

# **PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS AISLADOS DE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) COMO AGENTES TERAPÉUTICOS Y ADYUVANTES MOLECULARES PARA PECES Y MAMÍFEROS**

**Autores principales:** Jannel Acosta Alba, Mario Pablo Estrada García<sup>1</sup> y Yamila Carpio González

**Otros autores:** Vivian Montero Alejo, Janet Velázquez, Iris Valdés, Reynold Morales, Antonio Morales, Yasser Zamora, Yanet Prieto, Hilda Elisa Garay, Osvaldo Reyes, Elsa Rodríguez, Sonia González, Ania Cabrales y Yordanka Masforrol

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), P.O.Box. 6162, Habana 10600, Cuba. Teléfonos: 537 2504423. Fax: 537 2731779

Otra entidad participante: Departamento de Bioquímica, CIDEM

<sup>1</sup> Autor de correspondencia. Correo electrónico: [mario.pablo@cigb.edu.cu](mailto:mario.pablo@cigb.edu.cu)

**Jannel Acosta Alba** (17%). Diseño de las estrategias de trabajo. Aislamiento, clonación y caracterización funcional de los péptidos antimicrobianos Oreochromicinas. Escritura de artículo científico y patente.

**Mario Pablo Estrada García** (14%). Diseño y dirección de las estrategias de trabajo, seguimiento y discusión de los experimentos. Escritura de artículo científico y patente.

**Yamila Carpio González** (14%). Caracterización funcional de los péptidos antimicrobianos Oreochromicinas. Escritura de artículo científico.

**Vivian Montero Alejo** (8%). Caracterización funcional de los péptidos antimicrobianos Oreochromicinas.

**Janet Velázquez** (7%). Caracterización funcional de los péptidos antimicrobianos Oreochromicinas.

**Iris Valdés** (6%). Caracterización funcional de los péptidos antimicrobianos Oreochromicinas.

**Reynold Morales** (4%). Experimentos de inmunogenicidad en tilapia.

**Antonio Morales** (4%) Experimentos de inmunogenicidad en tilapia.

**Yasser Zamora** (4%). Experimentos de inmunogenicidad en ratones.

**Yanet Prieto** (4%). Purificación del antígeno E2CD40.

**Hilda Elisa Garay** (4%). Síntesis química de las Oreochromicinas.

**Oswaldo Reyes** (4%). Síntesis química de las Oreochromicinas.

**Elsa Rodríguez** (3%). Determinación del efecto de las Oreochromicinas en la respuesta inmune celular.

**Sonia González** (3%). Escritura de la patente que avala el trabajo.

**Ania Cabrales** (2%). Síntesis química de las Oreochromicinas.

**Yordanka Masforrol** (2%). Síntesis química de las Oreochromicinas.

## RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) constituyen un componente importante del sistema inmune innato. Los peces teleósteos representan un recurso potencial para el descubrimiento de nuevos péptidos antimicrobianos, ya que estos organismos dependen en gran medida de su sistema inmune innato para combatir las infecciones en el medio ambiente acuático donde ellos se desarrollan. Los PAMs tienen un papel fundamental en la defensa contra patógenos ya sea por sus acciones antimicrobianas directas o por el amplio rango de funciones inmunomoduladoras que ellos poseen. En el presente estudio, se aislaron por primera vez los ADNc que codifican tres péptidos antimicrobianos catiónicos  $\alpha$ -helicoidales a partir de branquias de tilapia (*Oreochromis niloticus*) basado en la búsqueda en las bases de datos de EST de tilapia de secuencias homólogas a PAMs informadas en la literatura. Estos péptidos se nombraron oreochromicinas (Oreoch-1, Oreoch-2 y Oreoch-3) y se caracterizaron en base a sus actividades antimicrobianas y citotóxicas y las propiedades de unión a lipopolisacáridos (LPS). Además se realizó la evaluación de la capacidad de estos péptidos para estimular la respuesta inmune contra antígenos proteicos co-inyectados en ratones y tilapia y se evaluaron sus efectos sobre la secreción *in vitro* de las citoquinas TH1 y TH2 IFN- $\gamma$  e IL-4, respectivamente. A pesar de que las evidencias de la función potencial de los PAMs en la regulación de la respuesta inmune adaptativa en especies de mamíferos se han incrementado en los últimos años, no existen estudios previos sobre los efectos de PAMs catiónicos  $\alpha$ -helicoidales aislados de organismos acuáticos como adyuvantes moleculares en experimentos de vacunación con vacunas de subunidades. Los resultados obtenidos proporcionan importantes conocimientos para el uso de estos péptidos como adyuvantes moleculares y para el tratamiento y/o prevención de infecciones microbianas en peces y mamíferos.

## COMUNICACIÓN CORTA

### Resultados y discusión

Los péptidos antimicrobianos anfipáticos y catiónicos de 12-50 residuos aminoacídicos están presentes en prácticamente todas las formas de vida como antibióticos naturales. Los PAMs por lo general tienen amplio espectro de actividad antimicrobiana y la capacidad para modular la respuesta inmune a través de una variedad de mecanismos. Ambas funciones son una parte integral del proceso de la inmunidad innata. En consecuencia los péptidos antimicrobianos catiónicos se consideran una nueva generación de antibióticos, así como moduladores de la respuesta inmune innata.

Las vacunas de subunidades contienen antígenos altamente purificados con una mejor tolerabilidad y perfiles de seguridad comparado con las vacunas clásicas, pero la respuesta inmune que inducen es subóptima sin la ayuda de adyuvantes. Los adyuvantes pueden ser utilizados para mejorar la magnitud y el tipo de la respuesta inmune específica del antígeno. Además de su actividad microbicida, los PAMs tienen muchas otras funciones que tienen un impacto en la calidad, la eficacia, y el tipo de la respuesta inmune que acentúa su papel en la vinculación de la inmunidad innata y adaptativa. Recientemente, las propiedades inmunomoduladoras de los PAMs se han demostrado en ratones. Por ejemplo,  $\alpha$ -defensinas humanas derivadas de neutrófilos potencian la producción en el suero de IgG antígeno específica y la liberación de IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6 e IL-10 por las células T CD4+. Además, el PAM artificial, KLKLLLLLKLK, es un potente inductor de la inmunidad adaptativa de tipo TH2 a antígenos co-inyectados. Un adyuvante sintético denominado IC31 (mezcla del PAM KLKL5KLK y deoxyinosine/deoxycytosine) satisfactoriamente induce una respuesta inmune celular y humoral antígeno-específica tipo TH1. No existen estudios previos sobre los efectos de PAMs catiónicos  $\alpha$ -helicoidales aislados de organismos acuáticos como adyuvantes moleculares en experimentos de vacunación con vacunas de subunidades.

#### **1. Aislamiento, clonación y análisis de secuencia de tres péptidos antimicrobianos de tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

En este estudio, se identificaron tres transcritos que codifican péptidos antimicrobianos de tilapia mediante la búsqueda en la base de datos de EST. Los transcritos obtenidos se nombraron Oreochromicinas (Oreoch-1, Oreoch-2 y Oreoch-3), los cuales codifican tres pre-pro-péptidos de 76, 89 y 77 residuos de aminoácidos, respectivamente. Los alineamientos múltiples de secuencias y el análisis filogenético sugieren que estos péptidos pertenecen a la familia Piscidina, Oreoch-1 y Oreoch-2 están relacionados con las Dicentracinas y Moronecidinas y Oreoch-3 está relacionado con los péptidos tipos Pleurocidinas. Los tres pre-pro-péptidos consisten en un péptido señal, un péptido maduro altamente catiónico de 23, 25, y 32 aminoácidos, respectivamente, y un pro-dominio carboxilo terminal.

Además, se pudo deducir mediante el análisis de rueda helicoidal de Schiffer–Edmundson la estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice anfipática de los péptidos maduros correspondientes a las Oreochromicinas y mediante el empleo del servidor I-Tasser se predijo que Oreoch-1, Oreoch-2 y Oreoch-3 adoptan una conformación  $\alpha$ -hélice.

## 2. Expresión en los tejidos y actividad antimicrobiana de los PAMs Oreochromicinas aislados de tilapia

El análisis del perfil de expresión de los genes que codifican los péptidos antimicrobianos en diferentes tejidos de tilapia reveló que se expresan constitutivamente en cerebro, corazón, riñón, riñón anterior, bazo e intestino. Tanto los sitios mucosales (intestino) como los sitios sistémicos inmunes (bazo y riñón anterior) son positivos para estos tres genes.

El espectro antimicrobiano se determinó utilizando los péptidos antimicrobianos de tilapia obtenidos por síntesis química (Tabla 1). Los péptidos Oreoch-1 y Oreoch-2 mostraron actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos analizados, con la excepción de *Aeromonas hydrophila* para ambos péptidos y *Edwardsiella tarda* en el caso de Oreoch-1 (MIC

espectro de actividad antimicrobiana más limitado contra bacterias Gram- y Gram+, siendo inactivo para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *A. hydrophila* y *E. tarda* a las concentraciones analizadas (MIC 160  $\mu$ M). Sin embargo, este péptido mostró ser más activo contra el hongo *Candida albicans*. Mediante la verificación visual de la sedimentación microbiana se determinó que los péptidos Oreoch-1, Oreoch-2 y Oreoch-3 poseen actividad contra el Oomicete *Phytophthora parasítica*.

**Tabla 1.** Espectro antimicrobiano de las Oreochromicinas (Oreoch) aisladas de tilapia (*O. niloticus*) obtenidas por síntesis química

Microorganismos	Oreoch-1	Oreoch-2	Oreoch-3
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	MIC <sup>a</sup> = 5 $\mu$ M IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> = 2,8	MIC = 5 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 2,02	MIC >160 $\mu$ M
<i>Bacillus subtilis</i> (Gram +)	MIC = 3 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 1,37	MIC = 1,7 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 0,5894	MIC = 106 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 19,22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram -)	MIC = 35 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 29,36	MIC = 6,67 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 3,75	MIC >160 $\mu$ M
<i>Escherichia coli</i> (Gram -)	MIC = 6,7 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 2,963	MIC = 5 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 2,289	MIC >160 $\mu$ M
<i>Aeromonas hydrophila</i> (Gram -)	MIC >160 $\mu$ M	MIC = 160 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 30,41	MIC >160 $\mu$ M
<i>Edwardsiella tarda</i> (Gram -)	MIC = 160 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 11,11	MIC = 20 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 2,085	MIC = 160 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 37
<i>Vibrio sp.</i> (Gram -)	ND <sup>c</sup>	ND	MIC = 106 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 67,41
<i>Candida albicans</i> (Hongo)	MIC = 20 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 10,28	MIC = 26,7 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 12,92	MIC = 40 $\mu$ M IC <sub>50</sub> = 14,10
<i>Phytophthora parasitica</i> (Oomicete)	MIC = 2,5 $\mu$ M	MIC = 2,5 $\mu$ M	MIC = 5 $\mu$ M

<sup>a</sup>MIC: Concentración mínima inhibitoria

<sup>b</sup>IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria media

<sup>c</sup>ND: No determinado.

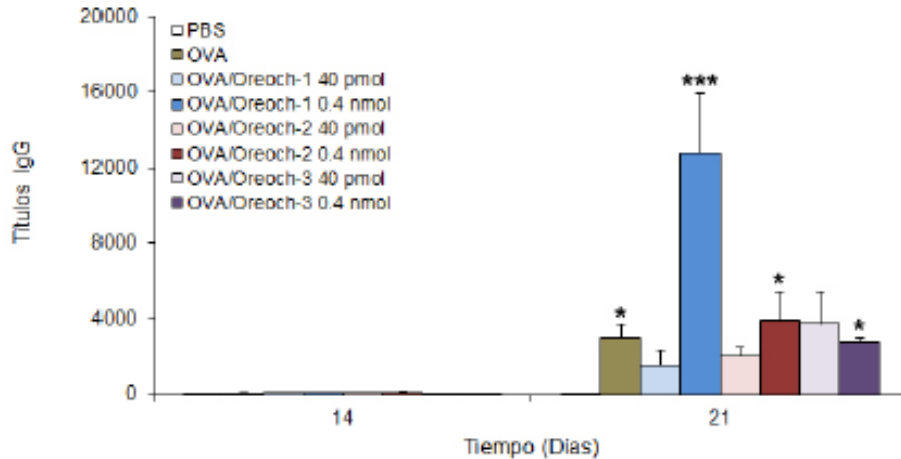
### **3. Actividad de unión a lipopolisacáridos y actividad hemolítica de las Oreochromicinas**

Para determinar que los PAMs tipo piscidinas aislados de tilapia se unen a LPS, se desarrolló un ensayo cromogénico cuantitativo de lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL). Los tres PAMs fueron capaces de unirse a LPS de manera dosisdependiente con una  $EC_{50}=1,23 \mu\text{M}$ ,  $EC_{50}=1,42 \mu\text{M}$  y  $EC_{50}=6 \mu\text{M}$  para la Oreochromicina 1, 2 y 3, respectivamente.

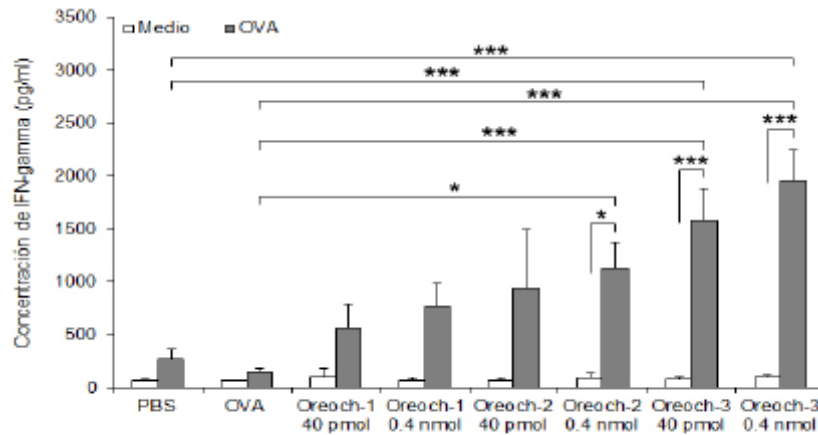
Además, los PAMs de tilapia obtenidos por síntesis química se emplearon en ensayos de actividad hemolítica contra eritrocitos de humanos y de peces. Los péptidos Oreoch-1 y Oreoch-3 no fueron hemolíticos para eritrocitos humanos a concentraciones por debajo de  $55 \mu\text{M}$ . En contraste, Oreoch-2 fue hemolítico en eritrocitos de humanos, alcanzando el 50 % de hemólisis a  $19 \mu\text{M}$ . Se observó que Oreoch-1 y Oreoch-2 tienen actividad hemolítica en eritrocitos de peces a concentraciones por encima de  $16 \mu\text{M}$  y  $7 \mu\text{M}$  respectivamente, de manera dosisdependiente. Oreoch-1 y Oreoch-2 alcanzaron el 23 % y 57 % de hemólisis respectivamente, a la máxima concentración analizada. Sin embargo, Oreoch-3 no fue hemolítico para eritrocitos de peces a concentraciones por debajo de  $55 \mu\text{M}$ .

### **4. Oreochromicinas como adyuvantes moleculares para vacunas de subunidades**

En el primer ensayo se empleó el antígeno modelo OVA para estudiar la naturaleza de la respuesta inducida por las Oreochromicinas en ratones. Sólo Oreoch-1 en la dosis más alta aumenta la producción en el suero de IgG (Fig. 1) y el subtipo IgG2a específicos contra OVA en comparación con el grupo inmunizado con OVA. Estos datos indican que Oreoch-1 induce una respuesta humoral del tipo TH1 para el antígeno OVA *in vivo*. Además, cuando se evalúa la respuesta inmune celular se observó que aunque los tres péptidos aumentaron el nivel de IFN- $\gamma$  cuando las células de bazo se reestimularon con OVA, sólo Oreoch-2 en la dosis más alta y Oreoch-3 de manera dosis dependiente mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con OVA lo que indica una respuesta inmune celular TH1 inducida por la co-administración de antígeno/PAM (Fig. 2). No se detectó secreción de IL-4 en ninguno de los grupos analizados.



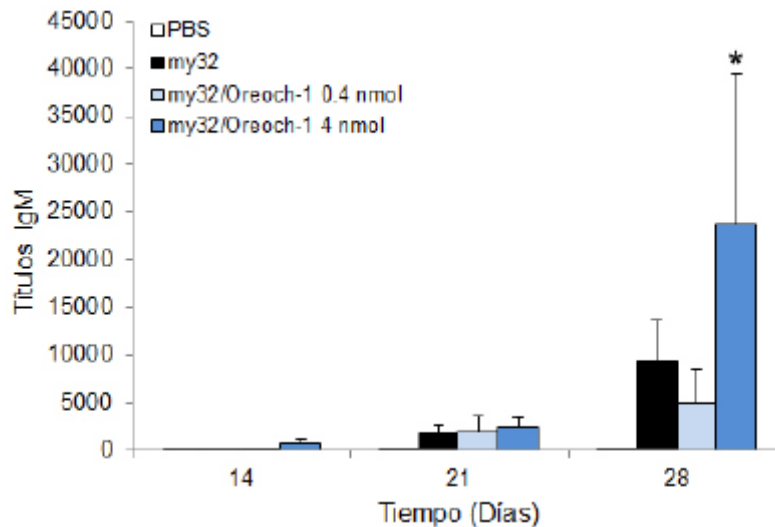
**Figura 1.** Respuesta de anticuerpos específica contra OVA en ratones inmunizados con una mezcla de OVA y Oreochromicinas. Ratones machos Balb/c (n=8) se inmunizaron intraperitonealmente los días 0 y 14 con OVA o OVA/PAM. El gráfico representa los títulos de IgG totales específicos contra OVA en los días 14 y 21. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas en los títulos de IgG totales comparado con el grupo inyectado con PBS. Las barras representan la media+ES. El análisis de los datos se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiples de Dunn. \* indica  $p < 0,05$ , \*\*\* indican  $p < 0,001$ .



**Figura 2.** La respuesta inmune celular específica para OVA en ratones (n=5) inmunizados con OVA co-formulada con Oreochromicinas se midió a los 59 días después de la primera inmunización. Los esplenocitos se re-estimularon con 10  $\mu$ g/mL de OVA y se determinó la concentración de IFN- $\gamma$  mediante ELISA. Las barras representan la media+ES. El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \* indica  $p < 0,05$ , \*\*\* indican  $p < 0,001$ .

A partir de los resultados obtenidos en ratones y teniendo en cuenta la evidencia de que my32 podría ser un antígeno promisorio en el desarrollo de vacunas para el control de las infestaciones por piojos de mar en los peces, decidimos probar la capacidad de Oreoch-1 para aumentar la respuesta inmune humoral específica para my32 en tilapia (títulos de IgM). Oreoch-1 induce una respuesta humoral específica del antígeno (Fig. 3). Estos resultados demuestran que Oreoch-1 puede ser eficaz como adyuvante para vacunas dirigidas contra los patógenos extracelulares. Este es el primer estudio que demuestra el efecto de los péptidos

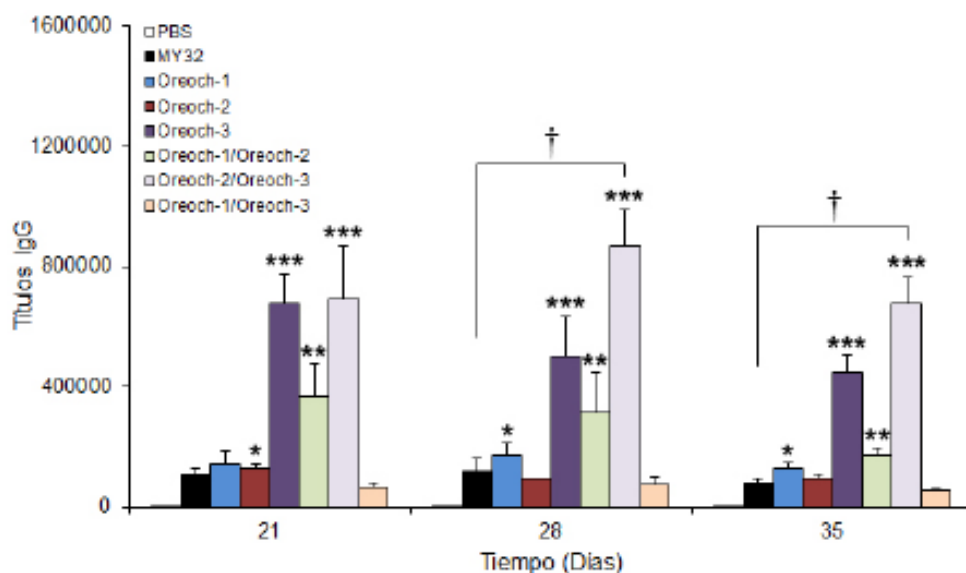
antimicrobianos  $\alpha$ -helicoidales como adyuvantes moleculares utilizando antígenos de subunidades en peces.



**Figura 3.** Respuesta de anticuerpos específicos contra my32-Ls en tilapias inmunizadas con una mezcla del antígeno my32-Ls y el PAM Oreoch-1. Tilapias de aproximadamente 50 g de peso corporal ( $n=10$ ) se inyectaron intraperitonealmente los días 0 y 14 con my32-Ls o my32-Ls/Oreoch-1 y el suero se colectó los días 14, 21 y 28 después de la primera inmunización. El antígeno y el péptido se formularon en montanide vegetalizado 888. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas en los títulos de IgM comparado con el grupo inyectado con PBS. Las barras representan la media+ES. El análisis de los datos se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiples de Dunn. \* indica  $p<0,05$ .

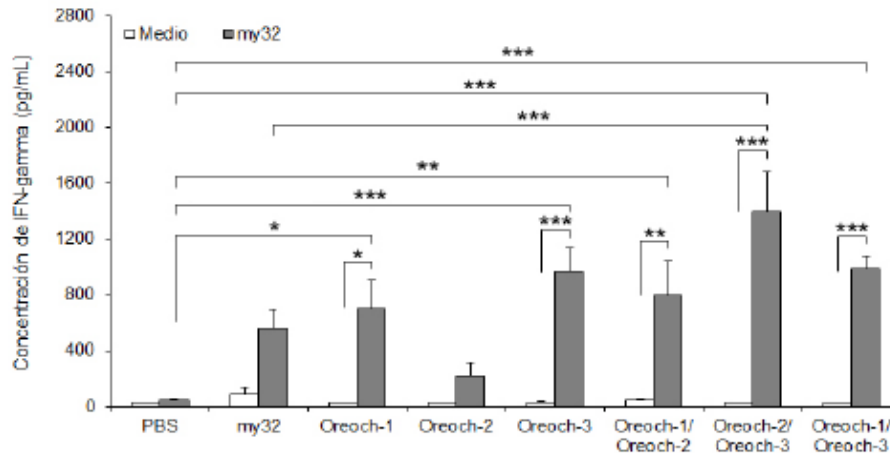
Para evaluar el efecto de diferentes combinaciones de Oreochromicinas sobre la respuesta inmune al antígeno my32-Ls, se realizó un experimento de inmunización en ratones. En el día 21, los títulos de IgG totales específicos para my32-Ls se incrementaron debido a la co-inyección con Oreoch-2 ( $p<0,05$ ) y Oreoch-3 ( $p<0,001$ ) y las combinaciones de Oreoch-1/Oreoch-2 ( $p<0,01$ ) y Oreoch-2/Oreoch-3 ( $p<0,001$ ) en comparación con PBS (Fig. 4). En los días 28 y 35, el aumento en los títulos de IgG se mantuvo en los grupos co-inyectados con Oreoch-3 ( $p<0,001$ ) y la combinación de Oreoch-1/Oreoch-2 ( $p<0,01$ ) y Oreoch-2/Oreoch-3 ( $p<0,001$ ) en comparación con PBS (Fig. 4). Además, se obtuvo un incremento en el grupo co-inyectado con Oreoch-1 ( $p<0,05$ ) en comparación con PBS. Las diferencias entre my32-Ls y la co-administración del antígeno con el PAM sólo se detectaron para la combinación Oreoch-2/Oreoch-3 ( $p<0,05$ ) en los días 28 y 35 después de la primera inmunización (Fig. 4). Además, se evaluaron los títulos de IgG1 e IgG2a específicos para my32-Ls en los grupos con mayores títulos de IgG totales a los 28 días después de la primera inmunización. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el título de IgG1 entre los grupos analizados. Los mayores títulos de IgG2a se encontraron en los grupos co-inyectados con Oreoch-3 ( $p<0,05$ ) y la combinación de Oreoch-2/Oreoch-3 ( $p<0,01$ ) en comparación con my32-Ls. La respuesta inmune mediada por células

my32-específica se evaluó en ratones inmunizados con my32 co-formulado con los PAMs a lo 78 días después de la primera inmunización mediante la determinación de los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-4 mediante ELISA. Los niveles más altos de IFN- $\gamma$  se detectaron en esplenocitos de animales co-inyectados con Oreoch-1, Oreoch-3 y las tres combinaciones en comparación con los animales inmunizados con PBS. Sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo inmunizado my32-Ls para la combinación Oreoch-2/Oreoch-3. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de PBS y my32-Ls (Fig. 5). No se detectó secreción de IL-4 en ninguno de los grupos analizados. Este es el primer informe sobre la combinación de dos PAMs con el objetivo de aumentar sus capacidades adyuvantes.



**Figura 4.** Respuesta de anticuerpos específica para my32-Ls en ratones inmunizados con una mezcla del antígeno my32-Ls y las Oreochromicinas o combinaciones de estas. Ratones hembras Balb/c (n=8) se inyectaron intraperitonealmente los días 0 y 14 con my32-Ls, my32-Ls/PAM o my32-Ls/combinaciones de PAMs. El gráfico representa los títulos de IgG totales específicos para my32-Ls. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas en los títulos de IgG totales comparado con el grupo inyectado con PBS. Las barras representan la media+ES. El análisis de los datos se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiples de Dunn. \* indica  $p < 0,05$ , \*\* indican  $p < 0,01$ , \*\*\* indican  $p < 0,001$  y † indica  $p < 0,05$ .





**Figura 5.** La respuesta inmune celular específica para my32-Ls en ratones (n=5) inmunizados con my32-Ls co-formulada con Oreochromicinas se midió a los 78 días después de la primera inmunización. Los esplenocitos se re-estimularon con 10 µg/mL de my32-Ls y 4 días después se colectó el sobrenadante de cultivo y se determinó la concentración de IFN- $\gamma$  mediante ELISA. Las barras representan la media+ES. El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \* indica  $p < 0,05$ , \*\* indican  $p < 0,01$ , \*\*\* indican  $p < 0,001$ .

La mayoría de trabajos relacionados con la actividad adyuvante de péptidos de defensa del huésped (HDP) están relacionados con las defensinas y combinaciones de los HDP y otros compuestos. Sólo unos pocos estudios caracterizan la respuesta inmune adaptativa inducida por péptidos antimicrobianos catiónicos  $\alpha$ -helicoidales. En estos estudios, la respuesta inducida por estos péptidos es una respuesta inmunitaria de tipo TH2. Los adyuvantes que favorecen la polarización de la respuesta inmune hacia TH2 son menos atractivos para las vacunas que requieren respuestas mediadas por células.

## Descripción científico-técnica detallada del resultado

### NOVEDAD CIENTÍFICA DEL TRABAJO

- Se identificaron tres péptidos antimicrobianos a partir de branquias tilapia (*O. niloticus*) basado en secuencias EST **que no estaban reportados con anterioridad** y se demostró que estos péptidos se expresan constitutivamente en todos los tejidos analizados. Además, se demostró que los péptidos sintéticos Oreoch-1 y -2 muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra las bacterias, hongos y Oomicetes mientras que Oreoch-3 muestra un espectro más limitado de actividad contra bacterias gram-negativas y gram-positivas, pero parece ser más activo contra hongos y Oomicetes. Además, los tres péptidos son capaces de unirse al lipopolisacárido y tienen una actividad citotóxica variable en eritrocitos humanos y de peces.

- Se demostró **por primera vez** que los péptidos antimicrobianos catiónicos  $\alpha$ -helicoidal actúan como adyuvantes moleculares induciendo una respuesta inmune humoral y/o celular tipo TH1 cuando se coadministran con antígenos de subunidad.

## **IMPORTANCIA PRÁCTICA PRINCIPAL DEL TRABAJO**

- La intensificación del cultivo de peces, debido a las demandas mundiales de alimentos, se ve acompañada por el auge de numerosas enfermedades infecciosas que causan enormes pérdidas en la acuicultura. La mayoría de estas enfermedades son producidas por bacterias, hongos, virus y protozoarios. Para prevenir estas infecciones se utilizan grandes cantidades de antibióticos en las granjas de cultivo de peces. Sin embargo, estudios recientes demuestran que el uso intensivo de antibióticos en la acuicultura genera la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos convencionales en los entornos acuáticos donde se desarrolla esta actividad. Por estas razones, el uso de los antibióticos convencionales está restringido en diferentes partes del mundo y la búsqueda de nuevas soluciones debido a la presencia de enfermedades infecciosas en el medio acuático se hace cada vez más urgente. Los PAMs, cuya acción protectora ha sido utilizada por los organismos pluricelulares durante millones de años como parte de su mecanismo de defensa, cumplen con muchos requerimientos que demandan la industria farmacéutica, la agricultura, acuicultura y producción de alimentos en general, pues poseen múltiples ventajas que los convierten en herramientas factibles como antibióticos naturales. Ante esta perspectiva se abre un amplio campo de investigación tanto en ciencia básica como en la biotecnología y bioingeniería de agentes terapéuticos más durables. Aunque forman parte de un mecanismo de defensa ancestral, los PAMs representan un futuro prometedor en la lucha contra microorganismos patógenos.
- El objetivo de la vacunación es la inducción de una respuesta inmune específica y eficaz contra un patógeno que conduce a la protección contra la infección y/o enfermedad causada por dicho patógeno, y que puede en última instancia resultar en su erradicación. La nueva tecnología de la vacunación ha conducido a las vacunas que contienen antígenos altamente purificados con una mejor tolerabilidad y perfiles de seguridad, pero la respuesta inmune que inducen es subóptima sin la ayuda de adyuvantes. Por tanto, una mejor comprensión de la inmunidad innata y adaptativa y su estrecha interacción a nivel molecular brinda conocimientos sobre la posibilidad de estimular selectivamente vías inmunológicas para obtener la respuesta inmune deseada. Los adyuvantes pueden usarse para mejorar la magnitud y afectar el tipo de la respuesta inmune específica del antígeno, y la combinación de antígenos con más de un adyuvante, el llamado enfoque de sistema adyuvante, se ha demostrado que permite el desarrollo de vacunas con la capacidad para generar respuestas inmunitarias eficaces.

Por estas razones la búsqueda de adyuvantes más seguros y eficaces es clave en el desarrollo de vacunas en la actualidad. Los resultados obtenidos en el presente trabajo hacen de las Oreochromicinas atractivos candidatos como adyuvantes para diferentes tipos de estrategias de vacunas donde se requieren especialmente la inmunidad mediada por células, además de la respuesta inmune humoral.

### **Avales**

- Jannel Acosta, Vivian Montero, Yamila Carpio, Janet Velázquez, Hilda Elisa Garay, Osvaldo Reyes, Ania Cabrales, Yordanka Masforrol, Antonio Morales, Mario Pablo Estrada. Cloning and functional characterization of three novel antimicrobial peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**. 2013 372-375:9-18 (FI: 2.0).

**Publicación internacional de la patente** “Amino acid sequences for controlling pathogens”. Acosta J, Estrada MP. No. de Solicitud: WO 2013/044890 A1.

### **Presentación en eventos científicos**

- Acosta J, Montero V, Morales A, Garay HE, Reyes O, Velázquez J, Estrada MP (2011). Novel tilapia antimicrobial peptides: a promising tool against pathogens in aquaculture. Congreso Biotecnología Habana' 2011 (CIGB, Habana, Cuba).
- Acosta J, Montero V, Morales A, Garay HE, Reyes O, Velázquez J, Estrada MP (2012). Cloning and functional characterization of three novel antimicrobial peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*). Congreso MarCuba' 2012 (Habana, Cuba).
- 1st International conference of fish and shellfish immunology, Vigo, España, 2013.

### **Distinciones**

- Logro institucional, 2011. Caracterización de péptidos antimicrobianos en organismos acuáticos.
- Logro institucional, 2012. Péptidos antimicrobianos de tilapia como adyuvantes moleculares en peces y mamíferos.
- XVI Fórum de Ciencia y Técnica: Aislamiento y caracterización funcional de tres péptidos antimicrobianos aislados de tilapia (*Oreochromis niloticus*). El trabajo obtuvo mención en dicho fórum.

### **Otros avales**

- Aval del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

### **Referencias bibliográficas**

(1) Acosta J, Montero V, Carpio Y, Velázquez J, Garay HE, Reyes O, Cabrales A, Masforrol Y, Morales A y Estrada MP (2013) Cloning and functional

characterization of three novel antimicrobial peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 372–375:9-18.

**(2)** Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, Hatch G, Williams A, Kritsch C, Lingnau K, von Gabain A, Andersen CS, Korsholm KS y Andersen P (2006) Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine* 24: 5452-60.

**(3)** Aichinger MC, Ginzler M, Weghuber J, Zimmermann L, Riedl K, Schütz G, Nagy E, von Gabain A, Schweyen R y Henics T (2011) Adjuvating the adjuvant: Facilitated delivery of an immunomodulatory oligonucleotide to TLR9 by a cationic antimicrobial peptide in dendritic cells. *Vaccine* 29: 426-36.

**(4)** Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, y Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSIBLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389-3402.

**(5)** Atherton E, Fox H, Harkiss D, Logan CJ, Sheppard RC, y Williams BJ (1978) A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylaminoacids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (13): 537-539.

**(6)** Bernardo L, Pavón A, Hermida L, Gil L, Valdés I, Cabezas S, Linares R, Alvarez M, Silva R, Guillén G, Nagy E, Schlick P y Guzmán MG (2011) The two component adjuvant IC31® potentiates the protective immunity induced by a dengue 2 recombinant fusion protein in mice. *Vaccine* 29:4256-63.

**(7)** Boman HG (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann. Rev. Immunol.* 13: 61-92.

**(8)** Brogden KA, Ackermann M, McCray PB, y Tack BF (2003) Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International J. of antimicrobial agents* 22 (5): 465-478.

**(9)** Bowdish DME, Davidson DJ, y Hancock REW (2005a) A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Current Protein and Peptide Sci.* 6 (1): 35-51.

**(10)** Bowdish DME, Davidson DJ, Scott MG, y Hancock REW (2005b) Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49 (5): 1727-1732.

**(11)** Browne MJ, Feng CY, Booth V, y Rise ML (2011) Characterization and expression studies of Gaduscidin-1 and Gaduscidin-2; paralogous antimicrobial peptide-like transcripts from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Devel. Comp. Immunol.* 35 (3): 399-408.

- (12) Carpio Y, Basabe L, Acosta J, Rodríguez A, Mendoza A, Lisperger A, Zamorano E, González M, Rivas M, Contreras S, Hausmann D, Figueroa J, Osorio VN, Asencio G, Mancilla J, Ritchie G, Borroto C y Estrada MP (2011) Novel gene isolated from *Caligus rogercresseyi*: A promising target for vaccine development against sea lice. *Vaccine* 29: 2810-20.
- (13) Carpio Y, García C, Pons T, Hausmann D, Rodríguez-Ramos T, Basabe L, Acosta J y Estrada M.P. (2013) Akirins in sea lice: First steps towards a deeper understanding. *Exp Parasitol* 135: 188-199.
- (14) Castañeda-Casimiro J, Ortega-Roque JA, Venegas-Medina AM, Aquino-Andrade A, Serafín-López J, Estrada-Parra S, y Estrada I (2009) Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas* 18 (1):16-29.
- (15) Cervantes-Villagrana AR, Hernández-Pando R, Biragyn A, Castañeda-Delgado J, Bodogai M, Martínez-Fierro M, Sada E, Trujillo V, Enciso-Moreno A y Rivas-Santiago B (Prime-boost BCG vaccination with DNA vaccines based in  $\beta$ -defensin-2 and mycobacterial antigens ESAT6 or Ag85B improve protection in a tuberculosis experimental model. *Vaccine* 2013; 31:676-84.
- (16) Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT, y Hodges RS (2007) Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51 (4): 1398.
- (17) Chinchar VG, Bryan L, Silphadaung U, Noga E, Wade D, y Rollins-Smith L (2004) Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology* 323 (2): 268-275.
- (18) Cole AM, Weis P, y Diamond G (1997) Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. of Biol. Chem.* 272 (18): 12008.
- (19) Cole AM, Darouiche RO, Legarda D, Connell N, y Diamond G (2000) Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44 (8): 2039-2045.
- (20) Colorni A, Ullal A, Heinisch G, y Noga EJ (2008) Activity of the antimicrobial polypeptide piscidin 2 against fish ectoparasites. *J. of Fish Diseases* 31 (6): 423-432.
- (21) Dathe M, Nikolenko H, Meyer J, Beyermann M, y Bienert M (2001) Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS letters* 501 (2-3): 146-150.

- (22) Dawson RM y Liu CQ (2008) Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents. *Critical Rev. in Microbiol.* 34 (2): 89-107.
- (23) Douglas SE, Gallant JW, Gong Z, y Hew C (2001) Cloning and developmental expression of a family of pleurocidin-like antimicrobial peptides from winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). *Devel. Comp. Immunol.* 25 (2): 137-147.
- (24) Fernandes JMO, Ruangsri J, y Kiron V (2010) Atlantic cod piscidin and its diversification through positive selection. *PloS one* 5 (3): e9501.
- (25) Fritz JH, Brunner S, Birnstiel ML, Buschle M, Mattner F y Zauner W (2004) The artificial antimicrobial peptide KLKLLLLLKLK induces predominantly a TH2-type immune response to co-injected antigens. *Vaccine* 22: 3274-84.
- (26) Hancock REW y Diamond G (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8: 402-10.
- (27) Hancock REW y Lehrer R (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnol.* 16 (2): 82-88.
- (28) Hancock REW y Scott MG (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (16): 8856.
- (29) Holzl MA, Hofer J, Steinberger P, Pfistershammer K, y Zlabinger GJ (2008) Host antimicrobial proteins as endogenous immunomodulators. *Immunol. letters* 119 (1): 4-11.
- (30) Huang HN, Pan CY, Rajanbabu V, Chan YL, Wu CJ y Chen JY (2011) Modulation of immune responses by the antimicrobial peptide, epinecidin (Epi)-1, and establishment of an Epi-1-based inactivated vaccine. *Biomaterials* 32: 3627-36.
- (31) Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, y Boman HG (1980) Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European J. of Biochem.* 106 (1): 7-16.
- (32) Hwang PM y Vogel HJ (1998) Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell Biol.* 76 (2): 235-246.
- (33) Iijima N, Tanimoto N, Emoto Y, Morita Y, Uematsu K, Murakami T, y Nakai T (2003) Purification and characterization of three isoforms of chrysophsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *European J. of Biochem.* 270 (4): 675-686.

- (34) Insel RA (2006) Potential Alterations in Immunogenicity by Combining or Simultaneously Administering Vaccine Components. *Ann N Y Acad Sci* 754:35-48.
- (35) Järver P y Langel U (2006) Cell-penetrating peptides--a brief introduction. *Biochim Biophys Acta* 1758:260-3.
- (36) Jerala R y Porro M (2004) Endotoxin neutralizing peptides. *Current topics in Med. Chem.* 4 (11): 1173-1184.
- (37) Khandelia H, Ipsen JH, y Mouritsen OG (2008) The impact of peptides on lipid membranes. *Biochim. Biophys. Act. (BBA)-Biomembranes* 1778 (7): 1528-1536.
- (38) Kovacs-Nolan J, Latimer L, Landi A, Jenssen H, Hancock RE, Babiuk LA y van Drunen Littel-van den Hurk S (2009a) The novel adjuvant combination of CpG ODN, indolicidin and polyphosphazene induces potent antibody-and cell-mediated immune responses in mice. *Vaccine*; 27: 2055-64.
- (39) Kovacs-Nolan J, Mapletoft JW, Latimer L, Babiuk LA y Hurk S (2009b) CpG oligonucleotide, host defense peptide and polyphosphazene act synergistically, inducing long-lasting, balanced immune responses in cattle. *Vaccine* 27: 2048-54.
- (40) Kovacs-Nolan J, Mapletoft JW, Lawman Z y Babiuk LA (2009c) Formulation of bovine respiratory syncytial virus fusion protein with CpG oligodeoxynucleotide, cationic host defence peptide and polyphosphazene enhances humoral and cellular responses and induces a protective type 1 immune response in mice. *J Gen Virol* 90: 1892-905.
- (41) Kumar S, Tamura K, y Nei M (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics* 5 (2): 150.
- (42) Kümmerer BM, Tautz N, Becher P, Thiel H, Meyers G (2000) The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet Microbiol.* 77(1-2):117-28.
- (43) Ladokhin AS y White SH (1999) Folding of amphipathic [alpha]-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin1. *J. of Mol. Biol.* 285 (4): 1363-1369.
- (44) Lalumera GM, Calamari D, Galli P, Castiglioni S, Crosa G, y Fanelli R (2004) Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* 54 (5): 661-668.

- (45) Lauth X, Shike H, Burns JC, Westerman ME, Ostland VE, Carlberg JM, Van Olst JC, Nizet V, Taylor SW, y Shimizu C (2002) Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *J. of Biol. Chem.* 277 (7): 5030.
- (46) Lee SC, Pan CY y Chen JY (2012) The antimicrobial peptide, epinecidin-1, mediates secretion of cytokines in the immune response to bacterial infection in mice. *Peptides* 36: 100-8.
- (47) Leroux-Roels G (2010) Unmet needs in modern vaccinology: Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* 28: C25-C36.
- (48) Li P, Wohland T, Ho B, y DING JL (2004) Perturbation of lipopolysaccharide (LPS) micelles by sushi 3 (S3) antimicrobial peptide. *J. of Biol. Chem.* 279 (48): 50150-50156.
- (49) Lillard JW, Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, y McGhee JR (1999) Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (2): 651.
- (50) Lin QP, Zhou LF, Li NN, Chen YQ, Li BC, Cai YF, y Zhang SQ (2008) Lipopolysaccharide neutralization by the antibacterial peptide CM4. *European J. of Pharm.* 596 (1-3): 160-165.
- (51) Matsuzaki K (1998) Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Act. (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1376 (3):391-400.
- (52) Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I (2003) Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet J.* 165(1):11-20.
- (53) Montano K y Vargas F (2002) Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *INCI* 27 (1): 21-27.
- (54) Mookherjee N y Hancock REW (2007) Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol. Life Sci.* 64 (7): 922-933.
- (55) Mor A, Van Huong N, Delfour A, Migliore-Samour D, y Nicolas P (1991) Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry* 30 (36): 8824-8830.
- (56) Nicolas P y Mor A (1995) Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Ann. Rev. in Microbiol.* 49 (1): 277-304.



- (57) Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, y Von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein engineering* 10 (1): 1-6.
- (58) Olafsdottir TA, Lingnau K, Nagy E y Jonsdottir I (2009) IC31, a two-component novel adjuvant mixed with a conjugate vaccine enhances protective immunity against pneumococcal disease in neonatal mice. *Scand J Immunol* 69:194-202.
- (59) Oppenheim JJ y Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current opinion in Immunol.* 17 (4): 359-365.
- (60) Otvos L y Cudic M (2007) Broth microdilution antibacterial assay of peptides. *Methods in Mol. Biol.-Clifton then Totowa* 386-309.
- (61) Pasupuleti M, Schmidtchen A, y Malmsten M (2011) Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Rev. in Biotechnol.* 1- 9.
- (62) Patrzykat A y Douglas SE (2003) Gone gene fishing: how to catch novel marine antimicrobials. *Trends in Biotechnol.* 21 (8): 362-369.
- (63) Patrzykat A, Gallant JW, Seo JK, Pytyck J, y Douglas SE (2003) Novel antimicrobial peptides derived from flatfish genes. *Antimicrobial agents and Chem.* 47 (8): 2464.
- (64) Pérez-Payá E, Dufourcq J, Braco L, y Abad C (1997) Structural characterisation of the natural membrane-bound state of melittin: a fluorescence study of a dansylated analogue. *Biochim. Biophys. Act. (BBA)-Biomembranes* 1329 (2): 223-236.
- (65) Polyansky AA, Vassilevski AA, Volynsky PE, Vorontsova OV, Samsonova OV, Egorova NS, Krylov NA, Feofanov AV, Arseniev AS, y Grishin EV (2009) N-terminal amphipathic helix as a trigger of hemolytic activity in antimicrobial peptides: A case study in laticins. *FEBS letters* 583 (14): 2425-2428.
- (66) Roy A, Kucukural A, y Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* 5 (4): 725-738.
- (67) Rozek T, Waugh RJ, Steinborner ST, Bowie JH, Tyler MJ, y Wallace JC (1998) The maculatin peptides from the skin glands of the tree frog *Litoria genimaculata*: a comparison of the structures and antibacterial activities of maculatin 1.1 and caerin 1.1. *J. of Peptide Sci.* 4 (2): 111-115.

- (68) Ruangsri J, Salger S, Caipang C, Kiron V, y Fernandes JMO (2012) Differential expression and biological activity of two piscidin paralogues and a novel splice variant in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish & Shellfish Immunol.* 32: 396-406.
- (69) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, y Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- (70) Schellack C, Prinz K, Egyed A, Fritz JH, Wittmann B, Ginzler M, Swatosch G, Zauner W, Kast C, Akira S, von Gabain A, Buschle M y Lingnau K (2006) IC31, a novel adjuvant signaling via TLR9, induces potent cellular and humoral immune responses. *Vaccine* 24: 5461-72.
- (71) Salerno G, Parrinello N, Roch P, y Cammarata M (2007) cDNA sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin; a new component of the moronecidin family isolated from head kidney leukocytes of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comp. Biochem. and Physiol. Part B: Biochem. and Mol. Biol.* 146 (4): 521-529.
- (72) Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Act.* 1462 (1-2): 55-70.
- (73) Shai Y (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Sci.* 66 (4): 236-248.
- (74) Silphaduang U, Colorni A, y Noga EJ (2006) Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Diseases of aquatic organisms* 72 (3):241-252.
- (75) Silphaduang U y Noga EJ (2001) Antimicrobials: Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature* 414 (6861): 268-269.
- (76) Solomon T (2008) New vaccines for Japanese encephalitis. *The Lancet Neurol.* 7 (2): 116-118.
- (77) Steinborner ST, Waugh RJ, Bowie JH, Wallace JC, Tyler MJ, y Ramsay SL (1997) New caerin antibacterial peptides from the skin glands of the Australian tree frog *Litoria xanthomera*. *J. of Peptide Sci.* 3 (3): 181-185.
- (78) Subramanian S, Ross NW, y MacKinnon SL (2008) Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comp. Biochem. and Physiol. Part B* 150: 85-92.

- (79) Tachi T, Epand RF, Epand RM, y Matsuzaki K (2002) Position-dependent hydrophobicity of the antimicrobial magainin peptide affects the mode of peptide-lipid interactions and selective toxicity. *Biochemistry* 41 (34): 10723-10731.
- (80) Tani K, Murphy WJ, Chertov O, Salcedo R, Koh CY, Utsunomiya I, Funakoshi S, Asai O, Herrmann SH, y Wang JM (2000) Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune responses in mice to a lymphoma idotype and carrier antigens. *International Immunol.* 12 (5): 691-700.
- (81) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, y Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25 (24): 4876-4882.
- (82) Tomasinsig L y Zanetti M (2005) The cathelicidins-structure, function and evolution. *Current Protein and Peptide Sci.* 6 (1): 23-34.
- (83) Tossi A, Sandri L, y Giangaspero A (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55 (1): 4.
- (84) Vanhoye D, Bruston F, Nicolas P, y Amiche M (2003) Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150 million years old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *European J. of Biochem.* 270 (9): 2068-2081.
- (85) Vogel H y Jaehnic F (1986) The structure of melittin in membranes. *Biophysical J.* 50 (4): 573-582.
- (86) Wilson HL, Kovacs-Nolan J, Latimer L, Buchanan R, Gomis S, Babiuk L, van Drunen Littel-van den Hurk S (2010) A novel triple adjuvant formulation promotes strong, Th1-biased immune responses and significant antigen retention at the site of injection. *Vaccine* 28:8288-99.
- (87) Wong H, Bowie JH, y Carver JA (1997) The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *European J. of Biochem.* 247 (2): 545-557.
- (88) Xu J y Zhang Y (2010) How significant is a protein structure similarity with TM-score= 0.5? *Bioinformatics* 26 (7): 889-895.
- (89) Yan S, Gu W y Xu ZP (2013) Re-considering how particle size and other properties of antigen-adjuvant complexes impact on the immune responses. *J Colloid Interface Sci* 395:1-10.
- (90) Yang Z, Nielsen R, Goldman N, y Pedersen AMK (2000) Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* 155 (1): 431.

- (91)** Yeaman MR y Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55 (1): 27-55.
- (92)** Yin ZX, He W, Chen WJ, Yan JH, Yang JN, Chan SM, y He JG (2006) Cloning, expression and antimicrobial activity of an antimicrobial peptide, epinecidin-1, from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 253 (1-4): 204-211.
- (93)** Zasloff M (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (15): 5449.
- (94)** Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415 (6870): 389-395.
- (95)** Zhang HH, Yang XM, Xie QM, Ma JY, Luo YN, Cao YC, Chen F y Bi YZ (2010) The potent adjuvant effects of chicken beta-defensin-1 when genetically fused with infectious bursal disease virus VP2 gene. *Vet Immunol Immunopathol* 136:92-7.
- (96)** Zhang Y (2009) I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 77 (S9): 100-113.