

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ACTIVIDAD DE AGENTES CATIONICOS
EN *Brucella abortus* Y *Brucella ovis***

**Tesis sometida a la consideración de la
Comisión del Programa de Estudios de Posgrado
en Biología para optar al grado
de Magister Scientiae**

Javier Pizarro Cerda

Ciudad Universitaria 'Rodrigo Facio' Costa Rica

1994

*'La naturaleza es una triste cosa, sin colores ni sonidos ni fragancias:
todos esos atributos son puramente humanos'*
Ernesto Sábato. 'El escritor y sus fantasmas'

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, quiero agradecer profundamente la ayuda de Sonia Hernández, quien me apoyó tanto académica como espiritualmente durante mis primeros tiempos en el programa de Maestría.

A mi tutor, Edgardo Moreno, quien ha sido un maestro y un amigo dentro como fuera del laboratorio, mi más especial agradecimiento. A Magaly Caballero por ofrecermé las facilidades de su laboratorio y su ayuda en todo momento. A José Bonilla y a Pedro León por aceptar gentilmente involucrarse en este proyecto.

A Edgar Bolaños, por su amistad y su ejemplo de excelencia en el trabajo de laboratorio. A mis biólogos amigos Johnny y Mahmood por sus valiosas discusiones respecto al quehacer en la ciencia y el arte. A mis no biólogos amigos Felipe y Mauricio por su apoyo permanente.

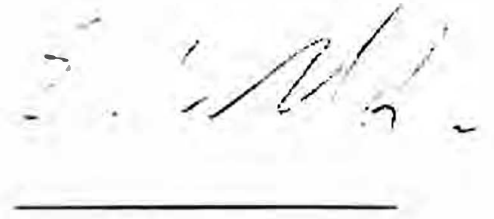
A Julieta Carranza por su benevolencia desde la dirección del Posgrado en Biología, sin la cual no habría sido posible terminar esta tesis.

A todo el personal de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional que de una u otra forma me brindaron su cooperación, gracias.

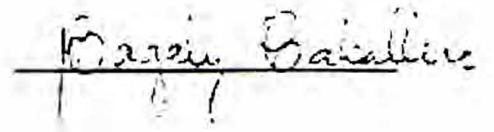
A todos, muchas gracias.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae.

Dr. Edgardo Moreno Robles
Tutor de la Tesis



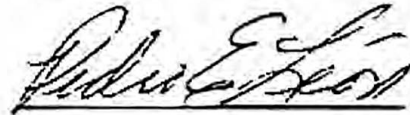
MSc. Magaly Caballero Castillo
Profesora Consejera



Dr. José Bonilla Vargas
Profesor Consejero



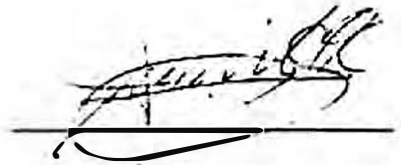
Dr. Pedro León Azofeifa
Profesor Consejero



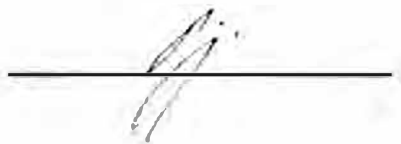
Dra. Yamileth González García
Decana del SEP



Dr. Alvaro Morales Ramírez
Director del SEP Escuela de Biología



Javier Pizarro Cerda
Postulante



INDICE

	Página
RESUMEN	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	
El género <i>Brucella</i>	2
La envoltura celular de <i>Brucella</i>	2
Peptidoglicano	3
Proteínas	3
Lípidos	4
Lipoproteína	4
Polisacáridos	4
Lipopolisacáridos	4
Agentes que incrementan la permeabilidad de la membrana externa	
Polimixina	5
Mellitina	6
Defensinas	8
Cecropinas	11
Magaininas	14
Bactenecinas	16
Polímeros de lisina y ornitina	17
Lactoferrina y lactoferricina B	17
Fosfolipasas A miotóxicas	19
Lisozima	20
Proteínas catiónicas antimicrobianas	22
Ácido etilendiaminotetracético	23
Trisamina	24
JUSTIFICACION	25
OBJETIVOS	26

MATERIALES Y METODOS	
Cultivo de las bacterias	27
Ensayo de acción bactericida	27
Ensayo de zonas de inhibición y determinación de concentración letal	29
Acople de agentes microbicidas a bacterias	29
Acople de agentes microbicidas al LPS	31
Acople de agentes microbicidas a fragmentos de envoltura celular, 'blebs' o antígeno salino	31
Sensibilización de bacterias	31
Análisis estructural de miotoxininas	32
RESULTADOS	
Ensayo de acción bactericida	33
Ensayo de zonas de inhibición y determinación de concentración letal	35
Acople de agentes microbicidas a bacterias	40
Acople de agentes microbicidas al LPS	42
Acople de agentes microbicidas a fragmentos de envoltura celular, 'blebs' o antígeno salino	45
Sensibilización de bacterias	47
Análisis estructural de miotoxininas	48
DISCUSION	51
CONCLUSIONES	62
PERSPECTIVAS	63
BIBLIOGRAFIA	64
APENDICE 1	
Lecturas turbidimétricas	91
APENDICE 2	
Modelo matemático para el cálculo de concentraciones letales	92
APENDICE 3	
Método para identificar el caracter hidropático de una proteína	95
APENDICE 4	
Método para determinar el potencial helicoidal de una proteína	97

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue estudiar la sensibilidad de *Brucella* a una serie de péptidos catiónicos y determinar el papel que juega la molécula de lipopolisacárido (LPS) en las interacciones con estos agentes. Determiné que la cepa lisa de *B. abortus* S19, el mutante rugoso *B. abortus* 45/20 y la cepa rugosa natural *B. ovis* REO 198 fueron más resistentes a la acción de los agentes microbicidas que *Escherichia coli* excepto en un caso, en el que el crecimiento de *B. ovis* fue inhibido en forma completa por el péptido batenecina 7 (1-35). Informo por primera vez de una acción permeabilizante en bacterias por parte de fosfolipasas A miotóxicas de vipéridos y de la acción bactericida de la miotoxinina I, péptido derivado de la miotoxinina II de *Bothrops asper*. La membrana de *Brucella* acopló menos cantidad de péptidos microbicidas, aunque en los ensayos de zonas de inhibición las moléculas probadas presentaron un efecto bacteriostático sobre el parásito intracelular. Las brucelas de morfología rugosa fueron más sensibles a la acción de los péptidos catiónicos que las brucelas de morfología lisa, presentando también concentraciones letales más bajas. *B. ovis* fue a su vez más sensible que *B. abortus* 45/20. El LPS de *Salmonella montevideo* unió más moléculas bactericidas que los LPS de las diferentes brucelas. El LPS de *B. ovis* acopló menos polimixina B y lactoferricina B que el LPS de *B. abortus* S19. El antígeno salino de *B. ovis* acopló más péptidos catiónicos que los "blebs" de *B. abortus* S19 o fragmentos de envoltura celular de *B. abortus* 45/20. El LPS de *S. montevideo* sensibilizó en mayor grado a *B. abortus* 45/20 frente a la acción de diversos agentes que el LPS de *B. abortus* S19, el cual ejerció por el contrario un efecto protector. En esta tesis concluyo que en *Brucella* no está presente la vía de autopromoción, que el LPS determina parcialmente la resistencia a este mecanismo pero no es la única molécula involucrada, y que *Brucella ovis* presenta una membrana externa que difiere del patrón de otras brucelas rugosas, donde el acople de agentes microbicidas está determinado por proteínas del grupo 3.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Actividad antibacterial de los agentes catiónicos.

Cuadro 2: Concentraciones letales de los agentes catiónicos.

Cuadro 3: Actividad antibacterial de los agentes catiónicos al sensibilizar a *B. abortus* 45/20 con lipopolisacáridos.

Cuadro 4: Lecturas turbidimétricas y correspondencia en número de unidades formadoras de colonias para *E. coli*.

Cuadro 5: Lecturas turbidimétricas y correspondencia en número de unidades formadoras de colonias para *Brucella*.

Cuadro 6: Índice de hidropaticidad para aminoácidos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de la membrana externa de una bacteria gram negativa.

Figura 2: Estructura de la polimixina B.

Figura 3: A. Secuencia de la melitina.
B. Proyección axial de la melitina.

Figura 4: A. Dibujo esquemático del monómero de melitina.
B. Forma en que se empacan las unidades de melitina para formar el tetrámero en solución acuosa.

Figura 5: A. Secuencia de la defensina NP-2 de conejo.
B. Modelo espacial compacto del dímero formado por la defensina HNP-3.

Figura 6: A. Representación esquemática del dímero de defensinas.
B. Hipótesis de cuña.
C. Hipótesis del canal dímérico.
D. Hipótesis del poro general.

Figura 7: A. Secuencias de la cecropina A (aislada de *Hyalophora cecropia*) y la cecropina P1 (aislada de cerdo)
B. Modelo espacial compacto del dímero hipotético de cecropinas que interactúan con membranas.

Figura 8: A. Esquema de la configuración tridimensional de la cecropina A.
B. Proyección de la hélice amino terminal de la cecropina A.

- **Figura 9.** A. Secuencia de la magainina 2.
B. Proyección de la hélice formada por la magainina 2.

- Figura 10.** Modelo del mecanismo de acción de las maganininas.
- Figura 11.** **A.** Secuencia de los péptidos Bac 5 (0-31) y Bac 7 (1-35).
B. Estructura secundaria de las bacterenecinas 5 y 7.
- Figura 12.** **A.** Secuencia de la lactoferricina B.
B. Estructura esquemática del lóbulo amino terminal de la lactoferrina humana.
- Figura 13.** **A.** Secuencia de la miotoxina II de *Bothrops asper*.
B. Diagrama esquemático de la miotoxina II de *B. asper*.
- Figura 14.** **A.** Secuencia de la lisozima aviar.
B. Diagrama esquemático de la lisozima de ganso.
- Figura 15.** Secuencia del péptido CAP18A.
- Figura 16.** **A.** Fórmula estructural del EDTA.
B. Dibujo esquemático de dos moléculas de EDTA unidas a un átomo de plomo.
- Figura 17.** Ensayo de zonas de inhibición.
A. Polimixina B sulfato.
B. Lactoferricina B.
- Figura 18.** Ensayo de zonas de inhibición.
A. Bacterenecina 5 (0-31).
B. Bacterenecina 7 (1-35).
- Figura 19.** Ensayo de zonas de inhibición
A. Poli-L-lisina.
B. Poli-L-ornitina.
- Figura 20.** Ensayo de zonas de inhibición
A. Proteína catiónica antimicrobiana 18A.
B. Melitina.

- Figura 21.** Acople de agentes microbicidas a bacterias.
A. Defensina NP-2.
B. Lactoferricina B.
- Figura 22.** Acople de agentes microbicidas a bacterias.
A. Polimixina B sulfato.
B. Melitina.
- Figura 23.** Acople de agentes microbicidas al LPS.
A. Cecropina A.
B. Cecropina P1.
C. Magainina 2 amida.
- Figura 24.** Acople de agentes microbicidas al LPS.
A. Melitina.
B. Proteína catiónica antimicrobiana 18A.
- Figura 25.** Acople de agentes microbicidas al LPS.
A. Polimixina B sulfato.
B. Lactoferricina B.
- Figura 26.** Ensayo de acople a envoltura celular, "blebs" o antígeno salino.
A. Melitina.
B. Proteína catiónica antimicrobiana 18A.
- Figura 27.** Ensayo de acople a envoltura celular, "blebs" o antígeno salino.
A. Polimixina B sulfato.
B. Lactoferricina B.
- Figura 28.** Nivel de hidropaticidad de las miotoxininas I y II
- Figura 29.** **A.** Secuencia de la miotóxina I.
B. Proyección axial de la miotóxina I.
- Figura 30.** **A.** Secuencia de la miotóxina II.
B. Proyección axial de la miotóxina II.
- Figura 31.** Modelo de la envoltura celular de *Brucella*.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- BPI:** *Bactericidal/permeability increasing* (Bactericida e incrementador de permeabilidad).
- CAP:** *Cationic antimicrobial protein* (Proteína antimicrobiana catiónica).
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético.
- HNP:** *Human natural peptide* (Péptido humano natural).
- Kd:** Kilodaltons.
- Kdo:** Ácido manooctulosónico.
- LPS:** Lipopolisacárido.
- NP:** *Natural peptide* (Péptido natural).
- OmpA:** *Outer membrane protein A* (Proteína de membrana externa A).
- UFC:** Unidades formadoras de colonias.

INTRODUCCION

La brucelosis es una enfermedad animal y una zoonosis que provoca anualmente graves pérdidas económicas alrededor del mundo (Pérez et al. 1993). La brucelosis humana es una de las seis enfermedades bacterianas más comunes en el planeta (Alberts 1985) siendo su distribución en los países del tercer mundo más amplia que en los países desarrollados (Benenson 1987). A pesar de los notables avances que se han realizado en la comprensión de los mecanismos utilizados por los organismos huéspedes en el control de la infección (Nicoletti & Winter 1990, Sutherland & Searson 1990) existen todavía muchas interrogantes en cuanto a la biología básica del agente etiológico. En particular, se desconoce sobre los aspectos genéticos y estructurales que han permitido el éxito de *Brucella* como parásito intracelular. En este trabajo estudié las características de la membrana externa de *Brucella*, evaluando su respuesta al ataque de una nueva generación de antibióticos catiónicos aislados de taxones diversos y que probablemente han estado por mucho tiempo a lo largo de la evolución en los organismos que los presentan como una primera barrera de defensa contra agentes patógenos, entre ellos un péptido nunca antes descrito, derivado de la mitoxina II de *Bothrops asper*. El comportamiento de *Brucella* ante esta nueva generación de antibióticos nos permitirá entender más acerca de las propiedades particulares de su membrana y sobre la acción bactericida de estas moléculas.

REVISION DE LITERATURA

EL GENERO *Brucella*

Los miembros del género *Brucella* (Corbel & Brinley-Morgan 1984) son parásitos facultativos intracelulares de fagocitos (Riley & Robertson 1984), trofoblastos (Anderson & Cheville 1986) y células no fagocíticas (Detilleux et al. 1990). Infectan a una variedad amplia de mamíferos (Ewalt et al. 1993), con capacidad para producir diseminación generalizada (Canning 1990) seguida de localización en órganos reproductores y sistema reticuloendotelial (Enright 1990).

Las brucelas son cocobacilos gram negativos, aerobios, quimioorganotrofos, con crecimiento óptimo a 37°C en presencia de CO₂ (Moyer et al. 1991). Poseen dos cromosomas independientes (Michaux et al. 1993). Carecen de cápsulas, flagelos, fimbrias, pili, plásmidos, bacteriófagos lisogénicos y formas de resistencia (Meyer 1990). Además no producen exotoxinas y su lipopolisacárido es de baja endotoxicidad (Rasool et al. 192).

A pesar de la existencia de argumentos divergentes respecto a la taxonomía del género (Verger et al. 1985), se reconocen actualmente seis especies: *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, y *B. canis*, utilizando como criterios de clasificación la especificidad por huéspedes, susceptibilidad a tintes, patrones metabólicos, caracterización de fagos, muestreo serológico y análisis de ADN (Meyer 1990). Estudios en ARN ribosomal y lípidos revelan una estrecha relación filogenética con individuos de la subdivisión alfa-2 de la clase Proteobacteria (Moreno et al. 1990). Los mecanismos patogénicos desarrollados por *Brucella* sugieren una prolongada asociación evolutiva entre el parásito y su hospedero natural (Moreno 1992).

LA ENVOLTURA CELULAR DE *Brucella*

Brucella posee topológicamente una envoltura celular similar a la observada en otras bacterias gram-negativas (Figura 1), con la presencia de una membrana citoplasmática, un espacio periplásmico, una capa de

peptidoglicano y una membrana externa (Lugtenberg & van Alphen 1983). Sin embargo, presenta a nivel de composición características que la hacen única respecto a las enterobacterias y otras bacterias gram negativas no relacionadas (Cherwonogrodzky et al. 1990).

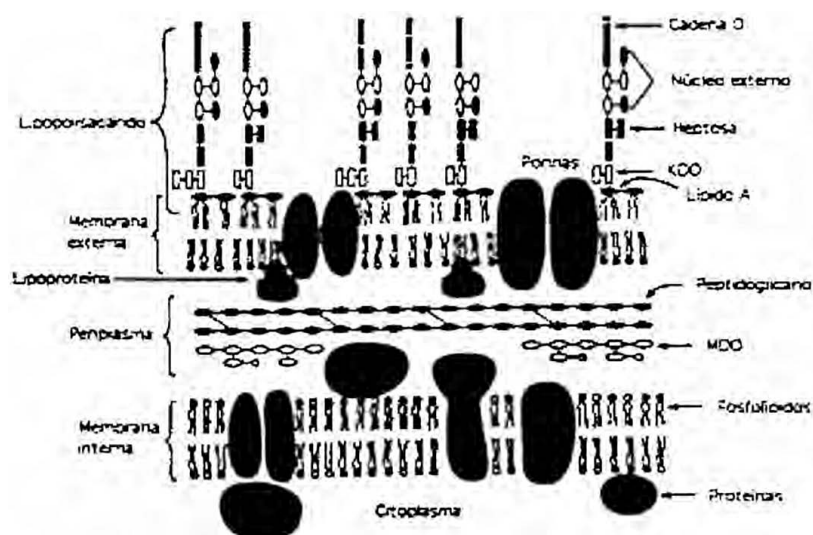


Figura 1. Representación esquemática de la membrana externa de una bacteria gram negativa. Ovalos y rectángulos muestran azúcares. Círculos muestran los grupos polares de fosfolípidos. MDO son oligosacáridos derivados de membrana y KDO es ácido 3-desoxy-D-mannooctulosónico (Tomado de Raetz 1990).

Péptidoglicano

Se ubica en el espacio periplásmico y se compone de unidades de glucosamina y ácido murámico unidos por cadenas cortas de alanina, ácido glutámico y ácido diaminopimélico (Corbel 1990). Aunque la secuencia exacta de las subunidades no se conoce en *Brucella*, no parece diferir del patrón conservado de enterobacterias (Caballero 1984).

Proteínas

La envoltura celular de *Brucella* muestra proteínas semejantes a las conservadas en otras bacterias gram negativas (Winter 1987). Las proteínas del grupo 1 poseen pesos moleculares que varían entre 88-94 Kd, han sido sobreamente caracterizadas y su función es desconocida (Verstrete et al. 1982). Las proteínas del grupo 2 son porinas, tienen pesos que varían entre 35-43 Kd y constituyen el principal componente proteico de la pared celular en

Brucella (Douglas et al 1984) Proteínas el grupo 3 poseen pesos entre 25-30 Kd. son el equivalente de la OmpA de *Escherichia coli* (Behr et al 1980) y contribuyen aparentemente a mantener la integridad de la pared celular (Gamazo et al. 1993).

Lípidos

Entre los fosfolípidos se encuentran fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, lisofosfatidiletanolamina (Kreutzer & Robertson 1979) así como un raro constituyente de membrana en bacterias, fosfatidilcolina (Gamazo & Moriyón 1987). Los principales lípidos neutros son ubiquinona Q₁₀, diglicéridos, ésteres cerosos, monoésteres acilos de etilenglicol y lípidos de ornitina (Thiele & Schwinn 1973). Entre los ácidos grasos detectados se encuentran ácido palmítico, el ácido palmitoléico, el ácido cis-vaccénico, ácido esteárico, ácido mirístico y el ácido lactobacílico, presente principalmente en gram positivas (Thiele et al. 1969).

Lipoproteína

En *Brucella* se detecta la presencia de una lipoproteína unida en forma covalente a la matriz de peptidoglicano (Gómez-Miguel & Moriyón 1986) y a diferencia de otras enterobacterias, esta molécula está expuesta en la superficie celular (Gómez-Miguel et al. 1987).

Polisacárido

El polisacárido reconocido en *Brucella* es el hapteno nativo, un polímero compuesto de unidades de N-formilperosamil semejante a la cadena del LPS (Moreno et al. 1987a y resultados sin publicar) el cual se ubica en la membrana externa asociado al LPS de manera no covalente (Moreno y Moriyón, manuscrito en preparación).

Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) está constituido estructuralmente por una cadena de polisacárido denominada 'O', por un oligosacárido central y por un ácido denominado 'A' que permite el anclaje de toda la estructura a la membrana externa (Bundle et al. 1987a, Moreno et al. 1987b). Representa uno de los principales componentes que contribuyen a mantener la barrera de

permeabilidad en la membrana externa (Labischinski et al. 1985). La cadena O está constituida en *B. abortus* por residuos de 4,6-didesoxi- α -D-manopiranosil unidos en posiciones 1,2 (Caroff et al. 1984) mientras que en *B. melitensis* la cadena se constituye de unidades de cinco residuos, cuatro unidos en posiciones α -1,2 y uno en posición α -1,3 (Bundle et al. 1987b). El oligosacárido central está constituido por quinovosamina, glucosamina, manosa, glucosa, ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico (Bowser et al. 1974, Moreno et al. 1984) y carece de heptosas (Caroff et al. 1984, Moreno et al. 1981). El lípido A es una molécula mixta ya que además de poseer el residuo glucosamina presente en muchas enterobacterias, posee también residuos de 2,3-diaminoglucosa (Mayer et al. 1986, Moreno et al. 1990). Los ácidos grasos asociados al lípido A son de cadena larga tanto saturados como hidroxilados (Moreno et al. 1990).

El LPS es una molécula heterogénea tanto a nivel de carga y peso (Sowa et al. 1986) como a nivel de densidad epitópica (Rojas 1992). Esta heterogeneidad es detectable en lípido A (Freer 1990) así como en el oligosacárido central y en la cadena O (Freer et al. 1994).

El LPS de *Brucella* posee una diversidad de actividades biológicas (Berman & Kurtz 1987, Moreno 1983 y 1990) entre las que destacan actividad mitogénica para células normalmente insensibles a endotoxina (Moreno & Berman 1979) y actividad adyuvante (Moreno et al. 1984). Su toxicidad es baja en comparación al LPS de enterobacterias (Golstein et al. 1992, Rasool et al. 1992).

AGENTES QUE INCREMENTAN LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA EXTERNA

La membrana externa de las bacterias gram negativas representa una barrera efectiva contra una variedad grande de sustancias nocivas (Nikaido & Vaara 1985). El LPS, molécula que constituye uno de los principales soportes para la estabilidad de esta membrana (Labishinsky et al. 1985), es a su vez el punto sobre el cual actúan muchos agentes de carácter hidrofóbico que incrementan la permeabilidad de esta envoltura (Gabay 1994, Vaara 1992).

Polimixina

La polimixina es un lipopéptido pentacatiónico anfipático aislado de *Bacillus polymyxa* y se caracteriza por poseer un anillo heptapeptídico (Figura 2) con un alto porcentaje del residuo ácido 2,4-diaminobutírico y un ácido graso acoplado al péptido a través de un enlace amida (Storm et al.1977).

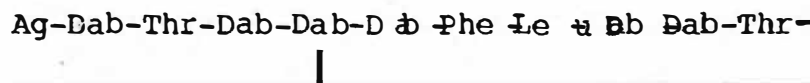


Figura 2. Estructura de la polimixina B. Se muestra el anillo heptapeptídico. Ag indica 'ácido graso'. Dab representa 'ácido diamino-butírico' (Tomado de Vaara 1992).

Otras moléculas aisladas del *Bacillus polymyxa* con propiedades microbicidas son las octapeptinas, la brevistina, la estendomicina, la polipeptina y la cerexina (Storm et al. 1977).

La polimixina presenta actividad microbicida contra hongos, protozoarios, bacterias gram negativas y gram positivas (Storm et al. 1977). Desafortunadamente es tóxica para células animales, lo que restringe su uso terapéutico (Corriveau & Danner 1993). En eritrocitos tratados con LPS la actividad parece estar relacionada con un acople iónico inicial a la molécula de LPS (Moore et al. 1986), seguido por la inserción del ácido graso en la membrana lipídica (Carr & Morrison 1985). Esta interacción produce alteraciones morfológicas en la membrana externa de gram negativas (Schindler & Teuber 1975), así como altera su permeabilidad (Vaara & Vaara 1981) siendo esta actividad dependiente del voltaje de la membrana (Shröder et al. 1992). Compuestos derivados de la polimixina sin el extremo lipídico conservan la capacidad permeabilizante (Vaara & Vaara 1983a) pero carecen de poder microbicida (Vaara & Viljanen 1985).

Melitina

La melitina aislada del veneno de la abeja *Apis mellifera* es un péptido de 26 aminoácidos (Figura 3A), anfifílico, con una secuencia básica en su extremo carboxilo (Bernheimer & Rudy 1986, Dempsey 1990, Dempsey & Butler 1992). Se conforma de dos hélices α (Figura 4A) separadas por un segmento de dos aminoácidos (Terwilliger & Eisenberg 1982a y b) aunq e

bajo presión puede adaptar la estructura de una lámina β (Ahmed et al. 1992). Es soluble como tetrámero (Figura 4B) y constituye un 50% del peso seco del veneno (Habermann 1977).

Posee efectos microbicidas sobre algunas bacterias gram negativas (Groisman et al. 1992). El mecanismo de acción de la melitina incluye la asociación electrostática a membranas (Otsuda et al. 1992, Shi et al. 1993) y formación de poros dependientes de voltaje (Hanke et al. 1983), pero la dinámica del proceso que involucra la formación de estos poros se está empezando a dilucidar y está lejos de conocerse claramente (Schwarz et al. 1992).

A

1 10
Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-
20
Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Glu-Glu

B

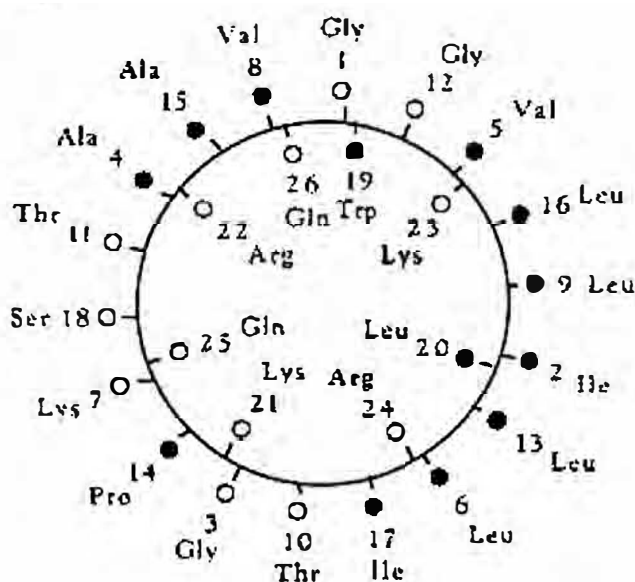


Figura 3. A. Secuencia de la melitina. B. Proyección axial de la melitina. Los círculos negros indican residuos hidrofóbicos. Los círculos claros muestran residuos hidrofílicos (Adaptado de Dempsey 1990).

La melitina es conocida principalmente por su actividad hemolítica (Hider et al. 1983), aunque también se sabe que es capaz de potenciar fosfolipasas (Lunes et al. 1977), actuar como alérgeno (King et al. 1976), promover la fusión

de membranas (Murata et al. 1987), activar eosinófilos (Kroegel et al. 1990) e inhibir la adsorción de algunos virus (Baghian & Kousoulas 1993).

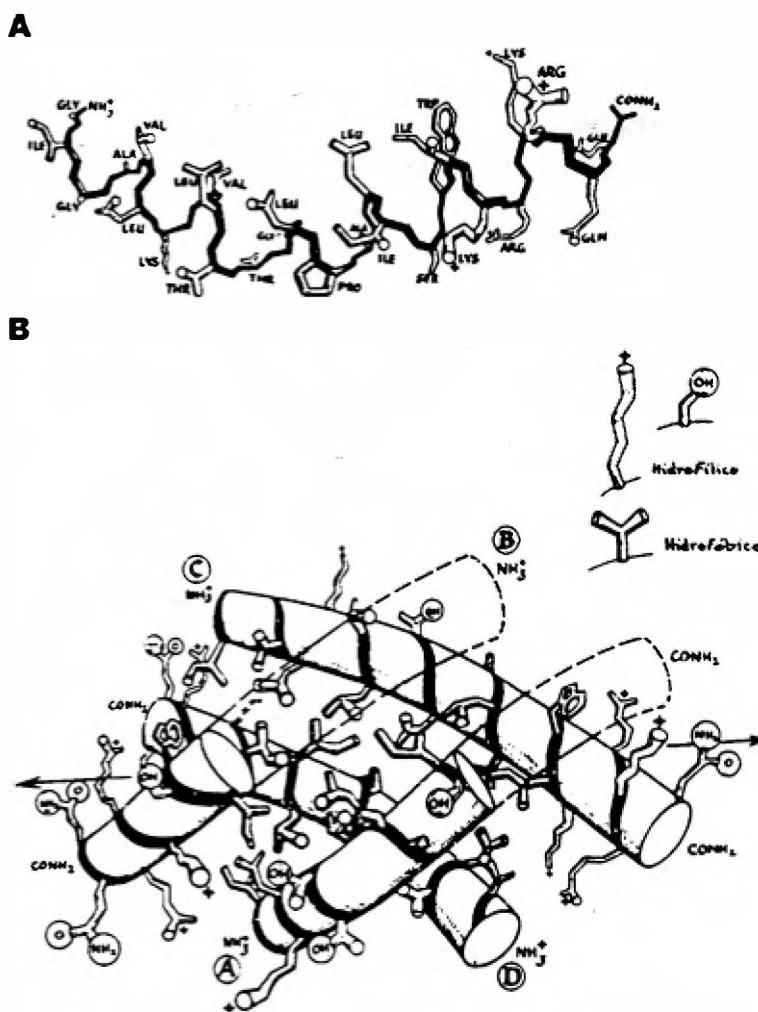


Figura 4. A. Dibujo esquemático del monómero de melitina. B. Forma en que se empacan las unidades de melitina para formar el tetrámero en solución acuosa (Tomado de Terwiliger & Eisenberg 1982).

Defensinas

Las defensinas son péptidos catiónicos ricos en arginina aislados de los gránulos azurófilos de fagocitos de mamíferos, con un número de residuos que oscila entre 29-35 aminoácidos (Figura 5A) y peso molecular que varía entre 3500-4000 (Spitznagel 1990, Lehrer & Ganz 1990 y 1992, Lehrer et al. 1991 y 1993). Poseen seis cisteínas conservadas dentro del grupo que forman tres

enlaces disulfuro intramoleculares, uno de los cuales convierte al péptido en un compuesto cíclico (Selsted & Harwig 1989). Tridimensionalmente adoptan una estructura de láminas β rígidas sin hélices α intercaladas (Figura 5B) y cristalizan en forma de dímero (Hill et al. 1991). En neutrófilos humanos representan del 30 al 50% del contenido protéico de los gránulos secundarios (Rice et al. 1987). Se originan como moléculas de preprodefensinas que se modifican postraduccionalmente para formar el péptido maduro (Valore & Ganz 1992). La evolución de estas moléculas se explica a través de duplicación génica (Ganz et al. 1989). Originalmente descubiertas en polimorfonucleares de cuillos (Zeya & Spitznagel 1966), fueron después localizadas en macrófagos pulmonares de conejos (Patterson-Delafield et al. 1980 y 1981), para ser posteriormente detectadas en neutrófilos humanos (Ganz et al. 1985, Selsted et al. 1985b) y de rata (Eisenhauer et al. 1989). Actualmente se conocen al menos treinta defensinas en mamíferos entre las que se ubican la criptidina, aislada tanto de células del intestino delgado humano (Jones & Bevins 1992 y 1993) como de ratón (Eisenhauer et al. 1992) y las β defensinas, aisladas de neutrófilos en bovinos (Selsted et al. 1993, Tang & Selsted 1993).

A

```

1                               10
Val-Val-Cys-Ala-Cys-Arg-Arg-Arg-Ala-Leu-Cys-Leu-Pro-
                               20
Leu-Pro-Leu-Glu-Arg-Arg-Ala-Gly-Phe-Cys-Arg-Ile-Arg-
                               30
Gly-Arg-His-Pro-Leu-Cys-Cys-Arg-Arg

```

B



Figura 5. A. Secuencia de la defensina NP-2 de conejo. **B.** Modelo espacial compacto del dímero formado por la defensina HNP-3 (Tomado de Hill et al. 1991).

Las defensinas poseen un espectro microbicida amplio: actúan sobre hongos (Selsted et al. 1985a), espiroquetas (Borenstein et al. 1991), micobacterias (Ogata et al. 1992), gram negativas (Viljanen et al. 1988) y especialmente contra gram positivas (Selsted et al. 1984). El mecanismo de acción parece radicar en una permeabilización de la membrana externa en gram negativas (Figura 6) a través de un acople inicial a moléculas de LPS (Sawyer et al. 1988), formando luego canales iónicos dependientes de voltaje, como se ha demostrado en membranas lipídicas planas (Kagan et al. 1990).

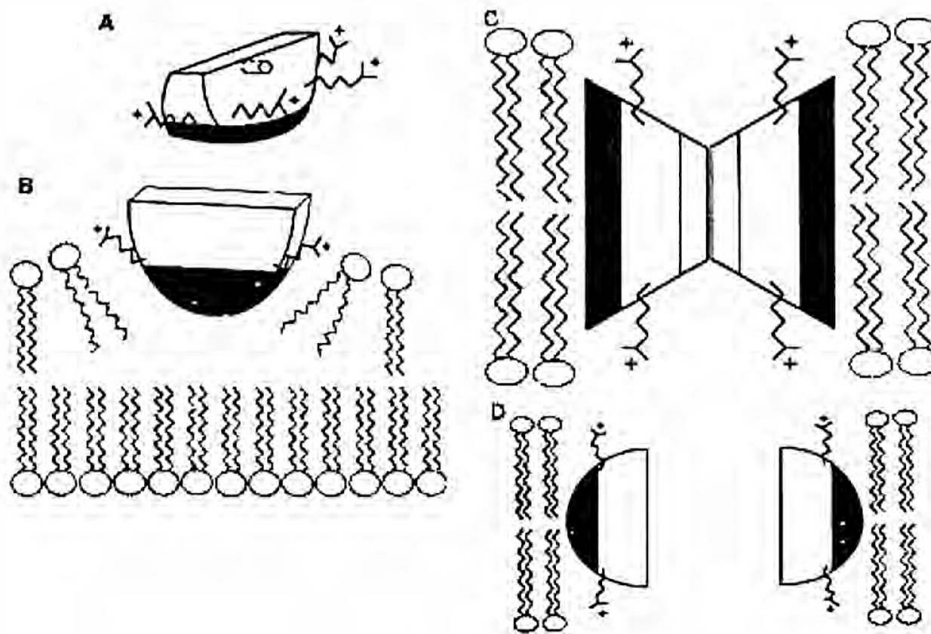


Figura 6. A. Representación esquemática de un dímero de defensinas. La parte superior es hidrofílica, la base sombreada es hidrofóbica. Seis residuos de arginina se distribuyen alrededor del centro. Se indica el minicanal solvente que se forma en medio de los monómeros. B. Hipótesis de cuña: la superficie hidrofóbica del dímero se incrusta en una bicapa lipídica, desestabilizando la membrana. C. Hipótesis del canal dímérico: la asociación de dos dímeros a través de sus superficies hidrofílicas permite la orientación de los minicanales en un plano perpendicular al de la membrana. D. Hipótesis del poro general: al menos cuatro dímeros se requieren para formar un poro. (Tomado de Hill et al. 1991).

El efecto letal se constituye en una permeabilización de la membrana interna del organismo atacado (Lehrer et al. 1989). Se ha demostrado actividad citotóxica por parte de las defensinas sobre células tumorigénicas en ratón (Sheu et al. 1985) y sobre linfocitos y polimorfonucleares en humanos (Lichtenstein et al. 1986), a través de un mecanismo que incluye acople

electrostático a las células (Lichtenstein et al. 1988), permeabilización de la membrana plasmática (Lichtenstein 1991) y posiblemente daño al ADN (Gera & Lichtenstein 1991). Entre otras propiedades, se encuentra que las defensinas son quimotácticas para monocitos (Territo et al. 1989), mitogénicas para células epiteliales y fibroblastos (Murphy et al. 1993), corticostáticas en rata (Fuse et al. 1993) y promueven la fusión de membranas cargadas negativamente (Fujii et al. 1993). Incluso se observa que pueden inactivar algunos virus (Nakashima et al. 1993).

En el díptero *Phormia terranova* se detectaron una serie de péptidos que se denominaron 'defensinas de insectos' (Lambert et al. 1989) por presentar similitudes con las defensinas reconocidas en mamíferos: tienen entre 38 y 43 residuos de aminoácidos, son moderadamente catiónicos, no son glicosilados, y tienen seis residuos invariables de cisteína que conforman tres enlaces disulfuro intramoleculares (Hoffmann & Hetru 1992). Sin embargo, después se observaron diferencias notables que hicieron abandonar la idea de un origen homólogo entre ambos grupos de péptidos: no existe consenso en cuanto a secuencias y tridimensionalmente las estructuras difieren, al poseer las defensinas en insectos una hélice α que separa dos láminas β (Bonmatin et al. 1992, Lepage et al. 1990). Actúan predominantemente sobre bacterias gram positivas mediante la formación de canales dependientes de voltaje al igual que las defensinas en mamíferos (Cociancich et al. 1993a). Estas moléculas se han logrado aislar actualmente tanto de dípteros (Matsuyama & Natori 1988) como de odonatos y coleópteros (Bulet et al. 1991 y 1992). En escorpiones se encuentran defensinas que sí parecen poseer un origen homólogo al de los péptidos de insectos (Cociancich et al. 1993b).

Cecropinas

Las cecropinas fueron originalmente identificadas como péptidos antibacteriales aislados de la hemolinfa de la mariposa *Hyalophora cecropia* (Steiner et al. 1981). Poseen entre 31 y 39 residuos de aminoácidos (Figura 7A), no presentan cisteínas, y tienen una región amino terminal muy básica con una larga porción hidrofóbica en el extremo carboxilo (Boman 1991, Boman et al. 1991, Boman & Hultmark 1987). Tridimensionalmente constituyen dos hélices α (Figura 8A) unidas por una región bisagra (Sipos et al. 1992). Se originan como prececropinas (Boman et al. 1989, Schlenstedt et al. 1992).

expresándose el péptido maduro en hemocitos y en cuerpo graso (Kato *et al.* 1993) luego de desafío "inmunológico" (Merrifield *et al.* 1982) o abrasión epicuticular de pupas (Brey 1993). Duplicaciones génicas parecen haber determinado el origen de las diferentes cecropinas (Tanai *et al.* 1992).

A

	1	10
Cecropina A	Lys-Trp-Lys-Leu-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-	
	20	
	Asn-Ile-Arg-Asp-Gly-Ile-Ile-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Val-	
	30	
	Ala-Val-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-Gln-Ile-Ala-Lys-NH ₂	
	1	10
Cecropina P1	Ser-Tyr-Leu-Ser-Lys-Thr-Ala-Lys-Lys-Leu-Glu-Asn-Ser-	
	20	
	Ala-Lys-Lys-Arg-Ile-Ser-Glu-Gly-Ile-Ala-Ile-Ala-Ile-	
	30	
	Gln-Gly-Gly-Pro-Arg	

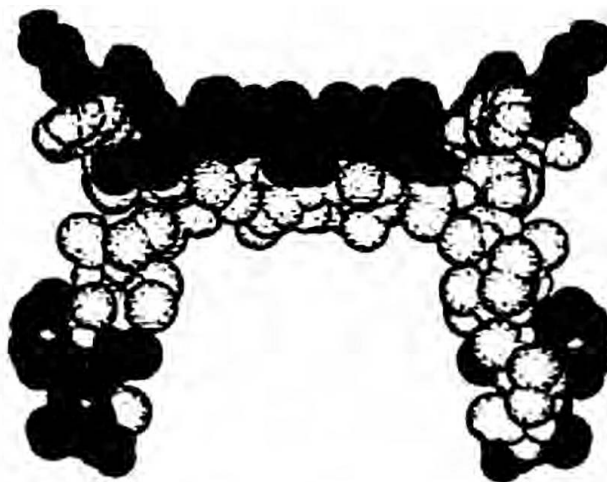
B

Figure 7. A. Secuencias de la cecropina A (aislada de *Hyalophora cecropia*) y la cecropina P1 (aislada de cerdo). B. Modelo espacial compacto del dímero hipotético de cecropinas que interactúa con membranas. Los residuos hidrofílicos están sombreados (Tomado de Durell *et al.* 1992).

Las cecropinas se han aislado también de los lepidópteros *Antheraea pernyi* (Qu *et al.* 1982), *Bombyx mori* (Teshima *et al.* 1986) y *Manduca sexta* (Chadwick & Dunphy 1986), conociéndose en estos dos últimos como ecidopterano y bactericidina respectivamente, mientras que en el díptero

Sarcophaga peregrina se conoce la cecropina con el nombre de sarcotoxina (Okada & Natori 1984 y 1985). Recientemente se han encontrado cecropinas en cerdo (Agerverth et al. 1991, Lee et al. 1989).

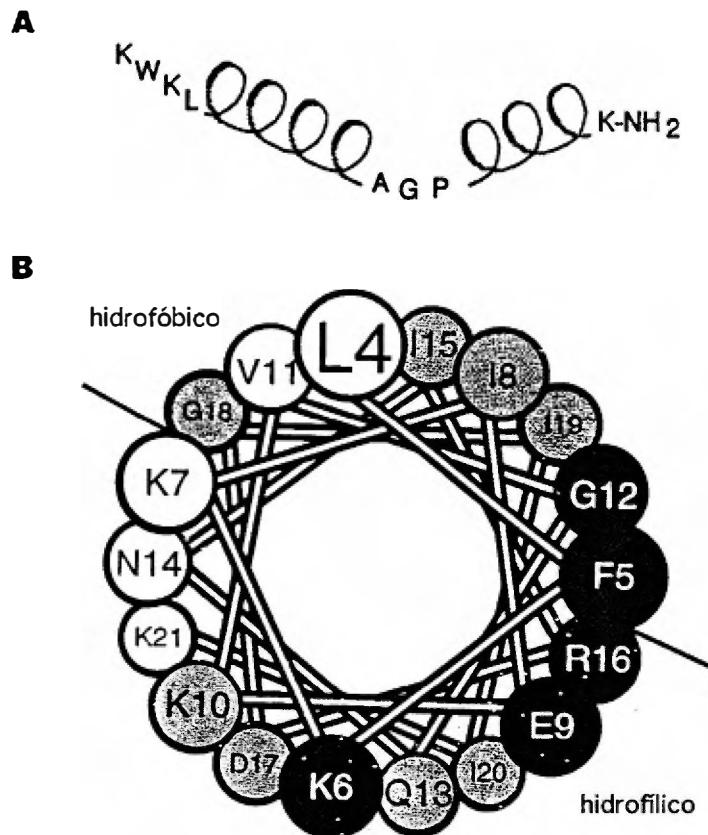


Figura 8. A. Esquema de la configuración tridimensional de la cecropina A. Se muestran las dos hélices separadas por la región bisagra (Tomado de Boman et al. 1991). B. Proyección de la hélice amino terminal de la cecropina A. Los residuos conservados en las diferentes cecropinas en insectos son negros. Los residuos en sitios de sustituciones conservativas son grises (Tomado de Durell et al. 1992).

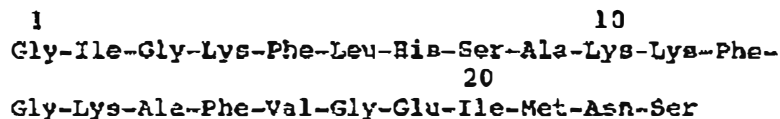
Las cecropinas no actúan sobre células eucariotas (Steiner et al. 1981), pero sí sobre bacterias tanto gram negativas como gram positivas (Hultmark et al. 1982). De acuerdo a ensayos efectuados en membranas lipídicas planares, el mecanismo de acción de las cecropinas se debe a la formación de canales iónicos dependientes de voltaje que pueden eventualmente permeabilizar las membranas de bacterias (Christensen et al. 1988, Durell et al. 1992). La formación de una hélice anfifílica en el extremo amino (Andreu et al. 1985) y la integridad química en el extremo carboxilo (Callaway et al. 1993) son

indispensables para la formación de estos poros, que no actúan en forma catalítica (Wade et al. 1990), sino más bien en forma estequiométrica (Steiner et al. 1988). Además de la acción permeabilizante, las cecropinas llevan a cabo su acción letal por un mecanismo que impide la síntesis de proteínas y ADN (Boman et al. 1993).

Magaininas

Las magaininas son péptidos aislados del anfibio *Xenopus laevis* (Chopra 1993, Zasloff 1987). Las dos magaininas aisladas hasta el momento poseen 23 residuos de aminoácidos (Figura 9A), no contienen cisteínas, son catiónicas y tienen característicamente una serina en el extremo carboxilo y una glicina en el extremo amino (Bevins & Zasloff 1990). Poseen la capacidad de adoptar una estructura secundaria anfipática (Giovannini et al. 1987) conformando una hélice α (Figura 9B) (Chen et al. 1988, Williams et al. 1990).

A



B

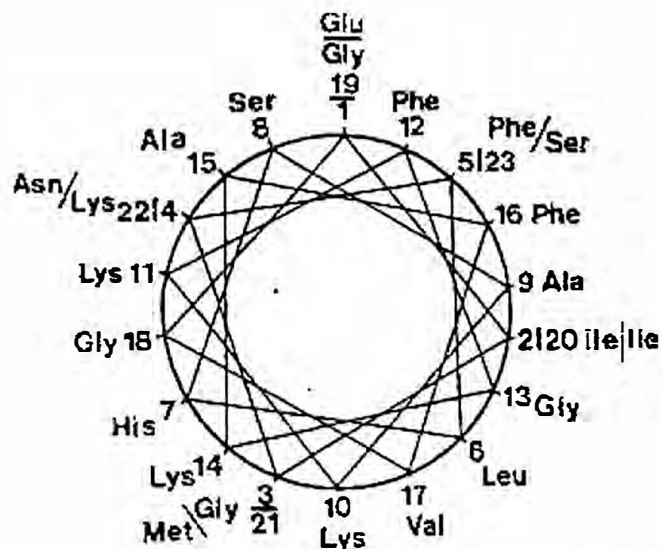


Figura 9. A. Secuencia de la magainina 2. B. Proyección axial de la hélice formada por la magainina 2 (Tomado de Terry et al. 1988).

Se forman a partir de un solo precursor que da origen a los dos péptidos (Terry et al. 1988), que se expresan tanto en las glándulas granulares de la piel (Sadler et al. 1992) así como en células granulares del estómago de *Xenopus* (Moore et al. 1991). Dentro de la familia de las magaininas también se han clasificado otros péptidos como los precursores de la xenopsina (Sures & Crippa 1984), de la ceruleína (Richter et al. 1986), y de la levitida (Poulter et al. 1988), que también poseen actividades antimicrobianas como precursores (Soravia et al. 1988) pero como péptidos maduros tienen por el contrario otras actividades farmacológicas (Gao & Wei 1993).

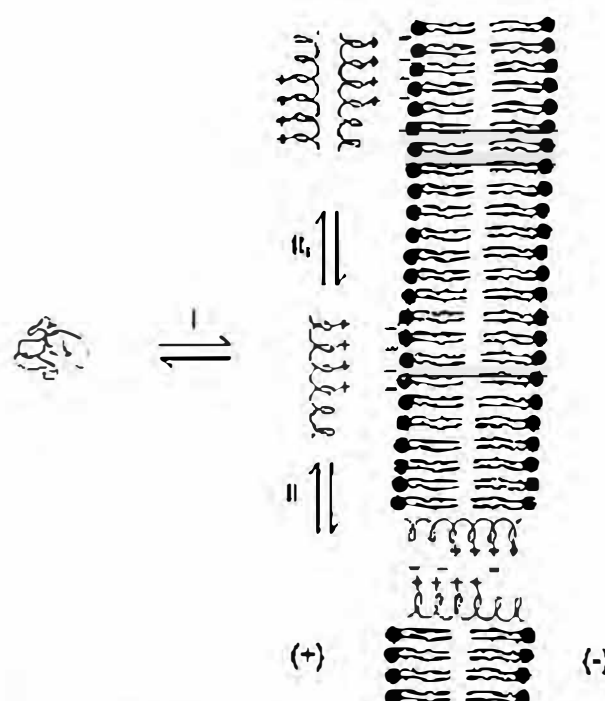


Figura 10. Modelo del mecanismo de acción de las magaininas. El péptido se encuentra en una conformación aleatoria en solución acuosa, y adopta una estructura de hélice al asociarse a la superficie de una membrana con carga negativa (paso I). Se puede formar un agregado inactivo (paso II) o un polímero que atraviesa la membrana formando un poro (paso III) (Tomado de Vaz-Gomez et al. 1993).

Las magaininas presentan actividad microbicida tanto contra hongos y protozoarios (Zaslouff 1987, Huang et al. 1990), como contra bacterias gram positivas y negativas (Zaslouff et al. 1988). El mecanismo de acción incluye una permeabilización de la membrana externa a través de asociación con el LPS (Rana et al. 1991). Estudios en vesículas fosfolipídicas (Grant et al. 1992) han

demostrado que las magaininas son capaces de formar canales iónicos (Matzusaki et al. 1989) por medio de la polimerización de un complejo de magaininas (Figura 10) (Vaz-Gomes et al. 1993) que disrumpe la transducción de energía libre ligado a la membrana (Westerhoff et al. 1989). Algunos grupos sugieren que la magaininas actúan en complejos orientados en el plano de la membrana (Bechinger et al. 1993, Milik & Skolnick 1993). Se ha informado también de la acción de magaininas sobre líneas celulares transformadas (Cruciani et al. 1991) pero algunos grupos han refutado la validez de esta acción (Peck-Miller et al. 1993).

Bactenecinas

Las bactenecinas son péptidos bovinos entre 42 y 59 aminoácidos (Figura 9A), catiónicos, ricos en prolina y arginina (Grieve et al. 1993, Litteri & Romeo 1993). Aparentemente no son capaces de adoptar una conformación de hélice α por la abundancia de prolinas, pero se sugiere que poseen una estructura antifilica (Frank et al. 1990).

A

	1	10
Bac 5 (0-31)	Arg-Phe-Arg-Pro-Pro-Ile-Arg-Arg-Pro-Pro-Ile-Arg-	
	20	
	Pro-Pro-Phe-Tyr-Pro-Pro-Phe-Arg-Pro-Pro-Ile-Arg-	
	30	
	Pro-Pro-Ile-Phe-Pro-Pro-Ile	
	1	10
Bac 7 (1-35)	Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Pro-Arg-	
	20	
	Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Leu-Pro-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-	
	30	
	Pro-Arg-Pro-Ile-Pro-Arg-Pro-Leu-Pro-Phe-Pro	

B

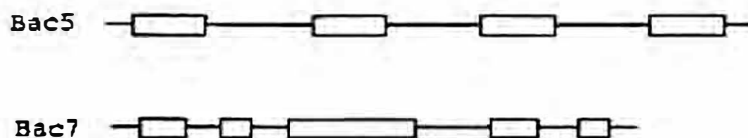


Figura 11. A. Secuencia de los péptidos Bac 5 (0-31) y Bac 7 (1-35). Corresponden a los fragmentos amino terminales de la bactenecina 5 y 7 respectivamente. B. Estructura secundaria de las bactenecinas 5 y 7 (Tomado de Frank et al. 1990).

Se almacenan en gránulos voluminosos de neutrófilos (Gennaro et al. 1983) y se generan a partir de preprobactenecinas (Zanetti et al. 1993) que se modifican protraduccionalmente (Zanetti et al. 1990). A la familia de las batenecinas se ha agregado un dodecapéptido cíclico aunque este no posee prolinas y presenta una estructura más similar a la de las defensinas debido a la presencia de cisteínas (Romeo et al. 1988). Las batenecinas son activas contra espiroquetas (Scocchi et al. 1990) y especialmente activas contra bacterias gram negativas, no así contra gram positivas (Gennaro et al. 1989). El mecanismo de acción constituye un rápido incremento en la permeabilización de membranas tanto externa como interna en gram negativas así como disrupción de la fuerza motora de protones (Skerlavaj et al. 1990). Entre otras propiedades los precursores de las batenecinas poseen además actividad quimiotáctica e inhibidora de proteasas (Verbanac et al. 1993). Los péptidos maduros interfieren con el crecimiento de células T autoinmunes (Schluesener et al. 1993).

Polímeros de lisina y ornitina

Son polipéptidos catiónicos comercialmente disponibles en diversos grados de polimerización y que, en el caso de los polímeros de lisina, adoptan tanto estructuras de hélices α así como láminas β según el solvente (Shibata et al. 1992). Diversos estudios demuestran el efecto bactericida de poli-L-lisinas en bacterias gram negativas (Vaara & Vaara 1983b) al desorganizar y alterar la permeabilidad de la membrana externa interactuando con el LPS (Vaara & Vaara 1983c). Iones de hierro parecen inhibir la acción microbicida al interactuar directamente con los grupos aminos del esqueleto peptídico (Tompkins et al. 1991). La poli-L-ornitina interactúan también letalmente con membrana externa de gram negativas (Hancock & Wong 1984), pero su espectro de acción y mecanismo involucrado están muy poco caracterizados.

Lactoferrina y lactoferricina B

La lactoferrina es una glicoproteína catiónica acopladora de hierro con peso aproximado a los 83 Kd, presente en la mayoría de las secreciones mucosas en mamíferos (Aisen & Listowsky 1980). Tridimensionalmente se conforma como una molécula con dos lóbulos (Figura 12B), cada lóbulo subdividido en dominios de hélices α y láminas β intercalados (Anderson et al.

1989). La familia de proteínas a la que pertenece la lactoferrina ha divergido por duplicación génica (Baldwin 1993).

A

1 10
Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-~~Met~~-Lys-Lys-Leu
20
Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe

B

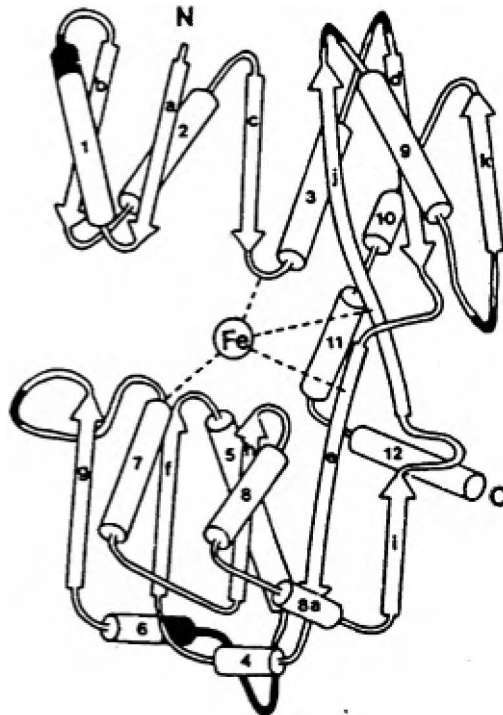


Figura 12. A. Secuencia de la lactoferricina B. B. Estructura esquemática del lóbulo amino terminal de la lactoferrina humana, donde se ubica la lactoferricina B (Tomado de Anderson et al. 1989).

La lactoferrina posee una poderosa actividad microbicida contra hongos y bacterias gram negativas (Arnold et al. 1980) a través de la acción de dos mecanismos: uno implica el privar a los microorganismos de hierro a través de la quelación del ion (Arnold et al. 1981), mientras que en el otro interviene un contacto directo de la molécula con las células blanco (Arnold et al. 1982), ya sea quelando cationes divalentes que estabilizan la membrana externa (Ellison et al. 1988) o acoplándose directamente a moléculas de LPS y

desestabilizando la membrana externa (Yamauchi et al. 1993). Esta última actividad parece originarse por la acción de un péptido denominado lactoferricina B (Figura 12A) que se libera ante la digestión de la molécula completa de lactoferrina ante pepsina (Tomita et al. 1991) y que se ubica en el extremo amino terminal de la proteína (Pierce et al. 1991). La lactoferricina B posee acción contra bacterias gram positivas (Bellamy et al. 1992) y hongos (Bellamy et al. 1993a) a través de un mecanismo que involucra la disrupción de las funciones normales de permeabilidad en la membrana citoplasmática (Bellamy et al. 1993b).

La transferrina es otra molécula que pertenece a la misma familia de proteínas acopladoras de hierro (Williams 1982) pero su actividad antimicrobiana no parece ser tan potente como la de la lactoferrina (Ellison et al. 1988).

Fosfolipasas A miotóxicas

Las fosfolipasas A miotóxicas son proteínas catiónicas anfifílicas de diverso peso molecular aisladas de venenos de serpientes principalmente en las familias Elapidae, Crotalidae y Viperidae, con capacidad para dañar células musculares además de otros tipos celulares (Gutiérrez & Cerdas 1984, Lomonte 1994). El patrón tridimensional general es el de una hélice α cercana al extremo amino terminal seguida por otras dos hélices α paralelas y una pequeña lámina β antiparalela (Figura 13B) (Arni et al. 1994, Holland et al. 1990). Dentro de género *Bothrops* en particular, se han caracterizado fosfolipasas A miotóxicas de *B. asper* (Gutiérrez et al. 1984b, Lomonte & Gutiérrez 1989), *B. nummifer* (Gutiérrez et al. 1989) y *B. godmani* (Díaz et al. 1992).

Estas miotoxinas actúan preferencialmente sobre células musculares (Gutiérrez et al. 1984a) aunque también se informa acción sobre células de origen no muscular (Bultrón et al. 1993) y sobre liposomas multilamelares (Díaz 1992). Parecen existir dos mecanismos de acción uno incluye actividad fosfolipasa (la cual no está presente en todas las proteínas) sobre lípidos de membrana (Scott et al. 1990) y otro se relaciona con penetración y alteración de membranas por actividad no enzimática (Díaz et al. 1991), donde la neutralización de las cargas básicas de la molécula parece dar origen a interacciones hidrofóbicas que favorecen la penetración de la molécula en

membranas (Rufini et al. 1992). Se han detectado otras actividades farmacológicas en miotoxinas como efecto anticoagulante (Alvarado & Gutiérrez 1988). Recientemente se han sintetizado tres péptidos de un alto contenido catiónico correspondientes a diferentes segmentos de la miotoxina II de *B. asper*, uno de los cuales posee actividad citolítica en células endoteliales (Lomonte et al. 1994). Sin embargo, no se conoce la acción de estas moléculas ni de la miotoxina completa sobre bacterias (B. Lomonte, comunicación personal).

A

1	10	20	30	40	50
SLGELGKMI L ETCKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPRD A TDRCCYV E KCCY					
K					
	60	70	80	90	
	100				
KLTGCNPKKDRYSYSWRDKTIVCGENNSCLRELCECDRAVAICLREN L NTY					
N					
	110	120			
KKYRYYLKPLCKKADAC					

B

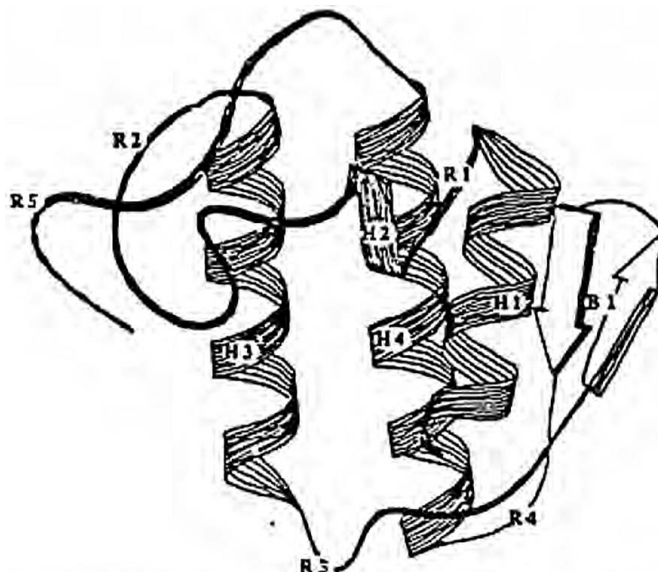
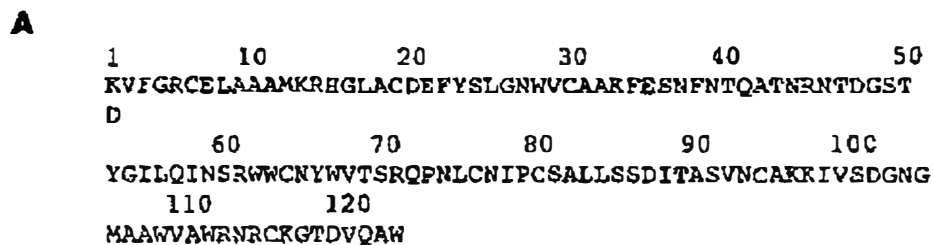


Figura 13. A. Secuencia de la miotoxina II de *Bothrops asper*. B. Diagrama esquemático de la miotoxina II de *B. asper* (Tomado de Ami et al. 1994).

Lisozima

La lisozima es una proteína catiónica que, de acuerdo a su origen, posee entre 123 y 185 aminoácidos (Figura 14A) con un peso promedio de 14.4 Kd, y

se obtiene en grandes cantidades de la clara del huevo de gallina (Stryer 1988). El arreglo tridimensional de la molécula es complejo (Figura 14B) aunque son claramente distinguibles regiones con hélices α y láminas β (Phillips 1966). Se encuentra ampliamente distribuida en tejidos, secreciones exocrinas y células circulantes del cuerpo humano (Lentner 1984). En el curso de la evolución han ocurrido cambios tanto a nivel de secuencia nucleotídica como de estructura terciaria en las lisozimas de distintas especies (Weaver et al. 1985).



B

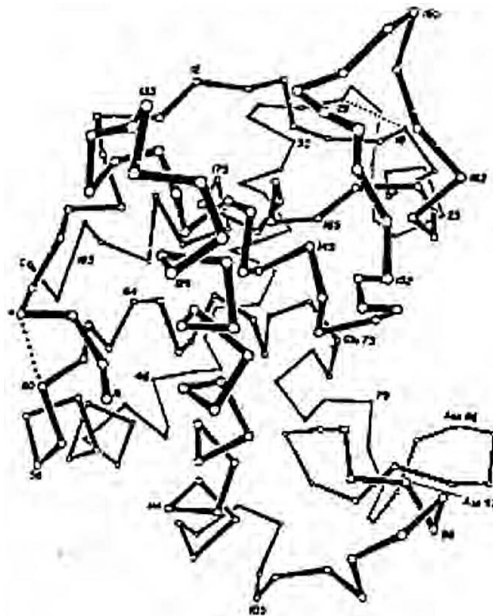


Figura 14. A. Secuencia de la lisozima aviar. **B.** Diagrama esquemático de la lisozima de ganso. Los enlaces disulfuro se indican con líneas punteadas (Tomado de Weaver et al. 1985).

La lisozima posee una acción antibacterial tanto contra organismos gram negativos como gram positivos (Iacono et al. 1980). Dos modos de acción son

posibles para la lisozima: un mecanismo incluye una acción hidrolítica sobre el enlace glicosídico que une a la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico en el esqueleto de la pared celular bacteriana (Chipman & Sharon 1969) y el otro mecanismo depende de una perturbación de la permeabilidad de membrana (Wang & Germaine 1991) que depende de la naturaleza catiónica de la proteína (Laible & Germaine 1985). Además, la lisozima parece capaz de acoplarse a lipopolisacáridos (Takada et al. 1994), activar autolisinas (Iacono et al. 1983) e inhibir la coagregación de bacterias (Murakami et al. 1991).

Proteínas catiónicas antimicrobianas

El primer miembro de este grupo en caracterizarse fue la proteína catiónica antimicrobiana con peso de 57 Kd (CAP57) (Farley et al. 1988), conocida también como proteína bactericida incrementadora de permeabilidad (BPI) (Elsbach & Weiss 1993a y b). Posee 456 residuos, es rica en lisina en su extremo amino, siendo hidrofóbica y menos cargada en su extremo carboxilo (Gray et al. 1989). Originalmente aislada de neutrófilos humanos y de conejo (Weiss et al. 1980), se ha detectado también en bovinos (Leong & Camerata 1990). Actúa exclusivamente sobre bacterias gram negativas (Weiss et al. 1992) debido a la alta afinidad que posee por la molécula de LPS (Gazzano-Santoro et al. 1992), produciendo alteración en la permeabilidad de membranas (Mannion et al. 1990).

Otra proteína con alta afinidad por el LPS es la proteína catiónica antimicrobiana de 142 residuos y 18Kd (CAP18) (Hirata et al. 1994) aislada de granulocitos de conejo (Larrick et al. 1991), con actividad tanto contra bacterias gram positivas como gram negativas (R. Gennaro, comunicación personal) (Figura 8).

```

1                               10
Arg-Cys-Val-Gly-Thr-Val-Thr-Arg-Tyr-Gln-
Ala-
                               20
Trp-Asp-Ser-Phe-Asp-Ile-Arg-Cys-Asn

```

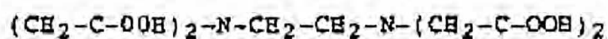
Figura 8. Secuencia del péptido CAP18A. Se origina por digestión proteolítica de la proteína CAP18. Los residuos corresponden a los aminoácidos 106-125 de la molécula original (Tomado de Larrick et al. 1991).

CAP18 no presenta homología con CAP57, pero si está estructuralmente relacionada con una serie de proteínas de 15KDa aisladas de colimorfonucleares de conejo que se encargan de regular la actividad de CAP57 (Ooi et al. 1990), lo que revela una compleja red de interacciones en estas moléculas (Levy et al. 1993).

Acido etilendiaminotetracético

El ácido etilendiaminotetracético (EDTA) es un agente quelante sintético (Figura 15) que posee la capacidad para formar seis enlaces de coordinación al asociarse a iones metálicos (Schubert 1966). El EDTA posee efectos bactericidas contra gram negativas (Temple et al. 1992a) a través de la interacción con cationes inorgánicos estabilizadores, seguido por la disgregación y solubilización de lipopolisacárido, proteínas y lípidos de la membrana externa (Temple et al. 1992b). Aparentemente el EDTA también es capaz de activar fosfolipasas (Hardaway & Buller 1979), de inhibir la síntesis de la envoltura celular (Rastogi et al. 1990) y de inhibir ureasas (Kwon-Chung et al. 1987).

A



B

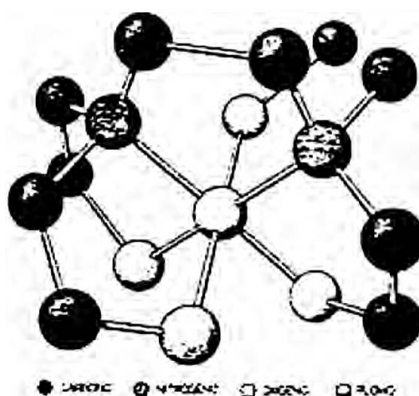


Figura 15. A. Fórmula estructural del EDTA. B. Dibujo esquemático de dos moléculas de EDTA unidas a un átomo de plomo (Tomado de Schubert 1966).

Trisamina

La trisamina (TRIS) es una base monoacídica débil, utilizada como amortiguador o como agente emulsificante, que puede prepararse por la reducción o hidrogenación catalítica del correspondiente compuesto nítrico (Windholz 1976).

En concentraciones moderadamente altas es capaz de solubilizar la membrana externa bacteriana (Irving et al. 1981). El mecanismo de acción incluye una desorganización de moléculas de LPS al reemplazar otros cationes estabilizadores menos voluminosos (Schindler & Osborn 1979).

JUSTIFICACION

La envoltura celular de las brucelas presenta además de una composición única, propiedades particulares (Moriyón et al. 1987). La membrana externa, a diferencia de la mayoría de las bacterias gram negativas, no es sensible a la acción del ácido etilendiaminotetracético, por lo que se sugiere que el lipopolisacárido en *Brucella* no es estabilizado por cationes divalentes que puedan ser quelados por el EDTA (Moriyón & Berman 1982). La polimixina tampoco es activa en *Brucella* (Moreno 1979), lo que concuerda con la menor cantidad de grupos negativos cargados en el LPS como el ácido 3-desoxy-D-manooctulosónico donde podría actuar este agente catiónico (Moreno et al. 1979), y compagina con la presencia de fosfatidilcolina en la membrana externa, que es un fósfolípido que resiste la acción de la polimixina (Feingold et al. 1974). Además, parecen existir relaciones más estrechas en *Brucella* respecto a otras enterobacterias, entre proteínas asociadas al peptidoglicano (Moriyón & Berman 1983) y proteínas asociadas al lipopolisacárido (Rojas et al. 1994). Por otra parte, la membrana externa de esta bacteria se caracteriza por una alta hidrofobicidad debida probablemente a la presencia de ácidos grasos de cadenas largas (Moreno 1990). Estas características representan con probabilidad adaptaciones a una vida parasítica intracelular y hacen de *Brucella* un modelo atractivo para el estudio de agentes microbicidas que interactúen en forma activa con componentes de la pared celular para llevar a cabo su acción.

Tomando en cuenta que en *Brucella* es posible detectar sensibilidad a antibióticos hidrofílicos que utilizan porinas (García-Rodríguez et al. 1993) o a permeantes hidrofóbicos de bajo peso molecular (Martínez de Tejada & Moriyón 1993), pero no está del todo caracterizada la resistencia hacia moléculas como los agentes policationicos que utilizan como ruta de ingreso la vía de autopromoción (Hancock 1984), modelo que involucra la desorganización de la membrana externa para la acción del agente involucrado (Hancock 1991), se hace pertinente un estudio para determinar la sensibilidad de *Brucella* hacia aquellos agentes que puedan utilizar este mecanismo, valorando así las propiedades particulares de la envoltura celular de esta bacteria.

OBJETIVOS

Esta tesis tiene como objetivo general el de evaluar la sensibilidad de dos especies de *Brucella* a un amplio espectro de péptidos catiónicos y agentes con capacidad para sensibilizar la membrana externa de bacterias gram negativas.

Los objetivos específicos que se persiguen son:

- Determinar el efecto en viabilidad de los diversos agentes sobre *Brucella*.
- Cuantificar las concentraciones letales de los diversos agentes.
- Investigar el acoplamiento de estos agentes a la membrana externa de *Brucella*.
- Estudiar si las moléculas de LPS poseen la capacidad para acoplar estos agentes.
- Estudiar si otros elementos de la envoltura celular poseen también capacidad para acoplar estos agentes.
- Identificar la posible acción de fosfolipasas A miotóxicas en bacterias.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVO DE LAS BACTERIAS

Las características de *Brucella abortus* cepa S19 (LPS tipo liso silvestre), disponible como vacuna comercial (Professional Biological Co., Denver, CO, Estados Unidos), *B. abortus* cepa 45/20 (LPS tipo rugoso mutante) y *B. ovis* cepa REO 198 (LPS tipo rugoso silvestre) han sido descritas con anterioridad (Moreno, Berman & Boettcher 1979). El testigo *Escherichia coli* ATCC 29648 (LPS tipo liso silvestre), fue cedido por R.I. Lehrer (Departamento de Medicina, Universidad de California en Los Angeles, Estados Unidos). *E. coli* fue cultivada en medio MacConkey (Difco Laboratories, Detroit, MI, Estados Unidos), mientras que *B. abortus* y *B. ovis* crecieron en medio Agar-Sangre (Difco) en presencia de CO₂. Las bacterias se repicaron en placas de petri recién preparadas y se incubaron a 37°C por un período de 24 horas en el caso de *E. coli* y 72 horas en *Brucella*. Concluida la incubación se almacenaron las placas en refrigeración 4°C hasta el momento de ser utilizadas.

ENSAYO DE ACCION BACTERICIDA

Trisamina, ácido etilendiaminotetraacético, lisozima aviar, poli-L-lisina, poli-L-ornitina, polimixina B sulfato, magainina II, magainina II amida, cecropina A, cecropina P1, melitina y lactoferrina bovina fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos). Lactoferrina B fue donada por W. Bellamy (Industria de Leche Morinaga, Higashihara, Japón), proteína catiónica 18A así como bacterenecinas 5 y 7 fueron facilitadas por R. Gennaro y D. Romeo (Departamento de Bioquímica, Biofísica y Química de Macromoléculas, Universidad de Trieste, Italia), defensina NP-2 fue suministrada por R.I. Lehrer, Departamento de Medicina, Universidad de California en Los Angeles, Estados Unidos), miotoxina I y miotoxina II de *Bothrops asper*, miotoxina I de *Bothrops nummifer* así como miotoxinina I y II fueron obsequio de J.M. Gutiérrez y B. Lomonte (Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica). Todas las

moléculas se disolvieron en agua bidestilada y desionizada a una concentración de 5 mg/ml para ser guardadas en congelación a -20°C .

En el momento de utilizarse, las bacterias crecidas en las placas de petri fueron resuspendidas en 5 ml de amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7 suplementado con peptona (Difco) al 1% con la ayuda de una barra de vidrio. Luego se centrifugaron durante 20 minutos hasta la obtención de un botón que fue resuspendido en 10 ml del amortiguador. A 1 ml de esta solución se agregaron otros 9 ml de amortiguador, se realizaron cuatro diluciones adicionales seriadas en el orden 1:10, y se determinó espectrofotométricamente la fracción cuya concentración de bacterias equivalía a 4×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, a través de lecturas a 420 nm en el caso de *Brucella* y 600 nm para *E. coli*, con el uso de relaciones previamente establecidas como referencia entre concentración de bacterias y densidad óptica (Alton et al. 1975, Apéndice 1). Se tomaron 100 μl de la fracción (de tal forma que se seleccionaron 4×10^5 UFC/ml), y a esta se agregaron 10 μg del agente a analizar suspendidos en 3 μl de agua bidestilada y desionizada y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 900 μl de amortiguador a la suspensión y se realizaron otras dos diluciones adicionales seriadas en el orden 1:10, para cultivar finalmente 100 μl de cada una de las dos últimas diluciones por cuadruplicado en los medios adecuados (Agar Tripticasa-Soya [Difco] para *Brucella* y Agar Nutritivo [Difco] para *Escherichia*) con incubación a 37°C hasta la aparición de colonias cuyos tamaños permitieron su conteo. Junto a cada ensayo se realizó una prueba testigo en la cual fue agregado únicamente amortiguador sin agente microbici da a la fracción que contenía 10^5 UFC/ml, con el desarrollo del resto de la prueba en forma similar al procedimiento antes descrito, y los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del crecimiento de bacterias en el ensayo normal respecto a la prueba testigo. En el caso de que no se observara efecto inhibitorio para algún agente particular con las condiciones antes especificadas, se incrementó el tiempo de incubación con el agente respectivo hasta un máximo de 180 minutos, momento a partir del cual, si todavía no se observaba acción microbici da, se incrementó entonces la concentración del agente hasta un máximo de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

ENSAYO DE ZONAS DE INHIBICION Y DETERMINACION DE CONCENTRACION LETAL

Se resuspendieron colonias, se centrifugaron y se prepararon diluciones seriadas en forma similar al ensayo anterior, para elegir por espectrofotometría aquella fracción que poseía una concentración de 4×10^7 UFC/ml. De esta solución se tomó 1 ml que se agregó a 2 ml de amortiguador de fosfatos y esta mezcla se adicionó a 3 ml de medio Peptona-Glucosa-Levadura (PGL: 10 g agarosa, 10 g peptona, 10 g glucosa y 0.5 g levadura por litro) concentración 2X, mantenido a 37°C para evitar su gelificación. Se homogenizó el medio con las bacterias para luego distribuirlo en una placa de cultivo que se mantuvo a temperatura ambiente durante 60 minutos para permitir solidificación, y una vez transcurrido este período se practicaron en el medio hoyos de 3 mm de diámetro, donde se agregaron 3 μ l de agua bidestilada y desionizada que contenían cantidades variables del agente microbicida a analizar que oscilaban entre 10 y 0.5 μ g. Las placas se incubaron a 37°C y se permitió el crecimiento de las colonias embebidas en el medio de cultivo hasta la aparición de colonias de tamaño apreciable. Con una regla graduada hasta 0.5 mm se hicieron las medidas pertinentes en los casos en los que apareció un halo que indicaba la inhibición de crecimiento bacteriano debido a la difusión del agente analizado a partir de los hoyos practicados al medio. La prueba testigo se constituyó como el análisis de hoyos en los que se agregó únicamente agua sin agente microbicida. Los resultados se expresaron como gráficos que muestran el diámetro de los halos formados versus la cantidad de péptido agregada en los hoyos. La concentración letal de cada agente para cada bacteria se calculó de acuerdo al modelo matemático publicado por Hultmark et al. (1982)(Apéndice 2).

ACOPLE DE AGENTES MICROBICIDAS A BACTERIAS

Luego de resuspender colonias de *Brucella* o *Escherichia*, centrifugarlas y preparar una serie de diluciones seriadas en forma similar al ensayo bactericida descrito anteriormente, se determinó por densidad óptica la fracción que contenía 4×10^7 UFC/ml. de la cual 100 μ l (que poseían por lo tanto 4×10^5

UFC/ml) fueron incubados junto con 10 μ g del agente a analizar suspendidos en 3 μ l de agua destilada y desionizada durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó la suspensión durante 20 minutos, se descartó el botón que se obtuvo y se volvió a centrifugar por otros 20 minutos para descartar nuevamente el botón y someter a análisis el sobrenadante. Para determinar si el agente microbicida utilizado se había acoplado o no a la membrana de la bacteria empleada hasta el momento en la primera parte de este ensayo, se observó si el sobrenadante obtenido presentaba actividad bactericida al agregarlo a un botón de *E. coli* colectado luego de centrifugar durante 20 minutos una solución con volumen de 100 μ l y que contenía 10^5 UFC/ml. Se agitó el sobrenadante con el botón para resuspender este último y se incubó entonces durante un periodo de 20 minutos a 37°C para continuar el ensayo como se hizo en la parte final de la prueba de acción bactericida.

En el caso de que la bacteria analizada en la primera parte de la prueba fuera *E. coli*, se corría en forma paralela a este ensayo otra prueba equivalente que seguía todos los procedimientos descritos con anterioridad hasta el momento en que se obtenía el sobrenadante a analizar, paso a partir del cual se agregaban 900 μ l de amortiguador directamente a los 100 μ l de sobrenadante y se realizaban otras dos diluciones adicionales seriadas en el orden 1:10 para finalmente cultivar 100 μ l de estas dos últimas diluciones en el medio propicio. De esta forma se determinaba el número de bacterias que no se lograron sedimentar luego de realizar los dos periodos de centrifugación mencionados, y que se agregarían al botón con 10^5 UFC/ml. En el caso de los ensayos con *Brucella* no era necesario realizar esta prueba paralela ya que al crecer más rápidamente *E. coli*, las brucelas que no se lograron sedimentar no interferían con el recuento final de colonias. Para las pruebas testigo se utilizó amortiguador sin agente microbicida durante la primera incubación de 30 minutos a 4°C y los resultados se informaron al igual que en el ensayo bactericida, como porcentaje de inhibición de crecimiento de bacterias en la prueba normal respecto al ensayo testigo. En el caso de péptidos de acción rápida se utilizó un ensayo similar al que se emplea en el acople de agentes microbicidas al LPS, sustituyendo en los pozos las moléculas de LPS por bacterias (ver siguiente sección).

ACOPLE DE AGENTES MICROBICIDAS AL LPS

Se utilizó LPS de *B. abortus* cepa S19, LPS de *B. abortus* cepa 45/20, y LPS de *B. ovis* cepa REO 198, así como el LPS testigo de *Salmonella montevideo*, extraídos y purificados de acuerdo a métodos descritos anteriormente (Moreno et al. 1981). Se disolvieron a una concentración de 25 mg/ml en agua bidestilada y desionizada, se sonicaron para favorecer la solubilización de las moléculas, y se almacenaron en refrigeración a -20°C. Se prepararon placas con medio PGL y 4×10^7 UFC/ml, similares a las utilizadas en la prueba anterior, se practicaron los hoyos de 3 mm de diámetro, y se agregaron en todos 5 µg del agente microbicida a analizar, junto con cantidades variables de los lipopolisacáridos que oscilaban entre 25 y 1.25 µg, para determinar si los diferentes LPS poseían la capacidad para acoplar a los agentes analizados, de tal forma que impidieran la formación de halos de inhibición de crecimiento de bacterias. En la prueba testigo se agregó agente microbicida pero no se agregó LPS. Los resultados se expresaron como gráficos que muestran el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento versus la cantidad de LPS agregada.

ACOPLE DE AGENTES MICROBICIDAS A FRAGMENTOS DE ENVOLTURA CELULAR, 'BLEBS' O ANTIGENO SALINO

Se utilizaron 'blebs' de *B. abortus* S19 que contienen esencialmente membrana externa con LPS y proteínas del grupo 3 (Gamazo et al. 1989). Ya que las brucelas rugosas no producen 'blebs', se usaron fragmentos de membrana envoltura celular que incluyen tanto membrana externa como interna en el caso de *B. abortus* 45/20 (Moriyón & Berman 1982) y antígeno salino que posee membrana externa rica en LPS y proteínas del grupo 3 (Gamazo et al. 1989).

SENSIBILIZACION DE BACTERIAS

Se preparó una suspensión de *B. abortus* 45/20, se centrifugó y se prepararon diluciones seriadas, a partir de las cuales se eligió por densidad óptica aquella fracción que poseía una concentración de 8×10^7 UFC/ml. Se tomaron 100 μ l de esta solución y se agregaron a 100 μ l de una solución de 20 mg/ml de LPS de *S. montevideo* o LPS de *B. abortus* S19. Se sonicó la mezcla tres veces, un segundo cada vez, para permitir la incorporación de moléculas de LPS a la ME de la *B. abortus* 45/20. Se incubó la solución con las bacterias durante 18 horas a 40°C y posteriormente se realizaron tres lavados para descartar al LPS del sobrenadante después de centrifugar por 20 minutos. El botón obtenido finalmente se resuspendió en 200 μ l de amortiguador, fue separado en dos mitades iguales, y se condujo el resto de la prueba como un ensayo bactericida, al agregar a una de las dos mitades 10 μ g del agente a analizar, que se incubó por 20 minutos. La otra mitad se utilizó como testigo. Los resultados se informaron como porcentaje de inhibición del crecimiento de colonias.

ANALISIS ESTRUCTURAL DE MIOTOXININAS

Se estudiaron las secuencias de las miotoxininas I y II mediante un análisis de hidropaticidad a través del método de Kyte y Doolittle (1982) (Apéndice 3) para determinar la capacidad de combinación con el agua de las dos moléculas. Los resultados se expresaron como gráficos de los valores de hidropaticidad. También se analizaron las secuencias para determinar la posible tendencia a formar hélices α mediante análisis con el método descrito por Schiffer y Edmundson (1967) (Apéndice 4). Los resultados se expresaron como representaciones axiales de las moléculas.

RESULTADOS

ENSAYO DE ACCION BACTERICIDA

En el Cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos al determinar la sensibilidad de las bacterias utilizadas frente a los diferentes agentes catiónicos muestreados.

Cuadro 1. Actividad antibacterial de los agentes catiónicos^a.

Agente bactericida	<i>E. coli</i> 296-48	<i>B. abortus</i> S19	<i>B. abortus</i> 45/20	<i>B. ovis</i> REO 198
Melitina	100.00±0.00	19.03±2.07	31.61±2.47	39.97±2.59
Polimixina B sulfato	100.00±0.00	0.62±0.29	23.94±1.02	32.82±1.47
Cecropina A	100.00 ^f	0.36 ^f	0.52 ^f	0.61 ^f
Cecropina P1	97.75 ^f	4.91 ^f	22.51 ^f	24.00 ^f
Magainina 2 ^b	93.67 ^f	1.02 ^f	1.30 ^f	2.45 ^f
Magainina 2 amida	84.88 ^f	0.00 ^f	0.52 ^f	0.97 ^f
Bactenecina 5 (0-31)	76.80±5.22	0.59±0.71	5.97±1.11	11.89±1.46
Bactenecina 7 (1-35)	97.30±0.75	1.39±0.76	8.56±2.19	100.00±0.00
Proteína catiónica 18A	91.07±3.00	1.09±0.82	9.91±1.68	14.30±2.54
Poli-L-Ornitina	99.54±0.42	0.92±0.73	14.74±3.44	57.20±4.10
Poli-L-Lisina	99.63±0.32	0.51±0.33	0.95±1.31	55.88±2.33
Defensina NP-2 ^c	93.99±3.65	0.58±0.36	1.52±0.30	N.D. ^g
Lactoferricina B ^b	93.94±1.19	10.95±1.52	23.15±1.04	25.60±0.53
Lactoferrina bovina ^d	85.83±1.96	0.63±0.26	9.49±0.74	15.61±2.34
Miotoxina (<i>B. nummifer</i>) ^d	45.15±1.55	0.04±0.17	0.57±0.05	10.91±3.67
Miotoxina I (<i>B. asper</i>) ^d	41.74±2.61	0.38±0.68	0.73±0.34	18.07±5.06
Miotoxina II (<i>B. asper</i>) ^d	87.35±1.49	0.21±1.46	17.13±1.55	24.29±0.89
Miotoxinina I ^b	95.48 ^f	0.42 ^f	0.88 ^f	1.31 ^f
Miotoxinina II ^b	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f
Lisozima ^e	81.12±2.54	6.99±2.16	27.64±1.49	30.30±1.76
EDTA ^e	97.26±0.77	0.92±0.72	2.58±1.45	6.84±4.65
Trisamina ^e	76.56±2.01	1.41±1.11	2.21±2.11	3.39±1.55

^a La actividad se expresa como porcentaje de inhibición en el crecimiento de la bacteria luego de incubar durante 20 minutos con 10 µg del agente (a excepción de los casos indicados).

^b Se incubó durante 180 minutos con 10 µg del agente.

^c Se incubó durante 90 minutos con 10 µg del agente.

^d Se incubó durante 180 minutos con 10 µg del agente y 10 µg de lisozima.

^e Se incubó durante 180 minutos con 200 µg del agente.

^f Se realizó únicamente un ensayo para cada prueba.

^g No se determinó.

A excepción de *B. ovis* en presencia del péptido bacteriocina 7 [1-35], *E. coli* en todos los casos fue menos resistente a la acción de los distintos agentes catiónicos que las brucelas. Los agentes de mayor potencia contra *E. coli* fueron cecropina A, polimixina B, melitina, poli-L-lisina, poli-L-ornitina, cecropina P1 y bacteriocina 7 (1-35). Defensina NP-2, magainina 2, lactoferricina B y miotoxina I presentaron una actividad superior al 90% de inhibición del crecimiento bacteriano únicamente después de incrementarse el tiempo de incubación. El ácido etilendiaminotetracético logró también un efecto importante sólo después de incrementarse notablemente el tiempo de incubación así como la cantidad del compuesto (en el caso de trisamina, aunque se variaron las condiciones en forma similar al EDTA, los resultados no fueron igualmente satisfactorios). Las miotoxinas y la lactoferrina bovina presentaron actividad sólo después de aumentar el período de incubación y de agregarse lisozima junto a la proteína, y en el caso de la miotoxina I de *B. asper* y la miotoxina de *B. nummifer* los resultados fueron siempre inferiores al 50% de inhibición en la formación de colonias, aún después de la combinación con la muramidasa. La miotoxina II no exhibió ninguna actividad.

B. abortus S19 fue la bacteria que desplegó mayor resistencia. Para este organismo los agentes con mayor actividad microbicida fueron melitina y lactoferricina B respectivamente, aunque estos porcentajes de inhibición (19.03 y 10.95%) estuvieron muy por debajo de los niveles mínimos observados en *E. coli* para los compuestos con la menor actividad (41.74% en el caso de la miotoxina I de *B. asper*). Los demás agentes, con excepción de lisozima, presentaron una acción casi nula siendo magainina 2 amida del todo inactiva.

B. abortus 45/20 ocupó en todos los casos una posición intermedia de sensibilidad respecto a *B. abortus* S19 y *B. ovis*. Melitina fue la molécula que mostró el más alto porcentaje de inhibición (aunque al igual que en el caso de *B. abortus* S19, este resultado fue inferior a los mínimos en *E. coli*). Lisozima, lactoferricina B, polimixina B sulfato, y cecropina P1 también inhibieron considerablemente el crecimiento de la bacteria. El resto de las moléculas tuvieron una actividad variable, siendo las menos efectivas cecropina A, magainina 2 amida, la miotoxina de *B. nummifer* y la miotoxina I de *B. asper*.

B. ovis fue la brucela menos resistente. Como se mencionó anteriormente, esta bacteria fue muy sensible a la acción de bacteriocina 7 (1-35), siendo incluso ligeramente más sensible que *E. coli* (en todos los demás

casos *B. ovis* presentó más resistencia que *Escherichia*). Poli-L-ornitina y poli-L-lisina inhibieron en forma notable el crecimiento del parásito, así como melitina, polimixina y lisczima en menor grado. Magainina 2 amida y cecropina A fueron las moléculas menos activas.

ENSAYO DE ZONAS DE INHIBICION Y DETERMINACION DE CONCENTRACION LETAL

En las Figuras 17, 18, 19 y 20 se observan los resultados del ensayo de zonas de inhibición con los agentes microbicidas que permitieron establecer curvas de relación entre el diámetro de los halos formados y la concentración del agente.

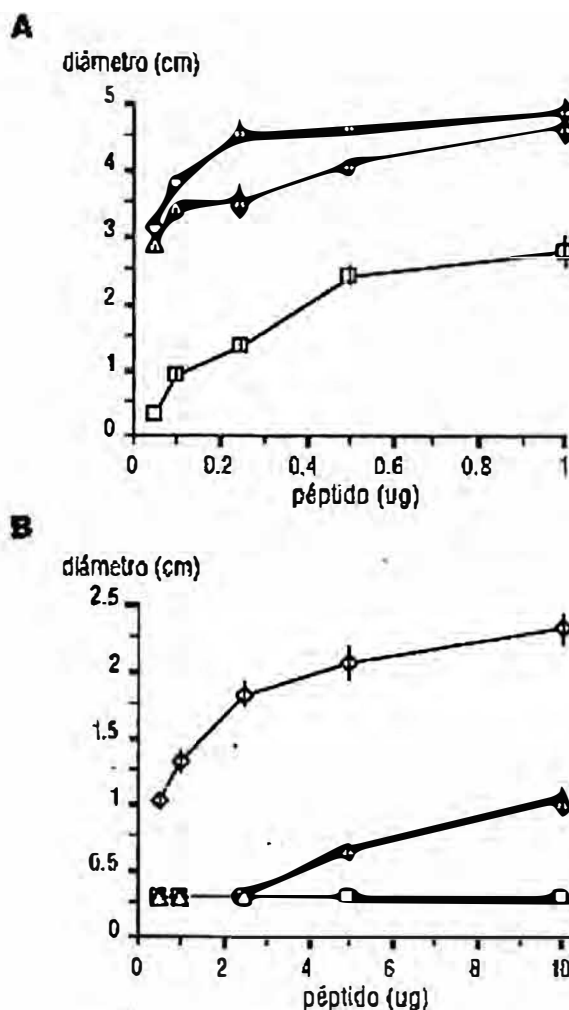


Figura 17. Ensayo de zonas de inhibición. A. Polimixina B sulfato. B. Lactoferrina B. □ DS19, Δ45/20, ◇ REO 198.

En los gráficos no se presentan los datos para *E. coli*, que no pueden compararse directamente con los resultados de las brucelas ya que, al crecer los parásitos intracelulares más lentamente (el tiempo medio de reproducción de *Brucella* es 2.5 horas, mientras que el de *E. coli* es 20 minutos), los agentes microbicidas pueden difundir una distancia mayor a partir del pozo donde se agregan formándose así halos de mayor tamaño, por lo que se podría interpretar una mayor sensibilidad a los agentes por parte de las brucelas, lo cual se descarta de acuerdo a la información obtenida a través del ensayo de acción bactericida. Sin embargo, dentro del mismo género *Brucella* si pueden establecerse relaciones al ser los tiempos de generación similares.

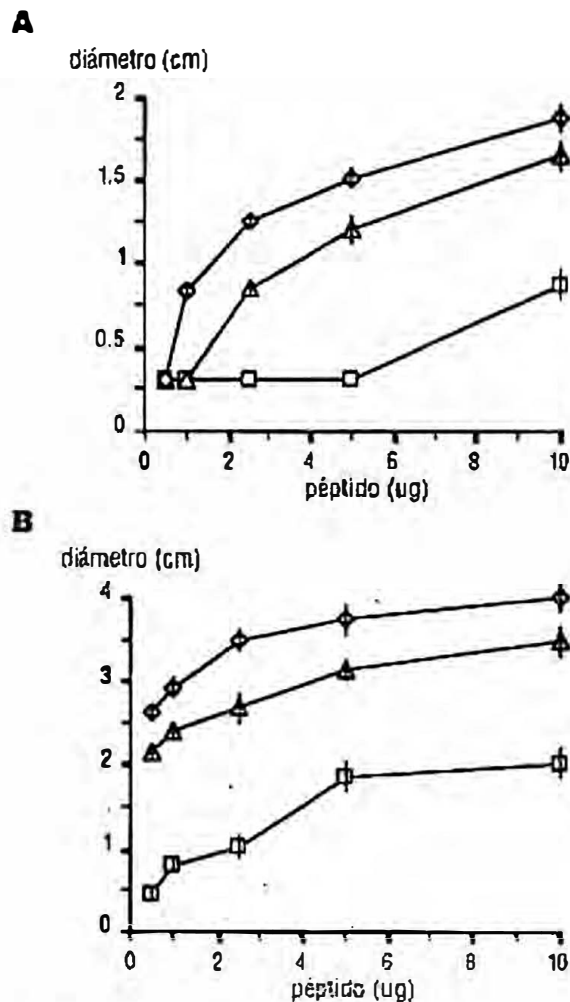


Figura 18. Ensayo de zonas de inhibición.
 A. Bactenecina 5 (0-31). B. Bactenecina 7 (1-35). □ S19, Δ 45/20, ◊ REO 198.

Es posible observar que en todos los casos, *B. abortus* S19 fue la bacteria más resistente a la acción de los agentes catiónicos presentando halos de menor tamaño, mientras que *B. ovis* resultó la más sensible con los halos mayores, ocupando *B. abortus* 45/20 una posición media.

Los halos formados por los distintos agentes presentaron características variadas. Bactenecina 7 (1-35) y melitina mostraron halos con bordes claramente definidos (en el caso de melitina, fue notable la presencia de un borde de bacterias muy engrosadas limitando al halo). Polimixina B sulfato y la proteína catiónica antimicrobiana 18A exhibieron bordes definidos a concentraciones altas, pero límites difusos a bajas concentraciones.

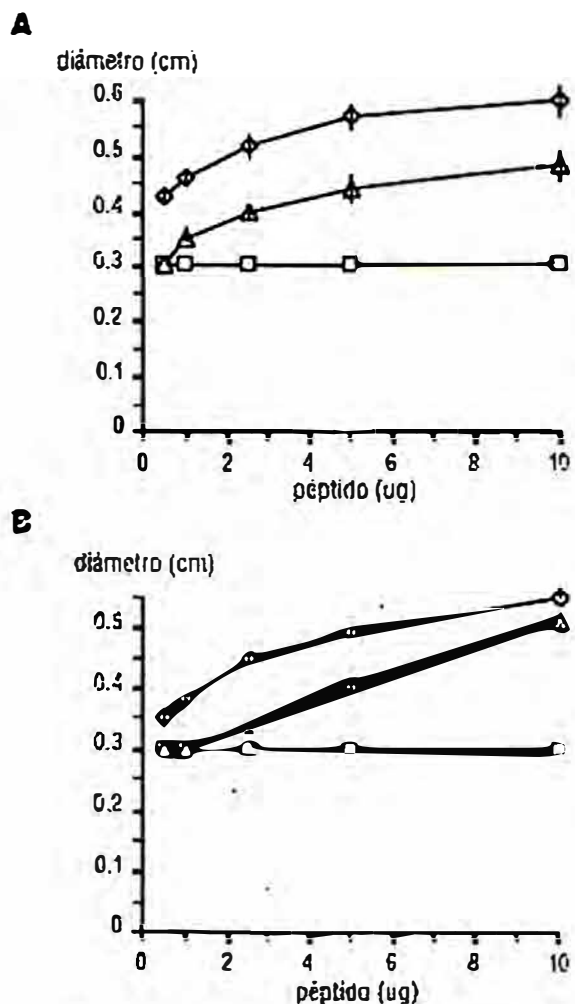


Figura 19. Ensayo de zonas de inhibición. A. Polí-L-lisina. B. Polí-L-ornitina. □ S19, Δ 45/20, ◊ REO 198.

En los casos de cecropinas A y P1, y de magaininas 2 y 2 amida, se observaron halos con bordes relativamente definidos, y un ligero gradiente de bacterias no inhibidas creciendo en el interior de los halos. En el caso de las miotoxinas, a pesar de que se observó una reducción en la densidad de bacterias creciendo alrededor del pozo donde se agregaron las proteínas, nunca se llegó a observar la formación de un verdadero halo de inhibición. En el caso de lactoferrina, lisozima, ácido etilendiaminotetracético y trisamina, no se observó alteración alguna en el crecimiento de las bacterias. La prueba no se llevó a cabo con defensina NP-2.

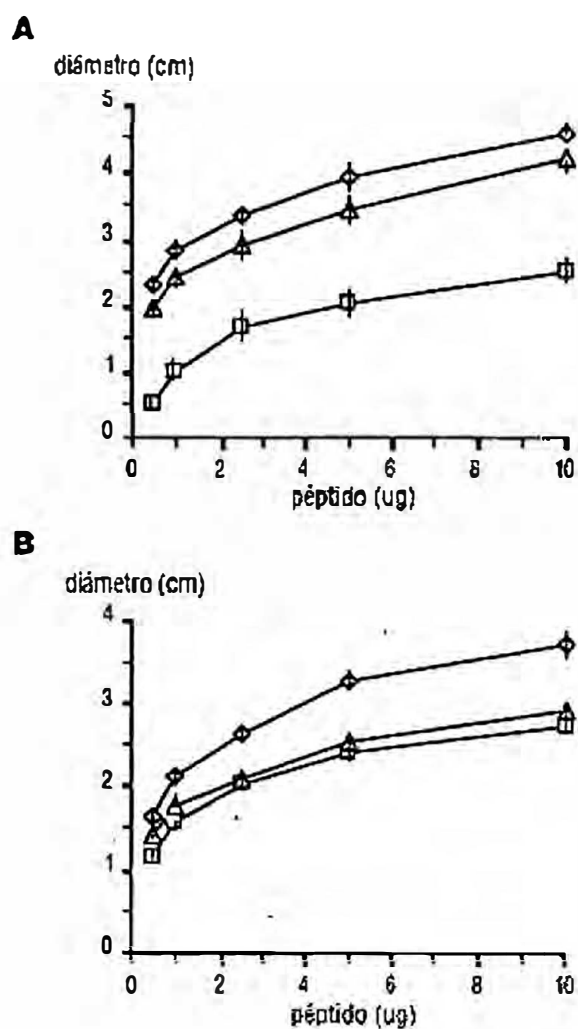


Figura 20. Ensayo de zonas de inhibición.
 A. Proteína catiónica antimicrobiana 18A.
 B. Melitina. □ S19, △ 45/20, ◇ REO 198.

En el Cuadro 2 se muestran los datos de concentración letal para los agentes bactericidas, calculados a partir de las curvas anteriormente mostradas o a partir de pozos únicos, de acuerdo a la metodología de Hultmark y colaboradores (1982)(ver Apéndice 2).

Cuadro 2. Concentraciones letales e inhibitorias de los agentes catiónicos^a.

Agente bactericida	<i>E. coli</i> 29648	<i>B. abortus</i> S19	<i>E. abortus</i> 45/20	<i>B. ovis</i> REO 198
Polimixina B sulfato	1.03±0.15	0.36±0.02	0.13±0.01	0.12±0.01
Lactoferricina B	2.83±0.30	N.H. ^b	43.72±2.14 ^c	1.63±0.18
Proteína catiónica 18A	3.64±0.10	2.85±0.07	1.40±0.06	1.18±0.03
Melitina	3.73±0.27	1.67±0.12	1.56±0.19	1.05±0.11
Bactenecina 7 (1-35)	12.14±1.08	4.25±0.35	0.72±0.02	0.45±0.06
Bactenecina 5 (0-31)	24.37±5.82	62.57±7.91 ^c	4.05±0.48	0.07±0.00
Cecropina A	14.72 ^{cd}	10.40 ^{cd}	4.48 ^{cd}	3.02 ^{cd}
Cecropina P1	17.37 ^{cd}	7.64 ^{cd}	2.27 ^{cd}	1.91 ^{cd}
Magainina 2	N.H. ^{b,c,d}	8.67 ^{cd}	6.29 ^{cd}	4.48 ^{cd}
Magainina 2 amida	39.70 ^{cd}	26.54 ^{cd}	6.29 ^{cd}	4.70 ^{cd}
Poli-L-Ornitina	22.26±3.79	N.H. ^b	90.03±70.82	66.17±14.82
Poli-L-Lisina	34.84±14.61	N.H. ^b	23.67±0.23	12.69±2.45

^a La concentración letal se define como la menor concentración de péptido ($\mu\text{g/ml}$) necesaria para inhibir la formación de colonias en la placa de agar. Se calcularon los datos a partir de curvas en que se asocia la cantidad de agente agregada y el diámetro de los halos formados (excepto en los casos indicados).

^b No se formaron halos.

^c Se calculó la concentración letal a partir de los datos de un solo pozo.

^d Se realizó únicamente un ensayo para cada prueba.

Como se mencionó anteriormente, los datos de *E. coli* y las diferentes especies de *Brucella* no son comparables. En *E. coli*, polimixina B sulfato presentó la concentración letal más baja. Lactoferricina B, la proteína catiónica antimicrobiana 18A y melitina también presentaron valores bajos. Poli-L-lisina mostró el dato de más alto valor.

Analizando las distintas brucelas, se observa que se requirieron concentraciones más altas de agentes microbicidas en *B. abortus* S19 para ejercer un efecto inhibitorio. Polimixina B sulfato presentó la menor concentración letal en esta bacteria. Melitina y proteína catiónica antimicrobiana 18A tuvieron así mismo una concentración letal baja. El valor más alto se observó en bactenecina 5 (0-31). Tanto para *B. abortus* 45/20 como para *B. ovis*, polimixina B sulfato fue la molécula con el valor más bajo de

concentración letal, mientras que poli-L-ornitina fue el agente con la mayor concentración letal. Las dos bacterenecinas mostraron valores bajos en *B. ovis*, así como bacterenecina 7 (1-35), proteína catiónica antimicrobiana 18A y melitina para *B. abortus* 45/20.

ACOPLE DE AGENTES MICROBICIDAS A BACTERIAS

En la Figura 21 se muestran los resultados para la prueba de acople a bacterias efectuada con defensina NP-2 y lactoferricina B.

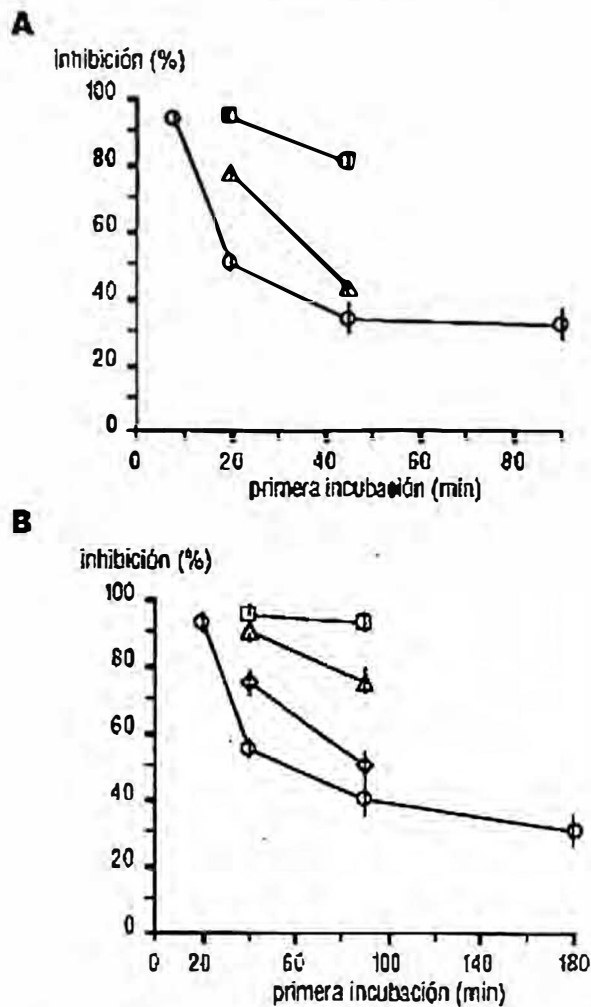


Figura 21. Acople de agentes microbicidas a bacterias. A. Defensina NP-2. B. Lactoferricina B. □ S19, Δ 45/20, ◇ REO 198, ○ *E. coli*.

Esta prueba se llevó a cabo utilizando comparación de porcentajes de inhibición del crecimiento de colonias únicamente para péptidos como defensina NP-2 y lactoferricina B que requirieron tiempos extensos de incubación para desarrollar su actividad, ya que con agentes de acción rápida no se logró estandarizar la metodología.

Como puede observarse en la Figura 21, si el tiempo de la primera incubación de los péptidos con cada una de las bacterias se incrementa, se observa un menor porcentaje de inhibición en el crecimiento bacteriano de *E. coli* (debe recordarse que en todos los casos la segunda incubación del sobrenadante obtenido en la primera parte del ensayo se realizó contra *E. coli*).

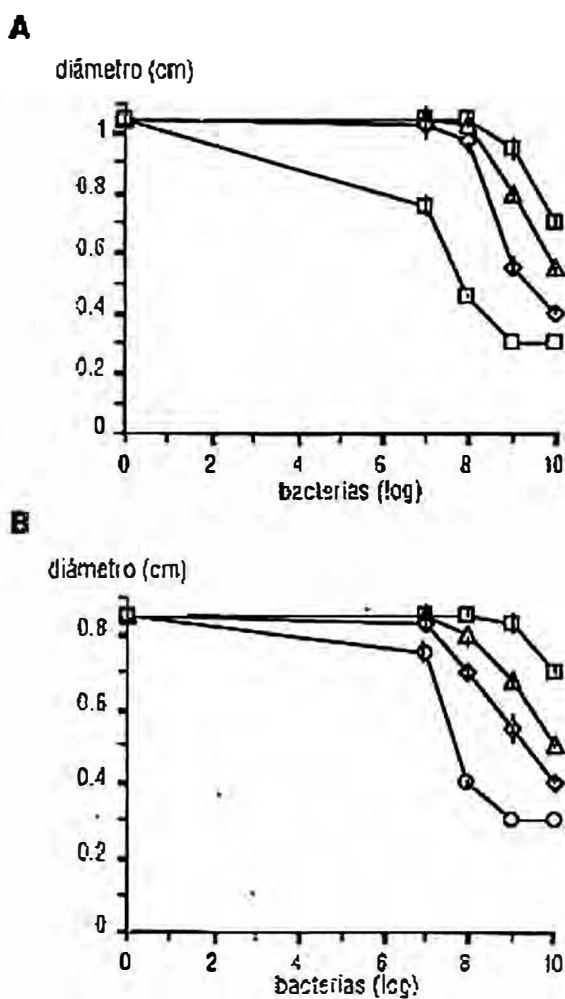


Figura 22. Ensayo de acople de agentes microbicidas a bacterias. A. Polimixina B. Melitina. □ S19, Δ 45/20, ◇ REO 198, ○ *E. coli*.

indicando así que el péptido se está acoplado efectivamente a los organismos, ya que existe una menor cantidad de agente bactericida libre en el sobrenadante que se está analizando. Sin embargo, se puede detectar claramente que *B. abortus* S19 es la bacteria que acopla menor cantidad de péptido porque permanece más agente en el sobrenadante para actuar inhibiendo posteriormente el crecimiento de *Escherichia*, mientras que *E. coli* es el organismo que más compuesto acopla. *B. abortus* 45/20 y *B. ovis* acoplan menos cantidad de agente que *E. coli*, pero no alcanzan los bajos niveles de acople mostrados por *B. abortus* S19.

En la Figura 22 se muestran los resultados de la prueba de acople a bacterias para polimixina B y para melitina. Este ensayo se llevó a cabo utilizando zonas de inhibición en aquellos péptidos de acción muy rápida y que a la vez formaron halos de gran tamaño en placas con colonias de *E. coli*. *B. abortus* S19 fue la bacteria que menos péptido acopló, ya que permitió la mayor difusión de las moléculas y por lo tanto se formaron los halos de mayor tamaño, mientras que para *E. coli* se observaron los halos más pequeños, lo que indica que en esta bacteria se da un mayor acople de los péptidos. Nuevamente *B. abortus* 45/20 y *B. ovis* ocuparon posiciones intermedias respecto a *E. coli* y *B. abortus* S19, con un menor acople de moléculas a *B. ovis*.

ACOPLE DE AGENTES MICROBICIDAS AL LPS

En las Figuras 23, 24 y 25 se pueden observar los resultados de las pruebas en las cuales se determinó si los agentes catiónicos tenían la capacidad de acoplarse a lipopolisacáridos de las distintas bacterias.

Comparando al LPS de *Salmonella montevideo* y al de *B. abortus* S19, de acuerdo a la Figura 23 se puede observar que el lipopolisacárido de *B. abortus* es el que acopla la menor cantidad de péptidos, ya que permite la formación de halos de diámetro mayor. En la Figura 24, cuando se analizan además los LPS de *B. abortus* 45/20 y *B. ovis*, se encuentra también que la molécula de *S. montevideo* es la que adsorbe una mayor cantidad de agentes microbicidas con excepción del LPS de *B. abortus* 45/20 en presencia de melitina, ya que a la máxima concentración de lipopolisacárido, se comporta prácticamente igual al de *Salmonella*. Sin embargo, se observa que el LPS de *B. ovis* acopla menor cantidad de péptidos que el LPS de *B. abortus* 45/20, a

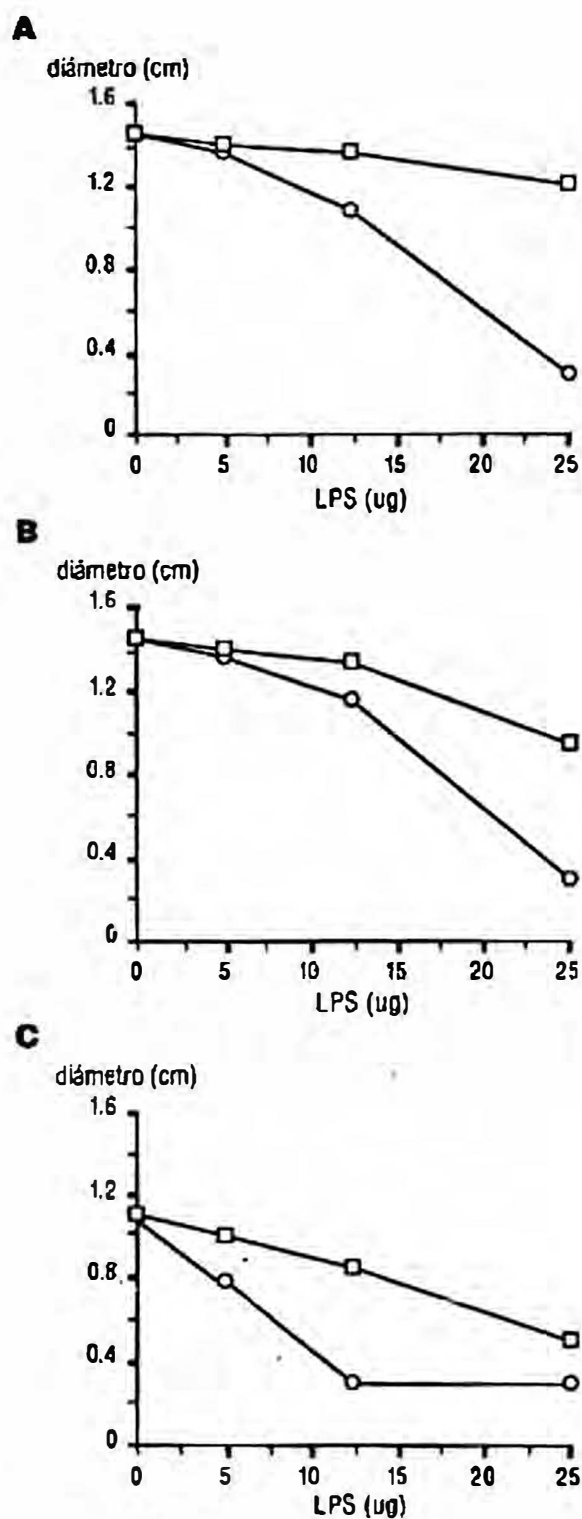


Figura 23. Prueba de acople de agentes microbicidas al LPS. A. Cecropina A. B. Cecropina P1. C. Magainina 2 amida. □ S19, ○ *S. montevideo*.

pesar de que *B. ovis* como bacteria completa acopló más moléculas microbicidas que *B. abortus* 45/20.

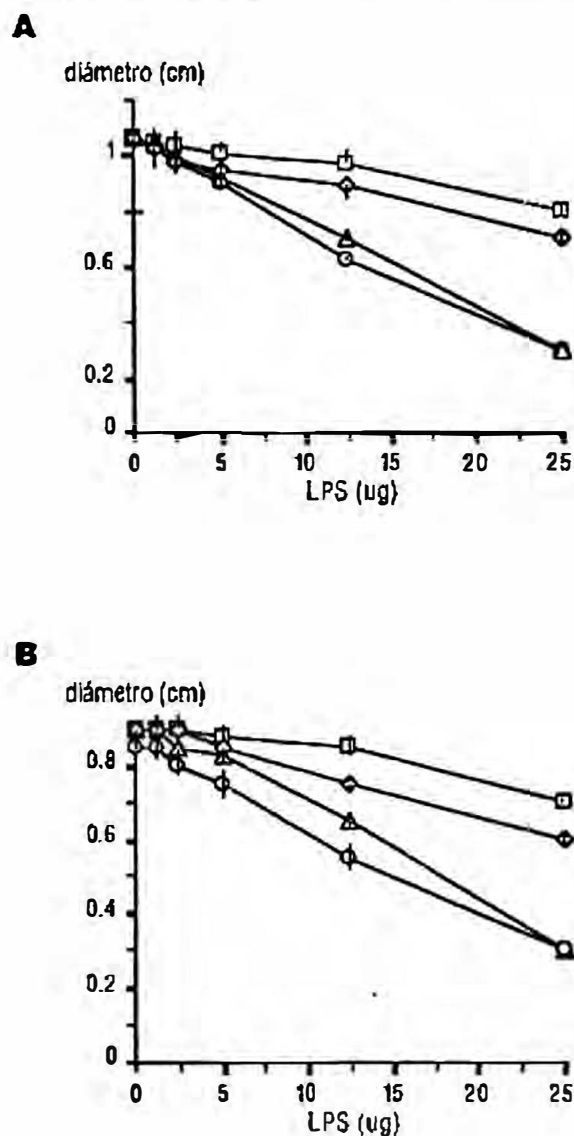


Figura 24. Prueba de acople de agentes microbicidas al LPS. **A.** Melitina. **B.** Proteína catiónica 18A. □ S19, Δ 45/20, ◇ REO 198, ○ *S. montevideo*.

Además, es notable además destacar que de acuerdo a la Figura 25, frente a lactoferricina B y a polimixina B sulfato, el LPS que menor cantidad de péptido acopló fue el de *B. ovis*, acoplando menos péptido incluso que el LPS de *B. abortus* S19.

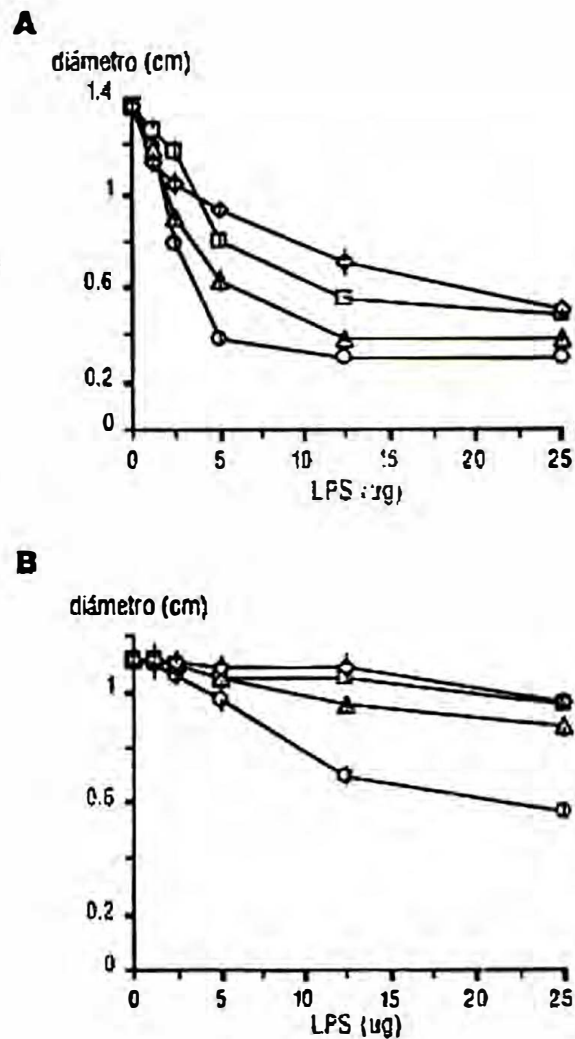


Figura 25. Prueba de acople de agentes microbicidas al LPS. A. Polimixina B sulfato. B. Lactoferricina B. □ S19, Δ 45/20, ◇ REO 198, ○ *S. montevideo*.

ACOPLE DE AGENTES MICROBICIDAS A FRAGMENTOS DE ENVOLTURA CELULAR, 'BLEBS' O ANTIGENO SALINO

En las Figura 26 y 27 se muestran los resultados de la prueba de acople de agentes microbicidas a fragmentos de envoltura celular, 'blebs' o antígeno salino.

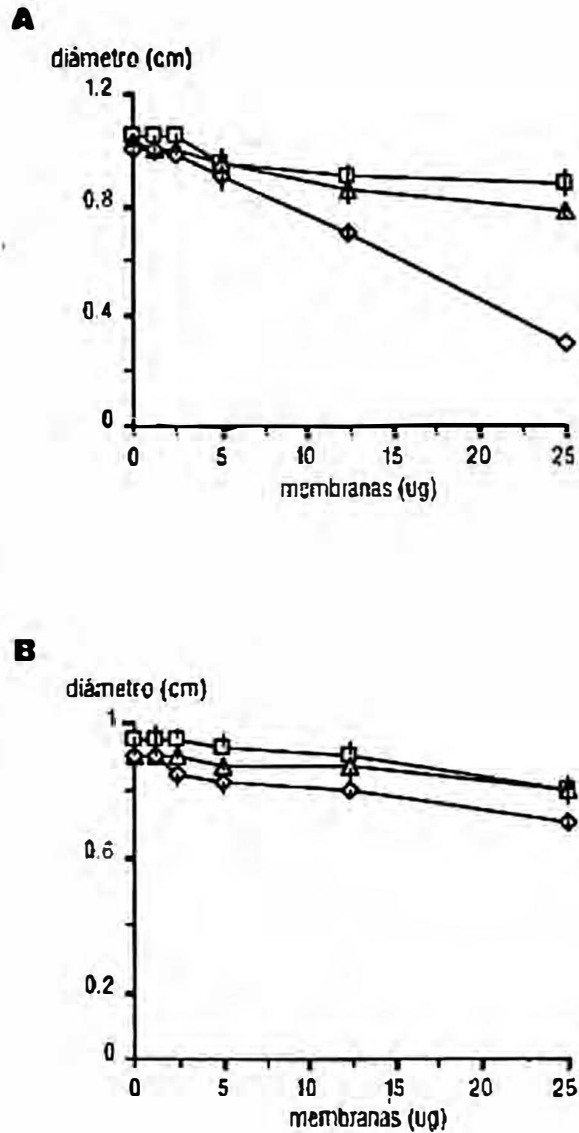


Figura 26. Ensayo de acople a envoltura celular, 'blebs' o antígeno salino. **A.** Melitina. **B.** Proteína catiónica antimicrobiana 18A. □ S19, Δ 45/20, ◇ REO 198.

De acuerdo a las Figuras 26 y 27 se observa que los 'blebs' de *B. abortus* S19 acoplaron cantidades muy similares de péptidos que los fragmentos de envoltura celular de *B. abortus* 45/20, mientras que el antígeno

salino de *B. ovis* fue el que acopló mayor cantidad de péptidos en todos los casos.

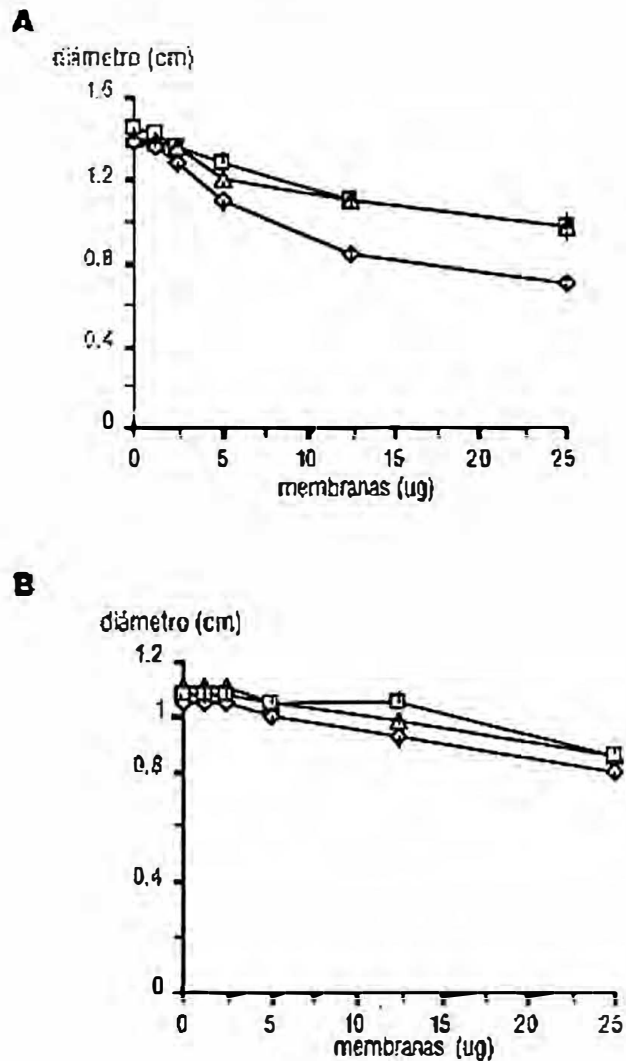


Figura 27. Ensayo de acople a envoltura celular, 'blebs' o antigene salino. A. Polimixina B. B. Lactoferricina B. □ S19. Δ 45/20. ◇ REO 198.

SENSIBILIZACION DE BACTERIAS CON LPS

En el Cuadro 3 se ilustran los datos de la prueba de sensibilización de bacterias utilizando lipopolisacáridos.

Cuadro 3. Actividad antibacterial de agentes catiónicos al sensibilizar a *B. abortus* 45/20 con lipopolisacáridos^a.

Agente bactericida	Testigo sin LPS	LPS <i>B. abortus</i> S19	LPS <i>S. montevideo</i>
Melitina	31.61±2.47	16.40±1.14 (p<001) ^b	99.09±0.43
Polimixina B sulfato	23.94±1.02	8.94±0.67 (p<001) ^b	99.11±0.94
Lactoferricina B	23.15±1.04	17.17±0.83 (p<001) ^b	97.42±2.34
Poli-L-Ornitina	14.74±3.44	11.14±2.02 (p<02) ^b	98.06±1.39
Proteína catiónica 18A	9.91±1.68	7.21±0.53 (p<01) ^b	97.86±0.48
Bactenecina 7 (1-35)	8.56±2.19	7.43±0.97 (p<2) ^b	98.71±1.08

^a La actividad se expresa como porcentaje de inhibición en forma similar a como se describió en el Cuadro 1

^b Probabilidad de diferencia significativa respecto al testigo

Al someter la membrana de *B. abortus* 45/20 a la incorporación de lipopolisacáridos de *S. montevideo* y de *B. abortus* S19, y luego realizar un ensayo de sensibilidad a la acción bactericida de los distintos agentes microbicidas, se observa que mientras el tratamiento con LPS de *S. montevideo* sensibiliza a las bacterias a la acción de los péptidos, el LPS de *B. abortus* S19 ejerce incluso un efecto protector sobre las bacterias en la mayoría de los casos.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MIOTOXININAS

En la Figura 28 se muestra el análisis de hidropaticidad en las moléculas miotoxinina I y II.

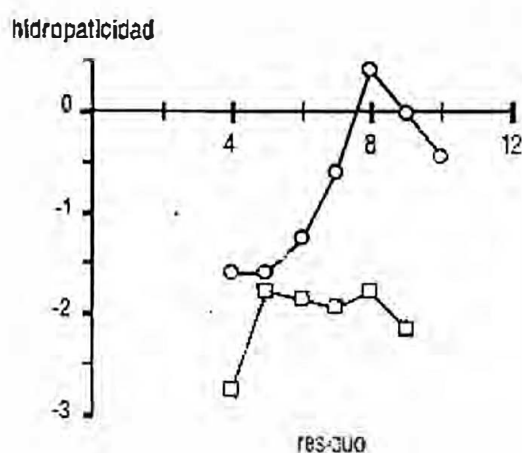


Figura 28. Nivel de hidropaticidad de las miotoxininas I y II. Se utilizó un ámbito de 7 residuos para calcular los valores. ○ Miotoxinina I. □ Miotoxinina II.

existen únicamente tres residuos hidrofóbicos que no se ubican agrupados en una sola región de la proyección axial.

A

1 10
Lys-Lys-Asp-Arg-Tyr-Ser-Tyr-Ser-Trp-Lys-Asp-Lys

B

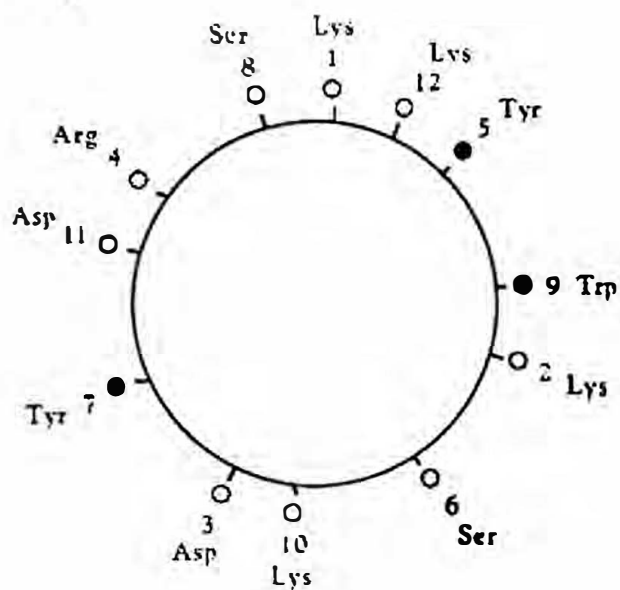


Figura 29. A. Secuencia de la miotoxina II. B. Proyección axial de la miotoxina II. Los círculos negros indican residuos hidrofóbicos. Los círculos claros muestran residuos hidrofílicos.

DISCUSION

Los resultados demuestran que *E. coli*, la bacteria que se usó como testigo en todas las pruebas, fue más sensible que *Brucella* a la acción bactericida de los agentes catiónicos. Además, los péptidos fueron más activos en su acción microbicida que las proteínas.

Observé una gran variedad de actividades microbicidas en las distintas moléculas catiónicas. Analizando el caso de *E. coli* únicamente, que fue el organismo en el cual se estandarizaron los procedimientos, encontré que la polimixina B sulfato, la poli-L-lisina y la poli-L-ornitina poseen una potente actividad bactericida muy similar entre sí, lo que está de acuerdo con trabajos anteriores (Carr & Morrison 1985, Moore et al. 1986, Vaara 1981, Vaara & Vaara 1983). La melitina fue otra de las moléculas con gran poder bactericida, pero la literatura menciona que muchas veces las preparaciones comerciales de este agente vienen acompañadas de fosfolipasas a las que hacen responsables de llevar a cabo gran parte de la acción citolítica (Wille 1989). En este trabajo, sin embargo, observé que la miotoxina II de *B. asper*, a pesar de no ser una fosfolipasa activa (Francis et al. 1991) presentó más actividad que la miotoxina I que si tiene actividad fosfolipasa además de acción miotóxica (Gutiérrez et al. 1984b). Tomando en cuenta que estas proteínas necesitan de la lisozima para demostrar su acción, no se descarta una actividad potenciadora de fosfolipasas en los resultados obtenidos con el péptido del veneno de abeja.

La magainina 2 amida trabajó mejor que la magainina 2 gracias a la sustitución de tres residuos relativamente hidrofóbicos en la molécula natural por residuos altamente hidrofóbicos en el péptido sintético que le confieren una mayor anfifilicidad y consecuentemente una mayor actividad bactericida. Las cecropinas presentaron actividades semejantes entre sí y fueron a su vez más potentes que las magaininas, tal y como se ha descrito anteriormente (Groisman et al. 1992a). La defensina NP-2 presentó una actividad débil en comparación a otras moléculas utilizadas en este estudio a pesar de ser una de las moléculas más activas en su familia. Sin embargo mis resultados concuerdan con los hallazos de otros laboratorios (Groisman et al. 1992b, Vaara 1992). Bellamy y colaboradores (1993a) encontraron que la lactoferricina B actuó en un tiempo menor de incubación que el utilizado aquí.

Sin embargo las condiciones de tiempo, concentración y solución no fueron las mismas, lo que puede explicar la variación entre ambos ensayos.

La miotoxinina I actuó en forma similar a la lactoferricina. El análisis de la actividad bactericida de péptidos sintéticos con secuencias similares pero diferentes longitudes indica que aquellas moléculas con un tamaño que oscila alrededor de los 20 aminoácidos son las que presentan una mayor acción microbicida (Bessalle et al. 1993, Lear et al. 1988) mientras que agentes de mayor o menor número de residuos exhiben una disminución en la actividad. Sería interesante sintetizar homólogos de la miotoxinina I de mayor longitud (esta molécula posee 13 aminoácidos) para determinar si su potencial antibiótico puede incrementarse. Posiblemente la miotoxinina II no presenta acción debido a su pequeño tamaño (posee un aminoácido menos que la miotoxinina I), por su carácter hidrofílico a lo largo de toda la molécula (lo que impediría que se insertara en membranas) y a la presencia de cargas negativas en los residuos de asparagina (que neutralizan las cargas positivas de los residuos catiónicos).

Como mencioné anteriormente, detecté que las proteínas tuvieron en general efectos más débiles que los péptidos de bajo peso molecular. A nivel de concentración molar trabajé siempre con una menor cantidad de proteínas respecto a péptidos, pero algunos autores indican que igualando las concentraciones molares de lactoferrina y lactoferricina B, esta última siempre es más activa presentando un efecto bactericida, mientras que la proteína completa presenta sólo un efecto bacteriostático en las mismas condiciones (Bellamy et al. 1993a, Yamauchi et al. 1993). Lo anterior concuerda con mis resultados y sugiere que además de relaciones estequiométricas se deben tomar en cuenta impedimentos estéricos, como un gran volumen, que pueden impedir a estas moléculas penetrar y desorganizar la membrana externa de las bacterias. Es importante señalar que este fenómeno es mayor en membranas de bacterias gram negativas que en organismos gram positivos o en membranas de células eucarióticas. En este estudio la lactoferrina fue capaz de ejercer una acción permeabilizante junto a lisozima como se ha observado en otros ensayos donde agentes catiónicos facilitan la acción de la muramidasa (Vaara & Vaara 1981) lo que sugiere que efectivamente es el tamaño de la molécula lo que impide que actúe por sí sola en bacterias gram negativas.

De acuerdo a mis resultados, la miotoxina II de *B. asper* es capaz de permeabilizar bacterias y hasta donde tengo conocimiento, esta tesis es el primer informe en el que se demuestra actividad permeabilizadora por parte de fosfolipasas A miotóxicas de viperidos en bacterias (anteriormente se había descrito la acción bactericida de la fosfolipasa básica de la cobra *Naja nigricolis* [Elapidae] pero sólo en mutantes de *E. coli* K12 ya que la cepa silvestre siempre fue resistente [Chwetzoff 1990]). La miotoxina I es probablemente el dominio molecular que induce esta permeabilización. Para la miotoxina de *B. nummifer* y la miotoxina I de *B. asper* que presentaron una baja actividad microbicida frente a *E. coli* aún después de agregar lisozima, los resultados indican que estas moléculas a pesar de estar estructuralmente relacionadas con la miotoxina II y de poseer carácter anfifílico y actividad independiente de la acción fosfolipasa (Días et al. 1991, Gutiérrez et al. 1989) no presentan los requerimientos de cationicidad o estructura química específica necesarios para permeabilizar la membrana externa de *E. coli*. Obtener la secuencia de estas miotoxinas sería muy valioso, ya que así se podrían evaluar adecuadamente los requisitos estructurales necesarios para la acción citolítica en bacterias.

La lisozima, que es una enzima de un tamaño muy similar al de las miotoxinas, posee la capacidad para acoplarse al LPS en solución (Takada et al. 1994). También tiene acción microbicida semejante a la de la poli-L-lisina a través de actividad de dominios catiónicos independientes de la acción muramidasa en bacterias gram positivas (Laible & Germaine 1985, Tompkins et al. 1991, Wang & Germaine 1991). Sin embargo no actúa por sí sola en bacterias gram negativas (Vaara & Vaara 1983a). Sería interesante realizar ensayos que permitan evaluar si son únicamente condicionamientos estéricos los que impiden actuar a la lisozima sin ayuda de otros agentes, y si posee un poder permeabilizante que permita la acción de moléculas catiónicas de bajo peso molecular. Para esto se pueden utilizar sondas fluorescentes que penetren el espacio periplásmico sin alterar la viabilidad de las bacterias (Martínez de Tejada & Moriyón 1993).

Las pruebas de zonas de inhibición con brucelas no reflejan a cabalidad los resultados del ensayo bactericida. Se ha asumido que por los tamaños similares de los péptidos utilizados en este trabajo, las velocidades de difusión en la placa de agar son muy parecidas, pero pueden existir elementos

particulares a nivel de arreglo tridimensional o estructura química que alteren la movilidad de las diferentes moléculas. Además, existen factores como interacciones con el medio que son difíciles de evaluar.

Las concentraciones 'letales' en brucelas calculadas por el método de zonas de inhibición no son comparables con las obtenidas en *E. coli*, debido no sólo a diferencias en el tiempo de generación de las dos especies sino también al nivel de afinidad de las moléculas catiónicas por las bacterias. Con un tiempo de generación de 20 minutos para *E. coli*, al cabo de 5 horas se tendrían 4×10^9 bacterias a partir de un sólo organismo, mientras que con un tiempo de generación de 2.5 horas para *Brucella*, al cabo de 5 horas se tendrían únicamente 4 bacterias a partir también de un sólo organismo, y así por unidad de área siempre existirían más unidades de *E. coli* que podrían consecuentemente adsorber una mayor cantidad de péptidos. A esto hay que agregar que la afinidad de las moléculas microbicidas por las brucelas es aproximadamente 5 veces menor que en el caso de *E. coli*. Lo anterior explica por qué en *Brucella* se observa que los agentes catiónicos difunden distancias mayores, formando halos de mayor diámetro y sugiriendo concentraciones letales más bajas que para *E. coli*, lo que está en desacuerdo con los resultados del ensayo bactericida. En conclusión, la determinación de concentraciones 'letales' por el método de zonas de inhibición no sirve para calcular la acción de los péptidos contra las brucelas respecto a otros organismos. Sin embargo la técnica es valiosa para comparar la susceptibilidad entre las diferentes especies de *Brucella* ya que todas tienen prácticamente el mismo tiempo de generación.

Steiner y colaboradores (1981) así como Boman & Hultmark (1987) informan de valores de concentración letal de cecropinas inferiores a los que se calculan en este trabajo de acuerdo a los ensayos de zonas de inhibición, así mismo Wade y colaboradores (1990) en magaininas. Sin embargo, los valores que se muestran aquí para las cecropinas (y también para las magaininas) provienen de datos de pozos únicos por lo que se debieron utilizar diámetros inferiores al diámetro crítico para calcular las concentraciones letales (ver Apéndice 2) y esta metodología generalmente proporciona valores que sobrestiman los valores reales (Hultmark et al. 1982). Curiosamente, la lactoferricina **B** que a nivel de ensayo bactericida tuvo una acción importante relativa en *B. abortus* S19 y 45/20, fue incapaz de formar halos de inhibición

para *B. abortus* S19 y también actuó en forma muy débil frente a *B. abortus* 45/20 en esta prueba. Esto nuevamente demuestra inconsistencias en el ensayo de zonas de inhibición.

Al estudiar en forma global la acción de los agentes microbicidas tanto en *E. coli* como en *Brucella*, no se observa un mismo patrón de acción de los distintos péptidos para cada bacteria. Groisman y colaboradores (1992b) observaron también trabajando con melitina, magainina 2, defensina NP-1 y cecropina P1 que distintas cepas de *Salmonella* eran diferencialmente sensibles a la acción de las moléculas catiónicas.

Los agentes catiónicos utilizados en el presente trabajo adoptan estructuras tridimensionales variadas, sin embargo no observé un patrón característico de acción de acuerdo al tipo de conformación: hélices α en el caso de las cecropinas, magaininas, y melitina; lámina β en la defensina; combinación de hélices α y láminas β en las proteínas como la lisozima, la lactoferrina y las miotoxinas; hélices α o láminas β según el solvente en el caso de la poli-L-lisina y la poli-L-ornitina; estructura desconocida aunque se reconoce un carácter anfipático en las bacterenecinas, proteína catiónica antimicrobiana y lactoferricina B. La miotoxinina I parece ubicarse en una región de la miotoxina II que no equivale a una hélice α (B. Lomonte, comunicación personal) pero el análisis de proyección axial indica que posee todas las cualidades para formar una estructura de este tipo (ver Figura 29B)

Blondelle & Houghten (1992) mencionan que estudiando péptidos con contenidos similares de aminoácidos pero diferente arreglo tridimensional, las láminas β presentan menor actividad microbicida que las hélices α . La única lámina β utilizada en este trabajo fue la defensina NP-2, pero tomando en cuenta que la magainina 2 adopta la estructura de una hélice α , y requirió un tiempo superior de incubación para lograr un resultado similar al de la defensina, no se puede generalizar el hallazgo de Blondelle & Houghten (1992).

Kini y Evans (1989) encontraron en una serie de agentes con capacidades citolíticas (entre ellos cecropinas, magaininas, melitinas y miotoxinas) un patrón catiónico y anfifílico involucrado en la actividad de estas moléculas. En el presente estudio aunque la presencia de un sitio catiónico asociado a una región anfifílica estaba presente en la mayoría de las moléculas analizadas, no se detectó un motivo catiónico uniforme tan específico como el

descrito de acuerdo al criterio de estos autores (Kini & Iwanaga 1986). El péptido con una mayor cantidad de cargas positivas asociadas a un sólo sitio activo fue el derivado de la proteína catiónica antimicrobiana 18A (11 cargas positivas y 6 cargas neutras interespaciadas) que mostró una notable acción bactericida e inhibitoria, pero cuya actividad fue superada por otras moléculas. Lamentablemente no se conoce la conformación tridimensional de este péptido para así determinar como están distribuidas las cargas en el espacio, aunque análisis con la metodología de Schiffer & Edmundson (1967) permite establecer que no se trata de una hélice α . Por el contrario, la molécula con el menor número de cargas positivas asociadas a un sólo sitio activo fue la melitina (4 cargas positivas dispuestas linealmente) que resultó ser la molécula más poderosa de todas las muestreadas haciendo un balance global de su actividad. Este hecho demuestra que, como se ha comprobado anteriormente para la polimixina B y derivados (Vaara 1992) y como indican incluso Kini y Evans (1989), a pesar de que el carácter catiónico es necesario para la acción de los agentes microbicidas (se menciona un requerimiento mínimo de 4-5 cargas positivas para la presencia de actividad microbicida [Blondelle & Houghten 1992, Vaara & Vaara 1983b]), la estructura química específica de las moléculas también presenta relevancia, ya que en muchos casos determinará la especificidad de la acción de las moléculas. Especialmente en *B. ovis* es importante este fenómeno, ya que moléculas muy relacionadas entre sí como las dos breccropinas utilizadas, o las dos batenecinas, presentaron resultados muy distintos en los ensayos bactericidas.

Como mencioné anteriormente, las bacterias del género *Brucella* fueron más resistentes a la actividad de agentes catiónicos que una enterobacteria típica como *E. coli*. La única excepción fue *B. ovis* en presencia de batenecina 7 (1-35), cuyo caso se discute más adelante. La menor acción bactericida contra *Brucella* se debe muy probablemente a que estos péptidos se acoplan a la membrana de la bacteria con mucha menor afinidad que a otras bacterias gram negativas. En favor de esta hipótesis tenemos que la defensina NP-2, melitina, polimixina B y lactoferricina B se acoplan a *Brucella* en mucha menor escala que a *E. coli*.

El LPS es considerado como determinante en la acción de los péptidos ya que a esta molécula se da el acople inicial para desorganizar la membrana externa. Recientemente se ha identificado que en el mutante de *Salmonella*

typhimurium pmrA sensible a polimixina (Vaara 1981) el defecto que se observa se localiza en un locus regulador de dos componentes que normalmente detecta la presencia de cambios en el ambiente y genera una respuesta adaptativa en el organismo (Roland et al. 1993), en este caso particular la síntesis de una molécula de lípido A con sustituciones en los grupos fosfato por 4-aminoarabinosa y fosforiletanolamina, volviendo al LPS menos negativo y menos susceptible al acople de moléculas catiónicas.

Los experimentos llevados a cabo en mi trabajo apuntan a una efectiva preponderancia de esta molécula en la susceptibilidad a los agentes catiónicos. Esto se demostró en las pruebas de sensibilización de bacterias por LPS heterólogo ya que las brucelas tratadas con LPS de *S. montevideo* fueron más propensas a la acción de las moléculas microbicidas que los testigos, mientras que aquellas tratadas con LPS de *B. abortus* S19 presentaron en varios casos mayor resistencia a la actividad antibiótica que las brucelas rugosas sin ningún tratamiento.

De acuerdo al tipo de LPS de cada bacteria, así fue la sensibilidad contra agentes catiónicos exhibida. Repetidamente se ha mencionado que bacterias con LPS de tipo rugoso son más susceptibles a la acción de agentes microbicidas que las bacterias con LPS de tipo liso. Esto se debe principalmente a que las cadenas O pueden enmascarar los grupos negativos cargados en la región donde se ubica el ácido manooctulosónico (KDO) y el lípido A (Capodici et al. 1994, Farley et al. 1988, Weiss et al. 1986). De hecho, en *B. abortus* 45/20 se ha descrito una mayor densidad de cargas expuestas a nivel de superficie que en *B. abortus* S19 (Schurig et al. 1981). Aún más, en *B. canis* (una brucela de tipo rugoso que ocurre naturalmente al igual que *B. ovis*) se detectan sitios aniónicos expuestos en la membrana externa atribuidos a grupos carboxilo y fosfato en la molécula de LPS (Weber et al. 1977). En las pruebas de acción bactericida se observa claramente que las brucelas de morfología rugosa fueron más susceptibles a los agentes microbicidas que las brucelas de morfología lisa. De igual forma, se observó una concentración letal inferior en bacterias con LPS de tipo rugoso.

En el ensayo de acople de péptidos a bacterias, observé claramente una correlación entre el acople de los agentes microbicidas a las bacterias y la actividad de los respectivos agentes. Así, *E. coli* fue siempre la bacteria que acopló una mayor cantidad de péptidos catiónicos y fue a su vez el organismo

más sensible. En *Brucella*, *B. abortus* S19 fue la cepa que acopló menos cantidad de agentes bactericidas y a su vez fue la más resistente, mientras que *B. ovis* acopló mayor cantidad de moléculas y fue el organismo más sensible dentro del género. No fue posible estandarizar la metodología utilizada para la lactoferricina B y defensina NP-2 en el caso de melitina y polimixina B porque la acción de estas dos últimas moléculas es tan rápida que los intervalos de manejo de material durante la prueba resultan demasiado extensos para poder establecer con claridad tiempos puntuales de actividad como se requería para realizar gráficos como los obtenidos con el procedimiento original.

En las pruebas de acople de péptidos al LPS, observé que el LPS de *Salmonella montevideo* posee una mayor capacidad de acople que los LPS de las distintas brucelas. En los ensayos en los que trabajé con LPS de las tres especies de *Brucella* utilizadas, encontré que el LPS de *B. abortus* 45/20 siempre acopló más péptidos que el LPS de *B. abortus* S19, lo que correlaciona con una mayor sensibilidad a la acción de los distintos agentes. Sin embargo, se pudo comprobar que en *B. ovis* REC198 no se podía establecer esta relación ya que el LPS de esta bacteria, en presencia de la melitina acoplaba menos péptido que el LPS de *B. abortus* 45/20, a pesar de haber sido *B. ovis* notablemente más sensible en los ensayos bactericidas y de zonas de inhibición. Además, en presencia de polimixina B o lactoferricina B el LPS de *B. ovis* acopló menos péptido incluso que el LPS de *B. abortus* S19, bacteria que fue mucho menos sensible a la acción de estos agentes que *B. ovis* (compárense los datos de porcentaje de inhibición para la polimixina B). Una explicación posible a este fenómeno es que el LPS de *B. ovis* no se constituye como un LPS de tipo rugoso similar al LPS de *B. abortus* 45/20, sino que es un lipopolisacárido con propiedades particulares como lo revela el hecho de poseer determinantes antigénicos diferentes de los LPS de cepas lisas o de mutantes rugosos derivados de estas cepas lisas, como es el caso del LPS de *B. abortus* 45/20 (Díaz & Bosseray 1973, Moreno et al 1981). En este sentido, debe recordarse que *B. ovis* es una especie con un LPS rugoso natural (Díaz et al. 1967).

Otra conclusión factible es que aunque el LPS es una molécula importante para la acción de los agentes catiónicos, no es el único componente de membrana externa involucrado en esta actividad. Los ensayos de acople de agentes microbicidas a 'blebs', componentes de envoltura celular y antigénicos

salino revelan que efectivamente existen otros elementos además del LPS relacionados con la acción de las moléculas bactericidas. El antígeno salino de *B. ovis* posee además de LPS, proteínas de membrana externa del grupo 3 (Gamazo et al. 1989, Riezu-Boj et al. 1990) a las que podrían acoplarse también los antibióticos muestreados. El hecho de que células rugosas de *B. ovis* pero no otras brucelas lisas removieran anticuerpos contra proteínas del grupo 3 (Riezu-Boj et al. 1990), así como la inducción de inmunidad en ratones al vacunar con antígeno salino de *B. ovis* (Jiménez de Bagüés et al. 1994) sugiere que estas proteínas están expuestas en la superficie de bacterias intactas. Se ha observado que la lactoferrina puede acoplarse a algunas proteínas de membrana externa de *E. coli* pero no se detectó acople a proteínas del grupo 3 (Erdei et al. 1994). Sin embargo, estas proteínas no son equivalentes al grupo 3 en *Brucella*.

La similitud en los resultados de acople en el caso de los 'blebs' de *B. abortus* S19 y los fragmentos de envoltura celular de *B. abortus* 45/20 podría deberse a la existencia de porciones de membrana citoplasmática incluidos en los fragmentos de envoltura celular. Esto sugiere que en realidad se estaba analizando una menor cantidad de envoltura en comparación a los 'blebs' de *B. abortus* S19.

La idea de que otros elementos ajenos al LPS están involucrados en la acción de agentes catiónicos es apoyada por el hallazgo de otro mutante de *Salmonella typhimurium* sensible a defensinas, magaininas, melitina y cecropinas. El defecto del mutante se ubica en un locus regulador de dos componentes sensible a cambios en el ambiente (Fields et al. 1989, Groisman et al. 1992b) que no interviene en la síntesis del LPS, por lo que en este mutante el lipopolisacárido es una molécula normal. El gen está involucrado en la producción de una proteína periplásmica o de membrana que sería la responsable de la resistencia a los péptidos (Miller et al. 1989). En otras bacterias gram negativas se observó la presencia de este locus, no así en *Brucella* (Groisman et al. 1989), lo que no implica que este parásito no posea un sistema análogo.

Por desgracia, se conoce muy poco sobre las características de la membrana externa de *B. ovis*, lo que dificulta la interpretación de uno de los resultados más sobresalientes del presente trabajo, como lo es la completa sensibilidad de esta bacteria a la acción de la bacterenecina 7 (1-35). Existe

además el inconveniente de que esta bactenecina es uno de los pocos péptidos sobre los cuales no se posee información sobre su estructura tridimensional, por lo que es todavía más difícil el análisis de los datos (la presencia de un alto número de prolinas indica que probablemente no se trata de una hélice α o de láminas β). A nivel de estructura secundaria se predice un patrón similar en cuanto a la estructura de las dos bactenecinas (Figura 11B), pero se observa un distanciamiento ligeramente mayor entre los diferentes dominios de giros empacados en la bactenecina 7 (1-35) (Frank et al. 1990) (ver Figura 11B). En bactenecina 5 (0-30) el motivo más característico es la secuencia Arg-Pro-Pro mientras que en la bactenecina 7 (1-35) es la secuencia Pro-Arg-Pro. En estas ligeras diferencias es donde debe radicar el poder de acción de la bactenecina 7(1-35) sobre *B. ovis*, indicando nuevamente que la estructura química de los péptidos catiónicos, incluso a niveles muy finos como los mencionados anteriormente, determinan un comportamiento tan disímil como el observado en las bactenecinas frente a *B. ovis*. Incluso se ha observado que un péptido aislado de bovinos denominado PR-39 y que es igualmente rico en argininas y prolinas como las bactenecinas, posee un mecanismo de acción totalmente distinto que no involucra lisis de membranas sino inhibición de la síntesis de proteínas y de ADN (Boman et al. 1993). Es interesante que las bactenecinas aisladas en bovinos no actuaron contra el parásito bovino, sino contra el parásito ovino. También resulta interesante destacar que la bactenecina 7 (1-35) junto con la melitina (el péptido más poderoso de acuerdo a los resultados obtenidos) formó los halos de características más definidas en los ensayos de zonas de inhibición.

Los resultados de mi tesis concuerdan plenamente con los datos obtenidos en una tesis de doctorado realizada en forma paralela en España (Martínez de Tejada 1993) en la cual, trabajando principalmente con *Brucella abortus* 2308 (lisa) y RB51 (rugosa) así como con *Brucella melitensis* B115 (rugosa) y Rev1 (lisa) se detectó que la polimixina y la protamina no sólo no poseen un efecto microbicida sobre estas bacterias, sino que ni siquiera provocan cambios de permeabilidad en la membrana externa. Además, se observó que el patrón de incorporación a través de la membrana externa de sondas fluorescentes fue muy distinto en *B. ovis* respecto a los mutantes rugosos de *B. melitensis* y *B. abortus*, reafirmando la particularidad de la envoltura celular de esta bacteria.

Los datos acumulados hasta el momento permiten reafirmar el modelo que se conoce respecto a la membrana externa de *Brucella*, en el cual el LPS posee una menor cantidad de cargas negativas, existe una gran hidrofobicidad debido a la presencia de ácidos grasos de cadena larga, se observa una estrecha relación entre proteínas con componentes del periplasma y de la membrana externa, y existen componentes de caracter particular como la fosfatidilcolina que recientemente se ha comprobado inhibe no sólo la acción de la polimixina, sino también la de defensinas y magaininas [Vaz-Gomez et al. 1993] y lípidos de ornitina que sustituyen fosfolípidos pero cuyo papel resta todavía por evaluarse frente a agentes catiónicos (Figura 31).

La ausencia en *Brucella* de la vía de autopromoción (Hancock 1984) es

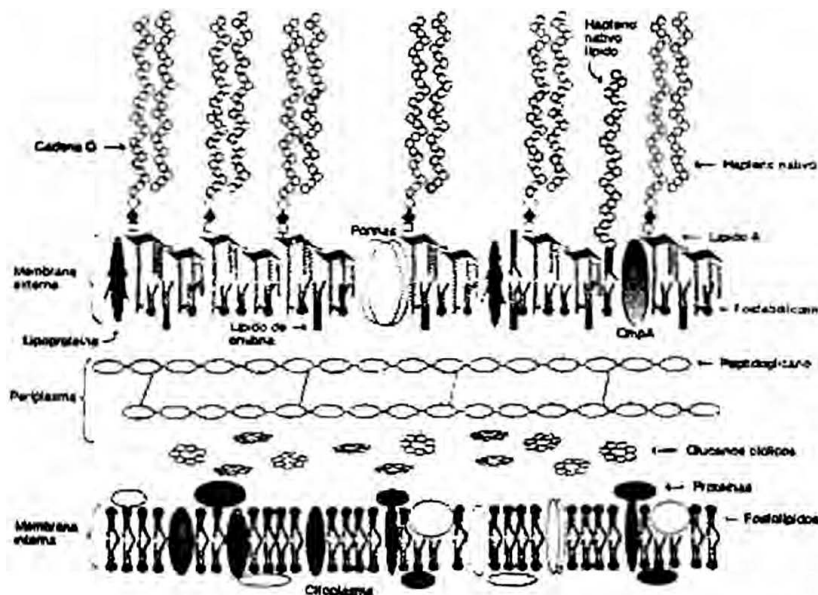


Figura 31. Modelo de la envoltura celular de *Brucella*. La presencia de lípidos de ornitina en la capa exterior de la membrana externa no ha sido comprobada.

de notable importancia ya que, como mencioné en la revisión de literatura, las moléculas catiónicas que utilizan este mecanismo para efectuar su acción microbicida representan una importante línea de defensa en una gran variedad de organismos, y en mamíferos en particular estos agentes están presentes en cantidades importantes en los fagocitos profesionales, células que son parasitadas precisamente por *Brucella*, lo que implica que esta bacteria está adaptada al ambiente hostil que representan los fagosomas de esas células y consecuentemente a la vida intracelular

CONCLUSIONES

- La membrana externa de *Brucella* representa una barrera efectiva contra aquellos agentes microbicidas que utilizan la vía de autopromoción como mecanismo de acción.
- La ausencia de esta vía esta determinada por una escasa capacidad de acople de los agentes microbicidas a la membrana externa de *Brucella*.
- El LPS, a pesar de estar involucrado en la resistencia a los agentes que utilizan la vía de autopromoción, no es el único determinante que define la actividad de estas moléculas.
- La membrana externa de *Brucella ovis* REO 198 presenta particularidades respecto a la envoltura de otras bacterias rugosas como *Brucella abortus* 45/20.
- Las fosfolipasas A miotóxicas de vipéridos poseen capacidad para permeabilizar la membrana externa en bacterias gram negativas.
- La miotoxinina I, péptido derivado de la miotoxina II de *Bothrops asper*, presenta actividad bactericida.

PERSPECTIVAS

Brucella es un modelo bacteriano en el cual todavía falta mucha información por conocerse. Recientemente se ha aislado un nuevo biotipo de un mamífero marino (Ewalt et al. 1994), reservorio nunca antes descrito para esta especie pero relacionado filogenéticamente con ungulados (Thewissen et al. 1994), y se ha revelado la presencia de un genoma compuesto por dos cromosomas (Michaux et al. 1993), fenómeno anteriormente observado sólo en los géneros *Rhodobacter*, *Agrobacterium* y *Rhizobium*, que son todos organismos cercanos filogenéticamente a las brucelas (Allardet-Servent et al. 1993).

A nivel molecular, la información también es fragmentaria respecto a las adaptaciones de *Brucella*. Identificar exactamente la estructura y composición de la membrana externa de este parásito no sólo implica avances en ciencia básica sino que también permite una selección más adecuada de fármacos que controlen efectivamente la brucelosis y otras bacterias relacionadas como las rickettsias.

Día a día se describen nuevos agentes microbicidas aislados de un número cada vez más extenso de taxones. Entre los más recientes hallazgos se encuentran los péptidos antimicrobianos equinos (Couto et al. 1993), las proteínas microbicidas murinas (Hiemstra et al. 1993) y los péptidos intestinales porcinos (Agerberth et al. 1993). En nuestro país se efectúan trabajos para caracterizar a los nuevos péptidos miotoxininas. En múltiples laboratorios realizan esfuerzos para producir híbridos de moléculas ya conocidas con un espectro de acción más poderoso (Andreu et al. 1992, Steiner et al. 1988, Wade et al. 1992) y a nivel industrial para permitir su comercialización (Piers et al. 1993, Rao et al. 1992, Tamamura et al. 1993). El estudio de esta nueva generación de antibióticos no sólo ofrece una poderosa alternativa al mercado actual donde se observa resistencia a los agentes tradicionalmente utilizados (Cohen 1992, Neu 1992, Travis 1994), sino que el estudio de sus mecanismos de acción ofrece la posibilidad de arrojar luz sobre las propiedades y características de los modelos en los cuales se utilizan.

BIBLIOGRAFIA

- Agerberth, B., J.-Y. Lee, T. Bergman, M. Cariquist, H.G. Boman, V. Mutt & H. Jörnvall. 1991. Aminoacid sequence of FR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur. J. Biochem.* 202: 849-854.
- Aisen, P. & I. Listowsky. 1980. Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 167-175.
- Ahmed, M.K., C.T. Choman & P.T.T. Wong. 1992. High pressure FTIR study of interaction of melittin with dimyristoylphosphatidyl glycerol bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 63: 139-148.
- Albert, A. 1985. *Selective toxicity*. Chapman & Hall, London. 324 p.
- Alton, G.G., L.M. Jones & D.E. Pietz. 1975. *Laboratory techniques in brucellosis*. Monograph 55. World Health Organization, Geneva.
- Alvarado, J. & J.M. Gutiérrez. 1988. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). *Rev. Biol. Trop.* 36: 563-565.
- Allardet-Servent, A., S. Michaux-Charachon, E. Jumas-Bilak, L. Karayan & M. Ramuz. 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J. Bacteriol.* 175: 7869-7874.
- Anderson, B.F., H.M. Baker, G.E. Norris, D.W. Rice & E.N. Baker. 1989. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 209: 711-734.
- Anderson, T.D. & N.F. Cheville. 1986. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. *Ame. J. Pathol.* 90: 903-910.
- Andreu, D., R.B. Merrifield, H. Steiner & H.G. Boman. 1985. N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity and conformational properties. *Biochem.* 24: 1683-1688.
- Andreu, D., J. Ubach, A. Boman, B. Wåhlin, D. Wade, R.B. Merrifield & H.G. Boman. 1992. Shortened cecropin A-melittin hybrids. *FEBS Letters* 296: 190-194.
- Arri, R.K., R.J. Ward, J.M. Gutiérrez & A. Tulinsky. 1994. Crystal structure of a calcium-dependent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. En prensa.

- Arnold, R.R., M. Brewer & J.J. Gauthier. 1980. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun.* 28: 893-898.
- Arnold, R.R., J.E. Russell, W.J. Champion, M. Brewer & J.J. Gauthier. 1982. Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect. Immun.* 35: 792-797.
- Arnold, R.R., J.E. Russell, W.J. Champion & J.J. Gauthier. 1983. Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. *Infect. Immun.* 32: 655-660.
- Baghian, A. & K.G. Kousoulas. 1993. Role of the Na⁺, K⁺ pump in herpes simplex type 1-induced cell fusion: melittin causes specific reversion of syncytial mutants with the Syn1 mutation to Syn⁺ (wild-type) phenotype. *Virology* 196: 548-556.
- Baldwin, G.S. 1993. Comparison of transferrin sequences from different species. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 203-218.
- Bechinger, B., M. Zasloff & S.J. Opella. 1993. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Science* 2: 2077-2084.
- Behr, N.C., C.A. Schnaitmann & A. Pugsley. 1980. Major heat-modifiable outer membrane protein in Gram negative bacteria: comparison with the OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 143: 906-913.
- Bellamy, W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase & M. Tomita. 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bacterial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 472-479.
- Bellamy, W., H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura & M. Tomita. 1993a. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol.* 182: 97-105.
- Bellamy, W., H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura & M. Tomita. 1993b. Role of cell-binding in the antibacterial mechanism of lactoferricin B. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 184-196.
- Benenson, A.S. 1987. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Organizacion Panamericana de la Salud. Washington. 536 p.
- Berman, D.T. & R.S. Kurtz. 1987. Relationship of biological activities to structures of *Brucella abortus* endotoxin and LPS. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138: 98-101

- Bernheimer, A.W. & B. Rudy. 1986. Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 864: 123-141
- Bessalle, R., A. Gorea, I. Shalit, J.W. Metzger, C. Dass, D.M. Desiderio & M. Fridkin. 1993. Structure-function studies of amphiphilic antibacterial peptides. *J. Med. Chem.* 36: 1203-1209.
- Bevins, C.L. & M. Zasloff. 1990. Peptides from frog skin. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 395-414.
- Blondelle, S.E. & R.A. Houghten. 1992. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochem.* 31: 12688-12694.
- Boman, H.G. 1991. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* 65: 20-207.
- Boman, H.G., B. Agerberth & A. Boman. 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of Cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immun.* 61: 2978-2984.
- Boman, H.G., I.A. Boman, D. Andreu, Z.-Q. Li, R.B. Merrifields, G. Schlenstedt & R. Zimmermann. 1989. Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B. *J. Biol. Chem.* 264: 5852-5860.
- Boman, H.G., I. Faye, G.H. Gudmundsson, J.-Y. Lee & D.-A. Lidholm. 1991. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.* 201: 23-31.
- Boman, H.G. & D. Hultmark. 1987. Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 103-126.
- Bonmatin, J.M., M. Genest, M.C. Petit, E. Gincel, J.P. Simorre, B. Cornet, X. Gallet, A. Caille, H. Labbé, F. Vovelle & M. Ptak. 1992. Progress in multidimensional NMR investigations of peptide and protein 3-D structures in solution. From structure to functional aspects. *Biochimie* 74: 825-836.
- Bowser, D.V., R.W. Wheat, J.W. Foster & D. Leong. 1974. Occurrence of quinovosamine in lipopolysaccharides of *Brucella* species. *Infect. Immun.* 9: 772-774.
- Brey, P.T., W.-J. Lee, M. Yamakawa, Y. Koizumi, S. Perrot, M. François & M. Ashida. 1993. Role of the integument in insect immunity: Epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 62-75-6279.

- Bulet, P., S. Cociancich, J.L. Dimarcq, J. Lambert, J.M. Reichhart, D. Hoffmann, C. Hetru & J.A. Hoffmann. 1991. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *J. Biol. Chem.* 266: 24520-24525.
- Bulet, P., S. Cociancich, M. Reuland, F. Sauber, R. Bischoff, G. Hegy, A. van Dorsselaer, C. Hetru & J.A. Hoffmann. 1992. A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata). *Eur. J. Biochem.* 209: 977-984.
- Bultrón, E., M. Thelestam & J.M. Gutiérrez. 1993. Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a phospholipase A₂ isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1179: 253-259.
- Bundle, D.R., J.W. Cherwonogrodzky, M. Caroff & M.B. Perry. 1987a. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138: 92-98.
- Bundle, D.R., J.W. Cherwonogrodzky & M.B. Perry. 1987b. Structural elucidation of the *Brucella melitensis* M antigen by high-resolution NMR at 500 MHz. *Biochem.* 26: 8717-8726.
- Burdle, D.R., J.W. Cherwonogrodzky & M.B. Perry. 1988. Characterization of *Brucella* polysaccharide B. *Infect. Immun.* 56: 1101-1106.
- Borenstein, L.A., M.E. Selsted, R.I. Lehrer & J.N. Miller. 1991. Antimicrobial activity of rabbit leukocyte defensins against *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infect. Immun.* 59: 1359-1367.
- Caballero, M. 1984. Isolation of *B. abortus* 45/20 peptidoglycan. M. Sc. Thesis. University of Wisconsin, Madison, USA.
- Callaway, J.E., J. Lai, B. Haselbeck, M. Baltaian, S.P. Bonnesen, B. Weickmann, G. Wilcox & S.-P. Lei. 1993. Modification of the C terminus of cecropin is essential for broad-spectrum antimicrobial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1614-1619.
- Canning, P.C. 1990. Phagocyte function in resistance to brucellosis, p. 151-163. In G. Adams (ed.), *Advances in brucellosis research*. Texas A & M University Press, Texas.
- Capodici, C., S. Chen, Z. Sidorczyk, P. Elsbach & J. Weiss. 1994. Effect of lipopolysaccharide (LPS) chain length on interactions of bactericidal/permeability-increasing protein and its bioactive 23-kilodalton NH₂-terminal fragment with isolated LPS and intact *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 62: 259-265

- Caroff, M., D.R. Bundle, M.B. Perry, J.W. Cherwonogrodzky & J.R. Duncan. 1984. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect. Immun.* 46: 384-388.
- Carr, C. & D.C. Morrison. 1985. Mechanism of polymyxin B-mediated lysis of lipopolysaccharide-treated erythrocytes. *Infect Immun.* 84-89.
- Cociancich, S., A. Ghazi, C. Hetru, J.A. Hoffmann, & L. Letellier. 1993a. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* 268: 19239-19245.
- Cociancich, S., M. Goyffon, F. Bontems, P. Bulet, F. Bouet, A. Menez & J. Hoffmann. 1993b. Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 17-22.
- Cohen, M.L. 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 257: 1050-1055.
- Corbel, M.J. 1990. *Brucella*, p. 340-343. In M.T. Parker & L.H. Collier (eds.), *Topley's & Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity*. Edward Arnold, London.
- Corbel, M.J. & W.J. Brinley-Morgan. 1984. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL, p. 377-388. In N.R. Krieg & J.C. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. The William and Wilkins Co., Baltimore.
- Corriveau, C.C. & R.L. Danner. 1993. Antiendotoxin therapies for septic shock. *Infect. Agents Dis.* 2: 44-52.
- Chadwick, J.S. & G.B. Dunphy. 1986. Antibacterial and antiviral factors in arthropod hemolymph, p. 287-330. In A.P. Gupta (ed.), *Hemocytic and humoral immunity in arthropods*. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Chen, H.-C., J.H. Brown, J.L. Morell & C.M. Huang. 1988. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 236: 462-466.
- Cherwonogrodzky, J.W., G. Dubray, E. Moreno & H. Mayer. 1990. Antigens of *Brucella*, p. 19-64. In K. Nielsen & J.R. Duncan (eds.) *Animal brucellosis*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Chipman, D.M., & N. Sharon. 1969. Mechanism of lysozyme action. Lysozyme is the first enzyme for which the relation between structure and function has become clear. *Science* 165: 454-465.

- Eisenhauer, P.B., S.S.L. Harwig & R.I. Lehrer. 1992. Cryptidins: antimicrobial peptides of the murine small intestine. *Infect. Immun.* 60: 3556-3565.
- Eisenhauer, P.B., S.S.L. Harwig, D. Szklarek, T. Ganz, M.E. Selsted & R.I. Lehrer. 1989. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. *Infect. Immun.* 57: 2021-2027.
- Elsbach, P. & J. Weiss. 1993a. Bactericidal/permeability increasing protein and host defence against gram-negative bacteria and endotoxin. *Curr. Op. Immunol.* 5: 103-107.
- Elsbach, P. & J. Weiss. 1993b. The bactericidal/permeability increasing protein (BPI), a potent element in host-defence against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide. *Immunobiol.* 187: 417-429.
- Ellison, R.T., III, T.J. Giehl & F.M. LaForce. 1988. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immun.* 56: 2774-2781.
- Ellison, R.T., III, F.M. LaForce, T.J. Giehl, D.S. Boose & B.E. Dunn. 1990. Lactoferrin and transferrin damage of the gram-negative outer membrane is modulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} . *J. Gen. Microbiol.* 136: 1437-1446.
- Enright, F.M. 1990. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals, p. 301-320. In K. Nielsen & B. Duncan (eds.), *Animal brucellosis*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Erdei, J. A. Forsgren & A. Satyanarayan-Naidu. 1994. Lactoferrin binds to porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 62: 1236-1240.
- Ewalt, D.R., J.B. Payeur, B.M. Martin, D.R. Cummins & W.G. Miller. 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). En prensa.
- Farley, M.M., W.M. Shafer & J.K. Spitznagel. 1988. Lipopolysaccharide structure determines ionic and hydrophobic binding of a cationic antimicrobial neutrophil granule protein. *Infect. Immun.* 56: 1589-1592.
- Feingold, D.S., C.C. Hsueh & I.J. Sud. 1974. Basis for the selectivity of the action of polymyxin antibiotics on cell membranes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 235: 480-492.
- Fields, P.I., E.A. Groisman & F. Heffron. 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 243: 1059-1062.

- Francis, B., J.M. Gutiérrez, B. Lomonte & I.I. Kaiser. 1991. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. Arch. Biochem. Biophys. 284: 352-359.
- Frank, R.W., R. Gennaro, K. Schneider, M. Przybylski & D. Romeo. 1990. Amino acid sequences of two proline-rich bacterenecins. J. Biol. Chem. 265: 18871-18874.
- Freer, E. 1990. Demonstration of the heterogeneity of *Brucella* lipid A by high performance thin-layer chromatography. M.Sc. Thesis, Karolinska Institut, Stockholm.
- Freer, E., N. Rojas, A. Weintraub, A.A. Lindberg & E. Moreno. 1994. Physical heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. Remitido para publicación.
- Fujii, G., M. E. Selsted & D. Eisenberg. 1993. Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. Protein Science 2: 1301-1312.
- Fuse, N., Y. Hayashi, J. Fukata, T. Tominaga, O. Ebisui, Y. Satoh, T. Isohara, I. Uno & H. Imura. 1993. Purification and characterization of new anti-adrenocorticotropin rabbit neutrophil peptides (defensins). Eur. J. Biochem. 216: 653-659.
- Gamazo, C. & I. Moriyón. 1987. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. Infect. Immun. 55: 609-615.
- Gamazo, C., A.I. Vitas, I. Moriyón, I. López-Goñi & R. Díaz. 1993. *Brucella* group 3 outer membrane proteins contain a heat-modifiable protein. FEMS Microbiol. Lett. 112: 141-146.
- Gamazo, C., A.J. Winter, I. Moriyón, J.I. Riezy-Boj, J.M. Blasco & R. Díaz. 1989. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 57: 1419-1426.
- Ganz, T., J.R. Rayner, E.V. Valore, A. Tumolo, K. Talmadge & F. Fuller. 1989. The structure of rabbit macrophage defensin genes and their organ-specific expression. J. Immunol. 143: 1358-1365.
- Ganz, T., M.E. Selsted, D. Szklarek, S.L. Harwig, K. Daher, D.F. Bainton & R.I. Lehrer. 1985. Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. J. Clin. Invest. 76: 1427-1435.
- Gao, G.C. & E.T. Wei. 1993. Xenopsin, neurotensin, neurotensin (8-13) and N-acetyl-neurotensin (8-13) inhibit vascular leakage in rats after tissue injury. J. Pharmacol. Exp. Ther. 265: 619-625.

- García-Rodríguez, J.A., J.L. Muñoz-Bellido, M.J. Fresnadillo & I. Trujillano. 1993. In vitro activities of new macrolides and rifapentine against *Brucella* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 911-913.
- Gazzano-Santoro, H., J.B. Parent, L. Grinna, A. Horwitz, T. Parsons, G. Theofan, P. Elsbach, J. Weiss & P.J. Conlon. 1992. High-affinity binding of the bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment of the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 60: 4754-4761.
- Gennaro, R., B. Dewald, U. Horisberger, H.U. Gubler & M. Baggiolini. 1983. A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell Biol.* 96: 1651-1661.
- Gennaro, R., B. Skerlavaj & D. Romeo. 1989. Purification, composition, and activity of two bactericins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect. Immun.* 57: 3142-3146.
- Gera, J.F. & A. Lichtenstein. 1991. Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells. *Cell. Immunol.* 138: 108-120.
- Giovannini, M.G., L. Poulter, B.W. Gibson & D.H. Williams. 1987. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochem. J.* 243: 113-120.
- Goldstein, J., T. Hoffman, C. Frasch, E.F. Lizzio, P.R. Beining, D. Hochsteln, Y.L. Lee, R.D. Angus & B. Golding. 1992. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as carrier in vaccines. *Infect. Immun.* 60: 1385-1389.
- Gómez-Miguel, M.J. & I. Moriyón. 1986. Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella* spp. *Infect. Immun.* 53: 678-684.
- Gómez-Miguel, M.J., I. Moriyón & J. López. 1987. *Brucella* outer membrane lipoprotein shares antigenic determinants with *Escherichia coli* Braun lipoprotein and is exposed on the cell surface. *Infect. Immun.* 55: 258-262.
- Grant, E., T.J. Beeler, K.M.P. Taylor, K. Gabie & M.A. Roseman. 1992. Mechanism of magainin 2a induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochem.* 31: 9912-9918.
- Gray, P.W., G. Flagg, G. Leong, R.J. Gumina, J. Weiss, C.E. Ooi & P. Elsbach. 1989. Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and functional implications. *J. Biol. Chem.* 264: 9505-9509.

- Grieve, P.A., A Jones & P.F. Alewood. 1993. Analytical methods for differentiating minor sequence variations in related peptides. *J Chromatogr.* 646: 175-184.
- Groisman, E.A. E. Chiao, C.J. Lipps & F. Heffron. 1989. *Salmonella typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7077-7081.
- Groisman, E.A., F. Heffron & F. Solomon. 1992a. Molecular genetic analysis of the *Escherichia coli* *phoP* locus. *J. Bacteriol.* 174: 486-491.
- Groisman, E.A., C. Parra-López, M. Salcedo, C.J. Lipps & F. Heffron. 1992b. Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11939-11943.
- Gutiérrez, J.M. & L. Cerdas. 1984. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Rev. Biol. Trop.* 32: 213-222.
- Gutiérrez, J.M., F. Chaves, J.A. Gené, B. Lomonte, Z. Camacho & K. Schosinsky. 1989. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon* 27: 735-745.
- Gutiérrez, J.M., C.L. Ownby & G.V. Odell. 1984a. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Molec. Pathol.* 40: 367-379.
- Gutiérrez, J.M., C.L. Ownby & G.V. Odell. 1984b. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22: 115-128.
- Habermann, E. 1977. Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes. *Science* 177: 314-322.
- Hanke, W., C. Methfessel, H.-U. Wilmsen, E. Katz, G. Jung & G. Boheim. 1983. Melittin and a chemically modified trichotoxin form alamethicin-type multi-state pores. *Biochim. Biophys. Acta* 727: 108-114.
- Hancock, R.E.W. 1984. Alterations in outer membrane permeability. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 237-264.
- Hancock, R.E.W. 1991. Bacterial outer membranes: evolving concepts. *ASM News* 57: 175-182.
- Hancock, R.E.W. & P.G.W. Wong. 1984. Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 48-52.

- Hardaway, K.L. & C.S. Buller. 1979. Effect of ethylenediaminetetraacetate on phospholipids and outer membrane function in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 137: 62-68.
- Hider, R.C., F. Khader & A.S. Tatham. 1983. Lytic activity of monomeric and oligomeric melittin. Biochim. Biophys. Acta 728: 206-214.
- Hill, C.P., J. Yee, M.E. Selsted & D. Eisenberg. 1991. Crystal structure of defensin HPN-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. Science 251: 1481-1485.
- Hirata, M., Y. Shimomura, M. Yoshida, J.G. Morgan, I. Palings, D. Wilson, M.H. Yen, S.C. Wright & J.W. Larrick. 1994. Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity. Infect. Immun. 62: 1421-1426.
- Hoffmann, J.A. & C. Hetru. 1992. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. Immunol. Today 13: 411-415.
- Holland, D.R., L.L. Clancy, S.W. Muchmore, T.J. Ryde, H.M. Einspahr, B.C. Finzel, R.L. Henrikson & K.D. Watenpaugh. 1990. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. J. Biol. Chem. 29: 17649-17656.
- Huang, C.M., H.-G. Chen & C.H. Zierdt. 1990. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1824-1826.
- Hultmark, D., Å. Engström, H. Bennich, R. Kapur & H.G. Boman. 1982. Insect Immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from cecropia pupae. Eur. J. Biochem. 127: 207-217.
- Iacono, V.J., P.R. Boldt, B.J. MacKay, M.-I. Cho & J.J. Pollock. 1983. Lytic sensitivity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 to lysozyme. Infect. Immun. 40: 773-784.
- Iacono, V.J., B.J. MacKay, S. DiRienzo & J.J. Pollock. 1980. Selective antibacterial properties of lysozyme for oral microorganisms. Infect. Immun. 40: 773-784.
- Irving, R.T., T.J. MacAllister & J.W. Costerton. 1981. Tris(hydroxymethyl)-aminomethane buffer modification of *Escherichia coli* outer membrane permeability. J. Bacteriol. 145: 1397-1403.
- Jiménez de Bagüés, M.P., P.H. Elzer, J.M. Blasco, C.M. Marin, C. Gamazo & A.J. Winter. 1994. Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice

following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect. Immun.* 62: 632-638.

Jones, D.E. & C.L. Bevins. 1992. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J. Biol. Chem.* 267: 23216-23225.

Jones, D.E. & C.L. Bevins. 1993. Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett.* 315: 187-192.

Kagan, B.L., M.E. Selsted, T. Ganz & R.I. Lehrer. 1990. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 210-214.

Kato, Y., K. Tanai, H. Hirochika & M. Yamakawa. 1993. Expression and characterization of cDNAs for cecropin B, an antibacterial protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 23: 285-290.

King, T.P., A.K. Sobotka, L. Kochoumian & L.M. Lichtenstein. 1976. Allergens of honeybee venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 661-667.

Kini, R.M. & H.J. Evans. 1989. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int. J. Peptide Protein Res.* 34: 277-286.

Kini, R.M. & Iwanaga. 1986. Structure-function relationships of phospholipases II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 24: 895-905.

Kreutzer, D.I., C.S. Buller & D.C. Robertson. 1979. Chemical characterization and biological properties of lipopolysaccharides isolated from smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 23: 81-818.

Kreutzer, D.I. & D.C. Robertson. 1979. Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: comparison of cell envelope components of smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 23: 819-828.

Kroegel, C., M.A. Giembycz & P.J. Barnes. 1990. Characterization of eosinophil cell activation by peptides. Differential effects of substance P, melittin and FMET-Leu-Phe. *J. Immunol.* 145: 2581-2587.

Kwon-Chung, K.J., B.L. Wickes, J.L. Booth, H.S. Vishniac & J.E. Bennett. 1987. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 55: 1751-1754.

Kyte, J. & R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.

- Labischlinski, H., G. Barnickel, H. Bradaczek, D. Naumann, E.T. Rietschel & P. Giesbrecht. 1985. High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeation barrier property of the outer membrane. *J. Bacteriol.* 162: 9-20.
- Laible, N.J. & G.R. Germaine. 1985. Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun.* 48: 720-729.
- Lambert, J., E. Keppi, J.-L. Dimarq, C. Wicker, J.-M. Reichhart, B. Dunbar, P. Lepage, A. van Dorsselaer, J. Hoffmann, J. Fothergill & D. Hoffmann. 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 262-266.
- Larrick, J.W., J.G. Morgan, I. Palings, M. Hirata & M.H. Yen. 1991. Complementary DNA sequence of rabbit CAP18. A unique lipopolysaccharide binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 170-175.
- Lear, J.D., Z.R. Wasserman & W.F. DeGrado. 1988. Synthetic amphiphilic peptide models for protein ion channels. *Science* 240: 1177-1061.
- Lee, J.-Y., A. Boman, C. Sun, M. Andersson, H. Jörnvall, V. Mutt & H.G. Boman. 1989. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9159-9162.
- Lehrer, R.I., A. Barton, K.A. Daher, S.S.L. Harwig, T. Ganz & M.E. Selsted. 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* 84: 553-561.
- Lehrer, R.I. & T. Ganz. 1990. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* 76: 2169-2181.
- Lehrer, R.I. & T. Ganz. 1992. Defensins: endogenous antibiotic peptides from human leukocytes, p. 276-293. In D.J. Chadwick & J. Whelan (eds.). *Secondary metabolites: their function and evolution*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex.
- Lehrer, R.I., T. Ganz & M.E. Selsted. 1991. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* 64: 229-230.
- Lehrer, R.I., A.K. Lichtenstein & T. Ganz. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 105-128.

- Lentner, C (ed.). 1984. Geigy scientific tables. Ciba-Geigy Limited, Basel. pp. 190.
- Leong, S.R. & T. Camerata. 1990. Nucleotide sequence of the bovine bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI). Nucl. Acid Res. 18: 3052-3053.
- Lepage, P., F. Bitsch, D. Roecklin, E. Keppi, J.L. Dimarq, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann, J.A. Roitsch & A. van Dorsselaer. 1990. Determination of disulfide bridges in natural and recombinant insect defensin A. Eur. J. Biochem. 196: 735- 742.
- Levy, O., J. Welss, C.E. Ooi & P. Elsbach. 1993. Structural characterization of BPI-modulating 15 kDa proteins from rabbit polymorphonuclear leukocytes: identification of a novel family of leukocyte proteins. Agents Actions 39: C207-C210.
- Lichtenstein, A. 1991. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. J. Clin. Invest. 88: 93-100.
- Lichtenstein, A.K., T. Ganz, T.-M. Nguyen, M.E. Selsted & R.I. Lehrer. 1988. Mechanism of target cytolysis of peptide defensins. Target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity. J. Immunol. 140: 2686-2694.
- Lichtenstein, A., T. Ganz, M.E. Selsted & R.I. Lehrer. 1986. In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. Blood 68: 1407-1410.
- Litteri, L. & D. Romeo. 1993. Characterization of bovine neutrophil antibacterial polypeptides which bind to *Escherichia coli*. Infect. Immun. 966-969.
- Lomonte, B. 1994. Tissue damage and inflammation induced by snake venoms. PhD Thesis. University of Göteborg, Göteborg.
- Lomonte, S. & J.M. Gutiérrez. 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon 27: 725-733.
- Lomonte, B., E. Moreno, A. Tarkowski, L.Á. Hanson & M. Maccarana. 1994. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. En prensa.
- Lugtenberg, B. & L. van Alphen. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. Biochim. Biophys. Acta 737: 51-115.

- Mannion, B.A., J. Weiss & P. Elsbach. 1990. Separation of sublethal and lethal effects of the bactericidal/permeability increasing protein on *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* 85: 853-860.
- Martínez de Tejada, G. 1993. Interacción de agentes hidrofóbicos y policationicos con la superficie de *Brucella*. Tesis doctoral. Universidad de Navarra, Pamplona.
- Martínez de Tejada, G. & I. Moriyón. 1993. The outer membranes of *Brucella* spp. are not barriers to hydrophobic permeants. *J. Bacteriol.* 175: 5273-5275.
- Mayer, H., E. Moreno & J. Weckesser. 1986. Structure of lipid A from photosynthetic and phylogenetically related bacteria. *J. Immunol. Immunopharmacol.* 6: 35-37.
- Matsuyama, K. & S. Natori. 1988. Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina*. *J. Biol. Chem.* 263: 17112-17116.
- Matsuzaki, K., M. Harada, T. Handa, S. Funakoshi, N. Fujii, H. Yajima & K. Miyajima. 1989. Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively-charged lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 981: 130-134.
- Merrifield, R.B., L.D. Vizioli & H.G. Boman. 1982. Synthesis of the antibacterial peptide cecropin A. *Biochem.* 21: 5020-5031.
- Meyer, M.E. 1990. Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*. p. 1-17. In K. Nielsen & B. Duncan (eds.). *Animal Brucellosis*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Michaux, S., J. Paillisson, M.-J. Carles-Nurit, G. Bourg, A. Allardet-Servent & M. Ramuz. 1993. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J. Bacteriol.* 175: 701-705.
- Milik, M. & J. Skolnick. 1993. Insertion of peptide chains into lipid membranes: an off-lattice Monte Carlo dynamics model. *Proteins Struc. Funct. Genet.* 15: 10-25.
- Miller, S.I., A.M. Kurbal & J.J. Mekalanos. 1989. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5054-5058.
- Moore, K.S., C.L. Bevins, M.M. Bresseur, N. Tomassini, K. Turner, H. Eck & M. Zasloff. 1991. Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 265: 19851-19857.

- Moore, R.A., N.C. Bates & R.E.W. Hancock. 1986. Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymixin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 496-500.
- Moreno, E. 1979. Purification, chemical characterization and biological activity of *Brucella* LPS. Ph. D. Thesis. University of Wisconsin, Madison.
- Moreno, E. 1983. Características y actividades biológicas del lipopolisacárido de *Brucella*. *Adel. Microbiol. Enf. Infecc.* 2: 21-65.
- Moreno, E. 1992. Evolution of *Brucella*, p. 198-218. In M. Plommet (ed.), *Prevention of brucellosis in the mediterranean countries*. Pudoc, Wageningen.
- Moreno, E. & D.T. Berman. 1979. *Brucella abortus* lipopolysaccharide is mitogenic for spleen cells of endotoxin resistant C3H/HeJ mice. *J. Immunol.* 123: 2915-2919.
- Moreno, E., D.T. Berman & L.A. Boettcher. 1979. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 31: 362-370.
- Moreno, E., D. Borowiak & H. Mayer. 1987a. *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* 138: 102-105.
- Moreno, E., L.M. Jones & D.T. Berman. 1984. Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 43: 779-782.
- Moreno, E., R.S. Kurtz & D.T. Berman. 1984. Induction of immune and adjuvant immunoglobulin G responses in mice by *Brucella* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 46: 74-80.
- Moreno, E., H. Mayer & I. Moriyón. 1987b. Characterization of a native polysaccharide hapten from *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 55: 2850-2853.
- Moreno, E., M.W. Pitt, L.M. Jones, G.G. Schurig & D.T. Berman. 1979. Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.* 138: 361-369.
- Moreno, E., S.L. Speth, L.M. Jones & D.T. Berman. 1981. Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Infect. Immun.* 31: 214-222
- Moreno, E., E. Stackebrandt, M. Dorsch, J. Wolters, M. Busch & H. Mayer. 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 172: 3569-3576.

- Moriyón, I. & D.T. Berman. 1982. Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *J. Bacteriol.* 822-828.
- Moriyón, I. & D.T. Berman. 1983. Isolation, purification, and partial characterization of *Brucella abortus* matrix protein. *Infect. Immun.* 39: 394-402.
- Moriyón, I., C. Gamazo & R. Diaz. 1987. Properties of the outer membrane of *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138: 89-91.
- Moyer, N.P., L.A. Holcomb & W.J. Hausler. 1991. *Brucella*, p. 457-462. In P.M. Balows et al. (eds.), *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington.
- Murakami, Y., H. Nagata, A. Amano, M. Takagaki, S. Shizukuishi, A. Tsunemitsu & S. Aimoto. 1991. Inhibitory effects of human salivary histatins and lysozyme on coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mitis*. *Infect. Immun.* 59: 3248-3286.
- Murata, M., K. Nagayama & S.-I. Ohnishi. 1987. Membrane fusion activity of succinylated melittin is triggered by protonation of its carboxyl groups. *Biochem.* 26: 4056-4062.
- Murphy, C.J., B.A. Foster, M.J. Mannis, M.E. Selsted & T.W. Reid. 1993. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 155: 408-413.
- Nakashima, H., N. Yamamoto, M. Masuda & N. Fujii. 1993. Defensins inhibit HIV replication *in vitro*. *AIDS* 7: 1129.
- Neu, H.C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1064-1073.
- Nicoletti, P. & A.J. Winter. 1990. The immune response to *Brucella abortus*. The cell-mediated response to infections, p. 83-95. In K. Nielsen & J.R. Duncan (eds.) *Animal brucellosis*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Nikaioo, H., & M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacteria outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1-32.
- Ogata, K., B.A. Linzer, R.I. Zuberi, T. Ganz, R.I. Lehrer & A. Cantanzaro. 1992. Activity of defensins from human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. *Infect. Immun.* 60: 4720-4725.

- Okada, M. & S. Natori. 1984. Mode of action of a bactericidal protein induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem. J.* 222: 119-124.
- Okada, M. & S. Natori. 1985. Ionophore activity of sarcotoxin I, a bactericidal protein of *Sarcophaga peregrina*. *Biochem. J.* 229: 453-458.
- Ooi, C.E., J. Weiss, O. Levy & P. Elsbach. 1990. Isolation of two isoforms of a novel 15kDa protein from rabbit polymorphonuclear leukocytes that modulate the antibacterial actions of other leukocyte proteins. *J. Biol. Chem.* 265: 15956-15962.
- Otoda, K., S. Kimura & Y. Imanishi. 1992. Interaction of melittin derivatives with lipid bilayer membrane. Role of basic residues at the C-terminal and their replacement with lactose. *Biochim. Biophys. Acta* 1112: 1-6.
- Patterson-Delafield, J., R.J. Martínez & R.I. Lehrer. 1980. Microbicidal cationic proteins in rabbit alveolar macrophages: a potential host defense mechanism. *Infect. Immun.* 30: 180-192.
- Patterson-Delafield, J., D. Szklarek, R.J. Martínez & R.I. Lehrer. 1981. Microbicidal cationic proteins of rabbit alveolar macrophages: amino acid composition and functional attributes. *Infect. Immun.* 31: 723-731.
- Peck-Miller, K.A., R.P. Darveau & H. P. Fell. 1993. Identification of serum components that inhibit the tumoricidal activity of amphiphilic alpha helical peptides. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32: 109-115.
- Pérez, L., A. Prat, A. Vilella, M.LI. Baré, J.M. Bayas, R. Lledró, M.A. Asenjo y J. Salleras. 1993. Epidemiología y prevención de la bruceosis. *Med. Int* 21: 72-75.
- Phillips, D.C. 1966. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci. Amer.* 215: 78-90.
- Pierce, A., D. Colavizza, M. Benaissa, P. Maes, A. Tartar, J. Montreuil & G. Spix. 1991. Molecular cloning, and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 196: 177-184.
- Piers, K.L., M.H. Brown & R.E.W. Hancock. 1993. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* 134: 7-13.
- Poulter, L., A.S. Terry, D.H. Williams, M.G. Giovannini, C.H. Moore & B.W. Gibson. 1988. Levitide, a neurohormone-like peptide from the skin of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 263: 3279-3283.

- Qu, X.-M., H. Steiner, Å. Engström, H. Bennich & H.G. Boman. 1982. Insect Immunity: isolation and structure of cecropins B and D from pupae of the chinese oak silk moth, *Anthereae pernyi*. Eur. J. Biochem. 127: 219-224.
- Raetz, C.R.H. 1990. Biochemistry of endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 59: 129-170.
- Rana, F.R., E.A. Macias, C.M. Sultany, M.C. Modzrakowski & J. Blazyk. 1991. Interactions between magainin 2 and *Salmonella typhimurium* outer membranes: effect of lipopolysaccharide structure. Biochem. 30: 5858-5866.
- Rao, A.G., T. Rood, J. Maddox & J. Duvick. 1992. Synthesis and characterization of defensin NP-1. Int. J. Peptide Protein Res. 40: 507-514.
- Rasool, O., E. Freer, E. Moreno & C. Jarstrand. 1992. Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. Infect. Immun. 60: 1699-1702.
- Rastogi, N., K.S. Goh & H.L. David. 1990. Enhancement of drug susceptibility of *Mycobacterium avium* by inhibitors of cell envelope synthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 759-764.
- Rice, W.G., T. Ganz, J.M. Kinkade, M.E. Selsted, R.I. Lehrer & R.T. Parmley. 1987. Defensin-rich dense granules of human neutrophils. Blood 70: 757-765.
- Richter, K., R. Egger & G. Kreil. 1986. Sequence of preprocaerulein cDNAs cloned from skin of *Xenopus laevis*. J. Biol. Chem. 261: 3676-3680.
- Riezu-Boj, J.I., I. Moriyón, J.M. Blasco, C. Gamazo & R. Diaz. 1990. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. Infect. Immun. 58: 489-494.
- Riley, L.K. & D.C. Robertson. 1984. Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 46: 224-230.
- Rojas, N. 1992. Immunochemical characterization of lipopolysaccharides from different *Brucella* species. M.Sc. Thesis, Karolinska Institut, Stockholm.
- Rojas, N., E. Freer, A. Weintraub, M. Ramírez, S. Lind & E. Moreno. 1994. Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. Clin. Diag. Lab. Immunol. (en prensa)
- Roland, K.L., L.E. Martin, C.R. Esther & J.K. Spitznagel. 1993. Spontaneous *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-

component regulatory system with a possible role in virulence. *J. Bacteriol.* 175: 4154-4164.

- Romeo, D., B. Skerlavaj, M. Bolognesi & R. Gennaro. 1988. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 263: 9573-9575.
- Rufini, S., P. Cesaroni, A. Desideri, R. Farias, F. Gubensek, J.M. Gutiérrez, P. Luly, R. Massoud, R. Morero & J.Z. Pedersen. 1992. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. *Biochem.* 31: 12424-12430.
- Sadler, K.C., C.L. Bevins & J.C. Kaltenbach. 1992. Localization of xenopsin and xenopsin precursor fragment immunoreactivities in the skin and gastrointestinal tract of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* 270: 257-263.
- Sawyer, J.G., N.L. Martin & R.E.W. Hancock. 1988. Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 56: 693-698.
- Scocchi, M., D. Romeo & M. Cinco. 1993. Antimicrobial activity of two bactericins against spirochetes. *Infect. Immun.* 61: 3081-3083.
- Scott, D.L., S.P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M.H. Gelb & P.B. Sigler. 1990. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science* 250: 1541-1546.
- Schiffer, M. & A.B. Edmundson. 1967. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* 7: 121-135.
- Schindler, H. & M.J. Osborn. 1979. Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochem.* 18: 4425-4430.
- Schindler, P.R.G. & M. Teuber. 1975. Action of polymyxin B on bacterial membranes; morphological changes in the cytoplasm and in the outer membrane of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8: 95-104.
- Schlenstedt, G., G.H. Gudmundsson, H.G. Boman & R. Zimmermann. 1992. Structural requirements for transport of preprocecropina and related presecretory proteins into mammalian microsomes. *J. Biol. Chem.* 267: 24328-24332.
- Schluesener, H.J., S. Radermacher, A. Melms & S. Jung. 1993. Leukocytic antimicrobial peptides kill autoimmune T cells. *J. Neuroimmunol.* 47: 199-202.

- Schröder, G., K. Brandenburg & U. Seydel. 1992. Polymyxin B induces transient permeability fluctuations in asymmetric planar lipopolysaccharide/ phospholipid bilayers. *Biochem.* 31: 631-638.
- Schubert, J. 1966. Chelation in medicine. *Sci. Amer.* 214: 40-50.
- Schurig, G.G., A.T. Pringle & S.S. Breese. 1981. Localization of brucella antigens that elicit a humoral immune response in *Brucella abortus*-infected cattle. *Infect. Immun.* 34: 1000-1007.
- Schwartz, G., R.-T. Zong & T. Popescu. 1992. Kinetics of melittin induced pore formation in the membrane of lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1110: 97-104.
- Selsted, M.E., & S.S.L. Harwig. 1989. Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2: a covalently cyclized peptide. *J. Biol. Chem.* 260: 4579-4584.
- Selsted, M.E., S.S.L. Harwig, T. Ganz, J.W. Schilling & R.I. Lehrer. 1985b. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.* 76: 1436-1439.
- Selsted, M.E., D. Szklarek, T. Ganz & R.I. Lehrer. 1985a. Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 49: 202-206.
- Selsted, M.E., D. Szklarek & R.I. Lehrer. 1984. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.* 45: 150-154.
- Selsted, M.E., Y.Q. Tang, W.L. Morris, P.A. McGuire, M.J. Novotny, W. Smith, A.H. Henscehn & J.S. Cullor. 1993. Purification, primary structures, and antibacterial activities of β -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268: 6641-6648.
- Sheu, M.J.-T., W.W. Baldwin & K.W. Brunson. 1985. Cytotoxicity of rabbit macrophage peptides MCP-1 and MCP-2 for mouse tumor cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 626-629.
- Shi, H., K.S. Hu, Y. Huang & N.X. Dong. 1993. Effect of melittin on photocycle and photopotential of purple membrane: sites of interaction between bacteriorhodopsin and melittin. *Photochem. Photobiol.* 58: 413-416.
- Shibata, A., M. Yamamoto, T. Yamashita, J.-S. Chiou, H. Kamaya & I. Ueda. 1992. Biphasic effects of alcohols on the phase transition of poly(L-lysine) between α -helix and β -sheet conformations. *Biochem.* 31: 5728-5733.

- Sipos, D., M. Andersson & A. Ehrenberg. 1992. The structure of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 in solution, determined by proton-NMR. *Eur. J. Biochem.* 209: 163-169.
- Skerlavaj, B., D. Romeo & R. Gennaro. 1990. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gram-negative bacteria by bactericins. *Infect. Immun.* 58: 3724-3730.
- Soravia, E., G. Martini & M. Zasloff. 1988. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett.* 228: 337-340.
- Sowa, B.A., R.P. Crawford, F.C. Heek, J.D. Williams, A.M. Wu, K.A. Kelly & L.G. Adams. 1986. Size, charge and structural heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides demonstrated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 7: 283-288.
- Spitznagel, J.K. 1990. Antibiotic proteins of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 86: 1381-1386.
- Steiner, H., D. Andreu & R.B. Merrifield. 1988. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. *Biochim. Biophys. Acta* 939: 260-266.
- Steiner, H., D. Hultmark, Å. Engström, H. Bennich & H.G. Boman. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248.
- Storm, D.R., K.S. Rosenthal & R.E. Swanson. 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 723-763.
- Stryer, L. 1988. *Biochemistry*. W.H. Freeman & Company, New York.
- Sures, J. & M. Crippa. 1984. Xenopsin: the neurotensin-like octapeptide from *Xenopus* skin at the carboxyl terminus of its precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 380-384.
- Sutherland, S.S. & J. Searson. 1990. The immune response to *Brucella abortus*. The humoral response, p. 65-81. In K. Nielsen & J.R. Duncan (eds.) *Animal brucellosis*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Takada, K., N. Ohno & T. Yadomae. 1994. Binding of lysozyme to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor production in vivo. *Infect. Immun.* 62: 1171-1175.
- Tamamura, H., J. Nakamura, K. Noguchi, S. Funakoshi & N. Fujii. 1993. Acceleration of the N^t-deprotection rate by addition of m-cresol to diluted methanesulfonic acid and its application to the Z(OMe)-based solid-

phase synthesis of human pancreastatin-29 and magainin I. *Chem. Phar. Bull.* 41: 954-957.

- Tang, Y.-Q. & M.E. Selsted. 1993. Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial β -defensin peptide from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268: 6649-6653.
- Taniai, K., Y. Kato, H. Hirochika & M. Yamakawa. 1993. Isolation and nucleotide sequence of cecropin B cDNA clones from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 1132: 203-206.
- Temple, G.S., P.D. Ayling & S.G. Wilkinson. 1992a. Sensitivity of *Pseudomonas stutzeri* to EDTA: effects of growth parameters and test conditions. *Microbios* 72: 7-16.
- Temple, G.S., P.D. Ayling & S.G. Wilkinson. 1992b. Sensitivity of *Pseudomonas stutzeri* to EDTA: solubilisation of outer-membrane components. *Microbios* 72: 109-118.
- Territo, M.C., T. Ganz, M.E. Selsted & R.I. Lehrer. 1989. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84: 2017-2020.
- Terry, A.S., L. Poulter, D.H. Williams, J.C. Nutkins, M.G. Giovannini, C.H. Moore & B.W. Gibson. 1988. The cDNA sequence coding for prepro-PGS (prepro-magainins) and aspects of the processing of this prepolypeptide. *J. Biol. Chem.* 263: 5745-5751.
- Terwilliger, T.C. & D. Eisenberg. 1982a. The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement. *J. Biol. Chem.* 257: 6010-6015.
- Terwilliger, T.C. & D. Eisenberg. 1982b. The structure of melittin. II. Interpretation of the structure. *J. Biol. Chem.* 257: 6016-6022.
- Teshima, T., Y. Ueki, T. Nakai, T. Shiba & M. Kikuchi. 1986. Structure of lepidopteran, self-defense substance produced by silkworm. *Tetrahedron* 42: 829-834.
- Thewissen, J.G.M., S.T. Hussain & M. Arif. 1994. Fossil evidence for the origin of aquatic locomotion in archaeocete whales. *Science* 263: 210-212.
- Thiele, O.W., C. Lacave & J. Asselineau. 1969. On the fatty acids of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Eur. J. Biochem.* 7: 393-396.
- Thiele, O.W. & G. Schwinn. 1973. The free lipids of *Brucella melitensis* and *Bordetella pertussis*. *Eur. J. Biochem.* 34: 333-344.

- Tomita, M., W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi & K.K. Wase. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 74: 4137-4142.
- Tompkins, G.R., M.M. O'Neill, T.H. Cafarella & G.R. Germaine. 1991. Inhibition of bactericidal and bacteriostatic activities of poly-D-lysine and lysozyme by chitotriose and ferric iron. *Infect. Immun.* 59: 655-664.
- Travis, J. 1994. Reviving the antibiotic miracle? *Science* 264: 360-362.
- Vaara, M. 1981. Increased outer membrane resistance to ethylenediaminetetraacetate and cations in novel lipid A mutant. *J. Bacteriol.* 148: 426-434.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56: 395-411.
- Vaara, M. & T. Vaara. 1981. Outer membrane permeability barrier disruption by polymyxin in polymyxin-susceptible and -resistant *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 578-583.
- Vaara, M. & T. Vaara. 1983a. Sensitization of gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide. *Nature* 303: 526-528.
- Vaara, M. & T. Vaara. 1983b. Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 107-113.
- Vaara, M. & T. Vaara. 1983c. Polycations as outer membrane-disorganizing agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 114-122.
- Vaara, M. & P. Viljanen. 1985. Binding of polymyxin B nonapeptide to gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 548-554.
- Valore, E.V. & T. Ganz. 1992. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* 79: 1538-1544.
- Vaz-Gomez, A., A. de Waal, J.A. Berden & H.V. Westerhoff. 1993. Electric potentiation, cooperativity and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes. *Biochem.* 32: 5365-5372.
- Verbanac, D., M. Zanetti & D. Romeo. 1993. Chemotactic and protease-inhibiting activities of antibiotic peptide precursors. *FEBS Lett.* 317: 255-258.
- Verger, J.M., F. Gremont, P.A.D. Gremont & M. Grayon. 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 292-295.

- Verstrete, D.R., M.T. Creasy, N.T. Caveney, C.L. Baldwin, M.W. Blab & A.J. Winter. 1982. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. *Infect. Immun.* 35: 979-989.
- Viljanen, P., P. Koski & M. Vaara. 1988. Effect of small cationic leukocyte peptides (defensins) on the permeability barrier of the outer membrane. *Infect. Immun.* 56: 2324-2329.
- Wade, D., D. Andreu, S.A. Mitchell, A.M.V. Silveira, A. Boman, H.G. Boman & R.B. Merrifield. 1992. Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and melittin. *Int. J. Peptid Protein Res.* 40: 429-436.
- Wade, D., A. Boman, B. Wåhlin, C.M. Drain, B. Andreu, H.G. Boman & R.B. Merrifield. 1990. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4761-4765.
- Wang, Y.-B. & G.R. Germaine. 1991. Effect of lysozyme on glucose fermentation, cytoplasmic pH, and intracellular potassium concentration in *Streptococcus mutans* 10449. *Infect. Immun.* 59: 638-644.
- Weaver, L.H., M.G. Grutter, S.J. Remington, T.M. Gray, N.W. Isaacs & B.W. Mathews. 1985. Comparison of goose-type, chicken-type, and phage-type lysozymes illustrates that changes occur in both amino acid sequence and three-dimensional structure during evolution. *J. Mol. Evol.* 21: 97-111
- Weber, A., H.G. Schieler & H. Krauss. 1977. Elektronenmikroskopische Darstellung anionisch geladener Gruppen auf der Zelloberfläche von *Brucella canis*. *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig.* A239: 365-374.
- Weiss, J., S. Beckerdite-Quagliata & P. Elsbach. 1980. Resistance of gram-negative bacteria to purified bactericidal leukocyte proteins. Relation to binding and bacterial lipopolysaccharide structure. *J. Clin. Invest.* 65: 619-628.
- Weiss, J., P. Elsbach, C. Shu, J. Castillo, L. Grinna, A. Horwitz & G. Theofan. 1992. Human bactericidal/permeability increasing protein and a recombinant NH₂-terminal fragment cause killing of serum-resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by the bacteria. *J. Clin. Invest.* 90: 1122-1130.
- Weiss, J., M. Hutzler & L. Kao. 1986. Environmental modulation of lipopolysaccharide chain length alters the sensitivity of *Escherichia coli* to the neutrophil bactericidal/permeability increasing protein. *Infect. Immun.* 51: 594-599.

- Westerhoff, H.V., D. Juretic, R.W. Hendler & M. Zasloff. 1989. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6597-6601.
- Wille, B. 1989. A preparation of melittin depleted of phospholipase A₂ by ion exchange chromatography in denaturing solvents. *Anal. Biochem.* 178: 118-120.
- Williams, J. 1982. The evolution of transferrin. *TIBS* 7: 394-397.
- Williams, R.W., R. Starman, K.M.P. Taylor, K. Gable, T. Beeler, M. Zasloff & D. Coveil. 1990. Raman spectroscopy of synthetic antimicrobial frog peptides magainin 2a and PGLa. *Biochem.* 29: 4490-4496.
- Windholz, M. (ed.). 1976. *The Merck Index*. Merck & Company Inc., New Jersey.
- Winter, A.J. 1987. Outer membrane proteins of *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138: 87-89.
- Yamauchi, K., M. Tomita, T.J. Giehl & R.T. Ellison III. 1993. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect. Immun.* 61: 719-728.
- Yunes, R., A.R. Goldhammer, W.K. Garner & E.H. Cordes. 1977. Phospholipases: melittin facilitation of bee venom phospholipase A₂-catalyzed hydrolysis of unsonicated lecithin liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 183: 105-112.
- Zanetti, M., L. Litteri, R. Gennaro, H. Horstmann & D. Romeo. 1990. Bactenecins, defense polypeptides of bovine neutrophils, are generated from precursor molecules stored in the large granules. *J. Cell Biol.* 111: 1363-1371.
- Zanetti, M., G. Del Sal, P. Storici, C. Schneider & D. Romeo. 1993. The cDNA of the neutrophil antibiotic bac5 predicts a pro-sequence homologous to a cysteine proteinase inhibitor that is common to other neutrophil antibiotics. *J. Biol. Chem.* 268: 522-526.
- Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5449-5453.
- Zasloff, M., B. Martin & H.-C. Chen. 1988. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 910-913.

Zeya, H.I. & J.K. Spitznagel. 1966. Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. Resolution of antibacterial and enzymatic activities. *J. Bacteriol.* 91: 750-754.

APENDICE 1

LECTURAS TURBIDIMÉTRICAS

Cuadro 4. Lecturas turbidimétricas y correspondencia en número de unidades formadoras de colonias para *E. coli*.

Densidad óptica a 600 nm	Número de bacterias ($\times 10^8$)
77.4	4.0
80.5	3.4
82.1	2.2
84.5	1.6
88.3	1.0

Cuadro 5. Lecturas turbidimétricas y correspondencia en número de unidades formadoras de colonias para *Brucella*.

Densidad óptica a 420 nm	Número de bacterias ($\times 10^9$)
72.8	6.0
76.6	5.0
80.5	4.0
85.5	3.0
90.6	2.0

APENDICE 2

MODELO MATEMATICO PARA EL CALCULO DE CONCENTRACIONES LETALES

El presente modelo matemático está tomado del trabajo de Hultmark y colaboradores (1982). Si el diámetro de un pozo es pequeño en comparación a la zona de inhibición, ecuaciones para la difusión radial en dos dimensiones desde una fuente de origen puntual pueden ser aplicadas a este problema. La concentración c de una sustancia antibacterial que difunde a una distancia r a partir del centro del pozo y a un tiempo t después de la aplicación de la muestra es (ecuación 1):

$$c(r,t) = \frac{n}{4 \pi a D} e^{-\frac{r^2}{4Dt}}$$

donde n es la cantidad de sustancia en la muestra, a es el grosor de la capa de agar, y D es la constante de difusión de la sustancia, bajo las condiciones de ensayo. En cualquier punto en el agar se encontrará que la concentración primero se incrementará hasta alcanzar un valor máximo, y luego decrecerá nuevamente a medida que la distancia difunde. La concentración máxima a la distancia r es dada por (ecuación 2):

$$c_{\max}(r) = \frac{n}{\pi e a r^2}$$

y será alcanzada en el tiempo (ecuación 3).

$$t = \frac{r^2}{4D}$$

Expresiones para el tamaño de zonas antibacteriales pueden ser obtenidas a partir de estas ecuaciones si se supone que las bacterias morirán a concentraciones de la sustancia antibacterial que son superiores a una cierta

concentración letal c_1 , y que además existe un tiempo crítico t_c después del cual las colonias bacterianas no serán afectadas por la sustancia microbicida.

Considerando la situación en el tiempo t_c , fuera de un cierto diámetro crítico d_c , la concentración del agente que difunde todavía se incrementa, mientras que dentro, la máxima concentración de la sustancia ya ha sido alcanzada y la concentración está disminuyendo. De acuerdo a la ecuación 3, este diámetro es (ecuación 4):

$$d_c = \sqrt{16 D t_c}$$

De esta forma, se pueden obtener dos expresiones para la zona de diámetro d . Para zonas más pequeñas que el diámetro crítico, el diámetro es determinado por el radio al cual la concentración máxima es igual a la concentración letal, o a partir de la ecuación 2 (ecuación 5):

$$c_1 = \frac{4n}{\pi e a d^2}$$

y el diámetro de la zona es dado por (ecuación 6):

$$d^2 = \frac{4n}{\pi e a c_1}$$

Así, en este caso la concentración letal puede ser calculada directamente a partir del diámetro de la zona de inhibición. Por otra parte, cuando la zona es más grande que el diámetro crítico, su tamaño está determinado por el radio en el cual la concentración es apenas igual a la concentración letal en el tiempo t_c . De la ecuación 1 se obtiene la siguiente expresión (ecuación 7):

$$d^2 = 16 D t_c [\ln n - \ln (4 \pi a D t_c c_1)]$$

Así, para estas grandes zonas d^2 debe ser una función lineal de $\log n$. Haciendo diluciones seriadas de la sustancia antibacterial y graficando d^2

versus $\log r$, una línea recta debe obtenerse con una pendiente de (ecuación 8):

$$k = 16 D t_c \ln 10,$$

y una intersección de (ecuación 9):

$$I = -16 D t_c \ln 10 \log (4 \pi a D t_c c_1).$$

A partir de ambas expresiones, tanto $D t_c$ y la concentración letal pueden resolverse (ecuaciones 10 y 11):

$$D t_c = \frac{k}{16 \ln 10}$$

$$c_1 = \frac{4 \ln 10}{\pi a k 10^{I/k}}$$

Entonces, cuando puede establecerse una correlación entre la concentración de una sustancia y el diámetro de los halos formados, se utiliza la ecuación 11 para determinar la concentración letal. Cuando los datos provienen del análisis de un sólo pozo se utiliza la ecuación 5, aunque de esta forma se sobreestima el verdadero valor de la concentración letal.

APENDICE 3

METODO PARA DETERMINAR EL CARACTER HIDROPATICO DE UNA PROTEINA

A continuación se presenta la metodología descrita por Kyte & Doolittle (1982) para determinar el carácter hidropático de una proteína, mediante el uso de un índice de hidropaticidad para cada aminoácido y un pequeño programa en lenguaje C que asigna el valor apropiado de hidropaticidad a cada residuo en una secuencia de aminoácidos dada y suma respectivamente esos valores empezando en el extremo amino terminal, con segmentos traslapados uno de otro por un sólo residuo. De esta forma, si se asigna un ámbito de 7 aminoácidos en el análisis, el primer valor resultante será la suma de la hidropaticidad de cada uno de los residuos del 1 al 7 y se asignará el valor a la posición 4, el segundo valor será la suma de los datos para los residuos 2 al 8 y se asignará a la posición 5, etc.

Cuadro 6. Índice de hidropaticidad para aminoácidos.

Aminoácido	Índice de hidropaticidad
Isoleucina	4.5
Valina	4.2
Leucina	3.8
Fenilalanina	2.8
Cisteína	2.5
Metionina	1.9
Alanina	1.8
Glicina	-0.4
Treonina	-0.7
Triptófano	-0.9
Serina	-0.8
Tirosina	-1.3
Prolina	-1.6
Histidina	-3.2
Acido glutámico	-3.5
Glutamina	-3.5
Acido aspártico	-3.5
Asparagina	-3.5
Lisina	-3.9
Arginina	-4.5

El programa en lenguaje C para determinar el caracter hidropático de una proteína es:

```
main ()
{
  int i,j,k;;
  float total;
  char residue;
  extern char code [23];
  extern float factor [23];
  char sequence[1099];
  float value[1099];

  j = 0;
  while (getchar() != '\n');
  while (j <1099) {
    for (i = 0; i <11; i++) getchar();
    while (j <1099) {
      sequence[j++] = getchar();
    }
    if (getchar() == '\n') break;
  }
  if (sequence[j - 1] == '*') break;
}
j = (j -1);
for (i = 0; i <j; i++) {
  residue = sequence[i];
  for (k = 0; k<23; k++)
  if(residue == code[k]) value[i] = factor[k]; }
for (i = 0; i <(j-6); i++) {
  total = 0;
  for (k = 0;k <7; k++) total = total + value[i + k];
  printf("%4d %c %6.1f", i + 4, sequence[i+3], total);
  for (k = 0; k <total; k++) {if(k == 29) printf(".");
  else printf(" ");}
  printf("X\n");
}
printf("\n");
}
char code [] "RKDBNSEHZQTGXAPVYCMILWF";
float factor [] {0.0,0.6,1.0,1.0,1.0,3.6,1.0,1.3,
                1.0,1.0,3.8,4.1,4.1,6.3,2.9,8.7,
                3.2,7.0,6.4,9.0,8.2,3.6,7.2};
```

APENDICE 4

METODO PARA DETERMINAR EL POTENCIAL HELICOIDAL DE UNA PROTEINA

De acuerdo al método de Schiffer y Edmundson (1967), para determinar si una proteína (o un péptido) poseen potencial para formar una hélice α , se examina la secuencia de la molécula y se identifican las tripletas de residuos hidrofóbicos en disposición $n, n \pm 3, n \pm 4$. Cada grupo se grafica en un modelo de hélice α convencional con 24 marcas numeradas, cada una dispuesta a 100° de su predecesora. Después de ubicar el residuo n en una de las marcas, el gráfico es extendido para incluir los aminoácidos tanto en el extremo amino como en el extremo carboxilo del residuo n . El proceso se continúa hasta que el arco hidrofóbico de tipo $n, n \pm 3, n \pm 4$ es interrumpido por un residuo polar o hasta la aparición de un residuo disruptor de hélices como prolina. Si los residuos polares se encuentran distribuidos a lo largo de toda la circunferencia o si los residuos hidrofóbicos no se encuentran agrupados formando un arco distintivo (de al menos tres aminoácidos) entonces no se considera al segmento con potencial para formar una hélice α .