

Diseño de Péptidos Antimicrobianos Derivados de Dermaseptina S4

Yesid Alexander Sánchez Acosta

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director:

Doctor Delmis Omar Camargo Rodríguez

Codirector:

Doctor Sergio Orduz Peralta

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

Agradecimientos

A Karen Juliet Ramirez Quintero por haberse involucrado con mi trabajo y aportar tanto con su valioso esfuerzo.

A Paula Andrea Jaramillo por sus consejos, asesorías y ayuda, por ser una excelente compañera de laboratorio.

A mis tutores, Sergio Orduz Peralta y Omar Camargo Rodríguez, por su asesoría, apoyo y acompañamiento.

A la profesora Olga Inés Montoya, por su asesoría y apoyo, muchas gracias.

Al profesor Juan Bautista López Ortiz, por su enorme apoyo, es un gran hombre al que le tengo mucho respeto.

A Luisa Fernanda Granger Serrano, por su apoyo invaluable, muchísimas gracias.

A toda mi familia y amigos por su apoyo, su comprensión, amor y amistad, ingredientes que me sirvieron cada día para ser una persona tranquila y entusiasta.

A mi novia, Sara Quiroz Suarez, por apoyarme, acompañarme y aconsejarme, una persona fundamental en el logro alcanzado con este trabajo.

A mi abuela, Reina Vásquez Arteaga, por su infinito apoyo y compañía. Es una persona que incondicionalmente aporta con amor y con él me nutro para vivir cada día.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras.....	V
Lista de tablas	VI
Introducción	1
1. Objetivos.....	5
1.1 Objetivo general.....	5
1.1 Objetivos específicos	5
2. Marco teórico.....	7
2.1 Resistencia antibacteriana a los antibióticos.....	7
2.2 Péptidos antimicrobianos como alternativa a los antibióticos convencionales..	8
2.3 Selectividad celular	9
2.4 Diseño racional de péptidos antimicrobianos	10
2.4.1 Cationicidad	10
2.4.2 Anfipaticidad	11
2.4.3 Hidrofobicidad	11
3. Capítulo 1.....	13
Potencial de péptidos derivados de Dermaseptina S4 para controlar la contaminación bacteriana en semen bovino	13
3.1 Resumen	13
3.2 Introducción	15
3.3 Origen de la contaminación bacteriana del semen bovino	18
3.4 Efectos de la contaminación bacteriana del semen sobre la calidad espermática.....	19
3.5 Resistencia bacteriana a antibióticos en criopreservación de semen bovino .	20
3.6 Metodología.....	22
3.6.1 Localización	22
3.6.2 Péptidos.....	22
3.6.3 Cálculo de parámetros fisicoquímicos y estructurales	22
3.6.4 Bacterias.....	23
3.6.5 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	23
3.6.6 Prueba de hemólisis.....	24
3.6.7 Prueba de movilidad espermática	24
3.6.8 Cálculo del índice relativo de selectividad (IRS)	25
3.7 Resultados.....	26
3.7.1 Diseño y selección de péptidos derivados de Dermaseptina S4.....	26

3.7.2	Agregación en solución.....	28
3.7.3	Actividad antibacteriana.....	30
3.7.4	Toxicidad contra células de mamífero.....	31
	▪ Actividad hemolítica	31
	▪ Actividad sobre la movilidad espermática.....	32
3.8	Discusión.....	34
4.	Capítulo 2	41
	Actividad biológica de derivados de Dermaseptina S4 con diferente distribución de aminoácidos catiónicos	41
4.1	Resumen.....	41
4.2	Introducción.....	43
4.3	Metodología	45
4.3.1	Localización	45
4.3.2	Diseño de péptidos	45
4.3.3	Análisis bioinformático	45
4.3.4	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	46
4.3.5	Prueba de hemólisis	47
4.4	Resultados	48
4.4.1	Diseño de péptidos	48
4.4.2	Actividad antibacteriana.....	50
4.4.3	Actividad hemolítica.....	51
4.5	Discusión.....	53
	A. Anexo: Peptide ID 1.0: Un programa para buscar potenciales péptidos bioactivos en secuencias de proteínas	57
	Bibliografía	73

Lista de figuras

	Pág.
Figura 3-1: Representación helicoidal.....	28
Figura 3-2: Perfil de hidrofobicidad de Dermaseptina S4	29
Figura 3-3: Perfil de agregación de Dermaseptina S4 y sus derivados	30
Figura 3-4: Actividad hemolítica de derivados de Dermaseptina S4	32
Figura 3-5: Efecto de los péptidos derivados de Dermaseptina S4 sobre la movilidad espermática progresiva	33
Figura 4-1: Diagrama helicoidal del péptido molde K4S4(1-15)a	46
Figura 4-2: Diagrama helicoidal de los péptidos seleccionados y evaluados	50
Figura 4-3: Actividad hemolítica.....	51

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 3-1: Péptidos derivados de Dermaseptina S4 analizados en este trabajo	26
Tabla 3-2: Actividad biológica de los péptidos derivados de Dermaseptin S4	31
Tabla 4-1: Parámetros fisicoquímicos y estructurales	48
Tabla 4-2: Actividad antimicrobiana y propiedades fisicoquímicas y estructurales de los péptidos seleccionados.....	49

Introducción

Desde el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos, muchas enfermedades infecciosas han sido controladas gracias a la amplia variedad y efectividad de estos medicamentos, favoreciendo la esperanza de vida de humanos y animales. Sin embargo, en los últimos años el tratamiento de las infecciones bacterianas se ha complicado debido al incremento acelerado de resistencia bacteriana contra los antibióticos convencionales, volviendo a ser una de las principales causas de muerte cada año en todo el mundo (Rice, 2003; OMS, 2014; Schmidtchen *et al.*, 2014). Además, el bajo número de nuevos antibióticos que entran en fase de desarrollo clínico contribuye a la insuficiente disponibilidad de medicamentos eficaces (von Nussbaum *et al.*, 2006; Schmidtchen *et al.*, 2014), generando una necesidad urgente de agentes antibacterianos alternativos (Rice 2003; Demain y Sanchez, 2009), como los péptidos antimicrobianos (Schmidtchen *et al.*, 2014).

Los péptidos antimicrobianos son pequeñas moléculas producidas por todo tipo de organismos en la naturaleza, tanto eucariotas como procariotas, y funcionan como componentes clave del sistema inmune innato, actuando como la primera barrera de defensa natural contra microorganismos invasores (Lehrer y Ganz, 1996; Zasloff, 2002; Brogden, 2005). Generalmente, este péptidos presentan una rápida y potente actividad (en el rango micromolar) contra un amplio espectro de microorganismos, como bacterias, virus, hongos y protozoos (Feder *et al.*, 2000; Belaid y Hani, 2002; Zasloff, 2002; Lorin *et al.*, 2005; Zairi *et al.*, 2008), incluso contra bacterias resistentes a los antibióticos convencionales, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente (Yuin Ong *et al.*, 2014). En consecuencia, los péptidos antimicrobianos reciben gran interés para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos que podrían servir como complemento o alternativa a los antibióticos convencionales en una amplia variedad de posibles aplicaciones (Yuin Ong *et al.*, 2014).

Los péptidos antimicrobianos se clasifican con base en su estructura secundaria como: hélices- α , láminas- β , extendidos y bucles (Zasloff, 2002; Hancock y Sahl, 2006). Las hélices- α constituyen la mayoría de los péptidos antimicrobianos naturales conocidos (Yeaman y Yount, 2003; Matsuzaki, 2009; Teixeira *et al.*, 2012). Los péptidos β -laminares son clasificados así por la formación de láminas- β antiparalelas estabilizadas por dos o más enlaces disulfuro. La siguiente clase de péptidos antimicrobianos contienen altas proporciones de ciertos aminoácidos como triptófano, histidina y prolina. Por último, la estructura de los péptidos en bucle ocurre por la formación de un solo enlace disulfuro, amida o peptídico (Powers y Hancock, 2003).

Desde su descubrimiento (Zasloff, 1987), miles de péptidos antimicrobianos naturales y sintéticos han sido reportados (Wang *et al.*, 2009), pero, muchos de ellos no son adecuados para aplicaciones terapéuticas debido a sus largas secuencias, alto costo de producción, baja potencia antimicrobiana, susceptibilidad a enzimas proteolíticas y alta citotoxicidad contra células de mamífero (por ejemplo, actividad hemolítica). Sin embargo, la gran cantidad de secuencias y la información estructural proporcionada por los péptidos antimicrobianos naturales conocidos, facilita el diseño de nuevos péptidos más potentes, menos tóxicos y con mayor potencial para múltiples aplicaciones (Brogden y Brogden, 2011; Yui Ong *et al.*, 2014). Un ejemplo de este tipo de péptidos son las dermaseptinas, una familia de péptidos antimicrobianos que se encuentran en la piel de varias especies de ranas sudamericanas del género *Phyllomedusa* (Mor *et al.*, 1991; 1994). Particularmente, la Dermaseptina S4 es un péptido de 28 residuos que posee débil actividad antibacteriana pero potente actividad hemolítica (Feder *et al.*, 2000). Sin embargo, varios estudios han logrado identificar derivados con actividad antibacteriana mejorada y actividad hemolítica disminuida (Feder *et al.*, 2000; Kustanovich *et al.*, 2002). Estos derivados de Dermaseptina S4 han presentado muy buena actividad contra varios patógenos causantes de infecciones de transmisión sexual como *N. gonorrhoeae*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *C. albicans* (Feder *et al.*, 2000; Kustanovich *et al.*, 2002; Zairi *et al.*, 2007, 2008, 2013), incluso contra virus del herpes simple tipo I (Belaid y Hani, 2002) y virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Lorin *et al.*, 2005).

La perspectiva de esta tesis es contribuir con una mayor comprensión de la relación general entre actividad y estructura de los péptidos antimicrobianos derivados de Dermaseptina S4. En el primer capítulo se utilizaron siete péptidos antimicrobianos y se

evaluó el efecto de algunas modificaciones en la carga neta positiva sobre la actividad antibacteriana y sobre la toxicidad contra células de mamífero (eritrocitos humanos y espermatozoides bovinos). Tres de los péptidos utilizados fueron diseñados en este trabajo y los otros cuatro fueron previamente diseñados, caracterizados y reportados en otros trabajos (Feder *et al.*, 2000; Kustanovich *et al.*, 2002). El objetivo fue identificar los péptidos con mayor actividad contra bacterias frecuentemente encontradas en semen bovino colectado y con menor toxicidad contra células de mamífero, con el fin de proponer los candidatos más prometedores para su aplicación en diluyentes para criopreservación de semen bovino. En el segundo capítulo se hizo énfasis en el péptido K4S4(1-15)_a como modelo para diseñar cinco derivados con diferente distribución de los aminoácidos catiónicos (en este caso lisinas) y estudiar el efecto de estas modificaciones sobre la actividad antibacteriana, contra *E. coli* y *S. aureus*, y sobre la actividad hemolítica. K4S4(1-15)_a es un derivado de Dermaseptina S4 que, como se muestra en el capítulo I, presentó los mejores resultados en cuanto a actividad antimicrobiana y selectividad celular. Adicionalmente, en colaboración con mis compañeros de laboratorio y el Dr. Sergio Orduz Peralta, se diseñó el programa Peptide ID 1.0, que es una herramienta para analizar secuencias de proteínas y buscar en ellas segmentos de secuencia con características fisicoquímicas similares a las de los péptidos antimicrobianos. Aunque el desarrollo de este programa no hizo parte de los objetivos de esta tesis, fue de gran ayuda para calcular y analizar los parámetros fisicoquímicos y estructurales de los péptidos diseñados.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Diseñar e identificar péptidos antimicrobianos derivados de Dermaseptina S4 con alta actividad antibacteriana y baja toxicidad contra células de mamífero.

1.1.1 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antibacteriana de péptidos derivados de Dermaseptina S4 contra bacterias contaminantes de semen bovino *in vitro*.
- Evaluar el efecto de péptidos antimicrobianos derivados de Dermaseptina S4 sobre la movilidad de espermatozoides bovinos.
- Evaluar el efecto de la distribución de aminoácidos catiónicos de péptidos derivados de Dermaseptina S4 sobre la actividad y la selectividad antibacteriana.

2. Marco teórico

2.1 Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia bacteriana es un fenómeno por el cual una bacteria deja de ser afectada por un antibiótico al que anteriormente era sensible; esto se puede dar por el uso excesivo de antibióticos en medicina, en veterinaria y en agricultura. Este fenómeno es considerado mundialmente una amenaza para la salud pública (OMS, 2014). Algunos factores que se atribuyen como causa de la resistencia son: el uso de antibióticos como promotores de crecimiento del ganado, prescripción médica y veterinaria inapropiada de antibióticos y tratamientos antibióticos incompletos en humanos y animales (Larson, 2007; OMS, 2014). Varias cepas de patógenos comunes: *Mycobacterium tuberculosis* (Morris *et al.*, 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Rice, 2003; Aloush *et al.*, 2006), *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus* spp. (Rice, 2003), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoea*, presentan resistencia a la mayoría de los antibióticos convencionales y se conocen como cepas multiresistentes, complicando su erradicación y el tratamiento de cualquier individuo infectado, especialmente, en aquellos pacientes más vulnerables como los receptores de trasplante de órganos, los sometidos a hemodiálisis y los que padecen síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y cáncer (OMS, 2014).

La resistencia a los antibióticos es una consecuencia natural de adaptación, un factor inherente en la evolución de los organismos, por lo que se vuelve un fenómeno imposible de detener (Salyers y Amabile-Cuevas, 1997). Los mecanismos de resistencia bacteriana surgen en respuesta al mecanismo de acción de los antibióticos, los cuales se unen a sitios específicos de enzimas dianas. Así, una mutación en el sitio de unión del antibiótico genera la resistencia al mismo (WHO, 2014). Aunque existen antibióticos que han presentado efectividad contra cepas resistentes (Fernebro, 2011), están supeditados a experimentar resistencia (Fernebro, 2011), disminuyendo la disponibilidad de agentes

antibacterianos efectivos. Por lo tanto, el problema de la resistencia debería ser enfrentado con el desarrollo de otra clase de antibacterianos que presenten mecanismos de acción diferentes (Rice, 2003), por ejemplo, los péptidos antimicrobianos (Levy, 2000; Zasloff, 2002; Schulze *et al.*, 2014; Speck *et al.*, 2014).

2.2 Péptidos antimicrobianos como alternativa a los antibióticos convencionales

El interés por los péptidos antimicrobianos viene principalmente desde 1987, tras el descubrimiento de la Magainina por Michael Zasloff y su equipo de trabajo en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Pensilvania (Zasloff, 1987). Mientras trabajaban con oocitos de *Xenopus laevis* (una rana arborícola africana) para estudiar la expresión de RNA en eucariotas, notaron que a pesar del procedimiento no-estéril al que sometían a las ranas para extirpar sus ovarios, las heridas sanaban normalmente, sin signos de infección o inflamación. Este interesante comportamiento motivó a investigar el efecto de extractos ventrales y de secreciones mucosas de la piel de las ranas sobre el crecimiento bacteriano *in vitro*, demostrándose que la sustancia activa, la Magainina, se encontraba en las secreciones ventrales de la piel y poseía actividad contra varias especies bacterianas y otros microorganismos, incluyendo hongos y protozoos (Zasloff, 1987). Estos resultados han fomentado la búsqueda de nuevos péptidos en otras especies, permitiendo el descubrimiento de miles de péptidos antimicrobianos, de los cuales 82.65% tienen actividad antibacteriana (Wang *et al.*, 2009).

A diferencia de los antibióticos convencionales, los péptidos antimicrobianos actúan desestabilizando y/o destruyendo las membranas celulares e, incluso, afectando blancos intracelulares, sin mediación específica de moléculas bacterianas (Shai, 2002; Zasloff, 2002; Brogden, 2005). Aunque hay algunos reportes de resistencia bacteriana a estos péptidos *in vitro*, la probabilidad de aparición de resistencia en condiciones naturales es muy baja, debido a que actúan de forma simultánea sobre múltiples estructuras bacterianas fundamentales, como la membrana y la pared celular (Zasloff, 2002). Por lo tanto, para enfrentar a los péptidos antimicrobianos, las bacterias tendrían que rediseñar las propiedades bioquímicas de su membrana como un todo, cambiando su composición, organización y potencial transmembrana, lo que sería una solución improbable y “costosa” comparado con una simple mutación de un receptor específico (Van't Hof *et al.*,

2001; Zasloff, 2002; Yeaman y Young, 2003). Además, tendrían que desarrollar una maquinaria compleja que involucre múltiples genes y productos génicos, lo cual es difícil de lograr (Zasloff, 2002).

La ubicuidad de los péptidos antimicrobianos, su papel en la inmunidad del hospedero y su particular mecanismo de acción, son buenas razones para sugerir la posibilidad de usarlos como agentes antimicrobianos en una multitud de aplicaciones (Zasloff, 2002; Yuin ong *et al.*, 2014). A lo anterior, se le suma el esfuerzo considerable que se ha hecho para elucidar el mecanismo de acción, comprender las bases estructurales de la selectividad celular y descubrir nuevos péptidos naturales, lo cual ha facilitado el diseño de péptidos con características de actividad mejoradas y su optimización para aplicaciones específicas (Hancock y Sahl, 2006).

2.3 Selectividad celular

La selectividad celular es un factor crucial para la aplicación de cualquier péptido antimicrobiano, es decir, una alta actividad contra bacterias y otros microorganismos, pero una baja toxicidad sobre células de mamífero. La selectividad celular es afectada principalmente por la diferente composición bioquímica entre las membranas bacterianas y las membranas de las células de mamífero (Zasloff, 2002; Yeaman y Yount, 2003; Matsuzaki, 2009; Teixeira *et al.*, 2012). Las membranas bacterianas están compuestas principalmente por fosfatidiletanolamina (PE), su lípido zwitteriónico más común, pero también contienen 20%-25% de fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL), ambos lípidos aniónicos que le confieren a la membrana una carga global negativa (Yeaman y Yount, 2003; Teixeira *et al.*, 2012). Además, la pared celular también contiene moléculas aniónicas, como los ácidos teicoico y lipoteicoico en las bacterias Gram positivas y los grupos fosfato de los lipopolisacáridos en las bacterias Gram negativas (hasta 70% de la membrana externa), lo que también contribuye a la carga global negativa sobre la superficie de estos microorganismos (Yeaman y Yount, 2003; Teixeira *et al.*, 2012). En cambio, las membranas de las células de mamífero están compuestas principalmente por fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomielina (EM), que son fosfolípidos zwitteriónicos, es decir que no le confieren ninguna carga neta (Yeaman y Yount, 2003; Matsuzaki, 2009; Teixeira *et al.*, 2012). Por otro lado, el potencial eléctrico transmembrana ($\Delta\psi$) de las células bacterianas (-130 a -150 mV) es más negativo que el

de las células de mamífero (-90 a -110 mV). Todas estas diferencias bioquímicas son los determinantes moleculares claves de la selectividad celular, ya que favorecen la afinidad electrostática de los péptidos antimicrobianos catiónicos por las membranas bacterianas aniónicas (Dathe *et al.*, 1997, 2001, 2002; Yeaman y Yount, 2003; Brogden, 2005; Matsuzaki, 2009; Teixeira *et al.*, 2012).

2.4 Diseño racional de péptidos antimicrobianos

Uno de los enfoques más comunes para el diseño racional de péptidos antimicrobianos consiste en realizar modificaciones estratégicas en la secuencia de aminoácidos de un péptido natural, buscando optimizar las propiedades de los péptidos, como como cationicidad, hidrofobicidad y anfipaticidad (Zelezetsky *et al.*, 2005), en favor de una o varias características deseadas sobre la actividad biológica, por ejemplo, potenciar la actividad antibacteriana, mejorar la selectividad celular, incrementar la estabilidad a proteasas e incrementar la estabilidad estructural (Toke, 2005; Yuin Ong *et al.*, 2014).

2.4.1 Cationicidad

La mayoría de los péptidos antimicrobianos tienen una carga entre de +2 y +9 (Zelezetsky y Tossi, 2006), lo que favorece la unión del péptido a la superficie de la membrana celular bacteriana a través de interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de los aminoácidos catiónicos y las cabezas aniónicas de los fosfolípidos fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) (Yeaman y Yount, 2003; Teixeira *et al.*, 2012). Esta mutua afinidad explica la correlación observada entre carga y actividad antimicrobiana, de tal forma que aumentando la carga se potencia la actividad y la selectividad antibacteriana (Dathe *et al.*, 1997; Feder *et al.*, 2000). (Yeaman y Yount, 2003; Matsuzaki, 2009; Teixeira *et al.*, 2012). Sin embargo, dentro de cierto rango, el aumento de la carga conduce a un aumento de la potencia antibacteriana, pero más allá de un valor límite, puede ocurrir el efecto contrario e, incluso, se puede favorecer la actividad hemolítica (Feder *et al.*, 2000; Dathe *et al.*, 2001). Tal disminución de la actividad antibacteriana puede ser consecuencia de fuertes interacciones electrostáticas entre el péptido y las cabezas de los fosfolípidos aniónicos, impidiendo la inserción del péptido en la bicapa (Yeaman y Yount, 2003; Pasupuleti *et al.*, 2008). Además, el exceso de aminoácidos catiónicos puede disminuir la helicidad del péptido debido a interacciones

electrostáticas repulsivas e impedimento estérico entre las cadenas laterales de los residuos básicos (Giangaspero *et al.*, 2001).

2.4.2 Anfipaticidad

La característica que define mejor a los péptidos α -helicoidales anfipáticos es la organización repetitiva $i \rightarrow i + 4$, o $i \rightarrow i + 3$, de los aminoácidos polares, lo cual les permite establecer puentes de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carbonilo y el hidrógeno del grupo amino, ambos de la cadena principal. Esta organización resulta en una estructura anfipática que consiste en la separación longitudinal de la hélice en dos sectores: por un lado el sector hidrofóbico, compuesto por aminoácidos hidrofóbicos, y por el lado opuesto, el sector hidrofílico, compuesto por aminoácidos polares y catiónicos (Eisenberg *et al.*, 1982a; Mor *et al.*, 1991). Esta conformación α -helicoidal anfipática facilita las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas del péptido con la membrana, ya que permite que el sector hidrofílico interactúe con los grupos cabeza aniónicos de los fosfolípidos, mientras que el sector hidrofóbico entra en contacto con la parte hidrofóbica de la membrana. De hecho, esta conformación es un prerrequisito para la interacción del péptido con las membranas bacterianas, su posterior inserción y disrupción de la membrana (Seelig, 2004; Zelezetsky y Tossi, 2006).

El grado de anfipaticidad de un péptido puede cuantificarse a través del momento hidrofóbico, el cual se calcula como la magnitud de la suma vectorial de la hidrofobicidad de cada aminoácido (Eisenberg *et al.*, 1982b). En muchos casos, la optimización de la anfipaticidad, descrita por un valor alto del momento hidrofóbico, se correlaciona con una actividad antibacteriana potenciada (Brogden, 2005; Pasupuleti *et al.*, 2012; Wiradharma *et al.*, 2013).

2.4.3 Hidrofobicidad

Este parámetro es esencial para las interacciones de los péptidos con las membranas, dado que determina el grado en el que un péptido se une e inserta en el centro hidrofóbico de una membrana (Yeaman y Yount, 2003). Por lo tanto, los péptidos antimicrobianos α -helicoidales deben tener un mínimo de hidrofobicidad para poder insertarse en la membrana de las células bacterianas. Si la hidrofobicidad es baja, entonces un ligero aumento potenciará la actividad antimicrobiana, pero, existe un límite

sobre el cual se potenciará la actividad hemolítica con respecto a la actividad antibacteriana. En otras palabras, existe un rango de hidrofobicidad óptima, donde disminuirla o aumentarla por fuera de este rango causará una reducción significativa de la actividad antibacteriana (Yeaman y Yount, 2003; Chen *et al.*, 2007). Esta relación no se observa con la actividad hemolítica, donde el incremento progresivo de la hidrofobicidad se correlaciona con una actividad hemolítica cada vez más fuerte (Chen *et al.*, 2007). Por lo tanto, la hidrofobicidad solo puede ser usada en cierta medida, para aumentar la potencia del péptido sin sacrificar la selectividad.

3. Capítulo 1

Potencial de péptidos derivados de Dermaseptina S4 para controlar la contaminación bacteriana en semen bovino

3.1 Resumen

El semen bovino criopreservado es un material utilizado en diferentes técnicas reproductivas, principalmente en inseminación artificial y fertilización *in vitro*, cuyo propósito es incrementar el rendimiento reproductivo y productivo del ganado. Sin embargo, durante la colecta del eyaculado y su procesamiento para criopreservación, existe una alta probabilidad de contaminación con diferentes tipos de bacterias, muchas de las cuales sobreviven a la criopreservación y mantienen patogenicidad. Por lo tanto, el uso de semen bovino criopreservado implica un riesgo de transmisión y propagación de microorganismos patógenos a las hembras inseminadas, a su descendencia y a los técnicos involucrados en la inseminación. Además, la contaminación bacteriana afecta negativamente la calidad del semen, disminuyendo el rendimiento de las técnicas reproductivas. Para contrarrestar lo anterior y controlar la contaminación bacteriana, existe una normatividad para la producción de semen que exige la adición de antibióticos a los diluyentes para criopreservación. Sin embargo, las bacterias son extremadamente adaptables y rápidamente pueden desarrollar resistencia a los antibióticos usualmente utilizados, siendo entonces necesario buscar nuevas alternativas antibacterianas para evitar el desarrollo de resistencia y realizar un control más efectivo. El propósito de este trabajo fue explorar el potencial de los péptidos antimicrobianos derivados de Dermaseptina S4 para controlar la contaminación bacteriana del semen bovino. Para lograr esto, se evaluó la actividad antibacteriana de siete péptidos derivados de Dermaseptina S4, incluyendo tres péptidos nuevos diseñados en este trabajo: S4(5-28)a,

K20S4(5-28) y K4S4(1-15), contra diferentes bacterias Gram Negativas y Gram Positivas comúnmente encontradas en semen. Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), un aislado clínico de *Salmonella* y cinco cepas aeróbicas aisladas de semen bovino criopreservado sin antibióticos: *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Bacillus cereus*. Además, para examinar la citotoxicidad de los péptidos sobre células de mamífero se evaluó la actividad hemolítica y la actividad sobre la movilidad espermática. Los resultados revelaron dependencia de la concentración de péptido sobre la actividad antibacteriana y citotóxica. Los péptidos K4S4, S4(5-28)a, K20S4(5-28) y K4S4(1-15)a, con una carga neta +5, fueron los más potentes contra todas las cepas bacterianas evaluadas. K4S4(1-16)a, con una carga +6, también presentó potente actividad antibacteriana, excepto contra *S. aureus* (CMI >28 μ M). En cambio, S4(5-28) y K4S4(1-15), ambos con una carga neta +4, presentaron baja actividad. K4S4 fue altamente tóxico contra eritrocitos y espermatozoides, mientras que los otros péptidos presentaron una toxicidad inferior. En conclusión, el aumento de la carga neta positiva de los péptidos resultó en derivados con mayor potencia antibacteriana y mayor selectividad celular. Estos resultados sugieren que algunos de los péptidos evaluados tienen potencial para el desarrollo de antibióticos para el control de la contaminación bacteriana del semen bovino, lo que podría ser una alternativa o complemento a los antibióticos convencionales.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos, Dermaseptina, bacterias, contaminación seminal, semen bovino, criopreservación de semen.

3.2 Introducción

En la industria ganadera, el semen bovino normalmente es utilizado para la producción de semen criopreservado, un método que permite la conservación de espermatozoides durante largos periodos de tiempo y consiste en someter a los espermatozoides de un eyaculado a un enfriamiento progresivo hasta alcanzar una temperatura entre -80 y -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) con el fin de disminuir las funciones vitales de cada célula y mantener su fertilidad. El propósito de esta criopreservación es su aplicación en técnicas de reproducción asistida, como inseminación artificial y fertilización *in vitro*. El uso de este semen presenta varias ventajas: evita la sincronización simultánea de donantes y receptoras, facilita el control de ciertas enfermedades transmisibles a través del apareamiento, incrementa el potencial reproductivo de los machos, facilita el transporte del semen y su disponibilidad sin limitaciones geográficas o temporales, entre otras, con respecto al semen fresco (Verkerk, 2003; Funk, 2006). Sin embargo, el semen criopreservado puede convertirse en vehículo para la transmisión y propagación de enfermedades infecciosas, ya que muchos microorganismos pueden contaminar el eyaculado, sobrevivir a la criopreservación y entrar en contacto con vacas inseminadas o con embriones producidos por fertilización *in vitro* (Aurich, 2005; de Ruigh *et al.*, 2006; Bielanski, 2007; Givens y Marley, 2008; Smole *et al.*, 2010). Además, hay que tener en cuenta que a partir de un solo toro se pueden obtener 2 a 6 eyaculados por semana y cientos de dosis de semen criopreservado por eyaculado, lo cual da una idea del elevado riesgo de propagación y transmisión de patógenos que implica el uso de semen criopreservado (Aurich, 2005; Smole *et al.* 2010).

Por lo tanto, la producción de semen bovino comercial está sujeta a estrictas exigencias legales cuyo propósito es reducir el riesgo de contaminación del semen y prevenir la transmisión y propagación de enfermedades (Resolución 02820 del ICA, 2001; CE, 2003). El Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2014) y, en Colombia, el Manual de Buenas Prácticas de Bioseguridad del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 2007), describen los estándares y las recomendaciones para el control técnico, higiénico y sanitario de todo el proceso, como: la selección de los toros donantes, la colecta y el procesamiento del semen, la adición de antibióticos a los diluyentes de semen para criopreservación (CE, 2003), el almacenamiento y el transporte del semen criopreservado. Sin embargo, a

pesar de las medidas empleadas, el control no es completamente efectivo (Wentink *et al.*, 2000; de Ruigh *et al.*, 2006; Bielanski, 2007; Givens y Marley, 2008) y permite que el semen se contamine con bacterias patógenas y saprófitas (Silveira y Machado, 2005; de Ruigh *et al.*, 2006; Smole *et al.* 2010; Najee *et al.*, 2012), muchas de las cuales han sido resistentes a los antibióticos usados en los diluyentes (Eaglesome *et al.*, 1995; Thibier y Guerin 2000; Alba-Gomez y Silveira-Prado, 2005; Silveira y Machado, 2005; Marques *et al.*, 2009; Najee *et al.*, 2012; Akhter *et al.*, 2008; Smole *et al.*, 2010; Kilburn *et al.*, 2013; Madeira *et al.*, 2014). Por lo que es evidente la necesidad de implementar nuevas o adicionales estrategias para lograr un control bacteriano más efectivo y evitar la aparición de bacterias resistentes.

La resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales es motivo de preocupación tanto para los ganaderos como para las autoridades del control sanitario, dado que dificulta el tratamiento y erradicación de los patógenos, y aumenta el riesgo de transmisión y propagación de los mismos. Esta situación podría tener gran impacto en términos sanitarios, económicos y legales, siendo necesario contar con estrategias alternativas para el control de la contaminación bacteriana del semen que eviten la resistencia. En este contexto, los péptidos antimicrobianos son moléculas prometedoras, ya que poseen un rápido y amplio espectro de acción contra bacterias (Feder *et al.*, 2000; Navon-Venezia *et al.*, 2002; Kustanovich *et al.*, 2002), virus (Belaid y Hani, 2002; Lorin *et al.*, 2005), protozoos (Feder *et al.*, 2000, 2001; Dagan *et al.*, 2002), levaduras y hongos filamentosos (Mor *et al.*, 1994; Coote *et al.*, 1998). Además, su particular mecanismo de acción les confiere una gran ventaja sobre los antibióticos convencionales, porque actúan inespecíficamente sobre la membrana celular, alterando su integridad estructural, lo cual dificulta el surgimiento de fenómenos bacterianos de resistencia (Van't Hof *et al.*, 2001; Zasloff, 2002, Navon-Venezia *et al.*, 2002).

El propósito de esta tesis fue explorar el potencial de los péptidos antimicrobianos para el control de la contaminación bacteriana del semen bovino. Para lograrlo, se establecieron tres objetivos: (1) seleccionar y diseñar péptidos antimicrobianos derivados de Dermaseptina S4, (2) evaluar la actividad de estos péptidos contra bacterias comúnmente encontradas en semen bovino y (3) determinar su potencial tóxico contra células de mamífero en términos de movilidad espermática y de actividad hemolítica. La

experimentación se llevó a cabo utilizando cuatro derivados de Dermaseptina S4 previamente reportados (Feder *et al.*, 2000) y tres más diseñados en este trabajo.

3.3 Origen de la contaminación bacteriana del semen bovino

Los toros son la fuente principal de contaminación seminal con patógenos (de Ruigh *et al.*, 2006; Givens y Marley, 2008). En vista de esto, las regulaciones establecen los requisitos para la selección de los toros donantes y las pruebas diagnósticas que deben hacerse, al menos una vez al año, a estos toros para determinar su estado de salud y verificar que se encuentren libres de patógenos (CE, 2003; ICA, 2007). La aceptación de toros donantes y su permanencia en los centros de producción de semen depende de que presenten resultados negativos para brucelosis bovina, tuberculosis bovina, leptospirosis, campilobacteriosis, tricomoniasis, rinitis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustulosa infecciosa (IBR/IPV), diarrea viral bovina/enfermedad mucosa (DVD/MD), parainfluenza tipo 3, leucosis bovina enzoótica y fiebre aftosa (CE, 1988, 2003; ICA, 2001).

Las principales fuentes de contaminación del eyaculado son el prepucio y el glande, pero otras fuentes probables son la piel del toro, el personal técnico involucrado, los materiales utilizados, el ambiente en cual se trabaja (Brown *et al.*, 1974; Althouse *et al.*, 2000; Silveira y Machado, 2005; Bielanski, 2007; Aurich y Spargser, 2007; Akhter *et al.*, 2008; Smole *et al.*, 2010) y los productos de origen animal (como yema de huevo y leche) que se emplean para preparar los diluyentes (Brown *et al.*, 1974; Bousseau *et al.*, 1998; Thibier y Guerin 2000; de Ruigh *et al.*, 2006; Bielanski, 2007; Smole *et al.*, 2010).

En consecuencia, la contaminación seminal es un evento altamente probable que puede ser causado por una gran variedad de microorganismos, siendo las especies bacterianas más frecuentemente encontradas en semen fresco de toros *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Brown *et al.*, 1974; Gómez y Silveira, 2005; Silveira y Machado, 2005; Smole *et al.*, 2010; González-Marín *et al.*, 2011; Kilburn *et al.*, 2013). Estas bacterias también son comunes en el semen de otras especies como búfalo (Akhter *et al.*, 2008), cerdo (Althouse *et al.*, 2000; Morrell y Wallgren, 2011), caballo (Varner *et al.*, 1998) y carnero (Yániz *et al.*, 2010; Madeira *et al.*, 2014).

3.4 Efectos de la contaminación bacteriana del semen sobre la calidad espermática

El semen fresco y los diluyentes tienen componentes nutritivos, como glucosa o fructosa, que facilitan el crecimiento bacteriano (Abro *et al.*, 2009), permitiendo que los efectos adversos de las bacterias sobre los espermatozoides aumenten con el tiempo (Brown *et al.*, 1974; Althouse *et al.*, 2000; Yániz *et al.*, 2010) y que pueden darse por producción de toxinas o por competencia por nutrientes, oxígeno y/o acidificación del medio (Abro *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2010; Smole *et al.*, 2010). Por ejemplo, estudios llevados a cabo en 100 muestras de semen congelado tomadas en dos centros de producción de semen encontraron que 7 de las 100 muestras fueron positivas para *Acinetobacter*, *Actinobacillus lignerisi*, *Citrobacter*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus intermedius*, las cuales podían fermentar varios tipos de azúcar y acidificar el medio (Abro *et al.*, 2009).

Las interacciones entre espermatozoides y bacterias han sido estudiadas con poco detalle. Con respecto a bacterias Gram Positivas, si bien se han observado algunas relaciones entre la presencia de este tipo de bacterias y la disminución de la calidad espermática, no se han identificado cuáles son los mecanismos que pueden alterar la función espermática (Yániz *et al.*, 2010). Por otro lado, la interacción con bacterias Gram Negativas se ha estudiado un poco más y se ha encontrado que su presencia en semen puede causar disminución de la calidad espermática (Althouse *et al.*, 2000; Yániz *et al.*, 2010) y efectos espermicidas (Diemer *et al.*, 1996). Los efectos de *E. coli* sobre espermatozoides de humano incluyen reducción de la movilidad, aglutinación (Monga y Roberts, 1994), aumento de translocación de fosfatidilserina (Schulz *et al.*, 2010) e inducción de cambios morfológicos a nivel de la pieza media, membrana plasmática y acrosoma (Diemer *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2010). Estas bacterias también pueden producir y secretar toxinas como α -hemolisina, lipopolisacáridos, fragmentos de péptidoglicano (Schulz *et al.*, 2010) y bacteriocinas (Smole *et al.*, 2010). González-Marín *et al.* (2011) también evaluaron la presencia de bacterias en semen bovino criopreservado y demostraron que afecta adversamente la integridad del ADN de los espermatozoides.

3.5 Resistencia bacteriana a antibióticos en criopreservación de semen bovino

En criopreservación de semen se utilizan antibióticos con el fin de limitar el crecimiento bacteriano y mantener la carga bacteriana en niveles que no sean perjudiciales para los espermatozoides. Estos antibióticos deben presentar actividad de amplio espectro y ser eficaces especialmente contra campilobacterias, leptospiras y micoplasmas (CE, 2003). Por ejemplo, la combinación penicilina y estreptomina (1000 UI/mL y 1000 µg/mL, respectivamente) ha sido usada desde 1948, cuando se comprobó que era efectiva en criopreservación de semen bovino, sin causar efectos tóxicos sobre la calidad espermática (Almquist *et al.*, 1949). Sin embargo, actualmente, dicha efectividad es insuficiente porque es común encontrar contaminación en las pajillas de semen criopreservado (Gomez y Silveira, 2005; Silveira y Machado, 2005; Abro *et al.*, 2009; Najee *et al.*, 2012), siendo *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus coag. neg.* y *S. aureus*, las bacterias resistentes más frecuentes (Gomez y Silveira, 2005; Najee *et al.*, 2012).

Con el fin de mejorar el control bacteriano, se ha implementado la combinación de antibióticos gentamicina, lincomicina, tilosina y espectinomicina, la cual fue usada por primera vez en 1988 en diluyentes de semen bovino (Shin *et al.*, 1988) sin efectos adversos para los espermatozoides y, hasta ahora, ha sido más efectiva para el control bacteriano que otros antibióticos (Eaglesome y Garcia 1995; Bousseau *et al.*, 1998, Andrabi *et al.*, 2001; Hasan *et al.*, 2001; Akhter *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha reportado que esta combinación de antibióticos es insuficiente para controlar una contaminación excesiva (Smole *et al.*, 2010) y para enfrentar la resistencia bacteriana (Eaglesome *et al.*, 1995; Eaglesome y Garcia 1995; Akhter *et al.*, 2008; Smole *et al.*, 2010; Kilburn *et al.*, 2013; Madeira *et al.*, 2014). Estudios realizados por Smole *et al.* (2010) encontraron contaminación con *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y otras bacterias en muestras de semen criopreservado con los antibióticos gentamicina-lincomicina-espectinomicina-tilosina (Triladyl®, Minitube). Resultados parecidos, reportados por Eaglesome *et al.*, (1995) mostraron la presencia de *P. aeruginosa* en semen bovino que había sido criopreservado con esta combinación de antibióticos. Estos investigadores aislaron una cepa de *P. aeruginosa* y la usaron para contaminar muestras de semen que posteriormente congelaron en presencia de los mismos antibióticos y demostraron que se

trataba de una bacteria resistente. Por lo tanto, el crecimiento bacteriano después de descongelación de muestras experimentales y comerciales de semen evidencia resistencia de algunas cepas bacterianas y la ineffectividad de los antibióticos usados en los diluyentes de semen.

El semen de toro comúnmente se encuentra contaminado con micoplasmas, siendo la microbiota del prepucio y de la parte distal de la uretra las fuentes principales de contaminación (Onoviran *et al.*, 1975; Fish *et al.*, 1985). Varias especies de estos microorganismos, incluyendo *Ureaplasma diversum*, han sido encontrados en semen fresco y pueden resistir a los antibióticos utilizados en los diluyentes para criopreservación (Fish *et al.*, 1985; Visser *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 2009). Shin *et al.* (1988) procesaron muestras de semen contaminadas artificialmente con varias especies de micoplasmas y de ureaplasmas diluidas en presencia de dos combinaciones diferentes de antibióticos: penicilina-estreptomicina-polimicina B (500 U/mL, 2000 µg/mL y 1000 U/mL) y gentamicina-tilosina-lincomicina-espectinomicina (500, 100, 300 y 600 µg/ml, respectivamente) y observaron que la primera combinación fue parcialmente efectiva, con actividad bacteriostática contra *Mycoplasma bovis* y *Mycoplasma bovis*; en cambio, la segunda combinación fue bactericida contra *Mycoplasma bovis* y ureaplasmas, pero bacteriostática contra *M. bovis* y *Mycoplasma spp.* En un estudio similar, reportaron que la combinación gentamicina-tilosona-lincomicina-espectinomicina presentó un efecto bacteriostático sobre nueve cepas de *M. bovis* (Visser *et al.*, 1999). En otro estudio más reciente, realizado con muestras de semen de 35 toros (en cinco centros de inseminación artificial diferentes) diluidas y congeladas en presencia de una de dos combinaciones diferentes de antibióticos: lincomicina-espectinomicina-penicilina-estreptomicina (150 µg/mL, 300 µg/mL, 500 U/mL y 500 U/mL, respectivamente) y gentamicina-tilosina-lincomicina-espectinomicina (250, 50, 150 y 300 µg/ml, respectivamente), mostraron contaminación con micoplasmas en 65.7% de las muestras evaluadas, más de la mitad de las cuales fueron identificadas como *U. diversum* (Marques *et al.*, 2009).

3.6 Metodología

3.6.1 Localización

El desarrollo experimental de esta investigación se llevó a cabo en dos laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. La actividad antimicrobiana y la hemolítica de los péptidos se evaluó en el Laboratorio de Físicoquímica Orgánica de la Escuela de Química (Facultad de Ciencias), y el efecto de los péptidos sobre la movilidad espermática en semen bovino se evaluó en el Laboratorio de Procesamiento de Semen San Pablo del Departamento de Producción Animal (Facultad de Ciencias Agrarias), ubicado en la vereda Tablacito del municipio de Rionegro (Antioquia).

3.6.2 Péptidos

Los péptidos utilizados en esta investigación, análogos de Dermaseptina S4, fueron sintetizados por Selleck Chemicals®. Las soluciones stock (1 mM) fueron preparadas a partir de cada péptido liofilizado usando agua destilada estéril y se almacenaron entre 0-4°C hasta el momento de la experimentación. Eventualmente, las soluciones descongeladas fueron diluidas en un medio apropiado según las necesidades del experimento.

3.6.3 Cálculo de parámetros fisicoquímicos y estructurales

La longitud, la carga, el punto isoeléctrico, el índice de hidrofobicidad y el momento hidrofóbico relativo de los péptidos fueron calculados usando el programa Peptide ID 1.0 (Sánchez *et al.*, 2014), el cual forma parte complementaria de esta tesis. El índice de hidrofobicidad y el momento hidrofóbico relativo se calcularon usando la escala de hidrofobicidad de Fauchere-Pliska (Fauchere y Pliska, 1983). La hidrofobicidad interfacial se calculó usando el módulo *Totalizer* del programa MPEX 3.2.11 (Snider *et al.*, 2009), el cual emplea la escala de hidrofobicidad interfacial de Wimley-White (Wimley y White, 1996). Esta escala representa la energía libre de transferencia de los aminoácidos (ΔG_{ww}) desde el agua hacia la interface de una bicapa lipídica compuesta por palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC). La tendencia a agregación en solución acuosa se predijo utilizando el programa TANGO.

3.6.4 Bacterias

Las cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) fueron compradas al centro de recursos biológicos American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Una cepa de *Salmonella* fue un aislado clínico obtenido previamente por miembros de nuestro grupo de investigación. Las cepas *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Bacillus cereus* fueron aislados de semen bovino criopreservado sin antibióticos. La obtención del semen y su criopreservación fue realizada como parte de este trabajo en el Laboratorio de Procesamiento de Semen San Pablo, pero los aislamientos bacterianos y su identificación fueron servicios técnicos solicitados al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín, Colombia) y al Laboratorio de Microbiología del Hospital Veterinario de la Universidad de Antioquia, Colombia.

3.6.5 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

La actividad antibacteriana de los péptidos derivados de Dermaseptina S4 fue evaluada mediante el método de microdilución en caldo (Wiegand *et al.*, 2008), usando medio de cultivo Luria-Bertani (LB; triptona 10 g/L, extracto de lavadura 5 g/L, NaCl 5 g/L NaCl, pH 7.4). Esta actividad fue definida en términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que corresponde a la concentración de péptido más baja que indujo 100% de inhibición del crecimiento bacteriano. Se determinó la CMI de cada péptido contra las bacterias anteriormente mencionadas. Los inóculos se prepararon en medio de cultivo LB incubados a 37°C durante 8-16 h. A partir de este cultivo se preparó un inóculo de 1×10^6 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) utilizando el mismo medio de cultivo, cuya concentración se estimó mediante mediciones de densidad óptica a 625 nm en el rango 0,08-0,13 de absorbancia (Thermo Scientific Multiskan GO UV-Vis spectrophotometer). Se adicionó una alícuota de 100 μ L de inóculo a cada uno de los pozos de un plato de 96 pozos, conteniendo 100 μ L de medio de cultivo con diluciones seriales dobles de cada péptido (desde 32 hasta 0.125 μ M), 100 μ L de medio de cultivo solo (control negativo) o 100 μ L de Triton X-100 15% (v/v) (control positivo) para obtener un inóculo final de 5×10^5 UFC/mL. La inhibición de la proliferación se determinó por mediciones de densidad óptica a 620 nm después de un periodo de incubación de 16-18 h a 37°C. Cada experimento se realizó por triplicado.

3.6.6 Prueba de hemólisis

La actividad hemolítica de los péptidos fue determinada usando glóbulos rojos obtenidos a partir de 1 mL de sangre humana fresca, como se describió previamente (Torcato *et al.*, 2013). Las células fueron lavadas tres veces en solución salina (0.9% p/v) mediante centrifugación a 2700 xg por 1 min. El pellet de células rojas fue resuspendido con solución salina hasta alcanzar 10 mL de suspensión celular con una concentración celular aproximada de 8%. Alícuotas de 90 µL de esta suspensión fueron adicionadas a 10 µL de las soluciones de cada péptido, las cuales fueron preparadas en solución salina para obtener una concentración final de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µM. La incubación se realizó a 37°C por 3 h en tubos eppendorf de 1.5 mL bajo agitación continua. Muestras de eritrocitos incubadas en presencia de solución salina o de Triton X-100 0.5% fueron incluidas para establecer el 0% y 100% de hemólisis, respectivamente. Después del periodo de incubación, todas las muestras fueron centrifugadas y 70 µL de sobrenadante de cada una fueron transferidos a un plato de 96 pozos para medir la liberación de hemoglobina mediante densidad óptica a 545 nm. El experimento fue repetido 3 veces y el porcentaje de hemólisis se calculó usando la Ecuación (3.1). La actividad hemolítica se analizó en términos de la concentración hemolítica 50% (CH₅₀), que es la concentración que causa una hemólisis del 50% de la población eritrocitos después del periodo de incubación.

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{OD_{545} \text{ tratamiento con péptido} - OD_{545} \text{ control negativo}}{OD_{545} \text{ in } 0.5\% \text{ Triton X } 100 - OD_{545} \text{ control negativo}} \quad (3.1)$$

3.6.7 Prueba de movilidad espermática

El efecto de los derivados de Dermaseptina S4 sobre la movilidad espermática se analizó en términos de la concentración de inmovilización espermática 50% (CI₅₀), que es la concentración que disminuye la movilidad espermática progresiva a 50% a 38°C durante 1 h. Se obtuvo tres eyaculados (uno por cada experimento) de un mismo toro de la raza BON, usando vagina artificial. Este toro ha sido aceptado como donador y ha registrado descendencia normal mediante inseminación artificial. Inmediatamente después de la colecta, el semen fue transferido al cuarto de procesamiento y mantenido a 38°C en baño María mientras se evaluaron las características seminales: volumen, pH, apariencia y morfología espermática. Una alícuota de 5 µL de semen diluido 1:2 en solución de citrato de sodio (29 g/L en agua destilada) fue analizada mediante un sistema de análisis

asistido por computador (*Computer Assisted Sperm Analysis* - CASA) para evaluar la concentración y la movilidad espermática. En los experimentos solo se incluyeron muestras de semen con características seminales normales y con más de 60% de movilidad progresiva. El resto del semen fue diluido en solución de citrato de sodio para obtener 120×10^6 espermatozoides/mL. Alícuotas de 30 μL de suspensión espermática fueron adicionadas al mismo volumen de diluciones de péptido (64, 32 y 16 μM en solución de citrato), solución de citrato (control negativo) o Triton X-100 5% (v/v) (control positivo). Después del periodo de incubación, a 38°C por 1 h, una alícuota de 5 μL de cada tratamiento fue tomada e insertada en una cámara de conteo Leja (calentada a 37°C) para evaluar el porcentaje de movilidad espermática progresiva sobre al menos 300 espermatozoides usando el sistema CASA. Este experimento fue realizado por triplicado.

3.6.8 Cálculo del índice relativo de selectividad (IRS)

El índice relativo de selectividad (IRS) es un parámetro que indica el grado selectividad de un péptido por las células procariotas con respecto a las células eucariotas en comparación con un péptido de referencia. el IRS se calculó como la razón entre la concentración de péptido que disminuye la movilidad progresiva al 50% (concentración de inmovilización espermática 50%, CI_{50}) y la CMI promedio ($CI_{50}/\text{CMI promedio}$) de un péptido dado dividido por la misma razón correspondiente para un péptido de referencia, en este caso K4S4. Así, comparado con K4S4, valores de IRS >1 indican mayor selectividad por células procariotas, valores <1 indican menor selectividad y valores iguales a 1 indican que no hay diferencia en selectividad.

3.7 Resultados

3.7.1 Diseño y selección de péptidos derivados de Dermaseptina S4

Se evaluó la actividad biológica de siete péptidos derivados de Dermaseptina S4; cuatro de ellos, identificados como K4S4, S4(5-28), K4S4(1-15)a y K4S4(1-16)a, fueron previamente diseñados y reportados por Feder *et al.* (2000). Estos péptidos, excepto K4S4, fueron escogidos en este trabajo por su alto índice relativo de selectividad, es decir porque poseen baja actividad hemolítica y alta actividad antimicrobiana. Por el contrario, el derivado K4S4 fue escogido con el propósito de comparación, por ser un potente antimicrobiano y hemolítico (Feder *et al.*, 2000). Los tres péptidos restantes, S4(5-28)a, K20S4(5-28) y K4S4(1-15), fueron diseñados en este trabajo con el propósito de evaluar el efecto del aumento de la carga neta positiva sobre otros parámetro fisicoquímicos y estructurales, y sobre la actividad biológica de los péptidos. En la Tabla 3-1 están reportados los valores de longitud, carga, hidrofobicidad interfacial (ΔG_{ww}), índice de hidrofobicidad (IH), agregación y momento hidrofóbico relativo (μHr) de los péptidos analizados, incluyendo la secuencia del péptido nativo, Dermaseptina S4 (S4).

Tabla 3-1. Propiedades de los péptidos derivados de Dermaseptina S4.

Péptido	Secuencia ¹	Longitud	Carga	ΔG_{ww} ²	IH ³	Agregación ³	μHr
S4	ALWMTLLKVKVLKAAAKAALNAVLVGANA	28	+ 4	1,63	15,23	214,2	0,24
K4S4	---K-----	28	+ 5	2,2	13,01	158,6	0,23
S4(5-28)	-----	24	+ 4	3,45	9,74	159,5	0,23
S4(5-28)a	-----NH2	24	+ 5	1,55	9,74	163,5	0,23
<u>K20S4(5-28)</u>	-----K-----	24	+ 5	4,02	9,35	91,5	0,24
K4S4(1-16)a	---K-----NH2	16	+ 6	-0,42	6,82	0	0,5
K4S4(1-15)a	---K-----NH2	15	+ 5	-1,41	7,81	0	0,5
<u>K4S4(1-15)</u>	---K-----	15	+ 4	0,49	7,81	0	0,5

¹ Las secuencias se muestran usando el código de una letra para los aminoácidos.

² Hidrofobicidad interfacial (Kcal/mol).

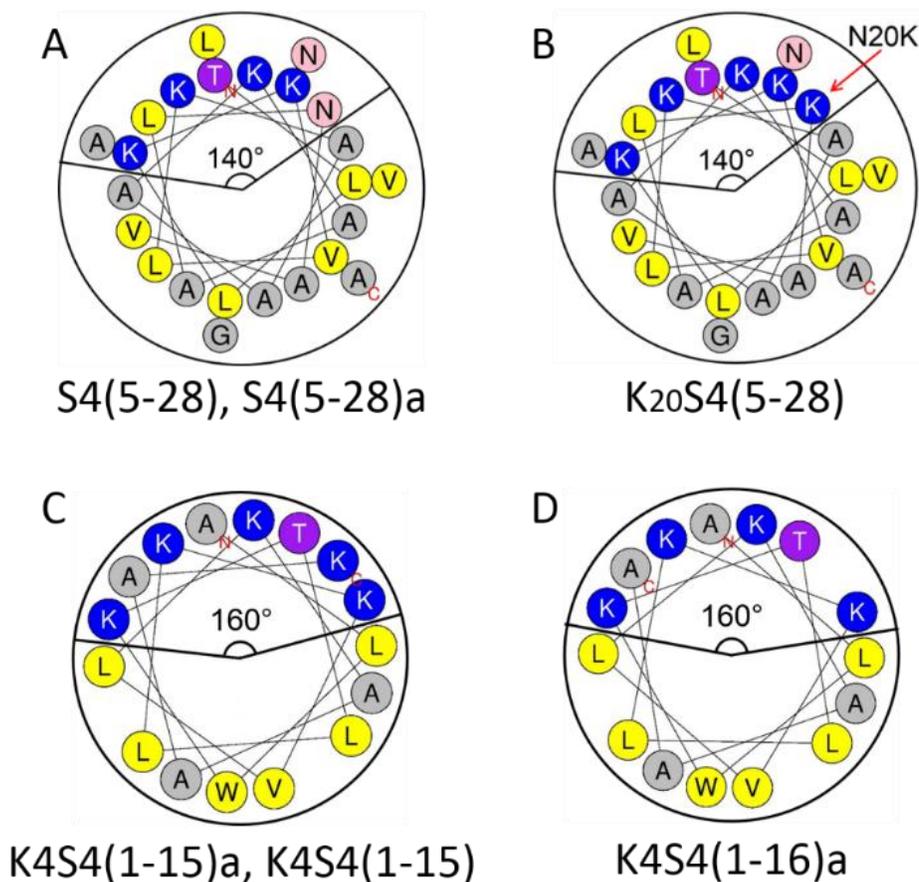
³ Valor de tendencia a agregación total que resulta al sumar la contribución de cada residuo (Fernández-Escamilla *et al.*, 2004).

Los péptidos fueron diseñados haciendo diferentes sustituciones y/o deleciones a la secuencia de Dermaseptina S4. K4S4 es un derivado que se formó sustituyendo la metionina (M) en la posición 4 por una lisina (K) (esta sustitución se puede abreviar como M4K). Los péptidos K4S4(1-16)a y K4S4(1-15)a combinan la sustitución M4K con la deleción de 12 y 13 residuos del extremo C-terminal, respectivamente, y, además, tienen una carboxiamidación (la “a” indica la amidación del péptido) en el extremo C-terminal. K4S4(1-15) posee las mismas características de K4S4(1-15)a pero con el extremo carboxilo libre. S4(5-28), S4(5-28)a y K20S4(5-28) son derivados obtenidos por deleción de los primeros 4 residuos del extremo N-terminal, pero S4(5-28)a se obtuvo neutralizando la carga negativa del extremo C-terminal con una amidación, mientras que K20S4(5-28) con la sustitución de un residuo de asparagina (N) por una lisina (K) en la posición 20 (N20K) (Figura 3.1, Tabla 3.1). La nomenclatura utilizada para identificar estos péptidos, sigue el mismo patrón utilizado en otros trabajos, teniendo como referencia la secuencia y la longitud del péptido nativo, Dermaseptina S4 (Feder *et al.*, 2000; Kustanovich *et al.*, 2002; Navon-Venezia *et al.*, 2002; Zairi *et al.*, 2007, 2008, 2013) (Tabla 3.1).

Con respecto a S4(5-28), la amidación C-terminal de S4(5-28)a aumentó dos veces la hidrofobicidad interfacial (ΔG 1.55 kcal/mol), mientras que la sustitución N20K en K20S4(5-28) la disminuyó (ΔG 4,02 kcal/mol). El índice de hidrofobicidad indica también que K20S4(5-28) es menos hidrofóbico, en cambio la amidación C-terminal no cambió la hidrofobicidad de S4(5-28). En general, todos los derivados de Dermaseptina S4 presentaron un índice de hidrofobicidad menor que el péptido nativo (Tabla 3.1).

Todos los péptidos utilizados presentaron un carácter anfipático, con los sectores hidrofóbicos e hidrofílicos claramente definidos por los residuos de lisina (Figura 3.1). El ángulo polar para los derivados de deleción N-terminal (Figura 3.1 A, B) y para los derivados de deleción C-terminal (Figura 3.1 C, D) es de 140° y 160°, respectivamente.

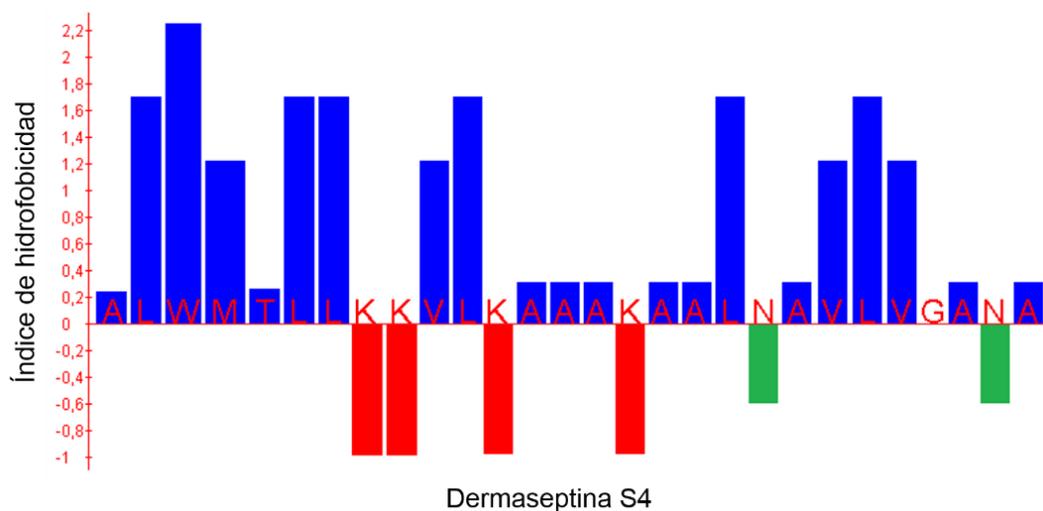
Figura 3.1: Representación helicoidal. Representada como la proyección axial 2-dimensional de una hélice- α ideal, se pueden identificar los residuos de lisina que definen el sector hidrofílico y los demás residuos que conforman el sector hidrofóbico de cada péptido. La figura emplea el código de una letra para los aminoácidos. Los residuos de lisina (K) cargados positivamente son coloreados azul, los residuos hidrofóbicos, leucina (L) y valina (V), son coloreados amarillo y los residuos de alanina (A) y de glicina (G) son coloreados gris. Dentro del diagrama se indica el ángulo polar. Estas imágenes fueron construidas con la ayuda del programa Heliquest (Gautier *et al.*, 2008) y posteriormente modificadas.



3.7.2 Agregación en solución

La Dermaseptina S4 contiene 28 aminoácidos, 22 de los cuales son hidrofóbicos (78.6%) y 6 hidrofílicos. El perfil de hidrofobicidad muestra cuatro cargas positivas concentradas en medio de la estructura primaria del péptido flanqueadas por dos tramos altamente hidrofóbicos, a los que nos referimos en adelante como dominios hidrofóbicos N- y C-terminales (Figura 3.2).

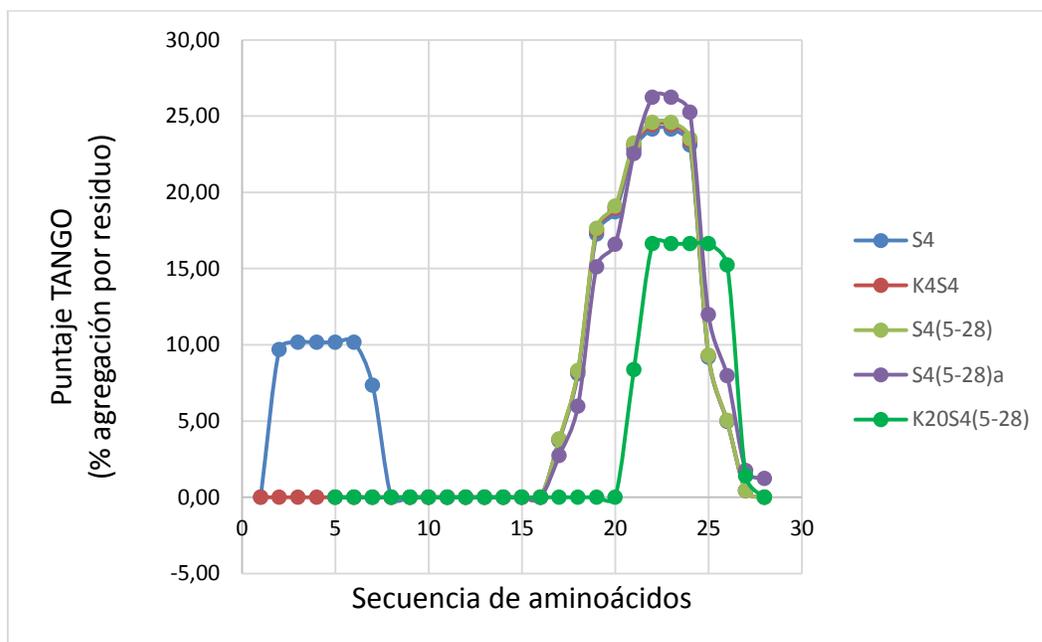
Figura 3.2: Perfil de hidrofobicidad de Dermaseptina S4. Predicción teórica de la hidrofobicidad de los péptidos utilizando la escala de hidrofobicidad de Fauchere-Pliska (1983). Los aminoácidos con valores por encima de cero tienen mayor afinidad por la membrana que por el ambiente acuoso. Para obtener este gráfico se utilizó el programa Peptide ID 1.0 (Sánchez *et al.*, 2014).



Las propiedades de agregación de Dermaseptina S4 y sus derivados fueron estimadas usando TANGO, un algoritmo para predecir la tendencia a agregación en solución acuosa de péptidos y proteínas (Fernández-Escamilla *et al.*, 2004). La figura 3.3 muestra el perfil de tendencia de agregación en solución acuosa de cada péptido, mientras que la Tabla 3.1 muestra la tendencia a agregación total. Similar a los resultados obtenidos en otros trabajos (Feder *et al.*, 2000; Kustanovich *et al.*, 2002), los cálculos de TANGO sugieren que los péptidos tienen diferentes grados de agregación. Este algoritmo predijo una mayor agregación para Dermaseptina S4 comparado con sus derivados (Feder *et al.*,

2000; Kustanovich *et al.*, 2002) e identificó dos regiones que contribuyen a la agregación: la primera está en el dominio hidrofóbico N-terminal y abarca los residuos 2-7, mientras que la otra región, situada en el dominio hidrofóbico C-terminal, presenta una mayor tendencia e involucra una región más extensa (residuos 17-27) (Figuras 3.2 y 3.3). La sustitución M4K indujo una disminución de la tendencia de agregación de K4S4. De manera similar, los péptidos K4S4(1-16)a, K4S4(1-15)a y K4S4(1-15), que poseen también la sustitución M4K y que carecen del dominio C-terminal, no presentaron tendencia a agregación. La amidación del extremo C-terminal de S4(5-28) no afectó la agregación en S4(5-28)a, en cambio la sustitución N20K (para generar el péptido K20S4(5-28)) resultó en una pérdida de tendencia de agregación (91.4598) (Tabla 3.1).

Figura 3-3: Perfil de agregación de Dermaseptina S4 y sus derivados. La tendencia a agregación fue estimada usando el algoritmo TANGO (Fernández-Escamilla *et al.*, 2004) con los siguientes parámetros: temperatura 298.15 K, pH 7.2 y fuerza iónica 0.1 M.



3.7.3 Actividad antibacteriana

Los péptidos K4S4, S4(5-28)a, K20S4(5-28) y K4S4(1-15)a, en el rango de concentración de 1 a 32 μM , inhibieron completamente el crecimiento bacteriano de todas las cepas

evaluadas. Esta actividad antibacteriana presentó dependencia de concentración, siendo más potentes los péptidos con mayor carga. Los péptidos S4(5-28)a y K20S4(5-28), con una carga +5, presentaron un incremento en la actividad antibacteriana en comparación con su contraparte S4(5-28), que tiene una carga +4. S4(5-28)a y K20S4(5-28) fueron más activos que S4(5-28) contra todas las cepas evaluadas, excepto K20S4(5-28) contra *S. salivarius*, cuya actividad fue igual a la de S4(5-28) e inferior que la de K4S4(1-15). Este último, fue el péptido con menor actividad antibacteriana, inhibiendo la proliferación de tan solo cuatro de las ocho cepas bacterianas evaluadas. En cambio, la amidación del extremo C-terminal de K4S4(1-15)a potenció la actividad antibacteriana (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Actividad biológica de los péptidos derivados de Dermaseptin S4.

Concentración mínima inhibitoria - CMI (μM) ¹							
Parámetro	K4S4	S4(5-28)	S4(5-28)a	K20S4(5-28)	K4S4(1-16)a	K4S4(1-15)a	K4S4(1-15)
<i>E. coli</i>	3±1.15	5±2	2.5±1	3.5±3	3.3±1.15	2.7±1.15	12±4.62
<i>P. aeruginosa</i>	8	26.7±9.2	16	8	10.7±4.6	13.3±4.6	>32
<i>Salmonella</i> sp.	4	26.7±9.2	10.7±4.6	10.7±4.6	6.7±2.3	6.7±2.3	>32
<i>S. salivarius</i>	4	10.7±4.6	5.3±2.3	10.7±4.6	3.7±3.8	1	8
<i>S. aureus</i>	12±4.6	28±8	14±4	10±4	>28±8	12±4.6	>28±8
<i>S. haemolyticus</i>	10.7±4.6	13.3±4.6	6.7±2.3	6.7±2.3	5.3±2.3	3.3±1.2	>16
<i>S. saprophyticus</i>	16	>16	6.7±2.3	16	4	2.7±1.2	>16
<i>B. cereus</i>	4	14.7±15.1	6.7±2.3	10.7±4.6	5.3±2.3	4	26.7±2
CMI promedio	7.71	17.64	8.58	9.54	8.38	5.71	21.34
CH ₅₀ ²	27.92±8.1	>100	>100	>100	88.21±5.1	83.25±7	>100
CI ₅₀ ³	<8.75	28.41±20.3	21.46±3.4	38.71±3.7	71.01±9.9	49.27±29.8	59.8±7.3
IRS ⁴	1	1.42	2.2	3.57	7.47	7.6	2.47

¹ Concentración mínima inhibitoria del crecimiento bacteriano (media ± D.E.).

² Concentración hemolítica 50% (media ± D.E.).

³ Concentración de inmovilización espermática 50% (media ±D.E.)

⁴ Índice relativo de selectividad.

3.7.4 Toxicidad contra células de mamífero

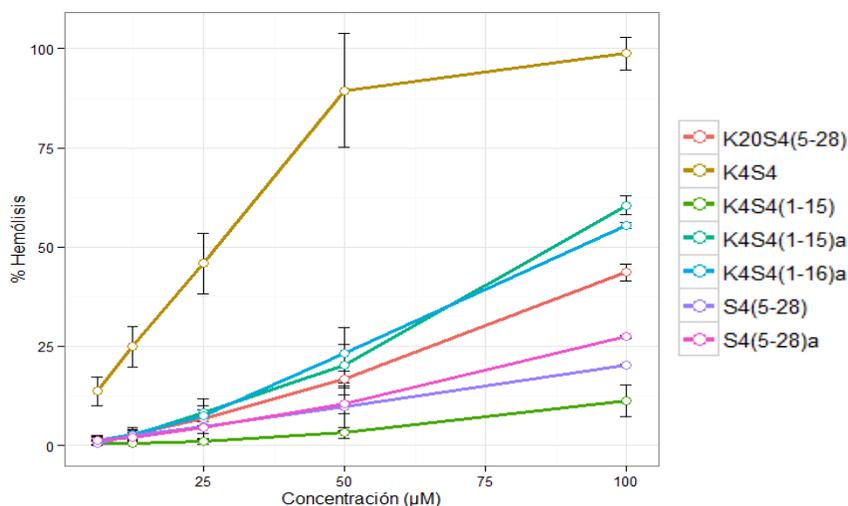
Para determinar la citotoxicidad de los derivados de Dermaseptina S4, se investigó su efecto sobre glóbulos rojos de humano y sobre la movilidad espermática de semen bovino. Ambos experimentos fueron realizados en soluciones simples (Solución salina

0.9% y solución de citrato de sodio 29 g/L en agua destilada, respectivamente) con el propósito de minimizar interacciones de los péptidos con otros componentes del medio.

▪ Actividad hemolítica

La figura 3.4 muestra el efecto de la concentración de cada péptido sobre la hemólisis, mientras que la tabla 3.2 muestra el valor de CH_{50} . El efecto tóxico de cada péptido fue dependiente de la concentración. K4S4 presentó una alta actividad hemolítica del 50% a una concentración de 27.92 μ M. En cambio, los demás derivados de Dermaseptina S4 presentaron menor actividad hemolítica. La eliminación de los primeros cinco residuos del extremo N-terminal disminuyó la actividad hemolítica, tal que la máxima concentración evaluada (100 μ M) de los péptidos S4(5-28), S4(5-28)a y K20S4(5-28) no fue suficiente para lisis al 50% de los eritrocitos. Sin embargo, el péptido K20S4(5-28) fue más hemolítico que S4(5-28)a, pero ambos fueron más hemolíticos que su contraparte, S4(5-28). El péptido K4S4(1-15), que a diferencia de K4S4(1-15)a y de K4S4(1-16)a, posee un extremo carboxilo C-terminal y menor carga neta positiva (+4, +5 y +6, respectivamente), presentó una disminución muy pronunciada de la actividad hemolítica, de hecho fue el derivado menos hemolítico de todos. K4S4(1-16)a y K4S4(1-15)a presentaron una actividad hemolítica intermedia, logrando lisis el 50% de células rojas con 88.21 y 83.25 μ M, respectivamente (Figura 3.4, Tabla 2).

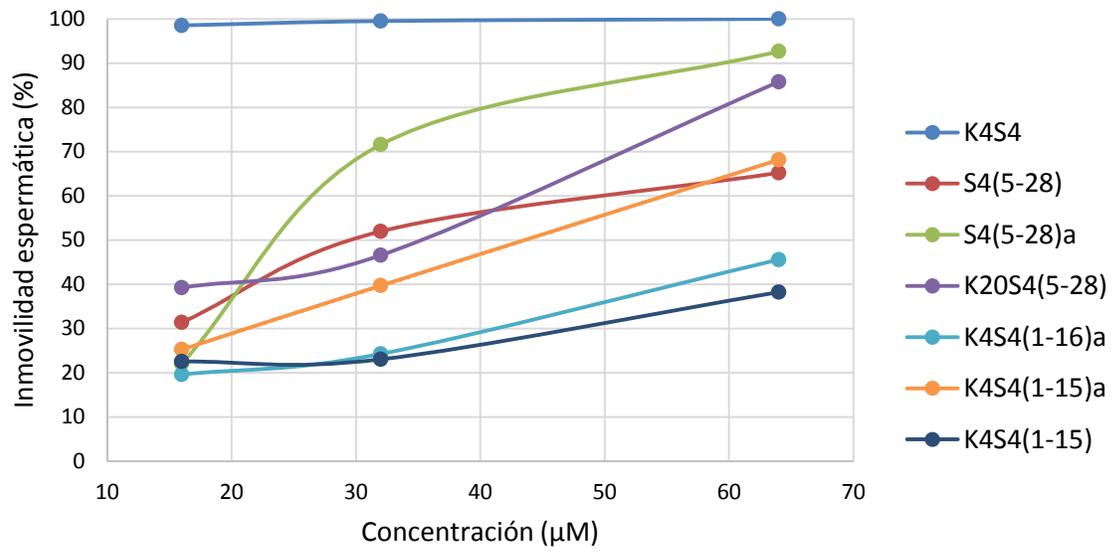
Figura 3.4: Actividad hemolítica de derivados de Dermaseptina S4 en solución salina a 37°C durante 3 h. El control positivo corresponde 100% de lisis causada por Triton X-100.



▪ **Actividad sobre la movilidad espermática**

Los péptidos derivados de Dermaseptina S4 se evaluaron sobre la movilidad espermática tras 1 h de incubación de semen fresco diluido en presencia de cada péptido a diferentes concentraciones (16, 32 y 64 $\mu\text{mol/L}$). En la Figura 3.5 se puede observar el efecto de la concentración de cada péptido sobre la movilidad espermática progresiva y en la Tabla 3.2 se reportan los valores de CI_{50} de cada péptido. Con el tratamiento control se puede observar que entre el 68 y 70% de los espermatozoides presentaron movilidad progresiva. La respuesta en la actividad de los péptidos sobre los espermatozoides fue similar a la actividad hemolítica. Todos los péptidos redujeron la movilidad espermática de manera dependiente de la concentración. K4S4 presentó la actividad más potente de inmovilización, reduciendo completamente la movilidad espermática en todas las concentraciones evaluadas, mientras que los demás péptidos fueron considerablemente menos tóxicos, siendo K4S4(1-16)a y K4S4(1-15) los menos tóxicos. La amidación del extremo C-terminal de S4(5-28), para dar S4(5-28)a, aumentó la hidrofobicidad interfacial y la actividad de inmovilización espermática, mientras que la sustitución N20K, para producir K20S4(5-28), causó el efecto inverso. No obstante, ambos péptidos presentaron un índice relativo de selectividad (IRS) mayor que S4(5-28) y K4S4. De manera similar, la versión amidada de K4S4(1-15) presentó mayor hidrofobicidad interfacial, mayor actividad de inmovilización espermática y mayor IRS (Figura 3.4, Tabla 3.2). En orden de menor a mayor selectividad obtuvimos, K4S4, S4(5-28)a, K20S4(5-28) K4S4(1-16)a y K4S4(1-15)a (Tabla 3.2).

Figura 3.5: Efecto de los péptidos derivados de Dermaseptina S4 sobre la movilidad espermática progresiva.



3.8 Discusión

El semen bovino colectado y procesado para criopreservación normalmente resulta contaminado con bacterias, muchas de las cuáles sobreviven a la criopreservación a pesar del uso de antibióticos en los diluyentes (Eaglesome *et al.*, 1995; Althouse *et al.*, 2000; Thibier y Guerin, 2000; Gomez y Silveira, 2005; Silveira y Machado, 2005; de Ruigh *et al.*, 2006; Aurich y Spersger, 2007; Akhter *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2009; Najee *et al.*, 2012; Kilburn *et al.*, 2013; Gloria *et al.*, 2014). En este trabajo, se aislaron cuatro cepas bacterianas y una cepa de levadura a partir de semen bovino diluido en Tris-Yema y congelado sin antibióticos. Las bacterias aisladas fueron *S. salivarius*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* y *B. cereus*, lo cual corresponde con otras investigaciones (Alba-Gomez y Silveira-Prado, 2005; Silveira y Machado, 2005; Smole *et al.*, 2010; González-Marín *et al.*, 2011; Najee *et al.*, 2012). La levadura, identificada como *Rhodotorula*, fue reportada también en el trabajo de Brown *et al.* (1974). Estas bacterias aisladas de semen, junto *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., y *S. aureus*, fueron utilizadas para determinar la actividad antimicrobiana de los péptidos.

La actividad biológica de los péptidos antimicrobianos es modulada por parámetros fisicoquímicos y estructurales, tales como carga, hidrofobicidad, anfipaticidad, distribución de cargas y agregación (Dathe *et al.*, 1996, 1997, 2001, 2002; Feder *et al.*, 2000; Yeaman y Yount, 2003; Toke, 2005). Con esto en mente, se seleccionaron siete péptidos con el fin de analizar la relación entre estos parámetros y la actividad antibacteriana, espermicida y hemolítica, buscando establecer unos criterios enfocados al diseño de péptidos con alta potencia antibacteriana, pero con baja toxicidad contra células de mamífero, especialmente contra espermatozoides bovinos. Dichos péptidos presentan diferentes modificaciones en la carga neta positiva, las cuales a su vez, afectan los otros parámetros (Tabla 3.1).

En cuanto a la carga, los péptidos cuya carga neta positiva aumentó a +5, como en K4S4, S4(5-28)a, K20S4(5-28), K4S4(1-15)a, o aumentó a +6, como en K4S4(1-16)a, se observó mayor actividad antibacteriana. Por el contrario, los péptidos con carga inferior, como K4S4(1-15) y S4(5-28), ambos con carga +4, presentaron baja actividad. Estos resultados concuerdan con múltiples investigaciones que muestran que el aumento de la carga neta positiva favorece la afinidad por las células bacterianas y, en consecuencia,

aumenta la actividad antibacteriana de los péptidos (Feder *et al.*, 2000; Efron *et al.*, 2002; Kustanovich *et al.*, 2002) (Tabla 3.2). Paralelamente, la toxicidad contra células de mamífero, evaluada en términos de actividad hemolítica y de actividad sobre la movilidad espermática, también aumentó como consecuencia del aumento de la carga, pero este efecto fue menos pronunciado, lo que se tradujo en un aumento de la selectividad celular (mayor IRS) de estos péptidos (Tabla 3.2).

La tendencia a agregación en solución acuosa es otro parámetro importante para la actividad y la selectividad antibacteriana (Feder *et al.*, 2000; Toke, 2005). Esta propiedad puede ser explicada por la capacidad de los péptidos para formar agregados (oligómeros) en solución acuosa estableciendo interacciones hidrofóbicas con otros monómeros. Debido al aumento de tamaño y a la pérdida de flexibilidad, tales agregados son incapaces de pasar a través de la capsula de polisacáridos, de la membrana externa y de la pared celular bacteriana, antes de poder alcanzar e interactuar con la membrana plasmática, que es el blanco de acción. En consecuencia, los péptidos con alta tendencia a agregación son débilmente activos contra las bacterias; en cambio, para un péptido monomérico es más fácil alcanzar la membrana y presentar una actividad antibacteriana efectiva (Feder *et al.*, 2000; Kustanovich *et al.*, 2002; Toke, 2005). Por lo tanto, para el diseño de péptidos antimicrobianos, normalmente se desea reducir la agregación para favorecer la actividad antibacteriana (Feder *et al.*, 2000).

La capacidad de agregación de los péptidos en esta tesis fue estimada usando el algoritmo TANGO, según el cual, la Dermaseptina S4 presenta mayor tendencia a agregación que sus derivados y tiene dos regiones que contribuyen a esta propiedad (Figura 3.3), las cuales coinciden con dos dominios hidrofóbicos N-terminal y C-terminal. (Figuras 3.2). Estos resultados concuerdan con otros trabajos que han demostrado experimentalmente las propiedades de agregación de la Dermaseptina S4 y de sus derivados, y que sugieren que la agregación se da mediante interacciones hidrofóbicas (Feder *et al.*, 2000). De ser así, probablemente la delección de los dominios hidrofóbicos y/o la inserción de cargas positivas en estas regiones interfieran desfavorablemente con la agregación, ya sea por ausencia del dominio hidrofóbico o por repulsión electrostática entre residuos catiónicos (Feder *et al.*, 2000). En efecto, la sustitución M4K en el dominio N-terminal indujo una disminución de la tendencia a agregación de K4S4 (Tabla 3.1), confirmando los resultados obtenidos en otros trabajos (Feder *et al.*, 2000; Kustanovich

et al., 2002). De manera similar, los péptidos K4S4(1-16)a, K4S4(1-15)a y K4S4(1-15), que poseen también la sustitución M4K y, que además, carecen del dominio hidrofóbico C-terminal, no presentaron tendencia a agregación. Por otro lado, la amidación del extremo C-terminal de S4(5-28)a no afectó la agregación, en cambio la sustitución N20K de K20S4(5-28) resultó en una pérdida de tendencia a agregación, aunque fue insuficiente para inhibir completamente la agregación (Tabla 3.1). A partir de estos resultados se puede concluir que el perfil de agregación de los péptidos es influenciado por la hidrofobicidad, pero también por la distribución de las cargas positivas. Así, la introducción de aminoácidos catiónicos en alguno de los dominios hidrofóbicos y/o la eliminación de dichos dominios afecta negativamente la agregación.

En general, la disminución de la agregación favoreció la actividad antibacteriana, pero este efecto dependió de la carga; solo los péptidos con mayor carga y disminución de la agregación presentaron un aumento de la actividad antibacteriana. Por ejemplo, la sustitución M4K aumentó la carga de K4S4 causando una disminución de la tendencia a agregación, lo cual potenció la actividad antibacteriana del péptido 40 veces por encima de la actividad de la Dermaseptina S4 (Feder *et al.*, 2000). De manera similar, los derivados de deleción C-terminal, S4(5-28), S4(5-28)a y K20S4(5-28), tienen una tendencia a agregación similar, pero solo S4(5-28)a y K20S4(5-28), cuya carga aumentó de +4 a +5, presentaron un aumento de la actividad antibacteriana. Igualmente, K4S4(1-15), K4S4(1-15)a y K4S4(1-16)a poseen la misma tendencia a agregación, pero solo K4S4(1-15)a y K4S4(1-16)a, que tienen un aumento de la carga, fueron potentes antibacterianos.

Entre todos los derivados de Dermaseptina S4 evaluados, K4S4(1-15)a presentó la actividad antimicrobiana más potente contra todas las cepas bacterianas evaluadas. K4S4(1-16)a fue también muy activo, excepto contra *S. aureus*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios (Feder *et al.*, 2000, Kustanovich *et al.*, 2002; Zairi *et al.*, 2008). Con el propósito de ganar mayor conocimiento sobre las características estructurales que respaldan la potente actividad antibacteriana y la selectividad de K4S4(1-15)a, se diseñó el péptido K4S4(1-15), cuya única diferencia entre ambos péptidos es la amidación del carboxilo C-terminal. Los resultados indicaron que esta modificación disminuyó drásticamente la actividad del péptido contra todas las bacterias y células de mamífero evaluadas, sugiriendo que la amidación es necesaria

para la actividad del péptido. Una explicación es que la amidación C-terminal estabiliza la formación de una hélice- α anfipática tras la unión del péptido a la membrana, facilitando la actividad del péptido (Shalev *et al.*, 2002; Dennison y Phoenix, 2011). Para estimar la helicidad de los péptidos en cuestión, utilizamos el algoritmo AGADIR (Muñoz y Serrano, 1994) el cual indicó que K4S4(1-15)a presenta una helicidad >2 veces que su análogo no-amidado. Por lo tanto, la alta potencia del péptido amidado (K4S4(1-15)a) puede ser atribuida también a una mayor carga neta positiva y a la estabilización de la conformación helicoidal. Una comparación similar se puede hacer entre los péptidos S4(5-28) y su análogo amidado, S4(5-28)a. Este último presentó mayor actividad biológica que S4(5-28), aunque la helicidad de estos dos péptidos, calculada por AGADIR (Muñoz y Serrano, 1994), fue similar. Probablemente, en este caso, la potenciación de la actividad presentada por S4(5-28)a es consecuencia principalmente del aumento de la carga neta positiva, más que por estabilización de conformación helicoidal. Los resultados indican que la amidación C-terminal de los péptidos podría tener un efecto potenciador de la actividad antibacteriana.

La selectividad celular es un aspecto clave para el diseño de péptidos antimicrobianos como estrategia de control bacteriano del semen bovino. Idealmente, los péptidos deben actuar solo contra células bacterianas, es decir, sin afectar negativamente las células espermáticas. También es fundamental minimizar la posibilidad de que la exposición del tracto reproductivo femenino a los péptidos pueda causar irritación u otro efecto adverso. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto de los péptidos sobre la movilidad espermática y sobre la hemólisis como indicadores de toxicidad contra células de mamífero. En estos experimentos se encontró que K4S4 fue altamente tóxico contra ambos tipos de células, por lo que, a pesar de su excelente actividad antibacteriana, este péptido puede ser descartado como candidato para el control de la contaminación del semen y, probablemente también, para cualquier otra aplicación que requiera contacto con células de mamífero. De acuerdo con las observaciones obtenidas, la baja selectividad de K4S4 podría estar relacionada con sus propiedades fisicoquímicas y estructurales particulares: alta hidrofobicidad, alta carga positiva y una tendencia a agregación intermedia (Tabla 3.1).

En conclusión, en este trabajo se ha identificado un conjunto de péptidos antimicrobianos con potencial para el control bacteriano del semen bovino. Estos péptidos presentaron

potente actividad *in vitro* contra varias bacterias Gram negativas y Gram positivas, y baja toxicidad contra eritrocitos y contra espermatozoides. Los péptidos más potentes y selectivos fueron S4(5-28)a, K20S4(5-28), K4S4(1-16)a y K4S4(1-15)a. Los dos últimos presentaron la mayor potencia antimicrobiana, así como el menor efecto adverso sobre la movilidad espermática. S4(5-28)a y K20S4(5-28) presentaron resultados intermedios. En cambio, los otros péptidos fueron altamente hemolíticos y espermicidas o presentaron baja actividad antimicrobiana. Este trabajo ha generado información sobre la influencia de parámetros como carga neta, hidrofobicidad, amidación y agregación sobre la actividad biológica de los péptidos, que puede ser útil para diseñar nuevos péptidos. Futuras investigaciones deberían estar orientadas a potenciar la actividad antimicrobiana de estos péptidos, reducir su toxicidad contra espermatozoides y evaluación su efectividad (solos y en combinación con antibióticos) para el control bacteriano en criopreservación de semen bovino cuando son adicionados al diluyente de semen.

4. Capítulo 2

Actividad biológica de derivados de Dermaseptina S4 con diferente distribución de aminoácidos catiónicos

4.1 Resumen

La actividad biológica de los péptidos antimicrobianos es mediada principalmente por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que fomentan la unión y la inserción en la membrana celular, lo que perturba la estabilidad de la membrana y causa muerte celular. El aumento de la carga neta positiva se relaciona con la afinidad y selectividad de los péptidos por las células bacterianas. En este trabajo se investigó el efecto de la distribución de los aminoácidos catiónicos sobre la actividad antibacteriana (contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) y citotóxica (contra eritrocitos humanos). Para lograr esto, se utilizó un conjunto de 20 péptidos, cada uno con diferente distribución de los aminoácidos catiónicos y sustitución del triptófano en la tercera posición (sustituciones W3I y W3K), los cuales fueron diseñados a partir de la secuencia del péptido K4S4(1-15)a, un derivado de 15 residuos del péptido antimicrobiano natural Dermaseptina S4 que presenta alta actividad antimicrobiana y selectividad celular. Con base en el análisis de varios parámetros fisicoquímicos y estructurales, como agregación, anfipaticidad, ángulo polar e hidrofobicidad, se escogieron 5 péptidos a los que se les determinó la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y la actividad citotóxica contra eritrocitos humanos. Los resultados obtenidos indican que la distribución de aminoácidos catiónicos afecta la actividad antibacteriana, aunque no se observó una correlación entre estas dos variables. En cambio, cuando la dispersión catiónica de los péptidos fue alta, se observó una disminución de la actividad hemolítica. Comparado con K4S4(1-15)a, los péptidos evaluados presentaron una menor actividad

antibacteriana contra *E. coli* y ninguna actividad detectable contra *S. aureus*, lo cual fue atribuido a la sustitución del residuo de triptófano. Sin embargo, la sustitución W3I favoreció la selectividad celular de K(4,8,9,12) contra *E. coli*, ya que la actividad hemolítica de este péptido disminuyó apreciablemente y mantuvo una alta actividad antibacteriana. Lo anterior proporciona información útil para el diseño de péptidos antimicrobianos y optimización de su actividad antibacteriana y citotóxica. Por lo tanto, se propone que la distribución catiónicos puede ser aplicada para el diseño racional de péptidos en combinación con otros parámetros estructurales.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos, distribución de cargas, selectividad celular, cationicidad.

4.2 Introducción

Actualmente, el conocimiento sobre el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos y su relación con la selectividad celular es limitado (Yuin Ong *et al.*, 2014). La selectividad celular se atribuye a las diferencias bioquímicas entre las membranas celulares procariotas y eucariotas. Dado que las membranas celulares procariotas contienen mayor cantidad de fosfolípidos aniónicos, son el blanco preferido de los péptidos catiónicos (Matsuzaki, 1999, 2009; Huang, 2000), cuya carga actúa como la principal fuerza conductora para la unión sobre las membranas bacterianas (Yeaman y Yount, 2003; Teixeira *et al.*, 2012).

La dispersión catiónica es un parámetro directamente relacionado con la cationicidad y se refiere a la distribución de los aminoácidos catiónicos en el sector hidrofílico de una hélice- α anfipática (Kim y Cha, 2010). Para una carga fija, existen múltiples posibilidades de distribuir los aminoácidos catiónicos en la secuencia; si estos están ampliamente distribuidos, entonces la dispersión catiónica es alta, pero, si están concentrados en una zona determinada de la secuencia, entonces la dispersión catiónica es baja. Este parámetro se calcula en una escala de 0 a 1, siendo 1 el valor correspondiente a la máxima dispersión catiónica (Kim y Cha, 2010), lo cual, probablemente, permite mayor área de interacción del péptido con los fosfolípidos aniónicos de la membrana celular bacteriana y minimiza la repulsión electrostática entre residuos de lisina, estabilizando la estructura helicoidal del péptido (Kim y Cha, 2010).

Considerando que la cationicidad es un factor clave para la selectividad celular de los péptidos antimicrobianos y que la dispersión catiónica afecta la actividad antimicrobiana (Kim y Cha, 2010), resulta interesante explorar distintas modificaciones de este parámetro buscando optimizar la actividad de algún péptido antimicrobiano conocido. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la distribución de los aminoácidos catiónicos y de otros parámetros fisicoquímicos y estructurales, como hidrofobicidad, momento hidrofóbico, agregación y ángulo polar, sobre la actividad biológica de los péptidos antimicrobianos. Para esto, se diseñó un conjunto péptidos análogos de K4S4(1-15)_a con diferente distribución de los aminoácidos catiónicos y se evaluó la actividad antibacteriana y hemolítica.

4.3 Metodología

4.3.1 Localización

El desarrollo experimental de esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Físicoquímica Orgánica de la Escuela de Química (Facultad de Ciencias), en la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

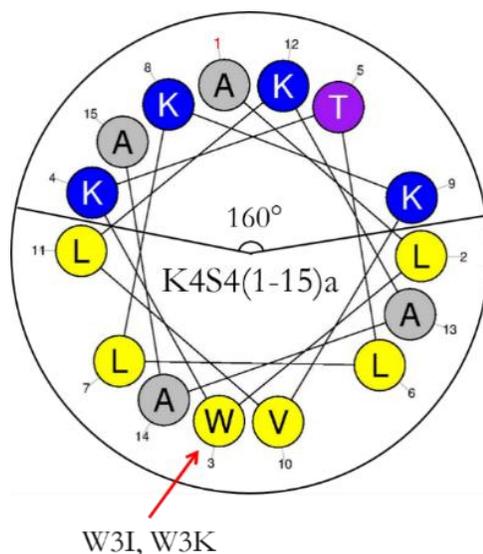
4.3.2 Diseño de péptidos

A partir de la secuencia de K4S4(1-15)a, se diseñaron 20 péptidos con diferente distribución de los aminoácidos catiónicos, de los cuales, 19 tienen una sustitución del residuo de triptófano (W) en la tercera posición por un residuo de isoleucina (I) (sustitución W3I), y el otro péptido tiene la sustitución W3K. A partir del diagrama de Edmudson de la Rueda Helicoidal de K4S4(1-15)a, se identificaron los residuos que conforman el sector hidrofílico (posiciones 1, 4, 5, 8, 9, 12 y 15) y el sector hidrofóbico (posiciones 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13 y 14) (Figura 4-1), lo cual sirvió para guiar el diseño de los péptidos manteniendo la anfipaticidad. Los péptidos utilizados en esta investigación fueron sintetizados por EZBiolab®. Las soluciones stock (1 mM) fueron preparadas a partir de cada péptido liofilizado usando agua destilada estéril y se almacenaron a 0-4°C hasta el momento de la experimentación. Eventualmente, las soluciones descongeladas fueron diluidas en un medio apropiado según cada experimento.

4.3.3 Análisis bioinformático

La longitud, la carga, el momento hidrofóbico relativo, la hidrofobicidad y el punto isoelectrico de los péptidos fueron calculados usando el programa Peptide ID 1.0 (Sánchez *et al.*, 2014), el cual forma parte complementaria de esta tesis. Para el momento hidrofóbico relativo y la hidrofobicidad se utilizó la escala de hidrofobicidad de octanol de Fauchere-Pliska (Fauchere y Pliska, 1983). La predicción de la tendencia a agregación en solución acuosa (pH 7,2; 298,15 K; fuerza iónica 0,02) se hizo usando el *software* TANGO (Fernández-Escamilla *et al.*, 2004). La dispersión catiónica se calculó según la definición dada por Kim y Cha (2010).

Figura 4-1: Diagrama helicoidal del péptido molde K4S4(1-15)a. Representada como la proyección axial 2-dimensional de una hélice- α ideal, se pueden identificar los residuos de lisina (K, círculos azules) que definen el sector hidrofílico del péptido (posiciones 1, 4, 5, 8, 9, 12 y 15) y los demás residuos que conforman el sector hidrofóbico. Dentro del diagrama se indica el ángulo polar. Fuera del diagrama se señala (flecha roja) el triptófano que fue modificado. Los residuos son mostrados usando el código de una letra. Esta imagen fue construida con la ayuda del programa Heliquest (Gautier *et al.*, 2008) y posteriormente modificada.



4.3.4 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

La actividad antibacteriana de los péptidos derivados de Dermaseptina S4 fue evaluada mediante el método de microdilución en caldo (Wiegand *et al.*, 2008) usando medio de cultivo Luria-Bertani (LB; triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L NaCl, pH 7.4). Esta actividad fue definida en términos de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que corresponde a la concentración de péptido más baja que indujo 100% de inhibición del crecimiento bacteriano. Se determinó la CMI de cada péptido contra *E. coli* y *S. aureus*. Estas bacterias tienen interés patológico ya que existen cepas con resistencia a antibióticos, razón por la que fueron seleccionadas como modelo de bacterias Gram negativas y de Gram positivas, respectivamente. Las bacterias fueron cultivadas en medio de cultivo LB a 37°C durante 8-16 h. A partir de este cultivo se preparó un inóculo de 1×10^6 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) utilizando el mismo

medio de cultivo, cuya concentración se estimó mediante mediciones de densidad óptica a 625 nm en el rango 0,08-0,13 de absorbancia (Thermo Scientific Multiskan GO UV-Vis spectrophotometer). Una alícuota de 100 μL de inóculo fue adicionada a cada uno de los pozos de un plato de 96 pozos, conteniendo 100 μL de medio de cultivo con diluciones seriales dobles de cada péptido (desde 32 hasta 0.125 μM), 100 μL de medio de cultivo solo (control negativo) o 100 μL de Triton X-100 15% (v/v) (control positivo) para obtener un inóculo final de 5×10^5 UFC/mL. La inhibición de la proliferación se determinó por mediciones de densidad óptica a 620 nm después de un periodo de incubación de 16-18 h a 37°C. Se realizaron tres repeticiones de cada experimento.

4.3.5 Prueba de hemólisis

La actividad hemolítica de los péptidos antimicrobianos se evaluó usando eritrocitos de sangre humana, los cuales fueron obtenidos a partir de 1 mL de sangre fresca y luego se lavaron tres veces en solución salina (0.9% p/v) mediante centrifugación a 2700 xg por 1 min. El pellet de eritrocitos fue resuspendido con solución salina hasta alcanzar 10 mL de suspensión con una concentración celular aproximada de 8%. Alícuotas de 90 μL de esta suspensión fueron adicionadas a 10 μL de las soluciones de cada péptido, las cuales fueron preparadas en solución salina para obtener una concentración final de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$. La incubación se realizó a 37°C por 3 h en tubos eppendorf de 1.5 mL bajo agitación continua. Muestras de eritrocitos incubadas en presencia de solución salina o de Triton X-100 0.5% fueron incluidas para establecer el 0% y 100% de hemólisis, respectivamente. Después del periodo de incubación, todas las muestras fueron centrifugadas y 70 μL de sobrenadante de cada una fueron transferidos a un plato de 96 pozos para medir la liberación de hemoglobina mediante densidad óptica a 545 nm (Thermo Scientific Multiskan GO UV-Vis spectrophotometer). El experimento fue repetido 3 veces y el porcentaje de hemólisis se calculó usando la Ecuación (4.1):

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{OD_{545} \text{ tratamiento con péptido} - OD_{545} \text{ control negativo}}{OD_{545} \text{ in } 0.5\% \text{ Triton X-100} - OD_{545} \text{ control negativo}} \quad (4.1)$$

4.4 Resultados

4.4.1 Diseño de péptidos

En la Tabla 4-1 se muestran la secuencia de los 20 péptidos diseñados y sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. La nomenclatura dada a cada péptido indica la posición de los residuos de lisina.

Tabla 4-1: Parámetros fisicoquímicos y estructurales de los péptidos diseñados.

Péptido	Secuencia ¹	Agregación	Momento hidrofóbico	Dispersión catiónica	Angulo polar
K4S4(1-15)a	ALWKTLLKKVLKAAA-NH ₂	0.00	0.50	1.00	160
K1,5,8,12	KLITKLLKAVLKAAA-NH ₂	0.00	0.56	0.29	120
K1,5,9,12	KLITKLLAKVLKAAA-NH ₂	0.00	0.54	0.21	160
K4,8,9,12	ALIKTLLKKVLKAAA-NH₂	0.00	0.47	1.00	160
K4,9,12,15	ALIKTLLAKVLKAAK-NH₂	0.00	0.45	0.71	160
K5,8,12,15	ALITKLLKAVLKAAK-NH₂	0.00	0.54	0.57	120
K5,8,9,12	ALITKLLKKVLKAAA-NH₂	0.00	0.52	0.50	160
K5,8,9,15	ALITKLLKKVLAAAK-NH ₂	2.25	0.48	0.50	160
K4,8,9,15	ALIKTLLKKVLAAAK-NH ₂	2.32	0.45	0.43	160
K1,5,9,15	KLITKLLAKVLAAAK-NH ₂	3.03	0.49	0.79	160
K1,5,8,15	KLITKLLKAVLAAAK-NH ₂	11.69	0.54	0.57	120
K1,4,8,15	KLIKTLKAVLAAAK-NH ₂	12.55	0.53	0.21	120
K1,5,8,9	KLITKLLKKVLAAAA-NH ₂	20.67	0.51	0.50	160
K1,4,8,9	KLIKTLKVLAAAA-NH ₂	21.19	0.47	0.71	160
K1,8,9,15	KLIATLLKKVLAAAK-NH ₂	60.64	0.49	0.50	140
K1,8,9,12	KLIATLLKKVLKAAA-NH ₂	62.21	0.52	0.50	120
K1,5,12,15	KLITKLLAAVLKAAK-NH ₂	97.19	0.54	0.57	120
K8,9,12,15	ALIATLLKKVLKAAK-NH ₂	97.93	0.49	0.79	140
K1,9,12,15	KLIATLLAKVLKAAK-NH ₂	119.35	0.50	0.79	140
K1,4,12,15	KLIKTLAAVLKAAK-NH ₂	160.56	0.52	0.50	120
K3,4,8,9,12	ALKKTLLKKVLKAAA-NH₂	0.00	0.30	1.00	160

¹Las secuencias son mostradas usando el código de una letra para los aminoácidos. La amidación C-terminal es representada como NH₂. Las secuencias resaltadas corresponden a los péptidos seleccionados para evaluar la actividad biológica (Tabla 4-2).

De los 20 péptidos diseñados, se seleccionaron 5, teniendo como criterio la agregación, el ángulo polar y la dispersión catiónica. La Tabla 4-2 muestra los resultados de actividad

y las propiedades fisicoquímicas y estructurales de estos cinco péptidos, incluyendo el péptido K4S4(1-15)a. Excepto K(5,8,12,15), que tiene un ángulo polar de 120°, los demás péptidos seleccionados presentan un ángulo polar de 160°, una dispersión catiónica entre 0.5 y 1.0, y ninguno tiene tendencia a agregación (Tabla 4-2). Los péptidos fueron cuidadosamente diseñados para mantener la anfipaticidad de la estructura helicoidal (Figura 4-2). La modificación de la distribución de los aminoácidos catiónicos en el sector polar de K4S4(1-15)a afectó varios parámetros fisicoquímicos y estructurales, pero la carga neta (+5) permaneció constante (+5), excepto en K(3,4,8,9,12), cuya carga aumentó a +6 como resultado de la inserción de un lisina en el sector hidrofóbico del péptido (sustitución W3K). La sustitución W3I disminuyó la hidrofobicidad y el momento hidrofóbico relativo de los péptidos K(5,8,9,12), K(5,8,12,15), K(4,8,9,12) y K(4,9,12,15), y la sustitución W3K disminuyó aún más el valor de estos parámetros de K(3,4,8,9,12) (Tabla 4-2).

Tabla 4-2: Actividad antimicrobiana y propiedades fisicoquímicas y estructurales de los péptidos seleccionados.

Péptido	CMI ($\mu\text{g/mL}$) ¹		Hemólisis (%) ²	Carga	IH ³	μHr ⁴	Dispersión catiónica	Angulo polar
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>						
K4S4(1-15)a	4.2 \pm 1.4	45 \pm 7.07	18.9	5	7.81	0.50	1.0	160
K(5,8,9,12)	5.8 \pm 3.8	≥ 70	18.8	5	7.36	0.52	0.5	160
K(5,8,12,15)	6.7 \pm 2.88	>70	43.3	5	7.36	0.54	0.6	120
K(4,8,9,12)	10	≥ 70	3.5	5	7.36	0.47	1.0	160
K(4,9,12,15)	30 \pm 17.3	>70	7.2	5	7.36	0.45	0.7	160
K(3,4,8,9,12)	80	>70	2.0	6	4.57	0.30	1.0	160

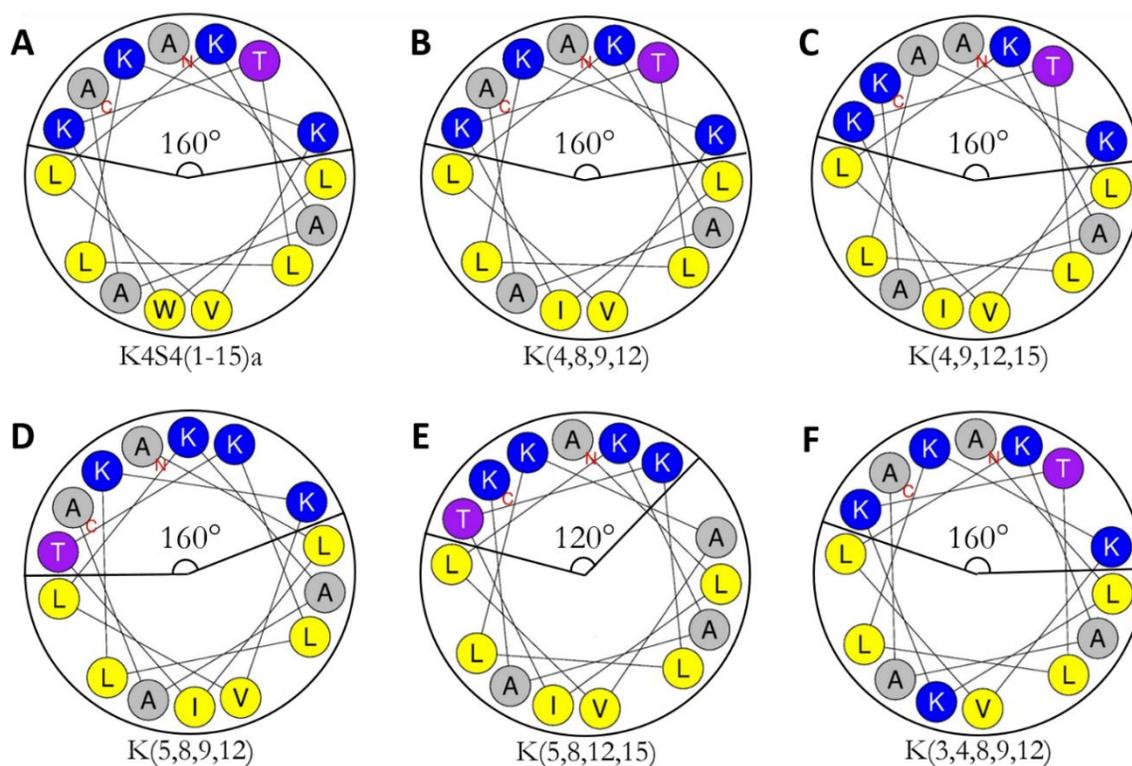
¹Concentración mínima inhibitoria (media \pm D.E.).

²Porcentaje de hemólisis de cada péptido a 100 $\mu\text{g/mL}$.

³Índice de hidrofobicidad.

⁴Momento hidrofóbico relativo.

Figura 4-2: Diagrama helicoidal de los péptidos seleccionados y evaluados. Las proyecciones de rueda helicoidal muestran la distribución de los residuos de lisina en el sector hidrofílico (posiciones 1, 4, 5, 8, 9, 12 y 15) y los demás residuos que conforman el sector hidrofóbico. Dentro del diagrama se indica el nombre del péptido y su ángulo polar. Los residuos son mostrados usando el código de una letra. Los residuos de lisina (K) cargados positivamente son coloreados azul, los residuos hidrofóbicos, leucina (L) y valina (V), son coloreados amarillo y los residuos de alanina (A) y de glicina (G) son coloreados gris. Esta imagen fue construida con la ayuda del programa Heliquest (Gautier *et al.*, 2008) y posteriormente modificada.



4.4.2 Actividad antibacteriana

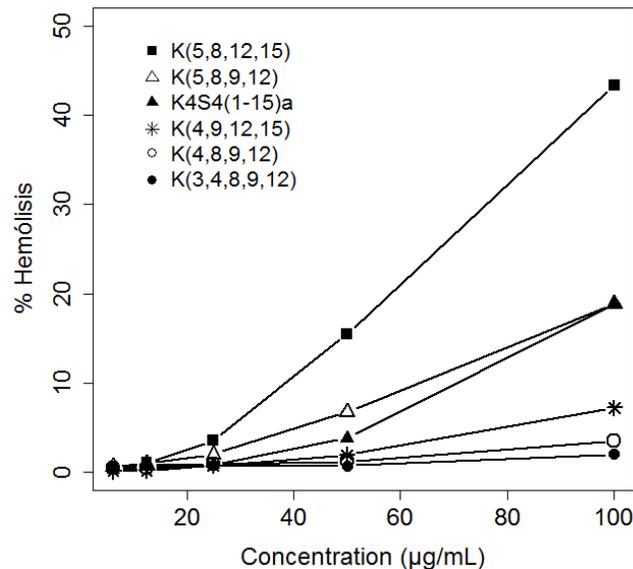
Se evaluó contra *E. coli* y *S. aureus* (Tabla 4-2). K4S4(1-15)a presentó actividad contra ambas bacterias, pero fue 10 veces más potente contra *E. coli* que contra *S. aureus*. Todos los análogos de K4S4(1-15)a presentaron actividad contra *E. coli*, pero ninguno presentó 100% de inhibición del crecimiento de *S. aureus*. Los péptidos K(4,8,9,12) y K(3,4,8,9,12), que tienen la misma distribución de cargas que K4S4(1-15)a, presentaron menor actividad contra *E. coli* en un factor de 2 y 19 veces, respectivamente. La

dispersión catiónica afectó la actividad antibacteriana, siendo K(5,8,9,12) el péptido más activo, mientras que K(4,9,12,15) el menos activo (Tabla 4-2).

4.4.3 Actividad hemolítica

La actividad hemolítica (% hemólisis) de cada uno de los péptidos fue dependiente de dosis (Figura 4-3). La Tabla 4-2 muestra los resultados de actividad hemolítica y se puede observar que todos los péptidos presentaron baja citotoxicidad ya que la mayor concentración evaluada (100 $\mu\text{g/mL}$) fue insuficiente para lograr una hemólisis del 50%. Sin embargo, el péptido K(5,8,12,15) fue el más tóxico, causando un 43.3% de hemólisis con 100 $\mu\text{g/mL}$. Por el contrario, K(3,4,8,9,12) presentó una drástica disminución de la actividad biológica, con una actividad hemolítica y antimicrobiana muy débiles.

Figura 4-3: Actividad hemolítica. Curvas de dosis respuesta obtenidas después de incubación de eritrocitos humanos por 3 h a 37°C.



Los péptidos K(3,4,8,9,12), K(4,9,12,15) y K(4,8,9,12) presentaron menor actividad hemolítica que K4S4(1-15)a, sin embargo, los dos primeros fueron también débiles antimicrobianos. En cambio, K(4,8,9,12) presentó resultados más interesantes. Comparado con K4S4(1-15)a, la actividad antimicrobiana de K(4,8,9,12) contra *E. coli* disminuyó en un factor de 2 veces, pero la actividad hemolítica disminuyó mucho más.

4.5 Discusión

En este trabajo se diseñó un conjunto de 19 análogos de K4S4(1-15)a sustituyendo un residuo de triptófano por una isoleucina (W3I) y variando la distribución de los residuos catiónicos. Un análogo adicional se obtuvo sustituyendo el residuo de triptófano por una lisina. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de estas modificaciones sobre la actividad biológica de los péptidos. Los resultados obtenidos sugieren que tanto la actividad antibacteriana como la hemolítica se pueden potenciar o debilitar modificando la distribución de lisinas en el sector hidrofílico.

La determinación de la influencia específica de la distribución de los aminoácidos catiónicos ha sido considerada en pocos estudios y presenta la dificultad de la variación simultánea de otros parámetros, principalmente el momento hidrofóbico, el ángulo polar y la agregación (Jiang *et al.*, 2008; Sivakamasundari y Nagaraj, 2009; Kim y Cha, 2010). En vista de ello, en este trabajo se trató de fijar la mayor cantidad posible de otros parámetros mientras se varió la distribución de los aminoácidos catiónicos en el sector hidrofílico. Todos los péptidos obtenidos por la sustitución W3I tienen la misma composición, longitud y carga neta positiva. Solo K(5,8,12,15) presentó un ángulo polar diferente, los demás péptidos mantuvieron constante este parámetro en 160°. Por otro lado, el péptido K(3,4,8,9,12) fue obtenido por sustitución W3K de K4S4(1-15)a, lo que causó una disminución de la hidrofobicidad y un aumento de la carga neta positiva, pero el ángulo polar y la dispersión catiónica permanecieron constantes.

Inicialmente, diseñamos 20 secuencias peptídicas con diferentes distribuciones de carga (Tabla 4-1), a partir de las cuales solo cinco fueron seleccionadas y sintetizadas (Tabla 4-2). El principal parámetro de selección fue la tendencia a agregación. La agregación limita la actividad antibacteriana, ya que los agregados no pueden alcanzar la membrana celular de las bacterias. En cambio, los péptidos monoméricos pueden atravesar e interactuar más fácilmente con la pared bacteriana para luego alcanzar la membrana y afectarla por algún mecanismo de disrupción. Dado que la agregación en solución acuosa es un importante modulador de la actividad antibacteriana, los péptidos seleccionados fueron aquellos que no presentaron ninguna tendencia a agregación, permitiéndonos descartar 13 de 20 secuencias peptídicas. Los otros criterios de selección fueron dispersión catiónica entre 0.5 y 1.0 y ángulo polar entre 120° y 160°.

Kim y Cha (2010) sugirieron que la dispersión catiónica tiene mayor influencia que el momento hidrofóbico (μHr) sobre la actividad antibacteriana. Aunque en este trabajo efectivamente se encontró influencia de la distribución de cargas sobre la actividad antibacteriana, no se observó ninguna correlación entre estas 2 variables, pero si entre el μHr y la actividad antibacteriana. Mientras que los péptidos con bajo momento hidrofóbico, como K(3,4,8,9,12) ($\mu\text{Hr} = 0.3$), son débilmente activos contra *E. coli.*, los péptidos más anfipáticos son altamente antibacterianos. Por ejemplo, el péptido K(4,9,12,15) ($\mu\text{Hr} = 0.45$) presentó débil actividad antibacteriana, K(4,8,9,12) ($\mu\text{Hr} = 0.47$) presentó una actividad intermedia y K(5,8,9,12) ($\mu\text{Hr} = 0.52$) presentó mayor actividad antibacteriana. Por otro lado, la dispersión catiónica se correlacionó con la actividad hemolítica, de tal manera que el aumento de la dispersión catiónica coincide con la disminución de la citotoxicidad. Para ilustrar esto, se pueden comparar los péptidos K(5,8,9,12), K(4,9,12,15) y K(4,8,9,12), que tienen una dispersión catiónica creciente (0.5, 0.7 y 1.0, respectivamente) y actividad hemolítica decreciente (18.8, 7.2 y 3.5 %). Basado en estas observaciones, se puede concluir que mientras la dispersión catiónica contribuye a disminuir la actividad hemolítica, el momento hidrofóbico contribuye a aumentar la actividad antibacteriana.

De acuerdo con la explicación anterior, la alta anfipaticidad ($\mu\text{Hr} = 0.54$) y baja dispersión catiónica de K(5,8,12,15) concuerdan con una buena actividad antibacteriana contra *E. coli* y alta citotoxicidad. Sin embargo, es posible también que su toxicidad tan elevada, en comparación con los demás péptidos, sea consecuencia del ángulo polar de 120° , a diferencia de los otros análogos que tienen un ángulo polar de 160° .

Para analizar el efecto de las sustituciones W3I y W3K, se pueden comparar los resultados obtenidos con los péptidos K(4,8,9,12) y K(3,4,8,9,12), los cuales tienen la misma distribución catiónica que K4S4(1-15)a y sólo difieren en dichas sustituciones. Estas modificaciones evidenciaron la importancia del triptófano para la actividad de K4S4(1-15)a. Estructuralmente, la sustitución W3K causa una interrupción del sector hidrofóbico con una lisina, lo cual debilitó drásticamente la actividad biológica del péptido K(3,4,8,9,12), que fue el menos activo, posiblemente por una gran disminución de la hidrofobicidad y del momento hidrofóbico que impediría establecer las interacciones necesarias para la actividad lítica contra células bacterianas y células de mamífero. De

manera similar, la sustitución W3I también disminuyó la hidrofobicidad y el momento hidrofóbico relativo de K(4,8,9,12), lo cual resulta también en un debilitamiento de la actividad, aunque en menor medida que K(3,4,8,9,12). Estos resultados son bastante acordes con los reportes de otros trabajos que muestran la importancia de la hidrofobicidad y del momento hidrofóbico para la actividad antibacteriana de los péptidos antimicrobianos (Feder *et al.*, 2000; Toke, 2005; Giangaspero *et al.*, 2001).

Varios trabajos han reportado que la sustitución por un aminoácido catiónico en el centro del sector hidrofóbico de una hélice- α anfipática puede disminuir la actividad hemolítica e incrementar o mantener la actividad antimicrobiana, que en otras palabras es aumentar la selectividad por las células procariontas (Hawrani *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2011, 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no presentaron este comportamiento. Aquí, la sustitución W3K disminuyó la actividad hemolítica, pero debilitó mucho la actividad antibacteriana, de modo que la selectividad celular fue desfavorecida. La introducción de un residuo catiónico en la cara hidrofóbica del péptido puede dificultar o impedir las interacciones hidrofóbicas con las colas alifáticas de los fosfolípidos de las membranas, disminuyendo la inserción del péptido, lo que explicaría los resultados obtenidos. Por lo tanto, la introducción de aminoácidos catiónicos en el sector hidrofóbico no necesariamente mejora las características de actividad, sino que también podría conducir a un debilitamiento de la estructura helicoidal, a una inestabilidad de los poros, y eventualmente, a una reducción de la actividad lítica del péptido. Otra posible causa del debilitamiento de la actividad biológica de K(3,4,8,9,12), puede ser simplemente el hecho de quitar el residuo de triptófano. Una comparación con K(4,8,9,12) soporta esta idea, ya que la sustitución W3I también causó un debilitamiento de la actividad, aunque en menor grado. Dado que en este trabajo solo se probó la interrupción del sector hidrofóbico mediante la sustitución W3K, sería interesante ampliar este estudio para evaluar otras sustituciones con lisina en varias posiciones del sector hidrofóbico de K4S4(1-15)a.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo demostraron la posibilidad de modular la actividad antibacteriana y citotóxica de los péptidos antimicrobianos modificando la distribución de los aminoácidos catiónicos y manteniendo la carga neta positiva constante, en lugar de aumentarla. Entre los péptidos evaluados, K(4,8,9,12) fue el más selectivo, ya que presentó una actividad hemolítica muy baja y una actividad antimicrobiana contra *E. coli* relativamente alta, mientras que los demás péptidos

presentaron muy débil actividad antimicrobiana o muy alta actividad hemolítica. La evaluación del efecto de la sustitución del residuo de triptófano en la tercera posición de la secuencia de K4S4(1-15)a por una isoleucina mostró que la disminución de la hidrofobicidad permite disminuir la actividad hemolítica y mantener una alta actividad antibacteriana, pero cuando la hidrofobicidad disminuye drásticamente, como ocurrió sustituyendo el triptófano por lisina, la actividad biológica de los péptidos también cae. En general, estos resultados sugieren también un papel del triptófano para la actividad hemolítica, pero en especial para la actividad contra *S. aureus*. Esto abre la pregunta de si esta respuesta contra *S. aureus* se extiende a otras bacterias Gram positivas, y sugiere la necesidad de investigar más a fondo sobre el papel del triptófano en la actividad contra las bacterias Gram positivas.

En términos generales, se encontró una compleja interrelación entre la distribución de cargas, el momento hidrofóbico, la hidrofobicidad y el ángulo polar. Una combinación de alta dispersión catiónica (≥ 0.7) con alto momento hidrofóbico relativo (entre 0.47 y 0.54) y un ángulo polar amplio (160°) contribuye a disminuir la actividad hemolítica y a mantener o a aumentar la actividad antibacteriana. Por el contrario, una combinación de baja dispersión catiónica y ángulo polar estrecho es consistente con una alta actividad hemolítica. Por lo tanto, modificando la distribución de los aminoácidos catiónicos y los otros parámetros interrelacionados, se afecta la actividad biológica de los péptidos antimicrobianos y su espectro de acción, lo cual es una estrategia útil para evitar características de toxicidad indeseables y aumentar la selectividad celular mediante manipulaciones racionales de su secuencia.

A. Anexo: Peptide ID 1.0: Un programa para buscar potenciales péptidos bioactivos en secuencias de proteínas

Manual del usuario de Peptide ID 1.0

Yesid Sánchez^a, Alejandra Betancur^b, Michael Agudelo^c, Sergio Orduz^d
yasanche@unal.edu.co^a, abetancurs@unal.edu.co^b, mjagudeloc@unal.edu.co^c,
sorduzp@unal.edu.co^d
Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

Introducción

Se han empleado diferentes estrategias para identificar y diseñar péptidos antimicrobianos potentes y selectivos (Zelezetsky y Tossi, 2006; Torrent *et al.*, 2011). Inspirados en una clase de péptidos antimicrobianos que muchos organismos producen mediante proteólisis de una proteína precursora (Brand *et al.*, 2012) y en varios estudios en los que han obtenido péptidos antimicrobianos derivados de regiones de secuencia de proteínas, nosotros hemos diseñado el programa Peptide ID 1.0, una herramienta para analizar secuencias de proteínas y buscar segmentos con características fisicoquímicas similares a las de los péptidos antimicrobianos α -helicoidales anfipáticos. Según esta estrategia, la disponibilidad actual de proteomas de muchos organismos en bases de datos públicas (por ejemplo, UniProt; <http://www.uniprot.org/>) supone una fuente enorme para la búsqueda de péptidos con potencial función antimicrobiana.

Antes de utilizar por primera vez el programa Peptide ID 1.0, recomendamos leer este manual, en el cual describimos las características, damos instrucciones de uso y presentamos información importante para familiarizar al usuario con su funcionamiento básico. El contenido de este manual se enfoca en el uso de Peptide ID 1.0 para buscar y diseñar péptidos antimicrobianos, pero el funcionamiento del programa es el mismo si se quiere usar para otro tipo de péptidos bioactivos.

Descripción y bases teóricas

Los péptidos antimicrobianos son muy diversos tanto en su secuencia de aminoácidos como en su estructura secundaria, pero poseen varias propiedades fisicoquímicas comunes, como carga neta positiva (entre +3 y +6), longitud corta (entre 12 y 50 aminoácidos), contenido de aminoácidos hidrofóbicos (50%), anfipaticidad, entre otras (Torrent *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2012). Estas propiedades modulan las interacciones péptido-membrana, influenciando la actividad de los péptidos en términos de potencia y de selectividad antimicrobiana (Dathe *et al.*, 1997; Dathe y Wieprecht, 1999; Yeaman y Yount, 2003). Peptide ID 1.0 puede calcular varias de estas propiedades fisicoquímicas y permite al usuario utilizarlas como criterio de búsqueda de segmentos de secuencia en una proteína. Luego, los segmentos encontrados por el programa pueden ser considerados como péptidos capaces de formar hélices- α anfipáticas con potencial actividad antimicrobiana, si sus propiedades fisicoquímicas calculadas son similares a las de los péptidos antimicrobianos conocidos. Dada la coincidencia de las propiedades fisicoquímicas entre péptidos antimicrobianos y péptidos no-antimicrobianos (Brand *et al.*, 2012), Peptide ID 1.0 no puede ser considerado un predictor, por lo que los segmentos de secuencia deben ser cuidadosamente seleccionados por el usuario y posteriormente validados mediante otras herramientas bioinformáticas y experimentalmente en el laboratorio.

La función de Peptide ID 1.0 consiste básicamente en tomar como entrada (*input*) la secuencia de aminoácidos de una proteína cualquiera para buscar segmentos de secuencia que satisfagan varios criterios definidos por el usuario. Estos criterios son un rango de valores para varias propiedades fisicoquímicas típicas de los péptidos antimicrobianos α -helicoidales anfipáticos: longitud (L), carga (Z), punto isoeléctrico (pI), porcentaje de hidrofobicidad ($\%H$), hidrofobicidad media (H_m) e hidrofobicidad total (H_t); además, el usuario puede excluir de la búsqueda segmentos de secuencia que contengan determinado(s) aminoácido(s). Como resultado, el programa arrojará una lista (*output*) con los segmentos de secuencia encontrados, indicando su posición en la proteína, su secuencia y el valor calculado de sus propiedades fisicoquímicas anteriormente anotadas.

Peptide ID 1.0 también calcula el momento hidrofóbico medio (μH) y el momento hidrofóbico relativo (μH_r). Además de la escala de hidrofobicidad consenso de Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1982a), también se puede utilizar la escala de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) y la escala de octanol de Fauchere y Pliska (Fauchere y Pliska, 1983) para el cálculo de la hidrofobicidad y del momento hidrofóbico. Peptide ID 1.0 también posee una consola complementaria, llamada "Analizar péptido", que sirve para calcular varias propiedades fisicoquímicas y estructurales de cualquier secuencia peptídica individual introducida por el usuario. Esta consola permite modificar los extremos N- y C-terminales (por acetilación y amidación, respectivamente) de la secuencia peptídica, calcular la carga neta en función de pH y calcular la hidrofobicidad y el momento hidrofóbico para secuencias con aminoácidos no-naturales utilizando la escala de hidrofobicidad de Tossi y colaboradores (Tossi *et al.*, 2002). Adicionalmente, la consola "Analizar péptido" genera una gráfica de perfil de hidrofobicidad que muestra la hidrofobicidad de cada aminoácido de la secuencia, utilizando cualquiera de las escalas de hidrofobicidad disponibles por el programa.

A continuación describimos las propiedades fisicoquímicas y estructurales que calcula Peptide ID 1.0

▪ Longitud (L)

La longitud es el único parámetro obligatorio que el usuario debe definir para ejecutar el algoritmo de Peptide ID 1.0, dado que la función básica de este programa es fragmentar la secuencia de la proteína en segmentos más cortos, según el rango de longitud elegido. Los péptidos antimicrobianos son generalmente cortos (<50 aminoácidos). En promedio, la longitud de todos los péptidos naturales (2426) reportados en la Base de Datos de Péptidos Antimicrobianos es de 32.32 aminoácidos (APD, *Antimicrobial Peptide Database*, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Este parámetro puede jugar un papel en el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos, modulando la inserción en la membrana (Shai, 2002). Además, este parámetro tiene implicaciones económicas y prácticas ya que los péptidos cortos son más económicos y fáciles de sintetizar.

▪ Carga (Z)

Muchos de los péptidos antimicrobianos conocidos presentan una carga neta positiva, entre +2 y +9 (Yeaman y Yount, 2003; Teixeira *et al.*, 2012); en promedio +3,18 (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>; Wang y Wang, 2004; Wang *et al.*, 2009). Esta característica, debida a los residuos de arginina y/o de lisina en su secuencia, juega un rol predominante en las interacciones péptido-membrana, principalmente en la atracción inicial del péptido catiónico a la superficie aniónica de las membranas bacterianas (Dathe *et al.*, 2001). Debido a la naturaleza zwitteriónica de la membrana de las células de mamíferos, la carga positiva de los péptidos también les confiere selectividad antimicrobiana; una característica fundamental para péptidos con potencial aplicación terapéutica y biotecnológica.

Usualmente, el aumento de la carga neta positiva de los péptidos antimicrobianos favorece su afinidad y adsorción por las membranas bacterianas, mejorando la actividad lítica (Dathe *et al.*, 1997; Brogden, 2005). Pero hay un límite para estos efectos, ya que el aumento de la carga más allá de cierto umbral disminuye o elimina la actividad antibacteriana (Giangaspero *et al.*, 2001) y puede también aumentar la actividad hemolítica (Dathe *et al.*, 2001; Zelezetsky y Tossi, 2006).

Peptide ID 1.0 calcula la carga de cualquier secuencia peptídica asumiendo un pH neutro (7.0-7.4). Así, la lisina y la arginina aportan una unidad de carga positiva, mientras que el aspartato y el glutamato aportan una unidad de carga negativa. Además, la consola "Analizar péptido" de Peptide ID 1.0 calcula la carga neta en función del pH utilizando la ecuación (1), donde L es el número total de aminoácidos de la secuencia (longitud), pK es la constante de disociación ácida, i representa el extremo N-terminal y los aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) y j representa el extremo C-terminal y los aminoácidos aspartato, glutamato, cisteína y tirosina (Ecuación 1).

$$Z = \sum_{i=1}^L \left(\frac{1}{1+10^{pH-pK_i}} \right) - \sum_{j=1}^L \left(\frac{1}{1+10^{pK_j-pH}} \right) \quad (1)$$

Para calcular la carga neta en función del pH, Peptide ID 1.0 utiliza los valores de pK de Lehninger (Nelson y Cox, 2000) asumiendo que no hay interacción entre aminoácidos, por lo que toma un valor fijo de pK . Los extremos N- y C-terminales también poseen valores fijos de pK , excepto cuando son modificados por acetilación y amidación, en cuyo caso no se asume ningún valor (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de pK.

Aminoácido	R	D	C	E	H	K	Y	N-terminal	C-termina
pK	12,4 8	3,65	8,1 8	4,2 5	6,0	10,5 3	10,0 7	9,69	2,34

▪ Punto isoelectrico (pI)

El punto isoelectrico es el pH en el cual la carga neta de un péptido es cero. Peptide ID 1.0 calcula el pI utilizando la ecuación (1) a través de un algoritmo que itera hasta que encuentra el cero de dicha ecuación. La mayoría de los péptidos antimicrobianos poseen un $pI > 9$, lo que garantiza su carácter catiónico en condiciones de pH normales.

▪ Porcentaje de hidrofobicidad (%H) e Hidrofobicidad (H)

La hidrofobicidad (H) indica la afinidad de un péptido por el interior de una membrana biológica. Peptide ID 1.0 puede calcular el porcentaje de hidrofobicidad (%H) y las hidrofobicidades media (H_m) y total (H_t) utilizando las ecuaciones (2) y (3). El primero es simplemente el porcentaje de residuos hidrofóbicos en un péptido, mientras que la hidrofobicidad media o total es una cantidad escalar definida, respectivamente, como el promedio o la sumatoria total de la hidrofobicidad de la cadena lateral de cada aminoácido en una secuencia peptídica. La hidrofobicidad es un valor numérico asociado a la afinidad de la cadena lateral de un aminoácido por un solvente hidrofóbico en comparación con el agua.

$$H_m = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L H_i \quad (2) \quad H_t = \sum_{i=1}^L H_i \quad (3)$$

donde L es la longitud de la secuencia y H_i es la hidrofobicidad del aminoácido en la posición i en la secuencia definido según una escala de hidrofobicidad (Sección 2.5).

La hidrofobicidad es un parámetro clave para la actividad biológica de los péptidos antimicrobianos (Brogden, 2005; Pasupuleti *et al.*, 2012). El aumento de la hidrofobicidad favorece la inserción de los péptidos en la membrana y aumenta la actividad antimicrobiana (Dathe *et al.*, 1997; Ringstad *et al.*, 2008), pero una hidrofobicidad muy alta (>60%) aumenta la toxicidad contra células eucariotas, comprometiendo la selectividad antibacteriana. La mayoría de los péptidos antimicrobianos poseen una hidrofobicidad moderada; alrededor de 50% de aminoácidos hidrofóbicos (Yeaman y Yount, 2003).

▪ Escalas de hidrofobicidad

Las escalas de hidrofobicidad proporcionan una medida de la afinidad relativa de la cadena lateral de los aminoácidos por los ambientes hidrofóbicos. La selección de la escala de hidrofobicidad es importante para interpretar la magnitud de la hidrofobicidad (H_m o H_t) y del momento hidrofóbico (Phoenix y Harris, 2002). Aunque se han determinado más de cien escalas de hidrofobicidad, Peptide ID 1.0 cuenta con las escalas más comúnmente usadas (Tabla 2).

Tabla 2. Escalas de hidrofobicidad.

Aminoácido			Escala de hidrofobicidad			
Nombre	Código 3 letras	Código 1 letra	Kyte y Doolittle, 1982	Eisenberg <i>et al.</i> , 1982a	Fauchere y Pliska, 1983	Tossi <i>et al.</i> , 2002
Alanina	Ala	A	1,8	0,25	0,31	-1,1
Arginina	Arg	R	-4,5	-1,76	-1,01	-10
Asparagina	Asn	N	-3,5	-0,64	-0,6	-7,1
Aspartato	Asp	D	-3,5	-0,72	-0,77	-8,3
Cisteína	Cys	C	2,5	0,04	1,54	-2,3
Glutamina	Gln	Q	-3,5	-0,69	-0,22	-6
Glutamato	Glu	E	-3,5	-0,62	-0,64	-8,3
Glicina	Gly	G	-0,4	0,16	0	-2,4
Histidina	His	H	-3,2	-0,4	0,13	-3,8
Isoleucina	Ile	I	4,5	0,73	1,8	8,7
Leucina	Leu	L	3,8	0,53	1,7	9,7
Lisina	Lys	K	-3,9	-1,1	-0,99	-9,9
Metionina	Met	M	1,9	0,26	1,23	4,6
Fenilalanina	Phe	F	2,8	0,61	1,79	10
Prolina	Pro	P	-1,6	-0,07	0,72	-0,2
Serina	Ser	S	-0,8	-0,26	-0,04	-4,3
Treonina	Thr	T	-0,7	-0,18	0,26	-3,8
Triptófano	Trp	W	-0,9	0,37	2,25	9,7
Tirosina	Tyr	Y	-1,3	0,02	0,96	2,5
Valina	Val	V	4,2	0,54	1,22	4,1
norleucina	Nle	Z	-	-	-	9,1
dipropilglicina	Dpg	1	-	-	-	13,7
dietilglicina	Deg	2	-	-	-	6
norvalina	Nva	3	-	-	-	5,3
Ácido aminoisobutírico	Aib	B	-	-	-	1,1
Ácido aminobutírico	Abu	U	-	-	-	1,7
Ornitina	Orn	O	-	-	-	-9
Homoserina	Hse	4	-	-	-	-3,5
Ácido diaminopropiónico	Dap	5	-	-	-	-9,5
Ácido diaminobutírico	Dab	6	-	-	-	-9,3
Ácido 1- aminociclopentano- 1-carboxílico	Acp	7	-	-	-	6,2

▪ Momento hidrofóbico (μH)

El momento hidrofóbico medio (o simplemente, momento hidrofóbico), μH , es una medida cuantitativa de la anfipaticidad de un péptido. Este parámetro corresponde a la magnitud del vector suma de las hidrofobicidades \vec{H}_i de las cadenas laterales de los aminoácidos de un péptido (Eisenberg *et al.*, 1982b). Para cualquier secuencia de aminoácidos de longitud L , Peptide ID calcula el momento hidrofóbico usando la Ecuación (4):

$$\mu H = \frac{1}{L} \left\{ \left(\sum_{i=1}^L H_i \cos(i\delta) \right)^2 + \left(\sum_{i=1}^L H_i \sin(i\delta) \right)^2 \right\}^{1/2} \quad (4)$$

donde H_i es la hidrofobicidad del aminoácido en la posición i , $\delta = 2\pi/m$ es el ángulo en radianes en el que las cadenas laterales sucesivas emergen desde la cadena principal y

m es el número de aminoácidos por vuelta. Peptide ID 1.0 asume todos los segmentos de secuencia como una hélice- α ideal, es decir, con $m = 3.6$ residuos por vuelta, para lo cual $\delta = 100^\circ$. Por lo tanto, el μH es un parámetro hipotético para los segmentos de secuencia que el programa identifica en una proteína.

Con el cálculo del momento hidrofóbico, Peptide ID 1.0 ayuda a predecir cuáles de los segmentos de secuencia encontrados por el algoritmo podrían formar hélices- α anfipáticas. Un valor alto del μH indica que el segmento de secuencia asociado tiene mayor tendencia a formar una hélice- α anfipática. Este tipo de hélices constituyen el grupo más común y ampliamente estudiado de los péptidos antimicrobianos, lo cual justifica calcular el momento hidrofóbico como criterio para buscar segmentos de secuencia que representen potenciales péptidos antimicrobianos. Además, el grado de anfipaticidad influye en la potencia y el espectro de acción de los péptidos antimicrobianos α -helicoidales (Datte *et al.*, 1997, Giangaspero *et al.*, 2001); mayor momento hidrofóbico se ha correlacionado con mayor actividad antibacteriana (Brogden, 2005), pero con un efecto más pronunciado sobre la actividad hemolítica (Dathe y Wieprecht, 1999).

▪ Momento hidrofóbico relativo (μH_r)

Para facilitar la comparación del momento hidrofóbico entre varios segmentos de secuencia, Peptide ID 1.0 calcula también el momento hidrofóbico relativo ($\mu H_r = \mu H / \mu H_{max}$), que es la anfipaticidad de un péptido relativa al valor máximo posible (μH_{max}). Por ejemplo, si una secuencia dada tiene un $\mu H_r = 0.5$ quiere decir que tiene 50% de la anfipaticidad máxima posible. El μH_{max} es entonces el valor de referencia y corresponde al momento hidrofóbico de un péptido α -helicoidal de 18 aminoácidos perfectamente anfipático; su valor depende de la composición del péptido y de la escala de hidrofobicidad. Para las escalas de Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1982a) y de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982), el μH_{max} es 0.80 y 2.88, respectivamente, y corresponde a un péptido compuesto solo por 9 aminoácidos de isoleucina (I) y por 9 aminoácidos de arginina (R) perfectamente segregados en caras opuestas sobre la proyección de Edmundson. Para la escala de Fauchere y Pliska (Fauchere y Pliska, 1983), el μH_{max} es 1,04 y corresponde a un péptido que estaría compuesto solo por aminoácidos de triptófano (W) y de arginina (R). Para la escala de Tossi (Tossi *et al.*, 2002), el μH_{max} es 7,58 y corresponde a un péptido compuesto solo por aminoácidos de dipropilglicina (1) y de arginina (R). El péptido de referencia para cada escala de hidrofobicidad se supone como una hélice- α ideal (con una proyección de las cadenas laterales de 100°) con 5 vueltas completas (3.6 residuos por vuelta) (Figura 1).

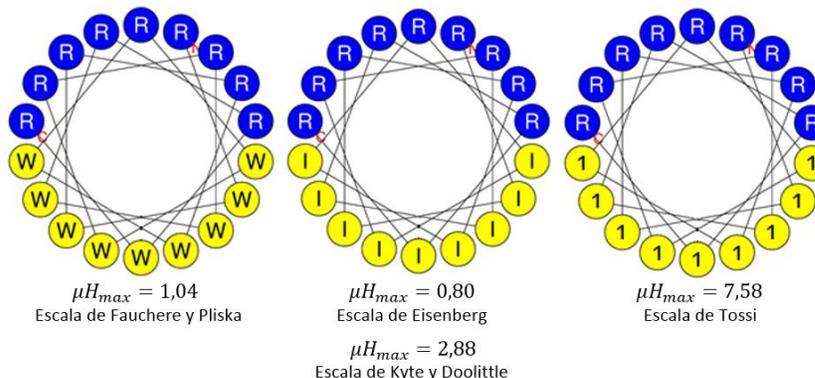


Figura 1. Representación de Edmundson de los péptidos perfectamente anfipáticos utilizados para calcular el momento hidrofóbico relativo. Imágenes tomadas del servidor HeliQuest (Gautier *et al.*, 2008) y modificadas por los autores de este manual.

Instalación

Peptide ID 1.0 está escrito en lenguaje Java y funciona en un archivo ejecutable con extensión .jar. Para abrir este programa, el usuario simplemente debe hacer doble clic en el ícono del archivo .jar, pero es necesario tener instalado el complemento Java Virtual Machine (JVM); preferiblemente en una versión posterior a la 7.0.

Descripción de la interfaz principal

Peptide ID 1.0 tiene una interfaz amigable e intuitiva (Imagen 1). A continuación, describimos la función básica de los íconos y de las opciones del programa; una vez el usuario conozca las funciones y el diseño básico, será más fácil utilizar el programa.

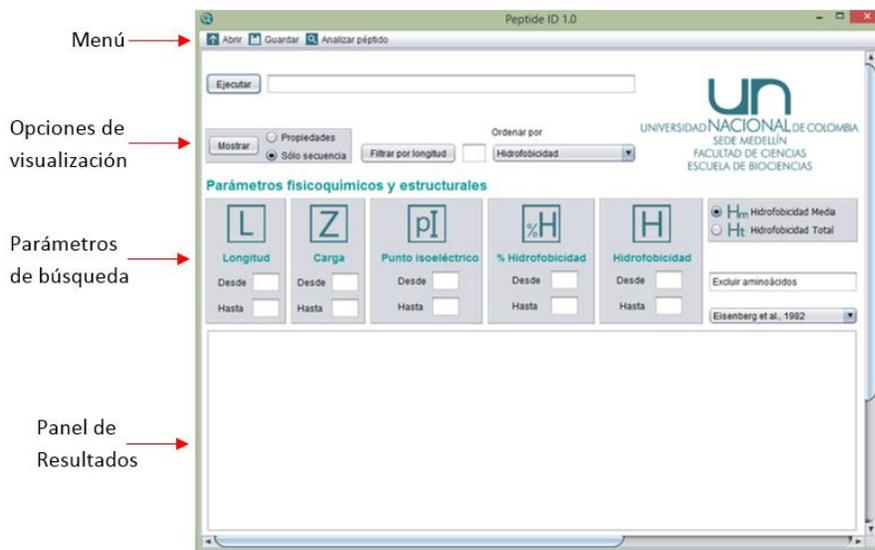


Imagen 1

Menú



Imagen 2

- Cargar:** Carga o abre un archivo en formato FASTA que contenga la secuencia de una proteína.
- Guardar:** Guarda los resultados obtenidos.
- Analizar péptido:** Abre la ventana de la consola “Analizar péptido” que permite calcular propiedades fisicoquímicas a secuencias peptídicas individuales. En la sección 5.6 se describe el funcionamiento de esta consola.

Opciones de visualización



Imagen 3

- Mostrar:** Permite visualizar los resultados en el panel de resultados. El usuario puede elegir la opción “Propiedades”, que muestra las secuencias de todos segmentos encontrados junto con sus correspondientes propiedades fisicoquímicas, o la opción “Sólo secuencia” que muestra solo las secuencias sin las propiedades.
- Filtrar por longitud:** Cuando la lista de resultados comprende segmentos de secuencia de diferentes longitudes, este botón permite visualizar en el panel de resultados solo segmentos de un único número de aminoácidos.
- Ordenar por:** Permite ordenar la lista de segmentos de secuencia por hidrofobicidad, porcentaje de hidrofobicidad, momento hidrofóbico, carga o punto isoeléctrico.

Parámetros de búsqueda

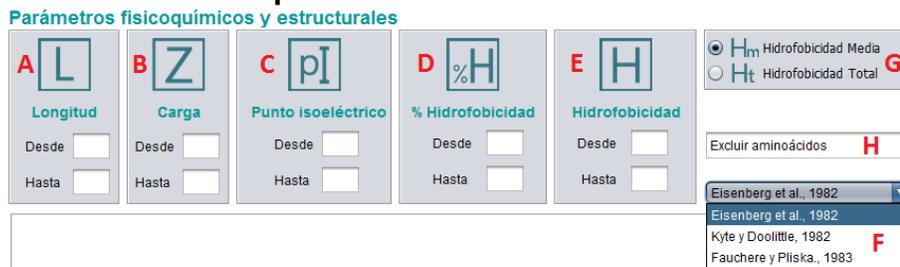


Imagen 4

- Longitud (L):** Define el rango de longitud (número de aminoácidos) de los segmentos de secuencia que el usuario desea buscar en una proteína.
- Carga (Z):** Define el rango de carga de los segmentos de secuencia que el usuario desea buscar en una proteína. En los cuadros de texto correspondientes se deben usar números enteros. Para este parámetro, Peptide ID 1.0 supone un pH de 7.0-7.4, por lo que cada aminoácido de lisina (K) o de arginina (R) aporta

una unidad de carga positiva (+1), mientras que cada aminoácido de aspartato (D) o de glutamato (E) aporta una unidad de carga negativa (-1). Bajo esta suposición, la histidina se cuenta como un aminoácido neutro.

- c. **Punto isoeléctrico (pI):** Define el rango de punto isoeléctrico de los segmentos de secuencia que el usuario desea buscar en una proteína. En los cuadros de texto correspondientes se pueden escribir números decimales, pero estos deben ser indicados con un punto (.).
- d. **% Hidrofobicidad (% H):** Define el rango, en porcentaje, del contenido de aminoácidos hidrofóbicos de los segmentos de secuencia que el usuario desea buscar en una proteína. Peptide ID 1.0 reconoce alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I) y fenilalanina (F) como aminoácidos hidrofóbicos. En los cuadros de texto correspondientes se pueden escribir números decimales, pero estos deben ser indicados con un punto (.).
- e. **Hidrofobicidad (H):** Define el rango de hidrofobicidad de los segmentos de secuencia que el usuario desea buscar en una proteína. Para definir este parámetro se debe tener en cuenta la escala de hidrofobicidad (F, Imagen 4) y el cálculo con el que se quiere ejecutar el algoritmo (G, Imagen 4). En los cuadros de texto correspondientes se pueden escribir números decimales, pero estos deben ser indicados con un punto (.).
- f. **Escala de hidrofobicidad:** Ventana desplegable para seleccionar la escala con la cual se va a calcular la hidrofobicidad y el momento hidrofóbico de los segmentos de secuencia que el usuario desea buscar en una proteína. Por defecto, Peptide ID 1.0 utiliza la escala de hidrofobicidad de Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1982a), pero es posible también utilizar la de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) y la de Fauchere y Pliska (Fauchere y Pliska, 1983).
- g. **Hidrofobicidad media (H_m) o Hidrofobicidad total (H_t):** Cuadro de opciones para seleccionar el tipo de cálculo de hidrofobicidad con el cual el usuario desea buscar segmentos de secuencia en una proteína.
- h. **Excluir aminoácidos:** Cuadro de texto para digitar y elegir cuáles aminoácidos deben ser excluidos o descartados por el algoritmo para la búsqueda de segmentos de secuencia de proteína. Los aminoácidos se deben digitar en código de una letra y sin espacios ni comas.

▪ Consola “Analizar péptido”

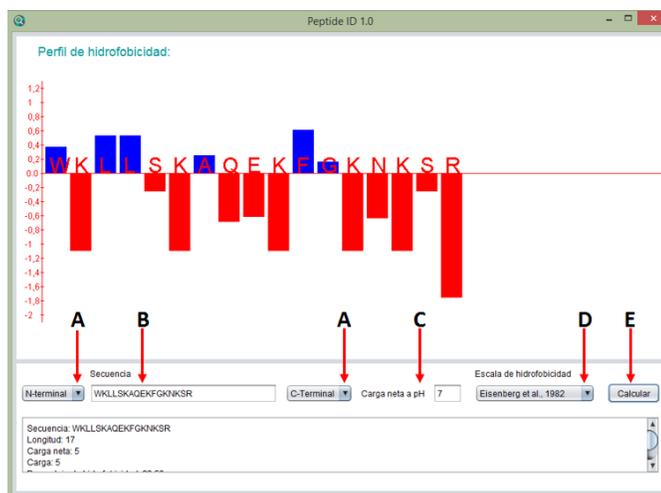


Imagen 5

- a. **Modificación de los extremos N- y C-terminal:** Estas dos ventanas desplegadas permiten neutralizar los extremos N- y C-terminales introduciendo una acetilación y/o una amidación, respectivamente.
- b. **Secuencia:** Cuadro de texto para introducir una secuencia peptídica en código de una letra.
- c. **Carga neta en función de pH:** Cuadro de texto para introducir un valor de pH en función del cual se quiere calcular la carga neta que tendría el péptido en solución acuosa; se pueden escribir números decimales, pero estos deben ser indicados con un punto (.).
- d. **Escala de hidrofobicidad:** Ventana desplegable para seleccionar la escala con la cual se va a calcular la hidrofobicidad y el momento hidrofóbico de la secuencia peptídica. Por defecto, Peptide ID 1.0 utiliza la escala de hidrofobicidad de Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1982a).
- e. **Calcular:** Botón para ejecutar el algoritmo. Un clic genera la gráfica del perfil de hidrofobicidad de la secuencia peptídica; un segundo calcula las propiedades fisicoquímicas que serán presentadas en el panel de resultados.
- f. **Panel de resultados:** Espacio en el que Peptide ID 1.0 presenta los resultados.

Instrucciones de uso

En esta sección explicamos paso a paso cómo utilizar Peptide ID 1.0, tomando como ejemplo la secuencia de 708 aminoácidos de la proteína Lactotransferrina bovina (Lactotransferrina-B) de *Bos taurus* (UniProtKB P24627) (Figura 2).

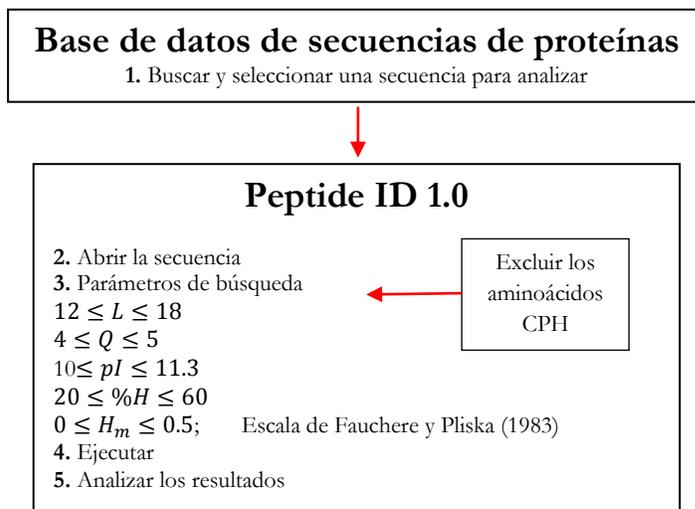


Figura 2. Descripción simplificada de las instrucciones de uso de Peptide ID 1.0. El usuario primero debe abrir en el programa una secuencia de aminoácidos y luego elegir un rango de valores para los parámetros fisicoquímicos y estructurales que serán usados como criterio de búsqueda de segmentos de secuencia. El programa identificará segmentos de secuencia que satisfagan los criterios y presentará el valor calculado de cada parámetro correspondiente a cada segmento de secuencia encontrado. Ya que estos parámetros están relacionados con la actividad de los péptidos antimicrobianos α -helicoidales, el usuario deberá analizar los resultados para seleccionar los segmentos más interesantes.

- **Abrir la secuencia de una proteína**

Para ejecutar el algoritmo de Peptide ID 1.0, primero se debe cargar el archivo en formato FASTA que contiene la secuencia de aminoácidos de la proteína que se quiere analizar (Imagen 6).

```
>sp|P24627|TRFL_BOVIN Lactotransferrin OS=Bos taurus GN=LTF PE=1 SV=2
MKLFVPLLALLSGLGALCLAAPRKNVWCTISQPEWFKCRRWQNRMKKLGAPSTCVRRAF
ALECIRAIAEKKADAVTLDGGMVFEAGRDPYKLRPVAEEIYGTKEPQTHYYAVAVVKKG
SNFQLDQLQGRKSCHTGLGRSAGWIIIPMGILRPYLSWTESLEPLQGAFAKFFSASCVPCI
DRQAYPNLCQLCKGEGENQCACSSREPYFGYSGAFKCLQDAGDVAFVKETTTFENLPEK
ADRDQYELLCNNRAPVDFAFKECHLAQVPSHAVVARSVDGKEDLINKLLSKAQEFKGN
KSRSFQLFGSPPGQRDLLFKDSALGFLRIPSKVDSALYLGSRYLTTLNKLNRETAEEVKAR
YTRVWCAVGPPEEQKCKQMSQSGQNVTCATASTTDDCIVLVKGEADALNDGGYIYT
AGKCGLVPLAENRKS5KHSLDCVLRPTGYLAVAVKKANEGLTWNSLKDKKSCHTAV
DRTAGWNIIPMLIVNQ7GSCAFDEFFSQSCAPGADPKSRKCALCAGDDQGLDKCVPNSKE
KYYGYTGAFRCLAEDVGDVAFVKINDTVWENTNGESTADWAKNLNREDFRLCLDGTAKPV
TEAQSCHLAVAPNHAVVSRSDRAAHVKQVLHQQALFGKNGKNCPOKFLFKSETKNLLF
NDNTECLAKLGGRPITYEYELGTEYVTAIANLKKCSTSPLEACAFLTR
```

Imagen 6. Secuencia de aminoácidos en formato FASTA de la proteína Lactotransferrina Bovina (Lactotransferrina-B) (UniProtKB P24627)

Para abrir el archivo de la proteína, haga clic en el botón “Abrir” del menú, ubicado en la esquina superior izquierda de la ventana principal (Imágenes 1 y 7). Esto hará aparecer una nueva ventana para buscar la ubicación del archivo y abrir la secuencia en el programa.



Imagen 7

- **Elegir y definir los parámetros de búsqueda**

Una vez abierto el archivo con la secuencia de una proteína que se quiere analizar, como se nota en la caja de texto a la derecha del botón “Ejecutar” (Imagen 8), el usuario puede elegir el rango de valores de los parámetros fisicoquímicos que desea utilizar como criterio para buscar segmentos de secuencia. Los valores inferior y superior de cada parámetro se deben digitar en los cuadros de texto correspondientes “Desde” y “Hasta”, respectivamente. Los parámetros son: longitud (L), carga (Q , a pH 7.0-7,4), punto isoeléctrico (pI), porcentaje de hidrofobicidad ($\%H$) e hidrofobicidad media (H_m) o hidrofobicidad total (H_t). Para calcular la hidrofobicidad, se puede elegir una de tres escalas de hidrofobicidad: la escala consenso (no normalizada) de Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1982a), la escala de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) y la escala de octanol de Fauchere y Pliska (Fauchere y Pliska, 1983). También se puede elegir cuáles aminoácidos excluir de la búsqueda digitando su código de una letra (Imagen 10); los aminoácidos ácidos y las cisteínas son normalmente excluidos para evitar neutralización de cargas positivas y la formación de puentes disulfuro, respectivamente. Todos los parámetros son opcionales, excepto la longitud; si los campos correspondientes están vacíos se presentará un aviso de error indicando que se debe definir el rango de longitud (Imagen 9).

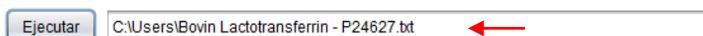


Imagen 8



Imagen 9

En este ejemplo, con la secuencia de la proteína Lactotransferrina-B (UniProtKB P24627), se ejecutará el programa para buscar segmentos con longitud de 12 a 18 aminoácidos, carga entre +4 y +5, punto isoeléctrico entre 10 y 11.3, porcentaje de hidrofobicidad entre 20 y 60, e hidrofobicidad media entre 0 y 0.5 (Imagen 10). Vamos a calcular la hidrofobicidad media, aunque también se puede calcular la hidrofobicidad total (esquina superior derecha, Imagen 10); vamos a utilizar la escala de hidrofobicidad de Fauchere y Pliska (Fauchere y Pliska, 1983), aunque también es posible elegir la escala de Kyte-Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) o la de Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1982a) (lista desplegable, Imagen 10). El programa también nos permite elegir cuáles aminoácidos excluir de la búsqueda; vamos a buscar segmentos de secuencia sin cisteína (C), prolina (P) ni histidina (H) (Imagen 10).

Parámetros fisicoquímicos y estructurales

L Longitud Desde 12 Hasta 18	Z Carga Desde 4 Hasta 5	pI Punto isoeléctrico Desde 10 Hasta 11.3	%H % Hidrofobicidad Desde 20 Hasta 60	H Hidrofobicidad Desde 0 Hasta 0.5	<input type="radio"/> H _m Hidrofobicidad Media <input checked="" type="radio"/> H _t Hidrofobicidad Total CPH Fauchere y Pliska., 1983
--	---	---	---	--	---

Imagen 10

▪ Iniciar la búsqueda

En este punto del procedimiento, ya se puede ejecutar el programa haciendo clic en el botón “Ejecutar”, que aparece en la esquina superior izquierda de la ventana (Imágenes 1 y 8). Esto ejecuta el algoritmo que escanea la secuencia de la proteína cargada y busca segmentos que cumplan los criterios definidos por el usuario. Luego el programa indicará la cantidad de segmentos encontrados; en este caso fueron 15.

▪ Ver los resultados

Para ver los resultados generados por Peptide ID 1.0, se debe dar clic en el botón “Mostrar”, cuya función está vinculada a dos opciones: (1) “Propiedades” o (2) “Solo secuencias” (Imagen 11). Si el usuario elige la primera opción, el programa presentará una lista de los segmentos de secuencia encontrados, junto con sus correspondientes propiedades: posición en la proteína, longitud, carga, porcentaje de hidrofobicidad, hidrofobicidad total, hidrofobicidad media, punto isoeléctrico, momento hidrofóbico y momento hidrofóbico relativo (Imagen 12 y 13). Si el usuario elige la segunda opción, el programa solo presentará una lista con las secuencias de los segmentos (Imagen 14).

Mostrar Propiedades Sólo secuencia

Imagen 11

Posición: 286-301; Secuencia: IWKLLSKAQEKFGKNNK; Longitud: 16; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 31,25; Hidrofobicidad total: 3,1; Hidrofobicidad Media: 0,19; Punto isoeléctrico: pH 10,71; Momento hidrofóbico: 0,53; Momento hidrofóbico relativo: 0,51
Posición: 287-302; Secuencia: WKLLSKAQEKFGKNNKS; Longitud: 16; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 25; Hidrofobicidad total: 1,26; Hidrofobicidad Media: 0,08; Punto isoeléctrico: pH 10,71; Momento hidrofóbico: 0,44; Momento hidrofóbico relativo: 0,42
Posición: 285-301; Secuencia: LIWLLSKAQEKFGKNNK; Longitud: 17; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 35,29; Hidrofobicidad total: 4,8; Hidrofobicidad Media: 0,28; Punto isoeléctrico: pH 10,71; Momento hidrofóbico: 0,44; Momento hidrofóbico relativo: 0,42
Posición: 286-302; Secuencia: IWKLLSKAQEKFGKNNKS; Longitud: 17; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 29,41; Hidrofobicidad total: 3,06; Hidrofobicidad Media: 0,18; Punto isoeléctrico: pH 10,71; Momento hidrofóbico: 0,5; Momento hidrofóbico relativo: 0,48
Posición: 287-303; Secuencia: WKLLSKAQEKFGKNNKSR; Longitud: 17; Carga: 5; Porcentaje de hidrofobicidad: 23,53; Hidrofobicidad total: 0,25; Hidrofobicidad Media: 0,01; Punto isoeléctrico: pH 11,09; Momento hidrofóbico: 0,46; Momento hidrofóbico relativo: 0,44
Posición: 289-305; Secuencia: LLSKAQEKFGKNNKRSRFS; Longitud: 17; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 29,41; Hidrofobicidad total: 0,74; Hidrofobicidad Media: 0,04; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,39; Momento hidrofóbico relativo: 0,37
Posición: 292-308; Secuencia: KQAEKFGKNNKRSRFSQFL; Longitud: 17; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 29,41; Hidrofobicidad total: 0,65; Hidrofobicidad Media: 0,04; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,41; Momento hidrofóbico relativo: 0,39
Posición: 285-302; Secuencia: LIWLLSKAQEKFGKNNKS; Longitud: 18; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 33,33; Hidrofobicidad total: 4,76; Hidrofobicidad Media: 0,26; Punto isoeléctrico: pH 10,71; Momento hidrofóbico: 0,42; Momento hidrofóbico relativo: 0,4
Posición: 286-303; Secuencia: IWKLLSKAQEKFGKNNKSR; Longitud: 18; Carga: 5; Porcentaje de hidrofobicidad: 27,78; Hidrofobicidad total: 2,05; Hidrofobicidad Media: 0,11; Punto isoeléctrico: pH 11,09; Momento hidrofóbico: 0,51; Momento hidrofóbico relativo: 0,49
Posición: 287-304; Secuencia: WKLLSKAQEKFGKNNKRSR; Longitud: 18; Carga: 5; Porcentaje de hidrofobicidad: 22,22; Hidrofobicidad total: 0,21; Hidrofobicidad Media: 0,01; Punto isoeléctrico: pH 11,09; Momento hidrofóbico: 0,43; Momento hidrofóbico relativo: 0,41
Posición: 289-306; Secuencia: LLSKAQEKFGKNNKRSRFSQ; Longitud: 18; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 27,78; Hidrofobicidad total: 0,52; Hidrofobicidad Media: 0,03; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,38; Momento hidrofóbico relativo: 0,36
Posición: 290-307; Secuencia: LSKAQEKFGKNNKRSRFSQL; Longitud: 18; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 27,78; Hidrofobicidad total: 0,52; Hidrofobicidad Media: 0,03; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,38; Momento hidrofóbico relativo: 0,36
Posición: 291-308; Secuencia: SKAQEKFGKNNKRSRFSQLF; Longitud: 18; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 27,78; Hidrofobicidad total: 0,61; Hidrofobicidad Media: 0,03; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,38; Momento hidrofóbico relativo: 0,37
Posición: 292-309; Secuencia: KQAEKFGKNNKRSRFSQLFG; Longitud: 18; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 27,78; Hidrofobicidad total: 0,65; Hidrofobicidad Media: 0,04; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,38; Momento hidrofóbico relativo: 0,37
Cantidad: 15

Imagen 12

25; Hidrofobicidad total: 3,1; Hidrofobicidad Media: 0,19; Punto isoeléctrico: pH 10,71; Momento hidrofóbico: 0,53; Momento hidrofóbico relativo: 0,51
5,29; Hidrofobicidad total: 1,26; Hidrofobicidad Media: 0,08; Punto isoeléctrico: pH 10,71; Momento hidrofóbico: 0,44; Momento hidrofóbico relativo: 0,42
9,41; Hidrofobicidad total: 4,8; Hidrofobicidad Media: 0,28; Punto isoeléctrico: pH 10,71; Momento hidrofóbico: 0,44; Momento hidrofóbico relativo: 0,42
23,53; Hidrofobicidad total: 3,06; Hidrofobicidad Media: 0,18; Punto isoeléctrico: pH 10,71; Momento hidrofóbico: 0,5; Momento hidrofóbico relativo: 0,48
9,41; Hidrofobicidad total: 0,25; Hidrofobicidad Media: 0,01; Punto isoeléctrico: pH 11,09; Momento hidrofóbico: 0,46; Momento hidrofóbico relativo: 0,44
9,41; Hidrofobicidad total: 0,74; Hidrofobicidad Media: 0,04; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,39; Momento hidrofóbico relativo: 0,37
9,41; Hidrofobicidad total: 0,65; Hidrofobicidad Media: 0,04; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,41; Momento hidrofóbico relativo: 0,39
33,33; Hidrofobicidad total: 4,76; Hidrofobicidad Media: 0,26; Punto isoeléctrico: pH 10,71; Momento hidrofóbico: 0,42; Momento hidrofóbico relativo: 0,4
27,78; Hidrofobicidad total: 2,05; Hidrofobicidad Media: 0,11; Punto isoeléctrico: pH 11,09; Momento hidrofóbico: 0,51; Momento hidrofóbico relativo: 0,49
22,22; Hidrofobicidad total: 0,21; Hidrofobicidad Media: 0,01; Punto isoeléctrico: pH 11,09; Momento hidrofóbico: 0,43; Momento hidrofóbico relativo: 0,41
27,78; Hidrofobicidad total: 0,52; Hidrofobicidad Media: 0,03; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,38; Momento hidrofóbico relativo: 0,36
27,78; Hidrofobicidad total: 0,52; Hidrofobicidad Media: 0,03; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,38; Momento hidrofóbico relativo: 0,36
27,78; Hidrofobicidad total: 0,61; Hidrofobicidad Media: 0,03; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,38; Momento hidrofóbico relativo: 0,37
27,78; Hidrofobicidad total: 0,65; Hidrofobicidad Media: 0,04; Punto isoeléctrico: pH 10,99; Momento hidrofóbico: 0,38; Momento hidrofóbico relativo: 0,37

Imagen 13

```

IWKLLSKAQEKFGKNNK
WKLLSKAQEKFGKNNKS
LIWLLSKAQEKFGKNNK
IWKLLSKAQEKFGKNNKS
WKLLSKAQEKFGKNNKSR
LLSKAQEKFGKNNKRSRFS
KQAEKFGKNNKRSRFSQFL
LIWLLSKAQEKFGKNNKS
IWKLLSKAQEKFGKNNKSR
WKLLSKAQEKFGKNNKRSR
LLSKAQEKFGKNNKRSRFSQ
LSKAQEKFGKNNKRSRFSQL
SKAQEKFGKNNKRSRFSQLF
KQAEKFGKNNKRSRFSQLFG
Cantidad: 15
    
```

Imagen 14

Ahora el usuario puede comenzar a analizar los segmentos de secuencia encontrados por Peptide ID 1.0 y, de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de cada uno, puede seleccionar los que presenten potencial como péptidos antimicrobianos α -helicoidales anfipáticos. Para facilitar el análisis de los resultados, Peptide ID 1.0 permite ordenar los segmentos de secuencia en orden de hidrofobicidad, porcentaje de hidrofobicidad, carga, punto isoeléctrico o momento hidrofóbico, simplemente seleccionando la opción correspondiente en la ventana desplegable “Ordenar por” (Imagen 15). Los resultados también se pueden filtrar por longitud; por ejemplo, si se quiere observar solo las secuencias de 17 aminoácidos, se escribe el número 17 en el cuadro de texto y se hace clic en el botón “Filtrar por longitud” (imagen 16).

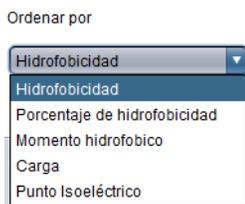


Imagen 15

Filtrar por longitud 17

Imagen 16

- **Guardar los resultados**

Para guardar los resultados, haga clic en el botón “Guardar” del menú de la ventana principal y seleccione el formato en el cual desea generar el archivo con sus datos; Peptide ID 1.0 permite guardar los resultados como archivo de texto (opción txt) o como hoja de cálculo (opción xls) (Imagen 17). Esto hará aparecer una nueva ventana para nombrar y generar el archivo. Este archivo se puede abrir luego en cualquier editor de texto, como Block de notas (Imagen 18) o Microsoft Excel (Imagen 19).

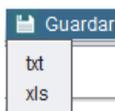


Imagen 17

1 Posición: 285-301; Secuencia: LIWKLLSKAQEFKGNK; Longitud: 17; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 35,29; Hidrofobicidad total: 4,8; Hidrofobicidad Media: 0,28; Punto isoeléctrico: pH 10,
 2 Posición: 286-302; Secuencia: IWKLLSKAQEFKGNKS; Longitud: 17; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 29,41; Hidrofobicidad total: 3,06; Hidrofobicidad Media: 0,18; Punto isoeléctrico: pH 16
 3 Posición: 287-303; Secuencia: WKLLSKAQEFKGNKSR; Longitud: 17; Carga: 5; Porcentaje de hidrofobicidad: 23,53; Hidrofobicidad total: 0,25; Hidrofobicidad Media: 0,01; Punto isoeléctrico: pH 11
 4 Posición: 289-305; Secuencia: LLSKAQEFKGNKRSR; Longitud: 17; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 29,41; Hidrofobicidad total: 0,74; Hidrofobicidad Media: 0,04; Punto isoeléctrico: pH 16
 5 Posición: 292-308; Secuencia: KAEKFGKGNKRSRSLQ; Longitud: 17; Carga: 4; Porcentaje de hidrofobicidad: 29,41; Hidrofobicidad total: 0,65; Hidrofobicidad Media: 0,04; Punto isoeléctrico: pH 16
 6 Cantidad: 5
 7

Imagen 18

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Posición	Secuencia	Longitud	Carga	Porcentaje de hidrofobicidad	Hidrofobicidad total	Hidrofobicidad media	Punto isoeléctrico	Momento hidrofóbico	Momento hidrofóbico relativo
2	285-301	LIWKLLSKAQEFKGNK	17	4	35,29411697	4,800000191	0,282352954	0,401487917	0,438783199	0,420702517
3	286-302	IWKLLSKAQEFKGNKS	17	4	29,41176605	3,060000658	0,180000037	0,400449812	0,500146806	0,479537576
4	287-303	WKLLSKAQEFKGNKSR	17	5	23,52941132	0,25	0,014705882	0,416851193	0,459884763	0,440934569
5	289-305	LLSKAQEFKGNKRSR	17	4	29,41176605	0,73999989	0,043529406	0,401384115	0,389862895	0,373798043
6	292-308	KAEKFGKGNKRSRSLQ	17	4	29,41176605	0,650000095	0,038235299	0,399550229	0,406719685	0,389960229
7										

Imagen 19

- **Consola “Analizar péptido”**

Al hacer clic en el botón “Analizar péptido” de la ventana principal, el programa mostrará una ventana que sirve para analizar secuencias peptídicas individuales. Para utilizar esta herramienta, el usuario simplemente debe introducir una secuencia de aminoácidos en código de una letra en el correspondiente cuadro de texto. La secuencia puede ser modificada en los extremos N- y C-terminales (por acetilación y amidación, respectivamente), utilizando los botones desplegable adyacentes a la secuencia. Luego, a la derecha, hay un cuadro de texto donde se puede poner el valor de pH al cual se quiere calcular la carga neta del péptido. También se puede seleccionar una escala de hidrofobicidad y, finalmente, se hace clic en el botón “Calcular”. Esta consola genera un “Perfil de hidrofobicidad”, que es una gráfica que muestra la hidrofobicidad de cada aminoácido de la secuencia introducida utilizando una de las escalas de hidrofobicidad disponibles en el programa. Haciendo otra vez clic en el botón “Calcular”, la consola presentará, en el panel de resultados, las propiedades fisicoquímicas del péptido: longitud, carga neta (en función del pH), carga (a pH 7.0-7.4), porcentaje de hidrofobicidad, hidrofobicidad total, hidrofobicidad media, punto isoeléctrico, momento hidrofóbico y momento hidrofóbico relativo (Imagen 20).

Nota: Para visualizar el diagrama de hidrofobicidad completo de una secuencia, se recomienda que el péptido no tenga una longitud superior a 33 aminoácidos. Cuando se sobrepasa este límite, Peptide ID 1.0 presenta un aviso de advertencia (Imagen 21).

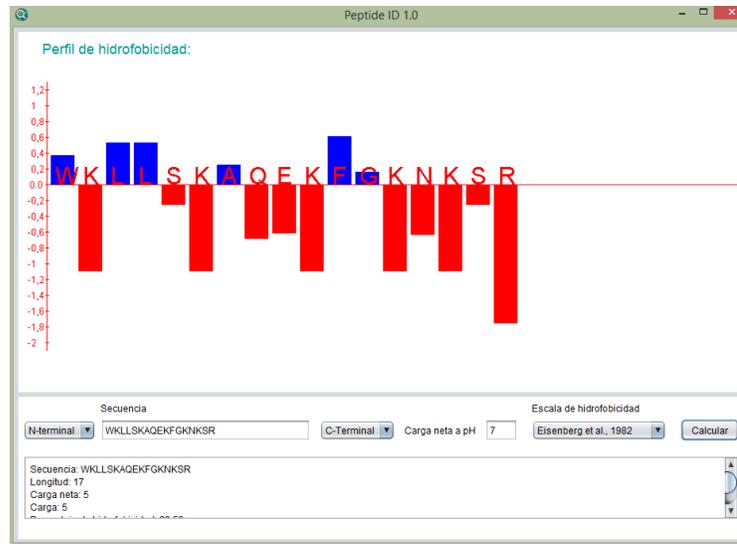


Imagen 20

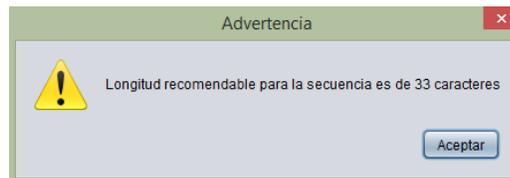


Imagen 21

Bibliografía

ABRO SH, WAGAN R, TUNIO MT, KAMBOH AA, MUNIR M. Biochemical activities of bacterial species isolated from the frozen semen of cattle. *Journal of Agriculture and Social Sciences*. 2009; 5: 109–113.

AKHTER S, ANSARI MS, ANDRABI SMH, ULLAH N, QAYYUM M. Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008; 43: 272–278. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00890.x.

ALMQUIST JO, GLANTZ PJ, SHAFFER HE. The effect of a combination of penicillin and streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen. *Journal of Dairy Science*. 1949; 32: 543-548.

ALOUSH V, NAVON-VENEZIA S, SEIGMAN-IGRA Y, CABILI S, CARMELI Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50: 43–48.

ALTHOUSE CG, LU KG. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology*. 2005; 63: 573–584.

ALTHOUSE GC, KUSTER CE, CLARK SG, WEISIGER RM. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*. 2000; 53: 1167-1176.

ANDRABI S.M, AHMAD A , ABBAS A, ANZAR M. Effect of two different antibiotic combination on fertility of frozen buffalo and sahiwal bull semen. *Pakistan Veterinary Journal*. 2001; 21(4): 166-169.

AURICH C, SPERGSER J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 2007; 67: 912–918.

AURICH C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2005; 89: 65-75.

BELAID A, HANI K. Antiviral and antifungal activity of some dermaseptin S4 analogues. *African Journal of Biotechnology*. 2002; 10(66): 14962-14967. Doi: 10.5897/AJB11.1108

BIELANSKI A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*. 2007; 68: 1-22.

BOUSSEAU S, BRILLARD JP, GUIENNE BML, GUÉRIN B, CAMUS A, LECHAT M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk Sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of Bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 1998; 50:699-706.

BRAND GD, MAGALHÃES MTQ, TINOCO MLP, ARAGÃO FJL, NICOLI J, KELLY SM, COOPER A, BLOCH JR C. Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides. *PLoS One*. 2012; 7(9): e45848.

BROGDEN KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 2005; 3: 238-250.

BROGDEN NK, BROGDEN KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011, 38: 217–225.

BROWN VG, SCHOLLUM LM, JARVIS BDW. Microbiology of bovine semen and artificial breeding practices under New Zealand conditions, *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 1974; 17(4): 431-442. Doi: 10.1080/00288233.1974.10421030

CE, 1988. Directiva 88/407/CEE del Consejo de 14 de junio de 1988. Por la que se fijan las exigencias de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las

importaciones de esperma congelado de animales de la especie bovina. European Commission. Disponible en http://ec.europa.eu/food/animal/semen_ova/bovine/index_en.htm. Accedido en Febrero 18 de 2015.

CE, 2003. Directiva 2003/43/CE del Consejo de 26 de mayo de 2003. Que modifica la Directiva 88/407/CEE del Consejo por la que se fijan las exigencias de policía sanitaria aplicables a los intercambios intracomunitarios y a las importaciones de esperma de animales de la especie bovina. European Commission. Disponible en http://ec.europa.eu/food/animal/semen_ova/bovine/index_en.htm. Accedido en Febrero 18 de 2015.

CHEN Y, GUARNIERI MT, VASIL AI, VASIL ML, MANT CT, HODGES RS. Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of α -Helical Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007; 51(4): 1398–1406.

COOTE PJ, HOLYOAK CD, BRACEY D, FERDINANDO DP, PEARCE JA. Inhibitory action of amphibian skin peptide Dermaseptin S3 on *S. cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 2160–2170.

DAGAN A, EFRON L, GAIDUKOV L, MOR A, GINSBURG H. *In Vitro* antiplasmodium effects of Dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002; 46(4): 1059–1066.

DATTA G, EPAND RF, EPAND RM, CHADDHA M, KIRKSEY MA, GARBER DW, LUND-KATZ S, PHILLIPS MC, HAMA S, NAVAB M, FOGELMAN AM, PALGUNACHARI MN, SEGREST JP, ANANTHARAMAIAH GM. Aromatic residue position on the nonpolar face of class a amphipathic helical peptides determines biological activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(24): 26509–26517.

DATHE M, MEYER J, BEYERMANN M, MAUL B, HOISCHEN C, BIENERT M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by

variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002; 1558: 171-186.

DATHE M, NIKOLENKO H, MEYER J, BEYERMANN M, BIENERT M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*. 2001; 501: 146–150.

DATHE M, WIEPRECHT T, NIKOLENKO H, HANDEL L, MALOY WL, MACDONALD DL, BEYERMANN M, BIENERT M. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Letters*. 1997; 403: 208–212.

DATHE M, WIEPRECHT T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999; 1462: 71–87.

DE RUIGH L, BOSCH J, BRUS M, LANDMAN B, MERTON J. Ways to Improve the Biosecurity of Bovine Semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 2006; 41:268–274

DEMAIN AL, SANCHEZ S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*. 2009; 62: 5–16.

DENNISON SR, PHOENIX DA. Influence of C-terminal amidation on the efficacy of Modelin-5. *Biochemistry*. 2011; 50, 1514–1523. DOI: 10.1021/bi101687t

DIEMER T, WEIDNER W, MICHELMANN HW. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. *International Journal of Andrology*. 1996; 19, 271–277.

DIEMER T, HUWE P, MICHELMANN HW, MAYER F, SCHIEFER HG, WEIDNER W. *Escherichia coli*-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *International Journal of Andrology*. 2000; 23: 178–186

EAGLESOME MD, GARCIA MM, BIELANSKI AB. A study on the effect of pseudomonas aeruginosa in semen on bovine fertility. Canadian Journal of Veterinary Research. 1995; 59: 76-78.

EAGLESOME MD, GARCIA MM. Comparisons of Antibiotic Combinations to Control *Pseudomonas aeruginosa* in Bovine Semen. Canadian Journal of Veterinary Research. 1995; 59: 73-75.

EFRON L, DAGAN A, GAIDUKOV L, GINSBURG H, MOR A. Direct interaction of Dermaseptin S4 aminoheptanoyl derivate with intraerythrocytic malaria parasite leading to increased specific antiparasitic activity in culture. The Journal of Biological Chemistry. 2002; 277: 24067–24072.

EISENBERG D, WEISS RM, TERWILLIGER TC. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. Nature. 1982b; 299: 371-374.

EISENBERG D, WEISS RM, TERWILLINGER TC, WILCOX W. Hydrophobic Moments and Protein Structure. Faraday Symposia of the Chemical Society. 1982a; 17: 109-120.

FAUCHERE JL, PLISKA VE. Hydrophobic parameters of amino-acid side-chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amide. European Journal Medicinal Chemistry. 1983; 18:369-375.

FEDER R, DAGAN A, MOR A. Structure-activity relationship study of antimicrobial Dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. The Journal of Biological Chemistry. 2000; 275(6): 4230–4238.

FEDER R, NEHUSHTAI R, MOR A. Affinity driven molecular transfer from erythrocyte membrane to target cells. Peptides. 2001; 22: 1683–1690.

FERNÁNDEZ-ESCAMILLA AM, ROUSSEAU F, SCHYMKOWITZ J, SERRANO L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides

and proteins. *Nature Biotechnology Letters*. 2004; 22(10): 1302-1306. Doi:10.1038/nbt1012.

FERNEBRO J. Fighting bacterial infections—Future treatment options. *Drug Resistance Updates*. 2011; 14: 125–139.

FISH NA, ROSENDAL S, MILLER RB. The distribution of mycoplasmas and ureaplasmas in the genital tract of normal artificial insemination bulls. *The Canadian Veterinary Journal*. 1985; 26: 13-15.

FJELL CD, HANCOCK REW, CHERKASOV A. AMPer: A database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. *Bioinformatics*. 2007; 23(9): 1148–1155.

FUNK DA. Major advances in globalization and consolidation of the artificial insemination industry. *Journal of Dairy Science*. 2006; 89: 1362–1368.

GAUTIER R, DOUGUET D, ANTONNY B, DRIN G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*. 2008; 24(18): 2101-2102.

GIANGASPERO A, SANDRI L, TOSSI A. Amphipatic α helical antimicrobial peptides: a systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *European Journal of Biochemistry*. 2001. 268(3): 5589–5600.

GIVENS M.D, MARLEY S.D. Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. *Theriogenology*. 2008, 69: 129–136.

GLORIA A, CONTRI A, WEGHER L, VIGNOLA G, DELLAMARIA D, CARLUCCIO A. The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen–thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*. 2014; 150: 15–23.

GOMEZ LA, SILVEIRA E. Perdurabilidad de la efectividad de la combinación penicilina-estreptomicina en la reducción de la carga bacteriana del semen de toro congelado en pastillas - *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 2005; 6(10): 1-7.

GONZÁLEZ-MARIN C, ROY R, LOPEZ-FERNANDEZ C, DIEZ B, CARABAÑO MJ, FERNANDEZ JL, KJELLAND ME, MORENO JF, GOSALVEZ J. Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. *Animal Reproduction Science*. 2011; 123: 139–148. Doi:10.1016/j.anireprosci.2010.11.014.

HANCOCK RE, LEHER R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*. 1998; 16(2): 82–88.

HANCOCK RE, SAHL H. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*. 2006; 24: 1551–1557.

HANCOCK RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*. 2001; 1: 156-164.

HASAN S, ANDRABI SMH, MUNEER R, ANZAR M, AHMAD N. Effects of a new antibiotic combination on post-thaw motion characteristics and membrane integrity of buffalo and sahiwal bull spermatozoa and on the bacteriological quality of their semen. *Pakistan Veterinary Journal*. 2001; 21(1): 6-12.

HAWRANI A, HOWE RA, WALSH TR, DEMPSEY CE. Origin of Low Mammalian Cell Toxicity in a Class of Highly Active Antimicrobial Amphipathic Helical Peptides. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(27): 18636–18645.

HUANG HW. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*. 2000; 39: 8347–8352.

JIANG Z, KULLBERG BJ, VAN DER LEE H, VASIL AI, HALE JD, MANT CT, HANCOCK RE, VASIL ML, NETEA MG, HODGES RS. Effects of hydrophobicity on the antifungal activity of alpha-helical antimicrobial peptides. *Chemical Biology and Drug Design*. 2008; 72: 483–495.

JIANG Z, VASIL AI, GERA L, VASIL ML, HODGES RS. Rational design of α -helical antimicrobial peptides to target Gram-negative Pathogens, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: utilization of charge, 'specificity determinants,' total hydrophobicity, hydrophobe type and location as design parameters to improve the therapeutic ratio. *Chemical Biology and Drug Design*. 2011; 77(4): 225–240. doi:10.1111/j.1747-0285.2011.01086.x.

JIANG Z, VASIL AI, VASIL ML, HODGES RS. "specificity determinants" improve therapeutic indices of two antimicrobial peptides Piscidin 1 and Dermaseptin S4 against the Gram-negative pathogens *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceuticals*. 2014; 7, 366-391: doi:10.3390/ph7040366.

KANG SJ, KIM DH, MISHIG-OCHIR T, LEE BJ. Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application. *Archives of Pharmacal Research*. 2012; 35(3): 409-413.

KILBURN C, ROOKS DJ, MCCARTHY AJ, MURRAY RD. Antimicrobial resistance in some Gram-negative bacteria isolated from the bovine ejaculate. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013; 48: 525–528. Doi: 10.1111/rda.12127.

KIM SY, CHA HJ. disperse distribution of cationic amino acids on hydrophilic surface of helical wheel enhances antimicrobial peptide activity. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010; 107: 216–223.

KUSTANOVICH I, SHALEV DE, MIKHLIN M, GAIDUKOV L, MOR A. Structural requirements for potent *versus* selective cytotoxicity for antimicrobial Dermaseptin S4 derivatives. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(19): 16941–16951.

KYTE J, DOOLITTLE RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*. 1982; 157(1): 105-132.

LARSON E. Community factors in the development of antibiotic resistance. *Annual Reviews of Public Health*. 2007; 28: 435-447.

LEE IH, CHO Y, LEHRER RI. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and Immunity*. 1997; 65(7): 2898–2903.

LEVY O. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood*. 2000; 96(8): 2664-2672.

LORIN C, SAIDI H, BELAID A, ZAIRI A, BALEUX F, HOCINI H, BÉLEC L, HANI K, TANGY F. The antimicrobial peptide Dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology*. 2005; 334: 264–275.

MADEIRA EM, GOULARTE KL, PRADIEÉ J, MONDADORI RG, LUCIA TH, BIANCHI I, VIEIRA AD, LEITE FPL. The use of antibiotics in cryopreservation of ram sperm. 2014; 2014: 1-7. Doi: 10.5171/2014.154947.

MALOY WL, KARI UP. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*. 1995; 37(2): 105-22.

MARQUES LM, BUZINHANI M, NETO MR, OLIVEIRA RC, YAMAGUTI M, GUIMARÃES AM, TIMENETSKY J. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination. *Veterinary Record*. 2009; 165: 572-573.

MATSUZAKI K, SUGISHITA K, FUJII N, MIYAJIMA K. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*. 1995; 34: 3423–3429.

MATSUZAKI K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1788: 1687–1692.

MATSUZAKI K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defence? Magainins and Tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999; 146: 1–10.

MOR A, HANI K, NICOLAS P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganism. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994. 269(50): 31635-31641.

MOR A, NGUYEN VH, DELFOUR A, MIGLIORE SD, NICOLAS P. Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin *Biochemistry*. 1991; 30(36): 8824–8830.

MOR A, NICOLAS P. The NH₂-terminal α -helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(3): 1934-1939.

MORRELL JM, WALLGREN M. Control of bacterial contamination in boar semen doses. En: *Science and Technology Against Microbial Pathogens. Research, Development and Evaluation*. Ed. Mendez-Vilas A. World Scientific, Valladolid, Spain. p 303-307 2010

MORRELL JM, WALLGREN M. Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science*. 2011; 123: 64–69.

MUÑOZ V, SERRANO L. Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nature: Structural and Molecular Biology*. 1994; 1: 399-409.

NAJEE HB, AL-SHAWII AM, ABD- AL RAHMAN LY. Bacterial contamination of imported bulls frozen semen. *Al-Anbar Journal of Veterinary Science*. 2012; 5(1): 54-62.

NAVON-VENEZIA SH, FEDER R, GAIDUKOV L, CARMELI Y, MOR A. Antibacterial properties of Dermaseptin S4 derivatives with *in vivo* activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002; 46(3): 689–694

NELSON DL, COX MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd edition. Worth Publishers: New York, 2000. ISBN 1-57259-9316. 1255 pp.

ONOVIRAN O, TRUSCOTT RB, FISH NA, BARKER CAV, RUHNKE HL. The recovery of mycoplasmas from the genital tracts of bulls in artificial breeding units in Ontario. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 1975; 39: 474-475.

PASUPULETI M, SCHMIDTCHEN A, MALMSTEN M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012; 32: 143–171.

PASUPULETI M, WALSE B, SVENSSON B, MALMSTEN M, SCHMIDTCHEN A. Rational design of antimicrobial C3a analogues with enhanced effects against Staphylococci using an integrated structure and function-based approach. *Biochemistry*. 2008; 7: 9057–9070.

PHOENIX DA, HARRIS F. The hydrophobic moment and its use in the classification of amphiphilic structures [review]. *Molecular Membrane Biology*. 2002; 19: 1-10.

POWERS JP, HANCOCK RE. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. 2003; 24: 1681–1691.

Resolución 02820 11/10/2001 del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Por la cual se dictan disposiciones para el control técnico de la producción, importación y comercialización del material seminal y embriones. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Bioseguridad-y-Recursos-Geneticos.aspx>. Accedido en Febrero 18 de 2015.

RICE LB. Do we really need new anti-infective drugs? *Current Opinion in Pharmacology*. 2003; 3:459–463. Doi: 10.1016/j.coph.2003.05.001.

RINGSTAD L, PROTOPAPA E, LINDHOLM-SETHSON B, SCHMIDTCHEN A, NELSON A, MALMSTEN M. An electrochemical study into the interaction between complement-derived peptides and DOPC mono- and bilayers. *Langmuir*. 2008; 24: 208–216.

SALYERS AA, AMABILE-CUEVAS CF. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 2321-2325.

SÁNCHEZ Y, BETANCUR A, AGUDELO M, ORDUZ S. Peptide ID 1.0: programa para buscar potenciales péptidos bioactivos en secuencias de proteínas. 2014. Register Application in the Copyright National Direction. Colombian Ministry of Interior.

SCHULZ M, SÁNCHEZ R, SOTO L, RISOPATRÓN J, VILLEGAS J. Effect of *Escherichia coli* and its soluble factors on mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine translocation, viability, and motility of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 2010; 94: 619–623.

SCHULZE M, JUNKES CH, MUELLER P, SPECK S, RUEDIGER K, DATHE M, MUELLER K. Effects of cationic antimicrobial peptides on liquid-preserved boar spermatozoa. *PLoS ONE*. 2014; 9(6): e100490. Doi:10.1371/journal.pone.0100490.

SEELIG J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004; 1666: 40–50.

SEO MD, WON HS, KIM JH, MISHIG-OCHIR T, LEE BJ. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: A review. *Molecules*. 2012; 17: 12276–12286.

SHAI Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2002; 66: 234-248.

SHALEV DE, MOR A, KUSTANOVICH I. Structural consequences of carboxyamidation of Dermaseptin S3. *Biochemistry*. 2002; 41: 7312-7317.

SHIN SJ, LEIN DH, PATTEN VH, RUHNKE HL. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. Control of Mycoplasmas, Ureaplasmas, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Haemophilus somnus*. *Theriogenology*. 1988; 29(3): 577-591.

SILVEIRA EA, GONZÁLEZ O, ESPINOSA L. Conservación del semen bovino con 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-Furano. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 2005; 6(11): 1-9.

SIVAKAMASUNDARI C, NAGARAJ R. Interaction of 18-residue peptides derived from amphipathic helical segments of globular proteins with model membranes. *J BIOSCI.* 2009; 34: 239–250.

SMOLE I, THOMANN A, FREY J, PERRETEN V. Repression of common bull sperm flora and in vitro impairment of sperm motility with *pseudomonas aeruginosa* introduced by contaminated lubricant. *Reproduction in Domestic Animals.* 2010; 45: 737–742. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01319.x.

SNIDER C, JAYASINGHE S, HRISTOVA K, WHITE SH. MPEX: A tool for exploring membrane proteins. *Protein Science.* 2009; 18: 2624—2628.

SPECK S, COURTIOL A, JUNKES CH, DATHE M, MULLER K, SCHULZE M. Cationic Synthetic Peptides: Assessment of Their Antimicrobial Potency in Liquid Preserved Boar Semen. *PLoS ONE.* 2014; 9(8): e105949. Doi:10.1371/journal.pone.0105949.

TEIXEIRA V, FEIO MJ, BASTOS M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research.* 2012; 51: 149–177.

THIBIER M, GUERIN B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science.* 2000, 62: 233-251.

TOKE O. Antimicrobial Peptides: New Candidates in the Fight Against Bacterial Infections. *Biopolymers (Peptide Science).* 2005; 80: 717–735.

TORCATO IM, HUANG YH, FRANQUELIM HG, GASPAR D, CRAIK DJ, CASTANHO MARB, HENRIQUES ST. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013; 1828: 944–955.

TORRENT M, ANDREU D, NOGUÉS VM, BOIX E. Connecting peptide physicochemical and antimicrobial properties by a rational prediction model. *PLoS One.* 2011; 6: e16968.

TOSSI A, SANDRI L, GIANGASPERO A. New consensus hydrophobicity scale extended to non-proteinogenic amino acids. Peptide. 2002 (Proceedings of the 27th European Peptide Symposium, Sorrento, 2002).

VAN'T HOF W, VEERMAN EC, HELMERHORST EJ, AMERONGEN AV. Antimicrobial peptides: Properties and applicability. Journal of Biological Chemistry. 2001; 382: 597–619.

VARNER DD, SCANLAN CM, THOMPSON JA, BRUMBAUGH GW, BLANCHARD TL, CARLTON TM, JOHNSON L. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extender. Theriogenology. 1998; 50: 559-573.

VERKERK G. Pasture-based dairying: challenges and rewards for New Zealand producers. Theriogenology. 2003; 59: 553–561.

VISSER IJR, TER LAAK EA, JANSEN HB. Failure of antibiotics gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. Theriogenology. 1999; 51: 689-697.

VON NUSSBAUM F, BRANDS M, HINZEN B, WEIGAND S, HÄBICH D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival? Angewandte Chemie International Edition in English. 2006; 45(31): 5072-5129.

WANG G, LI X, WANG Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic Acids Research. 2009; 37: D933-D937.

WANG Z, WANG G. APD: the antimicrobial peptide database. Nucleic Acids Research. 2004; 32: D590–D592.

WENTINK G, FRANKENA K, BOSCH J, VANDEHOEK J, VAN DEN BERG T. Prevention of disease transmission by semen in cattle. Livestock Production Science. 2000; 62: 207-220.

WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008; 3(2): 163-175.

WIESNER J, VILCINSKAS A. Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 2010; 1(5): 440-464. Doi: 10.4161/viru.1.5.12983.

WIMLEY WC, WHITE SH. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature: Structural and Molecular Biology*. 1996; 3(10): 842-848.

WIRADHARMA N, SNG M, KHAN M, ONG ZY, YANG YY. Rationally designed α -helical broad-spectrum antimicrobial peptides with idealized facial amphiphilicity. *Macromolecular Rapid Communications*. 2013; 34: 74–80.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Francia. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2014.

YÁNIZ JL, MARCO-AGUADO MA, MATEOS JA, SANTOLARIA P. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Animal Reproduction Science*. 2010; 122: 142–149.

YEAMAN MR, YOUNT NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 2003. 55: 27–55.

ZAIRI A, BELAID A, GAHBICHE A, HANI K. Spermicidal activity of dermaseptins. *Contraception*. 2005; 72: 447– 453.

ZAIRI A, TANGY F, DUCOS-GALAND M, ALONSO JM, HANI K. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial peptides from amphibian skin, dermaseptin, and derivatives. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007; 57: 319–324.

ZAIRI A, TANGY F, HANI K. Dermaseptin S4 derivative K4K20S4: A potential candidate for development of a new microbicide contraceptive agent – an *in vitro* study. The European Journal of Contraception and Reproductive Health Care. 2013; 18: 79–87.

ZAIRI A, TANGY F, SAADI S, HANI K. In vitro activity of dermaseptin S4 derivatives against genital infections pathogens. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2008; 50: 353–358.

ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 2002; 415: 389–395.

ZASLOFF M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. 84: 5449–5453.

ZELEZETSKY I, PAG U, SAHL HG, TOSSI A. Tuning the biological properties of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides: rational use of minimal amino acid substitutions. Peptides. 2005; 26: 2368–2376.

ZELEZETSKY I, TOSSI A. Alpha-helical antimicrobial peptides—using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. Biochimica et Biophysica Acta. 2006; 1758: 1436–1449.