



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**TEMA DE TESIS
DESARROLLO BIOTECNOLÓGICO DE UN PÉPTIDO ANTIMICROBIANO POR
BIOINFORMÁTICA**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. EDSON EDINHO ROBLES GÓMEZ



TUTOR: MANUEL SORIANO GARCÍA AÑO: 2011

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Manuel Soriano en el laboratorio 2 del Departamento de Bio-macromoléculas del Instituto de Química.

A la UNAM que junto con sus investigadores, estudiantes y administrativos me acompañaron y apoyaron en las diferentes etapas de este trabajo, a México y de nuevo a la UNAM un merecido reconocimiento por su generosidad, confianza y apoyo, que me permitió llevar a cabo este trabajo, ofreciéndome además la posibilidad de crecer en el campo académico y personal.

A CONACYT por su apoyo permitiéndome ser beneficiario de su programa de becas con el número 240061, porque sin éste el proyecto no hubiera sido viable.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento, el Dr. Manuel Soriano García por su confianza y permitirme trabajar en su grupo de investigación, un especial agradecimiento a mi comité de examen a la Maestría: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, por compartir con mucha generosidad una visión diferente del sistema de estudio, Dr Luis Eduardo García Zepe-da por su disposición, comprensión y apoyo. A los Dr. Miguel Antonio Basín, Dr. Enrique García Hernández, Dr. Fernando Cortés Guzmán, por su colaboración, disposición, y amabilidad.

Por su paciencia, apoyo de largo aliento, atención a mis consultas sobre metodología y otros aspectos y por todo el amor que me ofrece a cada momento, Citlali Flores Villegas.

Al Dr. Roberto Arreguín por su tiempo y disposición y Sergio Román por su ayuda en el HPLC y Fernando por las pruebas de hemolisis, a los tres les agradezco por su compañerismo y buen humor.

Mis compañeros de laboratorio Verónica Tello, Juan Pablo, Norma y María Gasca, por su infinita paciencia y disposición a mis bromas.

A mis patrocinadores oficiales de corazón, mi familia.

*Esta tesis la dedico con todo mi amor y cariño a Aleja (mi madre), Paolita (mi hermana) y
Citla (mi compañera de aventuras).*

CONTENIDO

RESUMEN	12
<hr/>	
I. INTRODUCCIÓN	13
<hr/>	
1.1 Péptidos antimicrobianos.	14
1.1.1 <u>Estructura y diversidad.</u>	
1.2 Bases de actividad y selectividad de péptidos antimicrobianos.	18
1.2.1 <u>Composición de membranas.</u>	
1.3 Mecanismos de acción.	20
1.3.1 <u>Permeabilización de membrana.</u>	
1.3.1.1 <i>Mecanismo de barril.</i>	
1.3.1.2 <i>Mecanismo de carpeta.</i>	
1.3.1.3 <i>Mecanismo toroide.</i>	
1.3.2 Mecanismos alternativos de permeabilización de membrana.	22
1.4 Citocinas y Quimiocinas.	
1.4.1 <u>Quimiocinas.</u>	
1.4.2 <u>Citocinas.</u>	
<hr/>	
II MOTIVACIÓN	25
<hr/>	
2.1 Objetivo general	
2.2 Objetivos específicos	
<hr/>	
III. DESARROLLO	
<hr/>	
3.1 Predicción de péptidos antimicrobianos basados en algunos conceptos de evolución, estructura y propiedades fisicoquímicas.	27
3.1.1 <u>Alineamiento</u>	
3.1.1.1 <i>Alineamiento óptimo.</i>	
3.1.1.2 <i>Diferencias entre PAM y BLOSUM</i>	
3.1.2 <u>Metodología desarrollada para el alineamiento de las proteínas citocinas y quimiocinas.</u>	30
3.2 Análisis del clúster.	
3.2.1 <u>Distancia observada.</u>	
3.2.2 <u>Modelos de sustitución</u>	
3.2.3 <u>Modelo WAG</u>	
3.2.4 <u>Metodología desarrollada para el dendograma de las proteínas analizadas.</u>	
3.3 Determinación de un péptido antimicrobiano candidato teniendo con base a los resultados del análisis clúster y propiedades fisicoquímicas determinadas por procedimientos de bioinformática.	31
3.3.1 <u>Proteínas con estructura de alfa-hélice.</u>	
3.3.2 <u>Péptidos con estructura alfa hélice</u>	
3.3.3 <u>Tamaño</u>	
3.3.4 <u>Punto isoeléctrico y carga neta.</u>	
3.3.5 <u>Helicidad</u>	
3.3.6 <u>Hidrofobicidad y momento hidrofóbico.</u>	
3.3.7 <u>Características Generales e importancia del 1F9R</u> ⁵⁷⁻⁷⁰	

3.4	<i>Determinación experimental de la actividad anti microbiana y comportamiento estructural de 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰.</i>	40
3.4.1	<u>Dicroísmo circular.</u>	42
	3.4.1.1 Resultados	
3.4.2	<u>Curvas de crecimiento y ensayo microbiológico.</u>	44
	3.4.2.1 Resultados	
3.4.3	<u>Escape de calceína.</u>	46
	3.4.3.1 Resultados	
3.4.4	<u>Actividad hemolítica.</u>	48
	3.4.4.1 Resultados	
3.4.5	<u>Isotermas de adsorción sobre eritrocitos.</u>	49
	3.4.5.1 Resultados	
3.5	<i>Modelo Cinético de Plegamiento del péptido 1F9R 57-70 en eritrocito.</i>	51
3.5.1	<u>Formulación Matemática</u>	
	3.5.1.1 Interpretación cualitativa de k_f	
3.5.3	<u>Evaluación experimental del modelo cinético propuesto para el péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰</u>	
	3.5.3.1 Metodología	
3.6	<i>Dinámica Molecular</i>	59
3.6.1	<u>Fundamentos de la dinámica molecular</u>	
	3.6.1.1 Condiciones Iniciales	
	3.6.1.2 Estimación de la fuerza y energía potencial	
	3.6.1.3 Medida de la propiedad	
	3.6.1.4 Análisis de datos de dinámica molecular	
3.6.2	<u>Metodología</u>	
3.6.3	<u>Resultados y discusión</u>	

IV CONCLUSIONES	75
------------------------	-----------

V BIBLIOGRAFÍA	78
-----------------------	-----------

VI ANEXOS	88
------------------	-----------

Anexo I.

Anexo II.

Anexo III.

Anexo IV.

Anexo V.

Anexo VI

Anexo VII.

Anexo VIII.

VII ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AH	Actividad Hemolítica
AM	Actividad Antimicrobiana
BMP	Proteína involucrada en la morfogénesis del hueso
C_0	Concentración inicial
C_b	Concentración del seno de una solución
C_{eq}	Constante en equilibrio
Ch	colesterol
CL	Cardiolipina
C_{TS}	Concentración del péptido en la región interfacial
DM	Dinámica Molecular
GPCR	Receptor Acoplado a Proteínas G
H	Hidrofobicidad
HTS	High throughput Screening
IF	Interferón
IL	Interleucina
K	Constante de velocidad
k_a	Constante de adsorción
k_d	Constante de desorción
k_f	Constante de cambio configuracional
K_L	Constante de equilibrio de adsorción para las capas superiores
K_s	Constante de equilibrio de adsorción para la primera capa
LPS	Lipopolisacárido
LUVs	Vesículas Unilamelares Grandes
M	Superficie membranal
n, m	Estados conformacionales
NT	Neighbor Joining
PA	Péptido Antimicrobiano
PC	Fosfatidilcolina
PDB	Protein Data Bank
PE	Fosfatidiletanolamina
P_f	Fracción del péptido plegado o activo
PG	Fosfatidilglicerol
P_n	Fracción del péptido en una región o estado conformacional específico
$P_n(eq)$	Péptido que se encuentra en un solo estado conformacional

POPE	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]
PS	Fosfatidilserina
P_u	Fracción del péptido despleado o en estado inactivo
P_u^i	Concentración del péptido en el tiempo 0
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
RSA	Random Sequential Adsorption
S	Tiempo
SM	Esfingomielina
TFE	Trifluoroetanol
γ	Tensión interfacial
θ	Fracción de la interfase
ϖ	Carga
Ψ	Helicidad
Ω	Ángulo polar
μ	Momento hidrofóbico
$p(v_i)$	Momento en función de la velocidad
m_i	Masa de la partícula i .
k	Constante de Boltzman.
T	Temperatura.
v	Velocidad.
$V(r; s)$	Energía Potencial en función de distancia y parámetros s .
$V_{(r,s)}^{no\ enlace}$	Potencial de no-enlace
$V_{(r,s)}^{enlace}$	Potencial de Enlace
V_{ij}^{LJ}	Potencial de Lennard-Jones
V_{ij}^q	Potencial Coulombico
ϵ	Constante dieléctrica

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Parámetros estructurales determinados para los péptidos antimicrobianos (PAs).
- Figura 2.** Esquema General de interacción de PAs con diferentes paredes celulares.
- Figura 3.** Esquema general de la pared celular de bacterias Gram negativas y Gram positivas.
- Figura 4.** Modelos de interacción entre péptidos antimicrobianos y la membrana citoplasmática.
- Figura 5.** Esquema general de plegamiento / inserción / plegamiento.
- Figura 6.** Esquema de microdominios formado por PAs en la membrana celular.
- Figura 7.** Dendograma final obtenido describe los grupos de proteínas.
- Figura 8.** Sobre-posiciones y densidades de los diferentes residuos de aminoácidos (grupos)..
- Figura 9.** Diagrama de flujo que muestra el criterio de selección del péptido
- Figura 10.** Características generales del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰.
- Figura 11.** Purificación del péptido sintético
- Figura 12.** Espectro de dicroísmo circular con las diferentes conformaciones para tres proteínas diferentes.
- Figura 13.** Efecto del aumento de la concentración de TFE en el contenido de estructura secundaria del péptido
- Figura 14.** Dicroísmo circular del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ en medio M9.
- Figura 15.** Curvas de Crecimiento y de porcentaje de supervivencia en función del tiempo.
- Figura 16.** Fotografía de microscopia de fluorescencia de las LUV's.
- Figura 17.** Porcentaje de fluorescencia por calceína en el medio obtenida por la interacción del péptido 1F9R.
- Figura 18.** Cantidad de hemoglobina.
- Figura 19.** Isotermas de adsorción.
- Figura 20.** Dinámica de la tensión superficial.
- Figura 21.** Simulación de la ecuación 28 con los datos obtenidos de la metodología realizada.
- Figura 22.** Dinámica de disminución de concentración de 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ en función del tiempo a 303 K.
- Figura 23.** Imágenes instantáneas de la Simulación.

Figura 24. Distancias de interacción péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ lípido.

Figura 25. Cambio en la estructura secundaria de alfa-hélice a aleatoria.

Figura 26. Desplazamiento lateral de los lípidos en la membrana

Figura 27. Densidad de las moléculas de colina (colinas) incluyendo el grupo fosfato

Figura 28. Parámetro de orden de deuterio de las cadenas de acilo a 1 ns y 75 ns de simulación

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Motivos estructurales predominantes en los diferentes grupos y las proteínas seleccionadas

Tabla 2. Secuencias de los C-terminales de las quimiocinas analizadas.

Tabla 3. Secuencia, carga neta y punto isoeléctrico determinados con la ecuación 2.

Tabla 4. Secuencia, helicidad a punto isoeléctrico de PI: 0.0 y PI: 0.35 y T:310 K.

Tabla 5. Datos determinados Momento Hidrofóbico e Hidrofobicidad y su relación con la temperatura.

Tabla 6. Propiedades del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰.

Tabla 7. Porcentaje de alfa-hélice determinado para cada solución de TFE por CDNN.

Tabla 8. Constante k , calculada a partir del ajuste no lineal de los datos experimentales

RESUMEN

Las bacterias patógenas, hongos, y virus en los últimos años han generado resistencia a una gran variedad de antimicrobianos, lo que ha llevado a diversos grupos de investigación a desarrollar novedosas alternativas de tratamiento contra estos patógenos.

Dentro de estas nuevas alternativas se encuentran los péptidos antimicrobianos (PAs). Éstos tienen como características generales ser de bajo peso molecular y tener dominios muy hidrofílicos e hidrofóbicos que permiten desestabilizar la membrana celular y provocar la muerte de los patógenos.

La complejidad de las interacciones péptido-membrana gobernadas por fuerzas electrostáticas, impedimentos estéricos, y efectos hidrofóbicos no permite tener una visión microscópica de la acción del péptido en la membrana. Los avances en simulación computacional de sistemas de muchas partículas permiten explorar dichas interacciones y al ser concatenadas con evidencia experimental permite plantear modelos de interpretación de estos fenómenos.

Diferentes proteínas modelo han sido utilizadas en la obtención de péptidos antimicrobianos, entre ellas defensinas y catelicidinas, debido a su comprobada acción antimicrobiana y pertenecientes al sistema inmune.

Este estudio explora la posibilidad de hacer un análisis biofísico que inicia con encontrar un PA a partir parámetros fisicoquímicos calculados desde bioinformática, y plantear el modelo de acción apoyados en cinética química y dinámica molecular. Iniciamos con un estudio filogenético de las citocinas y quimiocinas, debido a que estas proteínas en una gran variedad de respuestas inmunológicas, obteniéndose grupos con alta similitud de secuencia. El análisis de estos datos permitió escoger un candidato a PA, el 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰. La actividad antimicrobiana y fungicida fue evaluada por diferentes técnicas experimentales que confirmaron su actividad antimicrobiana y una aparente mínima actividad hemolítica, lo que indica su posible aplicación clínica. Las interacciones con la membrana fueron exploradas a través de un modelo cinético planteado en este trabajo y por simulaciones de dinámica molecular, que llevan a concluir que la interacción del 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ con las membranas se debe a los contactos electrostáticos entre argininas y grupos fosfato.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias patógenas, hongos y virus han generado resistencia a una gran variedad de antimicrobianos, lo que ha llevado a diversos grupos de investigación a desarrollar novedosas alternativas de tratamiento contra estos patógenos.

Dentro de estas nuevas alternativas se encuentran los péptidos antimicrobianos (PAs). Estos péptidos han sido estudiados por casi 20 años y se ha descubierto que proteínas y polipéptidos involucrados en las rutas metabólicas del sistema inmune de diferentes especies, sirven como modelo base en el desarrollo de nuevos PAs. Los péptidos antimicrobianos tienen como características generales ser de bajo peso molecular y una distribución de carga con dominios muy hidrofílicos e hidrofóbicos que permiten desestabilizar la célula y provocar la muerte celular (1).

La membrana celular es potencialmente vulnerable al ataque, debido a su distribución de carga, composición y morfología (1; 2). Estudios demuestran que PAs con estructura de hojas beta facilitan la formación de poros en las membranas celulares (3); Los PAs no estructurados en solución acuosa con tendencia general a la formación de alfa-hélice son capaces de adoptar esta estructura secundaria debido al ambiente electrostático y morfológico de la membrana (4; 5) y así ejercer su actividad antimicrobiana.

Varios modelos han sido propuestos para explicar estos fenómenos, la mayoría de estos basados en los dominios de alta carga positiva de PAs que interactúan por fuerzas electrostáticas con fosfolípidos de carga negativa y que cambian el potencial de carga de las membranas microbianas (6). Por esto, no es de sorprender la fuerte correlación entre la cantidad de aminoácidos catiónicos y la actividad antimicrobiana (7; 8; 9). Los dominios hidrofóbicos, por su parte, permiten la inserción en la membrana y la desestabilización. Modelos de permeabilización de membrana, formación de poro tipo toroidal, redistribución del péptido en la membrana (10), cambios de fase (11; 12) o interrupción de algún proceso celular (13), son consideraciones que subyacen en interpretaciones moleculares y atómicas de las interacciones PA-membrana.

La dificultad experimental de la determinación de esas interacciones moleculares y atómicas ha permitido a la dinámica molecular (DM), abordar este tema. Los avances en la simulación computacional de membranas (14) permiten estudios de interacción PA-membrana que comprueban las descripciones a nivel atómico predichas en los modelos y fenómenos experimentales (formación de poros, desestabilización, etc.) (15; 16; 17; 18; 19; 20; 21). Sin embargo, las simulaciones dependen del potencial de campo que se utilice (14), por lo que los resultados obtenidos por esta metodo-

logía se convierten en una herramienta exploratoria que debe ser combinada con evidencias experimentales.

En los últimos años, con el objetivo de descubrir nuevos Pas y su mecanismo de acción, se han empleado métodos como HTS (High Throughput Screening) (22; 23; 24), que utilizan librerías planeadas racionalmente y que se basan en polipéptidos o proteínas modelo, en las que la diferencia entre cada péptido es de pocos aminoácidos. No obstante, la falta de especificidad de cada péptido, permite plantear formas alternativas en los mecanismos de acción.

Diferentes proteínas modelo han sido utilizadas en la obtención de péptidos antimicrobianos, entre ellas, las quimiocinas y citocinas debido a que están asociadas a diferentes funciones que regulan y determinan la respuesta inmune, por ejemplo, la inflamación, la migración en una gran variedad de células. Las quimiocinas son una familia de proteínas (25) que presentan una secuencia altamente variable, aunque conservan su estructura terciaria estabilizada por puentes disulfuro, que consiste de un N-Terminal, fundamental para la interacción con los receptores de quimiocina, seguido de una región de hojas beta plegada y un C-terminal en forma de alfa-hélice. Las citocinas presentan una gran variabilidad tanto en secuencia como en función. Sin embargo, en la estructura terciaria predominan algunos plegamientos que han permitido agruparlas en citocinas tipo I, donde predominan cuatro alfa-hélices e incluyen un gran cantidad de interleucinas (ILs) (e.j IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15) y las citocinas tipo II que incluyen a los interferones IFNs (e.j IFN alfa/beta, IFN-gamma) y la IL-10 (26; 27). El efecto sinérgico entre estas dos familias de proteínas se ha reportado fundamentalmente en la inducción del linfocito T ayudador (Th-17) polarizada (28), pero a su vez, se ha demostrado que existen interacciones específicas entre citocinas y receptores de quimiocinas, como es el caso de la IL-3, IL4 con CCR3 como mecanismo regulador para diferentes enfermedades (29; 30). Esto indica, que existe una relación estructural entre las dos familias que se basa en la conformación de alfa-hélices en las citocinas y el C-terminal para las quimiocinas.

Estudios inmunológicos y moleculares plantean que el dominio N-terminal de las citocinas y quimiocinas funciona como mediador estructural en la unión ligando-receptor (31; 32; 33; 34; 35) y que, además, puede tener una alta actividad antimicrobiana (36; 37; 38; 39). Estudios estructurales indican que la superficie potencial de estos C-terminales tienen una relativa alta cantidad de argininas y lisinas que generan dominios hidrofílicos de carga positiva. La leucina y el triptófano presentes en estos C-terminales generan parches hidrofóbicos, propiedades que están en concordancia con las propiedades de los PAs antes señaladas. No obstante, no se reportan trabajos en bioinformática que agrupen secuencias de estas proteínas, las caractericen y las clasifiquen como posible PAs, según lo reportado en la literatura.

Trabajos recientes en dinámica molecular, muestran que cuando los PAs ingresan al interior de la bicapa, el PA adquiere una conformación adecuada dentro del medio fluido de la membrana (16). Esto indica que la DM es una herramienta adecuada para estudiar, entender y comprender el ensamble y acción de los péptidos en la membrana.

Iniciamos con un estudio filogenético de las citocinas y quimiocinas, y se obtuvieron varios grupos de alta similitud de secuencia. Un análisis de las propiedades fisicoquímicas como hidrofobicidad, helicidad, punto isoelectrico, etc. de los dominios alfa-hélices de las proteínas agrupadas posterior permitió identificar al C-terminal de estos grupos como posible PAs.. El análisis de estos datos comparados con los reportados para otros PA como la melitina permitió escoger un candidato a PAs el 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰. El 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ fue sintetizado por ANASPEC inc. y purificado por RP-HPLC (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography). La actividad antimicrobiana y fungicida fue evaluada, confirmado su actividad y aparente baja actividad hemolítica que indicaría su posible aplicación clínica. Las interacciones con membranas fueron exploradas a través de un modelo cinético planteado en este trabajo y por simulaciones de dinámica molecular, que llevan a concluir que la interacción del 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ con las membranas es por interacción electrostática entre aminoácidos de arginina y grupos fosfato, esto disminuye la velocidad de desplazamiento de los lípidos en la membrana y, por ende, promueve un aumento en la organización de los lípidos en la membrana alterando la funcionalidad de ésta.

1.1 Péptidos antimicrobianos.

Los PAs son poli péptidos con un poco menos de 100 aminoácidos. En humanos y mamíferos, las dos principales familias de Pas son las defensinas y las catelicidinas (40). Péptidos pertenecientes a estas familias han sido relacionadas con la actividad de fagocitos y secreciones epiteliales. Las defensinas están distribuidas en las células del epitelio y fagocitos y están presentes en altas concentraciones (superior a los micro molar). La catelicidinas son estructuralmente y de origen, distinto a los péptidos antimicrobianos similares a las defensinas (41).

Las defensinas son ricas en hojas beta estabilizadas por seis puentes disulfuro, pueden llegar a generar dimeros o multidimeros, sin embargo no es claro si esta propiedad éste relacionada con su actividad, en las catelicidinas son altamente heterogéneas pero que contienen un C-terminal altamente catiónico que se activa después de ser liberado de la porción N-terminal (42)

Recientemente los nuevos péptidos antimicrobianos tienen como características generales ser de bajo peso molecular y tener dominios muy hidrofílicos e hidrofóbicos que permiten desestabilizar la membrana celular y, por ende, provocar la muerte celular

Aunque decenas de péptidos antimicrobianos han sido reportados, no se ha podido determinar una secuencia consenso. Lo anterior fundamenta el esfuerzo realizado por muchos grupos de investigación en elucidar de manera racional Pas y mecanismos de acción. Un claro entendimiento de éste último, facilita el descubrimiento de nuevos fármacos que optimicen habilidad de eliminar patógenos o apoyen al sistema inmune. Por esto, el interés de utilizar proteínas modelo que estén involucradas en el sistema inmune, ya que en su secuencia y estructura contienen la información necesaria para el desarrollo de nuevos péptidos antimicrobianos.

1.1.2 Estructura y diversidad.

La relación entre estructura y actividad microbiana es una tarea muy compleja, debido a que cada PA puede tener diferente actividad ante diferentes microorganismos, así como ante células de mamíferos (43; 18). La alta diversidad de estructuras y mecanismo de acción no permite una asociación clara entre la estructura y la actividad, por esto, posteriormente se planteó una clasificación en términos de su estructura secundaria como alfa-hélices, hojas beta, asas (loops). Las alfa-hélices y las hojas-beta son las conformaciones de los péptidos más abundantes en la naturaleza.

Los parámetros estructurales tales como conformación, carga, hidrofobicidad, momento hidrofóbico y ángulo polar, son propiedades fisicoquímicas que comparten muchos péptidos antimicrobianos, a continuación mostraremos estos parámetros con algunos ejemplos:

1. Conformación.

Los PAs difieren en secuencia y fuente, sin embargo, la topología tridimensional separa a los péptidos en dos grandes grupos alfa-hélice y hojas beta. Las alfa-hélices en los PAs son abundantes en fluidos extracelulares de insectos y ranas (44). Estos presentan una conformación no estructurada en solución, Sin embargo, alcanzan su estructura activa por interacción con la membrana, posterior a esto se insertan y desestabilizan la membrana. Muchos polipéptidos en vertebrados y toxinas, como el ántrax, están en forma de hoja-beta, y tienden a formar barriles en el interior de la membrana, que conectan al interior y exterior de la membrana, lo que lleva a la lisis y, por consiguiente, la muerte celular (45). Conformaciones diferentes a éstas han sido poco reportadas, un ejemplo de ello es la hélice tipo II para péptidos enriquecidos con residuos de prolina y arginina (46) (47).

2. Carga (ω)

Muchos de los PAs tienen una carga positiva que se encuentra entre +2 y +9 (a pH = 7.0) y pueden contener dominios catiónicos bien definidos. Esto es importante para atracción de péptidos antimicrobianos y la carga negativa de las membranas de bacterias y otros microorganismos. Estudios con magainin 2 y homólogos, en los que se mantuvo constante la relación hidrofobicidad y estructura secundaria (alfa-hélice) y la carga positiva aumentó de 3+ a 5+ y, como consecuencia, la actividad antimicrobiana en Gram negativas y Gram positivas aumentó (48). Sin embargo, con cargas superiores a 6+ se incrementa la acción hemolítica y disminuye la actividad antimicrobiana (49).

3. Hidrofobicidad (H)

Es normalmente aceptado que los PAs tienen una cantidad significativa de residuos hidrofóbicos que debe estar próxima al 50 % de la secuencia total. La hidrofobicidad es una característica fundamental en estos péptidos, necesaria para penetrar la membrana. Los incrementos en el carácter hidrofóbico están correlacionados con toxicidad en células de mamífero y la pérdida de especificidad antimicrobiana (50).

La abundancia y polarización tanto de los dominios hidrofóbicos como hidrofílicos refleja el carácter anfipático del péptido. El carácter anfipático puede ser alcanzado por múltiples conformaciones. Sin embargo, una de las más simples y de mejor distribución es la de alfa-hélice. Una medida de la carácter anfipático es el momento hidrofóbico μ que es calculado como la suma vectorial de las hidrofobicidades de cada uno de los aminoácidos que componen el péptido, normalizado a una hélice alfa ideal (51). El incremento en el momento hidrofóbico resulta en un aumento en la permeabilización de la membrana y, por ende, en la actividad hemolítica (52). Los péptidos en conformación de hoja-beta también son anfipáticos, pero esta conformación rígida en solución acuosa promueve la multimerización. En el núcleo de la membrana, la asociación de estos péptidos facilita la formación de canales (45).

4. Helicidad (Ψ)

Muchos estudios demuestran que la helicidad podría ser un parámetro que influye directamente en la toxicidad de los PAs. Se han reportado que ciertos aminoácidos favorecen la adopción y estabilización de la estructura secundaria de alfa-hélice. Por ejemplo, en el estudio del péptido melitina donde se intercambiaron glicinas por leucinas correlacionan con aumentos en la actividad hemolítica y antimicrobiana. Incorporaciones de prolina en el N-terminal de otro péptido antimicro-

biano, llamado Cecropina, reducen la actividad contra bacterias, al igual que la helicidad. Aunque estos experimentos muestran la importancia de la helicidad, es difícil encontrar una correlación cuantitativa entre actividad y helicidad por la diversidad en la estructura de los PAs. Un ejemplo de esto se tiene en un estudio en el que se llevaron a cabo sustituciones seriales por D-aminoácidos en un PA molde, lo que mantuvo constante la carga y redujo la estructura helicoidal. Los resultados muestran que hay una pérdida de citotoxicidad en células de mamífero con retención de la actividad antimicrobiana (53). Para determinar este mecanismo varios estudios se basan en la actividad de *diastereoisómeros* que poseen estructuras anfipáticas de PAs helicoidales. Esto indica que los D-aminoácidos no son hemolíticos y los L-aminoácidos son altamente hemolíticos (54). Las diferentes características fisicoquímicas de los PAs descritas en esta sección es mostrada en las esquemas de la **Figura 1**.

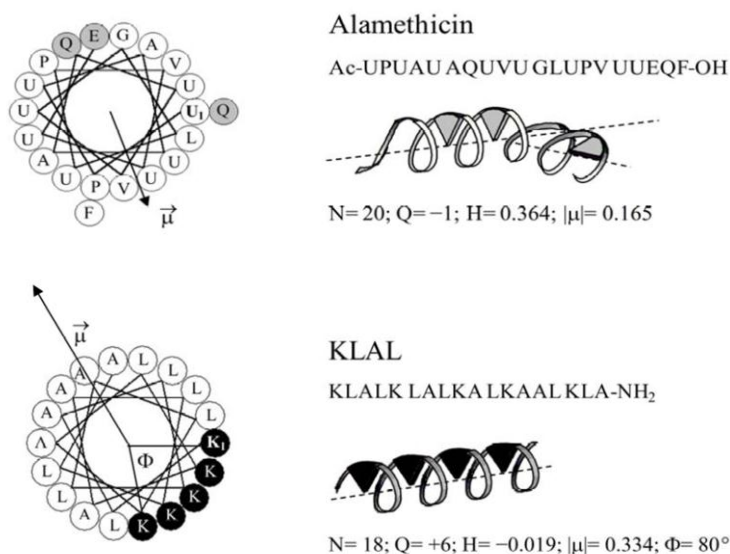


Figura 1. Características fisicoquímicas de algunos péptidos antimicrobianos. Alameticina, KLAL. Los grupos cargados positivamente mostrados en color negro, los hidrofílicos de color gris. También se reportan la propiedades como tamaño N, Hidrofobicidad H, momento hidrofóbico μ y Ángulo polar Ω (8).

1.2 Bases de actividad y selectividad de los Péptidos Antimicrobianos

Un factor fundamental en la divergencia del mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos es la naturaleza de la membrana celular, su composición variable. La gran cantidad de procesos en los que está involucrada, tales como respiración y alimentación, demuestra, que cual-

quier alteración de esta bio-estructura con lleva a una posible muerte celular. El componente principal de las bio-membranas es la bicapa de fosfolípidos, por su disposición espacial, la membrana muestra dos dominios, uno hidrofóbico y uno hidrofílico que define al sistema como anfipático. Hay una gran diferencia entre la versatilidad y la cantidad de fosfolípidos que se encuentran en las membranas de eucariontes y procariontes. Las bio-membranas compuestas de fosfatidilglicerol (PG), cardiolopina (CL), fosfatidilserina (PS) tienen una carga negativa neta; composición encontrada en muchos patógenos. Por el contrario, las bicapas enriquecidas por el zwitterión de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomelina (SM) tienen cargas neutras. Estas características permiten el desarrollo de péptidos específicos para diferente tipo de células.

Los péptidos con actividad antimicótica derivados de plantas, tienen una gran cantidad de aminoácidos neutros (18), debido a que las patógenos de éstas, tienen un alto porcentaje de esteroides en comparación de otras membranas, como la de los mamíferos (55; 56). Dominios de alta carga positiva en los PAs interactúan por fuerzas electrostáticas con fosfolípidos de carga negativa, abundantes en membrana de células Gram negativas (6), que las desestabilizan y las llevan a la muerte celular de bacterias (**Figura 2**). Otras características de las membranas que afectan el mecanismo de acción de los PAs es la diferencia en el potencial de membrana entre eucariotas y procariontes, las proteínas integrales de membrana, balsas proteicas, etc.

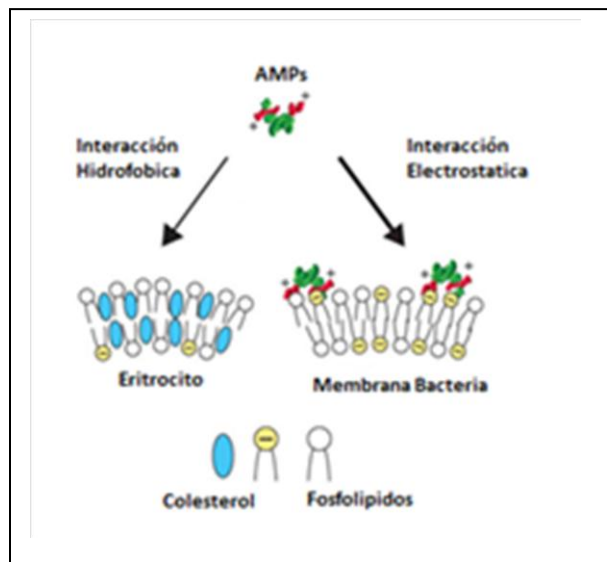


Figura 2. Esquema General de interacción hidrofóbicas, y electrostáticas de PAs con diferentes paredes celulares. En azul colesterol, verde el AMP, a la izquierda membranas neutras y a la derecha membranas cargadas negativamente.

1.2.2 Composición de membranas.

Las membranas de bacterias son usualmente ricas en lípidos aniónicos. Una representación esquemática de la pared celular de células Gram positivas y Gram negativas se muestra en la **figura 3**. Las bacterias Gram negativas tienen dos membranas, una externa y otra interna. La primera altamente asimétrica y con altas cargas negativas debidas a los lipopolisacáridos (LPS) y una interna compuesta por POPE (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina) y POPG (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]). Una capa de peptidoglicanos separa a estas dos membranas constituyéndose en un espacio periplásmico. La membrana citoplasmática es considerada el objetivo de los PAs y, también, se encuentra en las células Gram positivas, estas últimas tiene una cubierta de peptidoglicanos que protegen su membrana (**Figura 2**).

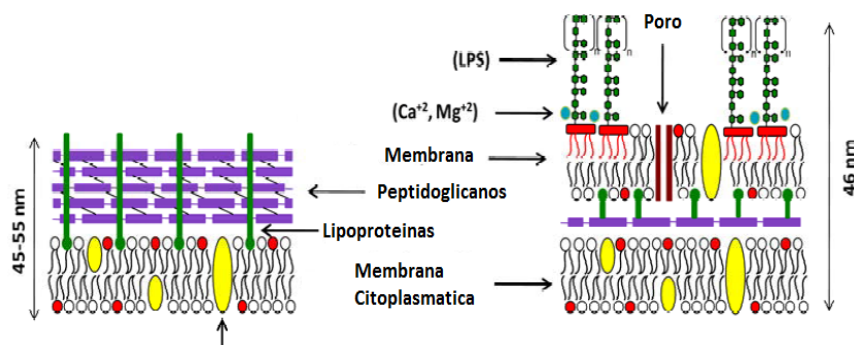


Figura 3. Esquema general de la membrana celular de bacterias Gram negativas y Gram positivas.

1.3 *Mecanismos de acción relacionados con la disrupción de la membrana celular*

Varios mecanismos de acción de los PAs han sido propuestos entre ellos inhibición de síntesis proteica, o de ácidos nucleicos. Sin embargo, el interés principal de este trabajo es analizar los modelos propuestos para la disrupción de la membrana celular. Todos éstos se basan en la adsorción de los PAs y posterior movilidad en el core o superficie de la membrana. Una de las consecuencias de la penetración en la membrana y movilidad es la disrupción de la membrana por formación de hoyos y otras estructuras como se muestra en la **figura 4**.

1.3.1 Permeabilización de los PAs en la membrana

Los cambios conformacionales de la membrana se deben a la reorientación de los péptidos dentro de ella. Esta reorientación es el fundamento esencial para plantear los siguientes modelos de acción:

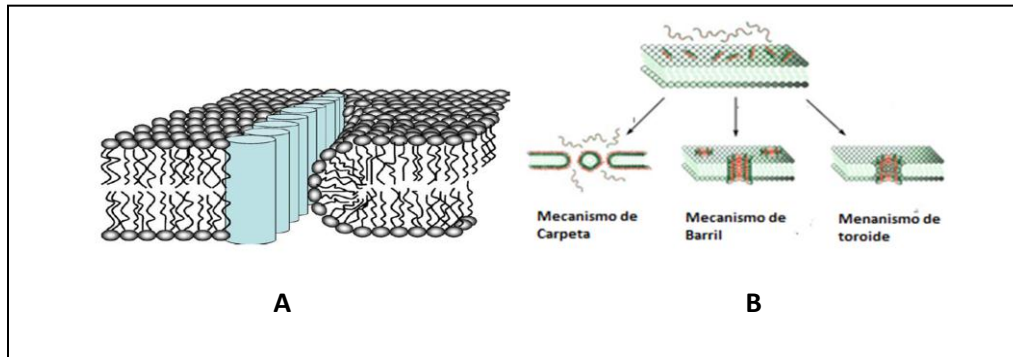


Figura 4. Modelos de interacción entre péptidos antimicrobianos y la membrana citoplasmática. A. muestra la conformación estructural de los lípidos frente a péptidos que atraviesan la membrana, B. Modelos de Permeabilización de membrana, mecanismo carpeta, barril y toroide.

1.3.1.1 *Mecanismo de barril*

Este modelo describe la formación de un poro por agregación de PAs dentro de la membrana. El eje de las alfa-hélices es orientado perpendicular a la superficie de la membrana y las interacciones hidrofílicas entre las hélices predominan agregándose, lo que lleva a la formación de un poro. Un ejemplo clásico es la Alameticina que puede generar poros de diámetro cercano a los 2 nm (**figura 4B**).

1.3.1.2 *Mecanismo de carpeta*

Este modelo es aplicable a PAs de tamaño pequeño, que no son capaces de atravesar el espesor de la membrana. Inicialmente estos péptidos se agregan en la superficie, después, al estar tan concentrados en un punto rompen la tensión superficial de la membrana y encapsulan parte de ésta, lo que interrumpe su semipermeabilidad (**figura 4A y B**).

1.3.1.3 *Mecanismo toroide*

Es un mecanismo similar al mecanismo de barril. Su diferencia fundamental consiste en la estructura y estabilidad del poro. En éste mecanismo, el poro es formado por las cabezas hidrofílicas de los lípidos de la membrana que se estabilizan por los péptidos con orientación perpendicular a la membrana. Los poros formados no son estables, es decir, que pueden desaparecer rápidamente y ser formados de nuevo (**figura 4B**).

1.3.2 *Mecanismos alternativos*

Debido a diferentes fenómenos fisicoquímicos que presentan los Pas al interactuar con las membranas como cambio conformacional, en la superficie y en el core de la membrana, ha permitido plantear nuevos modelos. Estos pueden ser descritos de la siguiente forma (**figura 5**): (i). Adsorción del péptido en la superficie de la membrana por interacciones electrostáticas, (ii). Cambio conformacional del péptido en la superficie de la membrana de aleatoria a la alfa hélice activa, (iii). Inserción del péptido en la membrana, (iv). Oligomerización

de los péptidos en conformación alfa hélices en el interior de la membrana, (v). Estabilización de oligómero formado, (vi). Cambio conformacional del oligómero a hojas-beta para formar un barril beta e iniciar la muerte celular (57).

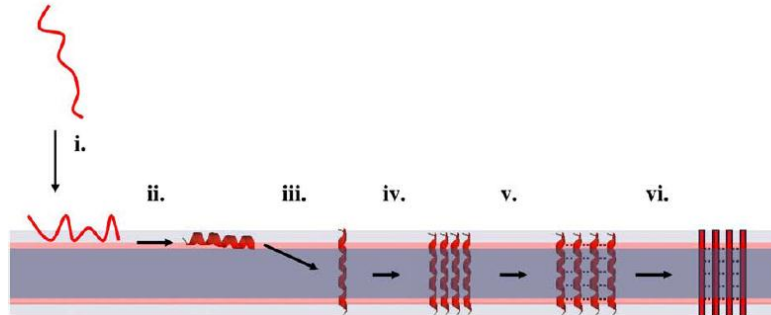


Figura 5. Modelos de interacción entre péptidos antimicrobianos y la membrana citoplasmática. A. muestra la conformación estructural de los lípidos frente a péptidos que atraviesan la membrana, B. Modelos de Permeabilización de membrana, mecanismo carpeta, barril y toroide

Se ha propuesto que los PAs pequeños pueden llegar a generar micro-dominios en la superficie de la membrana (58) como se muestra en la **figura 6** y que están atraídos por los grupos fosfato de los lípidos y alteran sustancialmente la movilidad lateral de los lípidos en la membrana

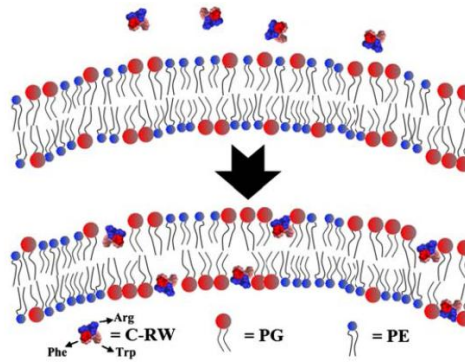


Figura 6. Esquema de microdominios formado por PAs en la membrana celular. Los péptidos generan micro dominios en la superficie de la membrana alterando la morfología de esta. Lo importante es que el péptido no necesita penetrar la membrana o romperla para afectar su funcionamiento

1.4 Citocinas y Quimiocinas

Las quimiocinas y citocinas son proteínas secretadas por el sistema inmune en respuesta de diferentes estímulos, estas determinan y controlan la naturaleza de la respuesta y controlan la migración celular. Trabajos experimentales demuestran que actúan sinérgicamente en algunas enfermedades como alergia y asma (59)

1.4.1 Quimiocinas

Son un grupo de pequeñas proteínas capaces de inducir quimiotaxis en una variedad de células, como macrófagos, monocitos, linfocitos, eosinófilos y fibroblastos entre otras. Estas proteínas llevan a cabo su actividad a través de interacciones con receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (60). Originalmente, las quimiocinas fueron consideradas como proteínas inflamatorias, debido a que eran encontradas en sitios de infección o estímulos proinflamatorios. Tiempo después se determinó que las quimiocinas inflamatorias reclutan y activan a los leucocitos para iniciar la respuesta del sistema inmune y los procesos de cicatrización. Aproximadamente, 50 quimiocinas humanas y 20 receptores han sido descritos (61). Las quimiocinas se dividen en cuatro subfamilias, su clasificación tiene como base la cantidad de aminoácidos que se encuentran entre los puentes disulfuro generados por cisteínas en el N-terminal. El grupo CC consiste de dos residuos de cisteínas adyacentes uno al otro, CXC un aminoácido separa a las dos cisteínas. Los receptores son clasificados dependiendo de la quimiocina que enlaza y se le agrega una letra R a su nombre.

La estructura global de las quimiocinas es tan conservada, que se distinguen dos dominios generales. El N-Terminal compuesto de una serie de hojas beta anti-paralelas y un dominio C-terminal en forma de alfa-hélice. Los dos dominios estructurales tienen diferentes funciones biológicas (59). Se han llevado a cabo estudios de mutagénesis de varias quimiocinas acopladas a sus receptores para determinar el efecto del N-terminal y definir su participación en la señalización receptor-ligando mostrando que este dominio es clave en la señalización aun conteniendo algunas mutaciones (62; 63; 64) (65; 66). El dominio C-terminal en las quimiocinas CXC es también importante en el enlace receptor-ligando, pero sin tanta especificidad. Por el contrario, estudios computacionales muestran al dominio C-terminal más afín al medio membranal y al acuoso que a la interacción ligando-receptor (67; 38).

1.4.2 Citocinas

Las citocinas están involucradas en una gran variedad de respuesta inmune. Inicialmente, se estableció el término linfocina para denominar productos biológicos producidos por linfocitos en respuesta al antígeno (60). Posteriormente, su uso se amplió a moléculas de características similares secretadas por otros tipos de células, por lo que se utilizó el término más amplio de citocina.

El término interleucina (IL) se aplicó a aquellas moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose a medida que se descubrían (IL-1, IL-2, etc.). No obstante, algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales *in vitro*

y aún conservan su denominación original de acuerdo con la función biológica, lo que permitió su identificación, como es el caso del TNF (factor de necrosis tumoral). Aunque la mayoría de las citocinas no poseen ninguna homología en secuencia entre sí, algunas de ellas se han agrupado en familias en base a su estructura tridimensional.

De acuerdo con la estructura secundaria de la molécula, las citocinas se han agrupado de acuerdo a su estructura secundaria, una conformación en α -hélice (IFN-alfa, IFN-gamma, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, G-CSF, M-CSF y GM-CSF), una estructura de láminas beta (IL-1-alfa, IL-1-beta, TNF-alfa y TNF-beta) o una estructura compuesta alfa/beta (IFN-gamma). El primer paso en la activación de receptor citocina – ligando es una dimerización ligando-receptor resultado de la yuxtaposición de superficies. Esto significa que la señalización está fuertemente influenciada por propiedades biofísicas y estructurales de interacciones extracelulares receptor-ligando (68).

Como ya se ha mencionado la primera parte está formada por la búsqueda, por medio del análisis de secuencias y por propiedades fisicoquímicas, de un grupo de péptidos con posible actividad antimicrobiana. Posteriormente, se detallará un nuevo modelo cinético de adsorción del péptido en la membrana y, por último, se describirá la simulación por dinámica molecular llevada a cabo que explora la interacción de la membrana con el péptido.

II JUSTIFICACIÓN

La existencia de una amplia diversidad en péptidos antimicrobianos provenientes de la naturaleza con diferentes estructura demuestra, sin lugar a duda, que no hay una secuencia única para atacar a todos los patógenos. Tal diversidad es una estrategia única para prevenir o retrasar la evolución de la resistencia a péptidos antimicrobianos. Algunos PAs con actividad antimicrobiana provenientes de proteínas del sistema inmune han sido reportados (ej los C-terminales de MIP-3 α /CCL20 en *E. coli* (69) , IL-8 en *S. aureus* y *C. albicans* (70)). Lo que justifica un estudio que explore y relacione familias de proteínas involucradas en la respuesta inmune, debido a que contienen la información estructural necesaria para servir como modelos de PAs con propiedades estructurales y fisicoquímicas características.

Por lo tanto, el interés fundamental de este trabajo es resolver la siguiente pregunta:

¿Es posible encontrar un péptido antimicrobiano a partir de propiedades fisicoquímicas determinadas por bioinformática que provenga de una familia de proteínas del sistema inmune?

Encontrar un péptido PA es el primer paso en el desarrollo de una investigación biofísica, la pregunta que surge después de encontrarlo es, bajo qué modelo de acción se rige. Existen algunas pruebas experimentales que ayudan a responder a esta pregunta, como microscopia electrónica y pruebas biológicas. Sin embargo, nuestro interés está enfocado en plantear un modelo cinético que se correlacione la disminución de concentración de péptido en solución con la adsorción de éste en la membrana, en función del tiempo. Se han planteado dos tipos de modelos cinéticos de adsorción de PAs en membranas celulares, los primeros se enfocan en el cambio de la tensión superficial de la membrana por el aumento de concentración de péptido en la superficie (71), mientras que los otros en el cambio de concentración del péptido en la solución, en función de la concentración de lípidos (72) , sin embargo, no existe un modelo que relacione la variación de la concentración del péptido con una variable propia de una membrana celular como es la superficie y su capacidad de adsorción.

Por esto, una pregunta alternativa surge como continuación en al desarrollo conceptual de este trabajo:

¿Es posible desarrollar un modelo cinético aplicado al mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos que incluya un análisis cuantitativo y un conjunto de ecuaciones no lineal que permita ajustarse a los datos de adsorción del péptido en la membrana?

El segundo paso consiste en la inserción del péptido en la membrana debido a consecuencia directa de las interacciones de tipo hidrofóbico entre el péptido y la membrana. Su estabilización en interior y posterior salida o re-ubicación en la membrana es difícil de seguir experimentalmente. Técnicas computacionales como la dinámica molecular permiten aproximarnos a identificar este tipo de interacciones. Por esto, en este trabajo complementamos las anteriores preguntas con una simulación por dinámica molecular del péptido seleccionado.

2.1 *Objetivo general*

Encontrar a partir de proteínas involucradas en la respuesta inmune (Citocinas y Quimiocinas) que tengan reportada su estructura tridimensional en el Protein Data Bank (PDB) una serie de posibles péptidos antimicrobianos, basados en propiedades determinadas por bioinformática, evaluar la actividad de uno de ellos, desarrollar un modelo cinético en el cual se utilice un parámetro relacionado con la membrana celular. Posteriormente, utilizar simulaciones de dinámica molecular como herramienta exploratoria del modelo de acción antimicrobiana.

2.2 *Objetivos específicos*

1. Determinar bioinformática propiedades fisicoquímicas, como helicidad, momento hidrofóbico, hidrofobicidad y punto isoeléctrico, para encontrar péptidos con posible actividad antimicrobianos de dos familias de proteínas involucradas en la respuesta inmune.

2. Determinar por ensayos microbiológicos como curvas de crecimiento, ensayos microbiológicos, actividad hemolítica, el potencial antimicrobiano del péptido seleccionado.

3. Plantear y desarrollar un modelo cinético que involucre a la fracción cubierta de membrana θ y a la variación de concentración de péptido en solución por interacción con la membrana de eritrocitos.

4. Estudiar las interacciones del sistema péptido seleccionado con la membrana apoyándose en estudios de dinámica molecular en equilibrio.

III. DESARROLLO

3.1 Predicción de péptidos antimicrobianos basados en algunos conceptos de evolución, estructura y propiedades fisicoquímicas.

3.1.1 Alineamiento

Desde una perspectiva biológica, el alineamiento de una secuencia es una hipótesis acerca de la homología en los aminoácidos (o nucleótidos) de varias secuencias. Se asume que las posiciones alineadas tienen una alta probabilidad de contener la misma información estructural y fisicoquímica. Las secuencias de diferente tamaño direccionan el alineamiento a la existencia de huecos (gaps) para encontrar un correcto alineamiento. Por tanto, los gaps representan ablaciones o inserciones en la secuencia (73).

Para encontrar el alineamiento óptimo se necesitan considerar los siguientes parámetros:

Sustituciones vs gaps

Si la secuencia acumula pocas sustituciones, el alineamiento es relativamente fácil. Sin embargo, cuando las secuencias son altamente divergentes, la cantidad de gaps dificulta un alineamiento. Para la introducción de un GAP se tienen que tomar en cuenta, además de las inserciones y ablaciones (de las secuencias entre sí), la probabilidad evolutiva de la mutación, las propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de las secuencias, en donde surgen patrones como la existencia de aminoácidos similares bioquímicamente (Ej. Serina y Treonina (polares), Fenilalanina y Tirosina (aromáticos), Acido Glutámico y Aspártico (Ácidos de carga negativa), etc.) por lo que, en este caso, se debe decidir si es mejor introducir un gap como tal o que sólo sea un desajuste en el alineamiento. Además de esto, hay que tomar en cuenta que hay una clara tendencia a mantener la estructura secundaria que es importante en interacciones proteína-proteína (74).

3.1.1.1 *Alineamiento óptimo.*

Las relaciones entre secuencias homólogas son comúnmente encontradas desde el alineamiento. Un alineamiento tiene aminoácidos que ocupan una determinada posición en una columna. Pueden realizarse varios alineamientos para un mismo grupo de secuencias, sin embargo, cada uno de estos alineamientos tiene un valor que es proporcional a la similitud encontrada entre las secuencias y los gaps utilizados. Una simple ecuación es utilizada para determinar la contribución de los gaps: $F=a+b*(n-1)$ donde a es el gap inicial, b es el gap extendido, n es el número de posiciones que ocupa esa penalización. Para determinar el valor debido a la similitud o divergencia entre aminoácidos de diferentes secuencias se utilizan matrices de sustitución, usualmente las más empleadas son PAM (75) y BLOSUM (76) para proteínas. La ecuación que utilizan estas matrices es:

$$s(i, j) = s(j, i) = \log \frac{q_{ij}}{p_i * p_j} \quad 1$$

Donde:

q_{ij} : Probabilidad de encontrar aminoácidos i y aminoácidos j alineados exactamente en un alineamiento o secuencias de proteínas relacionadas evolutivamente.

p_i : Proporción de aminoácidos i en proteínas que es la probabilidad de encontrar al aminoácido i aleatoriamente en esa posición.

$p_i * p_j$: Probabilidad de encontrar el aminoácido i y j alineados aleatoriamente (77).

Por lo tanto $s(i, j)$ es un valor que indica la probabilidad de encontrar alineados los aminoácidos i y j y que está directamente relacionado con criterios evolutivos.

3.1.1.2 Diferencias entre PAM y BLOSUM

PAM es una matriz que se calcula mediante el cálculo de las diferencias en las proteínas estrechamente relacionadas. BLOSUM es una matriz calculada a partir de alineamientos de proteínas evolutivamente divergentes (78).

3.1.2 Metodología desarrollada para el alineamiento de las proteínas citocinas y quimiocinas

Se incluyó en el estudio un grupo de 380 proteínas obtenidas de la base de datos PDB (Protein Data Bank) con estructura determinada por difracción de rayos X o por RMN. De éstas, se escogieron las proteínas provenientes de *Homo sapiens* y cuya expresión se hubiera realizado en *Escherichia coli* para evitar que la estructura tuviera cambios post-traduccionales y cuyo peso molecular fuera menor a 180 kDa, por lo que al final se trabajó con un total de 44 proteínas (Anexo 8) entre citocinas y quimiocinas. El alineamiento múltiple se realizó en CLUSTALX (79; 80) con una matriz BLOSUM, debido a que las proteínas trabajadas tienen una alta divergencia, aunque pertenecen a la misma familia. El resultado obtenido se muestra en la Anexo 1, donde se muestra que el alineamiento agrupa zonas de estructura secundaria además de secuencias de aminoácidos.

3.2 Análisis del clúster.

Uno de los primeros pasos en el análisis de secuencias de aminoácidos es la determinación de una matriz de distancias entre todos los pares de secuencias. Esta matriz de distancias nos provee una medida de la divergencia y similitud entre secuencias. Como resultado, si la secuencia presenta alguna asociación con otras, la matriz de distancias podrá ser representaremos en un dendograma.

La sustitución de aminoácidos en una secuencia es usualmente modelada como un evento aleatorio para no asumir una preferencia de un cambio a otro. En consecuencia, un requisito importante para la determinación de la matriz de distancias es una especificación *a priori* de un modelo de sustitución, el cual provee una descripción de este proceso estocástico.

3.2.1 Distancia observada.

La medida más básica de la divergencia entre dos secuencias es el número de sitios donde éstas difieren. Esta medida es llamada distancia observada (distancia p), expresada como el número de aminoácidos diferentes por sitio (81). Desafortunadamente, distancia p desestima la verdadera matriz de distancias, debido a que asume que dos o más situaciones divergen completamente, sin tener en cuenta variantes que no afectan las propiedades fisicoquímicas y evolutivas de la proteína. Por lo tanto, la matriz de distancias no puede ser determinada directamente. Técnicas estadísticas en los métodos de sustitución son incluidas para inferir en la determinación de la matriz de distancias.

3.2.2 Modelos de sustitución

La mayoría de los métodos usados para un análisis de tipo clúster de secuencias de aminoácidos están basadas en modelos de evolución, entre ellos se encuentra PAM, BLOSUM62, WAG (82). Estos modelos requieren de matrices, las cuales representan la relativa velocidad de sustitución de aminoácidos en sitios homólogos de una proteína.

Modelos como PAM utilizan proteínas con secuencias de una familia ancestral, BLOSUM62 utiliza secuencias divergentes. La forma de calcular la matriz está basada en un conteo de diferencias que puede llevar a ciertos errores de criterio, debido a que se asume que un cambio en un aminoácido da lugar a una nueva brecha de un dendograma. Esto puede llevar a la subestimación del verdadero número de sustituciones entre cada rama del dendograma, lo que puede considerarse un error sistemático en el modelo. WAG combina este modelo con un modelo de sustitución que involucra un proceso estocástico, permitiendo la estimación de un dendograma mucho más real.

3.2.3 Modelo WAG

El modelo WAG es un modelo empírico de comparación de secuencias, donde los coeficientes de probabilidad son constantes, En particular, éste modelo utiliza un proceso de Markov concebido como estocástico y homogéneo ajustándose al fundamento general de este modelo, donde la frecuencia de cambio de aminoácidos es constante a través del tiempo. La calidad del modelo

es evaluado con el logaritmo de la probabilidad de los eventos. La estimación del árbol se realizó por el método NJ (Neighbor-Joining) (83), basado en una métrica euclidiana.

3.2.4 Metodología desarrollada para el dendograma de las proteínas analizadas.

El árbol filogenético se obtuvo usando el método NJ a partir de los modelos de sustitución BLOSUM62 y WAG, con los que se midieron las distancias. La robustez de los dendogramas obtenidos se comprobó mediante el procedimiento de Bootstrap (84) con 100 repeticiones. Los árboles se compararon con TOPD/ftMs (85), encontrando un árbol consenso mostrado en la **figura 7**.

El dendograma de la **figura 7** muestra 5 grupos (G1-G5), cada uno de ellos con alta similitud en estructura, como se muestra en la **figura 8**, excepto para el G3 constituido por las citocinas [2QE3, 1IRP, 2AZ5] que muestran similitud en secuencia pero no en estructura terciaria. El **G2**: [2CR3, 3BMP, 2R52, 2JYE, 1G26] constituido por citocinas con variadas funciones fisiológicas como inmunoglobulinas, proteínas morfogenéticas, etc. mantienen estructura terciaria similar. **G4**: [1O7Y, 1NAP, 1F9R] son quimiocinas con clasificación CXC, y **G5**: [1F2L, 1NR2, 1NCV, 1RA4, 1DOK] quimiocinas con clasificación CC.

El grupo externo G1: [1K01] se aleja considerablemente de la estructura terciaria de los demás grupos, lo que permite discernir algunos aspectos importantes. La estructura terciaria de las quimiocinas es común entre ellas y consiste de un N-terminal con un asa seguido del motivo CXC, CC o C(X)₃C, posteriormente, se encuentran tres hojas beta antiparalelas en llave griega y un C-terminal en forma de α -hélice. El 1K01 se distingue por la conformación del corazón hidrofóbico, el cual tiene un Trp56 altamente conservado en el grupo de las CC y en las citocinas como la IL-8. En el 1K01 el Trp56 hace contactos tipo Overhauser con residuos de la hélice 3_{10} (Arg 20, Val 23) y con el N-terminal con la Val 18. En contraste, en las quimiocinas del grupo G5 el Trp56 se orienta completamente hacia el N-terminal. Esta diferencia en el corazón hidrofóbico hace que la α -hélice del C-terminal este orientado completamente diferente a las otras quimiocinas (Figura 8).

Otra característica es que el 1K01 es una proteína muy básica, ya que el 21% del total de los residuos son argininas, lisinas e histidinas. El análisis de potencial electrostático muestra algunas diferencias con el G4, el 1K01 concentra su carga positiva en el N-terminal y sus cargas negativas en el C-terminal. En el G4 el C-terminal es positivo y el N-terminal negativo, y en el G5 este no presenta una acumulación de carga significativa ni en el C-terminal ni N-terminal.

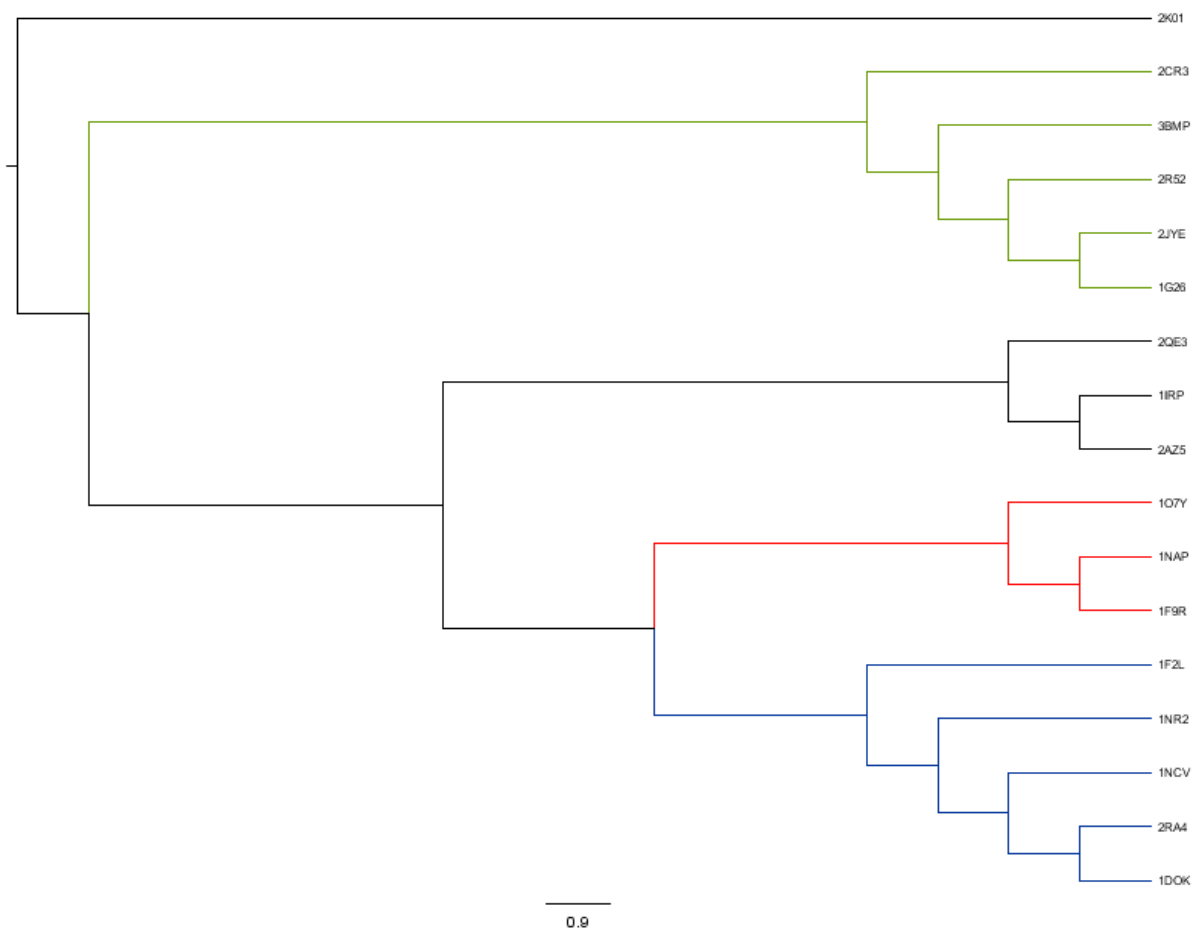


Figura 7. Dendrograma final obtenido describe la relación de secuencia que tienen los grupos de proteínas: **G1:**[2K01] (negro), **G2:**[2CR3,3BMP,2R52,2JYE,1G26] (verde), **G3:**[2QE3,1IRP,2AZ5] (negro), **G4:**[1O7Y, 1NAP,1F9R] (rojo), **G5:**[1F2L,1NR2,1NCV,1RA4,1DOK] (azul).

3.3 Determinación del péptido antimicrobiano candidato teniendo con base a los resultados del análisis clúster y propiedades fisicoquímicas determinadas por procedimientos de bioinformática.

La toxicidad de los péptidos antimicrobianos vs las células eucariotas es el principal obstáculo para una aplicación clínica. El uso del ensayo de actividad hemolítica es una prueba común para evaluar esta toxicidad (43). El potencial clínico de un péptido está dado por la razón entre la actividad hemolítica (AH) y la actividad antimicrobiana (AM). La AH y AM están relacionados por múltiples parámetros fisicoquímicos anteriormente mencionados. A continuación en el análisis del cluster mostramos los motivos para descartar algunas de las proteínas encontradas.

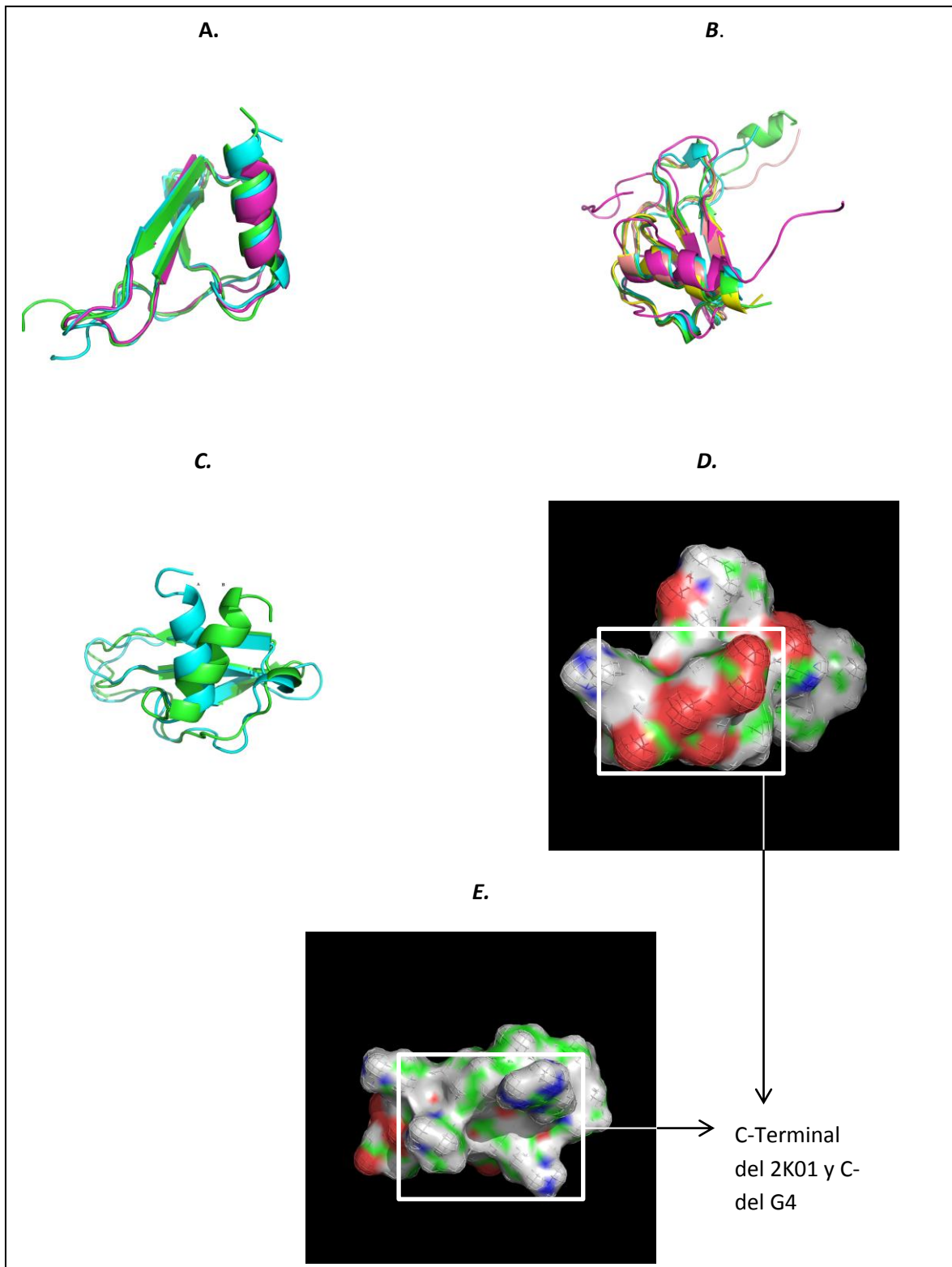


Figura 8. Sobreposiciones y densidades de los diferentes grupos. **A.** Alineamiento de la estructuras del grupo G4, **B.** Alineamiento del grupo G5, **C.** Comparación de G1 y G4. **D.** Densidad de carga de 1K01(CXCR4), predominan las cargas negativas en color rojo, **E.** Densidad de Carga para una quimiocina normal, predomina cargas positivas en el C-terminal

3.3.1 Proteínas que contengan en su estructura alfa-hélice, como parámetro de selección del péptido antimicrobiano.

La selectividad de un PA por agentes infecciosos es una característica fundamental en el desarrollo de PAs y depende de varios parámetros. Por ejemplo, la estructura secundaria que adoptan en interacción con la membrana es uno de ellos. Esto permite dividir a los PAs en dos grandes grupos, PAs-beta y PAs-alfa (hojas beta, alfa-hélice).

Los péptidos de tipo beta tienden a agregarse, generando dos tipos de superficies, una polar y otra no polar, lo que dificulta su inserción en la membrana. Recientemente, se han publicado algunos trabajos que exploran este tema usando RMN para determinar la estructura topológica de interacción lípido-péptido (37). Basados en la distancia y la movilidad del péptido proponen el siguiente mecanismo explicando su acción antimicrobiana: primero hay una oligomerización hacia hojas beta, posteriormente, se inserta parcialmente en las cadenas de POPC/POPG (simulando la membrana de una bacteria) con un ángulo cercano a los 55 grados (46), causando una expansión lateral, desestabilizando la membrana en un mecanismo muy parecido al de tipo carpeta (**Figura 4**).

Un nuevo modelo ha sido planteado, donde se profundiza el estudio de la interacción péptido-lípido. Estos datos apoyan con firmeza la formación de un poro acuoso formado por un dímero del péptido dentro de la fase hidrofóbica y dirigiendo a las argininas hacia el centro del poro (86). El péptido arenicina-1 y un análogo (de tipo beta) han sido probados como fungicidas con gran éxito y siendo superiores a PAs de alfa-hélice ya reportados, como la melitina (43).

Todos estos trabajos muestran la eficiencia de los PAs-beta y los diferentes modos de acción y beneficios del aumento de las argininas en la inserción del péptido y estabilidad del poro formado en la membrana (87). Sin embargo, este tipo de resultados no relaciona la actividad antimicrobiana con la hemolítica, que es fundamental en el desarrollo de un buen PA, el cual elimine a los agentes invasores pero mantenga intacta la integridad de las células que no son el blanco a atacar. Trabajos que demuestran una mayor selectividad de los PAs-beta están basados en estudios de difracción circular en solución, cuya estructura secundaria no está estabilizada (88).

La hélice alfa es un motivo estructural importante en las proteínas y péptidos antimicrobianos en la naturaleza. Los solventes orgánicos promueven la formación de alfa-hélices en péptidos que tienen tendencia a adquirir este motivo (89). Las interacciones del péptido con las cabezas de los fosfolípidos promueven la periodicidad entre los residuos cargados del péptido, promoviendo la formación de las alfa-hélices. Estos cambios de configuración permiten variar los momentos hidrofóbicos y ángulos polares. PAs-alfa como la cecropina, muestran que la conformación de alfa-hélice es proporcionalmente dependiente de la cantidad de fosfolípidos cargados negativamente (89; 90). Este tipo de péptidos muestran propensión a tener una estructura secundaria de tipo α -hélice inter-

actuando con TFE (Trifluoroetanol) o vesículas sintéticas que simulan la membrana citoplasmática (57; 91).

Debido a las características mencionadas, buscamos proteínas que contengan un dominio de alfa-hélice dentro de su estructura secundaria (**Figura 9**), ya que este motivo permite discernir otras propiedades fisicoquímicas, como ángulo polar, momento hidrofóbico, etc. Otra característica que hace deseable la selección de proteínas con dominios alfa hélices, es que las quimiocinas y citocinas utilizan el dominio alfa-hélice como sitio fijador en la membrana. En la **tabla 1** se muestra las proteínas que después de esta primera selección continuaron siendo evaluadas.

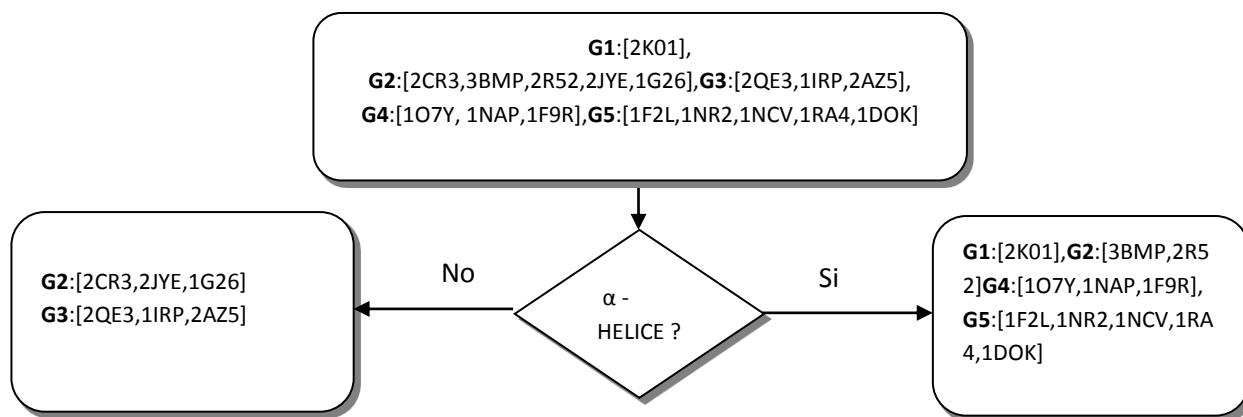


Figura 9 Diagrama de flujo que muestra el criterio de selección del péptido: Contiene motivos alfa- hélices en la estructura secundaria de las proteínas relacionadas en el análisis clúster.

Proteína	Hojas-β	α-hélice	otros
2K01	X	X	
2CR3	X		
3BMP	X	X	
2R52	X	X	
2JYE	X		X
1G26	X		
2QE3	X		
1IRP	X		
2AZ5	X		
1O7Y	X		
1NAP	X	X	X
1F9R	X	X	X
1F2L	X	X	X
1NR2	X	X	X
1NVC	X	X	X
1RA4	X	X	X
1DOK	X	X	X

Tabla 1. Motivos estructurales predominantes en los diferentes grupos y las proteínas seleccionadas la determinación de % de alfa-hélice y hoja beta fue realizada en el programa ANTHE-PROT

Sólo dos proteínas de los grupos G2 y G3 del tipo/grupo de las citocinas, no fueron descartadas [3BMP, 2R52], la primera es una proteína involucrada en la morfogénesis de hueso (BMP) y

la segunda en factores de crecimiento y clasificada como citosina. Las BMP originalmente fueron clasificadas por su capacidad de inducir la formación de hueso y cartílago, ahora se considera que constituyen un grupo fundamental de señales morfogenéticas, orquestando la arquitectura de los tejidos en todo el cuerpo y se considera fundamental en procesos patológicos como el cáncer. Esto es importante porque en los procesos de señalización las interacciones membrana-proteína participan activamente.

Los grupos G1, G4, G5 pertenecen a las quimiocinas, estas proteínas tienen actividad antimicrobiana. Sin embargo, pocos estudios han explorado las relaciones entre su estructura y esta actividad. Investigaciones donde se modifica el C-terminal de la CCL28 por medio de mutagénesis puntual, ablaciones o inserciones de sitios específicos lo relacionan con la actividad antimicrobiana (92). Adicionalmente, los cambios en secuencia están dirigidos a aumentar la carga positiva del C-terminal. Los resultados demuestran que la región del C-terminal de las quimiocinas es esencial en la actividad antimicrobiana, además de que se observó, que esta actividad no depende de las cisteínas (38).

La actividad del C-terminal de quimiocinas como PAs ha sido bien documentada. Trabajos con CCL20/MIP-3 α (69), TC-1 (93), NAP-2 (94) muestran una alta actividad del C-terminal (92). Todos estos péptidos muestran una alfa-hélice pero poco estable en solventes polares y no polares. No obstante, esta inestabilidad puede conducir a que la conformación activa del péptido está lejos de ser un alfa-hélice, debido al ambiente membranal.

3.3.2 Péptidos con estructura alfa hélice

Después de analizar las secuencias, las estructuras tridimensionales y las propiedades de las proteínas seleccionadas, el motivo alfa-hélice fue escogido como punto de partida en el análisis. El procedimiento general consistió en extraer la secuencia donde se encontraba el motivo alfa-hélice en cada una de las proteínas del dendograma final. En la **tabla 2** se muestran las secuencias escogidas de cada proteína, estos segmentos serán nombrados con el nombre de su proteína modelo y anteponiendo la letra C. Las regiones de alfa-hélice encontradas en estas proteínas fluctúan de 11 a 15 aminoácidos.

3.3.3 Tamaño.

Se consideraron los siguientes puntos: el mínimo de aminoácidos requeridos por vuelta en un alfa-hélice está entre tres y cuatro. Ocho son los aminoácidos para la formación de caras anfipáticas y 19 para atravesar la bicapa. Los péptidos de la **tabla 2** tienen la capacidad de formar alfa-

hélices debido a su procedencia (sección 3.32), tendrán momento hidrofóbico, pero por su tamaño no podrán atravesar la membrana celular.

No hay una relación directa entre tamaño y actividad antimicrobiana, un ejemplo de esto es el C-terminal de la melitina (15 aminoácidos) que tiene una actividad antimicrobiana 6 veces mayor y 300 veces menor en actividad hemolítica que con respecto la melitina de 30 aminoácidos (94). El péptido HP-A3 con 15 aminoácidos muestra una menor actividad antimicrobiana sin hemólisis que el HP-A3 original de 27 aminoácidos (43). Lo anterior demuestra que este parámetro no descarta ningún péptido de los reportados en la **tabla 2**.

Tabla 2 Secuencias de los C-terminales de las quimiocinas analizadas.

Péptido	Secuencia
G1 C2K01	- - - W I Q E Y L E K C L N K -
G2 C2R52	T N H A I V Q T L V H L M N
C3BMP	T N H A I V Q T L V N S - -
G3 C1F9R	- A P L Y K K I I K K L L E S -
C1NAP	- A P R I K K I V Q K K L A G D
C1O7Z	E S K A I K N L L K A V S - - -
G4 C1DOK	Q K W V Q D S M D H L D K Q -
C1NCV	Q K W V Q D F M K H L D K K -
C2RA4	- K W V Q N Y M K H L G - - -
C1F2L	- - W V K D A M Q H L D R Q -
C1NR2	- - R V K N A V K Y L Q S L E

3.3.4 *Punto isoeléctrico y carga neta.*

En general, es aceptado que la interacción de los PAs y la membrana dependen de las fuerzas electrostáticas. Pero una correlación entre la carga y la actividad biológica no es clara, debido a que alteraciones en esta propiedad afectan directamente a otras propiedades. Trabajos en la disminución de carga positiva del péptido V13K de 26 aminoácidos por adición de cargas negativas demuestra que el número de cargas positivas toma un papel importante en la actividad antimicrobiana y hemolítica (95). Las observaciones más importantes son que hay un incremento en la actividad hemolítica a cargas positivas mayores a 7. La actividad antimicrobiana y hemolítica desaparece a cargas netas menores a 4. Otros trabajos que se enfocan en esta característica difieren en los valores pero que cualitativamente son similares, donde a cargas mayores a 4 presentan actividad hemolítica y antimicrobiana y menores a este solo actividad antimicrobiana (14).

La explicación de este tipo de comportamientos yace en la carga de las membranas. Por ejemplo, las membranas de bacterias contienen fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y cardiolopina, confiriendo la carga negativa. Además, lipopolisacáridos, ácidos teicóicos dan una carga negativa adicional tanto en bacterias Gram negativas y Gram positivas, aumentando en un 50% la diferencia potencial al compararlas con la membrana de mamíferos.

Células humanas, como los eritrocitos, tienen membranas enriquecidas con fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomelina. En comparación con las membranas de bacterias las de mamíferos tienen mucha menor proporción de PE pero mayor SM.

Un aumento en la carga neta del péptido asegura al péptido a la cara exoplasmática de la membrana y no entra en el núcleo de la membrana. En membranas de mamífero, que son de carácter neutro, el efecto electrostático es tan fuerte que la desestabiliza, aumentando la actividad hemolítica.

Por lo anterior, buscamos péptidos con carga neta positiva. La determinación de esta propiedad y punto isoeléctrico se realizó por medio de la ecuación 2 y los resultados se muestran en la **tabla 3**. Los péptidos descartados son C2K01, 2R52, 3BMP, C1DOK, C1F2L debido a que no muestran carga neta positiva a un pH 7.0.

pK_{a_j} D:3.86,E:4.25,C:8.33,Y:10.07 P $_{kai}$ R:12.48,K:10.53,H:6.00	$CN: \sum N_i \left(1 - \frac{10^{-pK_{ai}}}{10^{-pH} + 10^{-pK_{ai}}} \right) - \sum N_j \left(1 - \frac{10^{-pK_{aj}}}{10^{-pH} + 10^{-pK_{aj}}} \right). \quad (2)$
--	--

Tabla 3. Secuencia, carga neta y punto isoeléctrico determinados con la ecuación 2. En rojo los péptidos descartados.

	Péptido	Secuencia	pI	Carga Neta*
G1	C2K01	- - - W I Q E Y L E K C L N K -	6.43	0.00
G2	2R52	T N H A I V Q T L V H L M N	7.98	0.00
	3BMP	T N H A I V Q T L V N S - -	7.83	0.00
G3	C1F9R	- A P L Y K K I I K K L L E S -	10.33	3.00
	C1NAP	- A P R I K K I V Q K K L A G D	11.02	4.00
	C1O7Z	E S K A I K N L L K A V S - - -	10.33	2.00
G4	C1DOK	Q K W V Q D S M D H L D K Q -	5.17	-1.00
	C1NCV	Q K W V Q D F M K H L D K K -	10.19	2.00
	C2RA4	- K W V Q N Y M K H L G - - -	10.25	2.00
	C1F2L	- - W V K D A M Q H L D R Q -	7.80	0.00
	C1NR2	- - R V K N A V K Y L Q S L E	10.20	2.00

* Determinada a pH: 7.0

3.3.5 Helicidad

La helicidad es esencial en la acción frente a membranas ricas en lípidos neutros pero no es muy importante en membranas negativas (96). El problema de determinar la estructura de péptidos enlazados a lípidos es la principal limitación en el estudio de esta propiedad. En este trabajo el criterio de selección está basado en trabajos enfocados en la determinación de la estructura secundaria de los C-terminales de quimiocinas por interacción con vesículas sintéticas donde calculan la helicidad por el software AGADIR y por RMN. La determinación de helicidad por bioinformática en solvente acuoso y la determinada por RMN relacionadas con la actividad, muestran que a mayor helicidad y carga neta mayor a 2 se tiene una alta actividad antimicrobiana y hemolítica. Menores valores de helicidad y carga mayor de 2, no hay actividad hemolítica y sí actividad antimicrobiana (20).

El valor de esta propiedad se realizó con el software *AGADIR* (97; 98), a fuerzas iónicas de 0.0 y 0.35. Los valores obtenidos se muestran en la **tabla 4**.

Los valores de helicidad deben ser acompañados de otras medidas para ser un parámetro de selección, por esto no utilizamos esta propiedad para eliminar candidatos, pero si como propiedad de apoyo en el análisis final.

Tabla 4. Secuencia, y valor de la helicidad a diferentes puntos isoeléctricos PI: 0.0 y PI: 0.35 y T:310 K

Péptido	Secuencia	Helicidad	Helicidad
		% (PI:0.0)	% (PI:0.35)
G3	C1F9R - A P L Y K K I I K K L L E S -	0.12	0.64
	C1NAP - A P R I K K I V Q K K L A G D	0.12	0.53
	C1O7Z E S K A I K N L L K A V S - - -	0.71	1.42
G4	C1NCV Q K W V Q D F M K H L D K K -	0.31	0.34
	C2RA4 - K W V Q N Y M K H L G - - -	0.07	0.14
	C1NR2 - - R V K N A V K Y L Q S L E	0.04	0.22

3.3.6 Hidrofobicidad y momento hidrofóbico.

La anfipaticidad refleja la abundancia relativa y la polarización de residuos o dominios hidrofóbicos. Esta característica cualitativa es fundamental en la actividad de un PA y su movilidad en la membrana. Una medida cuantitativa de la anfipaticidad es el momento hidrofóbico (μ), calculado como una suma vectorial de la hidrofobicidad individual normalizada a una alfa-hélice ideal. Estudios demuestran que incrementos en el momento hidrofóbico de un péptido aumentan significativamente la permeabilización y la actividad antimicrobiana (99).

Existe una ventana óptima de hidrofobicidad (π) en la cual una alta actividad antimicrobiana puede ser alcanzada. La disminución o aumento fuera de esta ventana inhiben fuertemente esta actividad y altas hidrofobicidades correlacionan con fuerte actividad hemolítica. Esto puede explicarse por la fuerte auto-asociación entre péptidos, lo que disminuye la actividad.

De acuerdo a estos comportamientos experimentales debemos tener un péptido con baja hidrofobicidad para evitar actividad hemolítica y alto momento hidrofóbico permitiendo así la permeabilización de la membrana. En la **tabla 5** se muestra los datos bioinformáticos del momento hidrofóbico y el valor medio de la hidrofobicidad utilizando la escala de hidropatía Eisenberg (51) para los péptidos seleccionados. Los datos demuestran que la hidrofobicidad es muy baja y los momentos tienden a ser constantes. Se presenta la relación $T: |\mu/ H|$, a valores grandes de T significa mayor hidrofobicidad y mayor tendencia a penetrar la membrana y a valores pequeños se reduce la auto-asociación.

Uno de los objetivos de este trabajo consiste en seleccionar un péptido antimicrobiano con aplicabilidad clínica, por esto después de toda esta serie de análisis concluimos que el péptido C1F9R que será nombrado 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ posee esas características. Tiene un valor T alto, un aumento sustancial de la helicidad en función del aumento de la fuerza iónica fundamental en la actividad antimicrobiana, con carga neta positiva y no muy alta, descartando la fijación del péptido en la región exoplásmica de la membrana de bacterias y hongos. Un tamaño inferior a 19 aminoácidos asegura que el péptido pueda atravesar la membrana.

Tabla 5 Datos determinados Momento Hidrofóbico e Hidrofobicidad y su relación por T.

<u>Péptido</u>	Momento Hidrofóbico	Hidrofobicidad Promedio	Relación
	μ	H	T: $ \mu/ H $
C1F9R	0.34	-0.14	2.43
C1O7Z	0.36	-0.17	2.12
C2RA4	0.38	-0.18	2.11
C1NCV	0.36	-0.35	1.03
C1NR2	0.26	-0.28	0.93
C1NAP	0.20	-0.29	0.69

3.3.7 Características generales e importancia del 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰

El C-terminal de la mutante de quimiocina CXCL14 (1F9R) es nuestro péptido candidato, esta quimiocina es proteína homotetramérica liberada por células α -granulocíticas. Está implicada en

diferentes procesos biológicos como coagulación, la adhesión de neutrófilos al endotelio y la inhibición de los megacariocitos y hematopoyesis, caracterizada además como una proteína angiostática (inhibición en el crecimiento de vasos sanguíneos).

Estudios de C-terminales del 1F9R-var⁴⁷⁻⁷⁰ y en 1F9R⁴⁷⁻⁷⁰ (que se diferencian en tres aminoácidos (**Figura 10**)), demuestran que la forma 1F9R-var⁴⁷⁻⁷⁰ es mucho más potente como angiostático y antitumoral. Estos cambios fueron una L por una P lo que aumento la hidrofobicidad, y LL por EH que disminuyo los efectos electrostáticos. Estos cambios aumentan el carácter hidrofóbico del péptido 1F9R-var⁴⁷⁻⁷⁰ desestabilizando la membrana de mamífero, que tiene carácter neutro, lo que ayuda a aumentar su capacidad antitumoral.

Aunque este péptido tiene 10 aminoácidos más que el seleccionado en este trabajo 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰, la interacción C-terminal membrana es esencial en entender el mecanismo real y antitumoral reportado ya que cambios en su estructura, generan comportamiento de alta divergencia. Las propiedades generales del 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ son resumidas en la **tabla 6** y en la **figura 10**.

Tabla 6 Propiedades del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰

Péptido	Momento	Hidrofobicidad	Relación	Carga Neta (pH 7)	Helicidad	
	Hidrofóbico μ	Promedio H	T: $ \mu/ H $			
Quimiocina (CXC) 1F9R ⁵⁷⁻⁷⁰	0.34	-0.14	2.43	10.3	3	0.64

3.4 Sección experimental de la actividad antimicrobiana y comportamiento estructural de 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰.

El C-terminal del polipéptido CXCL4/PF-4⁵⁷⁻⁷⁰ o 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ (APLYKKIIKKLLES) fue sintetizado por ANASPEC Inc. La purificación fue realizada por RP-HPLC usando una columna Hibar Purospher Star RP-18e 5mm (Merck). El péptido se eluyó desde un gradiente de 0.1%-60% de ácido trifluoroacético y se detectó a 220nm. La muestra se liofilizó por 36 horas. La masa molecular de 1645 Da se confirmó por MALDI-TOF mass spectrometry (MS; Bruker) (**Figura 11**). La muestra se disolvió en diferentes medios dependiendo del ensayo a realizar (Agua, TFE, M9, YPD)

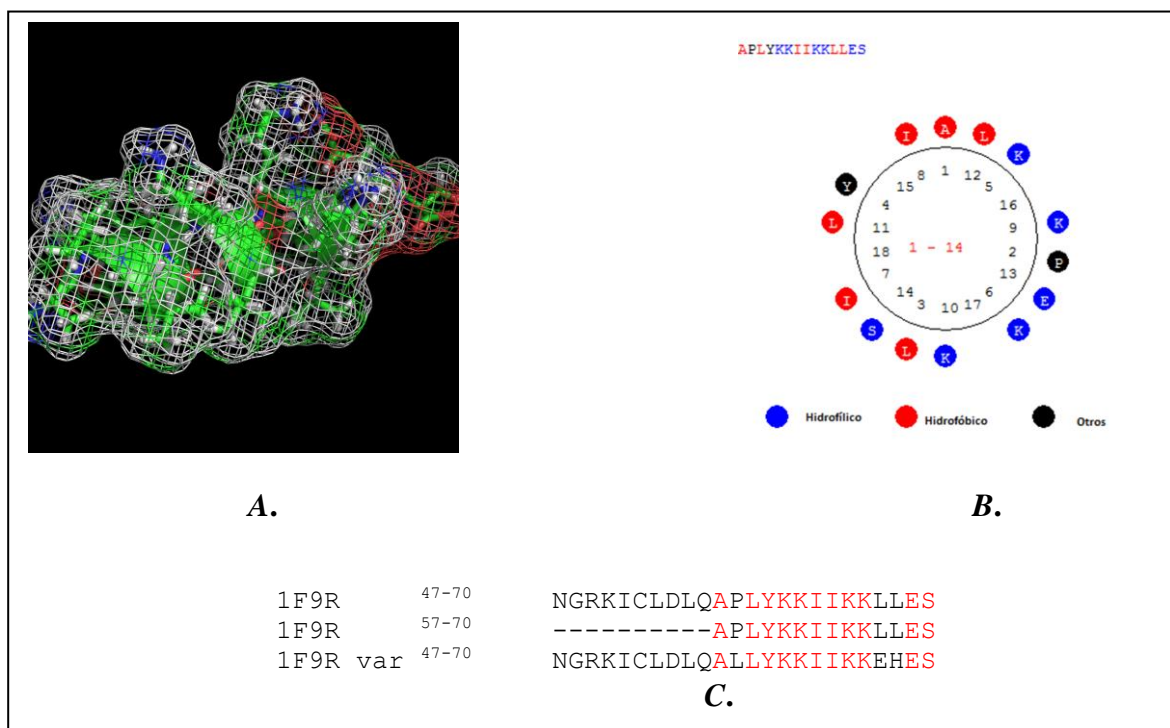


Figura 10. Características generales del péptido 1F9R. **A.** Densidad de carga de péptido **1F9R**⁵⁷⁻⁷⁰, **B.** Proyección de la estructura alfa-hélice que nos ayudó a identificar la dirección de las caras hidrofóbicas e hidrofílicas del péptido, **C.** Alineamiento de los péptidos 1F9R⁴⁷⁻⁷⁰, 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰, 1F9R-var⁴⁷⁻⁷⁰.

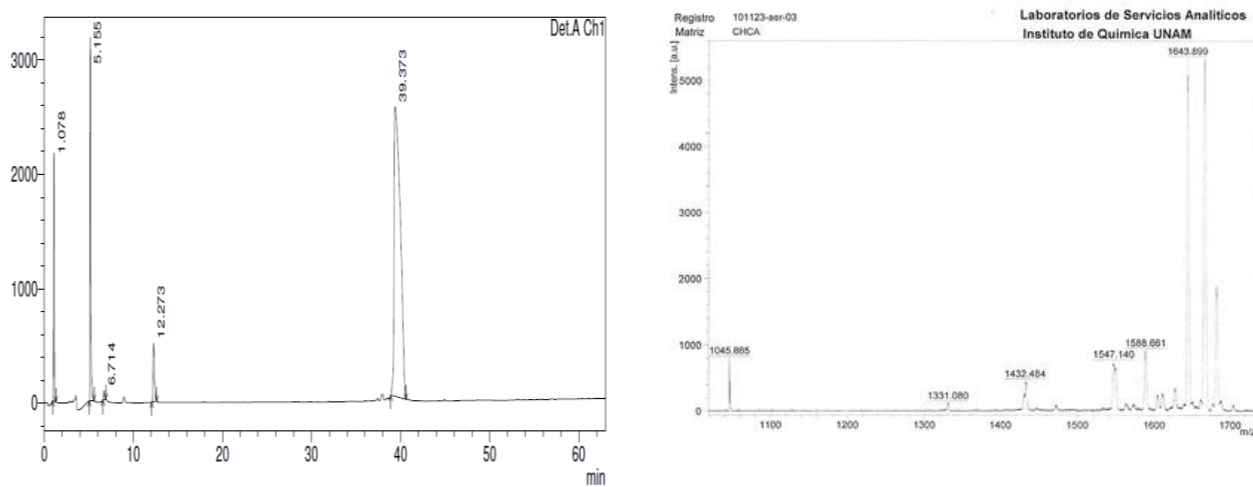


Figura 11. Purificación del péptido sintético CXCL4/PF-4 57-70 (APLYKKIHKLLLES). **A.** El péptido se recuperó de una columna RP-18e en un gradiente de acetonitrilo de (0.1%-60%) por 1 hora y se detectó a una longitud de 220 nm. Los picos obtenidos fueron liofilizados y llevados a MALDI-TOF. **B.** El espectro MS para el pico con un tiempo de retención de 39.37 min, con una masa de 1643.29 Da que se desvió en un 0.12% del valor teórico esperado 1645 (Da).

3.4.1 Dicroísmo circular

La técnica de dicroísmo circular es utilizada para medir la actividad óptica de las moléculas asimétricas en solución, como proteínas y ácidos nucleicos. Se ha convertido en una técnica estándar para determinar el contenido de la estructura secundaria de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos. También, se puede medir la estabilidad termodinámica de las proteínas en solución en función a la temperatura, pH y agentes desnaturizantes.

Las bandas de dicroísmo circular en proteínas y péptidos ocurren en el siguiente espectro: la región de 250 a 300nm se origina a partir de los residuos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano). Estas dos regiones del espectro presentan diferentes clases de información acerca de la estructura secundaria de la proteína: estructura alfa-hélice, estructura hoja-beta y estructura al azar (100).

En la **figura 12** se pueden observar los espectros de dicroísmo circular para los diferentes tipos de estructuras secundarias.

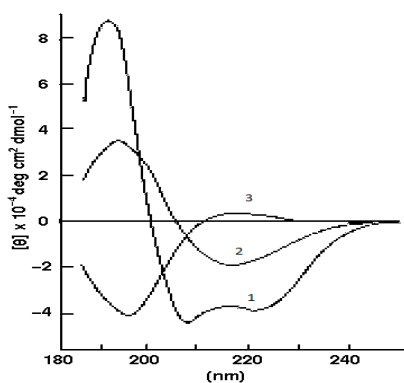


Figura 12. Espectro de dicroísmo circular con las diferentes conformaciones para tres proteínas diferentes: 1. Estructura alfa-hélice α , 2. Estructura beta β , 3. Estructura al azar

Mediante el dicroísmo circular se evaluó la conformación en solución acuosa y otros medios previos a los ensayos microbiológicos. La estructura secundaria del péptido y su tendencia a generar alfa-hélices o beta plegadas dependen del medio en que se encuentre. Los estudios de dicroísmo circular se realizaron en la región de (180-260 nm), con un barrido de 10 nm/min, un ancho de banda de 1 nm, 0.5 nm de resolución. 5 barridos se llevaron a cabo, se acumularon y se promediaron para cada muestra. Una concentración de 0.3 mg/mL (18 μ M) del péptido se usó en agua y en diferentes solventes (M9, agua/TFE). El aumento en la concentración de TFE de 0 a 60% v/v se hizo en incrementos de 10%. La elipticidad molar es medida en $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, calculada usando

la fórmula: $[\theta] = [\theta_{obs}] / 10lcd$. Donde (θ_{obs}) es la elipticidad observada en milideg, l es el número de residuos, c es la concentración molar del péptido y por último d es el ancho de la celda (37). La composición de elementos de estructura secundaria es analizada usando un software basado en redes neuronales CDNN versión 2.1 (101) que utiliza un conjunto de 13 proteínas simples y un conjunto de 33 proteínas complejas.

3.4.1.1 Resultados

El péptido en solución acuosa no tiene una conformación específica, de acuerdo a lo predicho por el software AGADIR. Sin embargo, cuando hay un aumento del co-solvente TFE, el porcentaje de alfa-hélice aumenta. Esto indica que el péptido tiene una tendencia general a la formación de esta estructura secundaria con diferentes estados intermedios (**Figura 13**) (**Tabla 7**). Recientemente algunos estudios demuestran que el TFE puede inferir en la tendencia general de péptido a una conformación. Sin embargo, las velocidades de plegamiento difieren de las reportadas. Esto se atribuye a que el debilitamiento de interacciones hidrofóbicas por el TFE es más rápido que otros medios y se pueden alcanzar conformaciones trampa sobre la trayectoria de plegamiento. Aplicado a nuestros sistemas indica que el péptido tiene una tendencia a la formación de alfa-hélice, pero no podemos decir que su trayectoria de plegamiento tenga estados con mayor o menor helicidad.

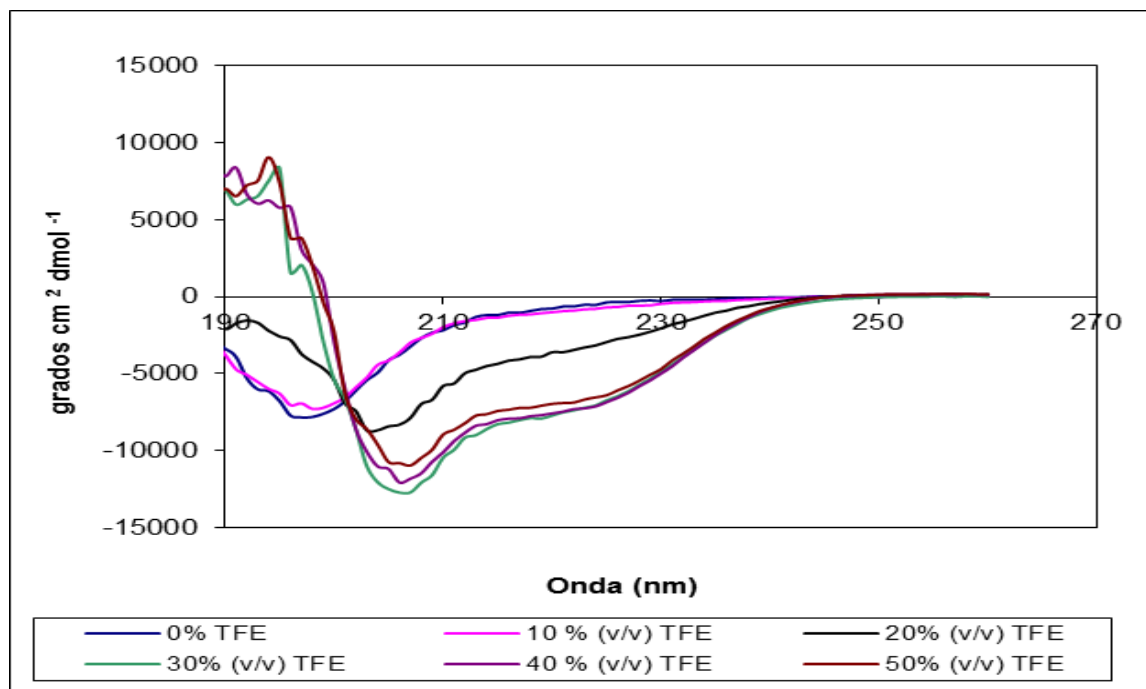


Figura 13. Efecto del aumento de la concentración de TFE en el contenido de estructura secundaria del péptido. La concentración inicial del péptido fue de 0.300 mg/mL 1F9R 57-70 a 310 K pH 7.0.

Tabla 7 Porcentaje de alfa-hélice determinado para cada solución de TFE por CDNN

Porcentaje de TFE v/v ± 0.1	Porcentaje de Alfa-Hélice
0.0	2.6
10.0	7.5
20.0	13.8
30.0	84.8
40.0	85.3
50.0	86.7

Cuando el péptido se solubilizo en medio mínimo de cultivo bacteriano (M9) conformado por sales como (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO_4 , H_2O disueltos en un litro) adquirió una conformación de alfa-hélice (**Figura 14**), este comportamiento no había sido reportado para medios de cultivo. Una posible explicación pueden ser planteada para este comportamiento: una simple segregación de los péptidos que genera una pseudofase donde interacciones hidrofóbicas permiten su plegamiento.

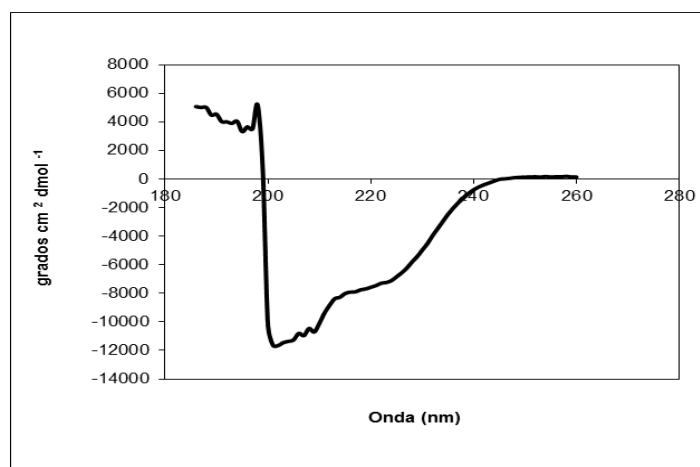


Figura 14 Dicroísmo circular del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ en medio M9.

3.4.2 Curvas de crecimiento y ensayo microbiológico¹

Crecimiento de *Escherichia coli*. **HMS174 (DE3)**. Se inoculó la cepa en 100 mL de medio mínimo M9 (85 mM NaCl, 49 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 18 mM NH_4Cl , 0.80mM MgSO_4 y 0.4 % w/v glucosa). El cultivo se colocó en agitación a 200 rpm y 37° C por toda la noche. 20 μL de cultivo se inocularon en una serie de diluciones de péptido en M9 desde 0.0 mg/mL hasta 0.8 mg/mL en un polypropilene mincontier plate (Costar, Cambrige) con un volumen total de 200

¹ Los datos de Curvas de Crecimiento están en el anexo 2

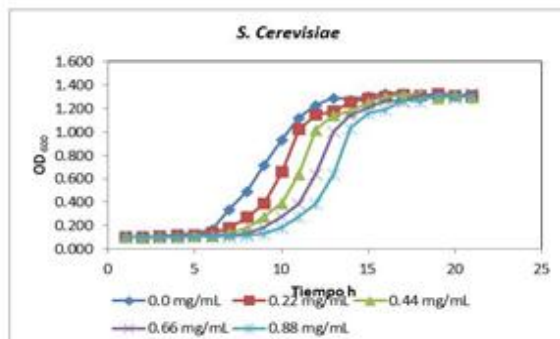
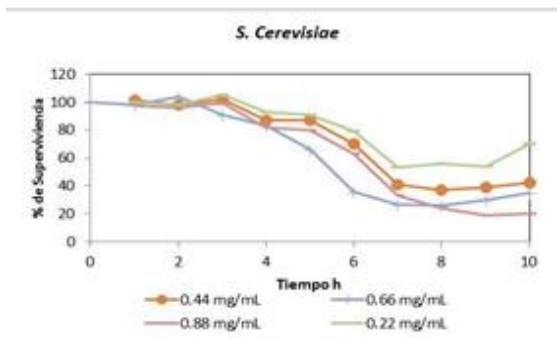
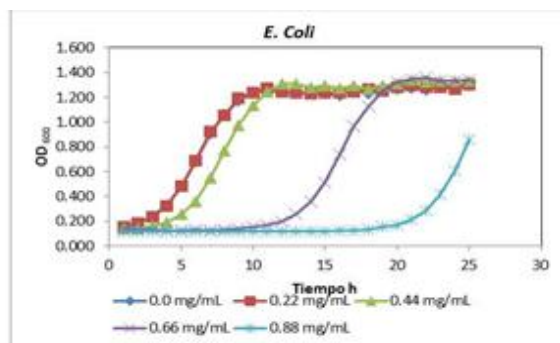
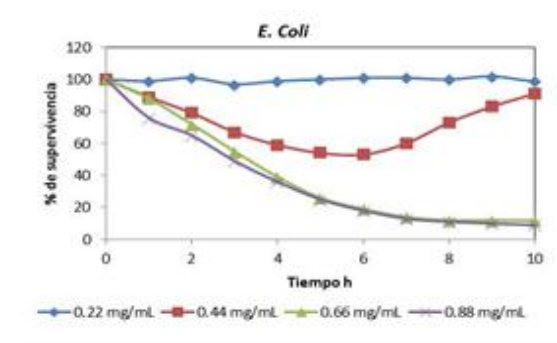
μL (asegurando que la densidad óptica $\text{OD}_{600\text{nm}}$ sea igual a 0.05 a tiempo t_0) y se incubaron a 37°C . Los valores de $\text{OD}_{600\text{nm}}$ fueron medidos cada 15 minutos por 24 horas en el instrumento BioScreenC Tipo FMPOOC. El experimento fue repetido por triplicado. Una muestra de $10 \mu\text{L}$ fue esparcida sobre agar Mueller Hinton (MH) a los 30 minutos de iniciada la curva de crecimiento. Las bacterias sobrevivientes fueron contadas como unidades formadoras de colonia units/mL a las 12 h.

Crecimiento *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida glabrata*: La metodología es igual que la anterior cambiando los medios de cultivo por YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa) con una incubación de 4 horas a 30°C y se contaron las levaduras sobrevivientes en YPD agar. Los resultados obtenidos fueron validados por prueba *t-student*.

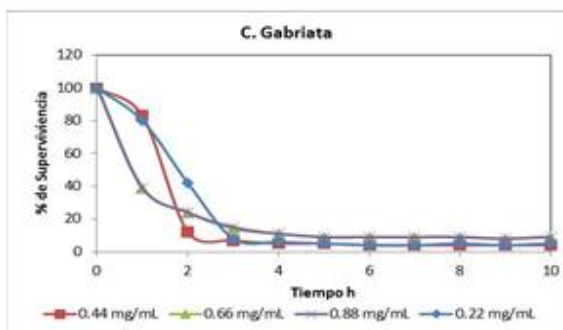
3.4.2.1 Resultados

Se comprobó el efecto antimicrobiano del 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ sobre bacterias y levaduras. La **Figura 15** muestra que el aumento de la concentración de péptido inhibe el crecimiento tanto de levaduras como de *E. coli*. Las curvas presentan además un aumento de colonias después de un respectivo tiempo, esto es debido al carácter bacteriostático del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ que tiende a ser bacteriostático para *E. coli* y *S. cerevisiae*, que coincide en la pruebas microbiológicas realizadas en agar sólido (**Figura 15**). Para *C. glabrata* es un agente antimicrobiano, esto es algo muy importante ya que ser estas levaduras infectan el tracto urogenital y el torrente sanguíneo, especialmente, en portadores de VIH y ancianos.

Porcentaje de Supervivencia



Porcentaje de Supervivencia



Curvas de Crecimiento

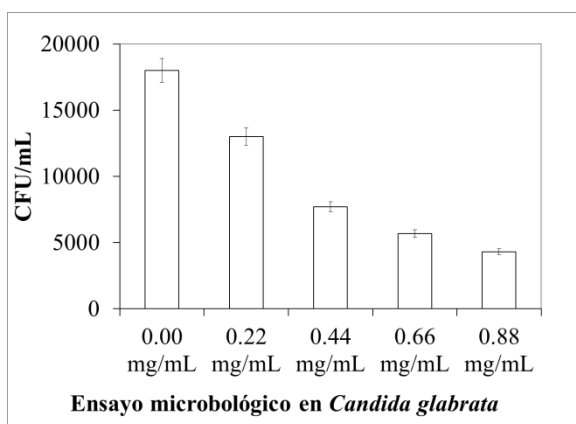
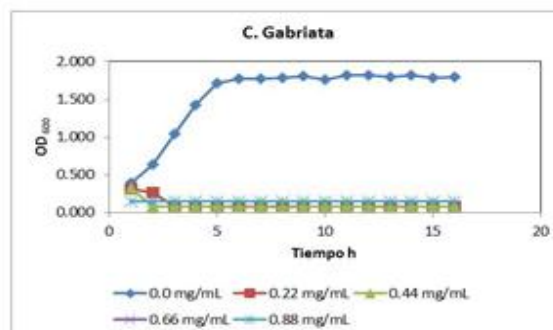


Figura 15. Curvas de Crecimiento y de porcentaje de supervivencia en función del tiempo. Actividad antimicrobiana del 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰, en *Candida glabrata*

3.4.3 Escape de Calceína²

Las vesículas grandes unilamelares (LUVs) están compuestas por una relación 2:3:1 de PC, PE y colesterol (Ch) (SIGMA), respectivamente, se usaron para simular las membranas de mamíferos (102; 103). El método de preparación de las LUVs fue por estrucción. Inicialmente se preparó una solución stock de los distintos fosfolípidos en cloroformo a una concentración de 10 mg/ml, tomamos 0.5 g de solución stock y la diluimos en más cloroformo, se evaporó en una corriente de nitrógeno por 2 horas eliminando todo el cloroformo, se hidrató en 3.5 ml de una solución que contenía 30 mM de calceína, 10 mM de buffer de fosfatos, 150 mM NaCl a pH 7.4. Después hay un periodo de incubación de 2 horas, en el cual hay ciclos de enfriamiento y calentamiento en continua agitación. Finalmente pasamos la muestra por un estructurador con un filtro de policarbonato de 0.22 μm por más de 10 veces. La calceína no atrapada fue separada por medio de una cromatografía de exclusión molecular sobre una columna Sephadex-G25. La presencia de LUV's fue determinada por microscopia de fluorescencia (**Figura 16**).

² Los datos de Fluorescencia se muestra en los Anexos 3

Los experimentos de concentración de calceína en el medio fueron llevados a cabo en un Biotek SynergyMx. La intensidad de fluorescencia se midió a 520 nm (excitación de 490nm). Una serie de concentraciones del péptido se colocaron en los pozos de un fluorímetro de microplacas con microtitulador (Costar, Cambridge). El máximo de fluorescencia se determinó destruyendo las vesículas con 10% de detergente Tritón X100 como control positivo. El control negativo estaba dado por una solución de vesículas sin péptido. El porcentaje de calceína en medio se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación,

$$\%L = 100 * \frac{F - F_o}{F_{max} - F_o} \quad (3)$$

Donde F_o es la fluorescencia intacta de la solución de vesículas, F y F_{max} son la fluorescencia observada y la obtenida al agregar Tritón X100. El experimento se monitoreó cada 45 segundos manteniendo la temperatura a 25°C por 30 minutos. La incertidumbre de la medida se encuentra entre el +/- 5% y las diferencias fueron analizadas por la prueba *t-student*.

3.4.3.1 Resultados

Los resultados muestran el porcentaje de calceína medido en función del tiempo (**Figura 17**). La acción del 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ a diferentes concentraciones (e iguales a las utilizadas en las curvas de crecimiento) no muestra ningún tipo de fuga de calceína al medio. Aunque existen valores cercanos al 15% de porcentaje de fluorescencia no indica que el péptido fuera el responsable ya que los controles sin péptido también alcanzan estos valores. Esto se explica en base a la estabilidad de las vesículas y condiciones de agitación.

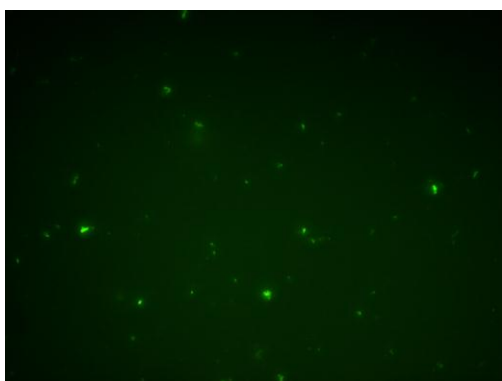


Figura 16. Fotografía de microscopía de fluorescencia de las LUV's en el medio constituidas por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y colesterol.

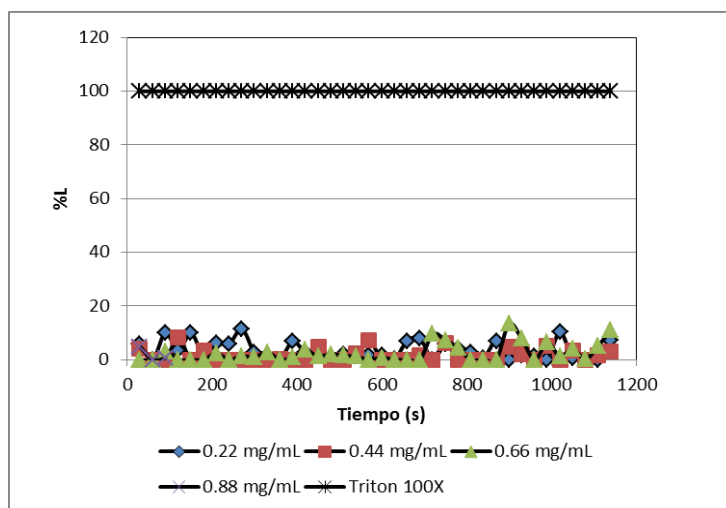


Figura 17 Porcentaje de fluorescencia por calceína en el medio obtenida por la interacción del péptido 1F9R 57-70 a diferentes concentraciones con LUV's constituidas por PC, PE y Ch.

3.4.4 Actividad hemolítica³

La actividad hemolítica se confirmó con células de sangre humana. La sangre es colectada en una solución anticoagulante de Alsever (glucosa 20.5 g/L, citrato de sodio x 2H₂O 8.0 g/L, ácido cítrico x 1 H₂O 0.55 g/L y cloruro de sodio 4.2 g) y se centrifugó a 2500 rpm a 4°C por 5 minutos, eliminando el sobrenadante y remplazándolo con 5 veces de solución de Alsever. Una serie de disoluciones del péptido se prepararon en solución de Alsever en una microplaca de polipropileno (Costar, Cambridge, USA) más 40 µL de la suspensión de eritrocitos y solución Alsever hasta un volumen máximo de 300 µL. Un pozo con agua milli-Q más eritrocito sin péptido es colocado como control positivo, y otro con solución Alsever y eritrocitos como control negativo. Las mezclas se incubaron a 37 C por 30 minutos y luego se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos. Las absorbancias del sobrenadante se midieron a 408 nm. La hemólisis está reportada en porcentaje de hemólisis, los experimentos se realizaron por triplicado y las diferencias se analizaron por la prueba *t-student*.

3.4.4.1 Resultados

El espectro de lisis completa (eritrocito más agua milli-Q) de los eritrocitos es mostrado en la **figura 18** encontrando un máximo en 408 nm, los demás posos fueron medidos a esa longitud encontrando que el péptido no tiene actividad hemolítica. Esto se explica puesto que su longitud no es mayor a 19 aminoácidos, tienen poco carácter hidrofóbico y baja helicidad debido al residuo prolina, como ya se argumentó anteriormente.

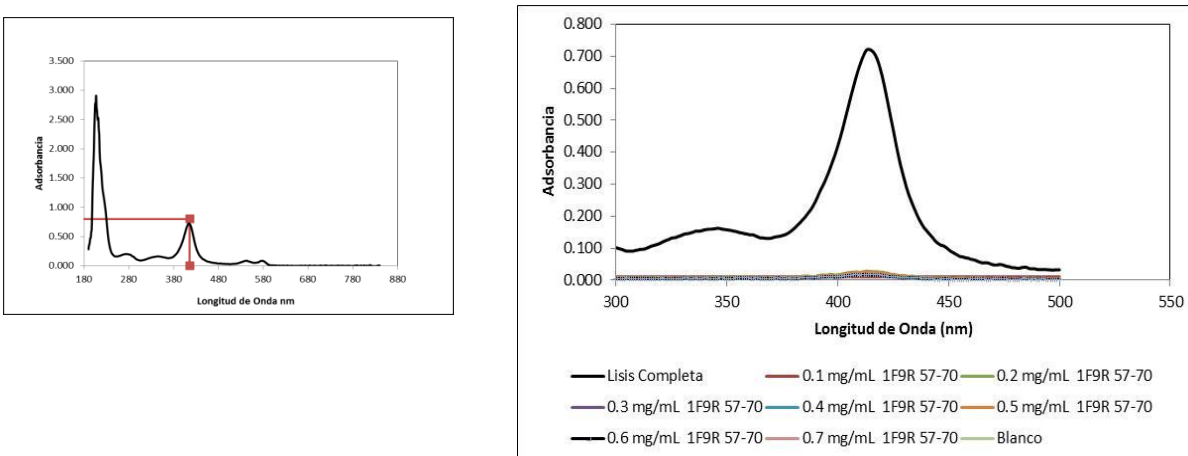


Figura 18. Cantidad de hemoglobina. En la figura del lado izquierdo se muestra el espectro de la hemoglobina bajo lisis completa. A la derecha la cantidad de hemoglobina liberada por distintas concentraciones de péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰, demostrando que no tiene actividad hemolítica.

³ Los datos de Actividad hemolítica se muestran en los anexos 4

3.4.5 *Isotermas de adsorción sobre eritrocitos*⁴

Los eritrocitos son células transportadoras de oxígeno, constituidas por una bicapa constituida por PC, PE y Ch y proteína. Se obtuvieron como describió anteriormente (con un volumen final de 300µl).

Las mezclas se incubaron por 40 minutos y se centrifugó a 2500 rpm a 4°C, por 5 minutos. La determinación de la concentración de péptido en solución fue monitoreado por la disminución en la concentración del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ en solución acuosa C_{eq} , con el instrumento NanoDrop 2000 Spectrophotometer. La concentración adsorbida en la membrana Q es determinada ($C_0 - C_{eq}$) siendo C_0 la concentración inicial. Los datos obtenidos se validaron por prueba *t-student*. Las ecuación utilizada (3) corresponden a el modelo de Langmuir.

$$Q = q_m \frac{K_s C_{eq}}{(1 + K_s C_{eq})} \quad (3)$$

Donde K_s es la constante de equilibrio de adsorción de la primera capa y q_m es la cantidad adsorbida en la monocapa.

3.4.5.1 *Resultados*

Este tipo de experimentos se han realizado en vesículas sintéticas, sin embargo, y debido al comportamiento del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ que no mostró ninguna actividad hemolítica pero si disminuyó la concentración de éste en solución, por lo que se asumió que el péptido se adsorbía en la membrana del eritrocito. Esto permitió hacer este experimento y desarrollar un estudio del mecanismo de acción con base en modelos de adsorción propuestos para sólidos porosos, el resultado de esto permitió discernir en el mecanismo de acción de este péptido como se mostrara en la sección 3.5.

La isoterma de Langmuir está estrechamente relacionada con la quimiadsorción, es decir, solutos que se unen a la superficie de un sólido por generación de uno o varios enlaces químicos, lo que se conoce como sitios específicos. Las isotermas como B.E.T (proveniente del estudio de Brunauer, Emmett y Teller) se relacionan con la fisiadsorción, en ésta se contempla la existencia de muchas capas, es decir varias moléculas son adsorbidas en la superficie generando una mono-capa similar a lo que ocurre en la isoterma de Langmuir pero la interacción no es por enlace químico sino por descompensación de la energía superficial del sólido, en este caso de la membrana, por esto es

⁴ Los datos de Isotermas de adsorción se muestra en el anexo 5.

posible que nuevas moléculas adsorbidas se coloquen encima de las presentes en la superficie y así generar multicapas en la membrana.

Estos modelos pueden servir como base en el entendimiento de los mecanismos de acción de PAs, por ejemplo, la formación de multicapas de péptido en la membrana puede estar asociada al colapso de la membrana celular fundamental para modelos como carpeta y toroidal. Modelos como el de micro-dominios son similares a tener sitios activos o preferentes en la superficie similar a lo propuesto por el modelo de Langmuir.

Si el sistema se comporta como la isoterma de Langmuir significa que existen sitios preferentes y no hay interacción péptido-péptido, por lo menos en la membrana expuesta al medio lo que indicaría que el mecanismo más probable fuera el de micro-dominios.

La manera más sencilla de corroborar si la interacción péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ con la membrana del eritrocito es preferente o no, es linealizando la ecuación número 3, si el sistema se comporta como una línea recta indica su consistencia con la isoterma de Langmuir y, por ende, con el método y lo expuesto.

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{q_m K C_{eq}}. \quad (7)$$

El resultado se muestra en la **figura 19**, la linealidad de isoterma demuestra que el péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ se adsorbe a la membrana de eritrocitos como una isoterma de Langmuir lo que indicaría que el péptido presuntamente obedece un mecanismo de acción tipo de microdominios.

3.5 Modelo Cinético de Plegamiento del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ en eritrocito.

La adsorción de péptidos antimicrobianos en interface es un fenómeno inherente a los mecanismos de acción propuestos para explicar su acción antimicrobiana. El fenómeno de adsorción ha sido investigado desde 1840 en diferentes campos investigación. Sin embargo, cuando se investiga la adsorción de PAs en membranas surgen tres preguntas clave en la investigación: 1. ¿Cómo es la estructura del PA en la interface? 2. ¿Cuál es el tamaño del espesor de la interface?, 3. ¿Cómo es la dinámica de adsorción?

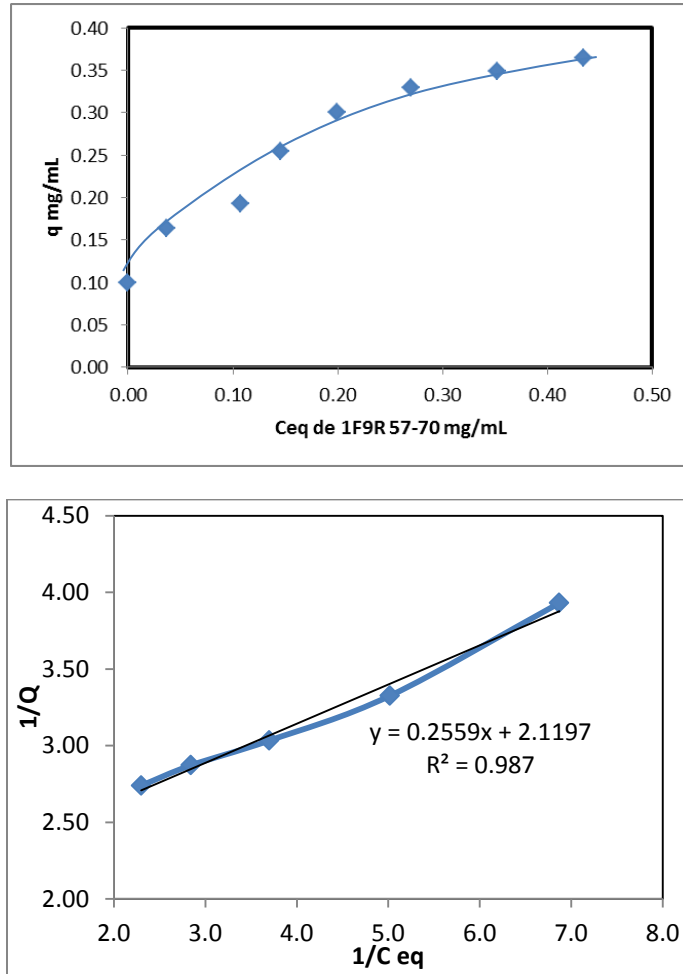


Figura 19. Isothermas. En la gráfica superior vemos la isoterma obtenida, en la gráfica inferior la linealización de la ecuación de Langmuir.

3.5 Modelo Cinético de Plegamiento del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ en eritrocito.

La adsorción de péptidos antimicrobianos en interface es un fenómeno inherente a los mecanismos de acción propuestos para explicar su acción antimicrobiana. El fenómeno de adsorción ha sido investigado desde 1840 en diferentes campos investigación. Sin embargo, cuando se investiga la adsorción de PAs en membranas surgen tres preguntas clave en la investigación: 1. ¿Cómo es la a estructura del PA en la interface? 2. ¿Cuál es el tamaño del espesor de la interface?, 3. ¿Cómo es la dinámica de adsorción?

La primera pregunta ha sido investigada intensamente y se identifican dos comportamientos principales: 1) orientaciones preferenciales en sistemas aire-líquido (104) y, 2) cambios en la conformación preferencialmente hacia alfa-hélice (104) en sistemas líquido-líquido.

El espesor de la interface ha sido investigado por elipsometría (105) y por reflexión de neutrones, y se determinó que en sistemas líquido-líquido la primera capa es adsorbida irreversiblemente, capas subsecuentes son adsorbidas reversiblemente, aumentando el espesor de la interface y sin aumentar la presión superficial.

La tercera pregunta está dirigida a la dinámica de adsorción y, particularmente, como ésta afecta a la conformación y estabilidad de la proteína. La difusión a la interface frecuentemente controla la velocidad de adsorción y, por lo tanto, gobierna la tensión superficial de la membrana cubierta por cantidades pequeñas de péptido (106). Cuando las cantidades de péptido en superficie son muy grandes el efecto de la difusión disminuye (107). La ecuación que utilizan para este comportamiento dinámico es la siguiente:

$$\frac{\pi_{ss} - \pi(t)}{\pi_{ss} - \pi_o} = \frac{\gamma - \gamma_{ss}}{\gamma_o - \gamma_{ss}} = e^{-kt}. \quad (4)$$

Donde π es la presión superficial [N/m], γ es la tensión interfacial en [N/m] y k es la constante de velocidad en [1/s] y el tiempo en segundos, los subíndices ss y o son medidas a tiempos altos (en el equilibrio) e inicial, respectivamente. La constante de velocidad ha sido relacionada con cambios en la conformación de la proteína en la interface, aunque no se ha comprobado experimentalmente.

Otros modelos de difusión, bajo condiciones de cinética limitada por la tensión superficial de la membrana cubierta, plantean ecuaciones evolutivas de cambios en la tensión superficial Φ_τ , una constante de velocidad de adsorción k_a en función de la superficie cubierta θ , k_d una constante de desorción y la concentración del péptido en la región interfacial C_{TS} de la siguiente manera:

$$\frac{d\Phi_\tau}{d\tau} = k_a C_{TS} (1 - \theta) - k_d \Phi_\tau. \quad (5)$$

.Cuando $k_a \gg k_d$ se puede asumir que $C_{TS} = C_b$, donde C_b es la concentración del seno de una solución y, asumiendo la siguiente ecuación lineal, $\Pi = \gamma_{\theta,0} - \gamma$, se obtiene:

$$\ln(\gamma - \gamma_{ss}) = \ln(\gamma_o - \gamma_{ss}) - \frac{k_a C_{TS}}{\Phi_{max}} t. \quad (6)$$

La **figura 20** muestra datos característicos de la dinámica superficial del péptido LAC21 (MKLQLADSLMQLARQVSRLESA) el cual tiene la característica de tener un equilibrio entre estados monoméricos y tetraméricos, en un sistema líquido-líquido (agua-octano), a bajas concen-

traciones, la dinámica es lineal cumpliendo la ecuación 3, pero a medida que la concentración aumenta, se pierde esta correlación.

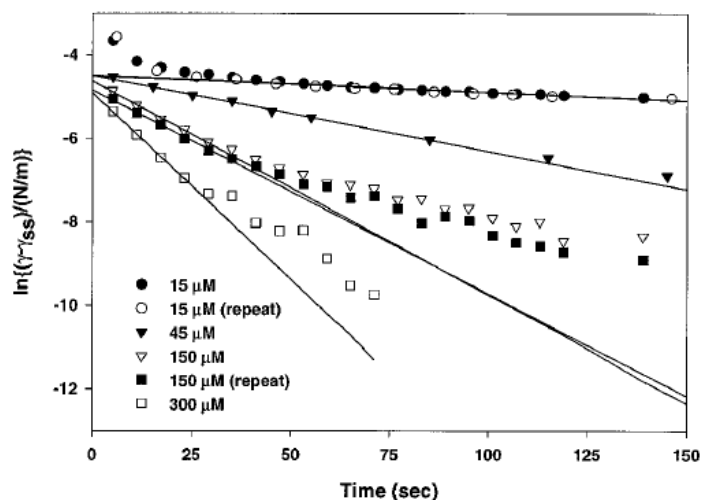


Figura 20. Dinámica de la tensión superficial (agua-octano) por aumento de la concentración del péptido LAC 21.

La constante k_a es de $175 \pm 8 \times 10^{-9}$ m/s. Dada la relación de k_a con la energía libre de Gibbs determinada en este trabajo para el péptido LAC es de -42 kJ/mol. Este ΔG está relacionado con la estabilidad del péptido en la interface, si se asume que esta estabilidad depende del cambio conformacional, el ΔG debe ser igual o muy cercano al ΔG de desnaturalización o plegamiento. Sin embargo, el ΔG calculado es mucho menor que el reportado para el plegamiento del péptido LAC21 en alfa-hélice, haciendo más difícil la comprensión del significado físico de k_a .

Podemos apreciar varios errores en este modelo, asumir que la concentración del seno de la solución es igual a la superficial, bajo velocidades de alta adsorción, no es válido si nos basamos en la interpretación termodinámica de la difusión, donde el potencial químico debe ser diferente en cada una de las regiones, para que exista la difusión. Asumir que la energía de Gibbs determinada a partir k_a es comparable con la ΔG de plegamiento es demasiado arriesgado, ya que en el desarrollo del modelo k_a no está en función de cambios de conformación.

Una de las contribuciones más importantes para entender la cinética de adsorción es el modelo RSA (Random Sequential Adsorption) (108). En esta aproximación las proteínas son rígidas y la interacción es realizada por medio de exclusión de volumen. Las proteínas son adsorbidas irreversiblemente, así que no hay grados de libertad translacional o por desorción. Este modelo ha sido

ampliado para considerar cambios conformacionales y desorción (108). Sin embargo, el principal problema es que este modelo no permite agregar información estructural detallada.

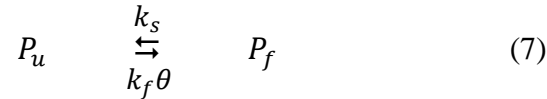
Otros modelos de adsorción de proteínas a escala coloidal asumen a la proteína o péptido como una partícula y pueden predecir con mayor exactitud la isoterma de adsorción, éstos involucran potenciales de interacción y dinámica Browniana. Pero tampoco contemplan los parámetros estructurales de una manera explícita.

Como conclusión, podemos afirmar que todos estos modelos se enfocan en abordar el fenómeno de adsorción de una proteína en una interface, e implícitamente lo relacionan con cambios en la conformación del péptido.

El enfoque que plantea el modelo desarrollado a continuación es completamente diferente y se basa no sólo en las propiedades de la superficie, sino también en el espacio membranal cubierto por el péptido, y cuya velocidad se ve afectada por las constantes k_f y k_s que son las velocidad de adsorción y de desorción.

3. 5.1 Formulación Matemática

El enlace reversible de un péptido en la membrana puede ser representado de la siguiente manera:



Donde la velocidad de formación de configuración activa está directamente relacionada con la fracción de sitios desocupados en la membrana. El término P_u es la fracción de péptido en agua, P_f es la fracción de péptido en la membrana y θ es la fracción de la superficie cubierta. Siendo k_f es la constante cinética directa y k_s constante cinética inversa.

El modelo anterior es descrito por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dP_u}{dt} = -k_f\theta P_u + k_s P_f. \quad (8)$$

$$\frac{dP_f}{dt} = k_f\theta P_u - k_s P_f. \quad (9)$$

La solución de la ecuación (8) y (9) es planteada a continuación. Si inicialmente sólo está presente el péptido P_u , con una concentración inicial, $[P_u]_0 = a$ transcurrido un tiempo t las concentraciones de P_f y P_u serán:

$$P_u = a-x \quad \text{y} \quad P_f = x \quad (10)$$

$$-\frac{dP_u}{dt} = -\frac{d(a-x)}{dt} = k_f\theta(a-x) - k_sx \quad (11)$$

Por lo tanto

$$\frac{dx}{dt} = k_f\theta(a-x) - k_sx \quad (12)$$

θ es la fracción de superficie cubierta por el péptido, y puede ser definida como la cantidad de péptido adsorbida sobre la cantidad de péptido que soporta la membrana C , ésta última cantidad es una constante y puede ser calculada a partir de isotermas de adsorción, por lo tanto podemos definir a θ como:

$$\theta = \frac{x}{C} \quad (13)$$

Incluyendo la ecuación 13 en la 12 tenemos:

$$\frac{dx}{dt} = k_f \frac{x}{C} (a-x) - k_sx \quad (14)$$

De aquí el coeficiente $\frac{k_f}{C}$ lo llamaremos como k_f^C :

$$\frac{dx}{k_f^C x a - k_f^C x^2 - k_s x} = dt \quad (15)$$

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{(k_f^C a - k_s)x - k_f^C x^2} = \int_0^t dt \quad (16)$$

El lado izquierdo de la ecuación 14 es de la forma $\int \frac{dx}{nx-bx^2} = \frac{\text{Ln}(x) - \text{Ln}(bx-n)}{n}$, por tanto la solución de la ecuación 14 para los límites x_0 a x es:

$$\text{Ln}(x) - \text{Ln}(k_f^C x - (k_f^C a - k_s)) - \text{Ln}(x_0) - \text{Ln}((k_f^C x_0 - (k_f^C a - k_s))) = (k_f^C a - k_s)t \quad (17)$$

Que es simplificada de la siguiente manera:

$$\text{Ln} \left(\frac{\frac{(x)}{(k_f^C x - (k_f^C a - k_s))}}{\frac{(x_0)}{(k_f^C x_0 - (k_f^C a - k_s))}} \right) = (k_f^C a - k_s)t \quad (18)$$

$$\frac{(x)}{(k_f^C x - (k_f^C a - k_s))} = \frac{(x_0)}{(k_f^C x_0 - (k_f^C a - k_s))} e^{(k_f^C a - k_s)t} \quad (18)$$

$$\frac{(x)}{(k_f^C x - (k_f^C a - k_s))} = D e^{(k_f^C a - k_s)t} \quad (19)$$

$$x = k_f^C x D e^{(k_f^C a - k_s)t} - (k_f^C a - k_s) D e^{(k_f^C a - k_s)t} \quad (20)$$

$$x \left(1 - k_f^C D e^{(k_f^C a - k_s)t} \right) = -(k_f^C a - k_s) D e^{(k_f^C a - k_s)t} \quad (21)$$

$$x = - \frac{(k_f^C a - k_s) D e^{(k_f^C a - k_s)t}}{\left(1 - k_f^C D e^{(k_f^C a - k_s)t} \right)} \quad (22)$$

$$\frac{1}{x} = \frac{k_f^C D e^{(k_f^C a - k_s)t}}{(k_f^C a - k_s) D e^{(k_f^C a - k_s)t}} - \frac{1}{(k_f^C a - k_s) D e^{(k_f^C a - k_s)t}} \quad (23)$$

$$\frac{1}{x} = \frac{k_f^C}{(k_f^C a - k_s) D} - \frac{e^{-(k_f^C a - k_s)t}}{(k_f^C a - k_s) D} \quad (24)$$

$$\frac{1}{x} = \frac{k_f^C}{(k_f^C a - k_s) D} \left(1 - \frac{1}{k_f^C} e^{-(k_f^C a - k_s)t} \right) \quad (25)$$

La forma explícita de D :

$$\frac{1}{x} = \frac{k_f^C}{(k_f^C a - k_s) \frac{(x_0)}{(k_f^C x_0 - (k_f^C a - k_s))}} \left(1 - \frac{1}{k_f^C} e^{-(k_f^C a - k_s)t} \right) \quad (26)$$

$$\frac{1}{x} = \frac{k_f^C (k_f^C x_0 - (k_f^C a - k_s))}{(k_f^C a - k_s) x_0} \left(1 - \frac{1}{k_f^C} e^{-(k_f^C a - k_s)t} \right) \quad (27)$$

$$\frac{1}{P_f} = \frac{k_f^C(k_f^C[P_f]_o - (k_f^C[P_u]_o - k_s))}{(k_f^C[P_u]_o - k_s)[P_f]_o} \left(1 - \frac{1}{k_f^C} e^{-\left(\frac{k_f}{C}[P_u]_o - k_s\right)t} \right) \quad (28)$$

El coeficiente de la ecuación 28, $k = \frac{k_f}{C}[P_u]_o - k_s$, es determinado por la regresión exponencial del inverso de la cantidad de péptido adsorbida contra el tiempo y la determinación de k_f y k_s es determinada por la regresión lineal de K contra $[P_u]_o$.

La ecuación 28 puede ser modelada de la siguiente forma

$$y = \frac{1}{B - G e^{-kt}} \quad (29)$$

Donde

$$B = \frac{k_f^C(k_f^C[P_f]_o - (k_f^C[P_u]_o - k_s))}{(k_f^C[P_u]_o - k_s)[P_f]_o} \text{ y } G = B \frac{1}{k_f^C}, \text{ permitiendo concluir que:}$$

Primero: La velocidad de adsorción del péptido y conformación activa depende tanto de la constante k_f como de k_s . Estos parámetros regulan el fenómeno de adsorción y modo de acción de péptido.

Segundo: A tiempos muy cercanos a cero, la evolución del péptido adsorbido en la membrana está en términos del inverso de $B-G$, indicando que el factor k_f^C condiciona la evolución, lo que muestra la estrecha relación entre la dinámica y la capacidad de adsorción de la membrana.

Tercero: A tiempos muy grandes, cercanos al infinito, la evolución está dirigida por el factor B que depende a su vez de $(k_f^C[P_u]_o - k_s)$. Esto significa que la desorción del péptido es plausible y afecta la evolución del sistema.

Cuarto: Si el valor de k es positivo, significa que $k_f \gg k_s$, debido a que la fracción $\frac{k_f}{C}$ debe ser mayor a la fracción de $k_s/[P_u]_o$, y suponiendo que C es alta, k_f debe ser alta. Lo anterior indica que a tiempos iniciales la velocidad del proceso está dirigida por esta constante, por ende, se puede pronosticar que el sistema presenta un fuerte decaimiento de la concentración de péptido en solución y luego un posterior equilibrio.

En la **Figura 21** que se muestra a continuación es la simulación del modelo $y = \frac{1}{B-Ge^{-kt}}$ con los parámetros B , G y k reportados en este trabajo.

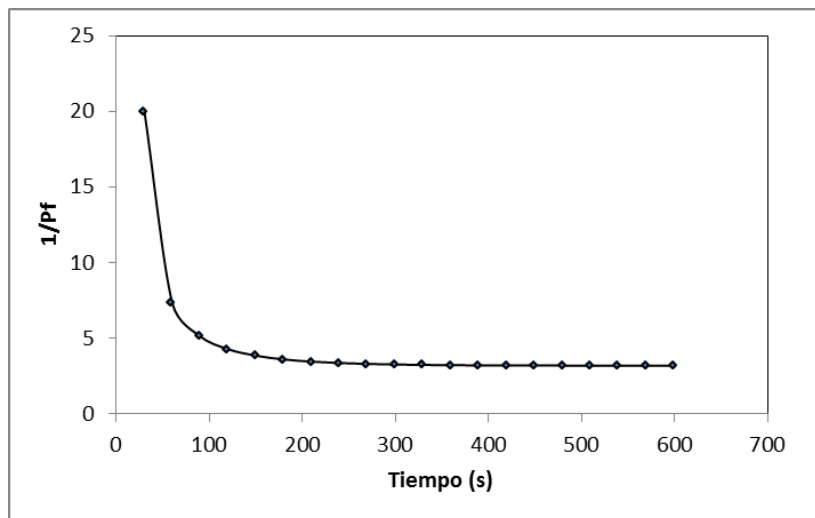


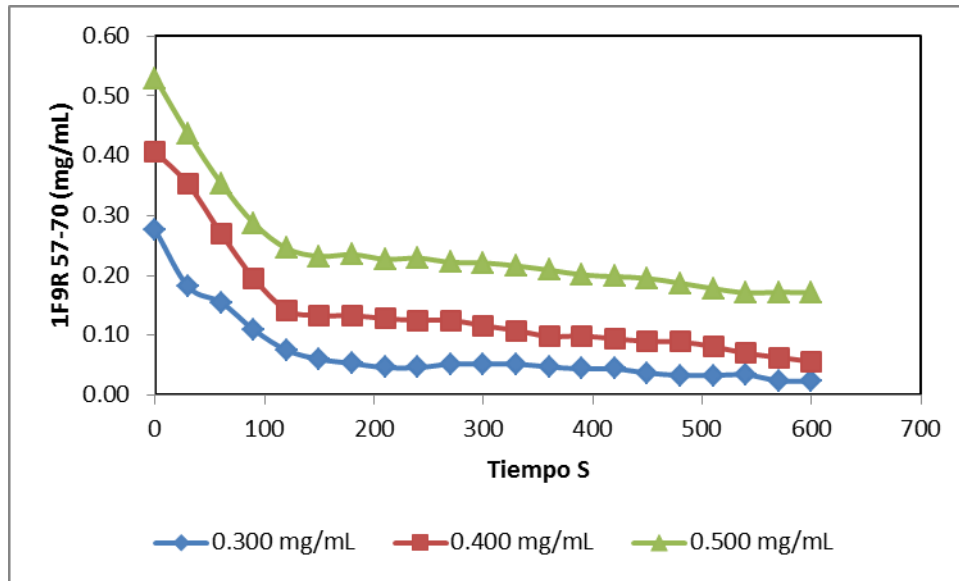
Figura 21. Simulación de la ecuación 28 con los datos obtenidos de la metodología realizada. Los parámetros son $B: 0.31$, $G:0.39$, $k:0.013$

3. 5. 3 Evaluación experimental del modelo cinético propuesto para el péptido 1F9R57-70

3.5.3.1 Metodología

La cinética se llevó a cabo en eritrocitos, se midió la disminución de péptido en solución por adsorción eritrocitos cada 30 segundos por un tiempo máximo de 10 minutos. Esto es debido a que la intención fue medir el inicio de la adsorción donde prevalece la sobre la . Los eritrocitos son obtenidos a partir de sangre humana y como anteriormente se mencionó. 25 μL de la solución de eritrocitos son colocados en una solución con 175 μL de péptido (en solución Alsever) a una concentración de 0.50, 0,40 , 0,30 mg/mL y midiendo la cantidad de péptido cada 30 segundos en el Nanodrop 2000c. Este rango de concentraciones fue escogido para estar en el mismo rango de las concentraciones utilizadas en los ensayos de hemólisis y curvas de crecimiento. **La figura 22** muestra los datos obtenidos a través de esta metodología.

A)



B)

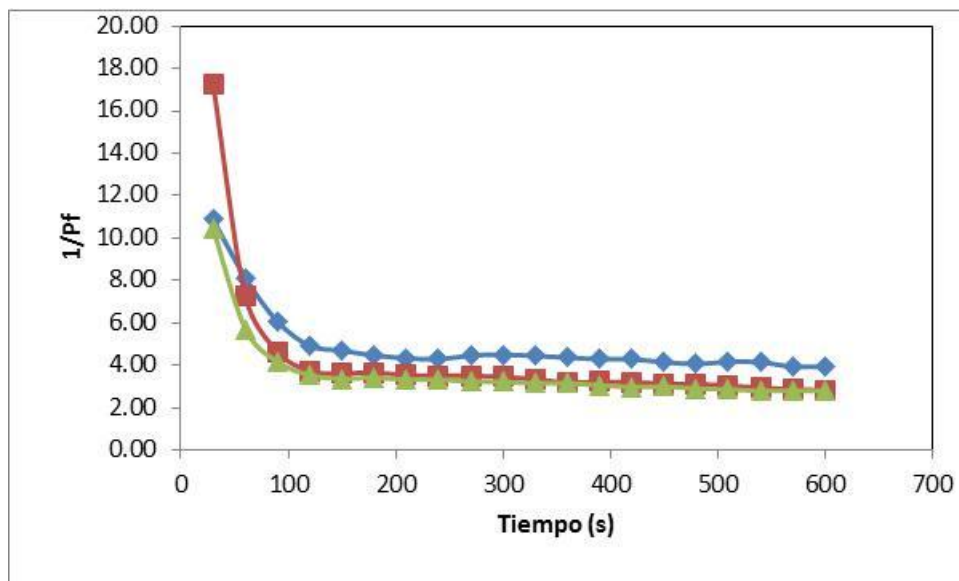


Figura 22. A) Dinámica de disminución de concentración de 1F9R57-70 en función del tiempo a 303 K, en color rojo los datos obtenidos para concentraciones promedio de 0.500 mg/mL, verde 0.400 mg/mL y azul 0.300 mg/mL. B) El inverso de la cantidad adsorbida mL/mg contra el tiempo (s).

En la **Figura 22 A**. Observamos la similitud entre lo determinado teóricamente y lo obtenido experimentalmente, un punto importante a recalcar es que los valores de concentración inferiores a 0.1 mg/ml tienen una alta incertidumbre, ya que están en el límite de la curva de calibración, esto afecta directamente al ensayo realizado con la concentración de 0.3 mg/ml. Como recomendación general,

es necesario trabajar con un conjunto de mayores concentraciones. Otra característica es que en la zona posterior a los 120 segundos se alcanza un equilibrio, lo que indica que se igualan las velocidades, tanto de adsorción como desorción, reforzando el planteamiento teórico del modelo expuesto.

Los datos de k son mostrados en la **tabla 8**, se encontraron a partir de un ajuste no lineal de los coeficientes al modelo de la ecuación 29. Los parámetros estadísticos de estos ajustes son mostrados en el Apéndice 5. La obtención de los valores de k_f^C y k_s fue realizada con base en las constantes k_{400} y k_{500} , debido a la alta incertidumbre de k para concentración de 0.30 mg/mL.

Tabla N 8 Constante K, calculada a partir del ajuste no lineal de los datos experimentales y el modelo planteado. Los valores presentados son los promedios obtenidos (ver Anexo 5)

Concentraciones de Péptido mg/mL	k (s^{-1})	k_f^C	k_s s^{-1}
0.30 \pm 0.01	0.009 \pm 1E-3	0.308 \pm 1E-2	0.0308 \pm 1E-2
0.40 \pm 0.01	0.012 \pm 0.01		
0.53 \pm 0.01	0.016 \pm 0.01		

Se puede observar que k_f^C es un orden de magnitud mayor a k_s , sin embargo, se sugiere hacer muchos más experimentos que demuestren esta relación, además, es importante recordar que k_f^C es un cociente lo que indica que la relación real entre es mayor a la mostrada.

3.6 Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular ofrecen una perspectiva detallada de la interacción péptido-membrana que está más allá de la resolución de muchas técnicas experimentales. Sin embargo, la compleja naturaleza de estos sistemas requiere de simplificaciones en el modelo de simulación, e incluso un modelo con los componentes mínimos podría tomar mucho tiempo para alcanzar el equilibrio.

En esta sección se revisa la simulación realizada con dinámica molecular a un péptido antimicrobiano y su interacción con la membrana. Una bicapa lipídica se puede modelar como un infinito de planchas hidrofóbicas (con diferentes grados de complejidad) a través de una función sobre el espacio. Este enfoque se ha adoptado muy a menudo en este tipo de simulaciones, para reducir la carga computacional, el solvente no está incluido en el modelo de manera explícita, pero es incluido de manera implícita por las interacciones efectivas entre las moléculas. Este tipo de

simulaciones se han aplicado para péptidos antimicrobianos de alfa-hélice como Alameticina (109), Cecropina (110) y Dermaceptina (111)

Las simulaciones de Alameticina inician con una conformación de alfa-hélice en paralelo a la superficie de la membrana. Se demostró que la hélice penetró de una manera espontánea en la membrana. Por otro lado, la orientación transmembranal exhibida por Alameticina, Cecropina y Dermaceptina fue en el plano paralelo a la superficie de la membrana.

Con respecto a las simulaciones, donde todos los átomos involucrados tienen un potencial indexado, la bicapa lipídica ha sido sustituida por un solvente orgánico con el fin de reducir el costo computacional. Las simulaciones de PA como la melitina (112), Magainina (113) y Alameticina (114) se realizaron por separado en soluciones de metanol y trifluoroetanol. Este conjunto de estudios complementados con dicroísmo circular, demuestran que estas simulaciones pueden imitar el plegamiento del péptido en el entorno de una membrana.

Hoy en día, las simulaciones de PAs con todos los átomos de las bicapas lipídicas, están bien establecidas (115). Se limitan generalmente en una escala temporal de decenas o cientos de nanosegundos. Una bicapa compuesta por fosfatidilcolina se utiliza a menudo para imitar la membrana de mamíferos. Por otra parte, la membrana bacteriana es generalmente modelada por lípidos bipolares (fosfatidiletanolamina) y aniónicos (fosfatidilglicerol).

Debido al gran número de átomos en el sistema y a la escala de tiempo (en el orden de minutos), no es práctico simular el mecanismo de translocación de péptidos o disrupción membranal. En cualquier caso, una representación de todos los átomos del sistema proporciona información valiosa.

Por lo ya antes mencionado, en este trabajo se buscó obtener información sobre la dinámica, características estructurales y reordenamiento de un sistema de péptido-membrana con el fin de entender sus interacciones. Los cálculos de éstas interacciones se hicieron entre una membrana formada por dipalmitoilfosfatidilcolina DPPC (emulando los fosfolípidos de una membrana) y el péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ durante 75ns por dinámica molecular.

En la siguiente sección, se muestra una breve revisión de los fundamentos de la simulación de dinámica molecular.

3.6.1 Fundamentos de la dinámica molecular

La dinámica molecular es una técnica computacional que determina propiedades en el equilibrio y no equilibrio, es decir, que los centros de masa obedecen las leyes de la mecánica clásica. La dinámica molecular en muchos aspectos es muy similar al experimento, se prepara inicialmente una muestra del material de estudio, luego es conectada a un instrumento de medida (e.g. termómetro, viscosímetro, etc.) y se determina la propiedad por un intervalo tiempo. La DM sigue exactamente la misma rutina, primero preparamos la muestra seleccionando un modelo de N partículas y resolvemos las ecuaciones de movimiento para este sistema, hasta que las propiedades no cambien en el tiempo (es decir, cuando tengamos un sistema en equilibrio). Una vez obtenido el equilibrio del sistema, se realiza la medida. Los errores en el experimento son muy similares a los cometidos en la DM (ej. la muestra no está preparada correctamente, la medida se hace a tiempos muy cortos o se miden cosas diferentes a lo que se cree)

La mejor forma de entender a la dinámica molecular es considerar un programa básico de éste (116) que permite mostrar principales características a considerar:

1. Se indican los parámetros para especificar las condiciones iniciales de corrida (Ej. temperatura inicial, número de partículas, densidad y número de pasos)
2. Inicialización del sistema esto es la posición y velocidades iniciales)
3. Estimar la fuerza sobre todas las partículas.
4. Integrar las ecuaciones de movimiento. Este paso y el anterior son el corazón de la DM. Hay que repetir este procedimiento hasta que se cumpla el tiempo deseado.
5. Medir la propiedad.

El paquete de simulación utilizado fue para esta simulación fue GROMACS 4.02 , por tanto la descripción de los puntos anteriores está basada en las características ofrecidas por este Software (117).

3. 6.1.1 Condiciones Iniciales (117)

Coordenadas y Velocidades:

Antes de iniciar la simulación, el tamaño de la caja, las coordenadas y velocidades de todas las partículas son asignadas obligatoriamente. El tamaño de la caja y la forma están determinadas por tres vectores (nueve números) b_1, b_2, b_3 . Si la simulación comienza en el instante $t = t_0$, las coordenadas en éste deben ser conocidas. El algoritmo leap-frog⁵ está predeterminado para actuali-

⁵ El algoritmo Leap-Frog actualiza la posición r en función del tiempo t y las velocidades usando velocidades en un tiempo $= (t-1/2\Delta t)$. Esta actualización de velocidades también está en función de las Fuerzas calculadas en función de la posición.

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{\Delta t}{m}F(t).$$

zar el paso de tiempo, al igual requiere que las velocidades en t_0 se conozcan. Si las velocidades no están disponibles, el programa puede generar velocidades iniciales con una distribución de Maxwell-Boltzmann.

$$p(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi kT}} \exp\left(\frac{-m_i v_i^2}{2\pi T}\right). \quad (1)$$

Buscando vecinos (117)

La determinación de las fuerzas internas de átomos no enlazados se realiza por medio de generación de listas que pueden ser estáticas o dinámicas (son recalculadas a un intervalo de tiempo), que contienen a los vecinos de un átomo a una cierta distancia corte.

El parámetro utilizado para calcular si un átomo i pertenece a la lista de j es la distancia a la que se encuentre y que sea menor a la distancia de corte (cut-off) R_c .

Cuando átomos se encuentran en los bordes de sistema, las condiciones periódicas⁶ permiten que la imagen pueda incorporar a nuevos átomos vecinos. Este concepto es mucho más realista cuando se trabaja con un ensamble de moléculas. Sin embargo una restricción por el uso de esta periodicidad es que los R_c de corto alcance deben de ser menores a la mitad del tamaño de la caja.

3. 6. 1.2 Estimación de la fuerza y energía potencial

Cuando se han determinado las fuerzas, es posible cuantificar la energía potencial que mide la capacidad que tiene dicho sistema para realizar un trabajo, en función exclusivamente de su posición o configuración. La energía potencial es la suma de todas las contribuciones de fuerzas de átomos no enlazados (Lennard-Jones, Coulombico) y los términos de átomos enlazados:

Las funciones de potencial se pueden subdividir en tres partes:

1. No enlace: Lennard-Jones o de Buckingham, y de Coulombico o modificaciones de éste. Estas interacciones se calculan sobre la base de la fuerza ejercida sobre el átomo i por una lista de vecinos que no tienen una interacción directa con éste. (dentro de un radio determinado).
2. Enlace: Como enlaces covalentes, ángulo de flexión. Éstos se calculan sobre la base de listas de átomos fijos.

$$v\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = r(t) + \Delta t v(t + \frac{1}{2}\Delta t).$$

Donde m es la masa

⁶ Condiciones periódicas de frontera: La forma clásica de reducir al mínimo los efectos de borde en un sistema finito

3. Restricciones: las restricciones de posición, ángulo, restricciones a distancia, la orientación y todos ellos se basan en las listas de los átomos fijos.

Las funciones de potencial utilizadas en esta simulación:

La forma funcional del potencial utilizado es (118) :

$$V(r; s) = V_{(r,s)}^{no\ enlace} + V_{(r,s)}^{enlace} \quad (2)$$

Donde r son las coordenadas y s los parámetros del campo de fuerza (119).

GROMOS 53 A6 es un conjunto de parámetros numéricos que provienen de las entalpías de vaporización y medidas espectroscópicas con los cuales se pueden solucionar las ecuaciones que componen el campo de fuerzas. A continuación mostramos las ecuaciones del campo de fuerza comunes (120).

No enlace $V_{(r,s)}^{no\ enlace}$:

$$V_{(r,s)}^{no\ enlace} = V_{ij}^{LJ} + V_{ij}^q \quad (3)$$

- a) Potencial Lennard-Jones.

$$V_{ij}^{LJ} = \left(\frac{C_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right). \quad (4)$$

la fuerza derivada de este potencial es

$$V_{ij} = \left(12 \frac{C_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - 6 \frac{C_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) \frac{r_{ij}}{r_{ij}^2}. \quad (5)$$

Donde C_{ij}^{12} y C_{ij}^6 son propiedades de los átomos.

- b) Coulombico

$$V_{ij} = f \frac{q_{ij}q_{ij}}{\epsilon r_{ij}^2}. \quad (6)$$

$$V_{ij} = f \frac{q_{ij}q_{ij} r_{ij}}{\epsilon r_{ij}^2 r_{ij}} \quad (7)$$

Donde $f = \frac{1}{4\pi\epsilon_0}$, q son las cargas, ϵ es la constante dieléctrica, C constante propia de los átomos y r es la distancia entre dos partículas.

Enlace ($V_{(r,s)}^{enlace}$)

Este potencial es calculado por la suma de varias contribuciones:

$$V_{(r,s)}^{enlace} = V_{(r,s)}^{Enlace-covalente} + V_{(r,s)}^{Angulo-enlace} + V_{(r,s)}^{Agulos Dihedros} + V_{(r,s)}^{Torsión}$$

Potencial de Enlace covalente $V_{(r,s)}^{Enlace-covalente}$

Este potencial es calculado sobre todos los N_b y depende de los parámetros K_b y b_o .

$$V_{(r,s)}^{enlace covalente} = V_{(r;k_\theta,b_o)}^{enlace covalente} = \sum_{n=1}^{N_b} \frac{1}{4} k_{b_n} [b_n^2 - b_{o_n}^2]^2 \quad (8)$$

El tamaño del enlace para un n th enlace entre los átomos i y j con posiciones r_i y r_j es dado por $b_n = r_{ij} = \sqrt{r_{ij} \cdot r_{ij}}$. Los parámetros k_b y b_o son definidos a través de datos espectroscópicos (k_b) y estructurales, obtenidos por difracción de rayos x para (b_o).

Potencial por el ángulo formado por tres átomos unidos por dos enlace covalente

$V_{(r,s)}^{Angulo-enlace}$

El potencial del ángulo formado se calcula sobre la suma de las contribuciones de todos los enlaces, siendo k_{θ_n} una constante en función de θ_n el enlace definido por los átomos i, j y k , θ_o ángulos iniciales y datos estructurales obtenidos por difracción de rayos x y k_θ^{harm} .

$$V_{(r,s)}^{angulo-enlace} = V_{(r;k_{\theta_n},\theta_o)}^{angulo-enlace} = \sum_{n=1}^{N_\theta} \frac{1}{2} k_{\theta_n} [\cos\theta_n - \cos\theta_{o_n}]^2. \quad (9)$$

Donde

$$k_{\theta_n} = \frac{2k_B T}{\left[\cos(\theta_o + \sqrt{\frac{k_B}{k_\theta^{harm}} - \cos\theta_n} \right]^2 + \left[\cos(\theta_o - \sqrt{\frac{k_B}{k_\theta^{harm}} - \cos\theta_n} \right]^2}. \quad (10)$$

k_B es la constante de Boltzman y T es la temperatura.

Potencial generado por el ángulo diedro $V_{(r,s)}^{Agulos Dihedros}$

La energía potencial determinada por estas interacciones, se calcula como la suma de todos los ángulos diedros N_ϵ con parámetros k_ϵ y ϵ_o , este último es el ángulo diedro inicial y se determinan por difracción de rayos X y por datos espectroscópicos.

$$V_{(r,s)}^{Agulos Dihedros} = V_{(r;k_\epsilon,\epsilon_o)}^{Angulo diedro} = \sum_{n=1}^{N_\epsilon} \frac{1}{2} k_{\epsilon_n} [\epsilon_n - \epsilon_{o_n}]^2. \quad (11)$$

Potencial de Angulo de Torsión $V_{(r,s)}^{Torsion}$:

La energía potencial determinada por estas interacciones se debe a la torsión en el ángulo diedro, se calcula como la suma de todos los ángulos diedros N_γ con parámetros k_γ , y donde γ_0 es el ángulo diedro inicial y son determinados por difracción de rayos X y datos espectroscópicos.

$$V_{(r,s)}^{Agulos\ diedros} = V_{(r;k_\gamma,\gamma)}^{angulo-enlace} = \sum_{n=1}^{N_\gamma} \frac{1}{2} k_{\gamma_n} [1 + \cos(\gamma_n) \cos(m_n \varphi_n)] \quad . \quad (12)$$

Donde m_n es el multiplicador del ángulo y φ_n es el ángulo diedro entre los átomos i, j, k, l , y γ_n es el plano de fase.

Potencial OPLS

El potencial OPLS es aplicado a la membrana DPPC, que tiene la misma forma funcional mostrada anteriormente $V(r; s) = V_{(r,s)}^{no\ enlace} + V_{(r,s)}^{enlace}$, pero los parámetros son obtenidos a través de simulaciones de Monte-Carlo y se comparan con datos experimentales, como entalpias de vaporización y difracción de rayos X (121).

Potencial SPC para el agua:

En el modelo de carga puntual, las moléculas de agua tiene tres centros de carga concentrada: donde en los H (hidrógenos) predomina la carga positiva y en el O (oxígeno) la carga negativa.

3.6.1.3 Medida de la propiedad

La mecánica estadística conecta al mundo microscópico con el mundo macroscópico. El estado de un sistema microscópico es definido por una configuración en el espacio, la cual consiste de coordenadas y momentos atómicos del sistema. Un sistema macroscópico puede concebirse como un ensamble de muchos sistemas microscópicos satisfaciendo un cierto estado termodinámico.

Diferentes ensambles se han propuesto y cada uno de ellos contiene propiedades diferentes. Por ejemplo el ensamble NVT está caracterizado por el mismo número de partículas N , mismo volumen V y misma temperatura T en todos los microestados o el ensamble es el NPT con presión, temperatura y número de moléculas fijas. Sin embargo, la energía y configuración es diferente para cada uno de los microestados.

Con la dinámica molecular, la idea es que, dado suficiente tiempo, un sistema microscópico se desarrolle a través de todas las configuraciones con la misma probabilidad. Esto conduce a

la aplicación central de la DM, en la que el principio ergódico establece que el promedio de las diferentes configuraciones del ensamble es igual al promedio en el tiempo.

3.6.1.4 *Análisis de datos de dinámica molecular*

En este trabajo se buscó obtener información sobre la dinámica, características estructurales y reordenamiento de un sistema de péptido-membrana con el fin de entender sus interacciones.

1. Densidad del ambiente membrana

Esta propiedad es determinada en función del tiempo y nos indica cómo el péptido afecta a la membrana en la distribución de los lípidos que la conforman.

2. Difusión lateral de los lípidos

Es una propiedad fundamental de los lípidos en la membrana, la disminución de esta movilidad, permite que asociaciones en la membrana se produzcan, como balsas lipídicas y asociaciones de proteínas, llevando a la muerte celular.

3. Desplazamiento lateral de los lípidos en la membrana

Movilidad de los lípidos en la membrana.

4. Desplazamiento del Péptido en la membrana

La movilidad del péptido en la membrana es fundamental para saber si el péptido puede asociarse con otras estructuras o con ella misma dentro de la membrana.

3.6.2 *Metodología*

La estructura del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ (APLYKKIIKKLLLES) se obtuvo a través de la base de datos PDB por difracción de rayos X a una resolución de 2.0 Å, siendo ésta la región C-terminal de la proteína 1F9R. Se utilizó el paquete *Visual Molecular Dynamics* (VMD) para obtener el C-terminal de la proteína y mantener la conformación de alfa-hélice. Se utilizó GROMACS (122) para el péptido en una caja de 22 nm³ y se solvató con 4200 moléculas de agua. El péptido se fijó en el centro de la caja y a las moléculas de agua se les permitió alcanzar un mínimo de energía por medio de un gradiente de minimización de la misma. El péptido entonces se liberó y se minimizó el sistema completo, el 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ más moléculas de agua, bajo el mismo esquema.

El sistema es calentado a 310K en periodo de 50 ps. Se incluyó el acoplamiento de presión y el sistema se equilibró por 2ns.

Una vez que la última configuración fue alcanzada por el sistema es usada para iniciar la simulación membrana/péptido. Una membrana pre-equilibrada de dipalmitoilfosfatidilcolina (**DPPC**) se obtuvo del laboratorio de Tileman (123). La membrana se equilibró por 6 ns a una temperatura de 310K para observar si no se presentaban cambios en la densidad de la membrana o desplazamiento lateral de los lípidos.

Usando el programa VMD, la última configuración del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ se colocó sobre la membrana a una distancia de 1.2 nm de separación con la membrana y en el centro de ésta. Se utilizó GROMACS para ubicar a la membrana y al péptido en una caja de 6.02 x 6.02 x 9.5 nm y al solvatar el sistema con las moléculas de agua se alcanzó un total de átomos de 28632. Toda la simulación fue llevada con un intervalo de tiempo de 2 fs, a lo largo de las condiciones periódicas de frontera. Las interacciones de Lennard-Jones son parametrizadas a un radio de corte de 1.0/1.4 nm. Las interacciones electrostáticas fueron modeladas por el método de Ewald. Al sistema se le permitió alcanzar el equilibrio mediante minimización por gradiente descendente, hasta alcanzar una fuerza igual o menor a 850 kJ mol⁻¹ nm⁻², cuando el solvente es calentado. Finalmente la simulación, fue realizada por un periodo de 75 ns.

El campo de fuerza de GROMOs 53 A6 fue utilizado para el sistema, que incluye los parámetros del modelo SPC para el agua. Los parámetros para los lípidos fueron los reportados por Berger. La temperatura permaneció constante utilizando el termostato de Nose-Hoover. Para la simulación se utilizó un esquema de presión (Parinello-Rahman) semi-isotrópica (uniformidad en los vectores *x*, *y* y *z* independiente). Las trayectorias fueron analizadas utilizando la paquetería desarrollado por GROMACS. Todos los cálculos fueron llevados a cabo en la supercomputadora KanBalam de la UNAM.

3.6.3 Resultados y Discusión

Durante los primeros 5 ns de la simulación, el péptido se equilibró y se difundió en la membrana, lo que indicó la alta afinidad entre ellos. El péptido utiliza los restantes 70 ns en estabilizarse en la membrana (**Figura 24**).

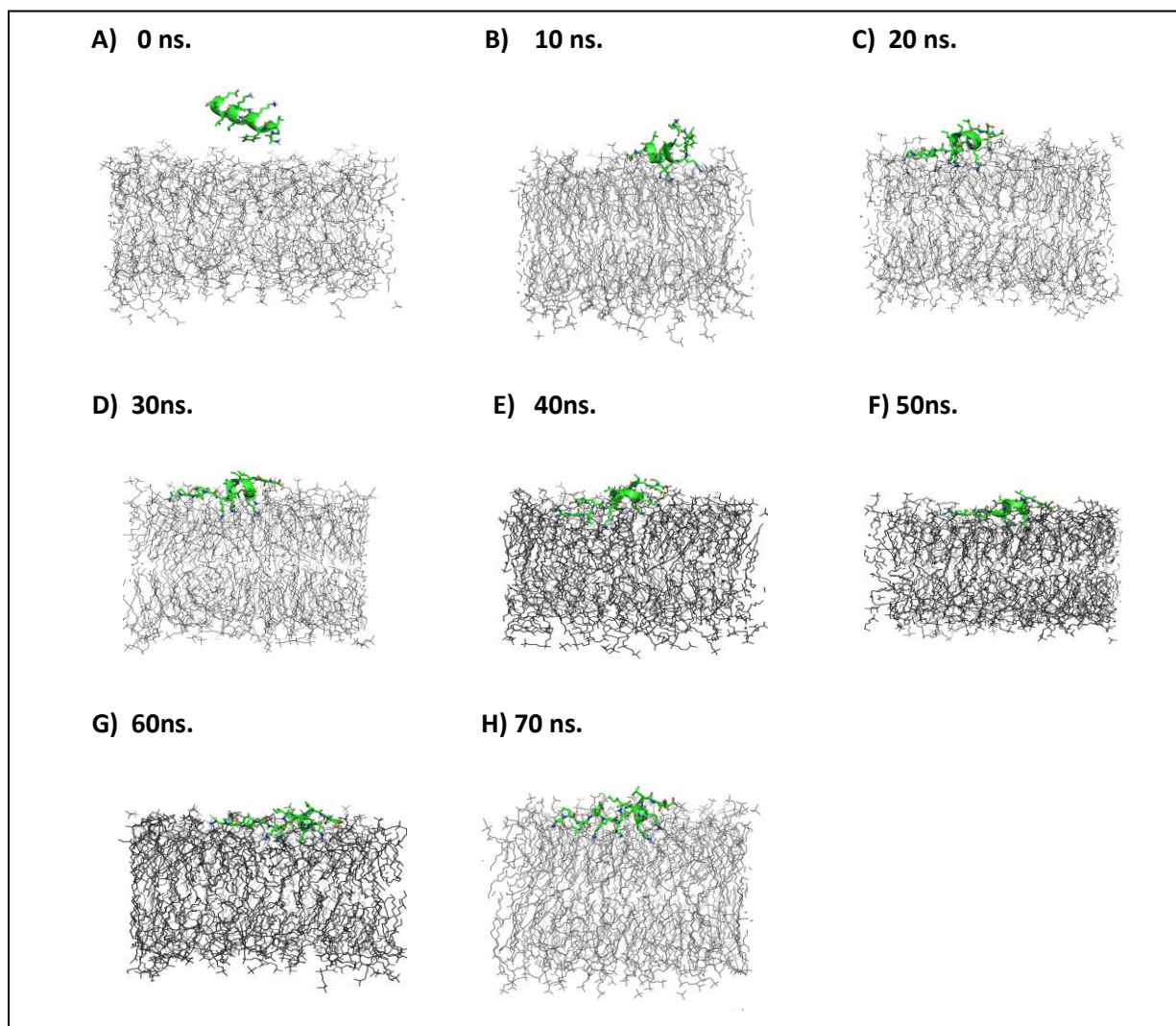


Figura 24. Fotografías instantáneas de la simulación A) 0 ns, B) 10 ns, C) 20 ns, D) 30 ns, E) 40 ns, F) 50 ns, G) 60 ns, H) 70 ns. El péptido se muestra de color verde y la membrana de color gris.

La interacción del péptido con la membrana genera un cambio de conformación de éste. El cambio inicia con exposición de las argininas hacia la membrana interaccionando con los oxígenos pertenecientes al grupo fosfato a una distancia promedio de 3.5nm propia de las interacciones de tipo Coulombicas (**Figura 25**).

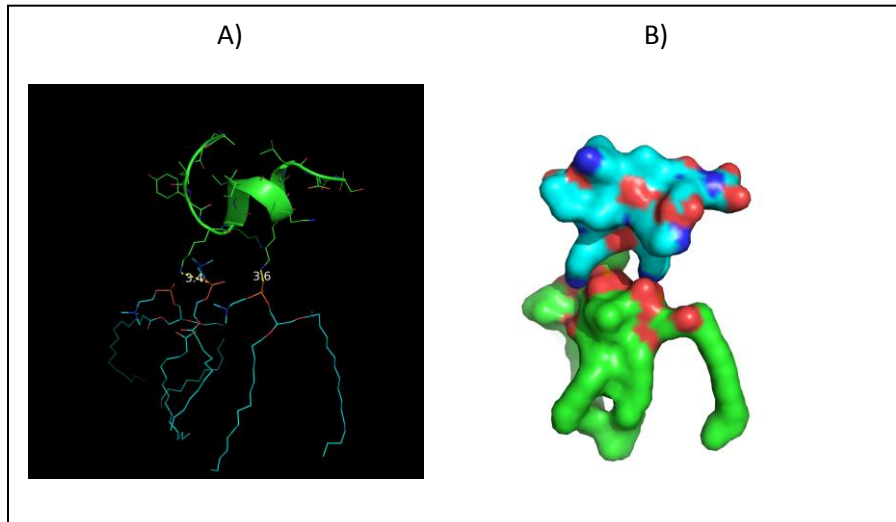


Figura 25 A). Las distancias de interacción entre el N de las argininas y los oxígenos del grupo fosfato del lípido. B) Las superficie potencial del péptido (cyan) y del péptido en verde, los colores rojo son cargas negativas y los azules positivas

Posterior a esto el péptido se estabilizó en la membrana, pero el cambio de conformación continuó hasta pasar de una estructura de alfa-hélice a una aleatoria. Como se muestra en la **figura 26**.

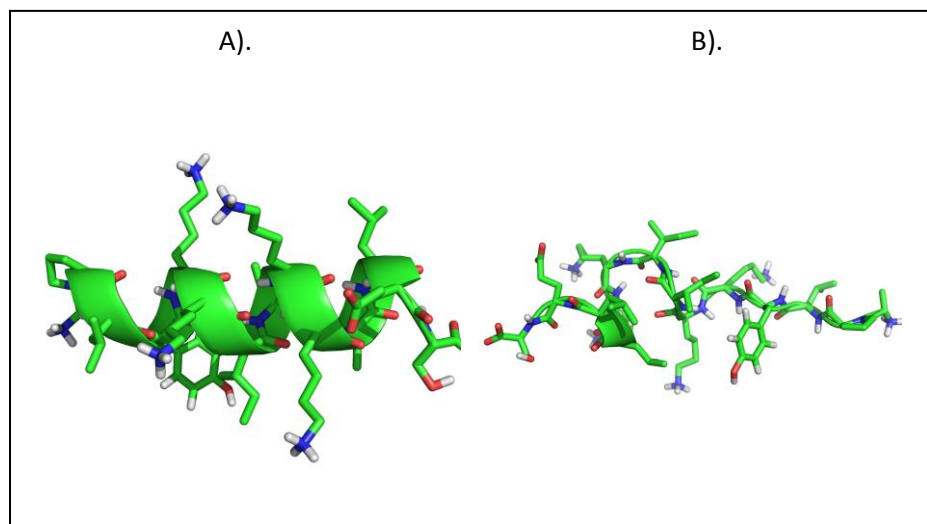


Figura 26 Cambio conformacional de alfa-hélice a aleatoria por su interacción con la membrana

El grado de penetración del péptido en la membrana está en el orden de $2.2 \pm 0.7 \text{ \AA}$ (a 50 ns) y de $1.1 \pm 0.6 \text{ \AA}$ (A 10ns). Esta penetración observada demuestra que la inserción del péptido es espontánea, sin la necesidad de una fuerza externa. Una observación muy importante es que el péptido no se sumerge completamente en el núcleo, se mantiene cerca de la primera capa de hidratación en concordancia con el modelo cinético planteado anteriormente. Esta localización interfacial se atribuye primero a las interacciones electrostáticas entre la arginina (grupo amino) y los grupos fosfato de los lípidos como ya se ha mencionado, que sirven de anclaje del péptido en la membrana, y a unas condiciones termodinámicas de mayor estabilidad, es decir, que puede dirigir sus grupos hidrofóbicos hacia el interior de la membrana como leucinas y los grupos polares hacia los fosfatos y aguas de la primera capa, para estabilizar sus interacciones polares.

Un segmento que tiene una gran flexibilidad es el N-terminal de 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ debido a que el C-terminal está compuesto de argininas que anclan al péptido a la membrana. Este N-terminal está compuesto de los residuos de alanina, prolina y tirosina. Tanto la prolina como el triptófano han sido relacionados en el ensamble de péptidos y proteínas en la membrana, pero en este caso sirven de grapa, que permite que el grupo amino de la alanina interaccione con el grupo fosfato y a la tirosina con los grupos amino de la colina.

El efecto del cambio conformacional del péptido en la membrana lo evaluamos con el desplazamiento lateral de los lípidos en la membrana como se muestra en la **figura 27**, Inicialmente el desplazamiento permanece aproximadamente constante, con una pendiente de $3.8 \times 10^{-5} \text{ nm}^2/\text{ps}$ cercana a la obtenida experimentalmente de $0.3 \times 10^{-5} \text{ nm}^2/\text{ps}$ (En DM todavía una pendiente de 6 nm/ps es considerada cercana a la experimental). Pero cuando se llega a 50 ns, tiempo en el cual el péptido alcanza una conformación aleatoria, el desplazamiento disminuye esto indica que el péptido hace que la membrana sea más rígida, lo que, en términos biológicos, tiene como consecuencia una dificultad en la adquisición de nutrientes, en la comunicación celular etc.

Lo anterior, puede conducirnos a entender el mecanismo de acción del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰, ya que su interacción con los lípidos genera columnas estáticas en la membrana. Esto es reportado para la castelina, que actúa sólo en bacterias y no en humanos (no produce hemólisis) donde analizan la dinámica de la membrana por RMN encontrando disminución en la velocidad de difusión de los lípidos (124). A diferencia del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰, la castelina entra en el núcleo de la estructura y genera microdominios en la membrana.

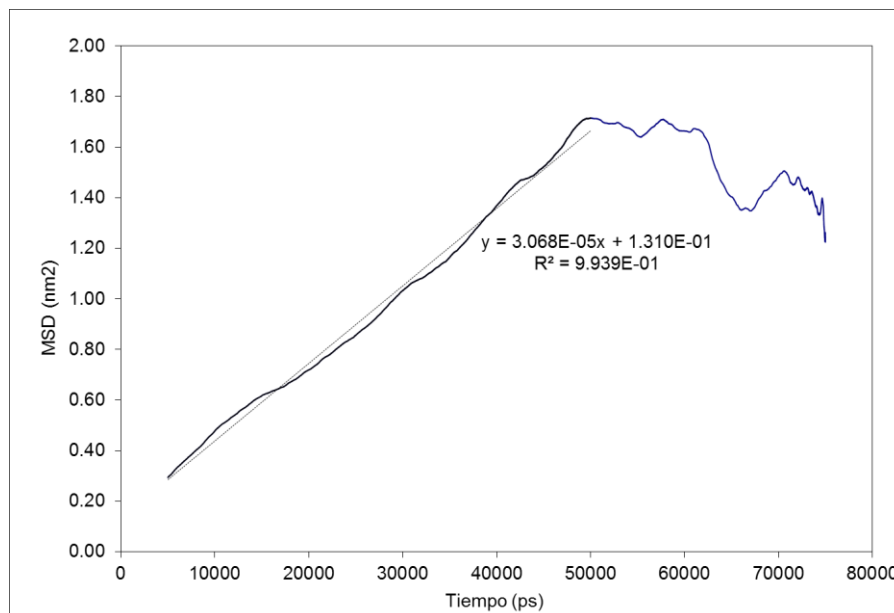


Figura 27 Desplazamiento cuadrado medio lateral de los lípidos en la membrana

Otra característica importante a analizar es cómo cambia la densidad de la membrana por su interacción con el péptido. Para analizar esto dividiremos a la membrana en un grupo que contiene a los grupos colinas incluyendo el grupo fosfato de la capa inferior y superior de la membrana. El pico que se encuentra entre 2 y 3.5 nm es la densidad de las colinas que interactúan con el péptido y el segundo pico es el grupo de colinas pertenecientes a la cara inferior de la membrana (**Figura 28**). Como se puede observar, la densidad es mayor para el grupo que interactúa con el péptido, indicando que tienen un menor volumen que las que están en la cara posterior, debido a la inserción superficial del péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ en la membrana.

Los parámetros de orden de deuterio sirven para analizar las propiedades físicas de la membrana. Cada parámetro de orden está definido como: $S_{CD} = 0.5(3\cos^2\theta_\pi - 1)$. Donde θ_π es el ángulo entre un vector de los hidrógenos de los grupos metileno o metilo de una de las cadenas de alcanos presentes en el lípido, con un vector normal al plano de la membrana, que en este caso se escogió la cadena de carbonos indexados desde el número 36 al 50⁷. Lo que significa que a un mayor valor de S_{CD} hay mucho mayor orden.

⁷ Ver anexo 6

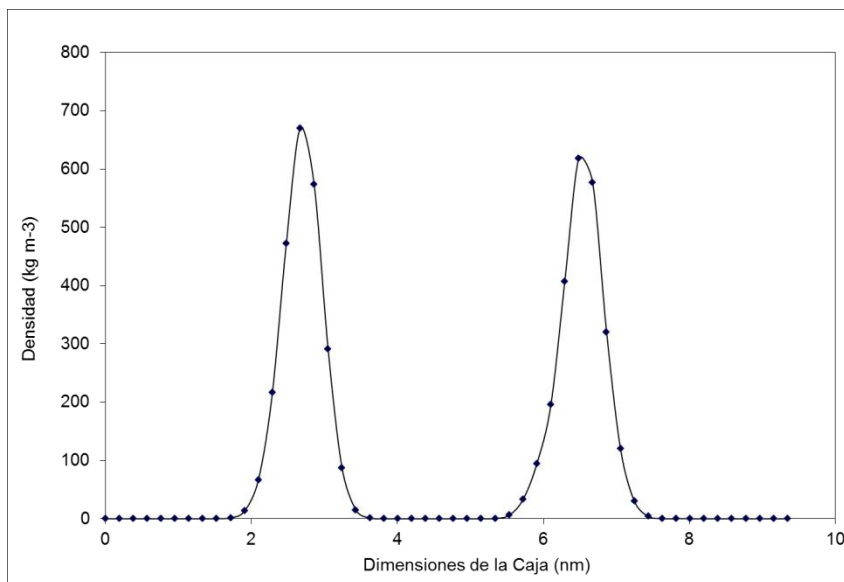


Figura 28. Densidad de los residuos de colina incluyendo el fosfato en la caja de simulación. El primer pico de mayor densidad corresponde a las moléculas de colina expuestas a el péptido 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰. El segundo pico corresponde a las moléculas de colina incluyendo al fosfato de la cara inferior de la membrana.

Los datos de orden se muestran en la **Figura 29**, en la que se compara el parámetro a 1ns y a 75 ns, demostrando que la inserción y estabilización del péptido en la membrana aumenta el orden de los lípidos en ésta. Esto, combinado con lo descrito en el desplazamiento y la densidad, indica que el péptido produce una rigidez y ordena la membrana incrementando las restricciones para una posible inserción en el núcleo de membrana.

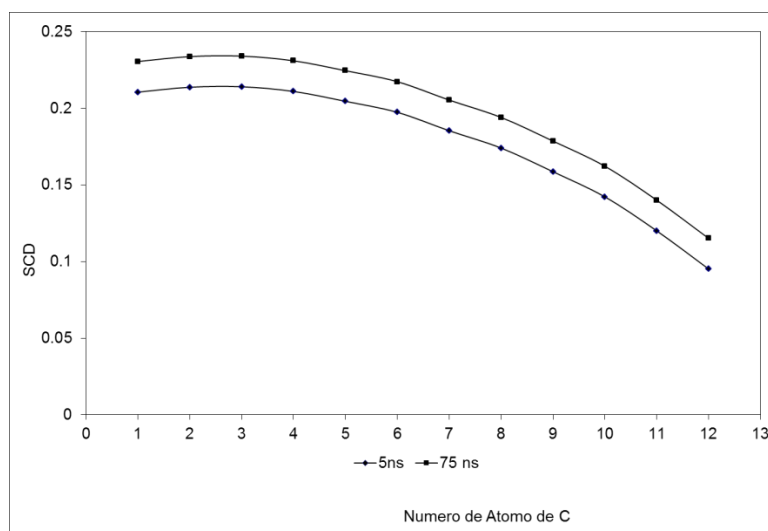


Figura 29 Parámetro de orden de deuterio de las cadenas acilo a 1ns y 75ns de simulación.

Es probable que los cambios observados en la estructura de la membrana se deban a los efectos locales del péptido sobre la membrana, en contraste con lo reportado en modelos de acción de PAs tradicionales (carpetas, barril, toroidal). Este estudio por dinámica molecular sugiere que el péptido genera un cierto orden alrededor del mismo. Es claro que este tipo de comportamientos es exclusivo para este péptido y no se puede generalizar, ya que el efecto exacto de un péptido depende de su composición química y configuración. En cualquier caso, se puede observar que existe una perturbación significativa en el parámetro de orden, en el desplazamiento y densidad debida a la interacción con el péptido.

IV RECOPIACION Y CONCLUSIONES

Los péptidos antimicrobianos son componentes esenciales en el sistema inmune y toman un papel importante en la defensa de los organismos. Su modo de acción está basado en la interacción con la membrana y han sido considerados como una nueva clase de antibióticos. Desde hace poco tiempo, estos estudios se han enfocado en modificar estos péptidos en su estructura para mejorar su actividad antimicrobiana. Sin embargo, la complejidad de los modos de acción no ha permitido encontrar un motivo estructural y secuencial que sirva como base en el desarrollo de péptidos selectivos a bacterias Gram negativas o Gram positivas. Por tanto, los esfuerzos se ha dirigido hacia el desarrollo de péptidos antimicrobianos superficiales, que inhiba el crecimiento y la adhesión entre bacterias.

En este trabajo se ha abordado este problema (Sección 3.1) utilizando como base estructural y de secuencia a proteínas del sistema inmune de la especie *Homo sapiens*, las cuales se han analizado desde criterios de secuencia, estructura y propiedades fisicoquímicas, encontrando una serie de péptidos como candidatos a PA. En esta parte del trabajo identificamos una región estructural de las proteínas analizadas (quimiocinas y citocinas) que se ajustaba a las propiedades fisicoquímicas que se han señalado como fundamentales para el desarrollo de PA (Sección 3.2).

De esta serie de posibles candidatos, se seleccionó uno con mayor probabilidad de tener actividad antimicrobiana y una baja hemólisis. De este candidato se evaluaron éstos dos últimos comportamientos y se encontró que el 1F9R 57-70 disminuye el crecimiento de *E. coli* (Gram Negativa) y de *S. cerevisiae* (de la familia de los ascomicetos). En *C. glabrata* (perteneciente a la misma familia de *S. cerevisiae*) el péptido actúa como inhibidor de crecimiento evidenciando actividad antifúngica. Esto demuestra que el péptido actúa como PA. Por tanto se concluye que:

1. Se encontró que a partir de un análisis, que involucra a proteínas de la respuesta inmune y análisis de propiedades fisicoquímicas relacionadas con la actividad antimicrobiana como estructura, tamaño, punto isoeléctrico, helicidad, hidrofobicidad y momento hidrofóbico, se pueden encontrar péptidos como el 1F9R 57-70 que tienen actividad antimicrobiana y baja actividad hemolítica.

El estudio además muestra que el péptido 1F9R 57-70 se ajusta al comportamiento predicho por el valor en sus propiedades fisicoquímicas.

La interacción péptido-membrana es un parámetro fundamental y juega un papel esencial en los mecanismos de acción de los PA para determinar el modelo de acción. En teoría, en esta interacción lleva a cambios conformacionales del péptido para alcanzar su conformación activa, penetrar y formar poros dentro de la membrana. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado péptidos con un tamaño inferior a 19 residuos de aminoácidos (los necesarios para hacer un cruce transmembranal), que tienen actividad antimicrobiana. Esto ha llevado a proponer dos teorías, la primera se basa en asociaciones de los PA en el núcleo de la membrana y la segunda, propone que el péptido disminuye la presión lateral de lípidos en la membrana y, por ende, la funcionalidad de ésta.

Los datos de actividad hemolítica, fluorescencia (Sección 3.3.3) e isothermas de adsorción (Sección 3.3.4) no permite registrar que el péptido genere poros, por el contrario se ajusta, aproximadamente, a una isoterma de adsorción de Langmuir. Por lo anterior sugerimos que el péptido actúa directamente sobre la membrana. Debido a esto, se desarrolló y planteó un modelo cinético adsorción del 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰, (Sección 3.4). El cual involucra un paso de tipo reversible, que permitió modelar la disminución de la concentración del péptido en solución acuosa por interacción con la membrana celular, además en su planteamiento el modelo evolutivo está en función de tres parámetros la capacidad de adsorción de la membrana C , y las constantes cinéticas k_f y k_s . Por tanto concluimos que:

2. El modelo cinético involucra de manera explícita a un parámetro de la membrana celular, como es el factor de recubrimiento. La aplicación de este modelo nos permite sugerir que la velocidad de adsorción está determinada por dos constantes, relacionadas con la velocidad de adsorción y la segunda con la desorción.

Por medio de la dinámica molecular exploramos una pregunta que surgió en ese trabajo: ¿Cómo afectan los cambios en conformación del 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰ debidos a la interacción con la membrana a esta misma? La respuesta a esta pregunta involucra al carácter microscópico del fenómeno de acción del PA. Con base en las simulaciones sugerimos que el péptido sufre cambios conformacionales en la interacción con la membrana y que se deben fundamentalmente a las interacciones entre los residuos de argininas y los grupos fosfato.

La membrana mostró varios comportamientos interesantes, entre ellos, un aumento en la densidad en los grupos colina de lado de la membrana expuesta al péptido, esto indica que el péptido penetra a la membrana pero no entra al núcleo de ésta.

Se observó una disminución en el desplazamiento lateral de los lípidos en la membrana cuando el péptido alcanza su estructura más estable, esta disminución en el desplazamiento está directamente relacionada con dos propiedades un aumento en el orden de la membrana y la disminución de la presión lateral.

La disminución en la presión lateral de la membrana presenta dificultades en la formación de balsas lipídicas, intercambio de alimento y expulsión de sustrato del interior de la célula. Por tanto, se concluye que:

3. El modelo de acción del péptido 1F9R 57-70 basado en la dinámica molecular, se da, probablemente, por un cambio en la conformación de éste en la superficie de membrana que afecta directamente la movilidad y presión lateral disminuyendo la fluidez de la membrana celular.

Bibliografía

1. *Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction.* **Verkleij, A.J., Post, J.A.** 2000, *J. Membr. Biol.*, Vol. 178, pp. 1-10.
2. *The effect of ethanol on the phase transition temperature and phase structure of monosaturated phosphatidylcholine.* **McIntosh, T.H., Lin, H., Li, S., and Huang, C.** 2001, *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 1510, pp. 219-230.
3. *Rational combinatorial design of pore-forming β -sheet peptides.* **Rausch, J., Marks, J., Wimley, W.** 2005, *PNAS*, Vol. 102, pp. 10511-10515.
4. *Human Macrophage Inflammatory Protein 3 : Protein and Peptide Nuclear Magnetic Resonance Solution Structures, Dimerization, Dynamics, and Anti-Infective Properties.* **Chan, D., Hunter, H., Tack, B., Vogel, H.** 2008, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 52, pp. 883 – 894.
5. *Beyond NMR spectra of antimicrobial peptides: dynamical images at atomistic resolution and functional insights.* **Ramamoorthy, A.** 2009, *Solid State NMR*, Vol. 35, pp. 201-207.
6. *Differential scanning calorimetry and X-Ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic system.* **K. Lohner, E.J Prenner.** 1999, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1462, pp. 141-156.
7. *The antimicrobial activity of CCL28 is dependent on C-terminal positively-charged aminoacids.* **Bin, L., Wilson, E.** 2010, *Eur. J. Immunol.*, Vol. 40, pp. 186-196.
8. *Optimization of the antimicrobial activity of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge.* **Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., Bienert, M.** 2001, *FEBS Lett.*, Vol. 501, pp. 146-150.
9. *Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interaction with lipid bilayers and biological membranes.* **Dathe, M., Schumann, M. Wieprecht, T. Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O., Bienert, M.** 1996, *Biochemistry*, Vol. 35, pp. 12612-12622.
10. *Mechanisms of Antimicrobial, Cytolytic, and Cell-Penetrating Peptides: From Kinetics to Thermodynamics.* **Almeida, P, F., and Pokorny, A.** 2009, *Biochemistry*, Vol. 48, pp. 8083-8093.
11. *Biomolecular engineering by combinatorial design and high-throughput screening: small soluble peptides that permeabilize membranes.* **Rathinakumar, R. Wimley, W. C.** 2008, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 130, pp. 9849-9858.
12. *From carpet mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptide.* **Shai, Y., and Oren, Z.** *Peptides*, Vol. 22, pp. 1629-1641.

13. *Inhibition of intracellular macromolecular synthesis in Staphylococcus aureus by thrombin-induced platelet microbicidal proteins.* **Xiong, Y., Bayer, A.S., Yeaman, M.R.** J. Infect. Dis., Vol. 186, pp. 667-688.
14. *Biomolecular simulation of membranes: Physical properties from different force fields.* **Siu, S., Vacha, R. Jungwirth, P., Bockmann, R.** 2008, J. Chem. Phys., Vol. 128, pp. 125013-1 125013-12.
15. *Interaction of the antimicrobial peptide Cyclo(RRWRF) with membranes by Molecular Dynamics simulations.* **Appelt, C., Eisenmenger, F., Kunhe, R., Schmieder, P., Soderhall, A.** 2005, Biophys. J., Vol. 89, pp. 2296-2306.
16. *peptide insertion, positioning, and stabilization in a membrane: Insight from an all-atom molecular dynamics simulation.* **Babakhani, A., Gorfe, A., Gullingsrud, J., Kim, J., McCammon, A.** 2007, Biopolymers, Vol. 85, pp. 490-497.
17. *Thermodynamics of Peptide Insertion and Aggregation in a Lipid Bilayer.* **Arneh B., Alemayehu A. Gorfe, Kim, J.e, McCammon, A.** 2008, J. Phys. Chem., Vol. 112, pp. 10528-10534.
18. *Pheripheral binding mode penetration depth of cobra cardiotoxin on phospholipid membranes as studied by a combination FTIR and computer simulation approach.* **Huang, W. N., Sue, S.C., Wang, S.D., Wu, P.L., Wu, W,C.** 2003, Biochem., Vol. 42, pp. 7457-7466.
19. *Construction of a toroidal model for the maginin pore.* **Murzin, K., Pasenkiewicz-Gierula, M.** 2003, J. Mol. Model., Vol. 9, pp. 217-224.
20. *Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder.* **Sengupta, D., Leontiadou, H., Mark, A., Marrink, S.J.** 2008, Biochem. Biophys. Acta, Vol. 1778, pp. 2308–2317.
21. *Alternative Mechanisms for the Interaction of the Cell-Penetrating Peptides Penetratin and the TAT Peptide with Lipid Bilayers.* **Yesylevskyy, S., Marrink, S., Mark, A.** 2009, Biophys. J., Vol. 97, pp. 40-49.
22. *High-throughput discovery of broad-spectrum peptides antibiotics.* **Rathinakumar, R., Wimley, W.** 2010, FASEB J., pp. 3232-3238.
23. *Biomolecular engineering by combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity.* **Rathinakumar, R., Wimley, W.** 2008, J. Chem. Phys., Vol. 128, pp. 125013-1 125013-12.
24. —. **Rathinakumar, R., Wimley, W.** 2008, J. Am. Chem. Soc., Vol. 130, pp. 9849-9858.
25. *Chemokine/Chemokine Receptor Nomenclature.* **Nomenclature., International Union of Immunological Societies/World Health Organization Subcommittee on Chemokine.** Immu., Vol. 12, pp. 121–127.

26. *Cytokine receptor signaling pathways*. **Warren J.L., Jian-Xin L.** 2000, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, pp. 877-888.
27. *Cytokines and their receptor complexes*. **Davies, R.D., Alexander, W.** 1995, *FASEB*, Vol. 9, pp. 50-57.
28. *Molecular mechanisms of cytokine and chemokine release from eosinophils activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: implication for Th17 lymphocytes-mediated allergic inflammation*. **Cheung, P.F., Wong, C.K., Lam, C.W.** 2008, *J. Immunol.*, Vol. 180(8), pp. 5625-5635.
29. *IL-3 induces down-regulation of CCR3 protein and mRNA in human eosinophils*. **Dulkys, Y., Kluthe, C., Buschermöhle, T., Barg, I., Knoss, S., Kapp, A.** 2001, *J. Immunol.*, Vol. 167, pp. 3443–3453.
30. —. **Dulkys, Y., Kluthe, C., Buschermöhle, T., Barg, I., Knöss, S., Kapp, A., Proudfoot, A.E., Elsner, J.** 2001, *J. Immunol.*, Vol. 167(6), pp. 3443-3453.
31. *Selective down-regulation of Th2 cytokines by C-terminal binding protein 2 in human T cells*. **Kitamura, F., Kitamura, N., Mori, A., Tatsumi, H., Nemoto, S., Miyoshi, H., Miyatake, S., Hiroi, T., Kaminuma, O.** 2010, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, Vol. 152, pp. 1-18.
32. *An unusual cytokine:Ig-domain interaction revealed in the crystal structure of leukemia inhibitory factor (LIF) in complex with the LIF receptor*. **Huyton T., Zhang, J.G., Luo, C.S., Lou, M.Z., Hilton, D.J., Nicola, N.A., Garrett, T.P.** 2007, *PNAS*, Vol. 104(31), pp. 12737-12342.
33. *Molecular Basis of Cytokine Receptor Activation*. **Lopez, A.F., Hercus, T.R., Ekert, P., Littler, D.R., Guthridge, M., Thomas, D., Ramshaw, H.S., Stomski, F., Perugini, M., D'Andrea, R., Grimbaldston, M., Parker, M.W.** 2010, *IUBMB Life*, Vol. 62(7), pp. 509-518.
34. *Structural biology of shared cytokine receptors*. **Wang, X., Lupardus, P., Laporte, S.L., Garcia, K.C.** 2007, *Annu. Rev. Immunol.*, Vol. 27, pp. 29-60.
35. *Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer*. **Brown, R.J., Adams, J.J., Pelekanos R.A., Wan, Y., McKinstry, W.J., Palethorpe, K., Seeber, R.M., Monks, T.A., Eidne, K.A., Parker, M.W., Waters, M.J.** 2005, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, Vol. 12(9), pp. 814-821.
36. *High- and low-affinity binding of GRO α and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils*. **Schumacher, C., Clark-Lewist, I., Baggiolini, M., Moser, B.** 1992, *PNAS*, Vol. 89, pp. 10542-10546.
37. *Structure-function studies of chemokine-derived carboxy-terminal antimicrobial peptides*. **Nguyen, L.T., Chan, D.I., Boszhard, L., Zaat, S.A., Vogel, H.J.** 2010, *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 1798(6), pp. 1062-1072.

38. *The antimicrobial activity of CCL28 is dependent on C-terminal positively-charged amino acid.* **Liu, B., Wilson, E.** 2010, *Eur.J.Immunol.*, Vol. 40, pp. 186-196.
39. *Determinants of High-Affinity Binding and Receptor Activation in the N-Terminus of CCL-19.* **Ott, T.R., Lio, F.M., Olshefski, D., Liu, X.J., Struthers, R.S., Ling N.** 2004, *Biochemistry*, Vol. 43(12), pp. 3670-3678.
40. *Defensins. Natural peptides antibiotics of human neutrophils.* **Gantz T, et al.** 1985, *J.Clin.Invest*, pp. 1427-1435.
41. *DEFENSINS: ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF INNATE IMMUNITY.* **Gantz, T.** 2003, *Nature, Immunology*, pp. 710-720.
42. *Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity.* **Zanetti, Margherita.** 2004, *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 75, pp. 39-48.
43. *Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function.* **Huang, Y., Huang, J., Chen, Y.** 2010, *Prot. Cell*, Vol. 1(2), pp. 143-152.
44. *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.* **Yeaman, M., Yount N.** 2003, *Pharmacol. Rev.*, Vol. 55, pp. 27-55.
45. *Rational combinatorial design of pore-forming B-sheet peptides.* **Rausch, M.J., Marks, J.R., Wimley, C.W.** 2005, *PNAS*, Vol. 102(30), pp. 10511-10515.
46. *Effects of arginine density on the membrane-bound structure of a cationic antimicrobial peptide from solid-state NMR.* **Tang, M., Waring, J. A., Hong, M.** 1788, 2009, *Biochim. Biophys. Acta.*, pp. 514-521.
47. *Surface behaviour and peptide-lipid interactions of the antibiotic peptides, Maculatin and Citropin.* **Ambroggio, E., Separovic, F., Bowie, J., Fidelio, G, D.** 2004, *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1664, pp. 31-7.
48. *Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes.* **Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O., Bienert, M.** 1996, *Biochemistry*, Vol. 35, pp. 12612-12622.
49. *Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge.* **Dathe, M., et, Al.** 2001, *FEBS Letters*, Vol. 501, pp. 146-150.
50. —. **Dathe, M., Meyer H.J., Beyermann, M., Bienert, M.** 2001, *FEBS Lett.*, Vol. 501, pp. 146-150.
51. *Three-dimensional structure of membrane and surface proteins.* **Eisenberg, D.** 1984, *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 53, pp. 595-623.

52. *Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes.* **Wieprecht, T., Dathe, M., Beyerman, M., Krause, E., Maloy, W.L., MacDonald, D.L., Biernat, M.** 1997, Vol. 36, pp. 6124-6132.
53. *Comparison of biophysical and biologic properties of alpha-helical enantiomeric antimicrobial peptides.* **Chen, Y.X., Vasil, A.I., Rehaume, L., Mant, C.T., Burns, J.L., Vasil, M. L., Hancock, R.E.W.,** 2006, Chem. Biol. Drug. Des., Vol. 67, pp. 162–173.
54. *The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers.* **Papo, N., Oren, Z., Pag, U., Sahl, H.G., Shai, Y.** 2002, J. Biol. Chem., Vol. 277, pp. 33913–33921.
55. *Peptide Antibiotics.* **Hancock, R.E.** Lancet, Vol. 349, pp. 418 – 422.
56. —. **Hancock, R.E., Chapple, D.S.** 1999, Antimicrobial. Agents. Chemother., Vol. 43, pp. 1317-1323.
57. *Binding of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides to lipid membranes: Lessons from temporins B and L.* **Mahalka, A.K., Kinnunen, P.** 2009, Biochim. Biophys. Acta., Vol. 1788, pp. 1600-1609.
58. *Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: A mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes?* **Arouri A., Dathe, M., Blume, A.** 2009, Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1788, pp. 650-659.
59. *Chemokine: Receptor Structure, interactions and Antagonism.* **Allen, S.J., Crown E. S., Handel M.T.** 2007, Annu. Rev. Immunology, Vol. 25, pp. 787-820.
60. *Cytokines and Chemokines.* **Borish, L., Steinke, J.W.** 2003, J. Allergy. Clin. Immunol., Vol. 111(2), pp. 460-475.
61. *Structural Biology of Shared Cytokine Receptors.* 2009, Annu. Rev. Immunol., Vol. 27, pp. 29-60.
62. *Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2.* **Jarnagin, K., Grunberger, D., Mulkins, M., Wong, B., Hemmerich, S., Paavola, C., Bloom, A., Bhakta, S., Diehl, F., Freedman, R., McCarley, D., Polsky, I., Ping-Tsou, A., Kosaka, A., Handel, T.M.** 38(49), 1999, Biochemistry, pp. 16167-16177.
63. *Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2.* **Hemmerich, S., Paavola, C., Bloom, A., Bhakta, S., Freedman, R.,** 1999, Biochemistry, Vol. 38, pp. 13013–13025.
64. *Molecular determinants of receptor binding and signaling by the CX3C chemokine fractalkine.* **Mizoue, L.S., Sullivan, S.K., King, D.S., Kledal, T.N., Schwartz, T.W.** 2001, J. Biol. Chem., Vol. 276, pp. 33906–33914.

65. *Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist.* **Simmons, G., Clapham, P.R., Picard, L., Offord, R.E., Rosenkilde, M.M.** 1997, *Science*, Vol. 276, pp. 276-279.
66. *Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5.* **Signoret, N., Pelchen-Matthews, A., Mack, M., Proudfoot, A.E., Marsh, M.** 2000, *J. Cell. Biol.*, Vol. 151, pp. 1281–1294.
67. *Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces.* **Wimley, W.C., White, S.H.** 1996, *Nat Struct Biol*, Vol. 3, pp. 842–848.
68. *Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 System.* **Sherry, L., LaPorte, Z., Juo, S., Vaclavikova, J., Colf, A.L., Qi, X., Heller, M.N., Keegan, A.D., Garcia, C.** 2008, *Cell*, Vol. 132, pp. 259-272.
69. *Many chemokines including CCL20/MIP-3 α display antimicrobial activity.* **Yang, D., Chem, Q., Hoover, D.M., Staley, P., Tucker, K.D., Lubkowi, J., Oppenheim, J.J.** 2003, *J. Leukoc. Biol.*, Vol. 74, pp. 448-455.
70. *Structural correlates of antimicrobial efficacy in IL-8 and related human kinocidins.* **Yount, N. Y., Waring, K.D. et, Al.** 2007, *Biochim. Biophys. Acta*, pp. 598-608.
71. *Peptide interfacial adsorption is kinetically limited by the thermodynamic stability of self association.* **Middelberg, A. P., Radke, C., Blanch, W. H.** 2000, *PNAS*, pp. 5054–5059.
72. *A quantitative model for the All or none permeabilization of phospholipid vesicles by antimicrobial peptide cecropin.* **Geogory, S., Cavanaugh, A., Journigan, V., and Almeida, F. P.** 2008, *Biophysical Journal*, pp. 1667-1680.
73. *Bioinformatics and Functional Genomics.* **Pevsner, J.** 2003, Wiley-Liss.
74. *SUPERFAMILY: HMMs representing all proteins of known structure. SCOP sequence searches, alignments and genome assignments.* **Gough, J., Chothia C.** 2002, *Nucleic. Acids. Res.*, Vol. 30, pp. 268-272.
75. *A model of evolutionary change in proteins.* **Dayhoff, M., R. Schwartz, Orcutt B.** In Dayhoff, M., ed.: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Vol. 5, pp. 345-352.
76. *Amino acid substitution matrices from protein blocks.* **Henikoff, S., Henikoff J.G.** *PNAS*, Vol. 89, pp. 10915-10919.
77. **Higgins, D. Lemey, P.** Multiple sequence alignment. *The phylogenetic handbook*. s.l. : Cambridge, 2009.
78. **Baxevanis, A. D.** Assessing pairwise sequence similarity: BLAST and FASTA. [book auth.] B.F. Francis Ouelette A. D. Baxevanis. *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*. s.l. : A. D. Baxevanis, B.F. Francis Ouelette,, 2005.

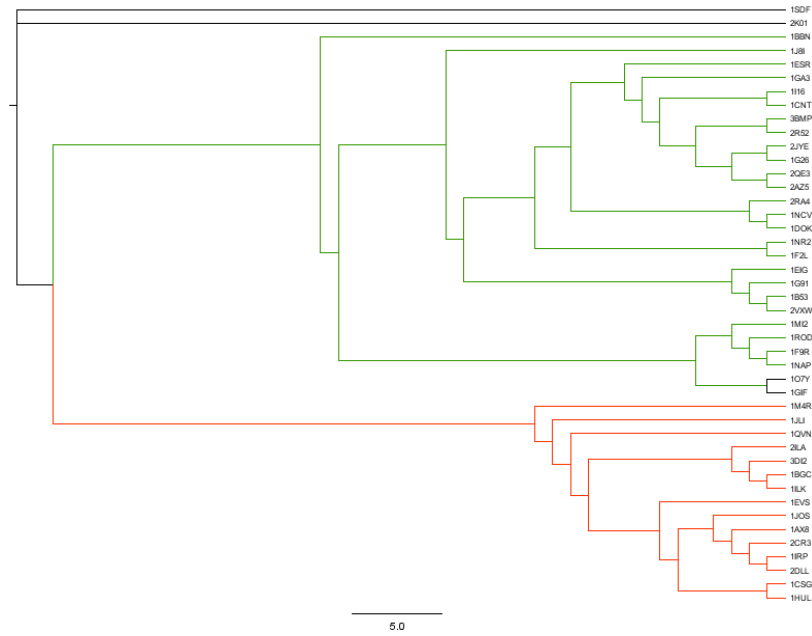
79. *The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.* **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, Higgins D. G.** 1997, *Nucleic Acids. Res.*, Vol. 28, pp. 4876-4882.
80. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, Gibson T. J.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. [book auth.] *Nucleic Acids. Res.* 1994, Vol. 22, pp. 4673-4680.
81. **Nei, M., Kumar, S.** *Molecular Evolution and Phylogenetics.* s.l. : Oxford University Press, 2000.
82. *Distributions of statistics used for the comparison of models of sequence evolution in phylogenetics.* **Whelan, S., Goldman, N.** 1999, *Mol. Biol. Evol.* , Vol. 16, pp. 1292-1299.
83. *A Note on the Neighbor-Joining Algorithm of Saitou and Nei.* **Studier, A.J.,Keppler J.** 1988, *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 5(6), pp. 729-731.
84. **Efron, B., Tibshirani, R.** *An Introduction to the Bootstrap.* s.l. : Chapman & Hall/CRC Monographs on Statistics & Applied Probability, 1993.
85. *TOPD/FMTS: a new software to compare phylogenetic trees.* **Puigbo, P., Garcia-Vallve, S., and McInerney J.O.,.** 2007, *Bioinformatics*, Vol. 23, pp. 1556-1558.
86. *Solid- State NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a B-sheet antimicrobial peptide, protegrin.* **Yamaguchi, S., Hong, T., Waring, A., Lehrer, R., and Hong, M.** 2002, *Biochemistry* , Vol. 41, pp. 9852-9862.
87. *The Membrane-Bound Structure and Topology of a Human R-Defensin Indicate a Dimer Pore Mechanism for Membrane Disruption.* **Zang, Y., Wuyuan, L., Hong, M.** 2010, *Biochemistry*, Vol. 49, pp. 9770-9782.
88. *Membranolytic antifungal activity of arenicin-1 requires the N-terminal tryptophan and the beta-turn arginine.* **Park, C., Cho, J., Lee, J., Lee, G.L.** 2011, *Biotechnol Lett*, Vol. 33, pp. 185–189.
89. *Structures of β -Hairpin Antimicrobial Protegrin Peptides in Lipopolysaccharide Membranes: Mechanism of Gram Selectivity Obtained from Solid-State Nuclear Magnetic Resonance.* **Yongchao Su, Y., Alan J. Waring, J.A., Ruchala, P., Hong, M.** 2011, *Biochemistry* , Vol. 50, pp. 2072-2083.
90. *Antimicrobial Activities and Structures of Two Linear Cationic Peptide Families with Various Amphipathic Sheet and Helical Potentials.* **Jin, Y., Hammer, J., Pate, M., Zhang, Y., Zhu, F., Zmuda, E., Blazyk, J.** 2005, *Antimicrob. Agents Chemother.* , Vol. 49(12), pp. 4957-4964.
91. *Conformational behavior of temporin A and temporin L in aqueous solution: a computational/experimental study.* **Abramo, M., Rinaldi, A.C., Bozzi, A., Amadei, G. A., Mignogna, A., Nola, D., Aschi, M.** 2006, *Biopolymers* , Vol. 81, pp. 215–224.

92. *Analysis of the antimicrobial activities of a chemokine-derived peptide (CDAP-4) on Pseudomonas aeruginosa.* **Martínez-Becerra, F. et al.** 2007, Biochemical and Biophysical Research Communications, pp. 352–358.
93. *Thrombocidins microbial protein from human blood platelets are C-terminal deletion products of CXC chemokine.* **Krijgsveld, J., Zaat, S.A.J., Meeldijk, J., van Veelen, P.A., Fang, G., Poolman, B., Brandt, E., Ehlert, J.E., Kuijpers, A.J., Engbers, G.H.M., Feijen, J., Dankert, J.** 2000, J. Biol. Chem., Vol. 270, pp. 20374-20381.
94. *Novel C-terminally truncated isoform of CXC chemokine β -tromboglobulin and their impact on neutrophil functions.* **Ehlert, J.E., Gerdes, J., Flad, H.D., Brandt, E.** 1998, J. Immunol., Vol. 161, pp. 4975-4982.
95. *The consequence of sequence alteration of an amphipathic α -helical antimicrobial peptide and its diastereomers.* **Papo, N., Oren, Z., Pag, U., Sahl, H.G., Shai, Y.** 2002, J. Biol. Chem., Vol. 277, pp. 33913–33921.
96. *Peptide Helicity and Membrane Surface Charge Modulate the Balance of Electrostatic and Hydrophobic Interactions with Lipid Bilayers and Biological Membrane.* **Dathe, M., Schumann, M., Krause, E., Beyermann, M., Biernet, M.** 1996, Biochemistry, Vol. 35, pp. 12612-12622.
97. *Elucidating the folding problem of α -helices: Local motifs, long-range electrostatics, ionic strength dependence and prediction of NMR parameters.* **Lacroix, E., Viguera A.R., Serrano, L.** 1998, J. Mol. Biol. , Vol. 284, pp. 173-191.
98. *Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters.* **Muñoz, V. & Serrano, L.** 1994, Nature. Struct. Biol., Vol. 1, pp. 399-409.
99. *Folding Amphipathic helices into membranes: Amphiphilicity Trumps Hydrophobicity.* **Vidal-Fernandez, M., Jayasingh, S., Ladokhin, S.A., White, H.S.** 2007, J. Mol. Biol. , Vol. 370, pp. 459-470.
100. *Oriented secondary structure in integral membrane proteins I. Circular dichroism and infrared spectroscopy of cytochrome oxidase in multilamellar films.* **Bazzy, M. D., Woody, R.W.** 1985, Biophys. J., Vol. 48, pp. 957-966.
101. *Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural network.* **Bohm, G., Muhr, R., and Jaenecke, R.** 1992, Prot. Eng, Vol. 5, pp. 191-195.
102. *Antimicrobial peptides derived from growth factors.* **Malmstein, M., Davoudi, M., Walse, B., Schmidtchen, A.** 2007, Growth Factor, Vol. 25, pp. 60-70.
103. *Membrane leakage induced by dynorphins.* **Hugonin, L., Vukojevic, V., Bakalkin, G., GrasLund, A.** 2006, FEBS Lett, Vol. 580, pp. 3201-3205.

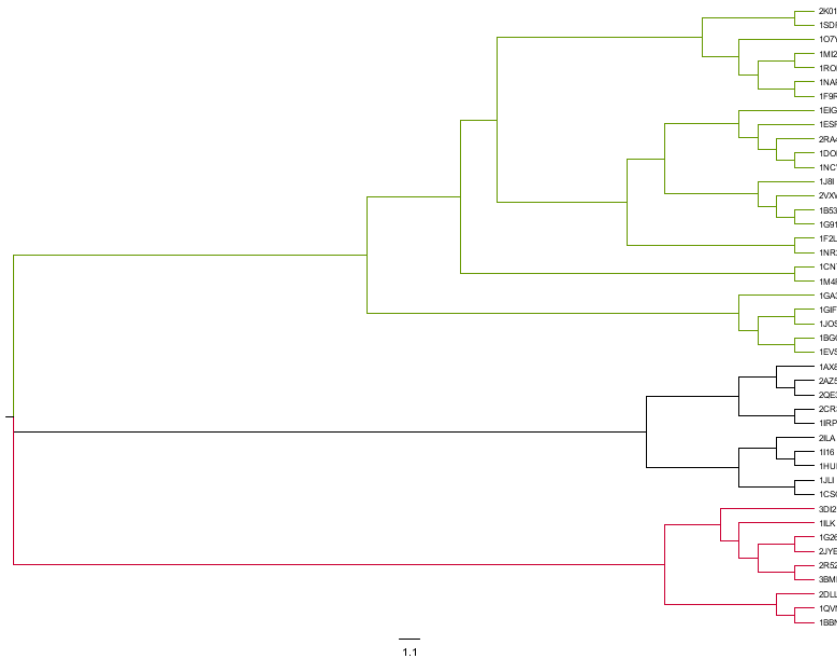
104. *On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon.* **Nakanishi, K., Sakiyama, T., Imamura, K.** 2001, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, pp. 233-244.
105. *Interface ellipsometry: An overview.* **Aspnes, D.E.** 1980, *Surf. Sci.*, Vols. 101(1-3), pp. 84-98.
106. *The interaction of proteins with solid surfaces.* **Gray, J, J.** 2004, *Current Opinion in Structural Biology*, Vol. 14, pp. 110-115.
107. *Peptide interfacial adsorption is kinetically limited by the thermodynamic stability of self association.* **Middelberg, P, J,A., Radke, C,J., Blanch, W,H.** 2000, *PNAS*, pp. 5054–5059.
108. *Dynamics of random sequential adsorption.* **Swendsen, R.H.** 1981, *Phys. Rev. A*, Vol. 24, pp. 504–508.
109. *Simulation studies of alamethicin bilayer.* **Biggin, P., C., Breed, J., Son, H. S., Sansom, M. S.** 1997, *Biophys J*, Vol. 72, pp. 627-636.
110. *Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin PI within phospholipid membranes.* **Gazit, E., Miller, I. R., Biggin, P. C, Sansom, M. S., Shai, Y.** 1996, *J. Mol. Biol.*, Vol. 258, pp. 860-870.
111. *Peptide-bilayer interactions: simulations of dermaseptin B, an antimicrobial peptide.* **La Rocca, P., Shai, Y., Sansom, M. S.** 1999, *Biophys. Chem.*, Vol. 76, pp. 145-159.
112. *A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer.* **Glattli, A., Chandrasekhar, I., van Gunsteren, W. F.** 2006, *Eur. Biophys. J.*, Vols. 35, (3), pp. 255-267.
113. *The structural properties of magainin in water, TFE/water, and aqueous urea solutions: molecular dynamics simulations.* **Mehrnejad, F., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B.** 2007, *Proteins*, Vol. 67 (4), pp. 931-940.
114. *Alamethicin helices in a bilayer and in solution: molecular dynamics simulations.* **Tieleman, D. P., Sansom, M. S., Berendsen, H. J.** 1999, *Biophys. J.*, Vol. 76, pp. 40-49.
115. *Peptide insertion, positioning, and stabilization in a membrane: Insight from an all-atom molecular dynamics simulation.* **Babakhani, A., Gorfe, A., Gullingsrud, J., Kim, E. K., McCammon, J.A.** *Biopolymer.*, Vols. 85 (5-6), pp. 490-497.
116. **Frenkel, D., Smit, B.** *Molecular Dynamics: A program. Understanding molecular simulation: From algorithms to applications.* Amsterdam, The Netherlands : Academic Press, 1996.
117. **D. van der Spoel., Lindahl, E., Hess, B., van Buuren, R.A., Apol,E., Meulenhoff, J.P.** *Gromacs User Manual version 4.5.4.* [Online] 2010. www.gromacs.org.

118. *A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6.* **OOSTENBRINK, C., VILLA, A., MARK, A, E., VAN GUNSTEREN, W.** 2004, *J. Comput. Chem.*, Vol. 25, pp. 1656–1676.
119. *Development of a physics-based force field for the scoring and refinement of protein models.* **Wroblewska, L., Jagielska, A., Skolnick, J.** 2008, *Biophys. J.*, Vol. 94, pp. Development of a physics-based force field for the scoring and refinement of protein models.
120. **Oostenbrink, C., Soares, T.A, van der Vegt N.A., van Gunsteren, W.F.** Validation of the 53A6 GROMOS force field. [book auth.] *Eur. Biophys. J.I.* Vol. 34(4), pp. 273-284.
121. *The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin.* **Jorgensen, L, W., Tirado, R.** 1988, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 110, pp. 1657–1666.
122. *GROMACS: Fast, Flexible, and Free.* **Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark E. A., Berendsen, J.C. H.** 2005, *J. Comput. Chem.*, Vol. 26, pp. 1701-1718.
123. *Computer simulation of partitioning of ten pentapeptides Ace-WLXLL at the cyclohexane/water and phospholipid/water interfaces.* **Aliste, Mp., Tieleman P, D.** 2005, *BMC Biochem.*, Vol. 6, p. 30.
124. *Aggregation of cateslytin beta-sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides?* **Jean-François, F., Castano, S., Desbat, B., Odaert, B., Roux, M., Metz-Boutigue, M.H., Dufourc, E.J.** 2008, *Biochemistry*, Vol. 47(24), pp. 6394-6402.
125. *Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma.* **Rempel, S.A., Dudas, S., Ge, S., Gutiérrez, J.A.** 2000 : s.n., *Clin. Cancer Res.*, Vol. 6(1), pp. 102-111.
126. *Pol angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study.* **Uematsu, N., Matsuzaki, K.** 2000, *Biophys. J.*, Vol. 79, pp. 2075-2083.
127. *Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis.* **Tyler, E.M., Ananthramiah G.M., Walker D.E., Mishra, V.K., Palgunachari M.N., Segrest, J.P.** 1995, *Biochemistry*, Vol. 34, pp. 4393-4401.
128. *Two-state models of protein folding kinetics.* **Zwanzig, R.** *PNAS*, Vol. 94, pp. 148-150.

Anexo 1
Dendogramas Obtenidos por los modelos BLOSUM y WAG



Dendograma obtenido por el modelo WAG con las 38 proteínas entre citocinas y quimiocinas



Dendograma obtenido por el modelo BLOSUM con las 38 proteínas entre citocinas y quimiocinas

Anexo 2
Curvas de Crecimiento
E. coli

T (h)	Curvas de Crecimiento en E. coli								Curvas de Crecimiento en E. coli								Curvas de Crecimiento en E. coli								Curvas de Crecimiento en E. coli								Curvas de Crecimiento en E. coli							
	1F9R57-70								1F9R57-70								1F9R57-70								1F9R57-70								1F9R57-70							
	0.0 mg/mL								0.22 mg/mL								0.44 mg/mL								0.66 mg/mL								0.88 mg/mL							
	P1	P2	P3	s	x	±	±%	P1	P2	P3	s	x	±	±%	P1	P2	P3	s	x	±	±%	P1	P2	P3	s	x	±	±%	P1	P2	P3	s	x	±	±%					
1	0.156	0.153	0.159	0.002	0.156	0.005	3.21	0.152	0.155	0.155	0.001	0.154	0.002	1.30	0.140	0.137	0.139	0.001	0.139	0.002	1.44	0.138	0.135	0.137	0.001	0.137	0.002	1.46	0.119	0.117	0.117	0.001	0.118	0.002	1.69					
2	0.181	0.177	0.185	0.003	0.181	0.007	3.87	0.180	0.184	0.184	0.002	0.183	0.005	2.73	0.143	0.140	0.146	0.002	0.143	0.005	3.50	0.128	0.131	0.131	0.001	0.130	0.002	1.54	0.117	0.119	0.119	0.001	0.118	0.002	1.69					
3	0.240	0.235	0.245	0.004	0.240	0.010	4.17	0.233	0.228	0.238	0.004	0.233	0.010	4.29	0.160	0.163	0.157	0.002	0.160	0.005	3.13	0.129	0.132	0.132	0.001	0.131	0.002	1.53	0.118	0.116	0.116	0.001	0.117	0.002	1.71					
4	0.327	0.334	0.320	0.006	0.327	0.015	4.59	0.323	0.317	0.329	0.005	0.323	0.012	3.72	0.193	0.189	0.197	0.003	0.193	0.007	3.63	0.126	0.123	0.129	0.002	0.126	0.005	3.97	0.119	0.121	0.117	0.002	0.119	0.005	4.20					
5	0.478	0.488	0.488	0.005	0.485	0.012	2.47	0.479	0.489	0.489	0.005	0.486	0.012	2.47	0.257	0.262	0.262	0.002	0.260	0.005	1.92	0.125	0.128	0.123	0.002	0.125	0.005	4.00	0.119	0.121	0.117	0.002	0.119	0.005	4.20					
6	0.682	0.696	0.668	0.011	0.682	0.027	3.96	0.692	0.678	0.706	0.011	0.692	0.027	3.90	0.361	0.368	0.354	0.006	0.361	0.015	4.16	0.132	0.135	0.129	0.002	0.132	0.005	3.79	0.119	0.121	0.121	0.001	0.120	0.002	1.67					
7	0.900	0.918	0.918	0.008	0.912	0.020	2.19	0.909	0.927	0.927	0.008	0.921	0.020	2.17	0.540	0.551	0.551	0.005	0.547	0.012	2.19	0.129	0.126	0.132	0.002	0.129	0.005	3.88	0.119	0.121	0.121	0.001	0.120	0.002	1.67					
8	1.060	1.039	1.081	0.017	1.060	0.042	3.96	1.070	1.049	1.049	0.010	1.056	0.025	2.37	0.769	0.754	0.784	0.012	0.769	0.030	3.90	0.133	0.130	0.130	0.001	0.131	0.002	1.53	0.118	0.116	0.120	0.002	0.118	0.005	4.24					
9	1.169	1.192	1.146	0.019	1.169	0.047	4.02	1.179	1.203	1.203	0.011	1.195	0.027	2.26	0.975	0.956	0.995	0.016	0.975	0.040	4.10	0.139	0.142	0.142	0.001	0.141	0.002	1.42	0.118	0.120	0.120	0.001	0.119	0.002	1.68					
10	1.245	1.270	1.220	0.020	1.245	0.050	4.02	1.254	1.229	1.229	0.012	1.237	0.030	2.43	1.133	1.110	1.156	0.019	1.133	0.047	4.15	0.153	0.150	0.150	0.001	0.151	0.002	1.32	0.117	0.119	0.119	0.001	0.118	0.002	1.69					
11	1.258	1.283	1.233	0.020	1.258	0.050	3.97	1.258	1.283	1.283	0.012	1.275	0.030	2.35	1.231	1.256	1.256	0.012	1.248	0.030	2.40	0.171	0.168	0.174	0.002	0.171	0.005	2.92	0.116	0.118	0.114	0.002	0.116	0.005	4.31					
12	1.243	1.268	1.218	0.020	1.243	0.050	4.02	1.244	1.219	1.269	0.020	1.244	0.050	4.02	1.292	1.318	1.318	0.012	1.309	0.030	2.29	0.199	0.195	0.195	0.002	0.196	0.005	2.55	0.116	0.114	0.114	0.001	0.115	0.002	1.74					
13	1.234	1.209	1.259	0.020	1.234	0.050	4.05	1.235	1.210	1.260	0.020	1.235	0.050	4.05	1.296	1.322	1.322	0.012	1.313	0.030	2.28	0.255	0.250	0.260	0.004	0.255	0.010	3.92	0.116	0.118	0.114	0.002	0.116	0.005	4.31					
14	1.231	1.256	1.256	0.012	1.248	0.030	2.40	1.229	1.204	1.254	0.020	1.229	0.050	4.07	1.282	1.308	1.256	0.021	1.282	0.052	4.06	0.358	0.365	0.351	0.006	0.358	0.015	4.19	0.117	0.119	0.115	0.002	0.117	0.005	4.27					
15	1.233	1.208	1.258	0.020	1.233	0.050	4.06	1.236	1.211	1.261	0.020	1.236	0.050	4.05	1.276	1.302	1.302	0.012	1.293	0.030	2.32	0.521	0.511	0.511	0.005	0.514	0.012	2.33	0.118	0.120	0.116	0.002	0.118	0.005	4.24					
16	1.236	1.211	1.211	0.012	1.219	0.030	2.46	1.236	1.261	1.211	0.020	1.236	0.050	4.05	1.276	1.302	1.250	0.021	1.276	0.052	4.08	0.752	0.737	0.737	0.007	0.742	0.017	2.29	0.122	0.120	0.124	0.002	0.122	0.005	4.10					
17	1.240	1.265	1.265	0.012	1.257	0.030	2.39	1.243	1.268	1.218	0.020	1.243	0.050	4.02	1.278	1.304	1.304	0.012	1.295	0.030	2.32	0.970	0.951	0.989	0.016	0.970	0.040	4.12	0.127	0.124	0.124	0.001	0.125	0.002	1.60					
18	1.250	1.225	1.225	0.012	1.233	0.030	2.43	1.249	1.274	1.274	0.012	1.266	0.030	2.37	1.286	1.260	1.260	0.012	1.269	0.030	2.36	1.141	1.118	1.118	0.011	1.126	0.027	2.40	0.137	0.134	0.134	0.001	0.135	0.002	1.48					
19	1.258	1.233	1.283	0.020	1.258	0.050	3.97	1.256	1.231	1.281	0.020	1.256	0.050	3.98	1.296	1.270	1.322	0.021	1.296	0.052	4.01	1.256	1.231	1.281	0.020	1.256	0.050	3.98	0.151	0.154	0.148	0.002	0.151	0.005	3.31					
20	1.268	1.293	1.243	0.020	1.268	0.050	3.94	1.266	1.291	1.291	0.012	1.283	0.030	2.34	1.310	1.336	1.284	0.021	1.310	0.052	3.97	1.328	1.355	1.301	0.022	1.328	0.055	4.14	0.170	0.173	0.173	0.001	0.172	0.002	1.16					
21	1.274	1.249	1.299	0.020	1.274	0.050	3.92	1.276	1.302	1.302	0.012	1.293	0.030	2.32	1.320	1.346	1.346	0.012	1.337	0.030	2.24	1.350	1.323	1.377	0.022	1.350	0.055	4.07	0.213	0.217	0.209	0.003	0.213	0.007	3.29					
22	1.278	1.252	1.252	0.012	1.261	0.030	2.38	1.280	1.254	1.306	0.021	1.280	0.052	4.06	1.328	1.301	1.355	0.022	1.328	0.055	4.14	1.342	1.369	1.369	0.013	1.360	0.032	2.35	0.288	0.282	0.294	0.005	0.288	0.012	4.17					
23	1.280	1.306	1.306	0.012	1.297	0.030	2.31	1.282	1.256	1.308	0.021	1.282	0.052	4.06	1.332	1.305	1.359	0.022	1.332	0.055	4.13	1.336	1.309	1.363	0.022	1.336	0.055	4.12	0.418	0.410	0.426	0.007	0.418	0.017	4.07					
24	1.282	1.308	1.308	0.012	1.299	0.030	2.31	1.286	1.260	1.260	0.012	1.269	0.030	2.36	1.332	1.305	1.359	0.022	1.332	0.055	4.13	1.334	1.307	1.361	0.022	1.334	0.055	4.12	0.619	0.607	0.607	0.006	0.611	0.015	2.45					
25	1.280	1.306	1.306	0.012	1.297	0.030	2.31	1.284	1.310	1.310	0.012	1.301	0.030	2.31	1.334	1.361	1.307	0.022	1.334	0.055	4.12	1.338	1.365	1.311	0.022	1.338	0.055	4.11	0.869	0.852	0.852	0.008	0.858	0.020	2.33					
	P1	Prueba 1						s	Desviación Estándar					±%	Porcentaje del Intervalo de Confianza						P1	Prueba 1						s	Desviación Estándar											
	P2	Prueba 2						x	Promedio													P2	Prueba 2						x	Promedio										
	P3	Prueba 3						±	Intervalo de Confianza													P3	Prueba 3						±	Intervalo de Confianza										

Anexo 2
Curvas de Crecimiento
S. cerevisiae

T (h)	C. Creci.en S. cerevisiae								C. Creci.en S. cerevisiae								C. Creci.en S. cerevisiae								C. Creci.en S. cerevisiae															
	1F9R57-70								1F9R57-70								1F9R57-70								1F9R57-70															
	0.0 mg/mL								0.22 mg/mL								0.44 mg/mL								0.66 mg/mL								0.88 mg/mL							
	P1	P2	P3	s	x	±	±%		P1	P2	P3	s	x	±	±%		P1	P2	P3	s	x	±	±%		P1	P2	P3	s	x	±	±%		P1	P2	P3	s	x	±	±%	
1	0.105	0.107	0.103	0.002	0.103	0.003	4.76	0.103	0.103	0.107	0.002	0.103	0.003	4.76	0.104	0.107	0.107	0.001	0.106	0.002	1.89	0.105	0.107	0.103	0.002	0.103	0.003	4.76	0.103	0.101	0.101	0.001	0.102	0.002	1.96					
2	0.105	0.107	0.107	0.001	0.106	0.002	1.89	0.104	0.106	0.102	0.002	0.104	0.003	4.81	0.103	0.103	0.103	0.001	0.104	0.002	1.92	0.104	0.106	0.102	0.002	0.104	0.003	4.81	0.103	0.101	0.101	0.001	0.102	0.002	1.96					
3	0.105	0.103	0.103	0.001	0.104	0.002	1.92	0.109	0.111	0.107	0.002	0.109	0.003	4.39	0.106	0.104	0.108	0.002	0.106	0.003	4.72	0.108	0.110	0.106	0.002	0.108	0.003	4.63	0.103	0.101	0.103	0.002	0.103	0.003	4.83					
4	0.123	0.123	0.128	0.002	0.123	0.003	4.00	0.113	0.117	0.117	0.001	0.116	0.002	1.72	0.109	0.111	0.107	0.002	0.109	0.003	4.39	0.112	0.113	0.113	0.001	0.114	0.002	1.73	0.103	0.101	0.101	0.001	0.102	0.002	1.96					
5	0.133	0.132	0.132	0.001	0.133	0.002	1.90	0.121	0.123	0.118	0.002	0.121	0.003	4.13	0.113	0.117	0.117	0.001	0.116	0.002	1.72	0.109	0.111	0.111	0.001	0.110	0.002	1.82	0.106	0.104	0.108	0.002	0.106	0.003	4.72					
6	0.177	0.173	0.173	0.002	0.174	0.003	2.87	0.137	0.134	0.139	0.002	0.137	0.003	3.65	0.121	0.123	0.118	0.002	0.121	0.003	4.13	0.114	0.117	0.112	0.002	0.114	0.003	4.39	0.109	0.107	0.111	0.002	0.109	0.003	4.39					
7	0.339	0.332	0.346	0.006	0.339	0.013	4.42	0.181	0.183	0.177	0.003	0.181	0.007	3.87	0.136	0.139	0.139	0.001	0.138	0.002	1.43	0.121	0.123	0.118	0.002	0.121	0.003	4.13	0.114	0.112	0.112	0.001	0.113	0.002	1.77					
8	0.494	0.484	0.504	0.008	0.494	0.020	4.03	0.280	0.274	0.274	0.003	0.276	0.007	2.34	0.181	0.183	0.178	0.003	0.181	0.007	3.87	0.137	0.134	0.134	0.001	0.133	0.002	1.48	0.120	0.122	0.122	0.001	0.121	0.002	1.63					
9	0.710	0.724	0.724	0.007	0.719	0.017	2.36	0.390	0.382	0.397	0.006	0.390	0.013	3.83	0.279	0.273	0.283	0.003	0.279	0.012	4.30	0.181	0.183	0.183	0.002	0.184	0.003	2.72	0.136	0.133	0.139	0.002	0.136	0.003	3.68					
10	0.938	0.919	0.937	0.016	0.938	0.040	4.26	0.647	0.660	0.660	0.006	0.636	0.013	2.29	0.389	0.397	0.397	0.004	0.394	0.010	2.34	0.280	0.274	0.283	0.004	0.280	0.010	3.37	0.181	0.183	0.183	0.002	0.184	0.003	2.72					
11	1.139	1.116	1.116	0.011	1.124	0.027	2.40	1.024	1.004	1.043	0.017	1.024	0.042	4.10	0.646	0.639	0.633	0.011	0.646	0.027	4.18	0.389	0.381	0.397	0.007	0.389	0.017	4.37	0.279	0.283	0.273	0.003	0.279	0.012	4.30					
12	1.247	1.222	1.222	0.012	1.230	0.030	2.44	1.143	1.122	1.168	0.019	1.143	0.047	4.10	1.023	1.004	1.043	0.017	1.023	0.042	4.10	0.646	0.634	0.639	0.010	0.646	0.023	3.87	0.389	0.397	0.381	0.007	0.389	0.017	4.37					
13	1.292	1.318	1.266	0.021	1.292	0.032	4.02	1.190	1.166	1.166	0.011	1.174	0.027	2.30	1.146	1.123	1.169	0.019	1.146	0.047	4.10	1.023	1.004	1.004	0.010	1.011	0.023	2.47	0.646	0.633	0.639	0.011	0.646	0.027	4.18					
14	1.298	1.272	1.272	0.012	1.281	0.030	2.34	1.234	1.229	1.279	0.020	1.234	0.030	3.99	1.191	1.167	1.167	0.011	1.173	0.027	2.30	1.146	1.123	1.169	0.019	1.146	0.047	4.10	1.024	1.044	1.044	0.009	1.037	0.022	2.12					
15	1.312	1.286	1.338	0.021	1.312	0.032	3.96	1.283	1.308	1.237	0.021	1.283	0.032	4.03	1.234	1.229	1.279	0.020	1.234	0.030	3.99	1.190	1.214	1.214	0.011	1.206	0.027	2.24	1.143	1.168	1.168	0.011	1.160	0.027	2.33					
16	1.316	1.342	1.342	0.012	1.333	0.030	2.25	1.316	1.290	1.290	0.012	1.299	0.030	2.31	1.283	1.308	1.308	0.012	1.300	0.030	2.31	1.234	1.279	1.279	0.012	1.271	0.030	2.36	1.190	1.166	1.214	0.020	1.190	0.030	4.20					
17	1.314	1.340	1.340	0.012	1.331	0.030	2.23	1.316	1.342	1.290	0.021	1.316	0.032	3.93	1.316	1.290	1.342	0.021	1.316	0.032	3.93	1.283	1.237	1.237	0.012	1.266	0.030	2.37	1.234	1.279	1.279	0.012	1.271	0.030	2.36					
18	1.316	1.290	1.290	0.012	1.299	0.030	2.31	1.312	1.286	1.338	0.021	1.312	0.032	3.96	1.316	1.342	1.342	0.012	1.333	0.030	2.23	1.317	1.290	1.343	0.022	1.317	0.033	4.18	1.282	1.296	1.296	0.012	1.263	0.030	2.37					
19	1.314	1.340	1.340	0.012	1.331	0.030	2.23	1.327	1.301	1.334	0.022	1.327	0.033	4.14	1.313	1.287	1.287	0.012	1.296	0.030	2.31	1.316	1.342	1.290	0.021	1.316	0.032	3.93	1.316	1.290	1.342	0.021	1.316	0.032	3.93					
20	1.314	1.340	1.288	0.021	1.314	0.032	3.96	1.328	1.301	1.301	0.013	1.310	0.032	2.44	1.320	1.346	1.293	0.022	1.320	0.033	4.17	1.313	1.286	1.286	0.013	1.293	0.032	2.47	1.316	1.290	1.290	0.012	1.299	0.030	2.31					
21	1.312	1.286	1.286	0.012	1.293	0.030	2.32	1.326	1.299	1.299	0.013	1.308	0.032	2.43	1.319	1.293	1.293	0.012	1.302	0.030	2.30	1.323	1.349	1.349	0.012	1.340	0.030	2.24	1.312	1.286	1.338	0.021	1.312	0.032	3.96					
	P1	Prueba 1						s	Desviacion Estandar						±%	Porcentaje del Intervalo de Confianza t						P1	Prueba 1						s	Desviacion Estandar										
	P2	Prueba 2						x	Promedio																P2	Prueba 2						x	Promedio							
	P3	Prueba 3						±	Intervalo de Confianza t																P3	Prueba 3						±	Intervalo de Confianza t							

Anexo 2

Curvas de Crecimiento

C. glabrata

C. CreLen C. glabrata										C. CreLen C. glabrata										C. CreLen C. glabrata										C. CreLen C. glabrata										C. CreLen C. glabrata									
1F9R57-70										1F9R57-70										1F9R57-70										1F9R57-70										1F9R57-70									
0.6 mg/mL										0.22 mg/mL										0.44 mg/mL										0.66 mg/mL										0.88 mg/mL									
T(h)	P1	P2	P3	s	x	±	±%	P1	P2	P3	s	x	±	±%	P1	P2	P3	s	x	±	±%	P1	P2	P3	s	x	±	±%	P1	P2	P3	s	x	±	±%														
1	0.397	0.389	0.405	0.007	0.397	0.017	4.28	0.319	0.313	0.325	0.005	0.319	0.012	3.76	0.330	0.337	0.323	0.006	0.330	0.015	4.55	0.152	0.155	0.155	0.001	0.154	0.002	1.30	0.153	0.156	0.150	0.002	0.153	0.005	3.27														
2	0.636	0.623	0.649	0.011	0.636	0.027	4.25	0.263	0.268	0.268	0.002	0.266	0.005	1.88	0.077	0.075	0.079	0.002	0.077	0.005	6.49	0.153	0.156	0.156	0.001	0.155	0.002	1.29	0.153	0.156	0.156	0.001	0.155	0.002	1.29														
3	1.048	1.069	1.027	0.017	1.048	0.042	4.01	0.079	0.081	0.077	0.002	0.079	0.005	6.33	0.077	0.075	0.079	0.001	0.078	0.002	2.56	0.153	0.150	0.150	0.001	0.151	0.002	1.32	0.153	0.156	0.150	0.002	0.153	0.005	3.27														
4	1.421	1.393	1.449	0.023	1.421	0.057	4.01	0.080	0.078	0.082	0.002	0.080	0.005	6.25	0.077	0.075	0.079	0.002	0.077	0.005	6.49	0.153	0.150	0.156	0.002	0.153	0.005	3.27	0.153	0.150	0.156	0.002	0.153	0.005	3.27														
5	1.692	1.726	1.726	0.016	1.715	0.040	2.33	0.080	0.078	0.078	0.001	0.079	0.002	2.53	0.077	0.075	0.079	0.001	0.078	0.002	2.56	0.153	0.150	0.150	0.001	0.151	0.002	1.32	0.154	0.157	0.157	0.001	0.156	0.002	1.28														
6	1.770	1.805	1.735	0.029	1.770	0.072	4.07	0.079	0.081	0.077	0.002	0.079	0.005	6.33	0.077	0.075	0.075	0.001	0.076	0.002	2.63	0.153	0.156	0.156	0.001	0.155	0.002	1.29	0.154	0.151	0.151	0.001	0.152	0.002	1.32														
7	1.778	1.814	1.742	0.029	1.778	0.072	4.05	0.080	0.078	0.082	0.002	0.080	0.005	6.25	0.077	0.079	0.075	0.002	0.077	0.005	6.49	0.153	0.156	0.150	0.002	0.153	0.005	3.27	0.154	0.157	0.151	0.002	0.154	0.005	3.25														
8	1.788	1.752	1.824	0.029	1.788	0.072	4.03	0.080	0.082	0.082	0.001	0.081	0.002	2.47	0.077	0.075	0.075	0.001	0.076	0.002	2.63	0.154	0.157	0.151	0.002	0.154	0.005	3.25	0.154	0.151	0.157	0.002	0.154	0.005	3.25														
9	1.788	1.824	1.824	0.017	1.812	0.042	2.32	0.080	0.082	0.082	0.001	0.081	0.002	2.47	0.077	0.075	0.079	0.002	0.077	0.005	6.49	0.154	0.157	0.151	0.002	0.154	0.005	3.25	0.154	0.157	0.151	0.002	0.154	0.005	3.25														
10	1.790	1.754	1.754	0.017	1.766	0.042	2.38	0.080	0.082	0.078	0.002	0.080	0.005	6.25	0.078	0.080	0.076	0.002	0.078	0.005	6.41	0.153	0.150	0.156	0.002	0.153	0.005	3.27	0.154	0.157	0.151	0.002	0.154	0.005	3.25														
11	1.794	1.830	1.830	0.017	1.818	0.042	2.31	0.080	0.078	0.078	0.001	0.079	0.002	2.53	0.077	0.075	0.079	0.002	0.077	0.005	6.49	0.154	0.151	0.157	0.002	0.154	0.005	3.25	0.154	0.151	0.151	0.001	0.152	0.002	1.32														
12	1.796	1.832	1.832	0.017	1.820	0.042	2.31	0.080	0.078	0.082	0.002	0.080	0.005	6.25	0.077	0.079	0.075	0.002	0.077	0.005	6.49	0.153	0.156	0.150	0.002	0.153	0.005	3.27	0.154	0.157	0.157	0.001	0.156	0.002	1.28														
13	1.794	1.758	1.830	0.029	1.794	0.072	4.01	0.080	0.082	0.082	0.001	0.081	0.002	2.47	0.077	0.075	0.075	0.001	0.076	0.002	2.63	0.154	0.157	0.151	0.002	0.154	0.005	3.25	0.155	0.152	0.152	0.001	0.153	0.002	1.31														
14	1.792	1.828	1.828	0.017	1.816	0.042	2.31	0.080	0.082	0.082	0.001	0.081	0.002	2.47	0.077	0.075	0.079	0.001	0.078	0.002	2.56	0.154	0.157	0.151	0.002	0.154	0.005	3.25	0.155	0.152	0.152	0.001	0.153	0.002	1.31														
15	1.790	1.754	1.826	0.029	1.790	0.072	4.02	0.080	0.078	0.078	0.001	0.079	0.002	2.53	0.078	0.076	0.080	0.002	0.078	0.005	6.41	0.154	0.157	0.157	0.001	0.156	0.002	1.28	0.155	0.152	0.152	0.001	0.153	0.002	1.31														
16	1.792	1.828	1.756	0.029	1.792	0.072	4.02	0.080	0.078	0.078	0.001	0.079	0.002	2.53	0.077	0.075	0.079	0.001	0.078	0.002	2.56	0.154	0.151	0.151	0.001	0.152	0.002	1.32	0.155	0.158	0.158	0.001	0.157	0.002	1.27														
P1	Prueba 1			s	Desviación Estándar			±%	Porcentaje del Intervalo de Confianza t			P1	Prueba 1			s	Desviación Estándar																																
P2	Prueba 2			x	Promedio						P2	Prueba 2			x	Promedio																																	
P3	Prueba 3			±	Intervalo de Confianza t						P3	Prueba 3			±	Intervalo de Confianza t																																	

ANEXO 3
Fluorescencia

Concentración de 0.22 mg/mL 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰

Tiempo (s)	Fluorescencia																		%L	Intervalo de Confianza ±
	1F9R 57-70						1F9R 57-70						1F9R 57-70							
	0.22 mg/mL			s	x	±	0.22 mg/mL			s	x	±	0.0 mg/mL			s	x	±		
	FM1	FM2	FM3				Fmax	Fmax	Fmax				Fo	Fo	Fo					
30	33719	34169	34546	338	34145	840	48460	48569	48747	118	48592	293	33097	32896	33738	359	33244	892	6	3
60	33244	33309	33322	34	33292	85	46088	46414	46464	166	46322	414	33248	34620	33982	561	33950	1393	0	4
90	34677	34699	34863	83	34746	206	48227	48299	48798	254	48441	631	32415	34198	33046	738	33220	1834	10	6
120	33541	33703	34081	226	33775	562	49991	50321	50602	250	50304	620	33619	32543	33484	479	33215	1189	3	4
150	34750	35089	35440	282	35093	700	52399	52515	52749	146	52554	362	32993	32851	33655	350	33166	870	10	3
180	33874	34240	34405	222	34173	551	52639	52702	53177	240	52839	597	33911	33336	34321	404	33856	1004	2	3
210	33981	34465	34863	361	34436	896	52559	53018	53497	383	53025	951	33206	32516	33963	591	33228	1468	6	4
240	33441	33918	34252	333	33870	827	51122	51430	51747	255	51433	634	32803	32661	32897	97	32787	241	6	1
270	34886	34989	35341	195	35072	484	50820	51176	51529	289	51175	719	33269	32267	33404	507	32980	1260	11	4
300	33496	33776	33851	153	33708	380	51342	51359	51421	34	51374	85	32609	33392	33719	466	33240	1157	3	3
330	32269	32505	32832	231	32535	573	49567	49746	50019	186	49777	462	32202	33174	33606	587	32994	1459	0	4
360	32920	33160	33618	290	33233	719	50334	50770	51197	352	50767	875	32436	32836	34462	876	33245	2176	0	7
390	33859	34038	34319	189	34072	470	52391	52748	53198	330	52779	820	32099	32723	33344	508	32722	1263	7	4
420	33588	33752	34097	212	33812	527	51483	51648	51748	109	51626	272	33315	33342	33284	24	33314	59	3	0
450	32336	32631	32916	237	32628	588	50154	50487	50722	233	50455	579	31801	31389	33529	927	32240	2303	2	7
480	33086	33134	33432	153	33217	380	51418	51539	51902	206	51620	511	32953	33067	33585	275	33202	683	0	2
510	32937	33150	33265	136	33117	338	50454	50903	50929	218	50762	542	32238	32427	33631	617	32765	1533	2	5
540	32695	33009	33155	192	32953	477	50959	51126	51386	176	51157	436	32121	32345	33583	643	32683	1597	1	5
570	32694	33072	33518	337	33095	837	51510	52005	52154	275	51890	684	32198	33289	32910	452	32799	1123	2	3
600	32391	32730	32809	181	32643	450	50943	51409	51480	238	51277	592	33083	31891	32101	520	32358	1291	2	4
630	32269	32455	32902	266	32542	660	50767	51049	51114	151	50977	374	32234	32206	32971	354	32470	880	0	3
660	33484	33831	33833	164	33716	408	50762	51184	51202	203	51049	505	32071	32251	32939	374	32420	929	7	3
690	32935	33318	33776	344	33343	854	48743	49228	49361	265	49111	659	31388	32887	31720	643	31998	1597	8	5
720	32187	32356	32754	238	32432	590	50692	50865	51015	132	50858	328	32250	33765	32394	683	32803	1696	0	5
750	32597	32708	33151	239	32819	595	50427	50605	51016	246	50682	612	31152	32123	31775	402	31683	998	6	3
780	32456	32783	32964	210	32734	522	51701	51708	52171	220	51860	546	31347	31442	32974	746	31921	1852	4	6
810	32309	32562	32843	218	32571	542	49812	50176	50260	194	50083	483	31194	32024	33146	800	32121	1987	3	6
840	31981	32317	32491	212	32263	526	49747	50011	50301	226	50020	562	32384	32061	31967	179	32137	444	1	1
870	32830	33161	33226	173	33072	431	49986	50485	50688	295	50386	733	31231	31672	32402	483	31768	1200	7	4
900	31373	31543	31833	190	31583	472	50595	50988	51180	243	50921	605	31755	31523	31828	130	31702	323	0	1
930	31742	31876	32161	175	31926	434	50244	50558	51056	334	50619	831	31189	32227	31431	443	31616	1102	2	3
960	31908	32177	32432	214	32172	531	49243	49536	49651	172	49477	427	32157	31418	32244	371	31940	921	1	3
990	30999	31254	31515	211	31256	523	48136	48304	48394	107	48278	265	31671	31335	31992	268	31666	666	0	2
1020	32959	33164	33430	193	33184	479	48788	48857	48997	87	48881	216	31169	30936	32065	487	31390	1209	10	4
1050	32061	32192	32627	242	32293	601	50627	50660	50994	166	50760	412	32243	31899	32489	242	32210	601	0	2
1080	31226	31283	31441	91	31317	226	49125	49574	49879	310	49526	769	31858	32541	31709	362	32036	900	0	3
1110	30856	30917	31408	247	31060	614	48741	48759	49069	150	48856	374	30948	31711	31554	329	31404	817	0	3
1140	31786	32149	32564	318	32166	790	48736	48947	48979	108	48888	268	30723	30479	31324	355	30842	882	7	3

$$\%L = 100 \cdot \frac{F - F_o}{F_{max} - F_o} \cdot (3)$$

Donde F_o es la fluorescencia intacta de la solución de vesículas, F y F_{max} son la fluorescencia observada y la obtenida al agregar Tritón X100. El experimento se monitoreó cada 45 segundos manteniendo la temperatura a 25°C por 30 minutos. La incertidumbre de la medida se encuentra entre el +/- 5% y los datos fueron validados por la prueba t-student

ANEXO 3 Fluorescencia

Concentración de 0.44 mg/mL 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰

Tiempo (s)	Fluorescencia																		%L	Intervalo de Confianza ±
	1F9R 57-70 0.44 mg/mL						1F9R 57-70 0.44mg/mL						1F9R 57-70 0.0 mg/mL							
	FM1	FM2	FM3	s	x	±	Fmax	Fmax	Fmax	s	x	±	Fo	Fo	Fo	s	x	±		
30	33453	33639	33709	108	33600	268	42122	42265	42518	164	42302	407	33097	32896	33738	359	33244	892		
60	33152	33268	33328	73	33249	181	43194	43457	43517	140	43389	348	33248	34620	33982	561	33950	1393		
90	33065	33230	33307	101	33201	251	43285	43764	44240	390	43763	969	32415	34198	33046	738	33220	1834		
120	33806	34275	34463	276	34181	686	44400	44853	45279	359	44844	892	33619	32543	33484	479	33215	1189		
150	32997	33110	33281	117	33129	290	46077	46241	46717	271	46345	674	32993	32851	33655	350	33166	870		
180	34061	34199	34565	213	34275	528	46781	46945	47005	95	46910	235	33911	33336	34321	404	33856	1004		
210	32736	32776	32911	75	32808	186	48316	48460	48877	238	48551	591	33206	32516	33963	591	33228	1468		
240	31885	32033	32331	185	32083	461	48200	48247	48564	162	48337	402	32803	32661	32897	97	32787	241		
270	32704	32830	33239	228	32924	567	48164	48267	48724	243	48385	605	33269	33267	33404	507	32980	1260		
300	32145	32169	32206	25	32173	62	47707	48044	48358	266	48036	660	32609	33392	33719	466	33240	1157		
330	32679	32939	33072	163	32897	405	48988	49160	49182	87	49110	215	32202	33174	33606	587	32994	1459		
360	33165	33266	33363	81	33265	201	48191	48225	48706	235	48374	584	32436	32836	34462	876	33245	2176		
390	32081	32235	32567	203	32294	504	48172	48498	48695	216	48455	536	32099	32723	33344	508	32722	1263		
420	32751	32809	32941	80	32834	197	48227	48264	48408	78	48300	194	33315	33342	33284	24	33314	59		
450	32679	33133	33138	215	32983	535	47793	48113	48443	265	48116	659	31801	31389	33529	927	32240	2303		
480	32816	32819	33178	170	32938	422	46571	46880	47287	293	46913	728	32953	33067	33585	275	33202	683		
510	32281	32646	32885	248	32604	617	47882	48285	48506	258	48224	642	32238	32427	33631	617	32765	1533		
540	32802	33144	33155	164	33034	407	48213	48407	48526	129	48382	320	32121	32345	33583	643	32683	1597		
570	33527	33816	33981	188	33775	466	46206	46330	46405	82	46314	204	32198	33289	32910	452	32799	1123		
600	31273	31603	31746	198	31541	492	46715	47177	47181	219	47024	543	33083	31891	32101	520	32358	1291		
630	32067	32181	32282	88	32177	218	47007	47504	47714	296	47408	736	32234	32206	32971	354	32470	880		
660	31134	31162	31281	64	31192	158	46879	46892	47144	122	46972	303	32071	32251	32939	374	32420	929		
690	32012	32343	32434	181	32263	450	48715	48854	48881	73	48817	181	31388	32887	31720	643	31998	1597		
720	31678	32010	32136	193	31941	480	46285	46621	46936	266	46614	660	32250	33765	32394	683	32803	1696		
750	32301	32753	32906	257	32653	638	46678	47030	47331	267	47013	663	31152	32123	31775	402	31683	998		
780	29999	30401	30748	306	30383	760	46664	46899	47341	281	46968	697	31347	31442	32974	746	31921	1852		
810	31255	31255	31272	8	31261	20	45348	45480	45977	271	45602	673	31194	32024	33146	800	32121	1987		
840	31911	31940	32329	191	32060	473	46139	46587	46612	217	46446	540	32384	32061	31967	179	32137	444		
870	30916	31025	31073	66	31005	163	45482	45611	45973	208	45689	516	31231	31672	32402	483	31768	1200		
900	31978	32413	32860	360	32417	895	46445	46912	47235	324	46864	806	31755	31523	31828	130	31702	323		
930	31730	31954	32133	165	31939	410	46881	47298	47764	361	47314	896	31189	32227	31431	443	31616	1102		
960	31402	31869	32092	288	31788	714	47788	47963	48353	236	48035	587	32157	31418	32244	371	31940	921		
990	32071	32537	32755	285	32454	709	47071	47526	47898	338	47498	840	31671	31335	31992	268	31666	666		
1020	30806	30982	31226	172	31005	428	47608	47966	47986	174	47853	431	31169	30936	32065	487	31390	1209		
1050	32573	32712	32768	82	32684	204	45688	46101	46439	307	46076	763	32243	31899	32489	242	32210	601		
1080	30071	30434	30457	177	30321	439	46985	47142	47387	165	47171	411	31858	32541	31709	362	32036	900		
1110	31440	31719	31744	138	31634	342	45494	45746	45807	135	45682	337	30948	31711	31554	329	31404	817		
1140	31203	31259	31352	61	31271	153	44901	45008	45056	65	44988	161	30723	30479	31324	355	30842	882		

$$\%L = 100 * \frac{F - F_o}{F_{max} - F_o} \cdot (3)$$

Donde F_o es la fluorescencia intacta de la solución de vesículas, F y F_{max} son la fluorescencia observada y la obtenida al agregar Tritón X100. El experimento se monitoreó cada 45 segundos manteniendo la temperatura a 25°C por 30 minutos. La incertidumbre de la medida se encuentra entre el +/- 5% y los datos fueron validados por la prueba t-student

ANEXO 3
Fluorescencia
Concentración de 0.66 mg/mL 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰

Tiempo (s)	Fluorecencia																		%L	Intervalo de Confianza ±
	1F9R 57-70 0.66 mg/mL						1F9R 57-70 0.66 mg/mL						1F9R 57-70 0.0 mg/mL							
	FM1	FM2	FM3	s	x	±	Fmax	Fmax	Fmax	s	x	±	Fo	Fo	Fo	s	x	±		
30	32797	33042	33416	255	33085	633	46813	47239	47491	280	47181	695	33097	32896	33738	359	33244	892	0	3
60	32875	33149	33529	268	33184	666	46969	47277	47710	304	47319	755	33248	34620	33982	561	33950	1393	0	4
90	33320	33665	33943	255	33643	633	47012	47270	47401	162	47228	401	32415	34198	33046	738	33220	1834	3	6
120	32116	32498	32881	312	32498	775	49804	49809	50180	176	49931	437	33619	32543	33484	479	33215	1189	0	4
150	32721	32831	33083	152	32878	377	50466	50564	50820	149	50617	371	32993	32851	33655	350	33166	870	0	3
180	32043	32142	32178	57	32121	142	50850	51183	51380	219	51138	543	33911	33336	34321	404	33856	1004	0	3
210	33509	33622	33822	129	33651	321	50671	51104	51587	374	51121	929	33206	32516	33963	591	33228	1468	2	4
240	32053	32130	32340	121	32174	302	51380	51658	51711	145	51583	361	32803	32661	32897	97	32787	241	0	1
270	33058	33123	33519	204	33233	506	51104	51445	51727	255	51425	633	33269	32267	33404	507	32980	1260	1	4
300	33142	33267	33752	263	33387	654	48639	48642	48851	99	48711	247	32609	33392	33719	466	33240	1157	1	3
330	33201	33498	33708	208	33469	516	49691	49726	49912	97	49776	241	32202	33174	33606	587	32994	1459	3	4
360	32497	32951	33175	282	32874	700	48464	48735	48884	174	48694	432	32436	32836	34462	876	33245	2176	0	7
390	32665	32907	33028	151	32867	375	49178	49188	49319	64	49228	160	32099	32723	33344	508	32722	1263	1	4
420	33538	33802	34284	309	33875	767	48607	49066	49469	352	49047	875	33315	33342	33284	24	33314	59	4	0
450	32064	32563	32696	272	32441	675	48202	48674	49014	333	48630	827	31801	31389	33529	927	32240	2303	1	7
480	33126	33464	33961	343	33517	852	47731	47900	48065	136	47899	339	32953	33067	33585	275	33202	683	2	2
510	32602	32998	33434	340	33011	844	47625	47831	48316	290	47924	720	32238	32427	33631	617	32765	1533	2	5
540	32536	32971	33046	225	32851	558	47650	47698	48064	185	47804	459	32121	32345	33583	643	32683	1597	1	5
570	31746	31866	31916	72	31843	178	48250	48330	48718	204	48433	508	32198	33289	32910	452	32799	1123	0	3
600	32139	32524	32751	252	32471	627	47276	47706	48103	338	47695	839	33083	31891	32101	520	32358	1291	1	4
630	31820	32031	32208	159	32020	394	46769	47013	47291	213	47024	530	32234	32206	32971	354	32470	880	0	3
660	31935	32051	32438	215	32141	534	46246	46521	46992	308	46586	765	32071	32251	32939	374	32420	929	0	3
690	31687	32005	32328	262	32007	650	47578	47783	47874	124	47745	308	31388	32887	31720	643	31998	1597	0	5
720	34016	34386	34454	193	34285	478	48097	48311	48753	273	48387	679	32250	33765	32394	683	32803	1696	10	5
750	32385	32853	33114	301	32784	749	46337	46824	47140	330	46767	820	31152	32123	31775	402	31683	998	7	3
780	32584	32616	32685	42	32628	105	47960	48399	48530	244	48296	606	31347	31442	32974	746	31921	1852	4	6
810	31539	31773	32255	298	31856	740	46501	46873	46963	200	46779	497	31194	32024	33146	800	32121	1987	0	6
840	31765	31781	31982	99	31843	246	46864	47111	47256	162	47077	402	32384	32061	31967	179	32137	444	0	1
870	31021	31108	31175	63	31101	156	48487	48958	49305	335	48917	833	31231	31672	32402	483	31768	1200	0	4
900	33226	33668	33673	210	33522	521	45108	45372	45601	201	45360	500	31755	31523	31828	130	31702	323	13	1
930	32572	32970	32985	191	32842	475	47279	47364	47546	111	47396	277	31189	32227	31431	443	31616	1102	8	3
960	30873	30907	31231	161	31004	401	45395	45809	46218	336	45807	835	32157	31418	32244	371	31940	921	0	3
990	32546	32564	32743	89	32618	221	46501	46611	46723	91	46612	225	31671	31335	31992	268	31666	666	6	2
1020	31111	31580	31978	354	31556	881	45556	45768	45901	142	45742	353	31169	30936	32065	487	31390	1209	1	4
1050	32543	32774	32927	158	32748	392	45843	45858	46254	190	45985	473	32243	31899	32489	242	32210	601	4	2
1080	31815	31958	32447	271	32073	672	46485	46870	47055	237	46803	590	31858	32541	31709	362	32036	900	0	3
1110	31796	32153	32635	344	32195	854	46504	46758	47074	233	46779	579	30948	31711	31554	329	31404	817	5	3
1140	32447	32630	32675	99	32584	245	46390	46705	46725	153	46607	381	30723	30479	31324	355	30842	882	11	3

$$\%L = 100 * \frac{F - F_0}{F_{max} - F_0} \cdot (3)$$

Donde F_0 es la fluorescencia intacta de la solución de vesículas, F y F_{max} son la fluorescencia observada y la obtenida al agregar Tritón X100. El experimento se monitoreó cada 45 segundos manteniendo la temperatura a 25°C por 30 minutos. La incertidumbre de la medida se encuentra entre el +/- 5% y los datos fueron validados por la prueba t-student

ANEXO 3 Fluorescencia

Concentración de 0.88 mg/mL 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰

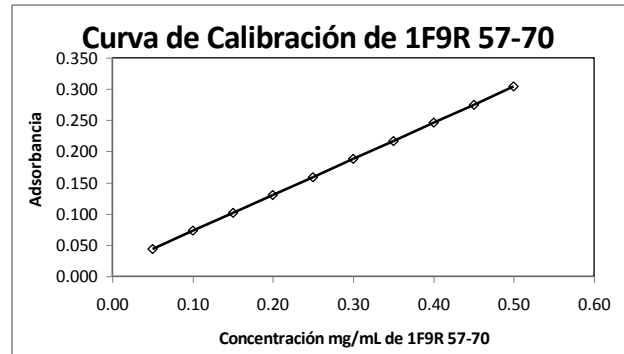
Tiempo (s)	Fluorecencia																		%L	Intervalo de Confianza ±
	1F9R 57-70 0.88 mg/mL						1F9R 57-70 0.88 mg/mL						1F9R 57-70 0.88 mg/mL							
	FM1	FM 2	FM3	s	x	±	Fmax	Fmax	Fmax	s	x	±	Fo	Fo	Fo	s	x	±		
30	33453	33687	34102	268	33747	667	43356	43690	43715	164	43587	407	33097	32896	33738	359	33244	892	5	3
60	33152	33496	33783	258	33477	641	45465	45657	46039	239	45720	593	33248	34620	33982	561	33950	1393	0	4
90	33065	33201	33591	223	33286	554	46072	46084	46101	12	46086	30	32415	34198	33046	738	33220	1834	1	6
120	33806	34035	34221	170	34021	422	48449	48705	49128	280	48761	696	33619	32543	33484	479	33215	1189	5	4
150	32997	33047	33252	110	33099	274	49755	49961	50139	157	49952	390	32993	32851	33655	350	33166	870	0	3
180	34061	34360	34826	315	34416	782	48257	48438	48624	150	48440	372	33911	33336	34321	404	33856	1004	4	3
210	32736	32965	33245	208	32982	517	48783	48856	48869	38	48836	94	33206	32516	33963	591	33228	1468	0	4
240	31885	31967	32293	176	32048	438	49453	49548	49771	133	49591	331	32803	32661	32897	97	32787	241	0	1
270	32704	33133	33379	279	33072	693	48753	49135	49411	270	49100	670	33269	32267	33404	507	32980	1260	1	4
300	32145	32342	32777	264	32421	656	47747	48128	48205	200	48027	497	32609	33392	33719	466	33240	1157	0	3
330	32679	32933	33430	312	33014	775	47648	47988	48373	296	48003	736	32202	33174	33606	587	32994	1459	0	4
360	33165	33287	33609	187	33354	465	47102	47390	47656	226	47383	562	32436	32836	34462	876	33245	2176	1	7
390	32081	32536	32765	284	32461	706	47396	47690	48045	265	47710	659	32099	32723	33344	508	32722	1263	0	4
420	32751	32895	33170	174	32939	432	48062	48446	48781	294	48430	730	33315	33342	33284	24	33314	59	0	0
450	32679	32923	33066	160	32889	397	47346	47381	47744	180	47490	447	31801	31389	33529	927	32240	2303	4	7
480	32816	32833	33098	129	32916	321	47597	47792	48125	218	47838	542	32953	33067	33585	275	33202	683	0	2
510	32281	32726	32823	236	32610	586	46540	46590	47003	207	46711	515	32238	32427	33631	617	32765	1533	0	5
540	32802	32895	32987	76	32895	188	46691	47154	47416	300	47087	745	32121	32345	33583	643	32683	1597	1	5
570	33527	33986	34236	294	33916	729	47101	47298	47576	195	47325	484	32198	33289	32910	452	32799	1123	8	3
600	31273	31378	31513	98	31388	244	47778	48125	48453	276	48119	685	33083	31891	32101	520	32358	1291	0	4
630	32067	32496	32884	334	32482	829	47201	47262	47468	114	47310	284	32234	32206	32971	354	32470	880	0	3
660	31134	31418	31645	209	31399	519	46428	46606	47049	261	46694	649	32071	32251	32939	374	32420	929	0	3
690	32012	32404	32839	338	32418	839	45729	45940	46132	165	45934	409	31388	32887	31720	643	31998	1597	3	5
720	31678	32095	32333	271	32035	672	46787	47072	47508	296	47122	737	32250	33765	32394	683	32803	1696	0	5
750	32301	32379	32752	197	32477	489	45462	45500	45670	90	45544	225	31152	32123	31775	402	31683	998	6	3
780	29999	30133	30347	143	30160	356	46258	46431	46568	127	46419	315	31347	31442	32974	746	31921	1852	0	6
810	31255	31480	31725	192	31487	477	46149	46333	46808	278	46430	690	31194	32024	33146	800	32121	1987	0	6
840	31911	32069	32246	137	32075	340	46181	46190	46369	87	46247	215	32384	32061	31967	179	32137	444	0	1
870	30916	31355	31669	309	31313	767	45464	45799	45831	166	45698	412	31231	31672	32402	483	31768	1200	0	4
900	31978	32046	32137	65	32054	162	45717	46061	46152	187	45977	465	31755	31523	31828	130	31702	323	2	1
930	31730	32153	32430	288	32104	715	45750	46078	46455	288	46094	716	31189	32227	31431	443	31616	1102	3	3
960	31402	31859	32143	305	31801	758	45358	45670	45816	191	45615	475	32157	31418	32244	371	31940	921	0	3
990	32071	32278	32440	151	32263	375	45820	45911	46321	218	46017	541	31671	31335	31992	268	31666	666	4	2
1020	30806	31246	31350	236	31134	586	45906	46332	46469	240	46236	596	31169	30936	32065	487	31390	1209	0	4
1050	32573	33012	33182	257	32922	637	44644	44925	45191	223	44920	555	32243	31899	32489	242	32210	601	6	2
1080	30071	30308	30365	127	30248	316	45997	46354	46813	334	46388	830	31858	32541	31709	362	32036	900	0	3
1110	31440	31674	32094	271	31736	672	45613	45638	45980	167	45744	416	30948	31711	31554	329	31404	817	2	3
1140	31203	31666	31832	266	31567	661	46571	47001	47127	238	46900	591	30723	30479	31324	355	30842	882	5	3

$$\%L = 100 * \frac{F - Fo}{F_{max} - Fo} \cdot (3)$$

Donde F_o es la fluorescencia intacta de la solución de vesículas, F y F_{max} son la fluorescencia observada y la obtenida al agregar Tritón X100. El experimento se monitoreó cada 45 segundos manteniendo la temperatura a 25°C por 30 minutos. La incertidumbre de la medida se encuentra entre el +/- 5% y los datos fueron validados por la prueba *t-student*.

Anexo 4
Isotermas de Adsorción
Curva de Calibración
Interpolación de datos

Concentración mg/mL ± 0.05	Adsorbancia 285 nm			Parametros Estadísticos			
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	x	s	±	% ±
0.50	0.301	0.304	0.307	0.304	0.002	0.008	2.63
0.45	0.272	0.275	0.278	0.275	0.002	0.008	2.91
0.40	0.243	0.246	0.249	0.246	0.002	0.008	3.25
0.35	0.214	0.217	0.22	0.217	0.002	0.008	3.69
0.30	0.185	0.188	0.191	0.188	0.002	0.008	4.26
0.25	0.156	0.159	0.162	0.159	0.002	0.008	5.03
0.20	0.127	0.13	0.133	0.130	0.002	0.008	6.15
0.15	0.099	0.102	0.105	0.102	0.002	0.008	7.84
0.10	0.07	0.073	0.076	0.073	0.002	0.008	10.96
0.05	0.041	0.044	0.047	0.044	0.002	0.008	18.18



Pendiente	0.577
Coefficiente de Correlación	0.99999
Intersección con el eje	0.015

Concentración Inicial de 1F9R 57-70 ± 0.05	Adsorbancia 285 nm de la Concentración en equilibrio ± 0.0005 nm			Parametros Estadísticos				Concentración en el equilibrio de 1F9R 57-70 mg / mL	Isoterma		Linealización	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	x	s	±	% ±		Concentración Equi de 1F9R 57-70 Ceq ± 0.007	Cantidad Adsorbida mg/mL ± 0.007	Concentración Equi de 1F9R 57-70 (1/Ceq)	Cantidad Adsorbida 1F9R 57-70 (1/q)
0.00	0.011	0.012	0.013	0.012	0.001	0.002	16.67	0.000	0.00	0	27.5	6.11
0.10	0.012	0.010	0.012	0.011	0.001	0.002	18.18	0.000	0.00	0.100	9.3	5.19
0.20	0.035	0.038	0.036	0.036	0.001	0.002	5.56	0.036	0.04	0.164	6.9	3.93
0.30	0.073	0.077	0.08	0.077	0.003	0.007	9.09	0.107	0.11	0.193	5.0	3.33
0.40	0.101	0.098	0.099	0.099	0.001	0.002	2.02	0.146	0.15	0.254	3.7	3.03
0.50	0.131	0.132	0.127	0.130	0.002	0.005	3.85	0.199	0.20	0.301	2.8	2.87
0.60	0.171	0.176	0.165	0.171	0.004	0.01	5.85	0.270	0.27	0.330	2.3	2.74
0.70	0.220	0.215	0.218	0.218	0.002	0.005	2.29	0.352	0.35	0.348	K	8.44
0.80	0.260	0.271	0.267	0.266	0.005	0.012	4.51	0.435	0.44	0.365	ΔG (j/mol)	-5497.42

Anexo 5
Modelo Cinético
Concertación de 0.300 mg/mL de 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰

Datos Obtenidos para el modelo cinético y la adsorción del péptido para cada una de las concentraciones

T (h)	Modelo Cinético							Modelo Cinético		
	1F9R 57-70			s	x	±	±%	1/ 1F9R 57-70		
	0.300 mg/mL							mL/mg		
	P 1	P 2	P 3	1/Pf1	1/Pf2	1/Pf3				
0	0.272	0.278	0.274	0.002	0.275	0.005	1.82			
30	0.178	0.186	0.179	0.004	0.181	0.010	5.52	10.64	10.870	10.526
60	0.152	0.155	0.159	0.003	0.155	0.007	4.52	8.333	8.130	8.696
90	0.103	0.113	0.111	0.004	0.109	0.010	9.17	5.917	6.061	6.135
120	0.074	0.075	0.077	0.001	0.075	0.002	2.67	5.051	4.926	5.076
150	0.056	0.065	0.058	0.004	0.060	0.010	16.67	4.63	4.695	4.630
180	0.048	0.054	0.056	0.003	0.053	0.007	13.21	4.464	4.464	4.587
210	0.042	0.047	0.048	0.003	0.046	0.007	15.22	4.348	4.329	4.425
240	0.045	0.045	0.049	0.002	0.046	0.005	10.87	4.405	4.292	4.444
270	0.048	0.054	0.055	0.003	0.052	0.007	13.46	4.464	4.464	4.566
300	0.049	0.056	0.05	0.003	0.052	0.007	13.46	4.484	4.505	4.464
330	0.047	0.053	0.055	0.003	0.052	0.007	13.46	4.444	4.444	4.566
360	0.043	0.049	0.05	0.003	0.047	0.007	14.89	4.367	4.367	4.464
390	0.042	0.045	0.046	0.002	0.044	0.005	11.36	4.348	4.292	4.386
420	0.04	0.045	0.048	0.003	0.044	0.007	15.91	4.31	4.292	4.425
450	0.036	0.037	0.038	0.001	0.037	0.002	5.41	4.237	4.149	4.237
480	0.032	0.032	0.036	0.002	0.033	0.005	15.15	4.167	4.065	4.202
510	0.029	0.038	0.033	0.004	0.033	0.010	30.30	4.115	4.167	4.149
540	0.029	0.037	0.037	0.004	0.034	0.010	29.41	4.115	4.149	4.219
570	0.024	0.024	0.025	0.000	0.024	—	—	4.032	3.937	4.016
600	0.02	0.025	0.024	0.002	0.023	0.005	21.74	3.968	3.953	4.000

P1	Prueba 1	1/Pf	El inverso de la cantidad adsorbida (Concentracion inicial-concetracionen el equilibrio)
P2	Prueba 2	x	Promedio
P3	Prueba 3	±	Intervalo de Confianza t ±! Porcentaje del Intervalo de Confianza t

Anexo 5
Modelo Cinético
Concertación de 0.400 mg/mL de 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰

T (h)	0.400 mg/mL 1F9R 57-70							0.500 mg/mL		
	1F9R 57-70			s	x	±	± %	1/ 1F9R 57-70		
	0.400 mg/mL							mL/mg		
	P 1	P 2	P 3					1/Pf1	1/Pf2	1/Pf3
0	0.403	0.411	0.404	0.004	0.406	0.010	2.46			
30	0.349	0.353	0.354	0.002	0.352	0.005	1.42	18.52	17.241	20.000
60	0.265	0.273	0.273	0.004	0.270	0.010	3.70	7.246	7.246	7.634
90	0.193	0.196	0.196	0.001	0.195	0.002	1.03	4.762	4.651	4.808
120	0.139	0.143	0.145	0.002	0.142	0.005	3.52	3.788	3.731	3.861
150	0.13	0.135	0.133	0.002	0.133	0.005	3.76	3.663	3.623	3.690
180	0.128	0.138	0.132	0.004	0.133	0.010	7.52	3.636	3.663	3.676
210	0.126	0.128	0.131	0.002	0.128	0.005	3.91	3.61	3.534	3.663
240	0.124	0.126	0.125	0.001	0.125	0.002	1.60	3.584	3.509	3.584
270	0.123	0.126	0.126	0.001	0.125	0.002	1.60	3.571	3.509	3.597
300	0.114	0.121	0.114	0.003	0.116	0.007	6.03	3.46	3.448	3.448
330	0.105	0.113	0.105	0.004	0.108	0.010	9.26	3.356	3.356	3.344
360	0.097	0.097	0.1	0.001	0.098	0.002	2.04	3.268	3.185	3.289
390	0.095	0.101	0.102	0.003	0.099	0.007	7.07	3.247	3.226	3.311
420	0.092	0.099	0.092	0.003	0.094	0.007	7.45	3.215	3.205	3.205
450	0.088	0.092	0.09	0.002	0.090	0.005	5.56	3.175	3.135	3.185
480	0.084	0.09	0.092	0.003	0.089	0.007	7.87	3.135	3.115	3.205
510	0.078	0.083	0.082	0.002	0.081	0.005	6.17	3.077	3.049	3.106
540	0.068	0.071	0.072	0.002	0.070	0.005	7.14	2.985	2.941	3.012
570	0.061	0.063	0.066	0.002	0.063	0.005	7.94	2.924	2.874	2.959
600	0.054	0.057	0.057	0.001	0.056	0.002	3.57	2.865	2.825	2.882

Anexo 5

Modelo Cinético

Concertación de 0.500 mg/mL de 1F9R 57-70

Datos Obtenidos para el modelo cinético y la adsorción del péptido para cada una de las concentraciones

T (h)	Modelo Cinético							Modelo Cinético		
	1F9R 57-70			s	x	±	±%	1/ 1F9R 57-70		
	0.500 mg/mL							mL/mg		
	P 1	P 2	P 3	1/Pf1	1/Pf2	1/Pf3				
0	0.525	0.531	0.532	0.003	0.529	0.007	1.32			
30	0.432	0.435	0.44	0.003	0.436	0.007	1.61	10.75	10.417	10.870
60	0.349	0.356	0.358	0.004	0.354	0.010	2.82	5.682	5.714	5.747
90	0.281	0.291	0.289	0.004	0.287	0.010	3.48	4.098	4.167	4.115
120	0.239	0.249	0.246	0.004	0.245	0.010	4.08	3.497	3.546	3.497
150	0.23	0.234	0.231	0.002	0.232	0.005	2.16	3.39	3.367	3.322
180	0.229	0.239	0.236	0.004	0.235	0.010	4.26	3.378	3.425	3.378
210	0.223	0.23	0.229	0.003	0.227	0.007	3.08	3.311	3.322	3.300
240	0.223	0.231	0.232	0.004	0.229	0.010	4.37	3.311	3.333	3.333
270	0.22	0.222	0.223	0.001	0.222	0.002	0.90	3.279	3.236	3.236
300	0.218	0.221	0.224	0.002	0.221	0.005	2.26	3.257	3.226	3.247
330	0.213	0.213	0.221	0.004	0.216	0.010	4.63	3.205	3.145	3.215
360	0.203	0.213	0.211	0.004	0.209	0.010	4.78	3.106	3.145	3.115
390	0.198	0.205	0.2	0.003	0.201	0.007	3.48	3.058	3.067	3.012
420	0.194	0.195	0.204	0.004	0.198	0.010	5.05	3.021	2.976	3.049
450	0.191	0.197	0.197	0.003	0.195	0.007	3.59	2.994	2.994	2.985
480	0.183	0.187	0.192	0.004	0.187	0.010	5.35	2.924	2.907	2.941
510	0.173	0.183	0.178	0.004	0.178	0.010	5.62	2.841	2.874	2.825
540	0.168	0.173	0.173	0.002	0.171	0.005	2.92	2.801	2.793	2.786
570	0.168	0.173	0.176	0.003	0.172	0.007	4.07	2.801	2.793	2.809
600	0.167	0.174	0.173	0.003	0.171	0.007	4.09	2.793	2.801	2.786

P1	Prueba 1	s	Desviacion Estandar	± %	Porcentaje del Intervalo de Confianza t
P2	Prueba 2	x	Promedio		
P3	Prueba 3	±	Intervalo de Confianza t		

Anexo 5
Modelo Cinético
Parámetros de Ajuste para cada uno de los ensayos .
A 0.300 mg/mL de 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰

$$y = \frac{1}{A - Be^{-Ct}}$$

1F9R 57-70 0.300 mg/mL					
Ensayo 1					
0.272mg/mL		Value	Standard Error		1/Pu
1/Pu	A	0.24197	0.00536	Number of Points	20
	B	0.20589	0.00705	Degrees of Freedom	17
	C	0.01065	0.00115	Reduced Chi-Sqr	0.08004
				Residual Sum of Squares	1.3606
				Adj. R-Square	0.97069
				Fit Status	Succeeded(101)
Ensayo 2					
0.278mg/mL		Value	Standard Error		1/Pu
1/Pu	A	0.24305	0.0047	Number of Points	20
	B	0.21108	0.00627	Degrees of Freedom	17
	C	0.0109	0.00102	Reduced Chi-Sqr	0.06196
				Residual Sum of Squares	1.05335
				Adj. R-Square	0.97824
				Fit Status	Succeeded(101)
Ensayo 3					
0.274mg/mL		Value	Standard Error		1/Pu
1/Pu	A	0.24046	0.00673	Number of Points	20
	B	0.19851	0.00808	Degrees of Freedom	17
	C	0.00985	0.00131	Reduced Chi-Sqr	0.12011
				Residual Sum of Squares	2.04183
				Adj. R-Square	0.95663
				Fit Status	Succeeded(101)

Anexo 5
Modelo Cinético
Parámetros de Ajuste para cada uno de los ensayos .
A 0.400 mg/mL de 1F9R⁵⁷⁻⁷⁰

$$y = \frac{1}{A - Be^{-Ct}}$$

0.400 mg/mL					
Ensayo 1					
0.403 mg/mL		Value	Standard Error		1/Pu
1/Pu	A	0.31546	0.00594	Number of Points	20
	B	0.39473	0.00719	Degrees of Freedom	17
	C	0.01373	8.11E-04	Reduced Chi-Sqr	0.04387
				Residual Sum of Squares	0.74586
				Adj. R-Square	0.99635
				Fit Status	Succeeded(100)
Ensayo 2					
0.411 mg/mL		Value	Standard Error		1/Pu
1/Pu	A	0.31998	0.0066	Number of Points	20
	B	0.39005	0.00768	Degrees of Freedom	17
	C	0.01326	8.64E-04	Reduced Chi-Sqr	0.0501
				Residual Sum of Squares	0.85167
				Adj. R-Square	0.99512
				Fit Status	Succeeded(100)
Ensayo 3					
0.404 mg/mL		Value	Standard Error		1/Pu
1/Pu	A	0.31445	0.00629	Number of Points	20
	B	0.39322	0.00693	Degrees of Freedom	17
	C	0.01322	7.86E-04	Reduced Chi-Sqr	0.04904
				Residual Sum of Squares	0.83365
				Adj. R-Square	0.9966
				Fit Status	Succeeded(100)

Anexo 5
Modelo Cinético
Parámetros de Ajuste para cada uno de los ensayos.
A 0.500 mg/mL de 1F9R 57-70

$$y = \frac{1}{A - Be^{-Ct}}$$

0.500 mg/mL					
Ensayo 1					
0.525 mg/mL		Value	Standard Error		1/Pu
1/Pu	A	0.33265	0.00513	Number of Points	20
1/Pu	B	0.37462	0.0093	Degrees of Freedom	17
1/Pu	C	0.01489	1.01E-03	Reduced Chi-Sqr	0.02683
				Residual Sum of Squares	0.45607
				Adj. R-Square	0.99157
				Fit Status	Succeeded(100)
Ensayo 2					
0.531 mg/mL		Value	Standard Error		1/Pu
1/Pu	A	0.33408	0.00499	Number of Points	20
1/Pu	B	0.36321	0.00826	Degrees of Freedom	17
1/Pu	C	0.01408	9.13E-04	Reduced Chi-Sqr	0.02421
				Residual Sum of Squares	0.41162
				Adj. R-Square	0.9918
				Fit Status	Succeeded(100)
Ensayo 3					
0.532 mg/mL		Value	Standard Error		1/Pu
1/Pu	A	0.33368	0.00528	Number of Points	20
1/Pu	B	0.37576	0.00925	Degrees of Freedom	17
1/Pu	C	0.0147	0.001	Reduced Chi-Sqr	0.04904
				Residual Sum of Squares	0.83365
				Adj. R-Square	0.9966
				Fit Status	Succeeded(100)

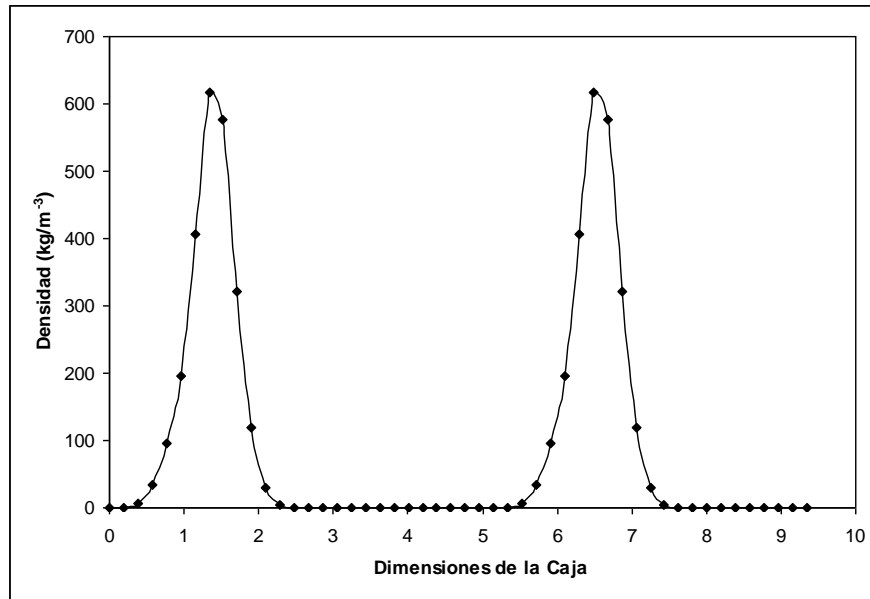
Anexo 5
Modelo Cinético
Parámetros para la obtención de k_f y k_s

	Value
Intercept	-0.00308
Slope	0.30769

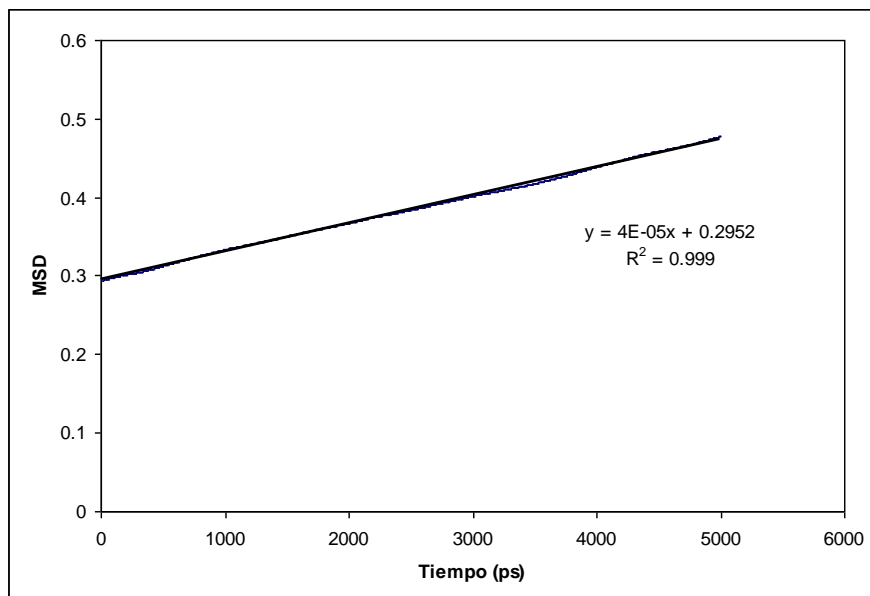
El índice de correlación es 1, debido a que solo se tomaron dos puntos.

Anexo 6
Dinámica Molecular
Datos de pre-equilibrio de la membrana celular 128 DPPC por 5 ns

La densidad de la membrana no cambio en los 5 ns de preequilibrio como se muestra a continuación.

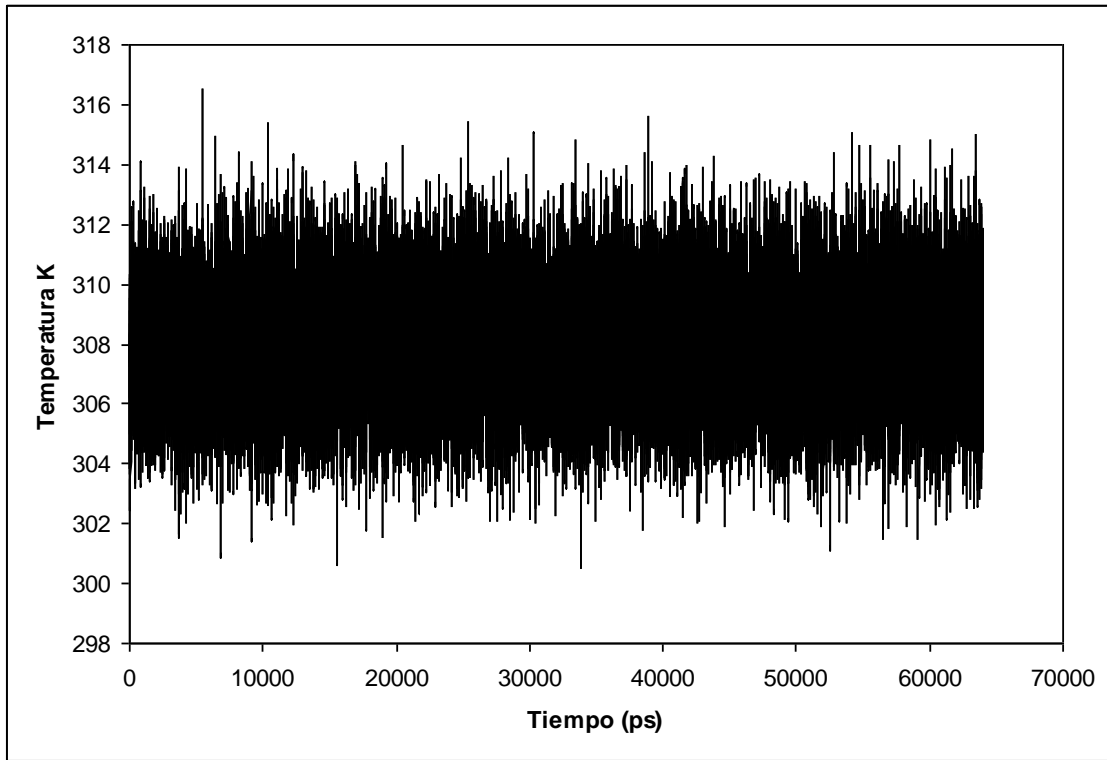


El desplazamiento lateral permaneció constante:



Anexo 6
Dinámica Molecular
Datos de pre-equilibrio de la membrana celular 128 DPPC por 5 ns

Variación de la temperatura en el tiempo de simulación



Lípido dipalmitoilcolina

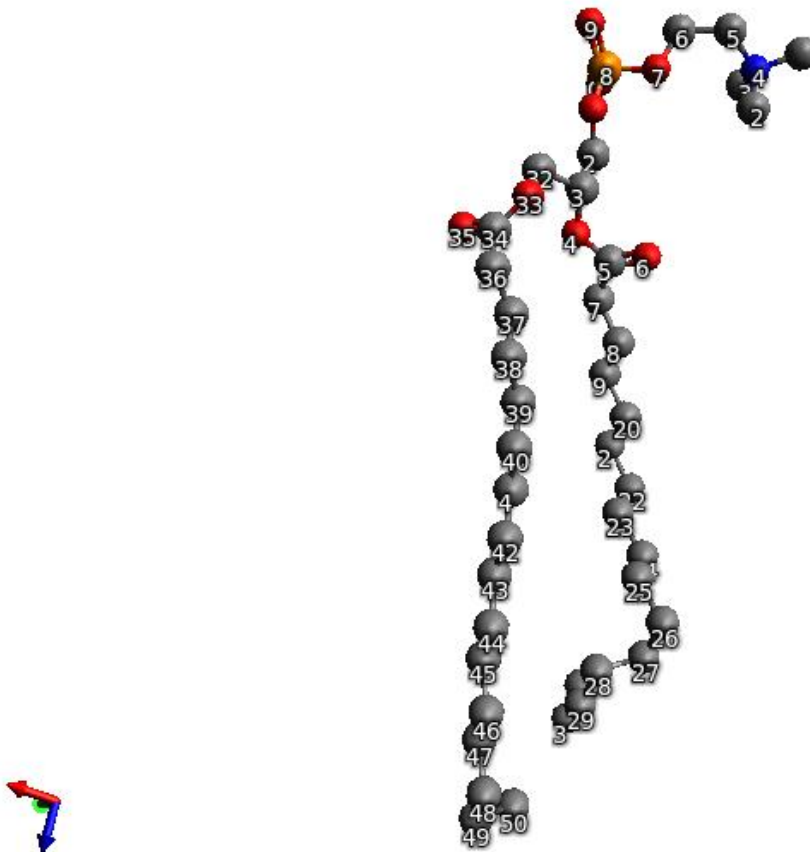


Figura de la fosfatidil colina, los atomos etiquetados de 1 a 10 fueron utilizados para determinar la densidad superficial de la membrana.

Nombre y Función de las Proteínas 38 proteínas analizadas, las cuales se obtuvieron de eliminar todas aquellas con un peso molecular superior a 180 kDa y que no fueran de la especie Homo Sapiens.

1. 2AZ5 Citocina Tumor necrosis factor (TNF-alpha)

DKPVAHVVANPQAGQLQWLNRRANLLANGVERDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPST-
HVLHTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLS-
AEINRPDYLDFAESGQVYFGIHAL

2. 2QE3 Citocina TNF superfamily ligand TL1A

GSHMLKGQEFAP-
SHQQVYAPLRADGDKPRAHLTVVRQTPTQHFKNQFPALHWEHELGLAFTKNRMNYTNKFL-
LIPESGDYFIYSQVTFRGMTSECSEIRQAGRPNKPSITVVITKVTDSYPEP-
TQLLMGTKSVCEVGSNWFQPIYLGAMFSLQEGDKLMVNVSDISLVDYTKEDKTFFGAFL

3. 2K01 Quimiocina CXCR4

GMKPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTCPNCACQIVARLKNNNRQVCIDPKLK-
WIQEYLEKCLNK

4. 1SDF Quimiocina SDF-1

KPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALN

5. 1MI2 Citocina Inflammatory protein-2.

AVVASELRCQCLKTLPRVDFKNIQSLSVTPPGPHCAQTEVI-
ATLKGQKQVCLDEAPLVQKIIQKILNKGKAN

6. 1NAP Quimiocina neutrophil activating peptide-2

AELRCLCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTNCNQEVIATLKDGRKICLDPDAPRIK-
KIVQKLAGDESAD

7. 1ROD Quimiocina IL-8

SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSGDGRELCLDPASPIV-
KKIIEKMLNSDKSN

8. 1F9R Quimiocina CXCL PF-4

EAEEDGDLQCLCVKTTSSQVRPRHITSLEVIKAGPHCAVPQLIATLKNRKCICLDLQAP-
LYKKIIEKLLLES

9. 1DOK Quimiocina monocyte chemoattractant protein 1

MQPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFK-
TIVAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT

10. 1NCV Quimiocina monocyte chemoattractant protein 3

QPVGINTSTTCCYRFINKKIPKQRLESYRRTTSSHCPREAVI-
FKTKLDKEICADPTQKWVQDFMKHLDKKTQTPKL

11. 2RA4 Quimiocina CCL13

MQPDALNVPSTCCFTFSSKKISLQRLKSYVITTSRCPQKAVI-
FRTKLGKEICADPKEKWVQNYMKHLGRKAHTLKT

12. 1ESR Citocina monocyte chemotactic protein

EPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTQRGKEVCADPKER-
WVRDSMKHLDQIFQNLKP

13. 1EIG Citocina eotaxin-2

VVIP-
SPCCMFFVSKRIPENRVVSYQLSSRSTCLKAGVIFTTKKGQQSCGDPKQEWVQRYMKNLDAKQKKA
SPR

14. 1B53 Quimiocina MIP-1A

SLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFIAAYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA

15. 1G91 Citocina myeloid progenitor inhibitory factor-1

MDRFHATSADCCISYTPRSIPCSLLESYFETNSECSKPGVIFLTKKGRRF-
CANPSDKQVQVCMRMLKLDTRIKTRKN

16. 2VXW quimiocina Rantes

FSPLSSQSSACCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSGKCSNPAV-
VVFTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEMS

17. 1G26 Citocina Granulin A

VVHCDMEVICPDGYTCCRLPSGAWGCCPFTQ

18. 2JYE Citocina

AMDVKCDMEVSPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAG-
FTCDTQKGTCEQKLAAALE

19. 2R52 Citocina Bone morphogenetic protein 6

MAPTSASSRRRQQRNRSTQSQDVARVSSASDYNSELKTACRKHLYVVFQDL-
GWQDWIAPKGYAANYCDGECFPLNAHMNATNHAIVQTLVHLMNPEYVPKPCAP-
TKLNAISVLYFDDNSNVILKKYRNMVVRACGCH

20. 3BMP Citocina Bone morphogenetic protein

QAKHKQRKRLKSSCKRHPLYVDFSDVGWNDWIVAPPGY-
HAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKACCVPTLSAISMLYLDENEKVVLK-
NYQDMVVEGCGCR

21. 1J8I Citocina Lymphotactin

VGSEVSDKRTCVSLLTQRLPVSRIKTYTITEGSLRAVIFITKRGLKVCADPQAT-
WVRDVVRSMDRKSNTNRNMIQTKPTGTQSTNTAVTLTG

22. 1O7Y Quimiocina small inducible cytokine b10

VPLSRTVRCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCCLNPESKAI-
KNLLKAVSKEMSKRSP

23. 1F2L Quimiocina fractalkine

QHHGVTKCNITCSKMTSKIPVALLIHYQQNQASCGKRAIILETRQHR-
LFCADPKEQWVKDAMQHLDRAAALTRDG

24. 1NR2 Citocina Thymus and activation-regulated chemokine

ARGTNVGRECCLEYFKGAIPRLKLTWYQTSSEDCSRDAIVFVTVQGRAICSDPNNKRVKNAV-
KYLQSLERS

25. 1GIF Citocina glycosylation-inhibiting factor

MPMFIVNTNVPRASVPDGFLSELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCALC-
SLHSIGKIGGAQNRYSKLLCGLLAERLRISPDRVYINYYDMNAANVGWNNSTFA

26. 1I16 Citocina IL-16

MPDLNSSTDSAASASAASDVSVESTAEATVCTVTLEKMSAGLGFSLGGKGLHGDK-
PLTINRIFKGAASEQSETVQPGDEILQLGGTAMQGLTRFEAWNIKALPDGPVTI-
VIRRKSLQSKETTAAGDS

27. 1JLI Citocina IL-3

ANCSIMIDEIIHHLKRPPNPLLDPNLNSEDMDILMERNLRTPNLLAFVRAVKHLENASAIE-
SILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIKGDWNEFRRKLTFFYLKTLENAQAQQ

28. 1GA3 Citocina IL-13

GGPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES-
LINVSGCSAIEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLLLHLKFLFREGRFN

29. 1CNT Citocina ciliary neurotrophic factor

MAFTEHSPLTPHRRDLCSRSIWLARKIRSDLTALTESYVKHQGLNKNINLDSADG-
MPVASTDQWSELTEAERLQENLQAYRTFHVLLARLLEDQQVHFTPTEGDFHQAIHT-
LLLQVAAFAYQIEELMILLEYKIPRNEADGMPINVGDG-
GLFEKKLWGLKVLQELSQWTVRSIHDLRFISSHQTGIP

30. 1M4R Citocina IL-22

QGGAAAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSE-
CYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLS-
NRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

31. 1ILK Citocina IL-10

NSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMI-
QFYLEEVMMPQAENQDPDI-
KAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFD-
IFINYIEAYMTMKIRN

32. 1QVN Citocina IL-2

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKPYMP-
KKATELKHLQCLEEELKPLEEALNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA-
DETATIVEFLNRWITFCQSIISTL

33. 2ILA Citocina IL-1

SFLSNVKYNFMRIIKYEFILNDALNQSIIIRANAQYLTAALHNLDEAVKFDMGAYKSSKDDA-
KITVILRISKTLQLYVTAQDEDQPVLLKEMPEIPKTITGSETNLLFFWETH-
GTKNYFTSVAHPNLFIATKQDYWVCLAGGPPSITDFQILENQA

34. 3DI2 Citocina IL-7

MGDCDIEGKDGKQYESVLMVSIQQLDMSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLF-
RAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVKGRKPAAL-
GAAQPTKSLEENKSLKEQKLNLDLFCFLKRLLEIQTWCWNKILMGTKEH

35. 1BBN Citocina IL-4

EAEAHKCDITLQEIITLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKDTTEKETFCRA-
ATVLRQFYSHHEKDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEAD-
QSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS

36. 1BGC Citocina granulocyte colony-stimulating factor

TPLGPARSLPQSFLKCLEQVRKIQADGAELQERLCAAHKLCHPEELM-
LLRHS LGIPQAPLSSCSSQSLQLRGCLNQLHGGLFLYQGLLQALAGISPELAPTL-
TLQLDVTDFATNIWLQMEDLGAAPAVQPTQGAMPTFTSAFQRRAGGVLVASQLHRFLELAYR-
GLRYLAEP

37. 1EVS Citocina oncostatin m

AAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLLDPYIRIQGLDVPKLEHCRERP-
GAFSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARP-
NILGLRNNIYCMAYLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRLEGCRFLHGY-
HRFMHSVGRVFSKW

38. 1CSG Citocina granulocyte colony-stimulating factor receptor

APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPCLQTRLE-
LYKQGLRGS LTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETS CATQIITFESFKENLKD FLLVIPFDCWEPVQE

39. 1HUL Citocina IL-5

PTSALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPVHKNHQLCTEEIFQGIGTLESQTVQGGTVER-
L FKNLSLIKKYIDGQKKKCGEERRRVNQFLDYLQEF LGVMNTEWI

40. 1AX8 Citocina obesity protein

VPIQKVQDDTKTIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILT-
LSKMDQTLAVYQQILTSMP SRNVIQISNDLENLRDLLHVLA F-
SKSCHLPEASGLETDSLGGVLEASGYSTE VVALSRLQGS LQDMLWQLDLSPGC

41. 1JOS Citocina

MAREFKRSDRVAQEIQKEIAVILQREVKDPRIGMVTVSDVEVSSDLSYA-
KIFVTFLFDHDEMAIEQGMKGLEKASPYIRSLLGKAMRLRIVPEIRFI-
YDQSLVEGMRMSNLVTNVVREDEKKHVEESN

42. 2CR3 Citocina growth factor receptor

GSSGSSGVEVESFLVHPGDLLQLRCRLRDDVQSINWL-
RDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSGPSSG

43. 1IRP Citocina IL-1alpha

MRPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGP NVNLEEK-
IDVVPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLS ENRKQDKRFAF-
IRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE

44. 2DLL Citocina Interferon regulatory factor 4

GSSGSSGKLRQWLIDQIDSGKYPGLVWENEEKSIFRIPWKHAGKQDYNREEDAALFKA-
WALFKGKFRREGIDKDPPTWKTRLR CALNKSNDFEELVERS QLDISDPYKVYRIVPESGPSSG