-KFHSAK-KFG.....KAFVGE
CRP_B2    1 .....GIG-KFHSAG-KFG.....

CRP_GK    16 -R.....V.....F...K-ASE-KA PVVV-GIK.....AIGK
CRP_A1    39 -R.....V.....F...K-ASE-KA PVAV-GIK.....AIGK
CRP_A2    39 -R.....V.....F...K-ASE-KA PVAV-GIK.....AIGK
CRP_BT2   40 -R.....V.....F...K-ASE-KA PVLV-GYK.....AIGK
CRP_BT1   40 -R.....V.....F...K-ASE-KA PVLV-GYK.....AIGK
CRP_CT2   39 -R.....V.....F...N-AAE-KA PVVA-GAK.....AIGK
CRP_CT1   39 -R.....V.....F...N-AAE-KA PVVA-GAK.....AIGK
CRP_AP    39 -R.....V.....F...K-ASE-KA PVVT-GFK.....AIGK
CRP_AQ    39 -R.....V.....F...K-ASE-KA PVVT-GFK.....AIGK
CRP_AG    39 -R.....V.....F...K-AAE-KA PVVA-GVK.....AIG

CRP_AD    40 -R.....V.....F...N-AAE-KA PVAV-GVK.....AIGK
CRP_P1    16 KRIS.....E
CRP_P2    29 KRIS.....E
CRP_P2C   39 KRIA.....E
CRP_P3    29 KRIS.....E
CRP_P4    29 KRIS.....E
CRP_X     14 .....PKW-KIFKKIE-KVG.....RNVVDG

MGN_2     5 .....GIG-KFHSAK-KFG.....KAFVGE
MGN_R1    1 .....GIG-KFHSAK-KFG.....KAFVGE
MGN_B2    1 .....GIG-KFHSAG-KFG.....KAFVGE
MGN_B1    1 .....G...KFHSAG-KFG.....KAFVGE
MGN_BM2   1 .....GVS-KIHSAG-KFG.....KAFVGE
BMN_H2    20 .....I
BMN_H1_H3 21 .....G

```


BMN_H4

21

G

DRP_4	9	-K	VLKAA	AK	ALNAV
DRP_DA2	8	-E	EQEDDEQ-SEE-KR		ALWKT
DRP_DI2	13			AAG-K	AAINA
DRP_K	12	-E	AAKAAK-AAC	K	AAINA

DRP_J7	12	-EAAKAAAK-AA	CKAA	NA		
DRP_S6	16	-EAAKAAAK-AA	CKAA	NA		
DRP_B2	16	-EAAKAAAK-AA	CKAA	GA		
DRP_B7	15	-EAAKAALK-AA	CKAA	GA		
DRP_DA4	12	-AAKAAAK-AA	CKAA	GA		
DRP_DA3	18	-AAK-AA	CKAA	GA		
DRP_H6	12	-EAA	AAAK-AA	CK	AVNA		
DRP_H9	12	-EAA	AAAK-AA	CQ	AA	NA	
DRP_1	12	-EAAK	AA	CK	AA	NK	
DRP_S4	9	-KVLKA						
DRM_S	9	-D	-----GAK-KA	V	GGLG-KL	C	--KDAVE-DLESVGKGA	V	HD
DRM_G	12	-D	-----GAK-KA		GGLG-KL		--KDAVE-DLESVGKGA		HD
DRM_PA	13	-D	-----GAK-KA		GGLG-KL		--KDAVE-DLESVGKGA		HD
DRM_PT	13	-D	-----GAK-KA		GGLG-KL		--KDAVE-DLESVGKGA		HD
DRM_CA	13	-E	-----GAK-KT		GGLG-NL		--KDAVE-DLESVGKGA		HD
DRM	13	-E	-----GAK-NT		GGLG-NL		--KDAVE-DLESVGKGA		HD
DRM_ML	13	-E	-----GAK-NT		GGLG-NL		--KDAVE-DLESVGKGA		HD
DRM_C	13	-E	-----GAK-NT		GGLG-NL		--KDAVE-DLESVGKGA		HD
DRM_P	13	-E	-----GAK-NT		GGLG-NL		--KDAVE-DLESVGKGG		HD
DRM_CS	12	-E	-----GAK-NT		GGLG-NL		--KDAVE-DLESVGKAV		GA
DRM_MN	19	-E	-----GAK-NT		GGLG-NL		--KDAVE-DLESVGKGA		HD
CTN_3BT	8		PRLPRPR		P				
CTN_3BI	18		PRLPRPR	-----P-RP	PFPRPGPR	-----P--	PR		
CTN_3BS	32		PRLPRPR	-----P-RP	PFPRPGPR	-----P--	PR		
CTN_3LV	18		PRLPRPRPRPW	F-PPR-FP	PRI		
CTN_3OA	18		PRLPRPR	-----PRP	-----R-PRP-RS	PLPRPQPR	-----R--	PR	
BAC_7	18		PRLPRPR	-----PRP	-----R-PRP-RS	PLPRPQPR	-----R--	PR	
BVN_1BYa	2				IPILA-SLA		AKFGPK		
BVN_1BYb	2				IPILA-SLA		AKLGPK		
BVN_1YBc	2				IPILA-SLA		ATLGPK		
BVN_ALa	17	-E	----E-RRDDDEMD	----V--E-VEK-RF	PMLA-GL		ANF	--	
BVN_1MT2	17	-E	----E-RRDDDEMD	----V--E-VEK-RF	PMLA-GL		ANF	--	
BVN_1MT1	17	-E	----E-RRDDDEMD	----V--E-VEK-RF	PLVA-SLA		ANF	--	
BVN_1HN1	17	-E	----ERRDDPDERD	----V--E-VEK-RF	PLIA-SL		ANF	--	
BVN_ALb	17	-E	----E-RRDDDEMD	----V--E-VEK-RF	PLAV-SL		ANF	--	
BVN_1PLc	17	-E	----R-RDEPDEMD	----V--E-VEK-RF	PVIA-GV		AKF	--	

BVN_1La

2

PMLA-GL

ASM PK

```

BVN_1Ecb      2 ..... PLLA-GLA ..... ANFFPK BVN_1Vb
17 -E-----R-RDEPDEM-----V--E-VEK-RF PLIA-GL ANF--- BVN_1PLb 17 -E-
---R-RDEPDEM-----V--E-VEK-RF PLIA-GL ANF---
BVN_1Pe       2 ..... PPIA-SVA ..... AKVFPK
BVN_1E        2 ..... PLLA-GLA ..... ANF---PK

```

```

ECL_1A        10 -K ..... IKN-LL SGL ..... K .....
ECL_1R        10 -K ..... LKN-LL SGL ..... KSVGKEVGMD
ECL_1B        10 -K ..... LKN-LL SGL ..... KNVGKEVGMD
ECL_1BP       22 ..... IKR-GIFSKE ..... AGKKLKNL
ECL_1PL       10 -K ..... IKN-LL SGL ..... KNVGKEVGMD
ECL_1PE       10 -K ..... IKN-LL SGL ..... KNVGKEVGMD
ECL_1SIa      22 ..... IKR-GIFSKE ..... AGKGIKNL
ECL_1HSa      10 -A ..... IKN-LF KGA ..... KNIGKEVGMD
ECL_1ISb      22 ..... IKR-RIFSKE ..... GGKAIKNL
RTN_2CSA      5 ..... SF ..... KGVAKGVAKD
RTN_2La       5 ..... SF ..... KGVAKGVAKD
RTN_2BYa      5 ..... TF ..... KGLAKGVAKD
RTN_2Lb       5 ..... SI ..... KGVAKGVAKN
RTN_2SPb      6 ..... TV ..... KDVAKDVAKD
RTN_2SPa      6 ..... TV ..... KDVAKDVAKD
RTN_2CA       6 ..... TL ..... KGAAK ..... D
RTN_2LC       6 ..... TL ..... KGAAK ..... D

```

```

RTN_2PLa     26 -E ..... VKR-GI DTV ..... KNVAKNLAGQ
RTN_2P       26 -E ..... VKR-GL DTV ..... KNVAKNLAGH
DFN_5HS 7 -Q-----ARA-T---CYC-RTG---RCATRESLSGV CE
DFN_A5G      7 -Q-----ARA-T---CYC-RTG---PCTNRESLSGV ---- CE
DFN_5PT      7 -Q-----ARA-T---CYC-RIG---HCTILESLSGV ---- CE
DFN_6HS      7 -T-----RAFTCH-CRR-SCYSTEY-SYG---T ----- CTVMG
DFN_6PT      7 -T-----RAFTCH-CRR-SCYSTEY-SYG---T ----- CTVMG
DFN_A6M      7 -T-----RSFTCN-CRR-SCYSTEY-SYG---T ----- CTVMG
DFN_A4M     13 -C ..... R-K-GHCKR ..... GERVRGT
DFN_20AM    13 -C ..... R-K-GGCNR ..... GEQVYGT
BDFN_1HS    12 -C ..... L-Y-SACPI ..... FTKIQGT

```

BDFN_1PP 12 -C.....L-Y-SACPI.....FTKIQGT
BDFN_1PT 12 -C.....L-Y-SACPI.....FTKIQGT

BDFN_12B 12 -C.....IPIRCPVPMR-QIC.....TCFGRP
BDFN_13B 12 -C.....IPIRCPVPMR-QIC.....TCFGRP

BDFN_11B	12	-C.....IPIRCPGPMR-QIG.....TCFGRP
BDFN_2HS	12	-C.....HPVFCPRRYK-QIG.....TCGIPG
BDFN_8M	12	-C.....QY-RCIGLRH-KIG.....TCGS-P
BDFN_3M	9	-C.....WN-RCIGNTR-QIG.....SCGVPF
BDFN_7M	12	-C.....LQ-RCIGLFH-KIG.....TCNF-R
DFN_HNP-3	9CIAGE.....RRYGTCI.....
NEU_DFN1H	13CIAGE.....RRYGTCI.....

NEU_DFN1P	9	-Q-----IPA-DNPEVVV-SLAWD-----ESLAPKHPG-
NEU_DFN4H	11RRTEL-RVIG.....NCLIGG
NEU_DFN4P	11RRTEL-RVIG.....NCLIGG

DRC_DM	23	-S-----LLSQML--HYDPN-KRISAKA-AL.....HPFFQD
DRC_DS	12	-R.....PI--R-VRR-EAIAIED-HL Q.....AAIR-
DRC_DG	6VRR-EAIAIAD-RLE LI.....LPAVTA
DRC_DP	10	-R-----PI--R-VRR-EAIAIAD-RLG--LI-----QPAVA-
PAS_PR-29	7	PYLP RPR.....P.....
PAP_PR-39	14	PYLP RPR.....PI PWF.....PP
GRN_4	15K.....DLVK-GAA.....QGVIST
GRN_5	15K.....DLIK-GAA.....QGVIST