



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Péptidos antimicrobianos: Melitina



M^a Elvira Ayala Domínguez



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
GRADO EN FARMACIA



Péptidos antimicrobianos: Melitina

TRABAJO FIN DE GRADO

Revisión bibliográfica

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Tutores: Dr. Manuel Bueno Martínez y Dra. Inmaculada Molina Pinilla

M^a Elvira Ayala Domínguez

Sevilla, enero de 2022

Facultad de Farmacia

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMP: Péptidos antimicrobianos

ARN: Ácido ribonucleico

CAM: Cecropina A – Melitina

CAMA: Cecropina A- Melitina A

CD: Dicroísmo circular

CDC: Centro para el Control de Enfermedades

CMI: Concentración mínima inhibitoria

DPP IV: Dipeptidil peptidasa IV

FTIR: Espectrometría de infrarrojos por la transformación de Fourier

HDP: Péptidos de defensa del huésped

MDR: Resistencia a múltiples fármacos

MRSA: Staphylococcus aureus resistente a meticilina

MSSA: Staphylococcus aureus sensible a meticilina

RMN: Resonancia magnética nuclear

SAMP: Imitadores sintéticos de péptidos antimicrobianos

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

WHO: Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

Las bacterias farmacorresistentes plantean un enorme problema de salud pública que ha sido provocada por el mal uso que se ha hecho de los antibióticos. Se ha estado trabajando en múltiples alternativas para combatir este problema. Una de estas opciones ha sido el uso de los péptidos antimicrobianos (AMPs), en lugar de los fármacos convencionales, debido a la dificultad que parece que tienen a que se desarrollen resistencias. Además, se ha visto que estos AMPs no sólo son efectivos contra bacterias, sino que también pueden ser activos ante hongos, parásitos, virus, o células cancerosas por lo que suponen un campo de estudio muy novedoso y con prometedores resultados.

En este trabajo se ha pretendido dar una visión general sobre los péptidos antimicrobianos, así como su importancia en el tratamiento de bacterias multirresistentes, y más concretamente sobre el péptido melitina. La melitina es un péptido antimicrobiano cuya estructura es en forma de hélice-bisagra-hélice procedente del veneno de la abeja, y cuyo mecanismo de acción consiste en alterar las bicapas de fosfolípidos formando poros y provocando una lisis de la célula. Se han estudiado las aplicaciones de la melitina ante distintas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y se ha visto que puede tener resultados prometedores en el tratamiento de estas infecciones, e incluso se ha demostrado que pueden tener efectos sinérgicos con antibióticos convencionales mejorando así la eficacia de estos.

Los AMP como agentes antibacterianos han estado dando buenos resultados, sin embargo, algunos inconvenientes como su inestabilidad, la toxicidad que puedan causar al huésped o los costos de producción, ha favorecido el desarrollo de los péptidos sintéticos (SAMP) destacando el péptido CAM (cecropina A- melitina) y derivados del mismo, los cuales han presentado mejores actividades antibacterianas y menores efectos adversos que sus péptidos naturales de partida, la melitina y la cecropina.

Palabras clave: resistencia a los antibióticos, melitina, péptidos antimicrobianos, CAM péptido y péptido híbrido

INDICE

1. Introducción.....	6
2. Objetivos	9
3. Metodología	9
4. Resultados y discusión.....	11
4.1. Concepto de péptido antimicrobiano (AMP).....	11
4.1.1. Mecanismo de acción	12
4.1.2. Clasificación	15
4.2. Melitina	18
4.2.1. Concepto y estructura	18
4.2.2. Mecanismo de acción de la melitina	21
4.2.3. Aplicaciones de la melitina como antibacteriano	24
4.3. CAM; Cecropina A – Melitina	29
5. CONCLUSIÓN.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA	34

1.- Introducción

Desde que en septiembre de 1928 Fleming descubriera la penicilina, se ha producido un importante adelanto en el tratamiento de las infecciones bacterianas. A lo largo de estos casi cien años se han descubierto nuevos antibióticos que han permitido el tratamiento de enfermedades infecciosas, que desde la antigüedad eran muy graves o incluso mortales (Ventola, 2015). Sin embargo, estudios epidemiológicos han demostrado que se ha favorecido la aparición y diseminación de resistencias bacterianas a los antibióticos debido al mal uso que se ha hecho de ellos, ya sea por un consumo en exceso, una mala prescripción (Luyt et al., 2014) o por su uso indiscriminado en el tratamiento de enfermedades o suplementos para el crecimiento en el ganado (Bartlett et al., 2013).

La resistencia a los antibióticos es un suceso natural conocido desde hace mucho tiempo. Ya en 1940, la enzima β -lactamasa producida por algunas bacterias, fue identificada como la responsable de la resistencia frente a la acción de antibióticos betalactámicos (Abraham y Chain, 1940). La resistencia adquirida a los antibióticos es un proceso genéticamente codificado, y hay varios mecanismos detrás de esta resistencia. Uno de los mecanismos más importantes de la propagación de los genes que codifican las enzimas que confieren resistencia a los antibióticos entre las bacterias, es la transmisión horizontal. La transferencia o movimiento de los genes entre bacterias se produce de forma hereditaria, de célula madre a célula hija, o puede ser adquirida, a través de plásmidos lo que desencadena que estos genes se transfieran entre distintas especies bacterianas (Figura 1). Además, puede ocurrir de manera natural mutaciones en los genes, lo que desencadena en última instancia el desarrollo de resistencias a los antibióticos (Read y Woods, 2014).

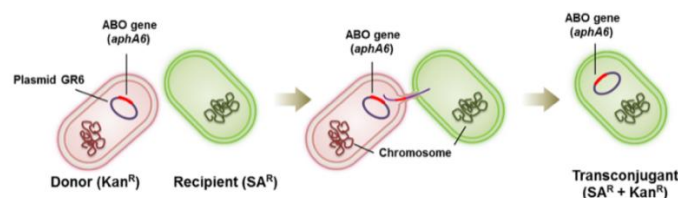


Figura 1. Transferencia horizontal de genes del grupo de plásmidos 6 (GR6) que alberga genes de resistencia a antibióticos entre cepas donante y receptora.

(Leungtongkam et al., 2018)

Un análisis realizado por el “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) en 2019, puso de manifiesto que en Estado Unidos se habían producido más de 2,8 millones de infecciones por resistencia a los antibióticos, y como resultado de ello murieron alrededor de 35.000 personas (CDC, 2019). Para tratar estas bacterias resistentes a los medicamentos, una de las opciones empleadas es el tratamiento con dosis más altas de antibióticos convencionales para lograr la misma eficacia que antes. Sin embargo, esto es un proceso costoso ya que requiere una hospitalización prolongada y puede tener un efecto tóxico en el paciente.

Según un informe publicado en 2020 por la WHO, Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2021), se están explorando nuevos tratamientos para combatir la resistencia a los antibióticos los cuales incluyen nuevos antibióticos y combinaciones de los mismos. Aunque algunos de ellos parecen estar dando resultados prometedores, se piensa que en general no serán capaces de resolver completamente el problema de la resistencia bacteriana, ya que algunos de los antibióticos nuevos son derivados de las diferentes familias de antibióticos existentes cuya farmacorresistencia es conocida, por lo que se prevé que se produzca una rápida aparición de resistencias a estos nuevos antibióticos. Es por eso que también se están investigando nuevos tratamientos no convencionales como bacteriófagos, péptidos antimicrobianos, etc.

Algunas de las bacterias cuya prioridad es crítica a la hora de encontrar un nuevo tratamiento aparecen recogidas en la Tabla 1, (Mukhopadhyay S et al., 2020).

Prioridad	Bacterias resistentes a los antibióticos	Medicamento al que es resistente
Prioridad 1:CRÍTICO*	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenem
	Enterobacteriaceae #	Carbapenem, cefalosporinas de tercera generación
Prioridad 2:ALTA	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina, vancomicina intermedia y resistente
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Salmonella</i> spp.	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolona
	<i>steotococos neumonia</i>	Penicilina
Prioridad 3: MEDIA	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolona

Tabla 1. Lista de prioridades mundiales recomendadas por la WHO de bacterias resistentes a los antibióticos.

Es por tanto muy importante encontrar nuevas estrategias para hacer frente a las bacterias resistentes. En este sentido, una de las vías que recientemente ha cobrado una enorme importancia es el empleo de los péptidos antimicrobianos (AMP). Estos AMP existen abundantemente en la naturaleza y son una parte importante del sistema inmunológico innato de diferentes organismos, por lo que han coexistido con los microorganismos desde hace millones de años, y no se tiene constancia de que se haya producido una resistencia generalizada, lo que podría significar que tienen un mecanismo antimicrobiano único, capaz de evitar que se produzcan estas resistencias. Además, se ha comprobado que algunos AMP pueden tener actividad no solo antibacteriana sino también contra hongos, parásitos, insectos, virus e incluso células cancerosas (Wang y Wang 2004). Hasta la fecha, ningún AMP se ha comercializado como antibiótico, aunque muchos de estos AMP se encuentran en ensayo clínico como: LocilexTM, un AMP catiónico de origen natural el cual produce alteraciones en la membrana de la bacteria; C16G2, péptido antimicrobiano sintético de acción específica contra las caries dentales; LTX-109 (LytixarTM) con una rápida actividad lítica, para el tratamiento del impétigo; o LL-37 para mejorar la curación de las úlceras venosas en la pierna.

Sin embargo, su desarrollo clínico ha tenido un éxito limitado debido a que presentan algunas desventajas, tanto farmacocinéticas como elevados costos de producción. Todo ello, unido a un renovado optimismo sobre el descubrimiento de productos naturales, ha llevado a que se desarrollen estrategias alternativas, en concreto la identificación de péptidos naturales activos, y su posterior modificación y optimización de las secuencias. Es por ello por lo que se investigó como nueva fuente de obtención de AMP, los distintos venenos de diferentes animales como arañas, escorpiones y abejas. Fue en las abejas y más concretamente las abejas del género *Apis* donde se detectó que en su veneno, el cual poseía una actividad citotóxica, tenía un componente bioactivo mayoritario, la melitina, un péptido catiónico con actividad citolítica por lo que se pensó que la melitina podría ser la responsable de esta actividad del veneno.

Tras el descubrimiento de la melitina, se han realizado una serie de ensayos que están permitiendo conocer su potencial, sus ventajas y limitaciones. La melitina ha

mostrado una potente actividad antibacteriana, tanto para bacterias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* o *Salmonella enterica*, como bacterias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (Memariani et al., 2019). También se han detectado acción antiinflamatoria, destrucción de células cancerosas y aumento en el crecimiento y la proliferación celular.

Actualmente se está estudiando el empleo de la melitina junto con otros péptidos y antibióticos y su efecto sinérgico, detectándose una mayor efectividad contra cepas que previamente eran resistentes a la meticilina como *S. aureus* (MRSA) (Bardbari et al., 2018).

2.-Objetivos

2.1. Objetivo general

- Dar a conocer a los péptidos antimicrobianos: estructura, mecanismo de acción y clasificación.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterización del oligopéptido melitina
- Estudiar la eficacia de la melitina ante distintas bacterias multirresistentes
- Describir nuevas posibilidades de tratamiento ante bacterias multirresistentes utilizando péptidos híbridos de la melitina.

3.-Metodología

La metodología utilizada en la elaboración de este trabajo de fin de grado de tipo bibliográfico, se ha centrado en la búsqueda de artículos científicos y revisiones, como fuentes bibliográficas primarias. Se ha utilizado en la búsqueda las distintas bases de datos proporcionadas por la biblioteca de la Universidad de Sevilla, como Web of Science, Scienedirect, Pubmed, Score, Medline, etc. También se han empleado diferentes portales de búsqueda en internet y bases de datos como Google académico. Se completó con información extraída de páginas de internet como la

página oficial de la Organización Mundial de la Salud (WHO) o la página oficial del Centro de Control de Enfermedades (CDC). Como palabras clave para la búsqueda se ha empleado los términos, “melittin”, “antibiotic resistance” y “cecropin-melittin peptides”.

Para la estrategia de búsqueda primero se realizó una lectura en profundidad de artículos que introdujeron el tema de péptidos antimicrobianos. Tras esto, se analizó con mayor facilidad, los artículos centrados en el péptido melitina y más en concreto, en su actividad antibacteriana. Las tablas y figuras han sido tomadas de los artículos y revisiones bibliográficas consultadas. Como criterios de exclusión se han descartado artículos o revisiones bibliográficas que fueran antiguas o que no tuvieran relevancia en la actualidad junto con aquellos estudios de la melitina que no estuvieran centrados en su capacidad antibacteriana, ya que la melitina presenta numerosas aplicaciones. Solo muy ocasionalmente se han citado artículos antiguos, por ser importantes.

La búsqueda realizada en Sciencedirect, empleando el término “melittin” y acotada a los diez últimos años dio como resultado la siguiente gráfica (Figura 2). Estos datos ponen de manifiesto como el interés del estudio de la melitina se mantiene en el tiempo hasta la actualidad.

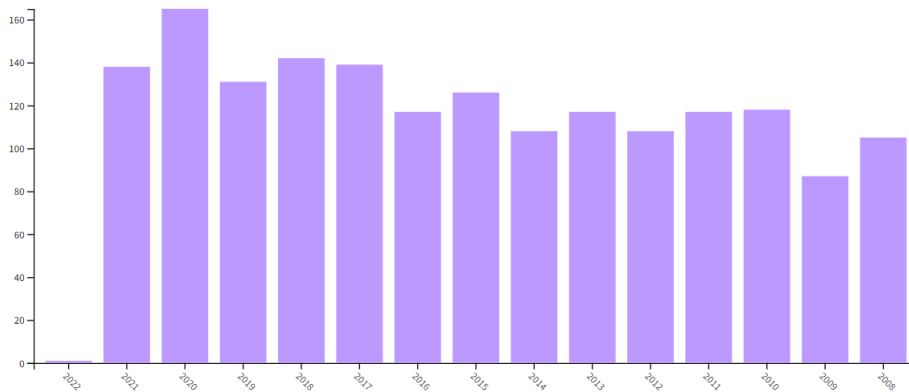


Figura 2. Evolución del tema de investigación a lo largo del tiempo.

4.-Resultados y discusión

4.1.-Concepto de péptido antimicrobiano (AMP)

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) o péptidos de defensa del huésped (HDP) se descubrieron por primera vez en la década de 1980. Se definen como un grupo de péptidos de tamaño relativamente corto, entre 10-50 aminoácidos, que se localizan tanto en las células eucariotas como procariotas de forma natural, siendo su función principal la regulación de la respuesta inmune innata del huésped en los organismos superiores, mientras que en las bacterias los AMPs, matan otras bacterias que compiten por el mismo nicho ecológico (Jiang et al., 2021). Al ser un componente integral de la inmunidad innata, los AMPs generalmente actúan de manera no específica (actividad de amplio espectro) y rápidamente (en minutos). Su eficacia en la actividad antimicrobiana contra patógenos, probablemente ha contribuido a su ubicuidad en muchas formas de vida. Aunque muestran una notable diversidad estructural y funcional, presentan una serie de características distintivas que los definen (Hancock y Sahl, 2006):

(a) Bajo peso molecular.

(b) Contener aminoácidos básicos, por lo que son de naturaleza catiónica a pH fisiológico, oscilando las cargas entre +2 y +9; y aminoácidos hidrofóbicos, lo que les permite interactuar con la membrana celular.

(c) La configuración más abundante es α -helicoidal, aunque también existen configuraciones en forma de hojas β -antiparalelas como consecuencia de la presencia de enlaces disulfuro. Debido a la ciclación de la cadena peptídica o la presencia de un solo enlace disulfuro pueden adquirir una configuración en bucle β , o puede ser una cadena extendida (Figura 3).

(d) Anfipáticos, lo que les permite asociarse a la bicapa lipídica.

Algunos AMPs pueden ser expresados constitutivamente, mientras que otros pueden ser inducidos después de una infección causada por agentes infecciosos externos. Al ser péptidos catiónicos destacan por tener una función antibacteriana marcada que se ve reforzada por una fuerte adhesión celular, favorecida por las interacciones hidrófobas (Mukhopadhyay et al., 2020).

Como la actividad de los AMPs depende de la estructura y la secuencia, es importante tener en cuenta estas dos propiedades al categorizarlos.

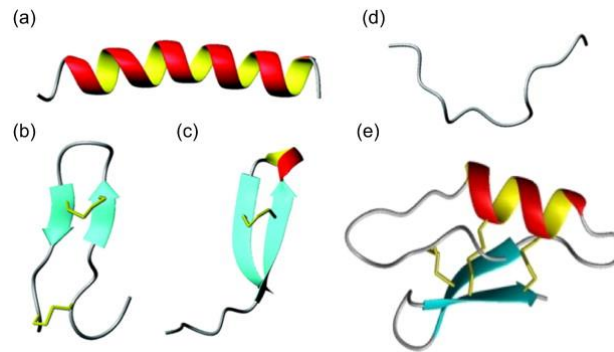


Figura 3. Estructuras secundarias comunes de péptidos antimicrobianos: (a) α -hélice, (b) β -hoja, (c) en bucle, (d) extendidas y (e) estructuras secundarias mixtas.

Además de la muerte directa de patógenos, se ha demostrado que muchos AMPs poseen otras actividades como neutralización de endotoxinas, reclutamiento de células inmunes, modulación de la producción de citocinas, supresión de inflamación potencialmente dañina, inducción de la diferenciación celular y mejora de las respuestas inmunitarias adaptativas, supervivencia, cicatrización de heridas y angiogénesis.

4.1.1.- Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de los AMPs es variado y ha sido extensamente estudiado. El objetivo principal es la membrana citoplasmática, ejerciendo una acción membranolítica; sin embargo los AMPs también pueden presentar una acción no membranolítica, al unirse a moléculas intracelulares, interfiriendo en la síntesis y plegamiento de proteínas; en el ADN o en la síntesis de la pared celular.

Actualmente se sabe que existe inicialmente una interacción electrostática entre el AMP catiónico a pH fisiológico y la membrana bacteriana aniónica, la cual no está mediada por el reconocimiento de un receptor. Tras su unión a la superficie de las membranas bacterianas, los péptidos deben alcanzar una concentración umbral mínima en la superficie bacteriana. Los parámetros que influyen en la concentración umbral incluyen la propensión al ensamblaje del péptido, la carga del péptido, la anfipaticidad y la hidrofobicidad, además de la diferencia en el potencial de

transmembrana y la presencia de colesterol en la membrana diana, que alteran la fluidez y composición de la membrana bacteriana. Después de que se haya producido la unión inicial a la membrana del AMP y se haya alcanzado la concentración umbral, se produce una inserción acompañada de un cambio conformacional (Figura 4), en el que se reordena la conformación del péptido en la interfaz lípido-agua, lo que conduce a la permeabilidad de la membrana, permitiendo una fuga citoplasmática que finalmente conduce a la muerte. Este proceso puede determinarse en presencia de bicapas lipídicas mediante cristalografía de rayos X, espectroscopia de RMN en solución, así como con espectroscopias ópticas FTIR, Raman, de fluorescencia y CD. A diferencia de los antibióticos convencionales, los AMPs parecen ser bactericidas en lugar de bacteriostáticos, aunque en muchos casos, se desconoce el mecanismo exacto de la muerte.

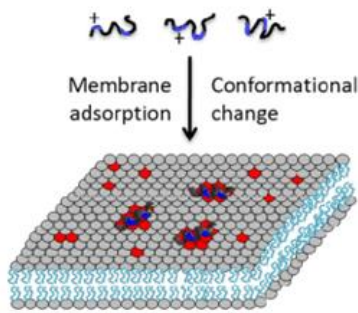


Figura 4.- Adsorción y cambio conformacional del AMP al contacto con la membrana, tras alcanzar una concentración umbral.

Dependiendo tanto del tipo de AMP, como de la concentración de péptidos, se han observado varios mecanismos de acción membranolíticos.

- i. *Modelo de transmembrana poroso*: se produce una despolarización de la membrana debido a la formación de poros provocando así la muerte celular (Rady et al., 2017). Se clasifica a su vez en:
 - a. Duela de barril: Los AMPs quedan orientados en paralelo a la membrana lo que permite que se establezcan interacciones péptido-péptido, formando un poro con un aspecto similar a un barril compuesto por péptidos helicoidales como duelas. Cuantos más monómeros se inserten, mayor será el tamaño de los poros, iniciándose el poro con al menos cuatro monómeros (Figura 5).

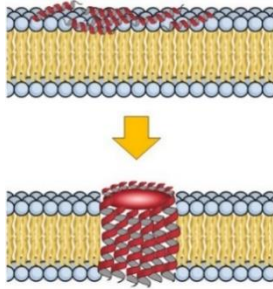


Figura 5.- Mecanismo de duela de barril

- b. Poros Toroidales: Los AMPs también se insertan perpendicularmente a la membrana pero en esta ocasión provocan una curvatura continua en la membrana a través del poro de modo que la luz central del poro esté revestida tanto por los péptidos insertados como por los lípidos de membrana intercalados. En este caso la interacción es entre el péptido y las cabezas de los fosfolípidos de la membrana (Matsuzaki et al., 1998) (Figura 6). Un ejemplo de este modelo es la melitina (Wimley et al., 2010).

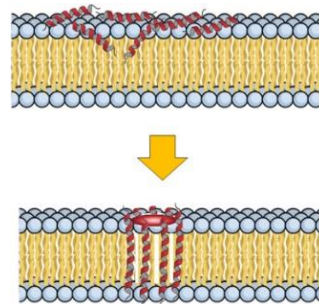


Figura 6.- Mecanismo poro Toroidal.

ii. Sin formar poros

Modelo de alfombra: Los AMPs se alinean de forma paralela a la superficie de las células, creando así una apariencia similar a una alfombra. Después de alcanzar la concentración umbral, la membrana comenzará a desestabilizarse y colapsar debido a la tensión de curvatura y la presión osmótica interna, lo que finalmente conducirá a la lisis celular (Figura 7) (Bechinger et al., 2006).

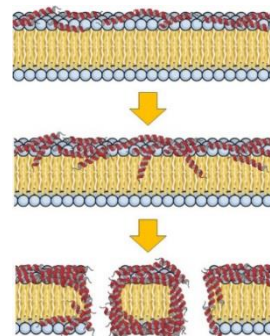


Figura 7.- Mecanismo de alfombra

Una vez que se definió los principales mecanismos de acción de los AMPs, los científicos intentaron hacer una clasificación que fuera única para poder agruparlos y para facilitar su estudio.

4.1.2.- Clasificación

La realización de una clasificación única de los AMPs por parte de los científicos ha planteado bastantes problemas. Hasta la fecha, se han descubierto más de 3283 AMPs naturales de muchas especies diferentes. También se han creado cientos de AMPs sintéticos, a menudo imitando secuencias naturales o mediante diseño asistido por ordenador (Wang y Wang, 2004). Sin embargo, aunque muchos AMPs han podido ser caracterizados y descritos con éxito, otros muchos no han sido definidos completamente. Este hecho, unido a la gran variedad que poseen, ha desembocado en que los autores no hayan podido encontrar un criterio único para su clasificación y establezcan por tanto distintos criterios de clasificación para su estudio como: (a) procedencia; (b) actividad; (c) estructura; (d) secuencia en aminoácidos (Figura 8).

Uno de los criterios más utilizados en la clasificación que permite la unificación es según su fuente biológica ya que de todos ellos, normalmente, si se conocerá el origen. Actualmente las bases de datos, como DRAMP, que son empleadas como herramienta en investigación y en educación, categorizan los AMPs en base a la fuente biológica.

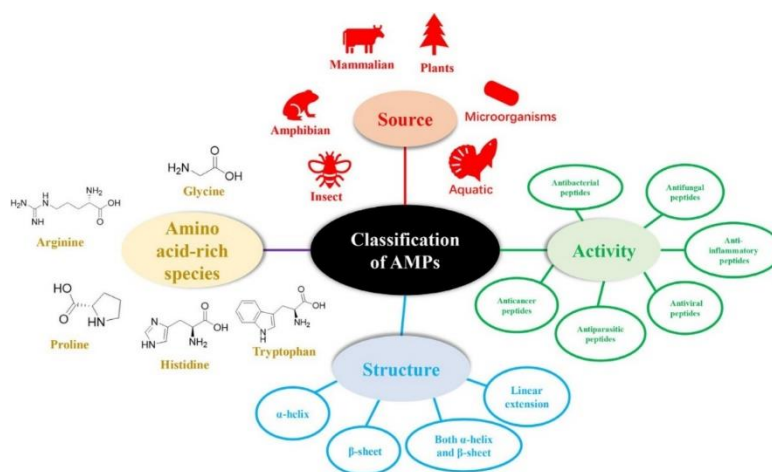


Figura 8. Esquema de la clasificación de los péptidos antimicrobianos

Los AMPs se encuentran en el reino vegetal y animal, formando parte importante en la respuesta de defensa innata del organismo. En base a su fuente biológica, podemos hablar de péptidos antimicrobianos de mamíferos, de anfibios, de insectos, o de microorganismos.

- i. Péptidos antimicrobianos de mamíferos: se encuentran distribuidos en distintos lugares dentro del organismo como pueden ser en las secreciones de la piel o mucosas, o en células como neutrófilos. Tienen diferentes funciones como ayudar en la cicatrización de heridas, (Lei et al., 2019) participar en la respuesta inmune etc. En cuanto a su actividad antibacteriana destacan dos familias: las catelicidinas, las cuales se encuentran todavía en fase de investigación (Kościuczuk et al., 2012) y las defensinas que han sido más estudiadas. Son producidas por células epiteliales, neutrófilos circulantes y macrófagos tisulares que son importantes para protegerse contra la invasión patógena. Estructuralmente son ricas en el aminoácido cisteína. También modulan la iniciación y activación de la respuesta inflamatoria y la posterior reparación de los tejidos dañados (Reddy et al., 2004).
- ii. Péptidos antimicrobianos de plantas: juegan una función importante y fundamental en la inmunidad innata de las plantas, siendo parte de las barreras de defensa tanto permanentes como inducibles. De acuerdo con su función defensiva, se han localizado en sitios de plantas que están expuestos a patógenos invasores, como hojas, flores, semillas y tubérculos. Se han identificado ocho familias diferentes de AMPs en plantas, y todas comparten una estructura globular de hoja β estabilizada por poseer de 2 a 6 puentes disulfuro. Entre ellos, las dos familias principales y más estudiadas son las tioninas y las defensinas.
- iii. Péptidos antimicrobianos derivados de anfibios: se encuentran sobre todo en las secreciones de la piel de los mismos siendo la rana la principal fuente para su obtención. Destaca la familia magainina como principal AMPs antibacterianos. (Rollins-Smith, 2009). Son péptidos lineales anfipáticos helicoidales, que presentan un espectro de acción muy extenso como antimicrobiano frente a bacterias, parásitos y hongos, además de influir en la activación de mecanismos que disminuyen la inflamación.

- iv. Péptidos antimicrobianos derivados de microorganismos: no defienden contra la infección por otras especies de bacterias; su objetivo es matar a otras especies de bacterias como fuente de nutrientes o para disminuir la competencia por los nutrientes. Destacan la nisina, antibiótico peptídico policíclico usado como bioconservante y sintetizado a partir del microorganismo *Lactococcus Lactis* y la gramicidina obtenida de la bacteria *Bacillus brevis* ambos con actividad antibacteriana (Caovil et al., 2018).
- v. Péptidos antimicrobianos derivados de insectos: los AMPs procedente de los insectos, han sido muy importantes ya que se piensa que uno de los motivos por los que se han podido adaptar al medio y sobrevivir exitosamente a lo largo del tiempo, es gracia a su capacidad de producir péptidos como primera línea de defensa contra la infección microbiana y flexible, capaz de adaptarse a cambios en el nicho ecológico (De La Fuente-Núñez et al., 2016). Se encuentran repartidos en diferentes zonas de los insectos tanto en las células de almacenamiento, como en las células sanguíneas o incluso pueden ser excretados en el veneno que producen.

Aunque los venenos de los insectos son tóxicos para los seres humanos, la elucidación de su composición y mecanismos de acción ha puesto al descubierto que estos compuestos antimicrobianos son eficaces contra una amplia gama de bacterias, presentando una CMI, en la mayoría de los péptidos de insectos, bastante potente (0,02 a 20 µg /ml) (Sojka et al., 2016).

El veneno de las abejas, y especialmente las de las abejas obreras, *Apis mellifera L.*, es un líquido amargo e incoloro formado por una mezcla compleja de enzimas, polipéptidos de bajo peso molecular, azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, feromonas y aminos biogénicas; y es en donde se descubrió el AMP natural melitina, como componente principal y que presentaba propiedades biológicas positivas y una toxicidad relativamente baja. Debido a su versatilidad para adoptar diferentes estructuras secundarias (hélice o espiral) y cuaternarias (monómero o tetrámero) en varios entornos, la melitina ha sido el foco de numerosas investigaciones como péptido modelo en estudios de plegamiento de proteínas, así como en estudios que involucran la unión a proteínas, lípidos y polisacáridos.

4.2.-Melitina

4.2.1.- Concepto y estructura

Como se ha indicado anteriormente, la melitina es un péptido natural y es el principal componente tóxico del veneno de las abejas del género *Apis*, con propiedades antimicrobianas, antivirales, antifúngicas, anticancerígenas y antiinflamatorias.

La melitina es sintetizada en las glándulas de veneno a partir de una preproteína, un precursor inactivo llamado prepromelitina que consta de 70 aminoácidos. Esta preproteína, en su extremo N-terminal, cuenta con una secuencia señal la cual tiene como función dirigir a la proteína hacia el retículo endoplásmico. Una vez allí se produce la escisión del péptido señal, mediante una endoproteasa, quedando libre la llamada proproteína o promelitina, donde se observa ahora en su extremo N-terminal, aminoácidos aniónicos (aspártico y glutámico) e intercalados entre ellos aminoácidos de prolina y alanina por lo que en definitiva cada segundo aminoácido será prolina o alanina (Figura 9). Posteriormente, la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) detecta estas secuencias repetidas de aminoácidos y las rompe de manera secuencial dejando a la proteína con 26 aminoácidos. El último paso en este proceso sintético, es que el dipéptido glutamina-glicina del extremo C-terminal pase de un enlace amina a un enlace amida, mediante una transamidación, para dar como resultado a la melitina (Kreil et al., 1980).

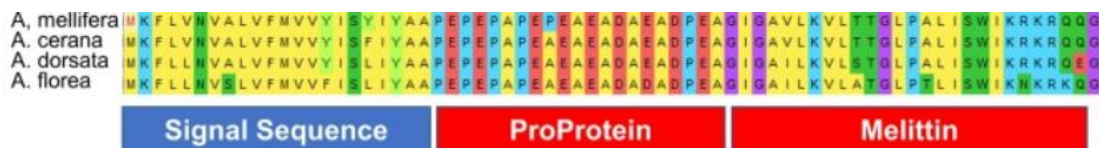


Figura 9. Representación de las secuencias de distintas melitinas.

Estructuralmente, la melitina es un péptido citolítico, catiónico, formado por 26 residuos de aminoácidos, GIGAVLKVLTGTPALISWIKRKRQ-NH₂ (Tosteson y Tosteson, 1981)(Figura 10) de cadena lineal, con una carga neta de +6 en condiciones de pH fisiológico, debido a la presencia de residuos de lisina y arginina y fórmula molecular C₁₃₁H₂₂₉N₃₉O₃₁.

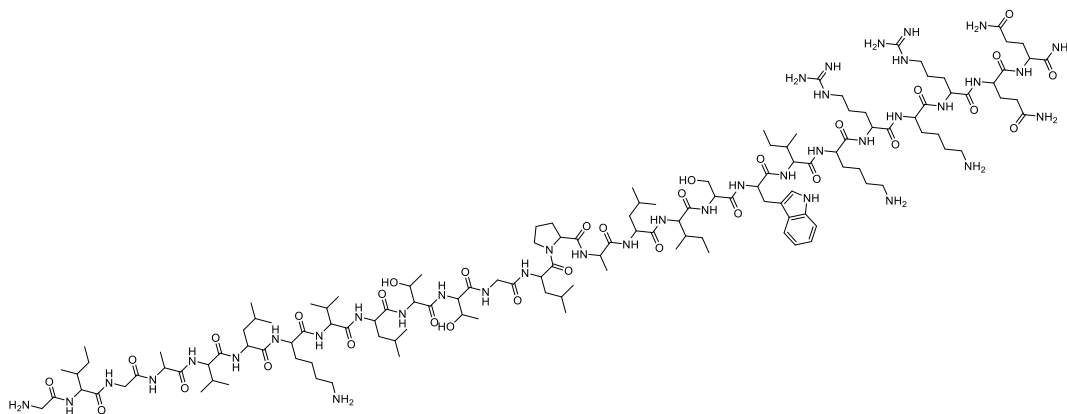


Figura 10. Estructura química de la melitina

Esta secuencia específica permite a la melitina tener una estructura tridimensional única. Está formada por una región N-terminal hidrófoba (residuos del 1-20 de la melitina), con +2 cargas positivas y una región C-terminal hidrofílica (residuos del 21-26), con +4 cargas positivas a pH fisiológico (Figura 11).



Figura 11. Representación de la secuencia de aminoácidos de la melitina.

Después de unirse a una membrana lipídica, la estructura secundaria de la melitina presenta una conformación en forma de varilla doblada con dos partes α -helicoidales conectadas por una región de torsión no α -helicoidal (Figura 12).

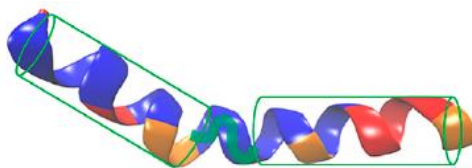


Figura 12. Anfipaticidad bidimensional de la α -hélice de melitina: azul residuos hidrófobos, naranja para los hidrófilos y rojo para los cargados

Los residuos de los aminoácidos polares y apolares se distribuyen simétricamente en los dos lados de cada hélice, lo que lleva a la formación de una configuración molecular anfifílica, según se ha determinado por simulaciones de dinámica molecular (Klocek et al., 2009) (Figura 13). Esta conformación le confiere la capacidad de ser soluble en agua y a la vez, de asociarse espontáneamente con membranas naturales y artificiales.

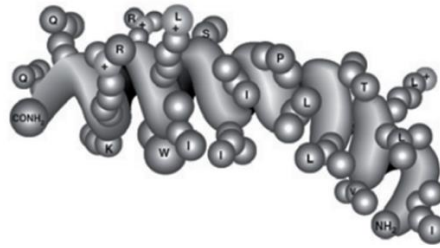


Figura 13. Predicción del perfil de hidrofobicidad de la estructura de melitina con recurrencia de residuos apolares, basada en vueltas helicoidales.

Tras la unión a la bicapa lipídica de la membrana celular, se produce la inserción transmembranal de forma espontáneamente, actuando molecularmente sobre las subestructuras celulares, llevando a la formación de poros.

Con respecto a la estructura cristalina de la melitina, ésta se determinó hace varias décadas, al igual que su estructura en solución mediante RMN (Ramirez et al., 2019). En medio acuoso, forma tetrámeros no líticos, aunque para su formación requiere de altas concentraciones y varía según el pH, la fuerza iónica y la temperatura (Figura 14).

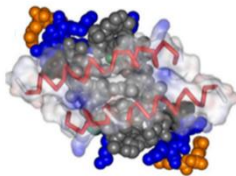


Figura 14. Representación de la melitina cuando se encuentra en solución formando tetrámeros.

Se ha demostrado que su estructura secundaria cristalina consta de dos segmentos α -helicoidales, una α -hélice contiene los residuos 1-10 y la otra α -hélice, más larga, está formada por los residuos 13-26. Estas dos hélices α están unidas por una región de "bisagra" entre los residuos 11 y 12 para constituir una varilla doblada (Rex, 2000) llegando a la conclusión que realmente su estructura era una hélice-giro-hélice (Figura 15) (Lam et al., 2001).

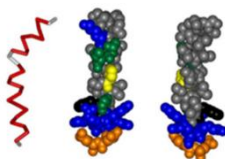


Figura 15. Simulación hélice-giro-hélice de la melitina.

Cabe destacar que la melitina sufre isomerización *cis-trans* de Pro14 (Figura 16) en condiciones fisiológicas, encontrándose la mayoría de las moléculas de melitina en la configuración *trans*. Cuando este enlace se encuentra en la conformación *cis*, se altera la estructura de la α -hélice C-terminal, impidiendo la formación del tetrámero en solución (Miura, 2012).



Figura 16. Esquema de las estructuras secundarias adoptadas por melitina.

Se ha demostrado que la melitina existe como monómero a las concentraciones mínimas necesarias para la lisis celular. Es decir, cuando se libera el veneno, se produce la disociación del tetrámero dando lugar al monómero. Actualmente se sabe que, la melitina se adhiere a la superficie de la membrana como monómeros, pero actúa sobre la membrana de forma colectiva para producir poros (Lee et al., 2013).

Debido a su versatilidad para adoptar una variedad de estructuras secundarias (hélice o espiral) y cuaternarias (monómero o tetrámero) en varios entornos, la melitina ha sido el foco de numerosas investigaciones como péptido modelo en estudios de plegamiento de proteínas, así como en estudios que involucran la unión a proteínas, lípidos y polisacáridos.

4.2.2 Mecanismo de acción de la melitina

A raíz de los diferentes estudios conformacionales que se realizaron en la melitina, se puso de manifiesto la importancia de poseer un carácter anfipático, que es lo que le permite formar en el espacio una estructura de hélice compleja. Esta conformación helicoidal provoca que la interacción entre el péptido natural y la membrana de la bacteria, se vea favorecida y tras varios estudios utilizando diferentes técnicas, se consiguió demostrar que la melitina actuaba por medio del modelo toroidal (Wimley et al., 2010). Además, los estudios revelaron que el péptido inducía poros estables en el rango de concentración micromolar, y como la formación del poro

dependía de la proporción de melitina insertada en la membrana lipídica lo que determinaría el tipo de orientación que adquiere. Si la relación péptido/lípido es baja (~ 1% en moles) se provocaría una orientación paralela de los segmentos helicoidales a la bicapa, mientras que en una relación alta (> 4% en moles) la melitina se reorientaría a la orientación de transmembrana. Como resultado, cuando los péptidos se alinean paralelos a la membrana, están inactivos, mientras que si se insertan directamente son activos y conducen a la formación de poros.

Además se realizaron otros estudios, algunos de ellos fueron llevados a cabo por el grupo de Jamasbi, (Jamasbi et al., 2014) los cuales señalaron que el residuo de prolina en posición 14, jugaba un papel central en la actividad antimicrobiana y citotóxica de la melitina. Para demostrarlo, crearon péptidos análogos a los que se les habían sustituido el residuo de prolina por lisina, cisteína y alanina, los cuales dieron como resultado una inactividad.

Como se comentó anteriormente, la inserción en la membrana por parte de la melitina es el paso clave para la formación de poros y por tanto para que se produzca su efecto antibacteriano. Sin embargo también es el paso más complejo de estudiar. Para ello se recurrió a distintas simulaciones realizadas por ordenador lo que han permitido explorar en profundidad los detalles moleculares de este proceso y revelar el mecanismo subyacente del mismo. Los resultados obtenidos de las simulaciones indican una transición por parte de la melitina de un estado de unión a la membrana a un estado de inserción de transmembrana, provocando la agregación de los péptidos de las membranas, y su interrelación con ellos. Así pues, el péptido al insertarse de manera perpendicular provoca que la membrana bacteriana se curve, desencadenando al final, la rotura de la membrana citoplasmática (Figura 17).

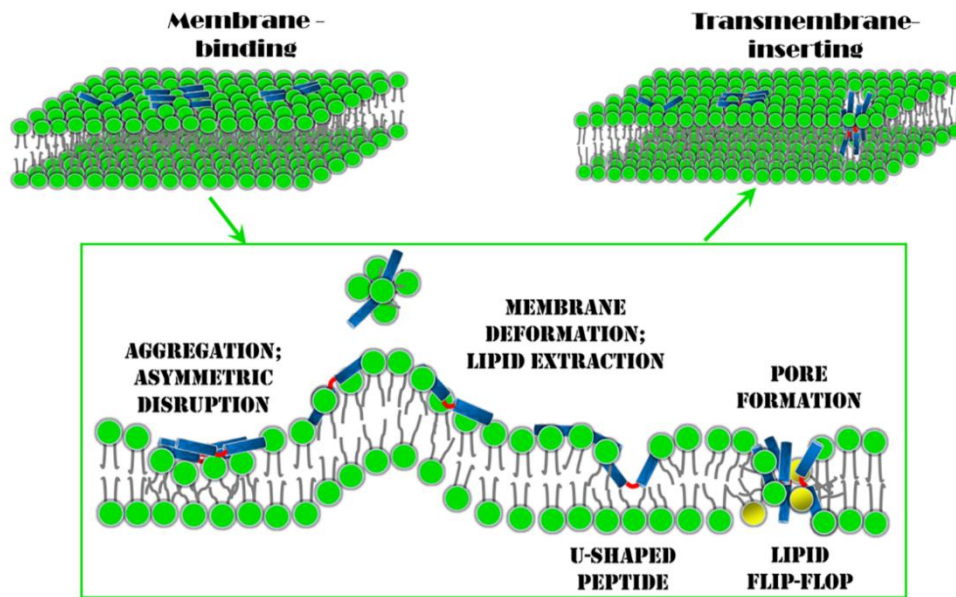


Figura 17. Vía hipotética del mecanismo de formación de poros de melitina.

Sin embargo cuando el grupo de Lee realizaron los estudios con *C.albicans*, (Lee y Lee, 2014) puso de manifiesto que la melitina podría presentar un mecanismo antimicrobiano dual, que incluye acciones apoptóticas y disruptivas de la membrana.

Recientemente, se ha llevado a cabo estudios que apoyan la idea de este posible mecanismo de acción dual. Esta rotura del citoplasma parece ser que favorece la entrada de la melitina al interior de la célula, lo que provoca que no sólo ejerza su acción bacteriana por la rotura de la membrana sino, que también se pueda unir a diferentes moléculas intracelulares, como lo puso de manifiesto el estudio llevado a cabo con la bacteria *E.coli*, al inhibir a la enzima F1F0-ATPasa, unida a la membrana, provocando la muerte de la misma (Nehme et al., 2020).

Todos estos estudios, reiteran la hipótesis de que la melitina no ejerce su acción a través de un solo mecanismo, sino que es un conjunto de ellos lo que hace que se manifieste esta acción antibacteriana, por lo que a partir de estos descubrimiento, se estudiaron los efectos antibacterianos que podría tener la melitina ante distintas cepas bacterias y también su posible efecto sinérgico al combinarlo con algunos antibióticos.

4.2.3.-Aplicaciones de la melitina como antibacteriano

La melitina es un AMP de amplio espectro que ha demostrado su capacidad para proteger *in vivo* contra infecciones por MRSA (Choi et al., 2015). Las actividades antimicrobacterianas *in vitro* fueron demostradas por primera vez en la década de los años 70 (Dorman y Markley, 1971). Estudios posteriores, han confirmado que la melitina tiene actividades antibacterianas significativas frente a cepas de bacterias de referencia y clínicas. Sin embargo, ha habido grandes discrepancias entre los valores de CMI notificados que podrían explicarse en base a las diferencias en la pureza de melitina, las cepas bacterianas y metodologías empleadas.

Se ha visto que tiene efectos positivos sobre bacterias Gram-positivas como puede ser la familia *Mycobacterium*, destacando las cepas *M. avium* y *M.tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis. Los estudios revelaron una gran efectividad frente a *M.tuberculosis*, probablemente debido a las diferencias en la composición de la membrana celular micobacteriana, la cual presenta una arquitectura distinta con una envoltura rica en lípidos. Se planteó que la acción antibacteriana de la melitina se podría deber al hecho de que al ser una molécula anfipática y catiónica, facilitaría su interacción con los ácidos micólicos de las paredes celulares de estas bacterias (Portell-Buj et al., 2019).

Destaca también su actividad frente a bacterias Gram-negativas como, *Chlamydia trachomatis* asociando su mecanismo también a una disminución del potencial químico de transmembrana (Lazarev et al., 2002) alterando la adhesión de las clamidias a la célula; e incluso *Borrelia burgdoferi*, agente etiológico de la enfermedad de Lyme, enfermedad importante ya que es capaz de evadir la respuesta inmune adaptativa del hospedador y formar biofilms, por lo que adquiere alta resistencia a los antibióticos convencionales (Socarras et al., 2017). Estos estudios pusieron de manifiesto que la melitina al formar el poro cuando se une a la membrana celular de *B. burgdoferi*, permite la liberación de iones Ca^{2+} , iones empleado por la bacteria para el desarrollo de la capa exterior protectora en las biopelículas maduras, así como actuar en la síntesis de proteínas y su plegamiento.

Además de estas aplicaciones clínicas, la melitina también se puede usar contra *Xanthomonas oryzae*, bacteria responsable de la enfermedad tizón la cual afecta a la

planta del arroz y disminuyendo su producción. Los estudios realizados por el grupo de Shi, mostraron que la melitina no solo es capaz de permeabilizar las membranas bacterianas y llegar al citoplasma, sino que también inhiben la biosíntesis del ADN/ARN, conduciendo a la muerte celular bacteriana (Figura 18) (Shi et al., 2016).

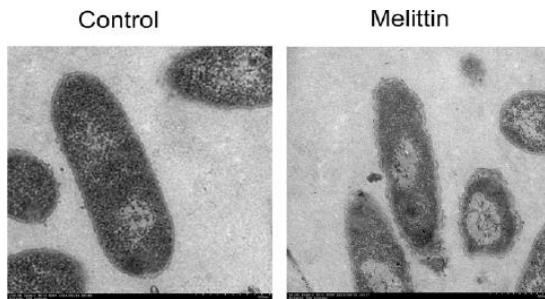


Figura 18. Imagen de microscopía electrónica de *X. oryzae* tratado con melitina.

También es activa contra bacterias del género *Mollicutes* cuya característica principal es que no tienen pared celular (Béven et al., 1997). En esta ocasión la actividad bactericida estaba directamente relacionada con la capacidad de la melitina de anular el potencial electroquímico de transmembrana.

Sin embargo a pesar de los prometedores resultados de los AMPs para combatir infecciones superficiales o sistémicas, ninguno de los estudios ha resultado ser una solución definitiva para las infecciones asociadas a biopelículas. Para ello, se ha recurrido a un nuevo enfoque racional, a la sinergia entre los AMPs y los antibióticos convencionales. Recientemente, se ha analizado los posibles efectos sinérgicos de la melitina con antibióticos convencionales en tratamientos contra bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR). La melitina tiene como características el ser muy potente, puede penetrar en la membrana bacteriana gracias a su conformación α -helicoidal y facilitar la entrada de los antibióticos. A su vez, la melitina, debido a su posible mecanismo dual, puede inhibir la expresión de genes asociados a la biopelícula después de la entrada a la bacteria, destruyendo a las bacterias e inhibiendo la formación de biopelículas (Akbari et al., 2019).

a) *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii es un cocobacilo Gram-negativo patógenos el cual tiene un tratamiento cada vez más difícil ya que posee resistencia a los antibióticos y también es capaz de formar biopelículas (Dosler et al., 2016). Una biopelícula se define como una comunidad microbiana adherida a una superficie y que se encuentra embebida en

una matriz de exopolisacáridos. Los microorganismos que crecen en estas biopelículas son más resistentes tanto a los mecanismos de defensa del huésped como a los antibióticos por lo que suponen cada vez un problema mayor (Figura 19) (Hausler y Fuqua, 2013).

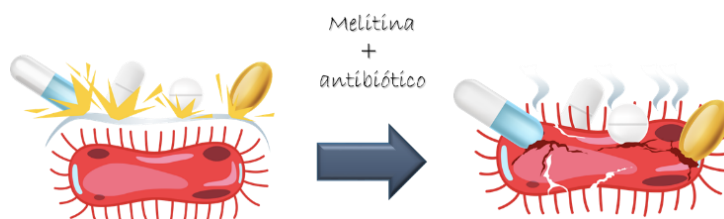


Figura 19. Esquema de acción contra bacterias MDR

Un estudio llevado a cabo por Bardbari tuvo como objetivo evaluar las actividades sinérgicas antibacterianas de inhibición y eliminación de biofilm de la melitina en combinación con colistina, imipenem y ciprofloxacina frente a aislados de *A. baumannii*. Concluyeron que la melitina posee un potencial considerable para su uso terapéutico en combinación con colistina e imipenem para tratar infecciones causadas por aislamientos de *A. baumannii*. El análisis de los resultados mediante espectroscopía electrónica demostró que el sinergismo de melitina-colistina a 0,125-0,25 μg , inhibe por completo la formación de biopelículas (Figura 20) (Bardbari et al., 2018). Con respecto al mecanismo de este sinergismo eficaz, sigue siendo poco conocido. Se ha postulado que la melitina puede unirse al gen resistente, en este caso la carbapenemasa, y conducir a la inhibición de la actividad de esta enzima. Este informe proporciona una evidencia notable de que la melitina regula a la baja la expresión del gen *bap* en su dosis mínima. Esto podría conducir a la disminución de la acumulación de matriz extracelular en la periferia de las bacterias, de modo que los antibióticos deseados puedan alcanzar la membrana y entrar en el citoplasma de estas bacterias productoras de biopelículas débiles. Este estudio, puso de manifiesto que la formación de biopelículas es un rasgo común de muchos aislados clínicos de *A. baumannii*, así como que se puede reducir la dosis efectivas, tanto de melitina como del antibiótico sinérgico, a dosis no tóxicas. Los resultados obtenidos permiten a su vez, recuperar el interés en el uso de antibióticos obsoletos.

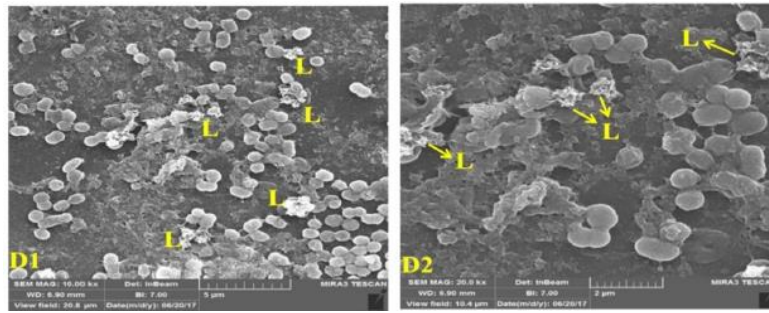


Figura 20. Imagen microscopía electrónica del efecto de combinación: Melitina – colistina a 0,125–0,25 μ g. L: lisis

La melitina no sólo tiene efectos sinérgicos en el tratamiento de bacterias Gram-negativas sino que también se han descrito estos efectos en bacterias Gram-positivas.

b) *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria Gram-positiva causante de múltiples infecciones. En la actualidad las cepas de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) son muy numerosas, lo que suponen un grave problema de salud (Bernier-Lachance et al., 2020). Aunque ya existen estudios que avalan la efectividad de la melitina contra bacterias de *S. aureus* MRSA (Lima et al., 2021) se ha tratado de investigar acerca de su sinergismo con otros antibióticos para conseguir tener un mayor arsenal para combatirla.

En un estudio realizado por el grupo de Mahmoudi, analizaron el sinergismo de la melitina en combinación con el antibiótico clindamicina en cepas MRSA y *S. aureus* sensible a la meticilina (MSSA) (Mahmoudi et al., 2020). Concluyeron que la melitina posee un potencial considerable para ser utilizada sola o en combinación con clindamicina para tratar infecciones causadas por aislados de MRSA y MSSA; siendo la combinación de ambos antibacterianos, la mejor opción ya que la dosis requerida, tanto de melitina como del antibiótico sinérgico, puede ser reducida a su dosis no tóxica (Figura 21).

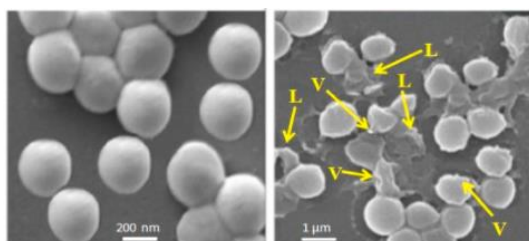


Figura 21. Imagen microscopía electrónica del efecto de la melitina sobre *S. aureus*. V: Vesícula, L: Lisis

Este estudio también puso de manifiesto, que la inhibición del crecimiento de dichas cepas por parte de la melitina, se produce a través de un doble mecanismo. Por un lado abriendo los poros en la membrana y por otro reduciendo la expresión de *eta* y *etb*, los genes de codificación de las toxina exfoliativa A y B.

Se sugiere por tanto que el sinergismo que hay entre la melitina y otros antibióticos afecta tanto a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y que los motivos que podrían desencadenar este sinergismo sería el debido a que la melitina es capaz de penetrar en la célula bacteriana destruyendo la membrana a través de la formación de poros y por consiguiente podría ayudar a la penetración del agente antibacteriano en la célula para poder ejercer su acción, ya sea inhibiendo la síntesis de proteínas o la síntesis de la pared celular y que gracias a este sinergismo se podrían reducir las dosis de ambos compuestos evitando así posibles efectos tóxicos (Li et al., 2020).

Aunque se comprobó los buenos resultados que ofrecía la melitina frente a las distintas cepas bacterianas, como *Escherichia coli* (Nehme et al., 2020) al ser un AMP natural, presenta algunos inconvenientes. Los AMPs presentan propiedades indeseables que incluyen, actividad hemolítica, sensibilidad a la proteasa, sal y suero, y altos costos de producción, lo que impide su desarrollo como agentes terapéuticos. De esta manera surgieron los péptidos antimicrobianos sintéticos (SAMP).

El diseño racional de los SAMP se basa en la relación estructura-actividad de estas moléculas, ya que cada aminoácido se puede agregar secuencialmente al AMP, siendo posibles modificaciones puntuales, análisis y optimización de las moléculas. Una de las principales estrategias aplicadas es utilizar como plantilla la secuencia de AMP de origen natural y producir congéneres, fragmentos o híbridos de distintos tipos. Otra vía es el uso de bibliotecas de AMPs, empleando el cribado y la combinación de nuevas secuencias de AMP. Las tecnologías *in silico* permiten sustituir aminoácidos específicos e introducir residuos hidrófobos y catiónicos para una mayor actividad antimicrobiana; o D-aminoácidos, acetilación, ciclación y peptidomiméticos para mejorar la estabilidad *in vivo*. Los SAMP, generalmente, se consideran más eficientes que los AMPs al ejercer una actividad antimicrobiana a concentraciones más bajas, además de un mayor espectro de acción.

La melitina muestra toxicidad a concentraciones altas, como se ha podido comprobar en diferentes ensayos, provocando ataxia e hipoxia en ratones (Saeed y Khalil, 2017). Esto puede ser debido a su falta de selectividad por las membranas celulares bacterianas. Por otro lado, la actividad hemolítica de la melitina ha limitado su aplicación clínica, lo que ha llevado a los investigadores a estudiar las causas de dicha hemólisis para convertirlo en una terapia novedosa (Wu et al., 2016). Esta toxicidad de la melitina junto con el hecho de presentar un alto coste a la hora de aislarla en el laboratorio, planteó la búsqueda de nuevas estrategias para optimizar sus propiedades antimicrobianas y disminuir su citotoxicidad.

Una estrategia de mejora de melitina que se ha utilizado con éxito es la hibridación, es decir la combinación de dos o más dominios funcionales de péptidos naturales, optimizando las características individuales. Entre ellos, los híbridos cecropina A-melitina (CAM) han sido los más estudiados en el área de la biomedicina.

4.3.- CAM; Cecropina A - Melitina

Las cecropinas se aislaron por primera vez de la hemolinfa de la polilla gigante de la seda *Hyalophora cecropia* (Steiner 1981). Representan una familia de AMPs, de 31 a 39 aminoácidos de longitud, que contienen un dominio de α -hélice anfipático. Muestran una poderosa actividad antibacteriana principalmente contra todas las bacterias Gram-negativas y algunas bacterias Gram-positivas, no tienen efectos citotóxicos contra los eritrocitos humanos y otras células eucariotas, pero no son estables, debido a la degradación de la proteasa. Por otro lado, la melitina, muestra una potente actividad antimicrobiana de amplio espectro, sin embargo es hemolítica. En un esfuerzo por mejorar las propiedades biológicas de las cecropinas y la melitina, se diseñaron y sintetizaron varios péptidos híbridos cortos α -helicoidal de cecropina-melitina.

Sintetizados por primera vez por el grupo de Merrifield en 1989, (Boman et al., 1989), los péptidos híbridos de cecropina A-melitina (CA-M) están formados por la región N-terminal catiónica de cecropina A y las regiones N-terminal hidrófobas y no hemolíticas de melitina, originando un péptido α -helicoidal. Estos híbridos tienen

mejores propiedades antimicrobianas frente a Gram-positivas que los compuestos parentales, ya que la cecropina A es inactiva y menos susceptible a la degradación de las proteasas, junto con una disminución significativa de las propiedades hemolíticas de la melitina.

Estudios realizados con CAM han puesto de manifiesto cómo en el híbrido, la posición 2 en la porción correspondiente a la melitina está ocupada por una isoleucina, aminoácido muy hidrófobo, el cual es importante para su actividad. Se ha comprobado que su supresión reduce su actividad; sin embargo se estudió la sustitución de este aminoácido por otros aminoácidos hidrófobos como leucina o alanina, lo que dio como resultado que mantuvo su actividad (Juvvadi et al., 1996).

Con respecto al mecanismo de acción de estos híbridos, está basado, como sus péptidos de origen, en la formación de poros. Se pensó que los CAM al ser péptidos con una alta carga catiónica y muy hidrófobos, serían tóxicos para el huésped, pero se demostró que no producía hemólisis en los eritrocitos como ocurría con la melitina. Entre ellos, el híbrido formado por CA (1-8) y M (1-12), ha sido el que demostró mejores propiedades antimicrobianas; debido posiblemente a una buena polaridad del péptido así como una flexibilidad apropiada.

Son varios los grupos de investigación que continuaron investigando y realizando modificaciones sobre este híbrido, para así conseguir un mejor péptido con mayor espectro de acción y menores efectos adversos. De esta manera surge el péptido CAMA, cecropina (1-7)-melitina A (2-9), en el cual se incorporó a su estructura inicial, un resto de alanina en su extremo C-terminal, pasando de los 15 aminoácidos que poseía en su estructura inicial y una carga positiva total de +5, al péptido CAMA de 16 aminoácidos y una carga positiva total de +6 (Figura 22). Al añadir esta alanina se mejoró la estabilidad de su estructura secundaria de hélice y se aumentó la hidrofobicidad de la molécula.

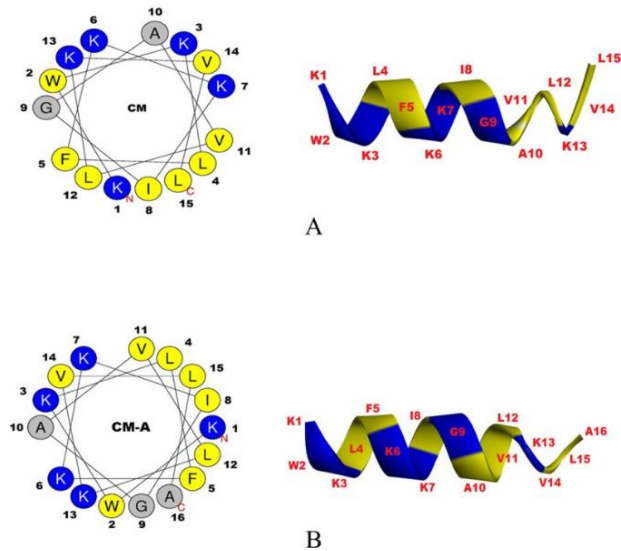


Figura 22. Diagrama helicoidal y estructura en hélice de CAM (A) y CAMA (B).

Este híbrido ha sido preparado recientemente por el equipo del profesor Aroonual (Arthithanyaroj et al., 2021) mediante síntesis en fase sólida. El objetivo era analizar su actividad frente a *Clostridium difficile*, la causa más común de diarrea nosocomial y diarrea asociada a los antibióticos (Lubbert et al., 2014). Los síntomas que produce esta enfermedad son desde diarreas leves hasta colitis pseudomembranosa e incluso puede causar la muerte (Sun et al., 2015). Las estancias en hospitales de manera prolongada puede ser un factor de riesgo por lo que se le ha considerado una enfermedad nosocomial (Bardbari et al., 2018). En el tratamiento de la *C. difficile*, en los episodios iniciales de pacientes adultos se emplea como antibiótico la vancomicina (Guh et al., 2018). Sin embargo, la recurrencia de la infección y el fracaso del tratamiento con antibióticos, han llevado a los investigadores a estudiar tratamientos alternativos.

Es por ello que se realizó un experimento mediante el cual se sometió a la bacteria *C. difficile* al tratamiento de diversas concentraciones de péptidos CAM y CAMA para evaluar los efectos inhibidores en comparación con los del antibiótico de referencia, la vancomicina, como control positivo. Los valores de MIC de los péptidos híbridos probados se muestran en la Tabla 2, donde representaron las MICs de CAM, CAMA y vancomicina.

Péptidos	MIC ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	MIC (μM)
CAM	3,906 \pm 0,001	2.21
CAMA	1,953 \pm 0,002	1.06
Vancomicina	0,488 \pm 0,001	0,34

Tabla 2. Valores de CMI al tratar las cepas de *C. difficile* con CAMA, CM-A y vancomicina

Estos resultados mostrados en la tabla ponen de manifiesto que CAMA es más eficaz ante la bacteria *C. difficile* que CAM ya que su MIC es casi la mitad. Sin embargo, los resultados también mostraron que ambos fueron menos efectivos en comparación con los resultados obtenidos de la vancomicina. Además se realizó ensayos de citotoxicidad, lo que indicó que el uso del péptido CAMA, en su concentración de MIC, no fue tóxico para la línea celular de adenocarcinoma de colon humano. Los estudios de citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión revelaron que, el objetivo de estos AMPs era la actuación sobre la membrana celular. La citometría que se realizó, determinó que el mecanismo de acción era mediante la despolarización de la membrana y su posterior lisis. Los resultados del TEM corroboraron la lisis que se producía sobre la membrana celular y también la salida del citoplasma, como muestra la Figura 23.

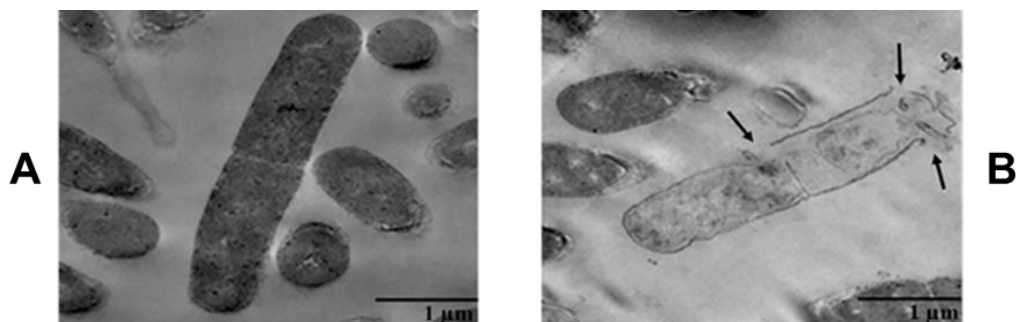


Figura 23. Estructura de membrana de *C. difficile* mediante TEM, (A) Sin tratamiento (B) Tratado con péptido CAMA.

5. – Conclusiones

- La búsqueda y el diseño de nuevos antibióticos es uno de los mayores imperativos en la medicina moderna para resolver los desafíos relacionados con el tema de las resistencias.
- Los péptidos antimicrobianos son una buena alternativa a los antibióticos convencionales en el tratamiento de enfermedades provocadas por bacterias multirresistentes.
- La melitina es muy potente contra un amplio espectro de bacterias, incluidas las bacterias resistentes a los fármacos y formadoras de biopelículas. Sin embargo, para ser eficaz se precisa una optimización adicional para crear análogos que no sean tóxicos, selectivos para las células y tejidos diana y que posean propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas útiles.
- La melitina no posee un único mecanismo de acción sino que es un conjunto de mecanismos lo que hace que tenga una buena capacidad antibacteriana junto con un amplio espectro de acción ya que actúa a través de la formación de poros en la membrana celular o interaccionando con proteínas intracelulares
- La melitina en combinación con antibióticos convencionales ha dado resultados positivos: es otra solución para minimizar la dosis de melitina que puede provocar citotoxicidad; así como la probabilidad de desarrollar bacterias mutantes resistentes a los antibióticos.
- El estudio de péptidos híbridos es una alternativa enfocada a modificar y optimizar los parámetros fisicoquímicos de los péptidos antimicrobianos, convirtiéndose en un potencial de futuros enfoques profilácticos y terapéuticos.

6.-BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham, E., Chain, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*, 146, 837 (1940).
2. Akbari, R., Hakemi-Vala, M., Pashaie, F., Bevalian, P., Hashemi, A. and Pooshang Bagheri, K. Highly Synergistic Effects of Melittin with Conventional Antibiotics Against Multidrug-Resistant Isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance*, 2019; 25 (2): 193-202.
3. Arthithanyaroj S, Chankhamhaengdecha S, Chaisri U, Aunpad R, Aroonnuan A. Effective inhibition of *Clostridioides difficile* by the novel peptide CM-A. *PLoS One*. 2021;16(9):e0257431.
4. Banawas S. *Clostridium difficile* Infections: A Global Overview of Drug Sensitivity and Resistance Mechanisms. *BioMed Research International*. 2018; 2018:1-9.
5. Bardbari A, Arabestani M, Karami M, Keramat F, Aghazadeh H, Alikhani M et al. Highly synergistic activity of melittin with imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm producer strains of *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2018; 37(3):443-454.
6. Bartlett J, Gilbert D, Spellberg B. Seven Ways to Preserve the Miracle of Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 2013; 56(10):1445-1450.
7. Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2006;1758(9):1529-1539.
8. Bernier-Lachance J, Arsenault J, Usongo V, Parent É, Labrie J, Jacques M et al. Prevalence and characteristics of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolated from chicken meat in the province of Quebec, Canada. *PLOS ONE*. 2020; 15(1):e0227183.
9. Béven, L., and H. Wroblewski. Effect of natural amphipathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes. *Res. Microbiol*. 1997; 148:163–175.

10. Boman, H. G.; Wade, D.; Boman, I. A.; Wahlin, B.; Merrifield, R. B. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids FEBS Lett. 1989, 259, 103– 106 DOI: 10.1016/0014-5793(89)81505-4.
11. Caovil J, de la Fuente-Nunez C, Ou R, Torres M, Pande S, Sinskey A et al. Yeast-Based Synthetic Biology Platform for Antimicrobial Peptide Production. ACS Synthetic Biology. 2018; 7(3):896-902.
12. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Surveillance Report for 2016–2017 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019 (in progress).
13. Choi JH, Jang AY, Lin S, Lim S, Kim D, Park K, et al. Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Mol Med Rep. 2015; 12(5):6483–90.
14. De la Fuente-Núñez C, Cardoso MH, de Souza Cândido E, Franco OL, Hancock RE, Synthetic antibiofilm peptides, Biochim Biophys Acta. 2016 May; 1858(5):1061-9.
15. Dorman LC, Markley LD. Solid phase synthesis and antibacterial activity of N-terminal sequences of melittin. J Med Chem. 1971; 14(1): 5-9.
16. Dosler S, Karaaslan E, Alev Gerceker A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. J Chemother. 2016; 28(2):95–103.
17. Guh AY, Kutty PK. *Clostridioides difficile* Infection. Ann Intern Med. 2018; 169(7): 49–64.
18. Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat Biotechnol. 2006; 24(2):1551–1557.
19. Haussler S., Fuqua C. Biofilms 2012: new discoveries and significant wrinkles in a dynamic field. J Bacteriol. 2013; 195(13):2947-2958.
20. Jamasbi, E.; Batinovic, S.; Sharples, R.A.; Sani, M.A.; Robins-Browne, R.M.; Wade, J.D.; Separovic, F.; Hossain, M.A. Melittin peptides exhibit different activity on different cells and model membranes. Amino Acids. 2014, 46(12), 2759-66.

21. Jiang Y, Chen Y, Song Z, Tan Z, Cheng J. Recent advances in design of antimicrobial peptides and polypeptides toward clinical translation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021; 170:261–80.
22. Juvvadi P, Vunnam S, Merrifield EL, Boman HG, Merrifield RB. Hydrophobic effects on antibacterial and channel-forming properties of cecropin A-melittin hybrids. *J Pept Sci.* 1996; 2 (4): 223-32.
23. Klocek G., Schulthess T, Shai Y, Seelig J. Thermodynamics of melittin binding to lipid bilayers. Aggregation and pore formation. *Biochemistry.* 2009; 48 (12): 2586-2596.
24. Kościuczuk EM, Lisowski P, Jarczak J, Strzałkowska N, Jóźwik A, Horbańczuk J, et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(12):10957–70.
25. Kreil G, Haiml L, Suchanek G. Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. Evidence for a new type of precursor--product conversion. *Eur J Biochem.* 1980; 111(1):49-58.
26. Lam YH, Wassall SR, Morton CJ, Smith R, Separovic F. Solid-state NMR structure determination of melittin in a lipid environment. *Biophys J* 2001; 81(5):2752–2761.
27. Lazarev, V. N., Parfenova, T. M., Gularyan, S. K., Misyurina, O. Y., Akopian, T. A., & Govorun, V. M. Induced expression of melittin, an antimicrobial peptide, inhibits infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis* in a HeLa cell line. *International journal of antimicrobial agents*, 2002; 19(2), 133-137.
28. Lee Wimley J.K., Gopal R, Park S.C, Ko H.S, Kim Y, Hahm K.S, Park Y. A proline-hinge alters the characteristics of the amphipathic alpha-helical AMPs PLoS One. 2013; 8(7):e67597.
29. Lee, J.; Lee, D. G, Melittin triggers apoptosis in *Candida albicans* through the reactive oxygen species-mediated mitochondria/caspase-dependent pathway, *FEMS Microbiology Letters.* 2014; 355(1):36–42.
30. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* 2019; 11(7):3919–31.
31. Leungtongkam U, Thummeepak R, Tasanapak K, Sitthisak S. Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid

- or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2018 Dec 6; 13(12):e0208468.
32. Li J, Fernández-Millán P, Boix E. Synergism between Host Defence Peptides and Antibiotics against Bacterial Infections. *Curr Top Med Chem*. 2020; 20(14):1238-1263.
 33. Lima WG, de Brito JCM, Cardoso VN, Fernandes SOA. In-depth characterization of antibacterial activity of melittin against *Staphylococcus aureus* and use in a model of non-surgical MRSA-infected skin wounds. *Eur J Pharm Sci*. 2021;156 (105592):105592.
 34. Lubbert C, John E, Muller L. *Clostridium difficile* infection: guideline-based diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2014; 111(43): 723–31
 35. Luyt CE, Brechot N, Trouillet JL, Chastre J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit Care*. 2014; 18(5):480.
 36. Mahmoudi H, Alikhani MY, Imani Fooladi AA. Synergistic antimicrobial activity of melittin with clindamycin on the expression of encoding exfoliative toxin in *Staphylococcus aureus*. *Toxicon*. 2020; 183:11-19.
 37. Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Ishibe, N.; Ueha, M.; Nakata, S.; Koichiro Miyajima; Epand, R. M. Relationship of Membrane Curvature to the Formation of Pores by Magainin2. *Biochemistry* 1998, 37 (34), 11856–11863.
 38. Memariani H, Memariani M, Shahidi-Dadras M, Nasiri S, Akhavan MM, Moravvej H. Melittin: from honeybees to superbugs. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103 (8):3265–76.
 39. Miura Y. NMR studies on the monomer-tetramer transition of melittin in an aqueous solution at high and low temperatures. *Eur Biophys J*. 2012; 41(7):629-36
 40. Mukhopadhyay S, Bharath Prasad AS, Mehta CH, Nayak UY. Antimicrobial peptide polymers: no escape to ESKAPE pathogens-a review. *World J Microbiol Biotechnol*. 2020; 36(9):131.
 41. Nehme H, Ayde H, El Obeid D, Sabatier JM, Fajloun Z. Potential inhibitory effect of *Apis mellifera*'s venom and of its two main components-melittin and PLA2-on *Escherichia coli* F1F0-ATPase. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(11):824.

42. Portell-Buj, Elena, et al. "In vitro activity of 12 antimicrobial peptides against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* clinical isolates." *Journal of medical microbiology* 2019;68.(2): 211-215.
43. Rady I., Siddiqui I.A., Rady M., Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Lett.* 2017; 402:16–31.
44. Ramirez L.S., Pande J, Shekhtman A. Helical structure of recombinant melittin J. *Phys. Chem. B*, 2019; 123 (2): 356-368.
45. Read AF, Woods RJ. Antibiotic resistance management. *Evol Med Public Health.* 2014; 2014(1):147.
46. Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24(6):536–47.
47. Rex M S. A Pro → Ala substitution in melittin affects self-association, membrane binding and pore-formation kinetics due to changes in structural and electrostatic properties. *Biophys. Chem.* 2000; 85 (2-3): 209-228.
48. Rollins-Smith LA. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(8):1593–9.
49. Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H and Boman H. *Nature.* 1981; 292: 246-248.
50. Saeed W et Khalil E. Toxic Effects and Safety of Bee Venom Protein [Melittin] in Mice: Search for Natural Vaccine Adjuvants. *J. Nat. Prod. Resour.* 2017; 3:111-114.
51. Shi, W.; Li, C.; Li, M.; Zong, X.; Han, D.; Chen, Y. Antimicrobial peptide melittin against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 5059–5067.
52. Socarras K, Kayla M., et al. "Antimicrobial activity of bee venom and melittin against *Borrelia burgdorferi*." *Antibiotics* 2017; 6(4)31.
53. Sojka M, Valachova I, Bucekova M, Majtan J, Antibiofilm efficacy of honey and bee-derived defensin-1 on multispecies wound biofilm. *J Med Microbiol.* 2016 Apr; 65(4):337-344.

54. Sun X, Hirota SA. The roles of host and pathogen factors and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Mol Immunol.* 2015; 63(2): 193–202.
55. Tosteson MT, Tosteson DC. The sting. Melittin forms channels in lipid bilayers. *Biophys J.* 1981; 36(1):109-16.
56. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T.* 2015; 40(4):277–83.
57. Wang Z., Wang G. APD: the antimicrobial peptide database *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 590-592.
58. Wimley, W. C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chem. Biol.* 2010, 5 (10), 905–917.
59. World Health Organization, 2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Geneva; 2021.
60. Wu X, Singh AK, Wu X, Lyu Y, Bhunia AK, Narsimhan G. Characterization of antimicrobial activity against *Listeria* and cytotoxicity of native melittin and its mutant variants. *Surf coloide B.* 2016; 143: 194-205.