

Interacciones péptido-lípido: una nueva alternativa para fármacos antimicrobianos

Abigail García-Morales¹ , Víctor R. Juárez-González² , Verónica Quintero-Hernández³ ,
 Daniel Balleza^{1*} 

¹Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Tecnológico Nacional de México, Veracruz, México. ²Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México. ³CONACYT-Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

*Email autor para correspondencia: daniel.bm@veracruz.tecnm.mx

Recibido: 11 septiembre 2022. **Aceptado:** 04 noviembre 2022

RESUMEN

Debido a su naturaleza anfifílica y enorme diversidad estructural, los lípidos son moléculas que, una vez empaquetadas en fase acuosa, forman membranas bilamelares que poseen propiedades electromecánicas de gran relevancia para la célula. En bacterias y otros microorganismos patógenos, el estudio de los factores que determinan la integridad de sus membranas resulta crucial para el desarrollo de antibióticos de última generación, ya que el uso indiscriminado de antibióticos convencionales como la penicilina y la estreptomina ha favorecido el desarrollo de resistencia bacteriana en una gran cantidad de géneros patogénicos. Esto ha llevado a reforzar la investigación para encontrar alternativas terapéuticas más efectivas y menos convencionales. El descubrimiento de péptidos y lipopéptidos antimicrobianos naturales ha llamado poderosamente la atención debido a que, gracias a sus interacciones con las membranas biológicas, facilitan la desestabilización de la integridad de las bicapas mediante formación de poros acuosos y dispersión de la interfase acuosa, entre otras acciones. Estos efectos dependen directamente de la capacidad que tienen estas biomoléculas de actuar de forma selectiva en membranas de mamíferos, plantas, hongos y diversos tipos de bacterias. La actividad de estos péptidos depende directamente de las propiedades mecánicas y electrostáticas de las membranas, siempre en función de su composición lipídica. Entender estos fenómenos a nivel de la nanoescala, podría contribuir al diseño de estrategias para el desarrollo racional de agentes terapéuticos con gran potencial para eludir los mecanismos de resistencia bacteriana asociados al uso de antibióticos convencionales.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos; lipopéptidos cíclicos; bicapas lipídicas; interacciones dipolo-dipolo; coeficiente de partición; poros acuosos.

ABSTRACT

Due to their amphiphilic nature and huge structural diversity, lipids are molecules that, once packed in the aqueous phase, form bilamellar membranes that have electromechanical properties of great relevance for the cell. In bacteria and other pathogenic microorganisms, the study of factors that determine the integrity of their membranes is crucial for the development of next-generation antibiotics since the indiscriminate use of conventional antibiotics such as penicillin and streptomycin has favored the development of resistance bacteria in many pathogenic genera. This has led to reinforce research to find more effective and less conventional therapeutic alternatives. The discovery of natural antimicrobial peptides and lipopeptides has attracted great attention because, thanks to their interactions with biological membranes, they facilitate the destabilization of bilayer integrity through the formation of aqueous pores and dispersion of the aqueous interface, among other actions. These effects depend directly on the ability of these biomolecules to act selectively on the membranes of mammals, plants, fungi, and several types of bacteria. The activity of these peptides directly depends on the mechanical and electrostatic properties of the membranes, always depending on their lipid composition. Understanding these phenomena at the nanoscale level could contribute to the design of strategies for the rational development of therapeutic agents with great potential to circumvent bacterial resistance mechanisms associated with the use of conventional antibiotics.

Keywords: Antimicrobial peptides; cyclic lipopeptides; lipid bilayers; dipole-dipole interactions; partition coefficient; aqueous pores.

INTRODUCCIÓN

Todas las células poseen membranas lipídicas que definen tanto sus propiedades de permeabilidad como la morfología y la función que desempeñan en el contexto de un organismo multicelular o, tratándose de organismos unicelulares como las bacterias, en vida libre. Desde la perspectiva de la enorme biodiversidad que alcanzamos a conocer, percibimos un sinnúmero de adaptaciones entre los seres vivos, producto de toda una gama de interacciones ecológicas. Producto de esta diversidad biológica, hemos encontrado asimismo relaciones simbióticas,

comensalismos, mutualismos y parasitismos entre los organismos. A nivel de la escala microscópica, sin embargo, las interacciones que se dan entre los seres vivos esta generalmente asociada a un constante intercambio de señales moleculares. Ejemplo de esto último lo fue el descubrimiento fortuito de los compuestos antibióticos por Alexander Fleming en 1928, lo cual cambió para siempre el curso de la medicina. Este bacteriólogo del St. Mary's Hospital, regresaba de sus vacaciones cuando, charlando con un colega suyo, notó una zona alrededor de un hongo invasor en una placa de agar en la que ciertas

bacterias no crecían. Fleming, identificando el hongo responsable de este interesante fenómeno, aisló la cepa y la identificó como perteneciente al género *Penicillium*, para posteriormente intentar aislar el compuesto activo responsable de la inhibición del crecimiento bacteriano, nombrando penicilina a este misterioso compuesto (Figura 1) [1]. Esto abrió una verdadera caja de Pandora para el descubrimiento de miles de otras moléculas con propiedades antibacterianas o antimicrobianas en general. Posteriormente, se determinó que la penicilina tiene efecto actuando en estafilococos y patógenos Gram-positivos mediante la inhibición de la síntesis de pared celular. También se descubrió que existen múltiples variantes de este antibiótico β -lactámico e incluso se han sintetizado toda una gama de agentes basados en la estructura de la

penicilina cuyas actividades antibacterianas son muy diversas [2].

Ahora sabemos que los antibióticos no solo llevan a cabo sus acciones mediante el mecanismo de inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana (antibióticos β -lactámicos como la ampicilina, carbenicilina y derivados de las cefalosporinas o lipopéptidos como la daptomicina), sino que inhiben la síntesis de proteínas y ADN (como la tetraciclina, la kanamicina, la estreptomycin, algunas estreptograminas, ciertos aminoglicósidos, las fluoroquinolonas, la ofloxacin y la ciprofloxacina), ARN (por ejemplo la rifampicina) ó alterando la vía de síntesis del ácido fólico (caso de las sulfonamidas), por ejemplo [3].

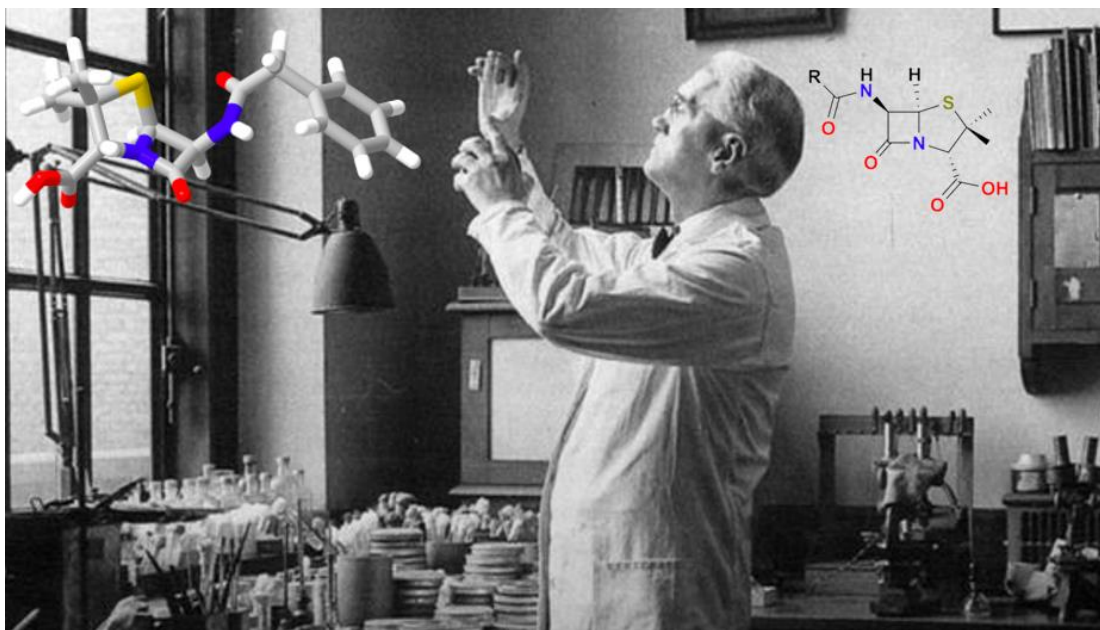


Figura 1. Alexander Fleming y el descubrimiento de la penicilina. Estructura de la penicilina: ácido 4-Tia-1-azabicyclo(3.2.0)heptano-2-carboxílico,-3,3-dimetil-7-oxo-6-[(fenilacetil)amino]-[2S-(2a,5a,6b)]. El color gris representa átomos de carbono; en rojo, oxígeno; en azul, nitrógeno, en amarillo, azufre; blanco, hidrógeno. Imagen modificada de la oficina de prensa de la Newcastle University (<https://www.ncl.ac.uk>) y publicada el 15 de febrero de 2018.

No obstante este enorme arsenal bioquímico, la eficacia en el uso de estos agentes antimicrobianos ha venido disminuyendo en las últimas décadas debido a la aparición de nuevas cepas microbianas resistentes a estos efectos metabólicos adversos. Esto evidentemente plantea un grave problema de salud a nivel mundial, ya que con el surgimiento de cepas resistentes se ha reducido la capacidad de combatir muchas enfermedades infecciosas. Sin embargo, aunque cada vez es más difícil enfrentar de manera adecuada las enfermedades que tales microorganismos causan en el ser humano e incluso en plantas y animales, la enorme biodiversidad vuelve a ser nuestra aliada. Proponer estrategias alternativas y novedosas para el control bacteriano, basadas en el descubrimiento de potenciales agentes de control bacteriano, cuyos mecanismos de acción no necesariamente se fundamenten en la inhibición de las rutas metabólicas o biosintéticas antes mencionadas, resultan muy atractivas.

En este trabajo realizamos una exposición de los conceptos teóricos de mayor relevancia para el estudio fisicoquímico y biofísico de las interacciones que ciertos péptidos tienen con las bicapas lipídicas, así como una pequeña revisión de algunos de los péptidos antimicrobianos más ampliamente estudiados a la fecha como alternativa al uso de los antibióticos convencionales y que tienen como blanco de acción las membranas de diversos patógenos microbianos.

La alternativa: Péptidos y Lipopéptidos antimicrobianos

De manera destacada, los péptidos y lipopéptidos antimicrobianos, como la melitina y la surfactina, respectivamente, son novedosos agentes antimicrobianos cuyos mecanismos de acción están directamente asociados con la integridad de las membranas biológicas. La melitina, componente clave del veneno de abeja, es un péptido anfipático, compuesto por 26 residuos de aminoácidos, cuya conformación y estado de agregación dependen de su concentración, el pH de la solución, la fuerza iónica del medio acuoso y el potencial iónico del mismo [4]. La surfactina, por otro lado, es un lipoheptapéptido de naturaleza anfifílica producido por varias especies del género *Bacillus* e identificado como un agente con actividad biosurfactante y propiedades emulsionantes y espumantes de gran interés en la industria alimenticia [5] (Figura 2).

Debido a su composición química, ambos péptidos poseen anfipaticidad, una propiedad clave que permite a tales compuestos asociarse fácil y rápidamente a las bicapas lipídicas en un contexto acuoso; lo que contribuye a interferir con la integridad de la membrana biológica de manera dosis-dependiente. Además, se han descubierto recientemente una enorme variedad de biomoléculas análogas tanto en estas dos clases de organismos, como también en plantas, hongos y hasta en arqueas. Nuevamente, esta enorme riqueza bioquímica es producto de las complejas vías de biosíntesis como respuesta adaptativa a los hábitats que ocupan estos seres vivos [5,6]. De hecho, se ha comprobado

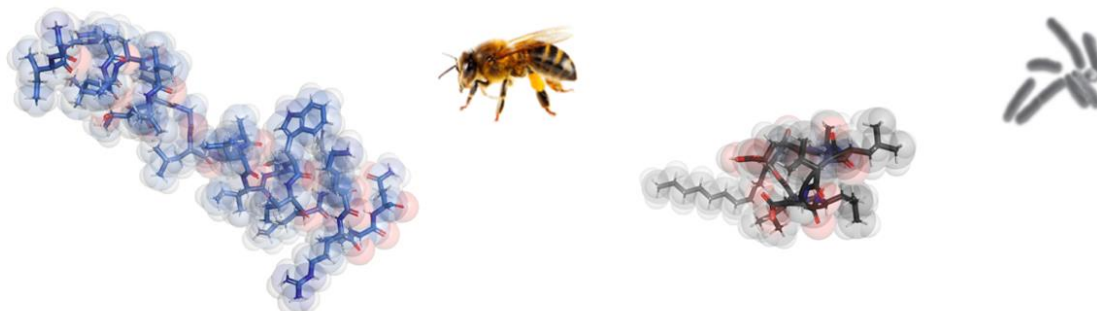


Figura 2. Estructura de la melitina del veneno de abeja (PDB: 2mw6) y la surfactina, formadora de biopelículas en *Bacillus* spp. (PDB: 2npv). Las imágenes de los organismos fueron tomadas de la base de datos Konchu de entomología (<https://insectdb.kyushu-u.ac.jp>) y el Instituto Robert Koch (<https://www.rki.de>) respectivamente. Las estructuras peptídicas se trabajaron mediante la versión libre de Pymol 2.5 (Schrödinger).

experimentalmente que la diversidad de los lipopéptidos sintetizados por bacterias de la especie *B. tequilensis* responde de forma directa a las condiciones y composición del medio de cultivo [7], lo cual prueba la enorme plasticidad metabólica y probablemente genética de estos microorganismos, así como su enorme adaptabilidad a las condiciones ambientales.

En este sentido, para el caso de *Bacillus* spp., resulta congruente imaginar toda una red de interacciones moleculares a nivel de la rizosfera y dentro del mismo tejido vegetal, como endófitos, donde una compleja comunidad microbiana constantemente debe enfrentar condiciones para adaptarse a su entorno ecológico. Al formar parte así de la interfase con el medio, las paredes celulares y los lípidos de la membrana plasmática participan en estas complejas interacciones. Las propiedades de los lípidos influyen así en el proceso de colonización microbiana mediante una serie de interacciones a nivel molecular. Por otro lado, en el caso de la melitina, presente en el veneno

de la abeja *Apis mellifera*, es parte de un cóctel molecular secretado por las glándulas de estos insectos como mecanismo de protección ante potenciales microorganismos patógenos, ya que sus colonias se componen de una gran cantidad de crías inmaduras y adultas, a la par de que los altos niveles de humedad y temperatura de los panales son ambientes propicios para el desarrollo de todo tipo de microbios incluyendo los patógenos. En respuesta, las abejas melíferas desarrollaron como respuesta adaptativa la síntesis metabólica de toda una gama de péptidos antimicrobianos como si de un “antiséptico” se tratase, ahora en el contexto de garantizar inmunidad social dentro de sus colonias [8].

En cualquiera de estos dos escenarios, está claro que las membranas biológicas son finalmente el blanco con el cuál ambos péptidos deben interactuar para llevar a cabo sus efectos de control biológico. Las membranas están compuestas por una doble capa de lípidos, cuyas cabezas polares delimitan un núcleo muy

hidrofóbico constituido por largas cadenas aciladas de carbono. Esta organización facilita mucho el empaquetamiento de la bicapa en un contexto acuoso mediante atracciones electrostáticas, técnicamente llamadas interacciones dipolo-dipolo (atracciones electrostáticas que se generan entre el extremo parcialmente positivo de una molécula polar y el parcialmente negativo de otra) y fuerzas de London (atracciones intermoleculares débiles que se originan de fuerzas interactivas entre multipolos temporales en moléculas sin momento dipolar permanente), lo que delimita y mantiene estable todo tipo de célula.

Lípidos y bicapas lipídicas

Aunque pueden ser muy diversos, los fosfolípidos en general están formados por dos ácidos grasos unidos mediante enlaces éster al glicerol en los carbonos C-1 y C-2, en tanto que la cabeza polar se une al C-3 con un enlace fosfodiéster G3P (Fig. 3). Por otro lado, los ácidos grasos presentes en las largas cadenas de carbono de los fosfolípidos pueden variar en la longitud de la cadena y el número de insaturaciones, además de poder incluir anillos o ramificaciones, lo que determina de manera importante la curvatura espontánea de las bicapas lipídicas [9,10]. En arqueas, a diferencia de lo que se ha encontrado en bacterias y eucariontes, los fosfolípidos son del tipo *sn*-glicerol-1-fosfato (G1P) con cadenas isoprenoides unidas mediante enlaces tipo éter al C-1, lo cual les confiere un carácter ligeramente más hidrofóbico. Esto, además de

que las arqueas también poseen lípidos tetraéter, forman monocapas en lugar de bicapas con disposiciones antiparalelas de las dos moléculas de diéter unidas a través de sus cadenas isoprenoides. Tales características podrían ser una adaptación de las arqueas ante ambientes hostiles en términos de temperatura y salinidad [11].

De esta manera, el carácter anfipático de los fosfolípidos, así como la composición de éstos al interior de las membranas, determinan las propiedades mecánicas, de fluidez, carga de superficie, topología y grosor que facilitan o impiden la interacción con agentes exógenos, como los péptidos antimicrobianos (AMPs). Además, los lípidos son tan diversos que es prácticamente infinito el número de combinaciones entre ellos para formar membranas con propiedades realmente muy diversas. En general, los fosfolípidos pueden clasificarse al menos en ocho grandes grupos: ácidos grasos, prenoles, esfingolípidos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, sacarolípidos, esteroides y policétidos [12].

Una propiedad que tienen las membranas biológicas, la cual depende directamente de la composición de los lípidos que la componen, es su viscoelasticidad. Al mantenerse unidas mediante interacciones no covalentes, las membranas son muy flexibles. Esta flexibilidad se puede explicar principalmente en términos de la deformabilidad que poseen las cadenas aciladas saturadas, cuyo número de rotámeros conformacionales depende de manera directa de parámetros físicos como la temperatura, por ejemplo. Los cambios en la temperatura de un

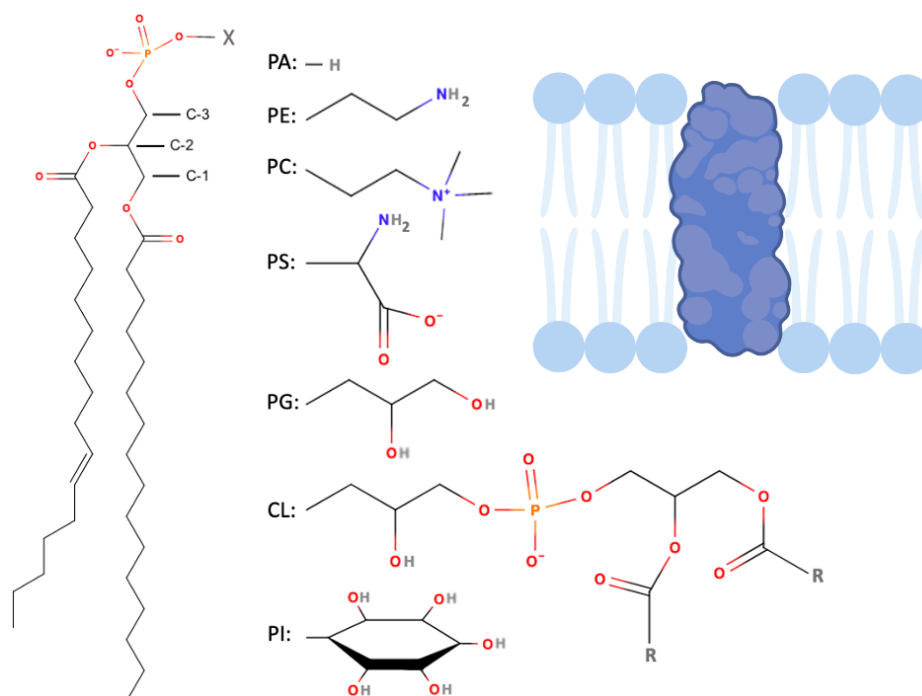


Figura 3. Estructura general de los fosfolípidos y principales grupos polares. PA, ácido fosfatídico (aniónico, a^-); PE, fosfatidiletanolamina (zwitteriónico, $zw^{+/-}$); PC, fosfatidilcolina ($zw^{+/-}$); PS, fosfatidilserina (a^-); PG, fosfatidilglicerol (a^-); CL, cardiolipina (a^-); PI, fosfatidilinositol (a^-). Se muestran los 3 átomos de carbono del glicerol y el esquema de una proteína inmersa en una bicapa lipídica, lo cual representa el blanco principal de ciertos péptidos antimicrobianos. Cada imagen fue diseñada mediante el servidor PubChem y el programa informático Bio-Render.

sistema liposomal facilita los movimientos laterales de las cadenas aciladas, así como la difusión lateral de los lípidos mismos y, en consecuencia su grado de compactación tanto lateral como transversal, además de que se puede dar el fenómeno de *flip-flop* (un movimiento de transposición de fosfolípidos de la monocapa superior a la inferior de la membrana, o viceversa). Un experimento típico que se realiza en los laboratorios de biofísica de membranas, para estudiar esta clase de fenómenos, es la transición de fases en sistemas liposomales. Asimismo, esta es una de las técnicas más ampliamente utilizada para la caracterización de las interacciones de sistemas

lipídicos modelo con péptidos antimicrobianos. El llamado comportamiento termotrópico mediante calorimetría por escaneo diferencial (DSC) permite evaluar la organización y dinámica de dispersiones lipídicas en medio acuoso. Tal es el caso de los cambios de fase que presentan sistemas liposomales compuestos de dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), un fosfolípido sintético. El DPPC transita diferentes estados de agregación o fases: a bajas temperaturas ($\sim 10^\circ\text{C}$) los lípidos se ordenan en forma de una fase llamada líquido cristalino (L_C) donde las cadenas aciladas prácticamente se encuentran formando un entramado molecular muy ordenado parecido a

un cristal; a unos 20°C los lípidos se gelifican (fase gel, L_{β}) y adquieren cierta fluidez, las cadenas aciladas reasumen su dinamismo cinético, aunque aún éste se encuentra muy limitado; a partir de los ~36°C sucede sin embargo un fenómeno fascinante, y es que las cadenas aciladas se empiezan a “fundir” e interdigitan, con lo cual las membranas empiezan a ondular debido a que ciertas regiones se empiezan a desordenar mientras otras aún permanecen semigelificadas, a esta fase se le conoce como la fase ondulada o la pretransición (P_{β}). Finalmente, a partir de los 42°C aproximadamente, las cadenas aciladas de los lípidos se “derriten” y el orden que se observaba a bajas temperaturas desaparece del todo. En esta fase, líquida desordenada (L_{α}) las membranas poseen una fluidez extrema, lo que incrementa mucho su permeabilidad y se compromete la integridad de la bicapa. Incluso, recientemente, se ha conseguido visualizar con microscopía electrónica que, de la mano de esta

fluidización de las membranas, las mismas también se adelgazan un poco [13] (Figura 4).

Interacciones péptido/lípido

Por lo antes expuesto es muy importante entender y estudiar las propiedades materiales que presentan las bicapas lipídicas y su respuesta ante diferentes variables físicas como lo son, además de la temperatura, la presión, el pH o la fuerza iónica del medio acuoso en las que se forman, además del efecto que compuestos químicos exógenos como los AMPs tienen sobre dichas propiedades de estabilidad mecánica. Estos efectos han sido ampliamente debatidos y existen grupos muy consolidados que los han reportado a detalle [14,15]. Al responder ante estos factores, una gran cantidad de péptidos afines a la membrana, responden de manera directa ante el estado termotrópico y mecánico de las mismas. De

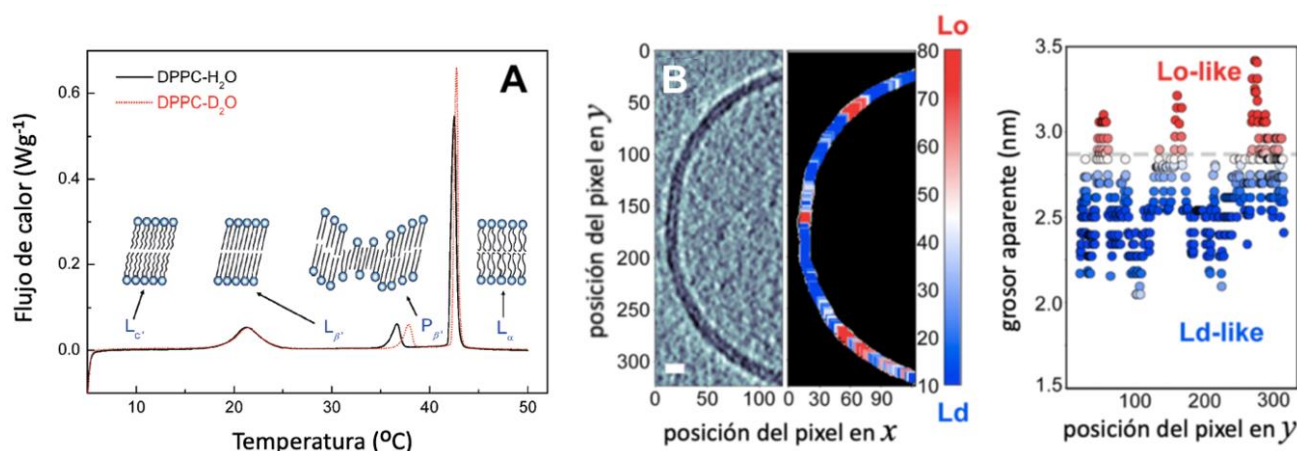


Figura 4. (A) Termograma de calorimetría diferencial para el DPPC mostrando los cambios de fase y el incremento de la fluidez del sistema a altas temperaturas. (B) Microfotografía y análisis densitométrico del grosor de la bicapa en un liposoma artificial. Las regiones ordenadas (Lo) son significativamente más gruesas que las desordenadas (Ld). La barra representa 10 nm. Las figuras se tomaron modificadas de las referencias [13, 23].

hecho, está documentado que la naturaleza dinámica de los lípidos los capacita para formar poros transitorios. Una vez formados, estos poros acuosos responden al voltaje, se pueden bloquear con diversos agentes químicos e incluso responden a cambios en la tensión lateral de la membrana, de manera análoga a lo que se ha observado en canales mecanosensibles de bacterias como el canal MscL de *Escherichia coli*. Los fenómenos de formación de poros lipídicos y su estabilidad depende directamente del comportamiento termotrópico de las membranas [16].

La presencia de péptidos formadores de poro, sin embargo, estabiliza los poros acuosos y, como se dijo anteriormente, tiene el potencial de desintegrar la membrana de forma dependiente de su concentración. Sin embargo, el efecto de la concentración es un fenómeno complejo donde las interacciones a nivel tanto de la topología de la membrana, como de los péptidos, y los fenómenos electrostáticos a nivel de la superficie, rigen la actividad formadora de poros de estas biomoléculas [17]. En breve, al ser generalmente pequeños (Tabla 1) los AMPs tienen conformaciones desordenadas en ambientes acuosos, cuya estructura depende directamente de la composición de aminoácidos, su carga global y, como se mencionó, su tamaño. Al establecer un primer contacto y unirse a las bicapas lipídicas, generalmente adoptan una configuración helicoidal anfipática, mediante mecanismos de

adsorción electrostática e interacciones topológicas, esto es, de forma, buscando concavidades o relieves en la superficie de las membranas.

Esto conduce a un adelgazamiento de la membrana, debido a que las estructuras helicoidales adosadas a la superficie de la bicapa, aumentan el volumen de las monocapas externas. Lo anterior se ha observado en el caso de la melitina y la magainina-2 [18,19]. Una vez que se alcanza una cierta concentración crítica, el llamado “umbral” de péptidos unidos a la membrana, la integridad de estas se ve cada vez más comprometida mediante una serie de reconfiguraciones y multimerizaciones de los péptidos, lo cual culmina con la formación de poros toroidales o tipo barril que atraviesan la membrana (Figura 5). La formación de poros incluye un cambio en la orientación de los péptidos, pasando de estar prácticamente adosados a la superficie de la membrana a atravesarla de forma perpendicular al plano de la misma. Los lípidos, por su parte, dada su fluidez a temperatura ambiente, y gracias al efecto perturbador de los AMPs, se translocan en fenómenos de *flip-flop*. Conforme la concentración de los AMPs se incrementa, los poros peptídicos se multimerizan facilitando la difusión pasiva de una gran cantidad de osmolitos intracelulares, lo que puede provocar la lisis de la célula al incrementarse cada vez más los defectos en el empaquetamiento de los lípidos.

Tabla 1. Principales péptidos antimicrobianos y sus mecanismos de acción.

Péptido	Secuencia o longitud *	Estructura predominante	Fuente biológica	Blanco principal	Principal mecanismo de acción	Ref.
Alameticina	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Ala-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Phl	α -helicoidal con dominio C-terminal 3 ₁₀	<i>Trichoderma viridae</i>	Membrana celular en bacterias Gram (+) y hongos	Formación de agregados lipídicos, poros tipo barril y adelgazamiento de la membrana	[26] [27]
Cathelicidinas	12-97 aa	α -helicoidal	vertebrados	Membrana interna bacterial	Poros toroidales y efecto detergente. Quimiotaxis de neutrófilos.	[28]
Daptomicina	l-Trp-d-Asn-l-Asp-Thr-Gly-l-Orn-l-Asp-d-Ala-l-Asp-Gly-d-Ser-l-MeOGlu-l-Kyn (C10)	lipopéptido cíclico	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Membrana celular en bacterias Gram (+)	Efecto de extracción de lípidos e inhibición de síntesis de pared	[7] [20] [29]
Defensinas	29-35 aa (tipo α) 36-42 aa (tipo β)	β -laminar	Plantas, insectos y mamíferos	Membrana celular en bacterias y hongos	Depolarización del potencial de membrana y permeabilización	[30]
Fengicina A	l-Glu-d-Orn-d-Tyr-d-Thr-l-Glu-d-Ala-l-Pro-l-Gln-l-Tyr-l-Ile (C14-C18)	lipopéptido cíclico	<i>Bacillus</i> spp.	Membrana celular en hongos	Fluidización y cambios en el grosor de la membrana	[31] [22]
Iturina A	l-Asn-d-Tyr-d-Asn-l-Gln-l-Pro-d-Asn-l-Ser (C14-C17)	lipopéptido cíclico	<i>Bacillus</i> spp.	Membrana celular en hongos	Miscelación y efecto detergente	[32]
Magainina 2	GIGKFLHSAKKF GKAFVGEIMNS	α -helicoidal	<i>Xenopus laevis</i>	Gangliósidos y membranas bacterianas y de mamífero	Poros toroidales, <i>flip-flop</i> de lípidos, efecto detergente	[33]
Melitina	GIGAVLKVLTTGL PALISWIKRKRQQ	α -helicoidal	<i>Apis mellifera</i>	Membrana interna bacterial	Formación de poros toroidales	[34]
Nisina	I-Dhb-AI-Dha-LA-Aba-PGAK-Aba-GALMGANMK-Aba-A-Aba-AHASIHV-Dha-K	Péptido desordenado con dominio α -helicoidal	<i>Streptococcus lactis</i>	Membrana celular en bacterias Gram (+). Lípido II	Formación de poros, permeabilización e inhibición de la síntesis de pared y germinación de esporas	[35] [36]
Plectasina	MGFGCNGPWDED DMQCHNHCKSIK GYKGGYCAKGGF VCKCY	α/β	Ascomicetos	Lípido II	Inhibición de la biosíntesis de pared celular	[37]
Surfactina	l-Glu-l-Leu-d-Leu-l-Val-l-Asp-d-Leu-l-Leu (C12-C17)	lipopéptido cíclico	<i>Bacillus</i> spp.	Membrana celular	Inducción de curvatura y efecto detergente	[38] [39]

* Aba: Ácido aminobutírico, Ac: Acetil, Aib: Ácido α -aminoisobutírico, Dha: Dehidroalanina, Dhb: Dehidrobutirina (β -metilhidroalanina), Kyn: Quinurenina, MeOGlu: Ácido 3-metil-glutámico, Orn: Ornitina, Phl: Fenilalaninol.

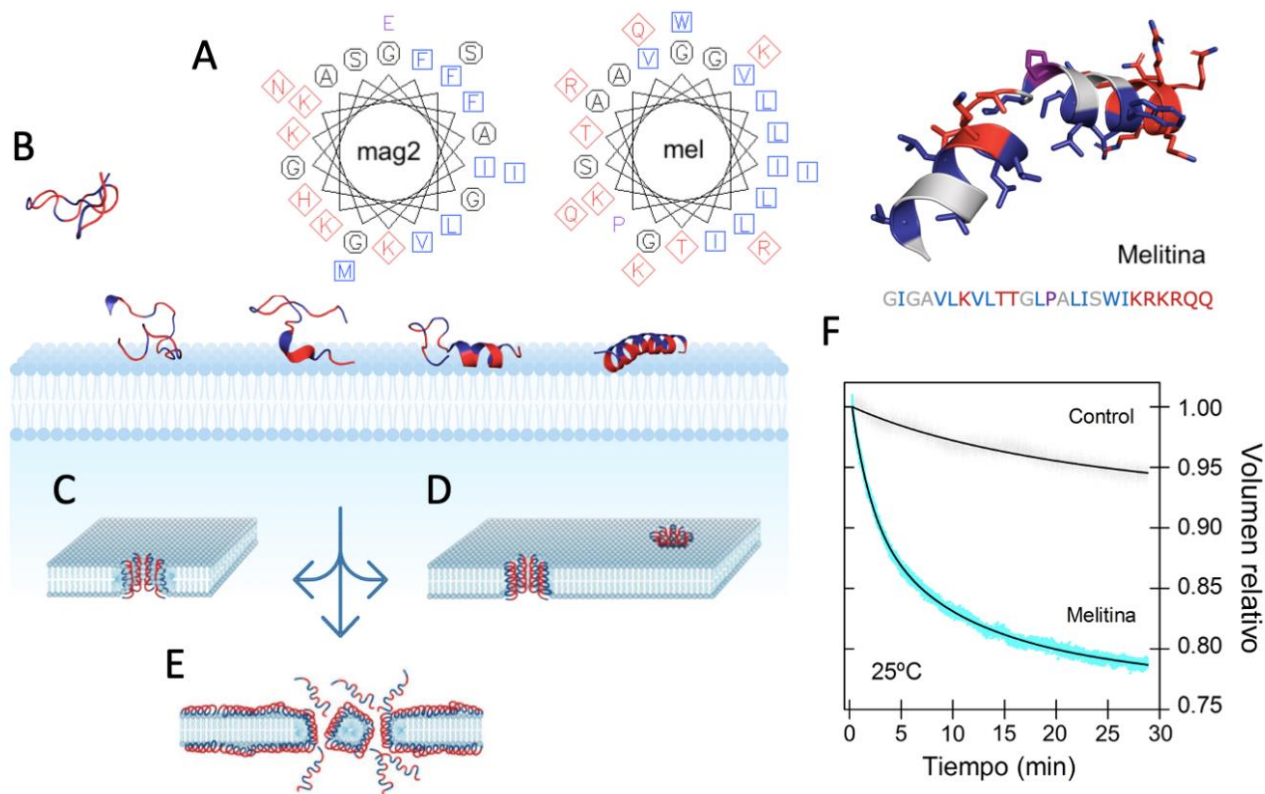


Figura 5. Mecanismos de acción de los AMPs catiónicos helicoidales en membranas lipídicas. (A) Representación transversal de la magainina 2 y la melitina (2mw6) con sus lados hidrofóbicos en azul e hidrofílicos en rojo; (B) en medio acuoso estos péptidos se encuentran desordenados y al ser adsorbidos en la superficie membranal mediante atracciones electrostáticas, se facilita una transición a estructuras helicoidales ordenadas; una vez que los péptidos alcanzan una concentración crítica, se oligomerizan de manera cooperativa con los lípidos formando poros toroidales (C), o poros tipo barril transversal (D), cuyo efecto es la permeabilización de osmolitos intracelulares; (E) a concentraciones muy altas, los péptidos cubren la superficie de ambas monocapas como si se tratase de una alfombra resultando en un efecto detergente y desintegrando la membrana. (F) Experimento de permeabilidad al ion amonio en liposomas sintéticos (DOPC:DPPC, 2:1) tratados con melitina a temperatura ambiente al superar la concentración crítica ($P/L = 1/40$). El momento hidrofóbico (mH) de la melitina es de 0.458, mientras que la magainina-2 tiene un valor de 0.514. Las imágenes de los incisos C-E fueron tomadas de la referencia [24]. Las condiciones experimentales mostradas en el inciso F se reportan en nuestro trabajo original [25].

Los lipopéptidos cíclicos (CLPs) se comportan de una manera muy similar, salvo que, al incluir una larga cadena acilada, se trata de biomoléculas con un fuerte carácter anfipático. Por ello mismo, su interacción con las membranas es aún más íntima al incluirse más fácilmente en el núcleo hidrofóbico entre las

dos monocapas, expandiendo lateralmente la bicapa y desestabilizando más rápidamente la integridad de estas. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con los AMPs, los CLPs generalmente se micelizan en solución acuosa, esto es, forman micelas. Las micelas son partículas coloidales que se forman al agregarse

moléculas de naturaleza anfifílica, donde la zona hidrofílica de la molécula se orienta hacia el exterior, en directo contacto con la fase acuosa y la zona hidrofóbica se orienta hacia el núcleo de la estructura (Figura 6).

Dependiendo de una concentración micelar crítica (c.m.c.), la inserción de las colas hidrofóbicas de los CLPs tiene como resultado la expansión lateral asimétrica de la monocapa superior de la membrana, perturbando el grado de hidratación de la misma y aumentando la curvatura local de la membrana, lo que desestabiliza su integridad. En el caso de la daptomicina, estos procesos dependen directamente de otros factores, como lo es la presencia de calcio y membranas ricas en PG [20]. Sin embargo, los mecanismos de acción

de los CLPs son poco claros todavía en comparación a lo que sabemos de los correspondientes en AMPs (Tabla 1). En el caso de surfactina, su pequeño tamaño favorece una distribución asimétrica entre ambas monocapas con la consiguiente desorganización de la bicapa lipídica, favoreciendo un efecto detergente [21]. De manera similar, la iturina interactúa con las membranas lipídicas aumentando la permeabilidad iónica debido a la formación de poros acuosos. Por otra parte, se sabe que la fengicina, al insertarse, promueve la curvatura de ambas monocapas, lo que induce un cambio en el grosor de la bicapa. Posteriormente, la inserción del anillo peptídico provoca una alteración extra de la membrana, lo que conduce a su desestabilización final [22].

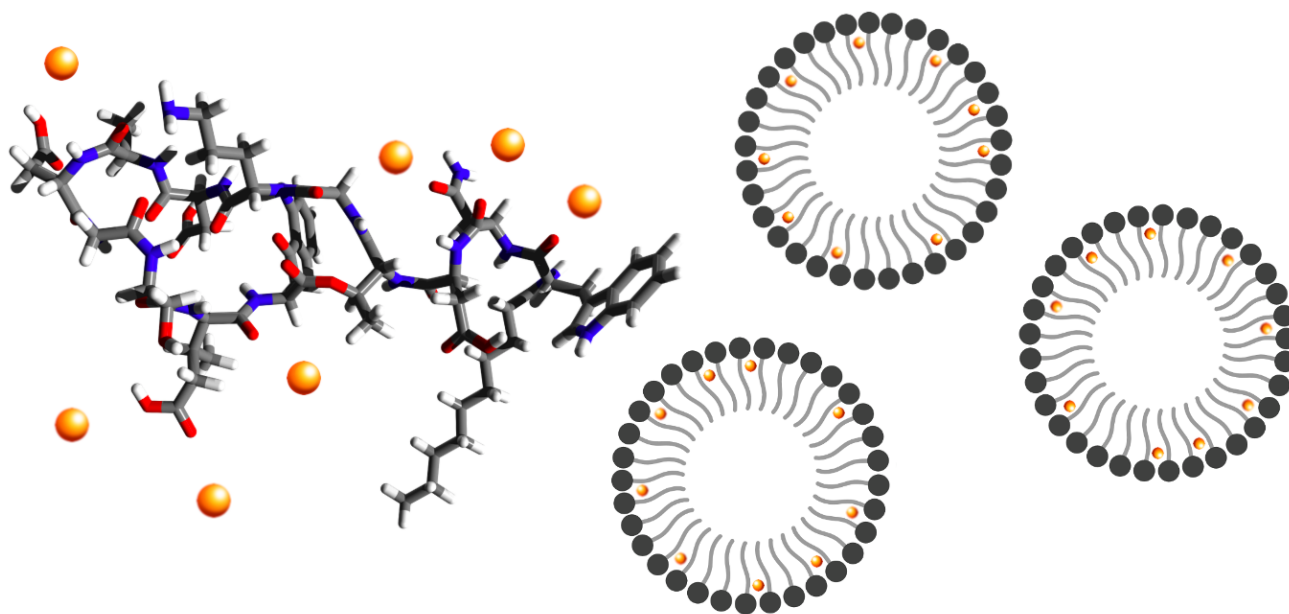


Figura 6. Micelización de la daptomicina en presencia del ion calcio (mostrados como esferas). En solución acuosa, la daptomicina forma complejos con calcio para formar pequeñas micelas. Su inserción en membranas depende tanto de la presencia de este catión divalente como de la presencia de fosfatidilglicerol en la bicapa lipídica. Una vez insertada en la superficie de la membrana, la daptomicina se oligomeriza y transloca a la monocapa interna de la membrana, lo que compromete la integridad de la membrana al extraer lípidos y facilitar la permeabilización de osmolitos vitales para la célula.

Sin embargo, pese a todas estas variantes en los mecanismos de acción de los CLPs en membranas, las acciones de estos biosurfactantes, como en el caso de los AMPs, son sensibles al mismo tipo de factores electrostáticos y mecánicos de la membrana objetivo en su contexto acuoso [7].

Independientemente de la naturaleza de los péptidos o lipopéptidos formadores de poro, las interacciones péptido-lípido generalmente se expresan, en términos termodinámicos, mediante constantes de partición. Estas constantes (K_p) se definen como la relación de concentración del péptido en las fases lipídica (P_l) y la acuosa (P_w) cuando las dos concentraciones están en equilibrio:

$$K_p = ([P_l])/[P_w]$$

De esta manera, los valores de los péptidos en fase lipídica [P_l] y fase acuosa [P_w] dependen de sus concentraciones relativas durante la interacción y al determinarse de forma experimental, contribuyen a una mejor comprensión de las complejas interacciones entre péptidos y lípidos.

CONCLUSIONES

Los AMPs y los CLPs se pueden considerar candidatos muy prometedores para superar la resistencia a los antibióticos aminoglicosídicos y β -lactámicos convencionales. Estos péptidos se han identificado prácticamente en todo el árbol de la vida, desde bacterias y arqueas,

protistas y hongos hasta plantas y animales. Hoy en día, la base de datos internacional de péptidos con actividad antimicrobiana (APD) (<http://aps.unmc.edu/AP>) contiene a la fecha 3425 AMPs, incluidos algunos péptidos sintéticos. En esta base de datos se incluyen péptidos tan diversos que muchos de ellos no han sido caracterizados a nivel de los mecanismos de acción que ejercen en las células. Desde que se descubrieron estas moléculas, inmediatamente se infirió que la formación de poros en la membrana podría constituir el principal mecanismo de acción para explicar sus actividades biológicas. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que sus acciones incluyen también mecanismos no relacionados con la desestabilización de las membranas e incluyen su internalización para interactuar con blancos intracelulares o bien mediante la modulación de la respuesta inmune.

En cualquier caso, los mecanismos de perturbación de la integridad de la bicapa lipídica expuestos en el presente trabajo, son al día de hoy los mejor caracterizados para comprender a detalle las interacciones entre péptidos y lípidos. En este contexto, para lograr entender cabalmente estos procesos, se deben evaluar experimentalmente varias propiedades de la membrana, entre las cuales las más relevantes podrían ser: (i) la electrostática superficial y el potencial dipolar de la bicapa lipídica; (ii) el grado de hidratación de las cabezas polares de los fosfolípidos; (iii) el potencial transmembrana, la fuerza iónica y el efecto de los cationes divalentes en solución acuosa; (iv) la fluidez y el grado de curvatura

espontánea de las membranas; (v) las propiedades viscoelásticas y de compresibilidad lateral de las mismas; (vi) su espesor, y (vii) el comportamiento de fase, miscibilidad y tensiones laterales asociadas a su composición química, además de posibles asimetrías de las monocapas. Por otro lado, desde el punto de vista de los péptidos, aspectos como: (i) su carga global, (ii) anfipaticidad, (iii) flexibilidad intrínseca, (iv) topología y conformación estructural, además de (v) la longitud de cadena acilada y número de insaturaciones o metilaciones en el caso de los CLPs, son determinantes para la caracterización a nivel molecular de la naturaleza de estas interacciones. Esto es fundamental para proponer el uso de AMPs y CLPs como antibióticos alternativos, contribuyendo así al desarrollo de una nueva generación de terapias y estrategias de control antimicrobianas cada vez más efectivas.

CONFLICTO DE INTERESES

Se declara la ausencia de cualquier conflicto de interés por parte de los autores del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. Noemi Jimenez-Rojo durante una estancia postdoctoral dentro de la Universidad del País Vasco, por su amable donación del péptido melitina, así como a la UNIDA-TecNM por las facilidades para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1]. Gaynes R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis J* [Internet]. 2017;23(5):849. Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/5/16-1556_article
- [2]. Castle SS. Penicillins. In: Enna SJ, Bylund DBBTTCP, editors. New York: Elsevier; 2007. p. 1–3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552323610116>
- [3]. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* [Internet]. 2004;10(12):S122–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- [4]. Abd El-Wahed AA, Khalifa SAM, Sheikh BY, Farag MA, Saeed A, Larik FA, *et al.* Chapter 13 - Bee Venom Composition: From Chemistry to Biological Activity. In: Atta-ur-Rahman BT-S in NPC, editor. Elsevier; 2019. p. 459–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444641816000139>
- [5]. Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* [Internet]. 2008;16(3):115–25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X08000383>
- [6]. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism

of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility *In Vivo*. Vol. 8, Biomolecules. 2018. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/8/1/4>

[7]. Balleza D, Alessandrini A, Beltrán García MJ. Role of Lipid Composition, Physicochemical Interactions, and Membrane Mechanics in the Molecular Actions of Microbial Cyclic Lipopeptides. *J Membr Biol* [Internet]. 2019;252(2):131–57. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00232-019-00067-4>

[8]. Baracchi D, Francese S, Turillazzi S. Beyond the antipredatory defence: Honey bee venom function as a component of social immunity. *Toxicon* [Internet]. 2011;58(6):550–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011100273X>

[9]. Gruner SM. Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1985 Jun 1;82(11):3665–9. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.82.11.3665>

[10]. Epand RM, D'Souza K, Berno B, Schlame M. Membrane curvature modulation of protein activity determined by NMR. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2015;1848(1, Part B):220–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527361400176X>

[11]. Balleza D, Garcia-Arribas AB, Sot J, Ruiz-Mirazo K, Goñi FM. Ether- versus Ester-Linked Phospholipid Bilayers Containing either Linear or Branched Apolar Chains.

Biophys J [Internet]. 2014;107(6):1364–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349514007814>

[12]. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, *et al.* A comprehensive classification system for lipids1. *J Lipid Res* [Internet]. 2005;46(5):839–61. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520339687>

[13]. Cornell CE, Mileant A, Thakkar N, Lee KK, Keller SL. Direct imaging of liquid domains in membranes by cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2020 Aug 18;117(33):19713–9. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.2002245117>

[14]. Bechinger B. Structure and Function of Membrane-Lytic Peptides. *CRC Crit Rev Plant Sci* [Internet]. 2004 May 1;23(3):271–92. Available from: <https://doi.org/10.1080/07352680490452825>

[15]. Rima M, Rima M, Fajloun Z, Sabatier J-M, Bechinger B, Naas T. Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. Vol. 10, *Antibiotics*. 2021. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/9/1095#>

[16]. Mosgaard LD, Heimburg T. Lipid Ion Channels and the Role of Proteins. *Acc Chem Res* [Internet]. 2013 Dec 17;46(12):2966–76. Available from: <https://doi.org/10.1021/ar4000604>

[17]. Paterson DJ, Tassieri M, Reboud J, Wilson R, Cooper JM. Lipid topology and

electrostatic interactions underpin lytic activity of linear cationic antimicrobial peptides in membranes. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2017 Oct 3;114(40):E8324–32. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1704489114>

[18]. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions. *Biosci Rep* [Internet]. 2007 Aug 6;27(4–5):189–223. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10540-006-9030-z>

[19]. Matsuzaki K, Sugishita K, Harada M, Fujii N, Miyajima K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 1997;1327(1):119–30. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273697000515>

[20]. Huang HW. DAPTOMYCIN, its membrane-active mechanism vs. that of other antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2020;1862(10):183395. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273620302376>

[21]. Heerklotz H, Seelig J. Detergent-Like Action of the Antibiotic Peptide Surfactin on Lipid Membranes. *Biophys J* [Internet]. 2001;81(3):1547–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349501758080>

[22]. Sur S, Romo TD, Grossfield A. Selectivity and Mechanism of Fengycin, an Antimicrobial Lipopeptide, from Molecular Dynamics. *J Phys*

Chem B [Internet]. 2018;122(8):2219–26. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/29376372>

[23]. Wu F-G, Jia Q, Wu R-G, Yu Z-W. Regional Cooperativity in the Phase Transitions of Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayers: The Lipid Tail Triggers the Isothermal Crystallization Process. *J Phys Chem B* [Internet]. 2011 Jul 7;115(26):8559–68. Available from: <https://doi.org/10.1021/jp200733y>

[24]. Ebenhan T, Gheysens O, Kruger HG, Zeevaert JR, Sathekge MM. Antimicrobial Peptides: Their Role as Infection-Selective Tracers for Molecular Imaging. *Biomed Res Int*. 2014;2014. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/867381/>

[25]. Balleza D. Mechanical properties of lipid bilayers and regulation of mechanosensitive function. *Channels* [Internet]. 2012 Jul 1;6(4):220–33. Available from: <https://doi.org/10.4161/chan.21085>

[26]. Afanasyeva EF, Syryamina VN, Dzuba SA. Communication: Alamethicin can capture lipid-like molecules in the membrane. *J Chem Phys* [Internet]. 2017 Jan 6;146(1):11103. Available from: <https://doi.org/10.1063/1.4973703>

[27]. Huang HW. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2006;1758(9):1292–302. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/>

[pii/S0005273606000411](https://doi.org/10.1189/jlb.0403147)

[28]. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2004 Jan 1;75(1):39–48. Available from: <https://doi.org/10.1189/jlb.0403147>

[29]. Gray DA, Wenzel M. More Than a Pore: A Current Perspective on the *In Vivo* Mode of Action of the Lipopeptide Antibiotic Daptomycin. Vol. 9, *Antibiotics*. 2020. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/1/17>

[30]. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* [Internet]. 2005;6(6):551–7. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/15908936>

[31]. Eeman M, Pegado L, Dufrêne YF, Paquot M, Deleu M. Influence of environmental conditions on the interfacial organisation of fengycin, a bioactive lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2009;329(2):253–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979708012988>

[32]. Harnois I, Maget-Dana R, Ptak M. Methylation of the antifungal lipopeptide iturin A modifies its interaction with lipids. *Biochimie* [Internet]. 1989;71(1):111–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300908489901405>

[33]. Imura Y, Choda N, Matsuzaki K. Magainin 2 in Action: Distinct Modes of Membrane Permeabilization in Living

Bacterial and Mammalian Cells. *Biophys J* [Internet]. 2008;95(12):5757–65. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349508819923>

[34]. Hong J, Lu X, Deng Z, Xiao S, Yuan B, Yang K. How Melittin Inserts into Cell Membrane: Conformational Changes, Inter-Peptide Cooperation, and Disturbance on the Membrane. Vol. 24, *Molecules*. 2019. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/31067828>

[35]. Lay C Le, Dridi L, Bergeron MG, Ouellette M, Fliss IL. Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination. *J Med Microbiol* [Internet]. 2016;65(2):169–75. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/26555543>

[36]. Hsu S-TD, Breukink E, Tischenko E, Lutters MAG, de Kruijff B, Kaptein R, *et al.* The nisin–lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2004;11(10):963–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/nsmb830>

[37]. Schneider T, Kruse T, Wimmer R, Wiedemann I, Sass V, Pag U, *et al.* Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II. *Science* (80-) [Internet]. 2010 May 28;328(5982):1168–72. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1185723>

[38]. Heerklotz H, Seelig J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J* [Internet].

2007;36(4):305–14. Available from:
<https://doi.org/10.1007/s00249-006-0091-5>

[39]. Deleu M, Lorent J, Lins L, Brasseur R, Braun N, El Kirat K, *et al.* Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase

separation. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2013;1828(2):801–15. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273612003859>