



Quantification of the effectiveness of indolicidin and protegrin-4 by means of analysis of kinetic parameters

Cuantificación de la efectividad de la indolicidina y protegrina-4 por medio de análisis de parámetros cinéticos

Salvador Chávez-Salinas¹, César Reyes², Tania Sánchez-Ovando¹, Norma Janet Valdes-Perez¹, Hebert Jair Barrales-Cureño², Juan Antonio Cortes-Ruíz³, Ketzasmin Armando Terrón-Mejía⁴, Adrián Gómez-de-Jesús⁵, Luis Germán López-Valdez^{6*}

¹División de Ingeniería en Biotecnología, Universidad Politécnica del Valle de Toluca, México. Carretera Toluca-Almoloya de Juárez Km. 5.6 Santiaguito Tlalcilcali, Almoloya de Juárez, C.P. 50904.

²División de Procesos Naturales, Ingeniería Forestal Comunitaria, Universidad Intercultural del Estado de Puebla. Calle Principal a Lipuntahuaca S/N; Lipuntahuaca, Huehuetla, Puebla, C.P. 73475.

³Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Mazatlán, Unidad II Anillo Periférico S/N Esq. Huacanaxtle. Fracc. Pradera Dorada, Mazatlán, Sinaloa, México.

⁴Instituto Tecnológico Superior de Zongolica, Km. 4 Carretera a la Compañía S/N, Tepetitlanapa, 95005, Zongolica, Ver.

⁵CONACYT-Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera Ocozocoautla-Villaflores Km. 84.5. Apartado postal # 78, C.P. 30470. Villaflores. Chiapas; México.

⁶Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola. AP74 Oficina de correos Chapingo, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco Estado de México, 56230.

*Corresponding author.

E-mail address: lgermanlv@taurus.chapingo.mx (L. G. López-Valdez).

Article history:

Received: 13 November 2017 / Received in revised form: 23 December 2017 / Accepted: 30 December 2017 / Published online: 1 January 2018.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.23>

ABSTRACT

Sequences of indolicidin and protegrin-4 were taken from the Data Bank of Nebraska University, USA and were chemically synthesized without terminal amide and nor N

terminal acetylation. Indolicidin and protegrin-4, consisting of 13 and 18-residue peptides, respectively with 95% of purity. These peptides were tested to estimate their antimicrobial effectiveness against *Salmonella* sp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* using 1×10^6 cells/mL. Their effectiveness was determined by means of Colony Forming Units (CFUs) after 1 hour of exposition at 20, 50 y 100 μM of every peptide and then were estimated the specific death rate (Kd) and specific apparent growth rate (μ_{net}). These kinetic parameters were used for modelling the extinction time and growth rate of the strains bacteria tested *in vitro* conditions and the highest activity of both peptides was observed against *E. coli* in every concentration tested. We conclude that modified indolicidin and protegrin-4 have high antimicrobial activity almost similar to those of previous reports.

Keywords: Antimicrobial peptides, kinetic data, Indolicidin, Protegrin-4, viability

RESUMEN

Se tomaron las secuencias de la indolicidina y protegrina-4 del banco de datos de la Universidad de Nebraska, USA y se mandaron sintetizar a la empresa EZBiolab Co., pero con la peculiaridad de que no cuentan con amidación y acetilación, estos péptidos consisten de 13 y 18 residuos, respectivamente y con 95% de pureza. Estos se utilizaron para estimar su actividad antimicrobiana contra una concentración celular de 1×10^6 cels/mL de *Salmonella* sp., *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*. La efectividad de los antimicrobianos se cuantificó a través de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) después de 1 hora de exposición a 20, 50 y 100 μM de cada péptido y se estimó la velocidad específica de muerte (Kd) y la velocidad específica de crecimiento aparente (μ_{net}) de las bacterias. Con los parámetros cinéticos obtenidos se modeló el tiempo de extinción y el crecimiento de las bacterias *in vitro*; la mayor actividad de ambos péptidos se observó contra *E. coli* en todas las concentraciones probadas. Se concluye que la indolicidina y protegrina-4 modificadas presentan una efectividad antimicrobiana similar a la reportada por otros autores.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, datos cinéticos, indolicidina, protegrina-4, viabilidad

1. INTRODUCCIÓN

El uso excesivo de antibióticos con o sin prescripción médica para tratar enfermedades bacterianas se ha convertido en un desafío debido al desarrollo de microorganismos patógenos resistentes contra los antibióticos que son usados en varios campos de la medicina (Bahar & Ren, 2013). Las bacterias patógenas tienen varios mecanismos para tolerar altas concentraciones de antibióticos (Aminov, 2009; Andersson *et al.*, 2016), pero cuando un antibiótico está presente a bajas concentraciones, estas pueden tolerarlos a través de mecanismos de persistencia, tales como la respuesta SOS, hipermutación, mutagénesis directa o cambios en la recombinación intracromosómica y horizontal en la transferencia de

genes (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2013). Los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) representan una alternativa atractiva para reemplazar o ser utilizados como tratamientos suplementarios con antibióticos tradicionales (Czyzewski *et al.*, 2016); donde estos péptidos son los principales componentes de la inmunidad innata y representan la primera línea de defensa contra infecciones microbianas (Steinsrtaesser *et al.*, 2009). Estas moléculas son oligopéptidos que varían en el número de aminoácidos (desde cinco a más de cien) y tienen un amplio espectro de acción contra blancos específicos e incluyen virus, bacterias, hongos y parásitos (Bahar & Ren, 2013). En términos generales, los AMPs actúan específicamente contra cierto tipo de microorganismos (por ejemplo, bacterias u hongos) (Hancock & Lehrer, 1998) y se pueden clasificar en cuatro grandes clases: β -plegados, α -helicoidales, tipo bucles y péptidos extendidos (Hancock & Lehrer, 1998); los péptidos de las dos primeras clases son los más comúnmente encontrados en la naturaleza.

Entre los péptidos tipo β -plegados, las protegrinas son los AMPs más comunes y estos consisten de péptidos cortos de entre 16 y 18 aminoácidos; además, dentro de su secuencia, las protegrinas poseen seis residuos de arginina cargadas positivamente y cuatro residuos de cisteína (Jang *et al.*, 2007). La familia de las protegrinas incluye a cinco protegrinas de porcino, las cuales han sido bien caracterizadas: PG-1 a PG-5 (Miyasaki *et al.*, 1997). De estas, la protegrina-4 consiste de 18 aminoácidos, se asume que su estructura química es rígida y con configuración tipo β -plegada, la cual le ayuda a estabilizar su estructura molecular a través de dos puentes disulfuro (Mohanram & Bhattacharjya, 2014), estos se encuentran desplegados entre los cuatro residuos de cisteína (Kandasamy & Larson, 2007). La estructura química de la PG-1 consiste de dos secuencias antiparalelas tipo β -plegada, donde esta unida por un bucle tipo β , 6 de sus 18 aminoácidos son argininas; mientras que la PG-2 no cuenta con dos aminoácidos carboxilados terminales resultando en un péptido más corto (16 aminoácidos) y con menor carga positiva; en la PG-3 se sustituye a la glicina 14 por la arginina. A diferencia de las otras protegrinas, PG-4 es menos polar, además, dentro de la secuencia del bucle existe una sustitución de la felinilalanina en la posición 14 por la valina, finalmente la PG-5 se caracteriza por el reemplazo de la arginina por la prolina en la posición 10 (Miyasaki *et al.*, 1997). Por otra parte, la indolicidina es un péptido extendido y pertenece a la familia de las catelicidinas, este es un péptido catiónico de 13 residuos y fue aislado a partir de gránulos citoplasmáticos de neutrófilos bovinos (Selsted *et al.*, 1992) y este es rico en triptófano (39%) y prolina (23%) (Rozeck *et al.*, 2000), además presenta un extremo carboxilo terminal de amida. Su mecanismo de acción involucra a la membrana bacteriana citoplasmática (Rozeck *et al.*, 2000), por lo tanto, posee un amplio espectro de acción de actividad antimicrobiana (Friedrich *et al.*, 2001). La indolicidina despliega su actividad antimicrobiana a través de la creación de poros en la membrana celular (Ha *et al.*, 2000), donde los lipopolisacáridos de la membrana bacteriana promueven la unión e incorporación del péptido en la interface agua/lípido (Halevy *et al.*, 2003).

Existen pocas metodologías reportadas en la literatura para cuantificar la cinética de muerte bacteriana mediada por AMPs. Recientemente, Freire *et al.*, (2015) reportaron un método basado en citometría de flujo con el objetivo de monitorear en tiempo real la permeabilización de la membrana bacteriana causada por el péptido pepR obtenido de una cepa del virus del dengue. Estos autores demostraron que la velocidad de permeabilización

de la membrana varía significativamente entre diferentes cepas de *E. coli* y se reportó que es necesario alrededor de 60 minutos para eliminar completamente a una población bacteriana. Por lo tanto, el patrón de las cinéticas de muerte podría revelar el mecanismo específico por el cual actúan los AMPs. En este contexto, Bolinteanu *et al.*, (2010) reportaron un mecanismo por el cual las protegrinas actúan sobre *E. coli* a través de una línea de tiempo de eventos fisiológicos y moleculares; que van desde la adhesión de la protegrina a la superficie de la membrana bacteriana hasta la liberación de potasio y decaimiento del potencial de membrana, donde este evento se lleva a cabo en minutos. Esta observación también fue reportada por Fantner *et al.*, (2010), pero con células individuales de *E. coli* cuando estas fueron expuestas al péptido conocido como CM15, el cual posee 15 residuos y el mecanismo de muerte fue seguido a través de imágenes de alta velocidad obtenidas por microscopía de fuerza atómica (AFM) combinada con imágenes de microscopía de fluorescencia; en este estudio, los péptidos solo necesitaron algunos minutos para matar a la bacteria. Sin embargo, el mecanismo por el cual la permeabilización de la membrana celular mediada por AMPs aún es un desafío técnico ya que es necesario observar a mayor resolución los eventos celulares que se llevan a cabo (Freire *et al.*, 2015).

El modelo de inhibición de crecimiento presentado en este trabajo está basado en el trabajo reportado por Mattie (1981), quien modeló el crecimiento de bacterias patógenas cuando se expusieron a diferentes concentraciones de antibióticos, y para ello se utilizó a las Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) para determinar la viabilidad celular. En este caso, la viabilidad celular se determina solo al final del ensayo, el cual es conocido como “determinación puntual final” (Theophel *et al.*, 2014) y este método está ampliamente reportado para determinar la susceptibilidad de las bacterias a cierto tipo de antibióticos, comúnmente a través del uso de antibiogramas; este método está basado en el análisis de puntos discretos. En este contexto, Firsov *et al.*, (1997) determinaron la velocidad de muerte y la capacidad de re-crecimiento de *E. coli* en la presencia de ciprofloxacina, para ello, los autores utilizaron un modelo logístico de crecimiento basado en UFCs. Además, esos modelos cinéticos en algunos casos representan el efecto real en los sistemas *in vivo* (Al-Asadi *et al.*, 1979). En contraste, en los métodos conocidos como “fuera de línea” se realizan muestreos sistemáticos para obtener una curva de crecimiento. Los métodos incluyen el crecimiento microbiano en las zonas de inhibición o muerte celular, difusión en pruebas de agar y determinaciones por turbidimetría (Jorgensen & Ferraro, 2009). Por otra parte, las mediciones llevadas a cabo “en línea” o conocidos como análisis en tiempo real podrían ser una mejor opción para optimizar los tratamientos con antibióticos (Theophel *et al.*, 2014). En este trabajo, se propone la determinación de constantes cinéticas usando puntos discretos obtenidos al final del ensayo a través de la determinación de UFCs.

El principal propósito de esta investigación fue utilizar a los péptidos indolicidina y protegrina-4, ambos sin la terminación amida y acetilación en la región amino y carboxilo terminal y modelar su efectividad a través de la obtención de datos cinéticos, asumiendo un crecimiento logístico. Esta decisión fue basada en que la alteración de secuencias y/o modificación de la conformación química de los aminoácidos de algunos péptidos puede mostrar una alta actividad antimicrobiana, similares o mayores a las versiones naturales (Zhu *et al.*, 2017), además de que no existen reportes previos sobre la falta de amidación y/o acetilación en la indolicidina y protegrina-4. La efectividad relativa de esos AMPs fue

evaluada *in vitro* a través del uso de parámetros cinéticos, tales como: la velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de muerte, y velocidad de crecimiento aparente. La viabilidad celular se determinó a través de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs), la cual es una técnica ampliamente reportada para determinar la susceptibilidad de las bacterias contra antibióticos y de partículas de plata (Theophel *et al.*, 2014). Recientemente, Harman *et al.*, (2017) utilizaron este método para medir la viabilidad celular cuando se expusieron bacterias a concentraciones de péptidos antimicrobianos; estos autores demostraron que es un método altamente preciso ya que se obtienen prácticamente los mismos valores cuando se compara con las lecturas de absorbancia obtenidas. La factibilidad y rapidez de este método, así como el corto tiempo de incubación y el uso de pocos reactivos utilizados para esta investigación hace que sea posible llevar a cabo un diagnóstico simple de los péptidos propuestos contra cepas patógenas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Salmonella* sp.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Péptidos sintetizados

Los péptidos antimicrobianos fueron químicamente sintetizados por la empresa EZBiolab Co. (Inc. 1033 rd Ave.SW, Room 215, Carmel, IN46032 USA). La secuencia de los péptidos se tomó del Data Bank APD (*Antimicrobial Peptide Database, University of Nebraska NE. USA*): <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>. El control de la calidad de los péptidos fue validado por medio de espectroscopía con una pureza mayor al 95%. La indolicidina AP00150 consistió de una secuencia corta de 13 residuos de aminoácidos (ILPWKWPWWPWR) y la protegrina-4 AP00220 de 18 residuos de péptidos (RGGRLCYCRGWICFCVGR); ambos péptidos antimicrobianos se caracterizan por la ausencia de acetilación y amidación en la terminación amino y carboxilo, respectivamente. La masa molecular de la indolicidina fue de 1906.32 Da y para la protegrina-4 fue de 2104 Da. Los péptidos se resuspendieron en Buffer PBS (0.1 M, pH 7.0); a una concentración de 3.4 mg/mL.

2.2. Microorganismos

Escherichia coli (ATCC 10798) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) se adquirieron de la American Culture Collection (ATCC), *Salmonella* sp. se aisló del Rastro municipal de Toluca, Estado de México usando el método reportado por Philip *et al.*, (2003).

2.3. Ensayos

Para cada ensayo se utilizó una concentración de 1×10^6 cels/mL, las células se colocaron en tubos Eppendorf con 1 mL de caldo nutritivo. La cantidad de bacterias se determinó mediante Cámara de Neubauer (Brand BR717820). Posteriormente, se adicionaron diferentes concentraciones de indolicidina y protegrina-4: 20, 50 y 100 μ M (Miyasaki *et al.*, 1997); estas concentraciones se determinaron a través del protocolo de dilución

reportado por la *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2012). Los péptidos se diluyeron en un Buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.0). A la población de bacterias se le dejó interactuar con las diferentes concentraciones de péptidos durante una hora a 37°C. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado. El efecto de cada concentración de péptidos en la viabilidad celular se determinó mediante Unidades Formadoras de Colonias (UFCs). Los medios sólidos donde se crecieron a las bacterias fueron: Agar de MacConkey, agar hierro triple azúcar y agar de soya tripticaseína (Sigma Co. USA) para *E. coli*, *Salmonella* sp. y *S. epidermidis*, respectivamente. El bufer de fosfatos se preparó de la siguiente manera (1000 mL): se pesaron 76 g de NaCl, 2.0 g de KCl, 21.7 g de Na₂HPO₄·7H₂O, 2.59 g de KH₂PO₄ y se disolvieron en agua destilada; el pH se ajustó a 7.0 con HCl 0.1 N. Finalmente la solución se esterilizó en autoclave (FELISA FE-936, México) durante 15 minutos.

2.4. Modelamiento matemático (Mattie, 1981)

Para cuantificar la efectividad de la indolicidina y protegrina-4, se modeló el crecimiento de *E. coli*, *S. epidermidis* y *Salmonella* sp. El crecimiento logístico es definido como el número de UFCs (dN/dt) durante la fase exponencial de crecimiento (Mattie, 1981):

$$\frac{dN}{dt} = \tilde{\mu}_{net} N \quad (1)$$

$$Nt = Noe^{\tilde{\mu}_{net}t} \quad (2)$$

$$\tilde{\mu}_{net} = \frac{\ln Nt - \ln No}{t} = \frac{d \ln N}{dt} = \frac{1}{N} \left(\frac{dN}{dt} \right) \quad (3)$$

Cuando los péptidos antimicrobianos están presentes en el cultivo, la velocidad específica de crecimiento (μ_{net}) se estima desde el inicio al término del cultivo, donde No es la concentración inicial al t = 0, entonces:

$$\tilde{\mu}_{net} = \tilde{\mu}_{max} - K_d \quad (4)$$

Por lo tanto, la velocidad específica de muerte (-K_d) es obtenida de la siguiente manera:

$$-K_d = \tilde{\mu}_{net} - \tilde{\mu}_{max} \quad (5)$$

Basado en esas diferencias, es posible modelar el crecimiento de las bacterias, para ello se utilizó el software SSBP (Versión 1.0), el cual fue diseñado los autores y previamente reportado (Reyes *et al.*, 2016). Finalmente, para estimar la efectividad antimicrobiana de los péptidos, usamos:

$$\frac{dN}{dt} = -K_d N = (\tilde{\mu}_{net} - \tilde{\mu}_{max}) N \quad (6)$$

Para determinar el tiempo de extinción del 90% de una población específica de bacterias en los ensayos de antimicrobianos, usamos:

$$t = \frac{\ln N_0 - \ln N_t}{-K_d} \quad (7)$$

3. RESULTADOS

3.1 Inhibición del crecimiento bacteriano usando indolicidina y protegrina-4

Para estimar el potencial antimicrobiano de la indolicidina y protegrina-4 se diseñaron ensayos *in vitro* con el objetivo de determinar su efectividad hacia las bacterias Gram negativas *E. coli* y *Salmonella* sp., así como *S. epidermidis*, la cual es Gram positiva. Para ello se utilizó medio de cultivo enriquecido como control negativo (Fig. 1). Cuando una población específica de bacterias (1×10^6 cels/mL) se expuso directamente con los AMPs por una hora, se disminuyó drásticamente el número de células viables, comparado con el tratamiento control. Para el caso de *Salmonella* sp., la indolicidina (Fig. 1a) fue más efectiva que la protegrina-4 (Fig. 1b) en todas las concentraciones probadas. Pero, este fenómeno no se observa contra *E. coli*, ya que ambos péptidos muestran la misma efectividad antimicrobiana contra esta bacteria. Posiblemente sea debido al tiempo de exposición de los antimicrobianos contra las bacterias, por ejemplo, Harman *et al.*, (2017) y Sung *et al.*, (2016) reportan una exposición directa de 6 horas entre los AMPs y bacterias patógena, mientras que Miyasaki *et al* (1997) reportaron que 2 horas de exposición son suficientes para observar un efecto significativo en la viabilidad celular. En este trabajo podemos decir que debido a la concentración celular y péptidos en suspensión fue suficiente para eliminar más del 90 % de las bacterias. Por otra parte, *S. epidermidis* fue más susceptible a la protegrina-4 que a la indolicidina (Fig. 1a).

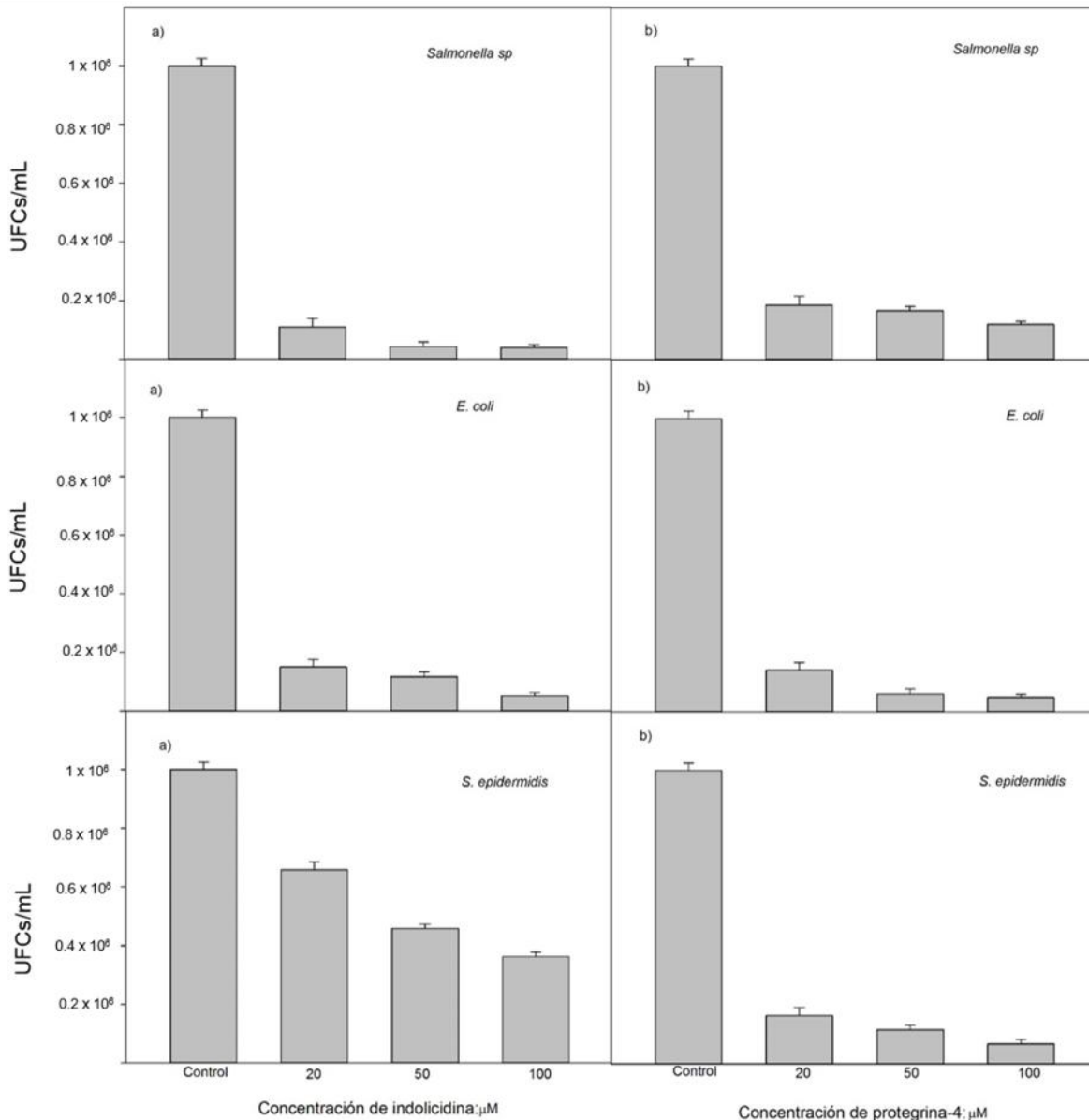


Fig. 1. a) UFCs finales después de 1 hora de exposición a: a) indolicidina, b) protegrina-4 en placas de cultivo de *Salmonella sp.*, *E. coli* y *S. epidermidis*. Las barras de error indican la desviación estándar (n= 3).

Una vez que se determinó la viabilidad celular después de la exposición a los péptidos se estimaron los parámetros cinéticos que se muestran en la Tabla 1. Para ello se hizo el siguiente análisis: primero se obtuvo la velocidad específica de muerte (Kd) de todas las cepas de bacterias cuando se expusieron a diferentes concentraciones de indolicidina y protegrina-4; este parámetro se obtuvo directamente a partir de la diferencia del número de UFCs iniciales y finales (Ec. 6). La velocidad específica aparente de crecimiento (μ_{net}) se obtiene a partir de la diferencia entre μ_{max} y Kd. De la literatura se tomó el valor de la velocidad máxima específica de crecimiento de *Salmonella sp.*, *E. coli* y *S. epidermidis*

(0.27 h^{-1} ó 0.076 min^{-1}) (Poccia *et al.*, 2014). Finalmente, se modeló el tiempo de extinción del 90% de las bacterias y se obtuvo a partir del número inicial y final de las bacterias considerando a la Kd. Para todos los casos (indolicidina y protegrina-4), a mayor concentración de antimicrobianos, la Kd fue también mayor, resultando en menores tiempos de extinción (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos después de 1 hora de exposición contra indolicidina y protegrina-4 de *Salmonella* sp., *E. coli* y *S. epidermidis*, normalizado al 90% de la población bacteriana.

	<i>Salmonella</i> sp.			<i>E. coli</i>			<i>S. epidermidis</i>			
	μ_{\max} (min^{-1})	Kd (min^{-1})	Tiempo de extinción (min)	μ_{\max} (min^{-1})	Kd (min^{-1})	Tiempo de extinción (min)	μ_{\max} (min^{-1})	Kd (min^{-1})	Tiempo de extinción (min)	
Indolicidina	Control	0.076	0.0	-----	0.076	0.0	-----	0.076	0.0	-----
	(20 μM)	0.039	-0.037	62.2	0.045	-0.031	74.2	0.069	-0.007	329.0
	(50 μM)	0.024	-0.052	44.2	0.040	-0.036	63.9	0.063	-0.013	177.1
	(100 μM)	0.023	-0.053	43.4	0.027	-0.049	47.0	0.059	-0.017	135.4
Protegrina-4	<i>Salmonella</i> sp.			<i>E. coli</i>			<i>S. epidermidis</i>			
	μ_{\max} (min^{-1})	Kd (min^{-1})	Tiempo de extinción (min)	μ_{\max} (min^{-1})	Kd (min^{-1})	Tiempo de extinción (min)	μ_{\max} (min^{-1})	Kd (min^{-1})	Tiempo de extinción (min)	
	Control	0.076	0.0	-----	0.076	0.0	-----	0.076	0.0	-----
	(20 μM)	0.048	-0.028	82.2	0.044	-0.032	71.9	0.046	-0.03	76.7
(50 μM)	0.046	-0.03	76.76	0.0304	-0.045	51.1	0.041	-0.035	65.8	
(100 μM)	0.041	-0.035	65.8	0.026	-0.05	46.06	0.031	-0.045	51.1	

Es bien conocido que a través de la colecta de datos cinéticos de la ruptura celular mediada por AMPs se contribuye ampliamente a caracterizar los mecanismos por los cuales los péptidos antimicrobianos inducen la permeabilización celular. En este contexto, Freire *et al.*, (2015) reportaron que la ruptura celular a través del análisis de datos obtenidos por citometría de flujo en tres cepas de *E. coli*, donde sus resultados revelaron la importancia de los lipopolisacáridos (LPS) para provocar la ruptura de la membrana bacteriana. De esta manera, los datos cinéticos podrían revelar el mecanismo de acción de los AMPs, el cual aún es un tema elusivo (Freire *et al.*, 2015). La Tabla 1 muestra los resultados cinéticos de los datos puntuales obtenidos a varias concentraciones de indolicidina y protegrina-4 contra *E. coli*, *S. epidermidis* y *E. coli*. Los datos cinéticos que se tomaron en cuenta en este estudio fueron la μ_{\max} , tiempo de extinción y la velocidad específica de muerte (Kd). Por ejemplo, cuando *Salmonella* sp., *E. coli* y *S. epidermidis* se expusieron a 100 μM de indolicidina, la μ_{\max} fue de 0.023, 0.027 and 0.059 min^{-1} , respectivamente, es decir, inhibió más a *Salmonella* sp. Mientras que los valores de Kd fueron de -0.017 min^{-1} para *S. epidermidis* y -0.053 min^{-1} para *Salmonella* sp., esto significa que la velocidad de muerte para *Salmonella* sp. fue menor. Por último, el tiempo de extinción del 90% cuando se expusieron a 100 μM de indolicidina fue mucho mayor para *S. epidermidis*; el resto de los resultados se muestran en la Tabla 1. De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 1, la velocidad específica de muerte (Kd) de todas las cepas es proporcional a la concentración de indolicidina y protegrina-4. Estos parámetros cinéticos fueron importantes para modelar

el tiempo de extinción y crecimiento de *Salmonella* sp., *E. coli* y *S. epidermidis* a las diferentes concentraciones de indolicidina y protegrina propuestas (Fig. 2 y 3).

3.2 Modelamiento cinético

Con los parámetros cinéticos de la Tabla 1 fue posible modelar la cinética de muerte (K_d) del 90% de la población de bacterias *in vitro* (Fig. 2). Para obtener esta cinética se asumió una conducta de segundo orden, es decir, la velocidad de muerte de la bacteria no se mantiene constante durante la exposición a los AMPs (Fanter *et al.*, 2010; Freire *et al.*, 2015), lo mismo se ha observado con antibióticos (Laurenco & Andreoli-Pinto, 2011). Por otra parte, a partir de los datos cinéticos de K_d , $\mu_{m\acute{a}x}$ y μ_{net} se modeló el crecimiento de la bacteria asumiendo un comportamiento logístico ($N_t = N_{oe}^{tt}$), el cual fue obtenido con el software SSBP (Reyes *et al.*, 2016). Para esto, se consideró un inóculo de 100 bacterias con una máxima concentración de 1×10^6 bacterias/mL.

Esas determinaciones resaltan la importancia de los parámetros cinéticos y muestran la efectividad de los péptidos antimicrobianos probados. Este método permite un alto nivel de predicción a través del modelamiento del crecimiento logístico de esos datos; los ensayos a través de la técnica de placas (UFCs) fue ampliamente demostrado por Lourenco & Andreoli-Pinto (2011). De acuerdo con estos autores, este método tiene las siguientes ventajas comparado con el de HPLC o turbidimetría: simplicidad en su operación, tiempos cortos de incubación, posibilidad de analizar un gran número de muestras de forma simultánea, y uso de pocos reactivos en cada prueba realizada. Nuestros resultados muestran que para llevar a cabo la inhibición o inducción de la muerte celular de las bacterias, se requiere de poco tiempo de exposición a los péptidos. Además, nuestros resultados muestran una relación entre la concentración de indolicidina y la protegrina-4 y la velocidad de muerte específica de crecimiento con las cepas probadas en este estudio (Fig. 2 y Fig. 3).

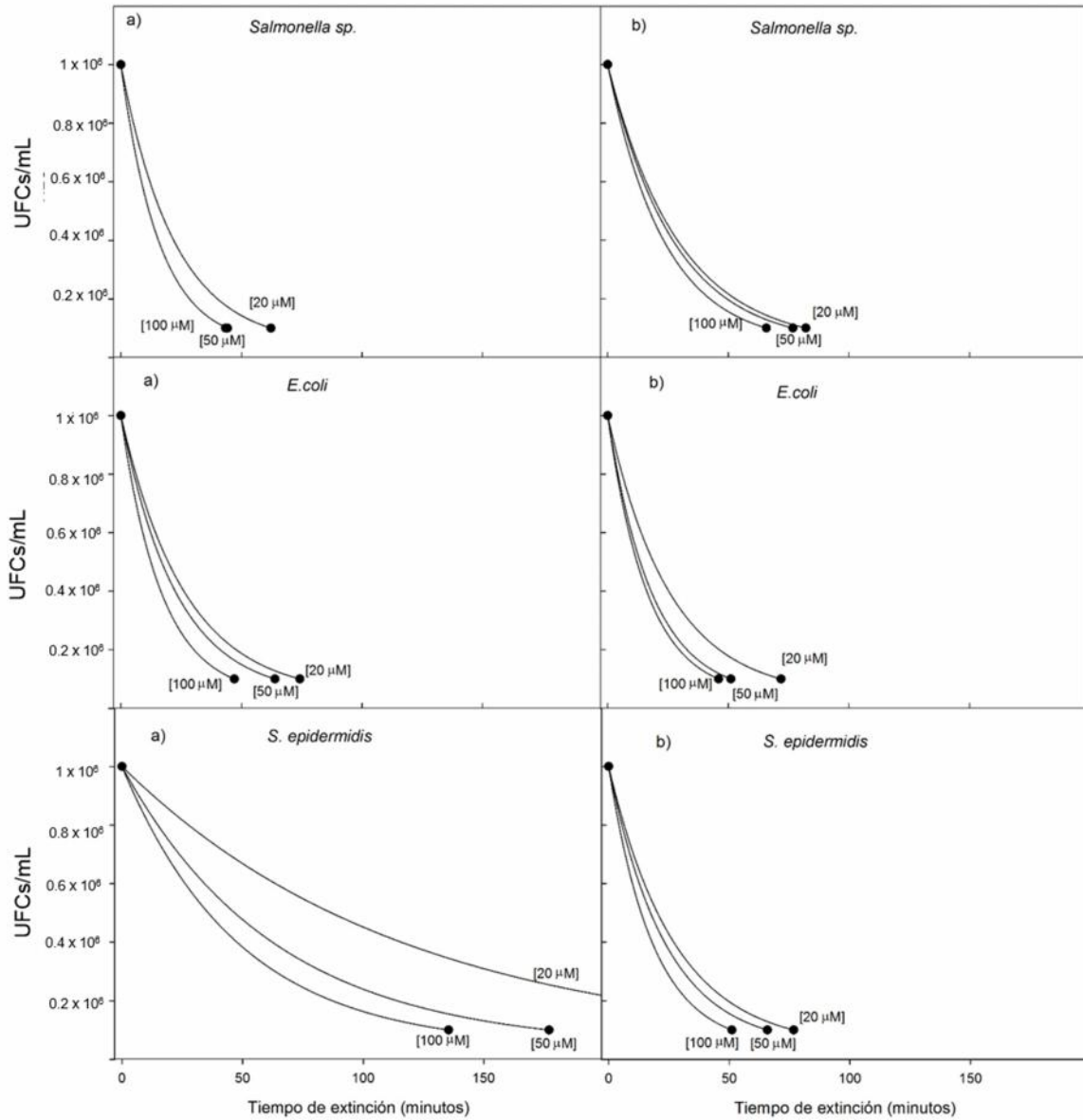


Fig. 2. Modelamiento del tiempo de extinción de una concentración específica de bacterias (90%) a varias concentraciones de a) indolicidina y b) protegrina-4.

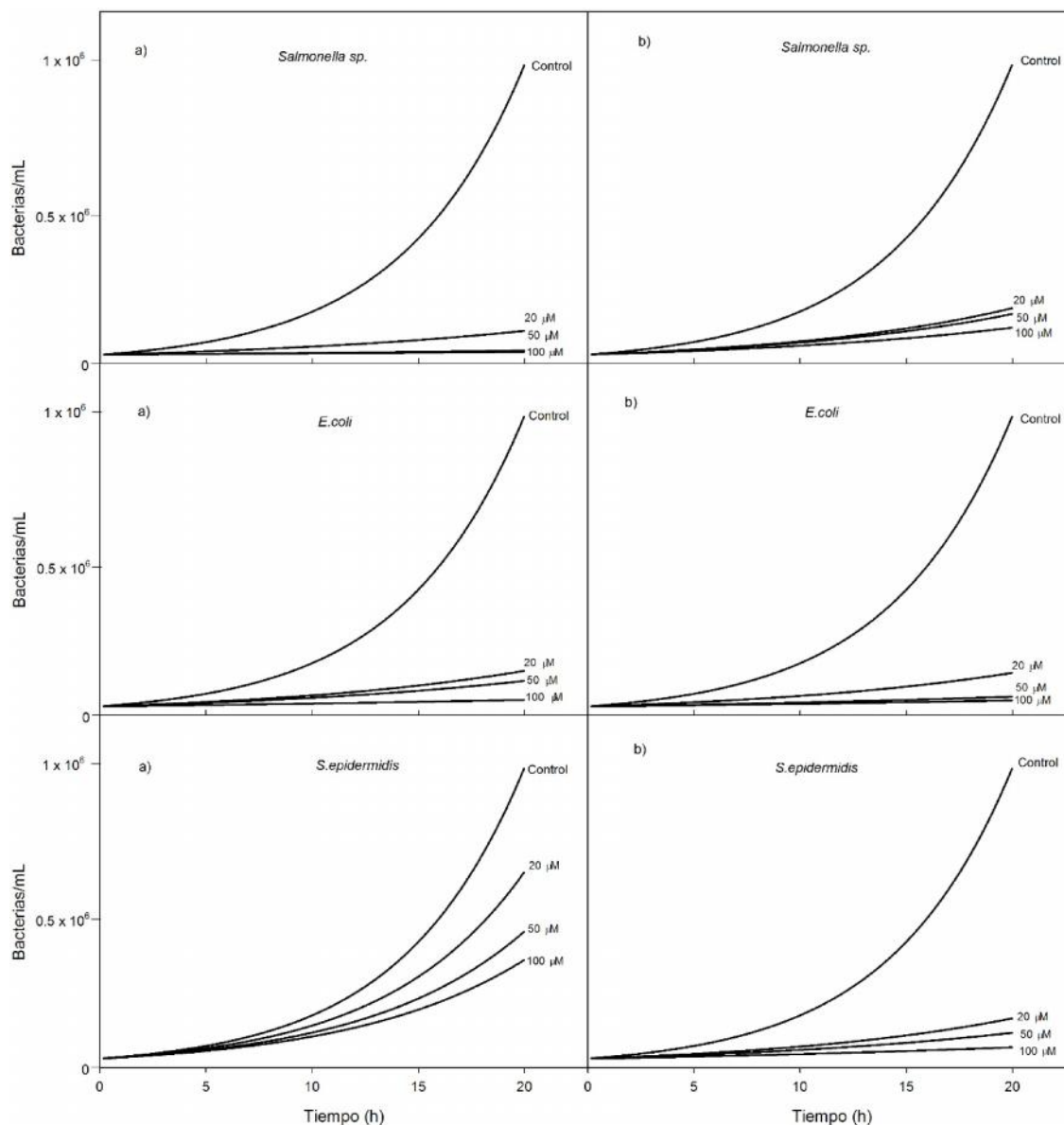


Fig. 3. Modelamiento de la proliferación de bacterias *in vitro* a varias concentraciones de a) indolicidina y b) protegrina-4.

4. DISCUSION

De las cinco protegrinas conocidas, la protegrina-1 (PG-1) ha atraído considerablemente la atención para el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos (Kokryakov *et al.*, 1993; Gottler *et al.*, 2008). Por ejemplo, el análogo de la PG-1 conocida como Iseganan o IB367 se ha evaluado en ensayos clínicos contra la mucositis oral (Tamamura *et al.*, 1995). Reportes previos han demostrado que al emplear análogos lineales de PG-1, los cuales se obtuvieron a través de mutaciones inducidas al sustituir las cuatro Cys por Ala o a través de la modificación de todas las Cys, muestran que los puentes de disulfuro son críticos en el

amplio espectro de acción de este péptido (Monhanram & Bhattacharjya, 2014). Este fenómeno fue previamente reportado por Harwig *et al.*, (1996) quienes removieron uno de los dos puentes de disulfuro que normalmente se encuentran entre los aminoácidos Cys6-Cys15 y Cys8-Cys13; cuando se remueve el puente Cys6-Cys15 resulta en una mayor pérdida de actividad antibacteriana, pero si solo se remueve el puente entre Cys8-Cys13, la actividad antimicrobiana se mantiene alta, indicando que la conformación β -plegada es muy importante en la actividad antimicrobiana. Mohanram & Bhattacharjya (2014) reportaron dos variantes de protegrina (RR11 y LR10) que incluyen la delección de Cys de la protegrina-1 (CDP-1) y demostraron que estas variantes ejercen un amplio espectro de actividad antibacteriana y que además fueron capaces de interactuar con los lípidos cargados negativamente de la membrana celular o también conocidos como lipopolisacáridos (LPS). Los dos puentes de disulfuro ayudan a que la protegrina-1 interactúe con la membrana externa gracias a su naturaleza catiónica y esto auxilia a su acoplamiento con la naturaleza anfipática de la membrana celular (Sokolov *et al.*, 1999); finalmente, la inserción de la protegrina-1 dentro de las capas lipídicas resulta en la ruptura de la membrana (Gidalevits *et al.*, 2003). En el presente trabajo evaluamos a la protegrina-4, la cual fue sintetizada sin la acetilación y amidación del terminal amino y carboxilo. Aunque está ampliamente reportado que esta es vital para lograr la interacción con la membrana celular. No obstante, Zhu *et al.*, 2017 reportaron un incremento de la actividad antimicrobiana de la lisozima de *Sus scrofa* cuando se le fusionó de una a seis copias de la secuencia AWVAWK al terminal amino y carboxilo, lo cual se realizó desde la construcción del gen; esta modificación incrementó de forma importante la permeabilización de la membrana citoplasmática e indujo muerte celular programada en *E. coli* ATCC 10798, *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 25923, *Klebsiella pneumoniae* CMCC (B) 46117, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella enteritidis* CMCC (B) 50335, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 y *Bacillus licheniformis*. Esta enzima también mostró un incremento en su actividad contra algunas bacterias Gram positivas cuando esta fue O-acetilada. Otro ejemplo fue el trabajo reportado por Kuzmin *et al.*, (2017) quienes analizaron las propiedades citotóxicas de la taquiplesina I cuando se le fusionó una amida en el terminal amino y carboxilo; esta modificación en este péptido β -plegado mejoró sus propiedades farmacocinéticas contra varios tumores causados por células tumorales: HEK293T (células humanas embrionarias de riñón transformadas), SKBR-3 (células de cáncer de mama), A549 (células de cáncer de pulmón), HeLa (células cervicouterinas), HEF (fibroblastos embrionarios humanos) y NHA (astrocitos humanos normales).

En el caso de la protegrina, esta actúa a través de la permeabilización de la membrana celular de bacterias Gram negativas (*Salmonella* sp. y *E. coli*) (Heller *et al.*, 1998). El mecanismo preciso incluye la inserción del péptido en la estructura externa de la membrana y este evento es mediado a través de interacciones hidrofóbicas, las cuales provocan una perturbación en la estructura de la membrana, entonces, otro péptido es capaz de penetrar suficientemente en un proceso conocido como “autopromoción de entrada” (Jenssen *et al.*, 2006). El mecanismo involucra un adelgazamiento de la membrana (Heller *et al.*, 1998) y posteriormente es seguida por un proceso de oligomerización para formar poros toroidales en membranas aniónicas (Yang *et al.*, 2000). Si el modelo de membrana contiene lípidos zwitteriónicos, la protegrina muestra otras configuraciones cuando se introduce a la membrana, tal como si fuera una sola inserción (Yamaguchi *et al.*, 2002) o dimerización

(Jang *et al.*, 2007). Para el caso de *E. coli*, Bolintineau *et al.*, (2010) reportan que es necesario solo 100 péptidos de protegrina-1 para matar a *E. coli* a través de la formación de poros, con la concomitante liberación de potasio. La pérdida de viabilidad es el resultado de un proceso de intercambio iónico no controlado y decaimiento del potencial transmembranal; la formación de poros probablemente se promueve con altas concentraciones de protegrina-1. La protegrina-1 (PG-1) fue probada contra *Staphylococcus aureus* (MIRSA) y *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 2 mg/mL y logró reducir en más de tres unidades logarítmicas (UFCs) a la población en menos de 15 minutos (Steinberg *et al.*, 1997), en este trabajo la máxima concentración de péptidos fue de 3.4 mg/mL pero al hacer diluciones la concentración de péptido fue menor, por ello se requirió de al menos una hora de exposición. En la presente investigación, a pesar de haber utilizado a la protegrina reportada como menos efectiva, los resultados de inhibición del crecimiento celular fueron evidentes respecto al control negativo en todas las cepas probadas. Sin embargo, Kim *et al.*, (2011) reportaron que la amidación en el grupo terminal carboxilo orienta perpendicularmente al péptido PMAP-23 hacia la membrana bacteriana, mientras que el péptido no modificado presenta una posición paralela respecto a la membrana, es decir, la orientación del péptido incrementa la velocidad de penetración a las membranas de las bacterias Gram negativas y, por lo tanto, resulta en una mejor permeabilización de la membrana celular. La amidación del grupo terminal carboxilo es un mejoramiento que se tiene en los AMPs sintéticos, debido probablemente a una mayor estabilidad de estos (Berthold *et al.*, 2013).

Por otra parte, el mecanismo específico por el cual la indolicidina expresa su actividad antimicrobiana es probablemente a través de la desintegración de la membrana celular (Végh *et al.*, 2011). De hecho, la indolicidina se comporta como un material surfactante, esto significa que interrumpe la continuidad de las membranas celulares (Melo *et al.*, 2009) conduciendo a la desintegración total de la estructura de la membrana (Subbalakshmi & Sitaram, 1998). En este contexto, Végh *et al.*, (2011) demostraron que la asociación de la indolicidina contra un soporte de dos bicapas planas produce “adelgazamiento”, este tipo de mecanismo de acción también fue reportado por Shaw *et al.*, (2008) y Mecke *et al.*, (2005). Una vez dentro de las células, la indolicidina inhibe la síntesis de proteínas, así como la interacción con la calmodulina (Falla *et al.*, 1996). Sitaram *et al.*, (2003) reportaron que la indolicidina es capaz de interactuar con la Ca^{2+} -calmodulina (CaM) debido a su alta afinidad; la CaM es una proteína dependiente de calcio que esta presente en todas las células eucariotas y actúa como mediador de ciertas funciones celulares tales como la proliferación celular, organización del citoesqueleto, y regulación de los canales iónicos de la membrana celular (Chin & Menas, 2000), por lo tanto, es necesario el desarrollo de análogos de indolicidina para evitar efectos colaterales hacia células normales de mamífero. Por otra parte, en bacterias, el mecanismo de acción incluye la interacción con el ADN y la membrana celular, especialmente con los fosfolípidos (Lee *et al.*, 2003), donde los péptidos están cargados positivamente y estos tienen la capacidad de interactuar con membranas celulares de bacterias Gram positivas permitiéndoles afectar la síntesis de proteínas, ADN y ARN.

Existen pocos trabajos en la literatura que reporten el uso de parámetros cinéticos para determinar la susceptibilidad de bacterias patógenas a la presencia de péptidos antimicrobianos usando modelos matemáticos y muchos de ellos son solamente

descriptivos tales como los reportados por Steinberg *et al.*, (1997); Harman *et al.*, (2017); Fanter *et al.*, (2010); Freire *et al.*, (2015); Bolintineau *et al.*, (2010); Sung *et al.*, (2016). Esto es debido a que posiblemente, los AMPs, en muchos casos, son todavía una promesa terapéutica para reemplazar a los antibióticos, por lo tanto, existen pocos estudios clínicos sistemáticos. Para el caso de los antibióticos, existen muchos reportes donde nuevos antibióticos se prueban *in vitro* para determinar la velocidad de crecimiento, muerte y resistencia de bacterias patógenas (Mattie, 1981; Firsov *et al.*, 1997). En este trabajo se propuso el uso de UFCs para determinar la viabilidad celular, usando el método conocido como “determinación puntual final” (Theophel *et al.*, 2014) y se diseñó un modelo logístico usando estos puntos discretos, los cuales resaltan la importancia de esos parámetros cinéticos para predecir el curso de la propagación de bacterias patógenas o su inhibición y muerte cuando son expuestas a AMPs. Sin embargo, a pesar del desarrollo de nuevas terapias donde se usan los AMPs, el modelo utilizado en esta investigación podría ser usado en un futuro para cuantificar la efectividad de nuevos AMPs, al menos *in vitro*, tal como aquellos utilizados para antibióticos. Finalmente, concluimos que los péptidos usados en esta investigación (indolicidina y protegrina-4) tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* sp., y *S. epidermidis in vitro*, pero su aplicación terapéutica en pacientes humanos es aún un desafío debido a que su estabilidad y actividad en el torrente sanguíneo es afectado por cambios en el pH (Malik *et al.*, 2016), así como otros factores.

La indolicidina, la cual no presentaba acetilación y amidación en la terminación amino y carboxilo, mostró alta actividad antimicrobiana contra *Salmonella* sp. y *E. coli* en todas las concentraciones probadas, excepto para *S. epidermidis*. Mientras que la protegrina-4, la cual se sintetizó con las mismas modificaciones que la indolicidina, fue muy efectiva contra todas las cepas probadas. Con el método de determinación puntual final de la viabilidad por medio de UFCs fue posible obtener los parámetros cinéticos como la velocidad específica de muerte (Kd), velocidad aparente de crecimiento (μ_{net}) y máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) se pudo modelar el tiempo de extinción y la cinética de crecimiento de las bacterias patógenas cuando se exponen a diferentes concentraciones de indolicidina y protegrina-4.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) a través del programa “Jóvenes en la investigación 2016” por el financiamiento de este Proyecto.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Al-Asadi M.J.S., Greenwood D. & O Grady F. 1979. In vitro model simulating the form exposure of bacteria to antimicrobial drugs encountered in infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 16: 77-80.
- Aminov R.I. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*. 11 (129): 2970-2988.
- Andersson D.I., Hughes D. & Kubicek-Sutherland J.Z. 2016. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*. 23: 43-57.
- Bahar A.A. & Ren D. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*. 6 (12): 1543-1575.
- Berthold N., Czihal P., Fritsche S., Sauer U., Schiffer G., Knappe D., Alber G. & Hoffmann R. 2013. Novel apidaecin 1b analogs with superior serum stabilities for treatment of infections by gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57: 402-409.
- Bolinteanu D., Hazrati E., Davis H.T., Lehrer R.I. & Kaznessis. Y.N. 2010. Antimicrobial mechanism of pore-forming protegrin peptides: 100 pores to kill *E. coli*. *Peptides*. 31 (1): 1-8.
- Chin D & Means A.R. 2000. Calmodulin a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology*. 10: 322-328.
- Czyzewski A.M., Jansen H., Fjell C.D., Waldbrook M., Chongsiriwatana N.P., Yuen E., Robert E.W., Hancock R.E.W. & Barron E. 2016. In vivo, in vitro and in silico characterization of peptoids as antimicrobial agents. *PloS One*. 11 (2): 1-17.
- Falla T.J., Karunaratne D.N. & Hancock R.E. 1996. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (32): 19298-303.
- Fantner G.E., Barbero R.J., Gray D.S. & Belcher A.M. 2010. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology*. 5 (4): 280-285.
- Freire J.M., Gaspar D., García de la Torre B., Veiga A.S., Andreu D. & Castanho M.A.R.B. 2015. Monitoring antibacterial permeabilization in real time using time-resolved flow cytometry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1848: 554-560.
- Firsov A.A., Vostrov S.N., Scherchenko A.A., & Cornaglia G. 1997. Parameters of bacterial killing and regrowth kinetics and antimicrobial effects examined in terms of area under the concentration-time curve relationships: action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* in a vitro dynamic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41 (6): 1281-2187.
- Friedrich C.L., Rozek A., Patrzykat A. & Hancock R.E.W. 2001. Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against Gram-positive bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (26): 24015-24022.

- Kandasamy S.K. & Larson R.G. 2007. Binding modes of protegrin-1, a beta-strand antimicrobial peptide, in lipid bilayers. *Molecular Simulation*, 9 (10): 799-807.
- Kim J.Y., Park S.C., Yoon M.Y., Hahm K.S. & Park Y. 2011. C-terminal amidation of pmap-23: Translocation to the inner membrane of gram-negative bacteria. *Amino Acids*. 40: 183-195.
- Kokryakov V.N., Harwig S.S.L., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V., Korneva H.A. & Lehrer R.I. 1993. Protegrins-leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Letters*. 327: 231-236.
- Kuzmin D.V., Emelianova A.A., Kalashnikova M.B., Pantelev, P.V. & Ovchinnikova T.V. 2017. Effect of N- and C- terminal modifications on cytotoxic properties of antimicrobial peptide tachyplesin I. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine: Pharmacology and Toxicology*. 162 (6): 754-757.
- Gidalevitz D., Ishitsuka Y., Muresan A.S., Konovalov O., Waring. A.J., Lehrer R.I. & Lee K.Y.C. 2003. Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (11): 6302-6307.
- Gottler L.M., Salud Bea R., Shelburne C.E., Ramamoorthy A. & Marsh E.N. 2008. Using fluorous aminoacids to probe the effects of changing hydrophobicity on the physical and biological properties of the beta-hairpin antimicrobial peptide protegrin-1. *Biochemistry*. 47: 9243-9250.
- Ha T.H., Kim C.H., Park J.S. & Kim K. 2000. Interaction of indolicidin with model lipid bilayer: quartz crystal microbalance and atomic force microscopy study. *Langmuir*. 16 (2): 871-875.
- Halevy R., Rozek A., Kolusheva S., Hancock R.E.W. & Jelinek R. 2003. Membrane binding and permeation by indolicidin analogs studies by a biomimetic lipid/polydiacetylene vesicle assay. *Peptides*. 24 (11): 1753-1761.
- Hancock R.E.W. & Lehrer R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*. 16: 82-88.
- Hancock, R.E. & Scott M.G. 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (16): 8856-8861.
- Harman R.M., Yang S., He M.K. & Van de Walle G.R. 2017. Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds. *Stem Cell Research & Therapy*. 8 (157): 1-14.
- Harwig S.S., Waring A., Yang H.J., Cho Y., Tan L. & Lehrer R.I. 1996. Intramolecular disulfide bonds enhance the antimicrobial and lytic activities of protegrins at physiological sodium chloride concentrations. *European Journal of Biochemistry*. 240: 352-357.
- Heller W.T., Waring A.J., Lehrer R.I. & Huang H.W. 1998. Multiple states of β -sheet peptide protegrin in lipid bilayers. *Biochemistry*. 37 (49): 17331-8.

- Jang H., Ma B. & Nussinov R. 2007. Conformational study of the protegrin-1 (PG-1) dimer interaction with lipid bilayers and its effect. *BMC Structural Biology*. 7: 21.
- Jenssen H., Hamill P. & Hancock R.E.W. 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 19 (3): 491-511.
- Kim J.Y., Park S.C., Yoon M.Y., Hahm K.S. & Park Y. 2011. C-terminal amidation of pmap-23: Translocation to the inner membrane of gram-negative bacteria. *Amino Acids*. 40: 183-195.
- Jorgensen J.H. & Ferrarro M.J. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*. 49 (11): 1749-55.
- Lee D.G., Kim H.K., Kim S.A., Park Y., Park S.C., Jang S.H. & Hahm K.S. 2003. Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phos-pholipid membranes. *Biochememical Biophysical Research Communications*. 305 (2): 305-310.
- Lourenco F.B. & Andreoli-Pinto T.J. 2011. Antimicrobial assay using kinetic-reading microplate system. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 47 (3): 573-584.
- Malik E., Dennison S.R., Harris F. & Phoenix D.A. 2016. pH dependent antimicrobial peptides and proteins, their mechanisms of action and potential as therapeutic agents. *Pharmaceuticals*. 9 (67): 1-35.
- Maróti G., Kereszt A., Kondorosi E. & Mergaert P. 2011. Natural roles of antimicrobial peptides 231 in microbes, plants and animals. *Research in Microbiol*, 162 (4): 363-374.
- Mattie H. 1981. Kinetics of antimicrobial agents. *Reviews of Infectios Diseases*. 3(1): 19-27.
- Mecke A., Lee D.K., Ramanoorthy A., Bradford G., Orr B.G. & Banaszak Holl M.M. 2005. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: an atomic force microscopy study of MSI-78 in lipid bilayers. *Biophysical Journal*. 89 (6): 4043-4050.
- Melo M.N., Ferre R. & Castanho M.A.R.B. 2009. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nature Reviews Microbiology*. 7 (3): 245-250.
- Miyasaki K.T., Iofel R. & Lehrer R.I. 1997. Sensitivity of periodontal pathogens to the bactericidal activity of synthetic protegrins. *Journal of Dental Research*, 76 (8): 1453-1459.
- Mohanram H. & Bhattacharjya S. 2014. Cystein deleted protegrin-1 (CDP-1): Antibacterial activity, outer membrane disruption and selectivity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1840: 3006-3016.
- Mueller M., de la Peña A. & Derendorf H. 2004. Issues in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-Infective Agents: Kill Curves versus MIC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48 (2): 369-377.
- Philip T.F., Lineau A., Leung S.C., Miu L.A., Florence H., Bohnert M., Mooijman K. et al. 2003. Detection of Salmonella in fresh cheese, poultry products, and dried egg products by

the ISO 6579 Salmonella culture procedure and the AOAC: Official methods: Collaborative study. *Journal of AOAC International*. 86 (2): 275-295.

Poccia M.E., Beccaral A.J. & Dondo R.G. 2014. Modeling the microbial growth of two *Escherichia coli* strains in a multi-substrate environment. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 31 (2): 347-354.

Reyes C., Terrón K., Reynoso R., Rubí H., Chávez S., Barrales-Cureño H.J. & López-Valdez L.G. 2016. Desarrollo de un software para la caracterización de matraces y fermentadores agitados mecánicamente. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 3 (5): 42-58.

Rodríguez-Rojas A., Rodríguez-Beltrán J., Couce A. & Balzquez J. 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*. 303 (6-7): 293-287.

Rozeck A., Friedrich C.L. & Hancock R.E. 2000. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*. 39 (51): 15765-15774.

Selsted M.E., Novotny M.J., Morris W.L., Tang Y.Q., Smith W. & Cullo J.S. 1992. Indolicidin a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*. 267 (7): 4292-4285.

Shaw J.E., Epand R.F., Hsu J.C.Y., Mo G.C.H., Epand R.M. & Yip C.M. 2008. Cationic peptide-induced remodelling of model membranes: direct visualization by in situ atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*. 162 (1): 121-138.

Sitaram N., Subbalakshmi C. & Nagaraj R. 2003. Indolicidin, a 13-residue basic antimicrobial peptide rich in tryptophan and proline, interacts with Ca⁺²-calmodulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 309: 979-884.

Steinberg D.A., Hurst M.A., Fujii C.A., Kung A.H., Ho J.F., Cheng F.C., Lounsbury D.J. & Fiddes J.C. 1997. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 41 (8): 1738-1742.

Steinstraesser L., Kraneburg U.M., Hirsch T., Kesting M., Steinau H.U., Jacobsen F. & Al-Benna S. 2009. Host defense peptides as effector molecules of the innate immune response: A Sledgehammer for Drug Resistance? *International Journal of Molecular Sciences*. 10 (9): 3951-70.

Sokolov Y., Mirzabekov T., Martin D.W., Lehrer R.I. & Kagan B.L. 1999. Membrane channel formation by antimicrobial protegrins. *BBA Biomembranes*. 1420 (1-2): 23-29.

Subbalakshmi C. & Sitaram N. 1998. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiology Letters*. 1: 91-96.

Sung D.K., Chang Y.S., Sung S.I., Yoo H.S., Ahn S.Y. & Park W.S. 2016. Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against *Escherichia coli* is mediated by secretion of beta-defensin-2 via toll-like receptor 4 signaling: Antibacterial effects of MSCs via beta defensin-2. *Cellular Microbiology*. 18: 424-436.

Tamamura H., Murakami T., Horiuchi S., Sugihara K., Otaka A., Takada W., Ibuka T., Waki M., Yamamoto N. & Fujii N. 1995. Synthesis of protegrin-related peptides and their antibacterial and anti-human immunodeficiency virus activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 43: 853-858.

Theophel K., Schacht V.J., Schluter M., Schnell S., Stingu C.S., Schaumann R. & Bunge M. 2014. The importance of growth kinetic analysis in determining bacterial susceptibility against antibiotics and silver nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*. 5 (544): 1-10.

Yamaguchi S., Hong T., Waring A., Lehrer R.I. & Hong M. 2002. Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a β -sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry (Mosc)*. 41: 9852-9862.

Yang L., Weiss T.M., Lehrer R.I. & Huang H.W. 2000. Crystallization of antimicrobial pores in membranes: maganin and protegrin. *Biophysical Journal*. 79: 2002-2009.

Végh A.G., Nagy K., Bálint Z., Kerényi A., Rákhely G., Váró G. & Szegletes Z. 2011. Effect of antimicrobial peptide-amide: indolicidin on biological membranes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-6.

Zhu D., Cai G., Li X., Lu J. & Zhang L. 2017. Enhancing the antimicrobial activity of *Sus scrofa* lysozyme by N-terminal fusion of sextuple unique homologous peptide. *Journal of Biotechnology*. 243: 61-68.