

Dr. José Manuel Pérez de la Lastra, coordinador del Grupo de Investigación de Biotecnología de Macromoléculas adscritos a la Titulación Máster en Biomedicina por la ULL

### **CERTIFICO**

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado “*Evaluación de la actividad antimicrobiana de dos catelicidinas en presencia de iones metálicos*” ha sido realizado bajo mi supervisión por D<sup>a</sup> Candela Atance Gómez matriculada en el Máster en Biomedicina, durante el curso académico 2021/22
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, doy mi consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de la memoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a miércoles 8 de junio de 2022

Dr.

PEREZ DE LA LASTRA  
PEREZ DE LA LASTRA  
JOSE MANUEL -  
30534621M

Firmado digitalmente por  
PEREZ DE LA LASTRA PEREZ  
DE LA LASTRA JOSE MANUEL  
- 30534621M  
Fecha: 2022.06.08 13:56:55  
+01'00'

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**Evaluación de la actividad  
antimicrobiana de dos catelicidinas en  
presencia de iones metálicos.**

Máster de Biomedicina  
(2021-2022)

Autor: Candela Atance Gómez

Tutor: José Manuel Pérez de la Lastra

Línea de investigación: Biotecnología de péptidos antimicrobianos

*Biotechnology of Macromolecules*  
*Institute of Natural Products and Agrobiology*

## **Resumen.**

La presión selectiva que ejerce el uso masivo de antibióticos convencionales sobre las bacterias y la facilidad de éstas para intercambiar material genético ha fomentado el rápido desarrollo de bacterias multirresistentes a antimicrobianos. Para solventar este problema se ha planteado el uso de péptidos antimicrobianos (PAMs), que forman parte del sistema inmunitario innato de prácticamente todas las formas de vida y podrían ser prometedores en la terapia de enfermedades infecciosas. Además, ofrecen ciertas ventajas como una menor predisposición a las resistencias antimicrobianas, un efecto sinérgico con los antibióticos tradicionales y un amplio espectro de actividad. Existen diferentes familias de PAMs según el organismo dónde se identifiquen. Las catelicidinas son péptidos catiónicos de mamíferos que desempeñan una función en la respuesta inmunitaria innata de los mamíferos contra infecciones bacterianas. Las catelicidinas inactivan a los microorganismos, normalmente mediante la desestabilización de sus membranas, induciendo su ruptura. Se ha demostrado la actividad antibacteriana de iones metálicos, como los iones de zinc que se usan para prevenir el crecimiento de microorganismos; o los iones de cobre, que frecuentemente se usan como agentes activos en biocidas inorgánicos, especialmente en ámbitos hospitalarios. En este estudio se evaluará la actividad antimicrobiana *in vitro* de dos catelicidinas naturales; la Indolicidina, de vaca (*Bos taurus*) y Lv-RR32, del delfín de agua dulce (*Lipotes vexillifer*) en presencia de los iones metálicos zinc y cobre, administrados en forma de sales metálicas.

## **Abstract.**

The selective pressure exerted on bacteria by the massive use of conventional antibiotics and the ease with which bacteria can exchange genetic material has encouraged the rapid development of bacteria that are multidrug-resistant to antimicrobials. To solve this problem, the use of antimicrobial peptides (AMPs), which are part of the innate immune system of practically all forms of life, has been proposed and could be promising in the therapy of infectious diseases. In addition, they offer certain advantages such as a lower predisposition to antimicrobial resistance, a synergistic effect with traditional antibiotics and a broad spectrum of activity. There are different families of AMPs depending on the organism where they are identified. Cathelicidins are mammalian cationic peptides that play a role in the mammalian innate immune response against bacterial infections.

Cathelicidins inactivate microorganisms, usually by destabilizing their membranes, inducing their rupture. The antibacterial activity of metal ions has been demonstrated, such as zinc ions, which are used to prevent the growth of microorganisms; or copper ions, which are frequently used as active agents in inorganic biocides, especially in hospital settings. In this study we will evaluate the in vitro antimicrobial activity of two natural cathelicidins; Indolicidin, from cow (*Bos taurus*) and Lv-RR32, from freshwater dolphin (*Lipotes vexillifer*) in the presence of zinc and copper metal ions, administered in the form of metal salts.

**Keywords:** cathelicidin; metal ions; antibacterial activity; MIC.

---

## 1. Introducción.

Debido al uso generalizado de antibióticos, en las últimas décadas se ha identificado un número creciente de bacterias multirresistentes, representando una grave preocupación para los centros sanitarios. Como resultado, se ha examinado el potencial terapéutico de los antibióticos existentes a través de combinaciones con otras moléculas biológicas o químicas. Con ello se consigue reducir las dosis de fármacos, prevenir la aparición de resistencias y mejorar la actividad antibacteriana [1].

Una alternativa prometedora a los antibióticos convencionales son los péptidos antimicrobianos (PAMs), como una nueva terapia contra microorganismos resistentes a los medicamentos [2]. Sus mecanismos de acción son menos propensos a la resistencia microbiana que los tratamientos tradicionales [3], debido a su capacidad para interactuar con las membranas de una gran variedad de patógenos, como hongos, parásitos, virus con envoltura, bacterias e incluso células cancerosas [2]. A diferencia de los antibióticos comunes que se dirigen a una enzima metabólica específica, los PAMs destruyen a los microorganismos principalmente a través de un mecanismo que implica la desestabilización de sus membranas, impidiendo o dificultando la aparición de resistencias [4]. Además, los PAMs tienen un amplio espectro de actividad y un efecto sinérgico con los antibióticos convencionales, pudiendo neutralizar las endotoxinas y modular el sistema inmune [5]. Se ha demostrado que la combinación de péptidos sintéticos cortos y catiónicos con antibióticos convencionales supera la actividad antibacteriana individual de cada uno [1].

A pesar de que la investigación de los PAMs está en continuo avance, su desarrollo clínico pasa por obtener PAMs más seguros, estables, eficaces y con alta capacidad sinérgica. Para la administración oral, e inyecciones subcutáneas o intravenosas son deseables ciertas propiedades [6], como una mayor selectividad, nula o reducida toxicidad o una mayor estabilidad que implica la digestión mediante proteasas [3,5], limitando la administración oral e inyecciones subcutáneas o intravenosas. Una de las estrategias usadas para resolver estos inconvenientes es el uso de péptidos miméticos o que contengan D-aminoácidos [2].

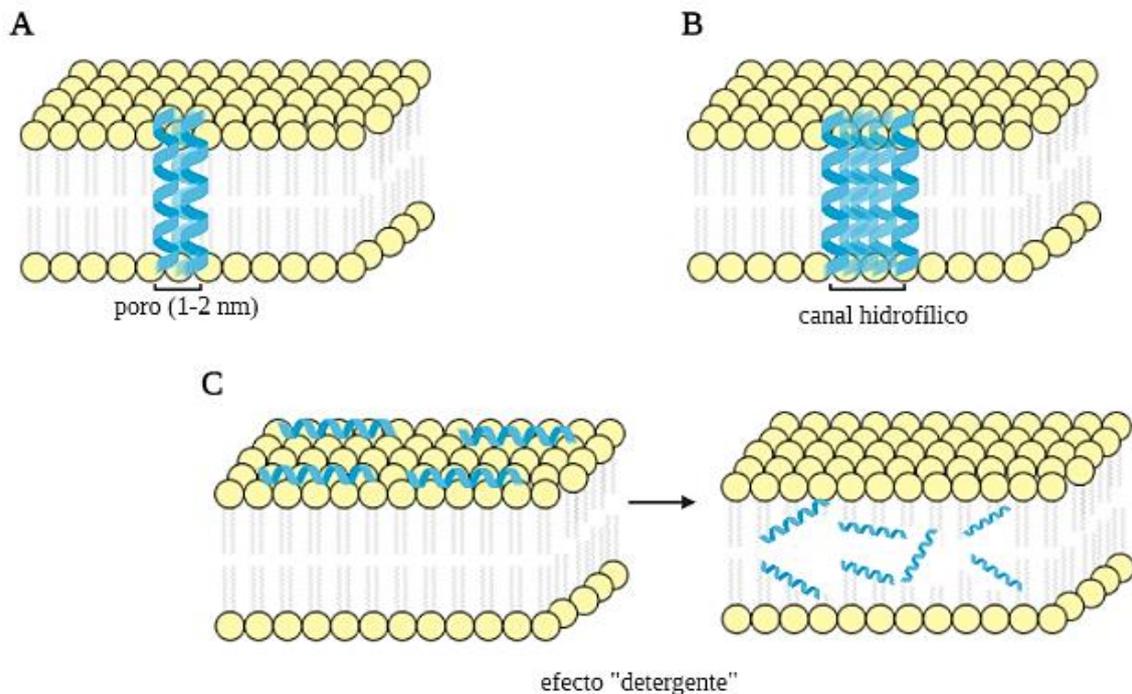
Los PAMs también son conocidos como péptidos de defensa del huésped, ya que forman parte del sistema inmunitario innato de prácticamente todas las formas de vida, desde bacterias hasta vertebrados [7]. La diversidad de secuencias de aminoácidos con actividad antimicrobiana es notable [3] y, hasta la fecha, se han registrado más de 3000 PAMs de distintos organismos [2]. Los PAMs otorgan una importante primera línea de defensa [3]. Son moléculas efectoras sintetizadas por las células del huésped derivadas de células mieloides; como los neutrófilos y los macrófagos. Los PAMs proporcionan protección contra microorganismos. A menudo actuando directamente sobre los mismos o mediante su unión a endotoxinas bacterianas, como LPS, los efectos de la infección [8].

Se han descrito diferentes familias de PAMs en diversos organismos, incluyendo defensinas, dermaseptinas o catelicidinas entre otras. A pesar de la variabilidad estructural entre las familias, muchos PAMs son péptidos anfipáticos normalmente helicoidales con regiones hidrofóbicas orientadas en caras opuestas de la hélice [9]. Los PAMs suelen ser catiónicos, con carga neta positiva (carga neta media 3.32) y relativamente cortos. Típicamente, contienen un número de residuos de aminoácidos comprendido entre 10 y 60 [10,11]. No obstante, también existen varios PAMs aniónicos con residuos ácidos como el ácido aspártico [10]. En organismos eucariotas, los PAMs están codificados por genes [4], pero también se han descrito péptidos antimicrobianos no codificados por genes, llamados bacteriocinas, que son sintetizados por microorganismos procariotas [2]. Se ha demostrado que los PAMs que contienen residuos de triptófano (Trp) tienen una mayor actividad antimicrobiana debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre la cadena lateral aromática de Trp con una región de la membrana, favoreciendo así la interacción con la superficie de las membranas celulares bacterianas [1].

Los PAMs pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios como la composición de aminoácidos, la naturaleza, la conformación estructural, la presencia de enlaces disulfuro y el espectro de actividad [4]. Según su origen, éstos pueden dividirse en PAMs de mamíferos que se encuentran en seres humanos, ovejas y otros vertebrados. Entre ellos, destacan las familias de las catelicidinas y las defensinas, que además de la actividad antimicrobiana también participan en la modulación inmunitaria de la apoptosis y la cicatrización de heridas. Los péptidos antimicrobianos derivados de insectos, como las cecropinas, desempeñan un importante papel en la adaptabilidad de los insectos a sus hábitats. Por último, algunos péptidos antimicrobianos derivados de microorganismos, como las bactericinas son de utilidad en la industria agroalimentaria [10]. También existen otros criterios de clasificación, basado en las propiedades fisicoquímicas del péptido. Por ejemplo, atendiendo a la carga, longitud o hidrofobicidad [2]. Según el patrón o estructura, los PAMs pueden ser péptidos  $\alpha$ -helicoidales, de láminas  $\beta$  o extendidos [5]. Según su función, los PAMs también se pueden clasificar en antibacterianos, antifúngicos, antivirales, insecticidas, espermicidas, anticáncer, cicatrizantes e inmunomoduladores [2].

Las catelicidinas son una familia de péptidos antimicrobianos que se han identificado en vertebrados. Su sobreexpresión en células y tejidos de animales mejora la resistencia a las infecciones [11]. En cuanto a su estructura, la catelicidinas contienen dominios altamente conservados evolutivamente, como el dominio N-terminal de la catelina. Este dominio se utiliza para la búsqueda de nuevas catelicidinas en las bases de datos del genoma [5]. La estructura primaria de las catelicidinas muestra gran heterogeneidad en su región C-terminal, cuyo tamaño oscila entre 12 y 18 aminoácidos [8,5]. En vertebrados superiores las catelicidinas están codificadas por genes con cuatro exones. El primero codifica un péptido señal, los exones 2 y 3 el dominio de la catelina y el exón 4 codifica el péptido activo antimicrobiano. En los neutrófilos, normalmente las catelicidinas se obtienen tras la escisión proteolítica del pre-propéptido por la enzima elastasa, que libera el péptido antimicrobiano activo. Las catelicidinas inactivan a los microorganismos normalmente a través de la interacción con sus membranas e induciendo su ruptura y, también desempeñan una función inmunomoduladora contra infecciones bacterianas de los vertebrados [11].

Se han descrito diferentes mecanismos de acción de los PAMs, pero dependiendo de la concentración del péptido, el pH o la temperatura el mecanismo de acción puede variar [5]. Por ejemplo, cuando la proporción de péptidos y lípidos es alta, los PAMs pueden alterar la integridad de la membrana. Se han propuesto distintos mecanismos de ruptura de la bicapa lipídica. En el modelo de poro toroidal (Figura 1A) los PAMs se apilan verticalmente en la membrana, se doblan y forman un poro de 1-2 nm, permitiendo la entrada y salida de iones vitales. En el modelo de las duelas de barril (Figura 1B) los PAMs se agregan, penetran en la bicapa como multímeros y forman canales hidrofílicos que permiten la entrada y salida de iones vitales. En el modelo de alfombra (Figura 1C) los PAMs actúan como si fuesen detergentes, se colocan en paralelo a la membrana, cubren la superficie formando micelas [2,9]. Además de los PAMs capaces de atravesar la membrana celular, existen otros péptidos antimicrobianos capaces abordar infecciones bacterianas crónicas multirresistentes actuando como agentes antibiofilm, mediante la degradación de señales en el interior del biofilm, la permeabilización de sustancias poliméricas extracelulares dentro de la membrana citoplasmática o regulando su producción [9].



**Figura 1.** Mecanismos de acción de los PAMs sobre la bicapa lipídica: (A) modelo poro toroidal, (B) modelo de duelas de barril (Barril Stave) y (C) modelo de alfombra (carpet).

Algunos PAMs se pueden unir a los iones metálicos, evitando el acceso de los microorganismos a estos metales esenciales para su supervivencia. Además, la presencia de iones metálicos puede modificar la eficacia o el modo de acción de ciertos PAMs. Diversos patógenos requieren la obtención de iones metálicos para su supervivencia y virulencia; el zinc forma parte como cofactor de diversas enzimas implicadas en la patogenicidad. El cobre, gracias a su capacidad de formar radicales hidroxilo nocivos, es esencial para enzimas que participan en la respiración celular y otros procesos claves de virulencia, pero su actividad redox puede provocar toxicidad y efectos secundarios negativos [12].

Debido a la importancia de los metales en la supervivencia de microorganismos, los hospedadores reducen los niveles de iones metálicos mediante la secreción de quelantes especiales, para impedir el crecimiento de los microorganismos. Por ejemplo, la proteína psoriasina presente en la superficie de la piel humana, penetra en la célula microbiana y secuestra los iones de zinc; o la microplusina, derivado de la garrapata, con sitios de unión a iones metálicos ricos en histidina (His), hace que el cobre no esté disponible para el patógeno. Existen PAMs ricos en residuos de His que permiten la unión específica de  $Zn^{2+}$ . Un ejemplo son las histatinas, secretados por las glándulas salivales en humanos y varios primates, están cargadas positivamente debido a la gran cantidad de residuos de His altamente conservados. Esta región es la responsable de la unión a  $Zn^{2+}$  a niveles bajos de pH. Los iones metálicos pueden modificar la estructura de los péptidos, alterando el modo de acción y mejorando su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, la amilina, péptido secretado junto con la insulina, en presencia del  $Zn^{2+}$  aumenta la agregación, mejorando su actividad antimicrobiana [2,7].

## **2. Hipótesis y objetivos.**

Los vertebrados que viven rodeados de patógenos habrían desarrollado sistemas de defensa innatos, que implican péptidos antimicrobianos con diferentes espectros de actividad, mecanismos de acción y eficacia. En este trabajo pretendemos estudiar la actividad *in vitro* de catelicidinas codificadas en el genoma de la vaca *Bos taurus* (Indolicidina) y del delfín de agua dulce *Lipotes veloxillifer* (Lv-RR32). Particularmente si su actividad antimicrobiana *in vitro* es modulada por sales de metales  $Zn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  con el objetivo de plantear futuras aplicaciones biomédicas y agroalimentarias.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de las catelicidinas Indolicidina y Lv-RR32 frente a bacterias Grampositivas y Gramnegativas.
2. Identificar el efecto bactericida o bacteriostático *in vitro* de los iones metálicos zinc y cobre en forma de sales frente a bacterias Grampositivas y Gramnegativas.
3. Evaluar si la combinación de catelicidinas Indolicidina y Lv-RR32 y los metales zinc y cobre modifican la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias Grampositivas y Gramnegativas.
4. Realizar un análisis bioinformático de los péptidos Indolicidina y Lv-RR32 para tratar de complementar los resultados obtenidos mediante los ensayos *in vitro*.

### **3. Material y métodos.**

#### *3.1. Selección y síntesis de los péptidos antimicrobianos.*

En este trabajo hemos utilizado dos catelicidinas de mamíferos, en concreto la Indolicidina, un pequeño péptido antimicrobiano aislado de neutrófilos de la vaca *Bos taurus*. La secuencia de la Indolicidina consta tan solo de 13 aminoácidos (ILPWKWPWWPWRR) y es rica en triptófano. Es activo frente a bacterias, hongos e incluso el virus del VIH [13]. Por otro lado, Lv-RR32 es una catelicidina del cetáceo *Lipotes vexillifer*, cuya secuencia consta de 32 aminoácidos (RRIRIRPPRLPRPRPRWFPPRFPIPRIPGKR) y es rica en arginina.

Los péptidos se sintetizaron con una pureza superior del 90% (analizada por HPLC) a escala de 10 mg. Para evitar la degradación durante el proceso, en el extremo C-terminal de cada péptido se añadió una amida y al extremo N-terminal un acilo. Para facilitar la eficacia y manipulación del ensayo, se diluyeron las alícuotas de cada polipéptido en agua destilada a una concentración de 100 M.

#### *3.2. Microorganismos y determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.*

La actividad antimicrobiana se probó contra dos microorganismos patógenos que provocan graves enfermedades infecciosas, la bacteria Gramnegativa *Escherichia coli* (*E. coli*) CECT 434 y la bacteria Grampositiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) CECT 794. Para estudiar la actividad antimicrobiana se usó la concentración mínima inhibitoria o

MIC, que se define como la concentración de antibiótico, péptido y/o la sal más baja que inhibe el 95% del crecimiento bacteriano [1].

Para cada bacteria, a partir de un cultivo bacteriano en medio sólido se sembraron los microorganismos en medio líquido de Mueller Hinton (MH) en una estufa a 37°C durante aproximadamente dos horas, hasta lograr un valor de absorbancia próximo a 0.5 McFarland en ambas bacterias, y se realizaron siete diluciones seriadas (de  $10^7$  a  $10^1$ ). Para las placas de los ensayos MIC se usó la dilución de  $10^5$  células/ml, mientras que para realizar el conteo de las colonias en unidades de ufc/ml se sembraron 100  $\mu$ l de las diluciones de  $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$  en placas con MH agar y se pusieron a crecer durante 24 horas a 37°C.

### 3.3. Experimento MIC bacteria-péptido.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los dos péptidos, Indolicidina y Lv-RR32, frente a *E. coli* y *S. aureus* en un ensayo MIC por cada bacteria. En una placa de 96 pocillos se realizaron 10 diluciones seriadas de cada péptido por cuadruplicado, con un volumen final de 50  $\mu$ l de cada dilución. Los pocillos de las filas A-D correspondían a las diluciones de Lv-RR32, que estaban entre 12.5  $\mu$ M y 0.025  $\mu$ M, y los pocillos de las filas E-H correspondían a las diluciones de Indolicidina, que estaban entre 50  $\mu$ M y 0.05  $\mu$ M. Por último, se añadió 50  $\mu$ l a cada pocillo de la dilución  $10^5$  de una de las bacterias en cada placa. Los pocillos de la columna 11 correspondían al control negativo, donde se añadieron 100  $\mu$ l de MH y los pocillos de la columna 12 al control positivo, donde se añadieron 50  $\mu$ l de la dilución de la bacteria y 50  $\mu$ l de MH. Ambas placas, una con *E. coli* y otra con *S. aureus*, se incubaron a 37°C durante 24 horas y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas FLUOstar® OMEGA BMG Lector Multimodo.

### 3.4. Preparación de sales metálicas y experimento MIC bacteria-sal.

Se utilizaron los iones metálicos de Zinc y Cobre en forma de sales metálicas,  $ZnCl_2$  y  $CuSO_4$  respectivamente. Para establecer el rango de concentraciones de metales que presentan actividad antimicrobiana se realizó un experimento para calcular el MIC de cada bacteria, *E. coli* y *S. aureus*, con las sales. A partir de una solución stock 1 M de cada sal se hicieron 10 diluciones seriadas, obteniéndose 10 concentraciones diferentes de cada sal (de 1 M a 1 nM). Se preparó una placa de 96 pocillos por microorganismo, en cada una se añadieron 50  $\mu$ l de cada una de estas concentraciones, correspondían las filas

A-D para las diluciones de  $ZnCl_2$  y las filas E-H para las diluciones de  $CuSO_4$ , por lo tanto, cada concentración se encontraba por cuadruplicado en la placa. Además, se añadió 50  $\mu$ l de la dilución  $10^5$  de la bacteria correspondiente a todos los pocillos de las columnas 1-10. Los pocillos de la columna 11 correspondieron a controles negativos con solo MH y los de la columna 12 a los controles positivos, con MH y bacterias (Figura 2). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y se midió la absorbancia a 595 nm como se ha mencionado anteriormente. Una vez establecidas las concentraciones de  $ZnCl_2$  y  $CuSO_4$  que presentaban cierto efecto antimicrobiano, se preparó, a partir del stock de 1 M, tres soluciones a tres concentraciones diferentes, concretamente a 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M, que se emplearon en los experimentos MIC de bacteria-péptido-sal (Figura 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1M	100mM	10mM	1mM	0.1mM	0.01mM	1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	0.01 $\mu$ M	0.001 $\mu$ M	-	+
B											-	+
C					$ZnCl_2$						-	+
D											-	+
E	1M	100mM	10mM	1mM	0.1mM	0.01mM	1 $\mu$ M	0.1 $\mu$ M	0.01 $\mu$ M	0.001 $\mu$ M	-	+
F											-	+
G					$CuSO_4$						-	+
H											-	+

**Figura 2.** Esquema de la placa de 96 pocillos de los ensayos MIC de sales. Pocillos de las filas A-D contenían las diluciones seriadas de  $ZnCl_2$  y los pocillos de las filas E-H las diluciones seriadas de  $CuSO_4$ . La columna 11 correspondía a los controles negativos, donde sólo se añadió 100  $\mu$ l de MH y la columna 12 a los controles positivos, con 50  $\mu$ l de MH y 50  $\mu$ l de la bacteria correspondiente, según la placa.

### 3.5. Experimento MIC bacteria-péptido-sal.

El valor del MIC de las bacterias en presencia de sales y péptidos se determinó mediante un método estándar en placas de 96 pocillos, donde dividimos la placa en 4 secciones según las concentraciones del péptido y de la sal metálica. Los péptidos se diluyeron en cada sección hasta cinco veces, en concentraciones entre 50  $\mu$ M y 3.125  $\mu$ M para Indolicidina tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, y en concentraciones entre 6.25  $\mu$ M y 0.4  $\mu$ M para Lv-RR32 con *E. coli*. En concentraciones entre 12.5  $\mu$ M y 0.8  $\mu$ M para Lv-RR32 con *S. aureus*, en todos los casos se añadió un volumen final de 25  $\mu$ L del péptido correspondiente en cada pocillo. En cuanto a las sales, en todos los pocillos de las filas de la 1 a la 10 se añadieron 25  $\mu$ L de la solución stock preparada anteriormente,

según la concentración de sal que correspondiese ya fuese 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  o 25  $\mu\text{M}$ . También se estableció una sección control sin sales, dónde solo se añadió 25  $\mu\text{l}$  de MH, esta sección nos permitió obtener el valor de MIC de cada péptido como control.

Por último, se añadió 50  $\mu\text{l}$  de la dilución  $10^5$  de las bacterias a todos los pocillos de las columnas 1 a la 10. Los pocillos del resto de columnas se emplearon para los controles; 9 pocillos para los controles negativos dónde se añadieron únicamente 100  $\mu\text{l}$  de MH; 4 pocillos para los controles positivos con 50  $\mu\text{l}$  de MH y 50  $\mu\text{l}$  de la dilución con la bacteria; y 3 pocillos para los controles de las sales, dónde se añadió 100  $\mu\text{l}$  de MH, 50  $\mu\text{l}$  de la dilución  $10^5$  con la bacteria y en cada pocillo 50  $\mu\text{l}$  de uno de las soluciones stocks (100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ ), quedando un pocillo para cada concentración establecida (Figura 3). Las placas fueron incubadas en una estufa a 37°C durante 24 horas y se midió la absorbancia con un lector, como se ha descrito anteriormente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											-	*
B		Control sin sales					100 $\mu\text{M}$				-	*
C											-	*
D											-	-
E											+	-
F		25 $\mu\text{M}$					50 $\mu\text{M}$				+	-
G											+	-
H											+	-

**Figura 3.** Esquema de la placa de 96 pocillos de los ensayos MIC con péptidos y sales. La sección sin sales corresponde al control con 0  $\mu\text{M}$  de sales; la sección 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  o  $\text{ZnCl}_2$ ; la sección 50  $\mu\text{M}$  de sal correspondiente y la sección 25  $\mu\text{M}$ . (-) Control negativo. (+) Control positivo. (\*) Control de sales.

### 3.6. Análisis estadístico.

Se utilizó el software de análisis estadístico SAS/STAT [12], se realizó un análisis post hoc de ANOVA multifactorial, por cada combinación de bacteria-péptido-sal, por lo tanto, se realizaron 8 ANOVAS multifactoriales diferentes. Además, se usó una prueba Tukey. La absorbancia fue la variable dependiente y la concentración de péptido y de sal las variables independientes.

### 3.7. Análisis bioinformático.

A partir de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) obtuvimos las secuencias de aminoácidos de ambos péptidos antimicrobianos. El número de acceso de la Indolicidina es el NC\_037349 y para Lv-RR32 es el NW\_006770548. Estas secuencias fueron necesarias para realizar la modelación bioinformática de ambos PAMs. Se utilizó el servidor de modelado homólogo Alphafold [14, 15]. ColabFold envía la secuencia de ambos péptidos en formato FASTA al servidor MMseqs2, que se encarga de buscar en dos bases de datos; UniRef100 y una base de datos de secuencias ambientales [16]. El servidor genera dos MSAs (Multiple Sequence Alignment) con formato A3M comprendiendo todas las secuencias ya identificadas, considerando solo los modelos de la primera posición para el análisis. El formato A3M consiste en un FASTA alineado, en el que los alineamientos se muestran con inserciones como caracteres en minúsculas, coincidencias como caracteres en mayúsculas, eliminaciones como “-” y huecos alineados con inserciones como “.”. El formato FASTA es un formato de archivo informático basado en texto que se utiliza para representar secuencias de ácidos nucleicos o péptidos en las que los pares de bases o los aminoácidos se representan mediante códigos de una sola letra. El formato también permite incluir nombres de secuencias y comentarios que preceden a las propias secuencias. Para la obtención y visualización de la estructura terciaria usamos el software ChimeraX [17].

Para comparar las propiedades de ambos péptidos se utilizaron dos servidores; la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) que permite el cálculo de varios parámetros físicos y químicos [18], y el servidor AVPPred (<http://crdd.osdd.net/servers/avppred/index.html>) que proporciona propiedades fisicoquímicas relacionadas con la carga neta y la hidrofobicidad [19].

La actividad biológica de los péptidos antimicrobianos contra diferentes microorganismos y los eritrocitos humanos fue estudiada mediante aplicaciones bioinformáticas disponibles online. Para ello se utilizó la Base de Datos de Actividad Antimicrobiana y Estructura de péptidos (DBAASP) (<https://dbaasp.org/home>) [20].

Por otro lado, para estudiar la interacción de ambos péptidos con las membranas, se utilizó el servidor PPM ([https://opm.phar.umich.edu/ppm\\_server](https://opm.phar.umich.edu/ppm_server)) que establece la ubicación rotacional y traslacional de las proteínas en las membranas [21].

Además, para predecir los sitios de unión de iones metálicos, se usó el servidor MIB (<http://bioinfo.cmu.edu.tw/MIB/>), que proporcionó un método preciso para buscar residuos en sitios de unión de iones metálicos y el acoplamiento de estos tras la predicción, a través del método de transformación de fragmentos [22,23].

#### 4. Resultados.

##### 4.1. Estudio de la actividad antimicrobiana de PAMs y sales por separado.

Los experimentos MIC realizados para evaluar la actividad antimicrobiana de los péptidos antimicrobianos, Indolicidina y Lv-RR32, demostraron que, para *S. aureus*, el MIC de Indolicidina se encuentra en el rango de concentración de 50  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ , y el MIC de Lv-RR32 estaba entre 0.8  $\mu\text{M}$  y 0.4  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, para *E. coli* el valor MIC de la Indolicidina estaba entre 25  $\mu\text{M}$  y 12.5  $\mu\text{M}$ , y el valor MIC de Lv-RR32 estaba en el rango de 0.4  $\mu\text{M}$  y 0.2  $\mu\text{M}$  (Tabla 1). También se estudió la actividad antimicrobiana de las sales metálicas:  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{CuSO}_4$  y se demostró que, para *S. aureus*, el valor MIC con  $\text{ZnCl}_2$  se encontraba en el rango entre 1  $\mu\text{M}$  y 0.1  $\mu\text{M}$ , mientras que, con  $\text{CuSO}_4$  el valor MIC se localizaba entre 100  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ . Por otro lado, para *E. coli*, el valor MIC con  $\text{ZnCl}_2$  se encontró en el rango entre 10  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , mientras que con  $\text{CuSO}_4$  estaba entre 100  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  (Tabla 1).

**Tabla 1.** Rango de valores de concentración inhibitoria mínima (MIC) de las sales  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{ZnCl}_2$  y de péptidos Indolicidina y Lv-RR32 frente a *E. coli* y *S. aureus*.

	Indolicidina	Lv-RR32	$\text{CuSO}_4$	$\text{ZnCl}_2$
<i>E. coli</i>	25 $\mu\text{M}$ - 12.5 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{M}$ - 0.2 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$ - 10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$ - 1 $\mu\text{M}$
<i>S. aureus</i>	50 $\mu\text{M}$ - 25 $\mu\text{M}$	0.8 $\mu\text{M}$ - 0.4 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$ - 10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$ y 0.1 $\mu\text{M}$

##### 4.2. Estudio de la actividad antimicrobiana de los péptidos en presencia de sales.

Para el estudio del efecto antimicrobiano de los PAMs en presencia de las sales metálicas frente a *E. coli* y *S. aureus* se realizaron ocho experimentos MIC. Según un primer ensayo, dónde se comprobó la actividad antimicrobiana de la Indolicidina contra *S. aureus* en presencia de  $\text{CuSO}_4$ , el valor de MIC en el control sin sales y en las dos concentraciones más altas de  $\text{CuSO}_4$  (50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) se encontraba entre el rango de concentraciones

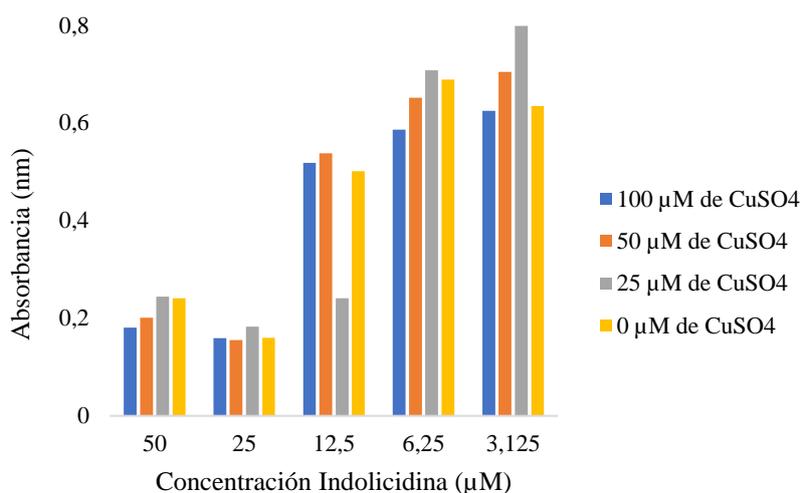
de 25  $\mu\text{M}$  y 12.5  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, el valor de MIC a la concentración de 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  se encontraba desplazado, concretamente entre 12.5  $\mu\text{M}$  y 6.25  $\mu\text{M}$ . Esto supone que existía una mejora de la actividad antimicrobiana de la Indolicidina, únicamente a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ , frente a *S. aureus*. Los valores significativamente distintos fueron representados con letras diferentes, demostrando dónde se encontraba el valor MIC (Tabla 2) (Figura 4).

En otro ensayo se estudió la actividad antimicrobiana de la Indolicidina contra *S. aureus* en presencia de  $\text{ZnCl}_2$  y los resultados demostraron que el valor MIC en el control sin sales y a las dos concentraciones más altas de sal (50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) se encontraba entre 25  $\mu\text{M}$  y 12,5  $\mu\text{M}$ , mientras que a la concentración de 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ , el crecimiento bacteriano se había reducido, en este caso, sin llegar al valor del MIC, pero con diferencias significativas. Ya que el valor se reduce, pero no llega a los valores mínimos. Estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana de la Indolicidina contra *S. aureus* también se veía mejorada únicamente con la presencia de  $\text{ZnCl}_2$  a 25  $\mu\text{M}$  (Tabla 3) (Figura 5).

Teniendo en cuenta estos resultados se pudo observar que la presencia tanto de  $\text{CuSO}_4$  y de  $\text{ZnCl}_2$  a concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  mejoraba la actividad antimicrobiana de la Indolicidina contra *S. aureus*, el valor MIC se desplazaba desde la concentración 12.5  $\mu\text{M}$  a 6.25  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, esto no ocurría a concentraciones más altas de sales (Tabla 2 y 3) (Figura 4 y 5). En ambos experimentos el conteo de colonias fue de  $2.2 \times 10^5$  ufc/ml.

**Tabla 2.** Efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *S. aureus* en presencia de  $\text{CuSO}_4$ . La diferencia significativa entre diferentes diluciones del péptido se refleja como las primeras letras del abecedario, la diferencia significativa de las diluciones de la sal se refleja como las últimas letras del abecedario. EE significa Error Estándar.

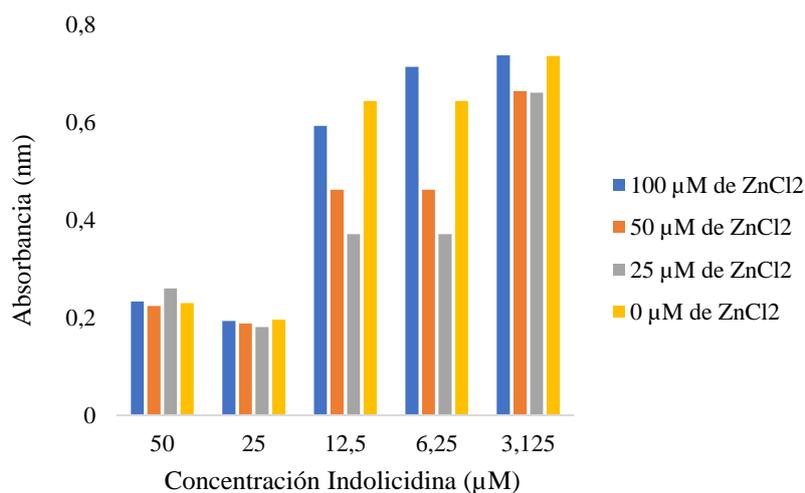
Concentración de $\text{CuSO}_4$ ( $\mu\text{M}$ )	Concentración de Indolicidina ( $\mu\text{M}$ )						EE
	50	25	12,5	6,25	3,125		
100	0,181 <sup>a</sup>	0,159 <sup>a</sup>	0,518 <sup>b</sup>	0,586 <sup>b</sup>	0,625 <sup>b</sup>	0,055	
50	0,201 <sup>a</sup>	0,155 <sup>a</sup>	0,538 <sup>b</sup>	0,652 <sup>b</sup>	0,705 <sup>b</sup>	0,056	
25	0,244 <sup>a</sup>	0,183 <sup>a</sup>	0,241 <sup>a</sup>	0,708 <sup>b</sup>	0,799 <sup>b</sup>	0,065	
0	0,241 <sup>a</sup>	0,160 <sup>a</sup>	0,501 <sup>b</sup>	0,689 <sup>b</sup>	0,635 <sup>b</sup>	0,052	
EE	0,012	0,008	0,040	0,030	0,047		



**Figura 4.** Representación gráfica del efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *S. aureus* en presencia de diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>, los datos corresponden a la Tabla 2.

**Tabla 3.** Efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *S. aureus* en presencia de ZnCl<sub>2</sub>. La diferencia significativa entre diferentes diluciones del péptido se refleja como las primeras letras del abecedario, mientras que la diferencia significativa de las diluciones de la sal se refleja como las ultimas letras del abecedario. EE significa Error Estándar.

Concentración de ZnCl <sub>2</sub> (μM)	Concentración de Indolicidina (μM)					EE
	50	25	12,5	6,25	3,125	
100	0.233 <sup>a</sup>	0.193 <sup>a</sup>	0.593 <sup>b,x</sup>	0.714 <sup>b</sup>	0.737 <sup>b</sup>	0.057
50	0.224 <sup>a</sup>	0.188 <sup>a</sup>	0.462 <sup>b,x</sup>	0.671 <sup>b</sup>	0.664 <sup>b</sup>	0.051
25	0.26 <sup>a</sup>	0.181 <sup>a</sup>	0.371 <sup>a,y</sup>	0.667 <sup>b</sup>	0.661 <sup>b</sup>	0.052
0	0.230 <sup>a</sup>	0.196 <sup>a</sup>	0.644 <sup>b,x</sup>	0.729 <sup>b</sup>	0.736 <sup>b</sup>	0.060
EE	0.009	0.008	0.036	0.029	0.031	



**Figura 5.** Representación gráfica del efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *S. aureus* en presencia de diferentes concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>, los datos corresponden a la Tabla 3.

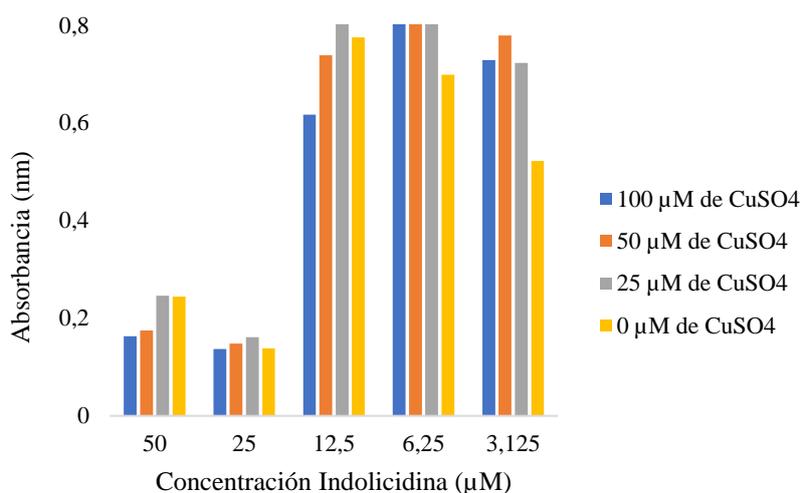
En el siguiente ensayo se estudió la actividad antimicrobiana de Indolicidina contra *E. coli* en presencia de CuSO<sub>4</sub>. Se demostró que el valor de MIC a las tres concentraciones de CuSO<sub>4</sub> (100 μM, 50 μM y 25 μM) y en el control sin sales, se encontraba en el mismo rango de concentraciones, concretamente entre 25 μM y 12.5 μM. Esto sugiere que la actividad antimicrobiana de la Indolicidina no se veía afectada por la presencia de CuSO<sub>4</sub> a ninguna concentración (Tabla 4) (Figura 6).

A continuación, se realizó el experimento MIC para evaluar la actividad antimicrobiana de Indolicidina contra *E. coli* en presencia de ZnCl<sub>2</sub> y los resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente, el valor de MIC se encontraba en el mismo rango a las tres concentraciones de sal y en el control sin sales, concretamente entre 25 μM y 12.5μM. Estos resultados sugieren que la presencia de ZnCl<sub>2</sub> tampoco afecta a la actividad antimicrobiana de la Indolicidina contra *E. coli* (Tabla 5) (Figura 7).

Por lo tanto, se pudo observar que la presencia de CuSO<sub>4</sub> y de ZnCl<sub>2</sub> no alteraba el efecto antimicrobiano de la Indolicidina contra *E. coli*. El valor MIC se encontraba en todos los casos entre 25 μM y 12.5μM (Tabla 4 y 5) (Figura 6 y 7). Para ambos experimentos, el conteo de colonias fue de 1.2 x 10<sup>5</sup> ufc/ml.

**Tabla 4.** Efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *E. coli* en presencia de CuSO<sub>4</sub>. La diferencia significativa entre diferentes diluciones del péptido se refleja como las primeras letras del abecedario, mientras que la diferencia significativa de las diluciones de la sal se refleja como las ultimas letras del abecedario. EE significa Error Estándar.

Concentración de CuSO <sub>4</sub> (μM)	Concentración de Indolicidina (μM)					
	50	25	12,5	6,25	3,125	EE
100	0.163 <sup>a</sup>	0.137 <sup>a</sup>	0.617 <sup>b,x</sup>	0.839 <sup>c,y</sup>	0.729 <sup>d,y</sup>	0.067
50	0.175 <sup>a</sup>	0.148 <sup>a</sup>	0.739 <sup>b,y</sup>	0.830 <sup>b,y</sup>	0.779 <sup>b,y</sup>	0.071
25	0.246 <sup>a</sup>	0.161 <sup>a</sup>	0.874 <sup>b,z</sup>	0.868 <sup>c,y</sup>	0.723 <sup>c,y</sup>	0.071
0	0.244 <sup>a</sup>	0.138 <sup>a</sup>	0.775 <sup>b,y</sup>	0.699 <sup>c,x</sup>	0.522 <sup>c,x</sup>	0.058
EE	0.012	0.007	0.027	0.019	0.027	

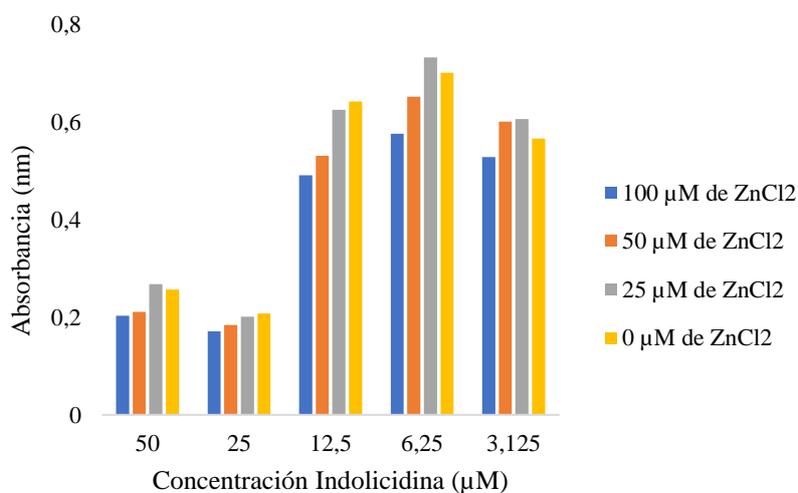


**Figura 6.** Representación gráfica del efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>, los datos corresponden a la Tabla 4.

**Tabla 5.** Efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *E. coli* en presencia de ZnCl<sub>2</sub>. La diferencia significativa entre diferentes diluciones del péptido se refleja como las primeras letras del abecedario, mientras que la diferencia significativa de las diluciones de la sal se refleja como las ultimas letras del abecedario. EE significa Error Estándar.

Concentración de ZnCl <sub>2</sub> (μM)	Concentración de Indolicidina (μM)					EE
	50	25	12,5	6,25	3,125	
100	0.203 <sup>a</sup>	0.171 <sup>a</sup>	0.491 <sup>b,x</sup>	0.576 <sup>b,x</sup>	0.528 <sup>b</sup>	0.041
50	0.211 <sup>a</sup>	0.184 <sup>a</sup>	0.531 <sup>b,y</sup>	0.652 <sup>b,y</sup>	0.601 <sup>b</sup>	0.047
25	0.268 <sup>a</sup>	0.201 <sup>a</sup>	0.625 <sup>b,y</sup>	0.732 <sup>b,y</sup>	0.606 <sup>b</sup>	0.049
0	0.257 <sup>a</sup>	0.208 <sup>a</sup>	0.642 <sup>b,y</sup>	0.701 <sup>b,y</sup>	0.566 <sup>b</sup>	0.048
EE	0.008	0.005	0.023	0.020	0.016	

**Figura 7.** Representación gráfica del efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>, los datos corresponden a la Tabla 5.



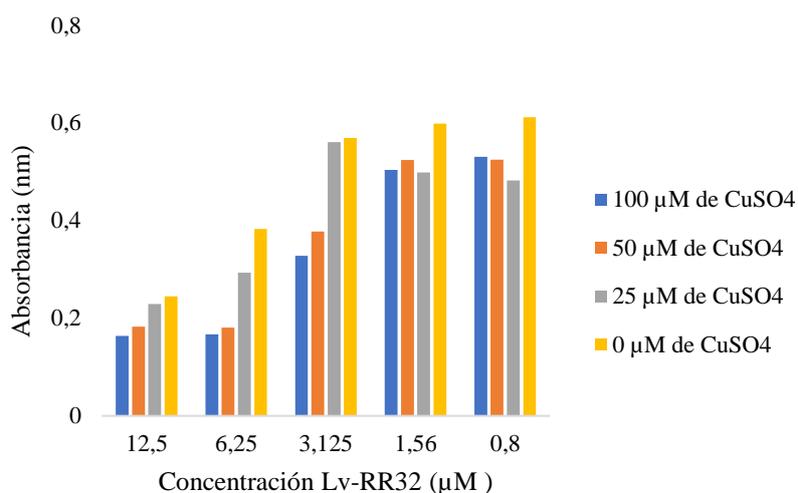
Más adelante, se realizó el experimento que estudiaba la actividad antimicrobiana del péptido Lv-RR32 contra *S. aureus* en presencia de CuSO<sub>4</sub> y los resultados demostraron que el valor de MIC, en el control sin sales y a las dos concentraciones más bajas de CuSO<sub>4</sub> (25 µM y 50 µM), se encontraba en el mismo rango; concretamente entre 6.25 µM y 3.125 µM. Sin embargo, a la concentración más alta de CuSO<sub>4</sub> el valor de MIC se encontraba desplazado hacia el rango 3.125 µM y 1.56 µM. Estos resultados indican que la actividad antimicrobiana del péptido Lv-RR32 se veía mejorada en presencia de CuSO<sub>4</sub> a concentración de 100 µM (Tabla 6) (Figura 8).

En el siguiente ensayo se estudió la actividad antimicrobiana de Lv-RR32 contra *S. aureus* en presencia de ZnCl<sub>2</sub>, los resultados demostraron que el valor de MIC para el control sin sales y para las dos concentraciones más bajas de sal (25 µM y 50 µM) se encontraba entre 6.25 µM y 3.125 µM. Sin embargo, a la concentración de 100 µM de ZnCl<sub>2</sub> el valor de MIC se encontraba desplazado hacia 3.125 µM y 1.56 µM. Estos datos sugieren que la actividad antimicrobiana de Lv-RR32 se veía mejorada en presencia de ZnCl<sub>2</sub> a concentraciones de 100 µM (Tabla 7) (Figura 9).

Con estos resultados, se puede observar que la presencia de CuSO<sub>4</sub> y ZnCl<sub>2</sub> a concentraciones de 100 µM mejoró la actividad antimicrobiana del péptido Lv-RR32 contra *S. aureus*, desplazando el valor de MIC de 6,125 µM a 3,125 µM (Tabla 6 y 7) (Figura 8 y 9). El recuento de colonias en los dos experimentos fue de  $9.5 \times 10^4$  ufc/ml.

**Tabla 6.** Efecto antimicrobiano de LV-RR32 contra *S. aureus* en presencia de CuSO<sub>4</sub>. La diferencia significativa entre diferentes diluciones del péptido se refleja como las primeras letras del abecedario, mientras que la diferencia significativa de las diluciones de la sal se refleja como las ultimas letras del abecedario. EE significa Error Estándar

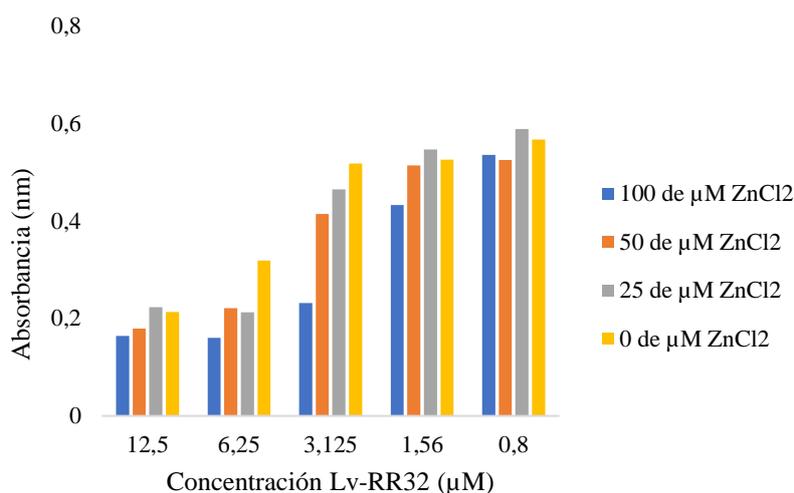
Concentración de CuSO <sub>4</sub> (µM)	Concentración de Lv-RR32 (µM)						EE
	12,5	6,25	3,125	1,56	0,8		
100	0.164 <sup>a</sup>	0.167 <sup>a,x</sup>	0.328 <sup>a,x</sup>	0.504 <sup>b</sup>	0.531 <sup>b</sup>	0.038	
50	0.183 <sup>a</sup>	0.181 <sup>a,x</sup>	0.378 <sup>b,x</sup>	0.524 <sup>b</sup>	0.525 <sup>b</sup>	0.037	
25	0.229 <sup>a</sup>	0.293 <sup>a,y</sup>	0.561 <sup>b,y</sup>	0.499 <sup>b</sup>	0.482 <sup>b</sup>	0.032	
0	0.245 <sup>a</sup>	0.383 <sup>b,y</sup>	0.569 <sup>b,y</sup>	0.599 <sup>b</sup>	0.612 <sup>b</sup>	0.038	
EE	0.010	0.024	0.033	0.020	0.024		



**Figura 8.** Representación gráfica del efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *S. aureus* en presencia de diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>, los datos corresponden a la Tabla 6.

**Tabla 7.** Efecto antimicrobiano de LV-RR32 contra *S. aureus* en presencia de ZnCl<sub>2</sub>. La diferencia significativa entre diferentes diluciones del péptido se refleja como las primeras letras del abecedario, mientras que la diferencia significativa de las diluciones de la sal se refleja como las ultimas letras del abecedario. EE significa Error Estándar.

Concentración de ZnCl <sub>2</sub> (μM)	Concentración de Lv-RR32 (μM)					EE
	12,5	6,25	3,125	1,56	0,8	
100	0.164 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.231 <sup>a,x</sup>	0.432 <sup>b</sup>	0.535 <sup>b</sup>	0.038
50	0.179 <sup>a</sup>	0.221 <sup>a</sup>	0.414 <sup>b,y</sup>	0.513 <sup>b</sup>	0.524 <sup>b</sup>	0.036
25	0.223 <sup>a</sup>	0.212 <sup>a</sup>	0.464 <sup>b,y</sup>	0.546 <sup>b</sup>	0.588 <sup>b</sup>	0.039
0	0.213 <sup>a</sup>	0.318 <sup>a</sup>	0.517 <sup>b,y</sup>	0.525 <sup>b</sup>	0.566 <sup>b</sup>	0.035
EE	0.007	0.020	0.036	0.019	0.021	



**Figura 9.** Representación gráfica del efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *S. aureus* en presencia de diferentes concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>, los datos corresponden a la Tabla 7.

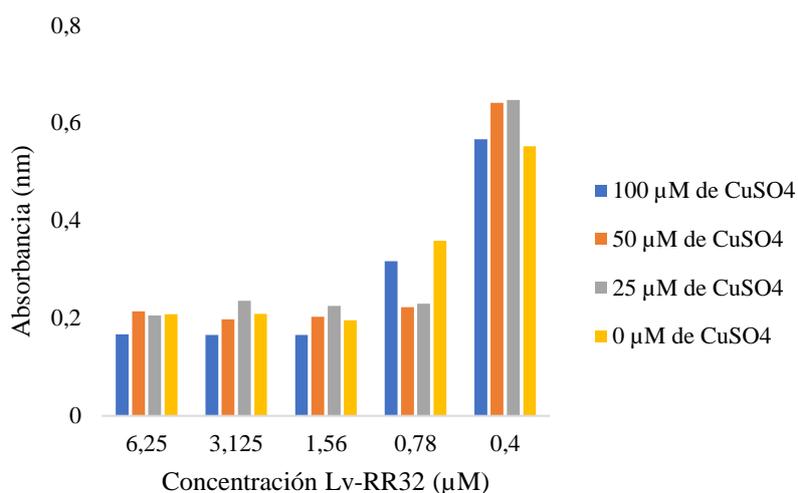
Seguidamente se estudió la actividad antimicrobiana de Lv-RR32 contra *E. coli* en presencia de CuSO<sub>4</sub>. Los datos demostraron que el valor de MIC para control sin sales y para la concentración de 100 µM de CuSO<sub>4</sub> se encontraba en el rango de 1.56 µM y 0.8 µM. Sin embargo, para las concentraciones de 25 µM y 50 µM de CuSO<sub>4</sub> el crecimiento bacteriano se veía reducido, sin llegar al valor MIC, hacia el rango 0.8 µM y 0.4 µM. Esto sugiere que la actividad antimicrobiana de Lv-RR32 contra *E. coli* se veía mejorada en presencia de CuSO<sub>4</sub> a concentraciones de 25 µM y a 50 µM (Tabla 8) (Figura 10).

Por último, se realizó un experimento para evaluar la actividad antimicrobiana de Lv-RR32 contra *E. coli* en presencia de ZnCl<sub>2</sub>. En este caso, el valor de MIC para el control sin sales y para las tres concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> se encontraba entre 0.8 µM y 0.4 µM. Lo que sugiere que la actividad antimicrobiana de Lv-RR32 contra *E. coli* no se veía alterada en presencia de ZnCl<sub>2</sub> (Tabla 9) (Figura 11).

Basándonos en estos resultados, se observó que la presencia de CuSO<sub>4</sub> a 25 µM y a 50 µM mejoraba la actividad antimicrobiana de Lv-RR32 contra *E. coli*, reduciendo el crecimiento bacteriano, sin llegar al valor de MIC ya que el valor disminuye, pero no llega a los valores mínimos (hacia una concentración 0.4 µM). Sin embargo, la presencia de ZnCl<sub>2</sub> no alteró el efecto antimicrobiano de Lv-RR32 contra *E. coli*, ya que el valor de MIC no variaba (Tabla 8 y 9) (Figura 10 y 11). El conteo de las colonias no fue igual para ambos experimentos. En presencia de CuSO<sub>4</sub> el conteo fue de 1.05 x 10<sup>6</sup> ufc/ml y en presencia de ZnCl<sub>2</sub> fue de 6.4 x 10<sup>4</sup>. Esto explica las diferencias del valor MIC en el control sin sales en ambos experimentos.

**Tabla 8.** Efecto antimicrobiano de LV-RR32 contra *E. coli* en presencia de CuSO<sub>4</sub>. La diferencia significativa entre diferentes diluciones del péptido se refleja como las primeras letras del abecedario, mientras que la diferencia significativa de las diluciones de la sal se refleja como las últimas letras del abecedario. EE significa Error Estándar

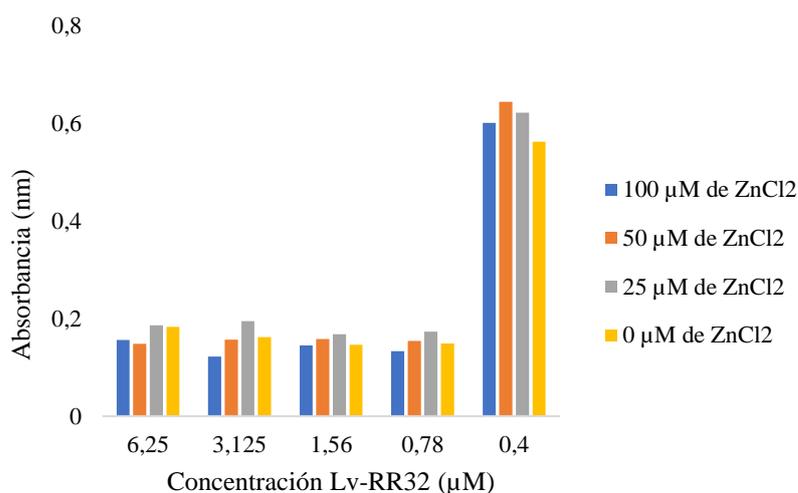
Concentración de CuSO <sub>4</sub> (µM)	Concentración de Lv-RR32 (µM)						EE
	6,25	3,125	1,56	0,78	0,4		
100	0.167 <sup>a</sup>	0.166 <sup>a</sup>	0.166 <sup>a</sup>	0.317 <sup>b</sup>	0.567 <sup>c</sup>	0.038	
50	0.214 <sup>a</sup>	0.198 <sup>a</sup>	0.203 <sup>a</sup>	0.223 <sup>a</sup>	0.641 <sup>b</sup>	0.040	
25	0.206 <sup>a</sup>	0.236 <sup>a</sup>	0.225 <sup>a</sup>	0.230 <sup>a</sup>	0.647 <sup>b</sup>	0.039	
0	0.208 <sup>a</sup>	0.209 <sup>a</sup>	0.196 <sup>a</sup>	0.359 <sup>b</sup>	0.552 <sup>c</sup>	0.033	
EE	0.008	0.009	0.009	0.022	0.014		



**Figura 10.** Representación gráfica del efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>, los datos corresponden a la Tabla 8.

**Tabla 9.** Efecto antimicrobiano de LV-RR32 contra *E. coli* en presencia de ZnCl<sub>2</sub>. La diferencia significativa entre diferentes diluciones del péptido se refleja como las primeras letras del abecedario, mientras que la diferencia significativa de las diluciones de la sal se refleja como las ultimas letras del abecedario. EE significa Error Estándar.

Concentración de ZnCl <sub>2</sub> (μM)	Concentración de Lv-RR32 (μM)					EE
	6,25	3,125	1,56	0,78	0,4	
100	0.156 <sup>a</sup>	0.122 <sup>a,x</sup>	0.145 <sup>a</sup>	0.133 <sup>a</sup>	0.601 <sup>b,x</sup>	0.043
50	0.148 <sup>a</sup>	0.157 <sup>a,y</sup>	0.158 <sup>a</sup>	0.154 <sup>a</sup>	0.644 <sup>b,x</sup>	0.045
25	0.186 <sup>a</sup>	0.195 <sup>a,y</sup>	0.168 <sup>a</sup>	0.173 <sup>a</sup>	0.622 <sup>b,x</sup>	0.041
0	0.183 <sup>a</sup>	0.162 <sup>a,y</sup>	0.146 <sup>a</sup>	0.149 <sup>a</sup>	0.562 <sup>b,y</sup>	0.037
EE	0.007	0.008	0.005	0.005	0.010	

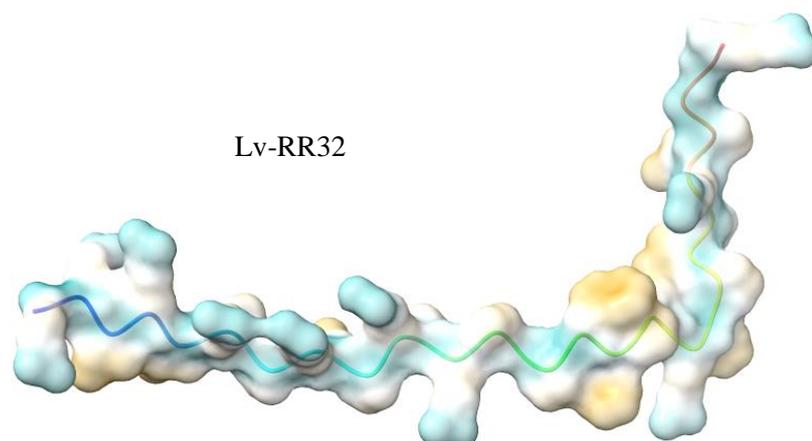


**Figura 11.** Representación gráfica del efecto antimicrobiano de Indolicidina contra *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>, los datos corresponden a la Tabla 9.

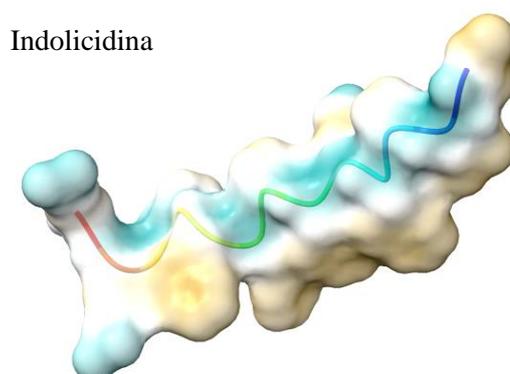
### 4.3. Análisis bioinformático

Realizamos un análisis bioinformático de las catelicidinas de interés para tratar de complementar los resultados obtenidos experimentalmente. Primero modelamos ambos péptidos para determinar sus estructuras secundarias y terciarias, permitiéndonos estudiar ciertas características estructurales y propiedades fisicoquímicas. Se modeló cada péptido con AlphaFold. Obtuvimos el modelo de Lv-RR32 (Figura 12A) y de Indolicidina (Figura 12B) en formato PDB (Protein Data Bank). Como vemos, ambos péptidos no presentan una estructura secundaria ordenada mediante puentes de hidrógeno, por lo que su estructura es desordenada. El péptido Indolicidina es más compacto, debido a su menor tamaño, mientras que el péptido Lv-RR32 tiene una estructura más alargada y muestra una torsión, inducida por la arginina R22, que está flanqueada por una prolina y una fenilalanina del extremo C-terminal (Figura 12).

**A**



**B**



**Figura 12.** Modelos estructurales de AlphaFold de las dos catelicidinas estudiadas; Indolicidina y Lv-RR32. Se utilizó el software ChimeraX para la visualización de las estructuras. La estructura terciaria del péptido se muestra en combinación con la hidrofobicidad, como superficie transparente. Todos los modelos utilizados fueron clasificados-1 por el servidor AlphaFold. (A) Modelado de estructura terciaria de Lv-RR32. (B) Modelado de estructura terciaria de Indolicidina.

A continuación, se compararon las propiedades fisicoquímicas de ambas catelicidinas, Indolicidina y Lv-RR32, mediante los servidores ProtParam (Tabla 10) y AVPpred (Figura 13). Los resultados demostraron que, además de las diferencias en la estructura terciaria descritas anteriormente, ambos péptidos presentan diferencias en su polaridad, siendo la Indolicidina más hidrofóbico en comparación con el Lv-RR32. Sin embargo, ambos péptidos presentan mayor carga positiva.

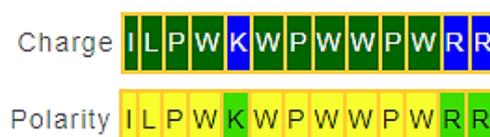
**Tabla 10.** Propiedades fisicoquímicas de los péptidos antimicrobianos; peso molecular (PM), pI, índice alifático y gran promedio de hidropaticidad (GRAVY), obtenidos mediante la herramienta bioinformática “ProtParam” (<https://web.expasy.org/protparam/>).

	PM	pI	Índice alifático	GRAVY
<b>Lv-RR32</b>	4035.95	13.00	60.94	-1.403
<b>Indolicidina</b>	1907.30	12.01	60.00	-1.069

**A**



**B**



**Figura 13.** Representación de la carga y polaridad en la secuencia de aminoácidos de péptidos antimicrobianos. Representando la carga positiva en azul y la negativa en rojo, y en cuanto a la polaridad, los aminoácidos hidrofóbicos se reflejan en color amarillo y los hidrofílicos en color verde. (A) corresponde al péptido Lv-RR32. (B) corresponde al péptido Indolicidina. Resultados obtenidos a través del servidor AVPpred (<http://crdd.osdd.net/servers/avppred/index.html>).

El siguiente paso fue someter a ambas secuencias a herramientas bioinformáticas para la predicción de sus actividades antimicrobianas. El servidor produce uno de los dos valores predictivos: valor predictivo positivo (PPV) para los péptidos previstos como activos y el valor predictivo negativo (NPV) para los péptidos previstos como no activos. Teniendo en cuenta que, en cuanto a la actividad frente a los eritrocitos humanos, los péptidos no activos se consideran positivos (PPV) y los péptidos activos se consideran negativos (NPV). Según estas predicciones, el péptido Indolicidina presentaría la actividad antibacteriana más potente contra *S. aureus* con un valor predictivo de 0.56 (VPP),

mientras que Lv-RR32 solo sería activo contra *E. coli* con un valor predictivo de 0.84 (PPV). Además, según esta herramienta de predicción, la Indolicidina tendría actividad antifúngica, ya que es activo contra *C. albicans*, actividad contra levaduras por ser activo contra *S. cerevisiae* y sería positivo frente a eritrocitos humanos. Sin embargo, Lv-RR32 solo tendría cierta antibacteriana frente a *E. coli* (Tabla 11).

**Tabla 11.** Predicción bioinformática de la actividad biológica contra microorganismos específicos. La herramienta bioinformática (Base de datos de actividad antimicrobiana y estructura de péptidos (DBAASP) predijo la susceptibilidad de los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, eritrocitos humanos, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Sacharomyces cerevisiae* a los péptidos antimicrobianos de interés. Los valores predictivos indican si los péptidos son activos (PPV) o no activos (NPV), sienta al revés para la actividad contra los eritrocitos humanos

	<b>Indolicidina</b>		<b>Lv-RR32</b>	
<i>E. coli</i>	0.51 (NPV)	No activo	0.84 (PPV)	Activo
<i>P. aeruginosa</i>	0.51 (PPV)	Activo	0.62 (NPV)	No activo
<i>K. pneumonia</i>	1 (NPV)	No activo	0.78 (NPV)	No activo
<i>S. aureus</i>	0.56 (VPP)	Activo	0.72 (NPV)	No activo
<i>Bacillus subtilis</i>	0.76 (NPV)	No activo	0.76 (NPV)	No activo
<i>C. albicans</i>	0.76 (PPV)	Activo	0.91 (NPV)	No activo
<i>S. cerevisiae</i>	0.83 (PPV)	Activo	0.80 (NPV)	No activo
<b>Eritrocitos humanos</b>	0.99 (NPV)	Activo	0.62 (PPV)	No activo

A continuación, estudiamos la posible influencia de las propiedades anfipáticas y las estructuras terciarias de los péptidos en la interacción con las membranas biológicas. Para ello, sometimos los modelos de Indolicidina y Lv-RR32 obtenidos por AlphaFold al servidor OPM, una herramienta bioinformática de estudio de la disposición espacial de las estructuras proteicas en bicapas lipídicas (Figura 13). En cuanto al péptido Lv-RR32 el ángulo de inclinación era de  $74 \pm 3^\circ$ , la profundidad o espesor hidrofóbico de  $3.5 \pm 0.9$  Å y las posiciones de los residuos que interaccionarían con la membrana simulada serían 3,5,8,10 (Figura 13A). Por otro lado, para el péptido Indolicidina, el ángulo de inclinación



## 5. Discusión

La aplicación de péptidos antimicrobianos (PAMs) en el ámbito clínico es prometedora, se ha propuesto como una alternativa a los antibióticos convencionales ante la aparición de cepas multirresistentes, gracias a su actividad antimicrobiana [24]. Además, se ha demostrado que algunos PAMs ayudan a neutralizar las endotoxinas y a reducir la respuesta inflamatoria gracias sus propiedades inmunomoduladoras [25]. La presencia de iones metálicos divalentes, en este caso  $Zn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , puede mejorar la actividad antimicrobiana de algunos PAMs, mediante la acción de quelantes que evitan el crecimiento de microorganismos en presencia de metales o cambiando la estructura y carga de los péptidos, alterando su modo de acción y, por lo tanto, su actividad antimicrobiana [26]. En este trabajo hemos investigado la interacción de los iones divalente zinc y cobre con dos catelicidinas de mamíferos, la Indolicidina de vaca y el péptido Lv-RR32 derivado de la catelicidina del delfín de agua dulce (*Lipotes vexillifer*).

Ciertos PAMs inhiben el crecimiento bacteriano a través del secuestro de iones metálicos, desempeñando un papel crucial en la inmunidad nutricional. Algunos ejemplos son la calprotectina, que posee dos sitios de unión a metales con alta afinidad al  $Zn^{2+}$  [11] o la microplusina, que redujo drásticamente su actividad antimicrobiana en presencia de iones de  $Cu^{2+}$ , ya que la unión de cobre por este PAM hace que el metal no esté disponible para la bacteria, ejerciendo su efecto antibacteriano [27]. Sin embargo, esto no ocurre en las catelicidinas estudiadas en este trabajo, pues los iones metálicos divalentes se han incorporado *in vitro*, es decir, no eran nutrientes esenciales de las bacterias.

En este trabajo, tras modelar la estructura tridimensional de los dos péptidos Indolicidina y Lv-RR32, ambos péptidos no eran capaces de retener los iones zinc y cobre en su estructura. Sin embargo, esto no impide que la interacción de los péptidos con estos iones pueda inducir cambios conformacionales en su estructura que alteren de alguna forma su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, la Indolicidina, debido a su estructura y a su pequeño tamaño, tiene un modo de acción específico con múltiples mecanismos: desde la inhibición de la síntesis de ADN, la unión directa a sitios de ADN o el entrecruzamiento de ADN [11]. Su objetivo es la membrana citoplasmática, para ello la Indolicidina supera la membrana externa en las bacterias Gramnegativas [28], lo que implica un desplazamiento de cationes divalentes de sus sitios de unión en la superficie de LPS y, como consecuencia, la permeabilización de la membrana. En nuestro caso, la actividad

antimicrobiana de la Indolicidina frente a *S. aureus* mejora en presencia de las sales metálicas de zinc y cobre, a concentraciones de equimolaridad. El zinc es normalmente bacteriostático, pero a concentraciones muy altas pueden tener efecto bactericida [29], la formación de complejos dependientes de  $Zn^{2+}$  provoca la despolarización de la membrana y, como consecuencia, la muerte bacteriana [11]. Sin embargo, para la bacteria Gramnegativa *E. coli*, la actividad antimicrobiana de la Indolicidina no se ve alterada en presencia de dichas sales metálicas.

Otros péptidos como la clavinina A mejoran su actividad antimicrobiana en presencia de iones de  $Zn^{2+}$ , que regulan la escisión del ADN [11]. La clavinina A puede adquirir una conformación helicoidal, la presencia de  $Zn^{2+}$  permite reducir el espacio configuracional y reducir la pérdida de entropía, facilitando la penetración de la membrana por el efecto hidrofóbico. Esta unión permite el aumento de la carga positiva neta en la región C-terminal del péptido, acercándolo a la membrana hasta que entran en contacto. En nuestro estudio desconocemos el mecanismo de acción de la Indolicidina frente a *S. aureus* respecto a este metal, aunque es posible que, similarmente a la clavinina A, la interacción de la Indolicidina con  $Zn^{2+}$  favorezca el plegamiento y establezca su configuración actuando como un péptido básico. Cuando vuelve a estar estable, el  $Zn^{2+}$  se separaría del péptido provocando una deformación lateral de la membrana, permitiendo que la Indolicidina se inserte de forma transmembrana a la bicapa, de igual forma que ocurre con la clavinina A [30].

En la interacción con membranas simuladas, hemos visto, que la Indolicidina se inserta en la membrana atravesándola totalmente, lo que apoyaría esta hipótesis.

Por otro lado, la actividad antimicrobiana de Lv-RR32 mejora a concentraciones más altas de sales.

Nuevamente, en nuestro trabajo desconocemos el posible mecanismo implicado en la actividad antimicrobiana del péptido, junto al metal, pero es posible la unión de este catión divalente altere la conformación del péptido y potencie la unión del péptido a la membrana [29]. Otro ejemplo de un péptido antimicrobiano que mejora su actividad en presencia de zinc es la kappacina, producido por la k-caseína en la leche bovina. Se ha demostrado que la presencia de  $Zn^{2+}$  reduce el crecimiento de las bacterias oral, inhibiendo enzimas bacterianas al interactuar con grupos sulfhidrilo. También las

histatinas son unos péptidos antimicrobianos que se unen a cobre y zinc. Esta unión induce una estabilización estructural que conduce a la fusión de las membranas, a través de la dimerización de los péptidos, y la desestabilización de la bicapa lipídica [31].

En nuestro caso, el modelado del péptido Lv-RR32 y el posterior análisis de su posible interacción con membranas parece que esta interacción es más débil que con la Indolicidina, a juzgar por el menor número de residuos que interaccionan con las membranas simuladas y que el péptido no termina de atravesar la misma.

Demegen P-113 es un fragmento pequeño de la histamina 5 que posee tres residuos de His, que favorecen la unión fuerte al  $\text{Cu}^{2+}$  [32]. Ninguno de los péptidos estudiados, Indolicidina y Lv-RR32, tienen residuos de histidina, lo que explicaría la menor interacción de los mismos con las sales de cobre. Aunque también se ha sugerido que la interacción con los iones metálicos participa en la actividad antimicrobiana de la histatinas a través del estrés oxidativo inducido por los metales [31]. Las piscidinas son otro grupo de PAMs derivados de peces y ricos en histidinas. Penetran en la membrana y están potencialmente unidas a metales [2]. Sin embargo, estos péptidos de peces interaccionan directamente con el  $\text{Cu}^{2+}$ , que regula las funciones inmunológicas del péptido. Se ha demostrado que los péptidos metalizados son más antimicrobianos, mejorando la actividad antimicrobiana contra el ADN y las membranas [33].

La exposición al cobre induce alteraciones de la membrana, provocando el daño oxidativo de los lípidos de la bicapa por peroxidación, la pérdida de la integridad de la membrana y la muerte celular. [11,27]. Se ha atribuido la actividad antibacteriana del cobre a su capacidad de liberar especies iónicas, que desencadenan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando estrés oxidativo. Debido a su elevada toxicidad, un aumento en sus niveles de ROS altera la homeostasis intracelular, induciendo estrés oxidativo a una amplia variedad de patógenos. Esto provoca la destrucción de macromoléculas celulares y, por consecuencia, la muerte celular bacteriana [4,34]. El cobre produce radicales hidroxilo por su potencial redox [35].

Sin embargo, en nuestro caso, ambos péptidos no son capaces de unir metales, a juzgar por los resultados de la predicción bioinformática y por la ausencia de residuos de histidina.

El uso de iones metálicos podría llegar a mejorar la actividad antimicrobiana de algunas catelicidinas como las estudiadas en este trabajo. Sin embargo, son necesarios más estudios e investigaciones para intentar confirmar el mecanismo de acción, siempre tratando de evitar la toxicidad y los efectos secundarios negativos de los metales.

## 6. Conclusiones

- La presencia de sales  $\text{CuSO}_4$  y de  $\text{ZnCl}_2$  a una concentración de  $25 \mu\text{M}$  disminuyen la concentración mínima inhibitoria del péptido Indolicidina frente a *S. aureus*.
- La actividad antimicrobiana *in vitro* de la Indolicidina no se ve alterada en presencia de  $\text{CuSO}_4$  y de  $\text{ZnCl}_2$  frente a *E. coli*.
- La presencia de  $\text{CuSO}_4$  y de  $\text{ZnCl}_2$ , a una concentración de  $100 \mu\text{M}$ , disminuyen la concentración mínima inhibitoria del péptido Lv-RR32 frente *S. aureus*
- Frente *E. coli*, la concentración mínima inhibitoria de Lv-RR32 disminuye en presencia de  $\text{CuSO}_4$  a concentraciones de  $25 \mu\text{M}$  y  $50 \mu\text{M}$ . Sin embargo, no se ve alterada en presencia de  $\text{ZnCl}_2$ .
- El análisis bioinformático de los péptidos Indolicidina y Lv-RR32 no predice la unión de los metales  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  a los mismos.
- En la simulación de la interacción con membranas, el péptido Indolicidina se introduciría en éstas a una mayor profundidad que el péptido Lv-RR32, interaccionando con un mayor número de aminoácidos.

## 7. Bibliografía

1. Thennarasu S, Tan A, Penumatchu R, Shelburne CE, Heyl DL, Ramamoorthy A. Antimicrobial and membrane disrupting activities of a peptide derived from the human cathelicidin antimicrobial peptide ll37. *Biophys J.* 2010;98(2):248-257. doi:10.1016/j.bpj.2009.09.060
2. Łoboda D, Kozłowski H, Rowińska-Zyrek M. Antimicrobial peptide-metal ion interactions-a potential way of activity enhancement. *New J Chem.* 2018;42(10):7560-7568. doi:10.1039/c7nj04709f
3. Bechinger B, Juhl DW, Glattard E, Aisenbrey C. Revealing the Mechanisms of Synergistic Action of Two Magainin Antimicrobial Peptides. *Front Med Technol.* 2020;2(December):1-16. doi:10.3389/fmedt.2020.615494
4. Andrés Juan C, Manuel Pérez de la Lastra J, Plou FJ, Pérez-Lebeña E, Reinbothe S. Molecular Sciences The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci.* 2021;22:4642. <https://doi.org/10.3390/ijms>
5. Chromek M, Slamová Z, Bergman P, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med.* 2006;12(6):636-641. doi:10.1038/nm1407

6. Pérez de la Lastra JM, Asensio-Calavia P, González-Acosta S, Baca-González V, Morales-Delanuez A. Bioinformatic analysis of genome-predicted bat cathelicidins. *Molecules*. 2021;26(6):1-16. doi:10.3390/molecules26061811
7. Shang D, Liu Y, Jiang F, Ji F, Wang H, Han X. Synergistic Antibacterial Activity of Designed Trp-Containing Antibacterial Peptides in Combination With Antibiotics Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Front Microbiol*. 2019;10(November):1-15. doi:10.3389/fmicb.2019.02719
8. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun*. 1999;67(11):6084-6089. doi:10.1128/iai.67.11.6084-6089.1999
9. A. Boto, J. M. P. De La Lastra, and C. C. González, The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs. *Molecules*. 2018;23,(2). doi: 10.3390/molecules23020311
10. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*. 2020;11(October):1-21. doi:10.3389/fmicb.2020.582779
11. Portelinha J, Duay SS, Yu SI, et al. Antimicrobial peptides and copper(II) ions: Novel therapeutic opportunities. *Chem Rev*. 2021;121(4):2648-2712. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00921
12. A. Miller et al. Zn-enhanced asp-rich antimicrobial peptides: N-terminal coordination by Zn(II) and Cu(II), which distinguishes Cu(II) binding to different peptides. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22,(13). doi: 10.3390/ijms22136971
13. Hancock REW, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):8856-8861. doi:10.1073/pnas.97.16.8856
14. Ruff KM, Pappu R V. AlphaFold and Implications for Intrinsically Disordered Proteins. *J Mol Biol*. 2021;433(20):167208. doi:10.1016/j.jmb.2021.167208
15. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
16. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold - Making protein folding accessible to all. *bioRxiv*. Published online 2022:2021.08.15.456425.
17. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci*. 2021;30(1):70-82. doi:10.1002/pro.3943
18. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the Expasy Server. John M. Walker: The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. 2005;1:571-607
19. Thakur N, Qureshi A, Kumar M. AVPPred: collection and prediction of highly effective antiviral peptides. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jul;40(Web Server issue):199-204. doi: 10.1093/nar/gks450.
20. Pirtskhalava M, Amstrong AA, Grigolava M, et al. DBAASP v3: Database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D288-D297. doi:10.1093/nar/gkaa991
21. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. OPM database and PPM web server: Resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(D1). doi:10.1093/nar/gkr703
22. Chih-Hao L, Yu-Feng L, Jau-Ji L, Chin-Sheng Y. Predicción de sitios de unión de iones metálicos en proteínas mediante el método de transformación de fragmentos, PLOS ONE, 2012, 7(6), e39252
23. Yu-Feng L, Chih-Wen C, Chung-Shiuan S, Jenn-Kang H, Chin-Sheng Y, Chih-Hao L. MIB: servidor de acoplamiento y predicción del sitio de unión de iones metálicos, J. Chem. información Modelo, 2016, 56(12), 2287 -2291

24. Cárdenas J, Castillo O, De Cámara C, González V. Combatiendo la resistencia bacteriana: una revisión sobre las terapias alternas a los antibióticos convencionales. *Bol venez infectol*. 2018;29(1):11-19. <http://fi-admin.bvsalud.org/document/view/crh2h>
25. Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock REW, Falla TJ. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7):2921-2927. doi:10.1128/AAC.49.7.2921-2927.2005
26. Moulahoum H. Metal Binding Antimicrobial Peptides in Nanoparticle Bio-functionalization : New Heights in Drug Delivery and Therapy. Published online 2020:48-63.
27. Silva FD, Rezende CA, Rossi DCP, et al. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34735-34746.
28. Falla TJ, Nedra Karunaratne D, Hancock REW. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J Biol Chem*. 1996;271(32):19298-19303. doi:10.1074/jbc.271.32.19298
29. Dashper SG, O'Brien-Simpson NM, Cross KJ, et al. Divalent metal cations increase the activity of the antimicrobial peptide kappacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2322-2328. doi:10.1128/AAC.49.6.2322-2328.2005
30. Duay SS, Sharma G, Prabhakar R, Angeles-boza AM, May ER. Molecular Dynamics Investigation into the Effect of Zinc(II) on the Structure and Membrane Interactions of the Antimicrobial Peptide Clavanin A. 2019;(ii). doi:10.1021/acs.j
31. Melino S, Santone C, Di Nardo P, Sarkar B. Histatins: Salivaryx peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs Perspectives for biomedical applications. *FEBS J*. 2014;281(3):657-672. doi:10.1111/febs.12612
32. Kulon K, Valensin D, Kamysz W, et al. The His-His sequence of the antimicrobial peptide demegen P-113 makes it very attractive ligand for Cu<sup>2+</sup>. *J Inorg Biochem*. 2008;102(4):960-972. doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.12.021
33. Kim SY, Zhang F, Gong W, et al. Copper regulates the interactions of antimicrobial piscidin peptides from fish mast cells with formyl peptide receptors and heparin. *J Biol Chem*. 2018;293(40):15381-15396. doi:10.1074/jbc.RA118.001904
34. Camarena JJ, Sánchez R. INFECCIÓN POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA. *Control Calid SEIMC*. Published online 1999:1-4. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>
35. Vincent M, Duval RE, Hartemann P, Engels-Deutsch M. Contact killing and antimicrobial properties of copper. *J Appl Microbiol*. 2018;124(5):1032-1046. doi:10.1111/jam.13681