



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*Caracterización preclínica de Pep19-2.5 y Pep19-4LF,
dos péptidos antimicrobianos en desarrollo para el
tratamiento de la sepsis.*

Sergio Bárcena Varela



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

Caracterización preclínica de Pep19-2.5 y Pep19-4LF, dos péptidos antimicrobianos en desarrollo para el tratamiento de la sepsis.

Memoria presentada por D. Sergio Bárcena Varela para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Navarra y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 21 de marzo de 2018

Dr. Guillermo Martínez de Tejada de Garaizábal

Humildad y paciencia.

A mis padres y hermana,

A Aida

Agradecimientos

A lo largo de esta tesis doctoral, ha habido una serie de instituciones sin las cuales habría sido imposible el desarrollo del trabajo y a las cuales me gustaría agradecer:

A la Universidad de Navarra, que ha apostado por mí y me ha brindado la oportunidad de formarme no solo profesional sino personalmente desde que entré con 18 años. Y a la Asociación de Amigos de esta misma Universidad: ese grupo de personas que dedican parte de sus recursos para financiar, entre otros, mis estudios de doctorado. He de mostrar también mis agradecimientos a la Fundación La Caixa por su colaboración en la financiación de este proyecto; y a las entidades alemanas Brandenburg Antiinfektiva GmbH, el Centro de Investigación de Borstel y la Universidad de Heidelberg, por la fructífera colaboración y su papel crucial para el desarrollo de la presente tesis doctoral.

Sin embargo, si de entidades se trata, he de resaltar al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Navarra como *ente* con vida propia. Ese espíritu con *core* en la tercera planta del Edificio de Investigación, pero ramificaciones en CIFA y CUN. Las personas de este departamento seguirán yendo y viniendo, pero confío en que siempre se mantendrán los valores de los que tanto he alardeado: seguirá habiendo trabajo incesante, experimentos interminables, docencia vocacional, superación de adversidades, idas y venidas a los animalarios... pero también cafés terapéuticos, multiculturalidad, vídeos de tesis... y amistad. Pero lo que (muy probablemente) nunca volverá a pasar será ese histórico doblete en el concurso de Belenes de Navidades de 2016... ¡Reto a las futuras generaciones a intentar igualarlo!

Creo que no hace falta decir que la verdadera riqueza de esta tesis reside en las personas con las cuales he trabajado y convivido, total o parcialmente, durante estos años. En cualquier caso, aquí van mis agradecimientos personales:

Al Dr. Guillermo Martínez de Tejada, supervisor de este trabajo y guía durante todos estos años. Gracias por la constante tutela y valiosos consejos, pero sobretodo, gracias por inculcarme los valores del buen trabajo y perseverancia. Ha sido todo un orgullo.

Many thanks to Dr. Brandenburg and Dr. Heinbockel for their constant contribution and collaboration in this project. This spanish-german relation could be considered the best example of synergy. And special thanks to Dr. Mier, who welcomed me in Heidelberg for several months and taught me not only Science but also the art of photography. Danke schön!

A la Dra. Ana Gloria Gil, y a Ismael Aizpún, por todo el asesoramiento y ayuda técnica prestada durante parte de este trabajo.

A veterinarios, servicio técnico del animalario, y miembros del Comité Ético de Experimentación Animal, que velan por el buen hacer de los experimentos *in vivo* y por el bienestar de los animales. Y, por qué no, a los propios animales, sin los cuales estos avances científicos habrían sido imposibles.

A todo el personal de mantenimiento, limpieza, lavandería, conserjería y prevención de riesgos laborales: gracias por facilitar en todo momento el trabajo en las mejores condiciones posibles.

A todos los integrantes de Microbiología de la CUN, especialmente al Dr. Leiva, al Dr. José Luis del Pozo, a la Dra. Mirian Fernández, y al Dr. Gabriel Reina, por mostrarse siempre dispuestos a ayudar, aportar esa visión clínica a mi investigación y ser siempre un apoyo en el que consultar dudas. Ha sido un verdadero placer haber estado durante cuatro años compartiendo docencia en prácticas con vosotros.

Al Dr. Ignacio Moriyón, a quien considero mi padre académico. Siempre referente en lo científico y en lo moral. Gracias por acogerme desde que puse mi primer pie en esta Universidad y, posteriormente, gracias por la generosidad y derroche de sabiduría. Aún así, advierto que no te será fácil librarte de mí.

Al Dr. Carlos Gamazo, confidente y consejero. Sin duda alguna el mejor ejemplo de eficiencia científica. Gracias por atender mis dilemas y mostrarme el gran abanico de caminos que desde cualquier punto se pueden tomar. Estoy seguro de que seguiremos trabajando conjuntamente por mucho tiempo.

Al Dr. Ignacio López-Goñi, por hacer que la Ciencia cuente al contarla. Gracias por tus consejos y por el importantísimo favor que haces a la Microbiología desde las redes.

A la Dra. Maite Iriarte, por enseñarme que siempre se puede salir adelante y por ser ejemplo de dedicación a los demás.

A la Dra. Begoña Alonso Urmeneta, por su disponibilidad, conocimiento y capacidad de organización que siempre ha derrochado pero, especialmente, por acogerme siempre con un cariño sincero e incondicional (te aseguro que es mutuo).

Al Dr. Paul Nguewa, gracias por tutelarme aquel proyecto de Camerún, espero que algún día se haga efectivo, ¡y que podamos verlo!

A la Dra. Anabel Vitas, gracias por ser ejemplo de eficiencia y, sobretodo, por generar ese espíritu de unidad departamental desde los sótanos de CIFA. Y a la Dra. María Díez, la mejor Virgen María jamás representada en un Belén viviente. Gracias por tu siempre colaboración, disponibilidad y buen hacer.

Al Dr. David González, por su inigualable dedicación docente y científica. Fue un placer compartir charlas contigo y una pena no haber podido ayudar en este proyecto SWI. El futuro deparará nuevos retos... ¡y espero que cuentas conmigo!

A la Dra. Raquel Conde, a quien siempre veré con el doble cristal de profesora y compañera de poyata a la vez. Creo que solo he sido consciente de la gran carga de trabajo que soportas en estos últimos meses y, aún así, siempre tienes momento para responder dudas y dar consejos. Gracias.

A la Dra. Celia Fernández, a la que no solo agradezco sino también admiro. Posiblemente sea la persona más trabajadora que jamás he conocido, la que menos se ha quejado y, sin embargo, la que jamás ha perdido las ganas de disfrutar de la vida, ya sea con Olivia o bailando el *vogue*.

A la Dra. Amaia Zúñiga, otro ejemplo de constancia y sacrificio. Gracias por atender todas mis consultas y compartir conmigo tiempo dentro y fuera del laboratorio. Deseo con todas mis fuerzas que los problemas del *Bioscreen* no te quiten más tiempo vital y, por favor, sigue con tus chistes de viernes.

A Alberto Delgado. Podría darte las gracias por las multitudes labores de orden, mantenimiento y uso de equipos, seguridad o apoyo a todo el personal del departamento, pero lo que verdaderamente agradeceré será tu honradez y sentido del bien. No hace falta que nos despedamos, doy por hecho que ya no somos compañeros, sino amigos.

A María Orbe, verdadera *alma máter* de este departamento. Gracias por impulsar y coordinar el bienestar en esta gran familia, por ser la efectividad personificada y el mejor ejemplo de proactividad las veinticuatro horas del día. De mayor quiero ser como tú.

A Rosario Urdaci, la madre de todos los PIFs. Puede que no eche tanto de menos tus chistes, fotos de desórdenes en el grupo de whatsapp o aportaciones a los vídeos de la tesis... pero dudo que pueda sobrevivir sin volver a probar esos roscones de Reyes o sin que me aplastes la cabeza cada vez que busco el café. Gracias por tu trabajo constante, y el cariño que siempre me has dado. Seguiremos viéndonos, aunque sea para bajar al central ;).

A Miriam Salvador (pronto Dra. Salvador): aún recuerdo tus lágrimas de alegría cuando nos concedieron la beca. Has sido la mejor compañera de experimentos, frustraciones, escrituras, *ColaCao-time* y divagaciones varias que un doctorando podría tener. No cambies.

A Leticia Lázaro: espero que tras estos años el porcentaje de amistad hacia mí haya subido lo suficiente como para que, al menos, me eches en falta tanto como yo te echaré a tí. Me consuela creer que, por muy cosmopolita que hayas vuelto de Bruselas, algún día te asentarás de nuevo en Pamplona y podremos seguir riéndonos y vacilándonos mutuamente cerveza en mano.

A Miriam Algarabel: no sé por qué darte las gracias, ya que entre amigos está todo dicho (y lo que es más importante, demostrado). Espero haber contribuido a romper el estereotipo de que los navarros somos cerrados y endogámicos. Por mi parte, tan solo puedo hacer una reflexión y recomendación a terceros: Pongan una Algarabela en su vida: saldrán ganando. Gracias.

A Yadira Pastor: Definitivamente eres mi versión 2.0: Bioquímica, MIDI, Tesis en Micro, charlas de divulgación... y ganas de engranar todo con una vida social plena. En tu caso, tampoco hace falta poner nada más por escrito, y mucho menos despedirnos, ya que esta tesis no ha sido más que la excusa para conocernos. Ten por seguro que seguiremos brindando.

A Beatriz Aragón: Aguantarme desde primero de carrera debería convalidar ya un doctorado entero. Pero acogerme en tu casa, visitarme a Alemania y compartir historias varias (que por el bien de los dos, no voy a contar) debería otorgar un honoris causa. Gracias por tu inmenso cariño, comprensión y amistad.

A Lara Pérez: Recuerdo tu frustración cuando años atrás no conseguías esa maldita beca. Con el tiempo y, sobretodo, con tu trabajo, has conseguido lo que te proponías y merecías. Gracias por ser todo un ejemplo de perseverancia y mantener

esa cohesión desde CIFA (sé perfectamente que las PCRs son solo una excusa para vernos a todos, pero no diré nada).

A Pepe Peña: independientemente de que me interese tener amigos en Málaga para poder visitarles en el futuro, ha sido todo un placer tener un *support* en el deporte olímpico de hundimiento de cereal en solución láctica cafeinada (somos unos incomprendidos, ¡pero resistiremos!). Eres un crack.

A Melibea Berzosa, María Fernández y Maite Loperena: sois el relevo generacional que micro necesita, dentro de pocos años la gente hablará en el café de una vieja gloria llamada Sergio y tan solo vosotras y los intocables le conocerán. Dejadme en buen lugar, por favor. Pero sobretodo: disfrutad de todo lo que os viene tanto como yo lo he hecho.

To Hawraa Shahrour: your personal and professional effort in this project is commendable. I hope your stay in Pamplona is productive and exciting. I wish you the best of the luck!

Además de haber agradecido a los actualmente presentes en este departamento, no puedo olvidarme de los gigantes sobre cuyos hombros hemos crecido: Los doctores Andrés Vacas, Estrella Martínez, Miguel Ángel Casares, César Bustos, Elena Ojer, Pedro Soler y Ana Camacho, entre muchos otros. Además, he de hacer mención especial a la Dra. Raquel Ferrer, a quien puedo considerar mi hermana mayor científicamente hablando, y de quien tomé el relevo y aprendí numerosas técnicas que he usado en esta tesis: muchísimas gracias, Raquel. Del mismo modo, he de agradecer a los doctores Iosu Razquin y Susana Sánchez, por haber sentado las bases y abierto el camino científico para el desarrollo del proyecto que a continuación se presentará.

Gracias también al grupo de Valorización y Transferencia del SGI, quienes me han acogido con los brazos abiertos en esta nueva familia y me han permitido compaginar tesis y trabajo. Gracias víboras y escorpiones, en especial a Xavier Tapias y

Cristina Natal, quienes me han dado la oportunidad de desarrollarme y aprender más allá de la poyata del laboratorio. Me han demostrado que la profesionalidad y los buenos valores no son virtudes endémicas del Departamento de Microbiología, sino que, al menos, se extienden hasta ese pequeño y viejo edificio entre CIMA y CUN.

No puedo acabar estos agradecimientos sin mostrar el mayor de mis afectos por mis amigos. No diré nombres, vosotros sabéis quiénes sois. Durante esta etapa, han sido numerosas las personas que han ido y venido en mi vida, pero pocas han permanecido de manera inalterable. Hacéis que los malos momentos sean más fáciles y los buenos, mejores. Sois quienes me habéis visto reír y aquellos que me habéis visto sufrir. Gracias por siempre estar, y perdón también por mis posibles ausencias, ya que esta tesis, en ocasiones, ha requerido de sacrificios... y muchas veces habéis sido vosotros los perjudicados. Espero que me lo perdonéis y, tras estos duros años, podamos volver a disfrutar juntos más a menudo.

Pero si hay algo por encima de todo esto, es la familia. No es que sea lo más importante, sino que es lo único verdaderamente importante. No sé cómo agradecer a mis padres, Félix y Lourdes, lo que han sacrificado y luchado por mí. Sois el mejor ejemplo en el que reflejarse, tanto individualmente como en pareja. Ironías de la vida, si todo sale bien voy a ser ese "Drrrr" Bárcena que con pocos años leía en los carteles de la consulta de mi padre y que, posiblemente, sea uno de los primeros recuerdos vitales que tengo. Y a Marina, mi querida hermana (y por extensión a Joaquín) tan solo queda agradecer su cercanía en todo momento y complicidad constante: eres quien siempre está y estará, a las duras y a las maduras.

Por último, pero no menos importante, he de agradecer a quien más ha sufrido esta tesis y su interminable final: a Aida. Gracias por apoyarme en todo momento: por celebrar mis victorias y por levantarme en mis derrotas. Esta tesis es también tuya. Eres el mejor ejemplo de lucha y superación y, francamente, este trabajo no vale nada en comparación con lo que tú has logrado saliendo siempre adelante, ¡sigue luchando!. Como te dije en su día: la suerte nos juntó, pero nosotros nos mantendremos. GRACIAS.

Índice

Agradecimientos

Abreviaturas

Índice

Abstract	1
1 Introducción	3
1.1 Sepsis	4
1.1.1 El problema actual de la sepsis	4
1.1.2 Microorganismos causantes de la sepsis	7
1.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.1.4 Patofisiología de la sepsis: Patrones moleculares asociados a patógenos bacterianos y su importancia en el desarrollo de la sepsis	12
1.1.5 Tratamiento de la sepsis bacteriana	16
1.1.6 Modelos animales de sepsis	19
1.2 Resistencias a los antimicrobianos	20
1.2.1 Incidencia mundial	20
1.2.2 Mecanismos de resistencia	22
1.2.3 <i>Biofilms</i>	25
1.2.3.1 Características e importancia clínica de los <i>biofilms</i>	25
1.2.3.2 Estrategias frente a los <i>biofilms</i>	26
1.3 Péptidos antimicrobianos	27
1.3.1 Descripción y mecanismo de acción	27
1.3.2 Ejemplos relevantes de AMPs	29
1.3.3 Pep19-2.5 y Pep19-4LF	30
1.3.4 Caracterización pre-clínica de Pep19-2.5 y Pep19-4LF	31
2 Hipótesis y Objetivos	35

3 Material y Métodos	41
3.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	43
3.2 Antibióticos y péptidos antimicrobianos	43
3.3 Determinación de CMI y CMB	45
3.4 Estudios de sinergia	46
3.4.1 Índice de concentración mínima fraccionada (CIF)	46
3.4.2 Turbidimetría: Bioscreen C	47
3.5 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de <i>biofilms</i> bacterianos	48
3.5.1 Sistema del <i>Center for Disease Control (CDC) Biofilm Reactor</i> (CBR)	48
3.5.2 Tratamientos anti- <i>biofilm</i>	50
3.5.3 Procesamiento de los discos	50
3.5.3.1 Recuento de UFC	50
3.5.3.2 Visualización de <i>biofilm</i> mediante microscopía confocal	52
3.6 Modelo de inmovilización de antimicrobianos en superficies para inhibir la formación de <i>biofilms</i>	52
3.6.1 Inmovilización de antimicrobianos en PDMS	52
3.6.2 Evaluación de la actividad anti- <i>biofilms</i> de compuestos inmovilizados	54
3.7 Obtención de LPS de <i>Salmonella enterica</i> Serovar Minnesota R60 mediante el método de extracción fenol-agua	55
3.8 Modelo murino de sepsis	57
3.8.1 Evaluación de la severidad en ratones. Escala de Shrum	59
3.9 Estudio de estabilidad y biodistribución de Pep19-2.5	59
3.9.1 Estudio de estabilidad de Pep19-2.5	59
3.9.2 Estudio de biodistribución de Pep19-2.5	59
3.9.2.1 Administración de ¹⁴ C-Pep19-2.5	60
3.9.2.2 Solubilización y decoloración de muestras	61
3.9.2.3 Medición de radiación beta	61
3.10 Modelo de bacteriemia en conejos	62
3.10.1 Preparación del inóculo bacteriano	62
3.10.2 Inducción de bacteriemia y tratamientos a evaluar	62

3.10.3	Análisis de sangre y suero	63
3.10.4	Análisis <i>post-mortem</i>	64
3.10.5	Cuantificación de endotoxina y citoquinas	64
3.11	Modelo murino de cicatrización de heridas	65
3.12	Estadística	66
4	Resultados	69
4.1	Pep 19-2.5 como neutralizante de lipoproteínas de grampositivos	71
4.2	Pep19-2.5 en combinación con tratamiento antibiótico en modelo de sepsis en conejos	73
4.2.1	Cinética de bacteriemia	73
4.2.2	Niveles de endotoxina en suero	75
4.2.3	Citoquinas pro-inflamatorias en suero	78
4.2.4	Parámetros metabólicos	80
4.2.5	Marcadores hematológicos	81
4.2.6	Monitorización de temperatura	83
4.2.7	Estudio <i>post-mortem</i>	84
4.2.8	Análisis histológico del bazo	87
4.3	Pep19-2.5 como agente cicatrizante de heridas infectadas	90
4.4	Estudios de estabilidad y biodistribución de Pep19-2.5	92
4.4.1	Estabilidad de Pep19-2.5	92
4.4.2	Biodistribución de ¹⁴ C-Pep19-2.5 tras administración intravenosa en el ratón	94
4.5	Caracterización preclínica de Pep19-4LF	97
4.5.1	Determinación de la CMI y CMB de Pep19-4LF	97
4.5.2	Actividad de Pep19-4LF en combinación con antibióticos	98
4.5.3	Capacidad de Pep19-4LF en sinergia con otros péptidos	105
4.6	Evaluación de la capacidad anti- <i>biofilm</i> de Pep19-4LF	107
4.6.1	Actividad bactericida de pep19-4LF sobre un <i>biofilm</i> pre-formado	107
4.6.2	Capacidad preventiva de la formación de <i>biofilm</i> de Pep19-4LF inmovilizado sobre una matriz polimérica	110

4.7	Estudio de la actividad neutralizante de LPS de Pep19-4LF en modelo de endotoxemia murino	114
5	Discusión	119
5.1	Evaluación de la efectividad de Pep19-2.5 en combinación con tratamiento antibiótico en modelo de sepsis en conejos	121
5.2	Estudio de estabilidad y biodistribución de Pep19-2.5	126
5.3	Caracterización pre-clínica del Péptido Pep19-4LF	129
5.4	Evaluación de la capacidad anti- <i>biofilm</i> de Pep19-4LF	135
5.5	Estudio de la actividad antiinflamatoria de Pep19-4LF en modelo de endotoxemia murino	139
5.6	Discusión general	141
6	Conclusions	145
7	Bibliografía	151
8	Anexo I	***
9	Anexo II	***
10	Anexo III	***

Abstract

Sepsis is a severe pathology caused by a systemic and disproportionate pro-inflammatory response of the immune system to an infection. Frequently, sepsis worsens and results in endotoxic (or septic) shock, which is accompanied by multi-organ failure and is usually fatal in a large number of cases. Microbial molecules triggering the most potent immune system activation are lipopolysaccharide (LPS or endotoxin) and lipoproteins (LPT) of Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively. Currently, there is no specific therapy against sepsis. The only treatments available are limited to fluid replacement and other life support measures. Each year, sepsis affects approximately 800,000 people in the United States alone and it has been estimated that between 28 and 50% of those affected die.

Our group designed an antimicrobial peptide called *Aspidasept I*® (Pep19-2.5) which has high affinity *in vitro* for LPS and for whole cells of *Staphylococcus aureus* and which is capable of protecting mice against endotoxic shock. We also developed *Aspidasept II*® (Pep19-4LF) which has a much more potent antimicrobial activity than Pep19-2.5. Our hypothesis is that either Pep19-2.5 or Pep19-4LF, by themselves or combined with antibiotics could be effective anti-sepsis therapies in humans. To advance in the preclinical development of these compounds we characterize selected *in vitro* and *in vivo* activities of them with emphasis in those properties related to their application for the treatment of sepsis.

We demonstrated that Pep19-2.5: afforded protection to mice against a lethal dose of the pro-inflammatory lipoprotein FSL-1 and efficiently cooperated with ceftriaxone to counteract sepsis-associated symptoms in a rabbit model of acute bacteraemia. However, the significant toxicity of Pep19-2.5 along with its poor half-life in blood and its sensitivity to proteases led us to focus our efforts on the preclinical development of Pep19-4LF.

Compared with Pep19-2.5, we demonstrated that Pep19-4LF: i, is much more potent as antimicrobial and has a broader spectrum of activity; ii, is more capable of enhancing antibiotics and sensitizing multi-resistant strains to those compounds; iii, has

a significant anti-biofilm bactericidal activity against *P. aeruginosa* Ps4 alone and combined with levofloxacin; iv, retains its antibacterial activity when immobilized on a polymeric matrix and prevents growth of *P. aeruginosa* biofilm as efficiently as colistin. Interestingly, Pep19-2.5 and Pep19-4LF synergized with each other against multi-resistant strains and showed a comparable capacity to protect mice against a lethal endotoxic shock.

These results suggest that Pep19-4LF holds promise as a candidate for human sepsis therapy. In its turn, Pep19-2.5 could be developed for the topical treatment of infected wounds, since this peptide showed wound healing activity in mice as high as the reference compound.

1. Introducción

1.1 Sepsis

1.1.1 El problema actual de la sepsis

La sepsis es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Solo en Estados Unidos, se estima que entre 800.000 y un millón de pacientes sufren sepsis anualmente, y se pronostica que la cifra alcanzará 1.600.000 casos para 2050, aumentando proporcionalmente en el resto de países desarrollados (Martin 2012; Shankar-Hari y *col.* 2016). Debido a las dificultades para definir esta enfermedad y la falta de consenso internacional, se hace complicado obtener información epidemiológica precisa. Aun así, se estima que en los países desarrollados la incidencia se mantiene entre 140 y 300 casos por cada 100.000 habitantes, aumentando entre un 8 y 13 % anualmente (Tsertsvadze y *col.* 2016; Laupland 2013). Sin embargo, en términos de mortalidad los valores varían sustancialmente, siendo África el continente más afectado (116 muertes por cada 100.000 habitantes) en comparación con Europa, con 24 muertes por 100.000 habitantes (Kempker y Martin 2016). A pesar de estas diferencias, la mortalidad causada por sepsis en países desarrollados ronda el 15 % y a nivel global la mortalidad del shock séptico se establece entre un 25 y 46,5 % de los casos (Fleischmann y *col.* 2015; Shankar-Hari y *col.* 2016). Los costes económicos derivados de esta patología son inmensos. En promedio, los países desarrollados invierten entre \$35.000 y 50.000 por cada caso de sepsis. Solo en Reino Unido la carga económica asociada a la sepsis alcanza los \$3.500 millones anuales, y en Estados Unidos supera los \$17.000 millones (Tsertsvadze y *col.* 2016).

La definición de sepsis ha evolucionado conforme ha aumentado el conocimiento de la patología. La propuesta más reciente, establecida por consenso internacional en febrero de 2016 entre representantes de la Sociedad Médica Europea de Cuidados Intensivos (ESICM) y la Sociedad Médica de Cuidados Críticos (SCCM), así como multitud de expertos en el campo, define la sepsis como una “disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a una infección” (Singer y *col.* 2016). Los conceptos de sepsis y de septicemia no son sinónimos y, de hecho, se ha descrito que los hemocultivos son positivos en solo un

tercio de los pacientes de sepsis (Angus y Van der Poll 2013). La evolución de la sepsis viene generalmente precedida por un estadio que clásicamente se ha denominado síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés), que se caracteriza en el paciente por mostrar, al menos, dos de los siguientes síntomas (Bone 1992):

- Temperatura $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Ritmo cardiaco >90 /min.
- Frecuencia respiratoria >20 /min o $\text{PaCO}_2 <32$ mm Hg (4.3 kPa).
- Recuento de glóbulos blancos >12.000 / mm^3 o <4000 / mm^3 o $>10\%$ de neutrófilos en banda.

El SIRS no indica una respuesta desregulada que ponga en peligro la vida del paciente, siempre y cuando no llegue a causar el más mínimo daño orgánico. En el momento en el que éste sea reconocido, la probabilidad de mortalidad aumenta hasta un 10 %, y el SIRS pasa a catalogarse como sepsis. Si, fruto del avance de la inflamación, las alteraciones subyacentes del metabolismo celular y circulatorio siguen agravándose, el paciente corre el riesgo de entrar en lo que se conoce como shock séptico.

El último documento de consenso sobre sepsis, no encontró suficiente evidencia clínica para mantener el concepto de “SIRS” y “sepsis severa”, aunque sí defiende la vigencia del término choque séptico (Singer y *col.* 2016). Según estos autores, esta complicación de la sepsis se define por una hipotensión persistente -en ausencia de hipovolemia- que requiere el empleo de vasoconstrictores para mantener una presión arterial media ≥ 65 mm Hg, acompañada de niveles de lactato sérico >2 mmol/L (18 mg/dL).

La sepsis se origina en la mayoría de los casos desde un foco de infección local que se extiende causando una respuesta inflamatoria sistémica y desproporcionada. En la mayor parte de los pacientes sépticos (39 %), el foco inicial de infección se sitúa en el tracto respiratorio. Las sepsis originadas a partir de infecciones pulmonares provocan una alta mortalidad, más aún si se trata de pacientes con complicaciones previas. De hecho, más de la mitad de los pacientes sépticos sufren de alguna enfermedad crónica

previa, tales como Enfermedad Obstructiva Pulmonar Crónica (EPOC), cáncer, enfermedades hepáticas, renales, o diabetes (Moss 2005). Aunque la presencia de complicaciones previas predispone a la aparición de sepsis, existe una clara correlación entre la frecuencia de sepsis y la edad (más de la mitad de los casos se dan en mayores de 65 años) (Mayr 2010) o el *status* socioeconómico (más frecuente cuanto más bajo) (Mendu 2012).

Por otra parte, en un 20,5 % de los casos de sepsis no es posible determinar el foco inicial de infección (cultivos negativos), aunque se ha descrito que esta cifra puede llegar al 33 % (Angus y Van der Poll, 2013). Este grupo engloba a los pacientes con presencia de bacteria en sangre (bacteriemia) o con endotoxemia (ver apartado 1.1.5). En mujeres, destaca además el tracto genitourinario como tercer foco infeccioso más frecuente (tras el pulmonar y el origen inespecífico), aunque los ratios de mortalidad asociada a estos casos descienden considerablemente (véase Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Frecuencia y mortalidad de sepsis en función del sexo y del origen de la infección. Adaptado de Mayr (Mayr 2010).

Origen de infección	Porcentaje de frecuencia (mortalidad)	
	Hombre	Mujer
Respiratorio	41,8 (22,0)	35,8 (22,0)
Bacteremia, insecífico	21,0 (33,5)	20,0 (34,9)
Genitourinario	10,3 (8,6)	18,0 (7,8)
Herida	9,0 (9,4)	7,5 (11,7)
Abdominal	8,6 (9,8)	8,1 (10,6)
Implantes	1,2 (9,5)	1,0 (9,5)
Endocarditis	0,9 (23,8)	0,5 (28,1)
Sistema Nervioso Central	0,7 (17,3)	0,5 (17,5)
Otros	6,7 (7,6)	8,6 (6,5)

A pesar de la intensa investigación y los innumerables esfuerzos por parte de la comunidad científica en las últimas décadas para desarrollar nuevas terapias contra la sepsis, sólo se han conseguido leves mejoras en la gestión del paciente séptico (Seeley y Bernard 2016). La terapia estándar actual consiste en un tratamiento antimicrobiano en combinación con terapias de soporte (estabilización hemodinámica, ventilación mecánica y anticoagulantes) (Dellinger y *col.* 2013). En la mayoría de los casos, sin embargo, estos tratamientos no controlan el desproporcionado desarrollo de la cascada proinflamatoria característica de la sepsis (ver más adelante).

1.1.2 Microorganismos causantes de la sepsis

La sepsis puede ser originada por cualquier tipo de microorganismo o parásito patógeno, aunque todos los estudios coinciden en señalar a las bacterias como el principal agente etiológico de esta patología. Dentro de estos microorganismos, el grupo de las bacterias gramnegativas es el más frecuentemente asociado a la sepsis (58,3 - 62,2 % del total de casos). Las bacterias grampositivas, pese a aumentar ligeramente su incidencia durante los últimos años, se mantienen en segundo lugar en esta clasificación (32,8 - 52 %). Las bacterias anaerobias estrictas, sin embargo, representan únicamente el 1,2 % del total de casos. La incidencia de la sepsis fúngica varía en función de estudios, estimándose entre un 7 y 19 %. Por último, de manera esporádica, se diagnostica sepsis de origen vírico e incluso parasitario (< 0,7 %) (Tabah y *col.* 2012) (Tabla 1.2).

En Estados Unidos, un 19,1 % de los casos de sepsis son debidos a infecciones nosocomiales, mientras que en Europa, los rangos oscilan entre 12 y 32 %, dependiendo de los países (Goto y Al-Hasan 2013). Entre los patógenos bacterianos causantes de infecciones nosocomiales, destacan los del grupo denominado ESKAPE, acrónimo que engloba a los organismos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.* Estas bacterias, además de ser las causantes más comunes de sepsis en unidades de cuidados intensivos, son una gran amenaza debido al aumento de resistencias a

antimicrobianos que han desarrollado en las últimas décadas, como se comentará en el apartado 1.2 (Santajit e Indrawattana 2016; Rice 2010).

Tabla 1.2: Agentes causantes de la sepsis en pacientes hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos y sus ratios de mortalidad. Adaptado del estudio EUROBACT de la Sociedad Europea de Medicina de Cuidados Intensivos (ESICM) (Tabah y col. 2012).

	Patógenos causantes de sepsis	Incidencia (%)	Mortalidad a los 28 días (%)
Bacterias Gram negativas	<i>Acinetobacter spp.</i>	12,2	34,4
	<i>Klebsiella spp.</i>	11,9	33,3
	<i>Pseudomonas spp.</i>	11,4	40
	<i>Escherichia coli</i>	7,4	34,7
	<i>Enterobacter spp.</i>	6,7	33
	Otras bacterias Gram negativas	8,1	31,8
Bacterias Gram positivas	<i>Enterococcus spp.</i>	10,9	42,4
	<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i> y otros	10,7	29,1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9	31,1
	Otras bacterias Gram positivas	2,7	27,8
Anaerobios	<i>Bacteroides spp.</i>	1	46,2
	Otros anaerobios	0,5	57,1
Hongos	<i>Candida albicans</i>	4,3	41,1
	<i>Candida</i> (no <i>albicans</i>)	3	35,7
	Otros hongos	0,2	100

De entre todas las familias de patógenos causantes de sepsis, el presente trabajo se centrará, aunque no exclusivamente, en las especies bacterianas gramnegativas *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y el grampositivo *S. aureus*. Solo estas cinco bacterias provocan alrededor del 75 % de los casos de sepsis bacteriana (El-Mahallawy y col. 2016). Sus principales vías de infección, así como los correspondientes índices de mortalidad y otros datos relevantes se resumen en la Tabla 1.3.

Las infecciones nosocomiales que derivan en sepsis están relacionadas en un 30 % de los casos con la presencia de catéteres y en un 15 % están asociadas a ventilación mecánica (Bassetti y *col.* 2016). En las infecciones asociadas a catéteres, las bacterias grampositivas suponen el 66 % de los casos (mayoritariamente *S. aureus* y *S. epidermidis*), siendo el resto causadas por bacterias gramnegativas (32,3 %) y hongos (1,7 %) (Soi y *col.* 2016). Por el contrario, la principal especie bacteriana aislada en infecciones pulmonares asociada a ventilación mecánica es *P. aeruginosa*, seguida de *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii*, como se muestra en la Tabla 1.4. *Pseudomonas aeruginosa* es, además, el tercer agente etiológico más común en la sepsis a nivel global y presenta generalmente capacidad de formar *biofilm*, como se comentará en el apartado 1.2.3. (Mayr y *col.* 2013; Lee y Yoon 2017)

Tabla 1.3: Principales patógenos causantes de sepsis bacteriana.

Especie bacteriana	Foco de infección más comunes	Mortalidad de la sepsis	Comentarios relevantes	Referencias
<i>A. baumannii</i>	Patógeno oportunista, asociado a infección nosocomial: neumonía, generalmente asociado a ventilación artificial e infección de material médico (catéteres, tubos de drenaje). Secundariamente: neumonía adquirida en comunidad, traumas y quemados en piel u órganos internos e infección del tracto urinario.	30 - 71 % 52 % en infección pulmonar	El LPS de <i>A. baumannii</i> se considera el componente estimulador de la respuesta proinflamatoria y desencadenante de la sepsis. Es el patógeno que más está creciendo en prevalencia en los últimos años.	Maragakis <i>et al.</i> 2004 SiegmanIgra <i>et al.</i> 1993 Dijkshoorn <i>et al.</i> 2007 Wang <i>et al.</i> 2017
<i>K. pneumoniae</i>	Principalmente infección nosocomial: neumonía, tracto urinario y lugares de acción quirúrgica. También en abscesos hepáticos.	14,1 - 43,3 %	Un 77 % de los pacientes de larga hospitalización están colonizados por <i>K. pneumoniae</i> .	Girometti <i>et al.</i> 2014 Anderson <i>et al.</i> 2006 Paterson <i>et al.</i> 2004 Xu <i>et al.</i> 2017
<i>E. coli</i>	Pneumonía, infecciones intestinales, urinarias y biliales. Secundariamente: mastitis, meningitis e infección de catéteres.	23,7 - 60,9 %	Es el principal causante de bacteriemia, con una prevalencia de entre 19 y 41 %.	Melzer <i>et al.</i> 2007
<i>P. aeruginosa</i>	Principalmente infección nosocomial: neumonía, infección urinaria y de órganos internos. Secundariamente: infección postoperatoria y de órganos transplantados	18 - 61 %	Sus infecciones se encuentran altamente asociadas a la presencia de <i>biofilms</i> .	Parkins <i>et al.</i> 2010 Duck Jin Hong <i>et al.</i> 2015 Pier <i>et al.</i> 2007
<i>S. aureus</i>	Principalmente nosocomial: endocarditis, infección osteoarticular, cutánea y de tejido interno. Secundariamente, neumonía e infección asociada a implantes. En un 25 % de los casos, se desconoce el foco de infección.	39 - 61 % en infección pulmonar 7 - 21 % en infección de catéter 22 - 48 % en bacteremia deslocalizada	Presente de manera asintomática en el 30 % de la población. Su principal toxina pro-inflamatoria es un lipopéptido capaz de generar una respuesta proinflamatoria similar a la del LPS de bacterias gramnegativas.	Tong <i>et al.</i> 2015 Van Hal <i>et al.</i> 2012 Martínez de Tejada <i>et al.</i> 2015

Tabla 1.4: Principales patógenos causantes de neumonía relacionada con ventilación mecánica en pacientes en cuidados intensivos.

Patógeno	Frecuencia en pacientes con neumonía relacionada con ventilación mecánica en unidades de cuidados intensivos en España en 2014 (%).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6,6
<i>Escherichia coli</i>	6
<i>Haemophilus influenzae</i>	6
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4,6
<i>Enterobacter cloacae</i>	4,4
<i>Serratia marcescens</i>	4
<i>Proteus mirabilis</i>	2,6

Adaptado de Envin Helics, 2015.

1.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo no fermentador de la lactosa, frecuentemente distribuido por la naturaleza en ambientes húmedos, por lo que se suele encontrar en tierra y en el agua. Es una especie bacteriana aerobia, móvil y dotada de uno o varios flagelos polares. Se la asocia con infecciones oportunistas de plantas, animales y humanos (Cheong y col. 2008), siendo una de las bacterias más frecuentes en infecciones nosocomiales debido a su facilidad de proliferación en desinfectantes, sistemas de refrigeración, baños y duchas (LM y col. 2009). Debido a su ubicuidad, a su enorme versatilidad metabólica y a su tolerancia intrínseca a muchos detergentes, desinfectantes y compuestos antimicrobianos, *P. aeruginosa* es muy difícil de controlar en el ambiente hospitalario. Se ha descrito que esta bacteria se encuentra habitualmente en unidades de quemados, de donde es prácticamente imposible eliminar mediante los procedimientos de control convencionales (European Centre for Disease Prevention and Control 2014).

Se calcula que en Estados Unidos *P. aeruginosa* causa 2 millones de infecciones nosocomiales anualmente (Klevens y col. 2008). Este microorganismo es el que coloniza con más frecuencia el tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística (Lipuma 2010) y causa infecciones en un elevado número de pacientes inmunodeprimidos, o que sufren quemaduras severas. Es, además, el tercer patógeno más frecuente entre los causantes de bacteriemias. La septicemia causada por *P. aeruginosa* suele originarse a partir de un foco pulmonar (44 % de los casos), abdominal (20 %), urinario (8 %), o tras colonizar un implante médico (catéteres urinarios, vasculares, implantes articulares o cocleares, entre otros). En la mayoría de los casos, las complicaciones de estas infecciones se deben a la gran capacidad de *P. aeruginosa* para formar *biofilms* o biopelículas (ver apartado 1.2.3.1). En forma de *biofilm*, la bacteria puede incrementar su resistencia a los antimicrobianos varios órdenes de magnitud, lo que dificulta enormemente el tratamiento de este tipo de infecciones (Lee y Yoon 2017).

1.1.4 Patofisiología de la sepsis: Patrones moleculares asociados a patógenos bacterianos y su importancia en el desarrollo de la sepsis

Las células del sistema inmunitario innato poseen receptores capaces de reconocer los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs en inglés), es decir moléculas que son comunes en los microorganismos pero que están ausentes en el huésped. Este reconocimiento es clave para el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria, cuya primera etapa implica la activación de estas células. Dicha activación da lugar, entre otros eventos, a la secreción por parte de estas células de potentes citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, entre otras).

El lipopolisacárido (LPS o endotoxina) es el principal PAMP de bacterias gramnegativas. El LPS es un glicolípido generalmente esencial que forma parte de la monocapa más externa de la membrana externa de los gramnegativos (Figura 1.1), donde ocupa alrededor del 75 % de su superficie (Vaara y Nurminen 1999). Desde la parte más exterior de la molécula (en su localización celular) a la más interior, se distinguen las tres porciones siguientes: i) La cadena O, largo polisacárido que presenta

gran variabilidad inter e intra específica y que es el responsable principal de la inmunogenicidad del LPS. ii) El núcleo, un oligosacárido constituido por monosacáridos muy infrecuentes en la naturaleza y que puede presentar ramificaciones. iii) El lípido A, cuya estructura más frecuente (un disacárido difosforilado y esterificado con varios ácidos grasos) está muy conservado entre las bacterias gramnegativas. Precisamente, su alta conservación es la que explica que esta última parte de la molécula sea la reconocida por el huésped y por tanto que sea la sección del LPS responsable de su endotoxicidad (Rosenfeld y *col.* 2006). Se estima que, por término medio, una sola célula de *E. coli* contiene aproximadamente 10^6 residuos de lípido A (Ramachandran 2013).

Además del LPS, existen otros PAMPs con menor potencialidad pro-inflamatoria en la mayoría de bacterias. En las grampositivas, que carecen de LPS, los PAMPs más potentes son ciertos lipopéptidos y lipoproteínas (LPTs), y en menor medida los ácidos lipoteicoicos y el peptidoglicano (Martínez de Tejada y *col.* 2015). Una vez reconocidas por el sistema inmunitario, todas estas moléculas son también capaces también de desencadenar sepsis.

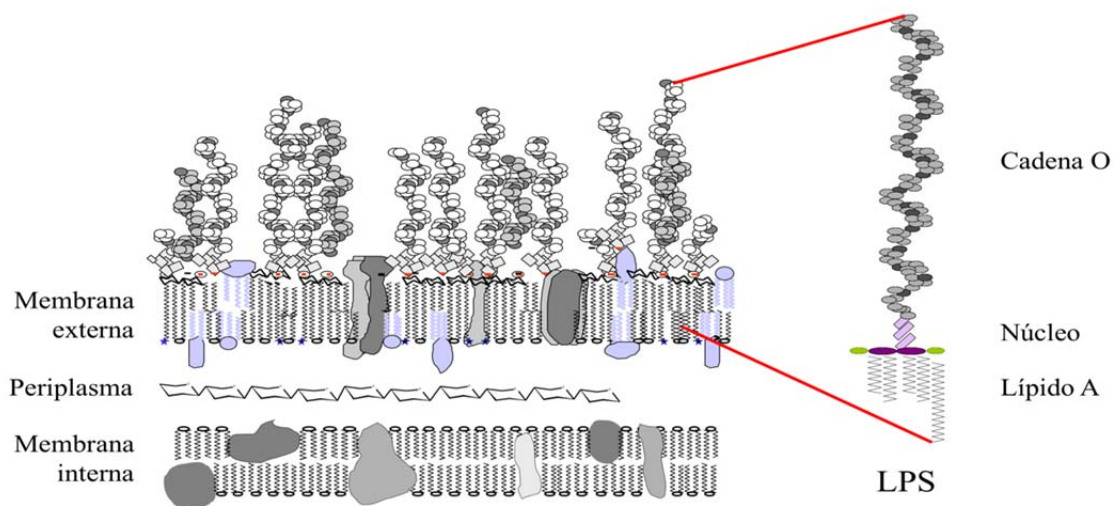


Figura 1.1. Estructura de la envoltura de bacterias gramnegativas y localización del lipopolisacárido.

La existencia de una infección es un factor necesario pero no suficiente para el desencadenamiento de la sepsis. De hecho, la patofisiología de la sepsis es consecuencia

de una exacerbada respuesta inflamatoria del huésped a la infección. Esa respuesta, que es necesaria para controlar la infección a nivel local, se activa a nivel sistémico y aumenta de intensidad progresivamente (retroalimentación positiva) hasta dañar los propios vasos sanguíneos, tejidos y órganos del huésped.

Como se mencionó anteriormente, el primer evento molecular de toda respuesta inflamatoria implica el reconocimiento de la presencia de microorganismos patógenos (específicamente de sus PAMPs) por parte de las células del sistema inmunitario innato. En el caso de bacterias gramnegativas, se genera cierta cantidad de LPS extracelular cuando éstas se dividen. Además, los mecanismos de defensa del huésped causan frecuentemente la lisis bacteriana con el consiguiente aumento de liberación de LPS.

Concretamente, los PAMPs son detectados gracias a la existencia de receptores específicos en la superficie de las células del sistema inmunitario. Entre estos receptores, denominados genéricamente receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), se encuentran los Toll-like receptors (TLRs) (Cui y col. 2014). Se han descrito hasta la fecha 13 tipos distintos de TLRs (Gao y col. 2017). El TLR mejor caracterizado es el TLR-4, que está presente principalmente en monocitos y macrófagos y que es capaz de reconocer específicamente el LPS (Calvano y col. 2003). Por su parte, el TLR-2 reconoce específicamente las LPTs, que son los PAMPs más importantes de las bacterias grampositivas (Holst y col. 2017).

A nivel molecular, el mecanismo de reconocimiento TLRs-PAMPs y su papel en el desarrollo de la sepsis se ha estudiado en gran detalle (Cui y col. 2014; Lorne y col. 2010; Gao y col. 2017). El LPS es captado inicialmente por proteínas presentes en la sangre y otros tejidos del huésped, como la *LPS-binding protein* (LBP) y la *bactericidal permeability increasing protein* (BPI). Estas proteínas tienen una gran afinidad por la región más conservada del LPS, el lípido A. A continuación, el complejo proteína-LPS interactúa con CD14, una proteína que se encuentra bien en forma soluble o bien anclada a la membrana de las células mieloides. CD14 facilita la transferencia del LPS a TLR-4/MD-2, un complejo receptor que modula la cascada de reconocimiento de LPS (Wright y col. 1990) y actúa como transductor celular de señales. MD-2 es un cofactor soluble asociado no covalentemente a TLR-4, que puede unir LPS incluso en ausencia

del receptor TLR (Jia *y col.* 2004; Nagai *y col.* 2002).

La activación de los TLRs pone en marcha la cascada proinflamatoria a través de la expresión del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y la vía de la proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Concretamente, estos factores son activadores transcripcionales de los genes que codifican para citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 e IL-6. Cuando los niveles de PAMPs en el organismo son muy elevados o bien cuando éstos están distribuidos de forma sistémica, la respuesta proinflamatoria puede amplificarse excesivamente dando lugar a la sepsis (Antonopoulou y Giamarellos-Bourboulis 2011; Nau y Eiffert 2002). Las tres citadas citoquinas proinflamatorias, liberadas rápidamente por monocitos y macrófagos, actúan como pirógenos endógenos estimulando la síntesis de mediadores secundarios y otras citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , IL-20, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, IL-33; Tabla 1.5). La producción de esta segunda cascada de citoquinas no se realiza sólo en células del sistema inmune innato, sino también en otras células, como fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, lo que genera un aumento en las proteínas de fase aguda, y atrae un gran número de células inflamatorias (Chaudhry *y col.* 2013; Simmons y Pittet 2015; Polat *y col.* 2017).

La producción de estas citoquinas proinflamatorias causa las alteraciones fisiológicas más características de la sepsis (fiebre, taquicardia, dolor, vasodilatación, daño endotelial, activación plaquetaria...). Además, durante la sepsis, la inflamación activa el sistema de coagulación, principalmente mediante las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 (Okamoto *y col.* 2016). La coagulopatía más común en la sepsis es la denominada coagulación intravascular diseminada (DIC, por sus siglas en inglés), que se produce en los vasos sanguíneos con un diámetro menor de 100 μ m (Thachil e Iba 2017). A su vez, la DIC impide la llegada de suficiente oxígeno a los órganos, promoviendo el metabolismo anaerobio (producción de ácido láctico) y causando en última instancia el fallo orgánico (Lipinska-Gediga 2016).

Tabla 1.5: Características relevantes de las citoquinas proinflamatorias más importantes en la sepsis. Adaptado de Chaudhry y col, 2013.

Citoquina Proinflamatoria	Células de origen	Función	Importancia en la sepsis
IL-1	Macrófagos Monocitos	Proliferación celular Diferenciación apoptosis	Severidad de la inflamación Mortalidad Biomarcador
IL-6	Células T Macrófagos Células endoteliales	Crecimiento celular Diferenciación Producción de citoquinas	Severidad de la inflamación Mortalidad Biomarcador
TNF-α	Macrófagos Células T CD4 Células NK	Producción de citoquinas Proliferación celular Apoptosis Necrosis tumoral Anti infección	Progreso de la inflamación Supervivencia Biomarcador
IL-8	Células epiteliales Macrófagos Células endoteliales	Quimiotaxis Angiogenesis	Mortalidad Biomarcador
IL-12	Células dendríticas Macrófagos Células B	Producción de IFN- γ , TNF- α Diferenciación Th1	Desconocido
IL-17	Células T helper	Producción de citoquinas Inmunidad antitumoral Autoinmunidad	Controvertido
IL-18	Macrófagos Monocitos Células dendríticas	Producción de IFN- γ Inmunidad antimicrobiana	Severidad de la inflamación Biomarcador
IFN-γ	Células T Células NK	Anti infección Inmunidad antitumoral Autoinmunidad	Desconocido

1.1.5 Tratamiento de la sepsis bacteriana

Actualmente, no existe una terapia directa contra la sepsis o el choque séptico.

La prevención de estas patologías está basada en el uso de vacunas y agentes quimioprolácticos (antibióticos generalmente) como estrategias preventivas de infecciones iatrogénicas (desarrolladas después de un acto médico), aunque también se recurre a la administración de inmunoterapia (Annane y *col.* 2005; Dellinger 2013). Por otra parte, los antiinflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, por ejemplo) se han utilizado durante décadas como terapia de soporte contra la sepsis, aunque su eficacia no es reconocida universalmente por la comunidad científica (Aronoff 2012). Los tratamientos antimicrobianos se complementan con otras estrategias de soporte que persiguen mantener las constantes vitales del paciente dentro de determinados rangos. El choque séptico, a menudo, provoca hiperglicemia y déficit de electrolitos, haciendo necesaria la infusión de insulina y la administración de soluciones isotónicas. Además, el paciente suele presentar problemas hemodinámicos y la ya mencionada DIC, por lo que se recurre a la administración de transfusiones sanguíneas, plaquetas, anticoagulantes, corticoesteroides y fármacos vasoconstrictores (dopamina y norepinefrina). La hipotensión provocada por la excesiva vasodilatación se combate mediante la infusión de suero fisiológico. La ventilación mecánica o la hemodiálisis suelen ser los métodos clínicos de elección en el caso de que los pacientes presenten insuficiencia respiratoria o disfunción renal, respectivamente. Por último, es importante un adecuado mantenimiento de las funciones orgánicas asistido por la monitorización cardiovascular, así como un adecuado aporte nutricional en las fases tempranas de la patología.

Pese a la importancia que tiene administrar antibióticos en el control de las infecciones bacterianas, algunos antimicrobianos en su interacción con los patógenos provocan, como efecto indeseado, la liberación de endotoxina bacteriana al torrente sanguíneo. Entre los antibióticos que promueven esta liberación de LPS se encuentran los β -lactámicos, las quinolonas y los aminoglucósidos (Lepper y *col.* 2002). Por ello, actualmente existe un gran interés en el desarrollo de compuestos capaces de neutralizar la endotoxina, o aún mejor, de agentes dotados simultáneamente de una potente actividad bactericida sumada a una elevada capacidad neutralizante de LPS, como es el caso de la polimixina B, o de la colistina (Sanchez-Gomez y *col.* 2011) (véase más adelante).

El desarrollo clínico de tratamientos contra la sepsis destaca como uno de los que ha cosechado más fracasos y frustraciones desde sus inicios. Aunque se ha recurrido a estrategias muy variadas, hasta ahora todos los fármacos ensayados han sido abandonados en distintas fases de su desarrollo clínico o incluso han sido retirados después de recibir una aprobación parcial (proteína C activada recombinante o drotrecogina). No obstante, dada la enorme importancia de la sepsis como problema sanitario, sigue habiendo un gran número de fármacos en desarrollo.

Entre las estrategias terapéuticas ensayadas destacan aquellas dirigidas a neutralizar citoquinas y mediadores proinflamatorios, como el TNF- α y la IL-1 (Reinhart y Karzai 2001). Otros investigadores estudian el posible uso de compuestos anticoagulantes como la antitrombina II (Gando *y col.* 2013), o inhibidores de la vía del complemento o del receptor TLR-4 (Samuelsen *y col.* 2004). Entre estos últimos se encuentra el inhibidor de TLR-4 TAK-242 (resatorvid®), que fracasó en estudios clínicos de fase III (Rice *y col.* 2010). También se estudió el uso del factor tisular (tifacogin®) con resultados negativos (Abraham *y col.* 2003) Además, se ha estudiado - también con resultados negativos- el empleo de anticuerpos monoclonales anti TNF- α (afelimomab®) y la administración de IFN- γ como estrategia para mejorar la actividad monocítica (Döcke *y col.* 1997). El eritoran®, antagonista del TLR-4, fracasó en la fase III al no mejorar la supervivencia de los pacientes sépticos a los 28 días (Tse 2013). Finalmente, se están probando compuestos que podrían neutralizar la endotoxina bacteriana, como antisueros humanos, estatinas, macrólidos (Bernard 2012), y se está ensayando la depuración extracorpórea, hemofiltración y hemoadsorción de endotoxinas con polimixina B inmovilizada (Toraymyxin®) (Opal *y col.* 2014; Shimada *y col.* 2000).

Este sombrío panorama subraya la urgencia de encontrar tratamientos frente a la sepsis. La comunidad científica se encuentra actualmente en una fase de reflexión, cuestionándose la metodología que se emplea en la búsqueda de nuevas terapias y reevaluando los criterios de selección de los compuestos que llegan a los ensayos clínicos.

1.1.6 Modelos animales de sepsis

Uno de los principales problemas que ha llevado al fracaso en el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de sepsis reside en la falta de modelos animales preclínicos robustos y fiables, lo que se traduce en una baja tasa de éxito en las posteriores fases clínicas (Baue 1999). No obstante, un obstáculo importante en el desarrollo de este tipo de modelos radica en las marcadas diferencias que existen en el funcionamiento del sistema inmunológico entre los animales y el ser humano.

Los modelos de sepsis animal varían ampliamente, desde la inducción de endotoxemia mediante la administración intraperitoneal (i.p.) o intravenosa (i.v.) de LPS o bacterias inactivadas, hasta estrategias quirúrgicas, como la ligación cecal y punción (CLP, por sus siglas en inglés), o la peritonitis de *stent* del colon ascendente (Nemzek y col. 2008; Lewis y col. 2016). Aunque estos últimos modelos quirúrgicos reflejan de manera más realista la sintomatología de la sepsis, suelen requerir una evaluación a largo plazo y tienen, como mayor contrapartida, la gran variabilidad en la mortalidad. Esta mayor dispersión experimental se debe a la complejidad técnica de la intervención quirúrgica y al empleo de un inóculo que necesariamente es heterogéneo y no se puede caracterizar de antemano.

Por otro lado, los modelos de endotoxemia, que no requieren de cirugía, son ampliamente usados para la evaluación de la sepsis aguda. Pese a no ser completamente realistas, tienen a su favor la mayor sencillez y la posibilidad de controlar fácilmente el material que se inocular. A su vez, esto redundaría en una menor variabilidad intra-grupo y una mayor reproducibilidad. Como solución intermedia, menos compleja que los modelos quirúrgicos pero más realista que el modelo de endotoxemia se encuentran los modelos de bacteriemia, basados en la inoculación i.v. o i.p. de bacterias vivas.

En relación con la especie animal, los modelos murinos se emplean con mucha más frecuencia que los que utilizan mamíferos más emparentados con el ser humano. La ventaja de los modelos murinos es su facilidad de manejo, la disponibilidad de estirpes modificadas genéticamente, y su bajo coste económico (Lewis y col. 2016). Sin embargo, no existe un modelo murino perfecto, debido a la naturaleza compleja y

heterogénea de la sepsis y a las diferencias del sistema inmunológico de los roedores con respecto al humano. Se ha descrito que los modelos de sepsis en conejos reflejan más estrechamente la respuesta del sistema inmune humano que los ratones. De hecho, los conejos son notablemente menos resistentes al LPS que los roedores, aunque están todavía lejos de la exquisita sensibilidad de los seres humanos a la endotoxina (Parker y Watkins 2001; Bárcena-Varela y *col.* 2017).

Existen más modelos de endotoxemia en otros animales (ovejas, perros, primates...) y el debate entre la comunidad científica sobre la idoneidad de unos u otros sigue abierto. No obstante, la mayoría de los expertos coinciden en la necesidad de utilizar varios modelos en distintas especies (incluyendo no roedores) durante la evaluación preclínica de las nuevas terapias para evitar fracasos en las posteriores etapas clínicas.

1.2 Resistencias a los antimicrobianos

1.2.1 Incidencia mundial

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, los antibióticos se han usado ampliamente para tratar enfermedades infecciosas en humanos y animales. Aunque se conocía la existencia de bacterias naturalmente resistentes a algunos antibióticos, el uso descontrolado de los mismos ha propiciado que en los últimos años hayan emergido cada vez más subpoblaciones bacterianas resistentes. El dramático aumento en la incidencia de patógenos resistentes a los antimicrobianos es un hecho que afecta ya a toda la población mundial y este problema es considerado como la mayor amenaza a la que se enfrenta la medicina moderna en el siglo XXI (*World Health Organization, WHO, 2014*). Según el estudio del *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)* de 2015, la resistencia a los antibióticos es directamente responsable de 25.000 muertes al año en Europa. Además, los gastos en cuidados sanitarios y las pérdidas de productividad asociadas se estiman en 1.500 millones de euros anuales, solo en la Unión Europea (ECDC 2017). Como dato representativo, en enero de 2017 una

mujer de E.E.U.U. murió como consecuencia de una infección por *K. pneumoniae* resistente a todos los antibióticos disponibles en el país (McCarthy 2017).

A raíz de esta crisis, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha dictado un Plan de Acción Global con el fin de combatir la proliferación de la resistencia a los antimicrobianos y la morbi-mortalidad asociada a ella. Entre las propuestas principales del marco de acción, destaca el llamamiento a la investigación y desarrollo de nuevas medicinas y terapias antimicrobianas novedosas capaces de neutralizar las resistencias a los antimicrobianos. En consecuencia, iniciativas como la aprobada por el congreso de E.E.U.U. en 2011, *Generating Antibiotic Incentives Now* (GAIN), y su homóloga Europea, *Combating Bacterial Resistance in Europe (New Drugs 4 Bad Bugs)*, en 2013 han concedido importantes ventajas e incentivos económicos a las empresas y centros de investigación que se impliquen en el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Dentro de España, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios implantó desde 2014 el Plan Estratégico y de Acción para Reducir el Riesgo de Selección y Diseminación de la Resistencia a los Antibióticos, en donde se recoge la necesidad de promover el desarrollo de antibióticos con un valor añadido frente a los ya comercializados.

A principios de 2017, la OMS emitió por primera vez en su historia una lista de prioridad mundial de bacterias resistentes a los antibióticos (Organización Mundial de la Salud, 2017). Esta lista incluye los 12 patógenos que representan la mayor amenaza para la salud humana y su objetivo fue ayudar a priorizar la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos con antibióticos. Los patógenos mencionados, enumerados de mayor a menor prioridad de acción son: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* (incluye a *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.* y *Providencia spp.*), *S. aureus*, *H. pylori*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. faecium*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *Shigella spp.* Particularmente, el documento advirtió sobre la aparición de patógenos gramnegativos resistentes a múltiples antibióticos (Shrivastava y col. 2017).

Como principal consecuencia de la resistencia a los antibióticos destaca, además, el aumento de la gravedad de la sepsis bacteriana: la terapia antimicrobiana de primera

elección puede no ser efectiva, retrasando el inicio del tratamiento efectivo y perdiendo un tiempo crítico en esta enfermedad de desarrollo tan rápido (Pogue y *col.* 2015).

1.2.2 Mecanismos de resistencia

Se conocen cuatro mecanismos principales mediante los cuales las bacterias adquieren resistencia a los antimicrobianos (Figura 1.2): (i) baja permeabilidad de la envoltura al antibiótico, (ii) expresión de bombas que expulsan el antibiótico que penetra en la célula, (iii) enzimas que inactivan los antibióticos por hidrólisis o modificación y (iv) modificación de la diana antibiótica por mutación. Estos mecanismos de resistencia se transmiten verticalmente, pero también pueden hacerlo horizontalmente, por medio del intercambio genético, incluso entre especies bacterianas genéticamente muy distantes.

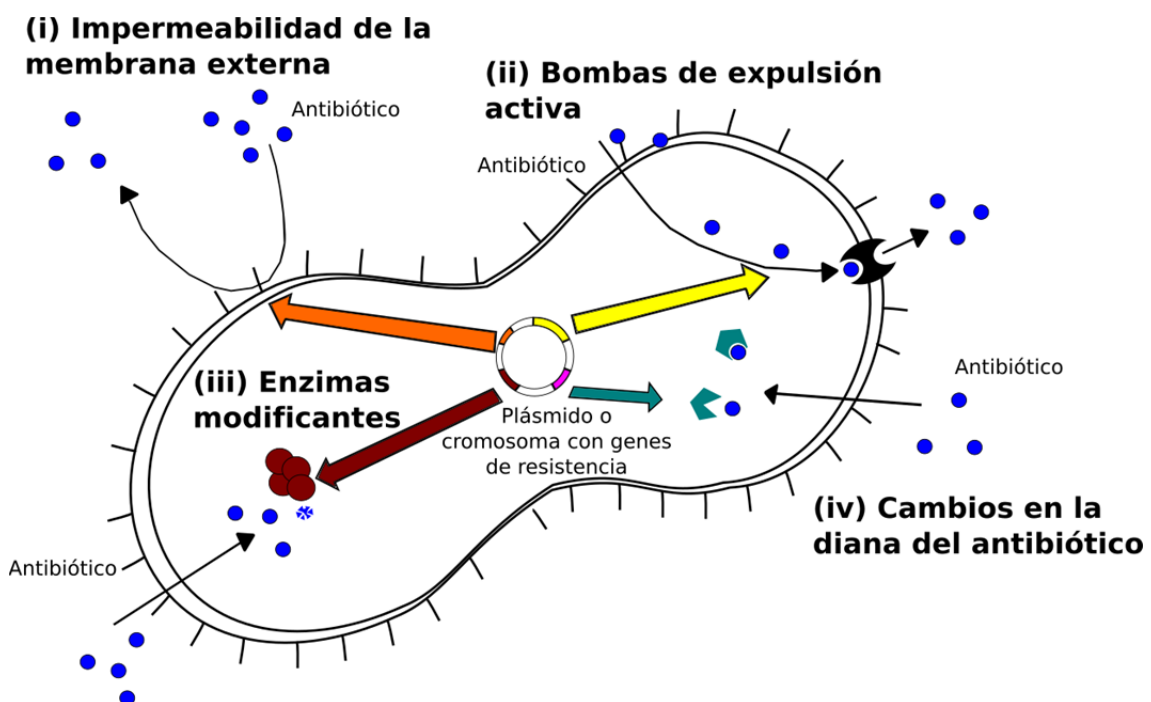


Figura 1.2: Resumen de los principales mecanismos de resistencia bacterianos. Modificado de Ferrer-Espada, 2016.

i: Impermeabilidad de la membrana externa

Las bacterias gramnegativas se caracterizan por poseer una envoltura celular que consta de dos membranas, una interna o citoplasmática y otra externa. Las dos bicapas lipídicas están separadas por una cavidad (denominada espacio periplásmico) en donde se sitúa una delgada capa de peptidoglicano (ver Figura 1.1). En especial, la membrana externa, cuya monocapa más superficial está constituida casi exclusivamente por LPS (Vaara y Nurminen 1999), es una eficaz barrera de permeabilidad frente a compuestos tóxicos, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. El LPS presenta carga negativa neta a pH fisiológico debido a los grupos fosfato presentes en el lípido A y a los grupos fosfato y carboxilo del núcleo de la molécula. Para neutralizar esta carga y proporcionar estabilidad a la membrana externa, los grupos aniónicos están unidos a cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) (Nikaido 2003; Sanchez-Gomez y *col.* 2011). Esto evita la repulsión electrostática entre las moléculas vecinas de LPS y aumenta el grado de empaquetamiento de la bicapa lipídica. En consecuencia, la superficie de la envoltura bacteriana es altamente polar, lo que dificulta la penetración de los antibióticos al interior de la bacteria, especialmente de los hidrofóbicos.

Por otra parte, la elevada hidrofobicidad del lípido A impide también la entrada por difusión de antimicrobianos hidrofílicos a la célula. Sin embargo, algunos compuestos de pequeño tamaño (β -lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol y fluoroquinolonas) son capaces de penetrar a través de las porinas, un tipo de proteína integral que atraviesa la membrana externa formando canales hidrofílicos. La ganancia de resistencia frente a este tipo de antimicrobianos puede obtenerse mediante mutaciones que reducen o eliminan la expresión de dichas porinas. Además, otros mecanismos de resistencia, como las bombas de expulsión (ver más adelante), trabajan coordinadamente con la membrana externa para reducir al máximo la concentración intracelular de un determinado compuesto tóxico.

Aunque las bacterias grampositivas carecen de membrana externa, su envoltura celular también actúa como una eficaz barrera selectiva de permeabilidad. De hecho, la eficacia de esta barrera obliga a que la captación de muchos solutos que son esenciales requiera gasto de energía en forma de ATP o bien una disipación parcial del gradiente

de protones.

ii) Bombas de expulsión activa

Las bombas de expulsión activa o de flujo (*efflux pumps*) son sistemas compuestos por varias proteínas situadas en la envoltura celular que trabajan conjuntamente para bombear al exterior de la célula sustancias perjudiciales. Estos sistemas están presentes tanto en células eucariotas como en procariontes. En gramnegativas, la eficacia de este mecanismo depende estrechamente de la integridad de la membrana externa y de su capacidad para actuar como una barrera de permeabilidad. En grampositivas constituyen la principal línea de defensa frente a antibióticos (Poole 2005).

iii) Enzimas modificantes

Aunque el antimicrobiano haya conseguido penetrar al interior de la célula, la bacteria puede sintetizar enzimas que lo modifiquen y lo inactiven. Dentro de estas enzimas, destacan las β -lactamasas, presentes tanto en gramnegativas como grampositivas, capaces de hidrolizar los antibióticos β -lactámicos. Una importante subclase de estas enzimas son las denominadas β -lactamasas de espectro extendido o BLEEs, que engloban a 200 enzimas diferentes (Falagas y Karageorgopoulos 2009). También existen otras enzimas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas) que modifican la estructura química del antimicrobiano, anulando su actividad. Este último tipo de enzimas son muy frecuentes en bacterias gramnegativas resistentes a aminoglucósidos (Ramírez y Tolmasky 2010).

iv) Modificaciones de la diana antibiótica

Otros mecanismos que pueden actuar una vez que el antimicrobiano ha entrado en la célula bacteriana son los basados en la alteración de la diana celular del antibiótico. La modificación de la secuencia diana impide total o parcialmente la unión del antibiótico a su lugar de acción. Este es el mecanismo más importante de entre los implicados en la resistencia de las enterobacterias, *P. aeruginosa* y *S. aureus* a β -

lactámicos, quinolonas y fluoroquinolonas (Kim y Hooper 2014).

1.2.3 Biofilms

1.2.3.1 Características e importancia clínica de los *biofilms*

En la naturaleza y en superficies, los microorganismos se encuentran habitualmente asociados entre sí formando biocapas (o biopelículas; *biofilms* en inglés) (Lebeaux y col. 2014). Estas estructuras contienen una o varias especies de microorganismos unidos mediante una matriz extracelular que ellos mismos secretan y que les permite adherirse a superficies tanto bióticas como abióticas. Esta matriz generalmente está compuesta de exopolisacáridos, pero también suele contener proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

Los *biofilms* bacterianos poseen una arquitectura característica y las células que los constituyen tienen unas propiedades fenotípicas y bioquímicas diferentes de las bacterias en vida libre o planctónicas (Sánchez-Gómez y Martínez de Tejada 2017). Dentro de las biopelículas, las células microbianas están protegidas de manera eficaz contra muchos tipos de agentes antimicrobianos, incluyendo los mecanismos microbicidas del huésped (Davey y O'Toole 2000). Por todo ello, se ha descrito que las células formadoras de biopelículas son mucho más resistentes (hasta 1000 veces más) a los antimicrobianos y a los efectores del sistema inmune que sus equivalentes planctónicas (Sans-Serramitjana y col. 2017; K. Lewis 2001).

La formación de biocapas no sólo confiere una ventaja al microorganismo en relación con su resistencia a los antimicrobianos, sino que también supone un importante factor de virulencia. En el ámbito clínico, las infecciones asociadas a *biofilms* son particularmente difíciles de tratar y los pacientes que las sufren tienen un alto riesgo de recidivas. Los microorganismos productores de biopelículas colonizan eficazmente los catéteres y otros implantes médicos (prótesis, válvulas, marcapasos, etc...) y son habitualmente los responsables de las infecciones asociadas a estos dispositivos (Sánchez-Gómez y Martínez de Tejada, 2017). Asimismo, las biocapas

microbianas suelen ser las causantes de infecciones pulmonares y de heridas (Hughes y Webber, 2017). Finalmente, las bacterias formadoras de *biofilm* o sus toxinas pueden desprenderse y pasar al torrente circulatorio, lo que en ocasiones es el factor desencadenante de una sepsis (Lebeaux y col. 2014).

Se han descrito varios mecanismos que parecen contribuir a la resistencia antibiótica de las biocapas bacterianas. Por un lado, la matriz extracelular exopolisacáridica dificulta la penetración de algunos antimicrobianos al interior del *biofilm* (Chan y col. 2005). Además, en las biocapas se genera un microambiente anaerobio y ácido que promueve la heterogeneidad celular a nivel fisiológico y favorece el desarrollo de células metabólicamente inactivas. Estas condiciones reducen en gran medida, o incluso anulan, la actividad de muchos antibióticos, incluidos los β -lactámicos, que sólo son eficaces sobre células metabólicamente activas (Sanchez-Gomez y Martinez de Tejada 2017).

Finalmente, dentro del *biofilm* se ha descrito la presencia de una pequeña subpoblación celular (1 % del total) con un metabolismo reducido y que no se multiplica, constituida por las llamadas bacterias persistentes (o *persisters*). Las *persisters* se caracterizan por su alta capacidad para tolerar los tratamientos antibióticos. Tras el cese del tratamiento, su reactivación y multiplicación permiten la regeneración del *biofilm* (Wood 2017). La diferencia entre *persisters* y células resistentes es que el primer tipo celular no adquiere resistencia al antibiótico empleado, sino que mantiene su sensibilidad al antimicrobiano antes, durante y después del tratamiento (Lebeaux 2014).

1.2.3.2 Estrategias frente a los *biofilms*

Las infecciones asociadas a *biofilm* son especialmente difíciles de erradicar y generalmente requieren el empleo de tratamientos antibióticos muy agresivos y de larga duración. Cuando la infección es debida a la colonización de un catéter periférico, generalmente se opta por retirar el mismo lo antes posible (Mermel y col. 2009). Sin embargo, en ciertos catéteres venosos centrales esta opción puede suponer un riesgo para el paciente, por lo que se recurre al sellado antibiótico. Esta técnica consiste en

llenar el lumen del catéter con una solución concentrada de antimicrobiano (entre 100 y 1000 veces la CMI planctónica del patógeno a eliminar) y dejarla actuar el tiempo necesario hasta conseguir la esterilización del dispositivo (Justo y Bookstaver 2014).

Cuando el *biofilm* causante de la infección se encuentra asociado a un tejido interno del paciente, resulta imposible emplear el sellado antibiótico y se recurren a otras estrategias, algunas de ellas aún experimentales. Entre otros, destacan los métodos mecánicos para la eliminación de la infección, como la exposición a campos eléctricos (Ruiz-Ruigomez y col. 2016; Del Pozo y col. 2014) o la retirada del tejido fuente de la infección (Del Pozo y Patel 2013). Los pacientes con *biofilms* pulmonares reciben antibióticos por vía inhalatoria en forma de aerosol (Sommerfeld-Ross y col. 2017) o nanoencapsulados (Sans-Serramitjana y col. 2017). Otros investigadores están desarrollando técnicas para la erradicación de las bacterias persistentes (Wood 2017) o están evaluando el empleo de bacteriófagos para lisar las células formadoras de *biofilm* (Abdulmir y col. 2015; Del Pozo y col. 2007).

1.3 Péptidos antimicrobianos

1.3.1 Descripción y mecanismo de acción

La ausencia de nuevos antimicrobianos y la progresiva expansión de bacterias resistentes han acelerado la búsqueda de compuestos alternativos a los antibióticos, como los péptidos antimicrobianos (AMPs). Además, estos compuestos tienen una buena actividad anti-*biofilm* (Sánchez-Gómez y Martínez de Tejada, 2017) y son capaces de neutralizar PAMPs, como el LPS y las LPTs (Martínez de Tejada y col. 2015). Este último hecho hace que se esté evaluando su empleo para el control de la sepsis (Bárcena-Varela y col. 2017). Los AMPs están presentes de manera natural en la primera línea de defensa del huésped. Aunque inicialmente se pensó que únicamente los organismos carentes de inmunidad adaptativa producían AMPs, se ha comprobado que estos compuestos se conservaron de manera muy fiel a lo largo de la evolución. De hecho, los AMPs, como efectores del sistema inmunitario innato, están presentes en

microorganismos, invertebrados, plantas, anfibios, peces, pájaros y mamíferos, incluyendo a los seres humanos (Cederlund y *col.* 2011).

Los AMPs tienen un número de aminoácidos que oscila entre 12 y 100. La presencia de residuos catiónicos (porcentaje variable) e hidrofóbicos (alrededor del 40-50 %) hace que estos compuestos posean una estructura típicamente anfipática. Esta propiedad es importante para su mecanismo de acción frente a bacterias. Por un lado, el carácter catiónico de los AMPs posibilita la interacción electrostática inicial con los componentes electronegativos de la superficie bacteriana (fosfolípidos y LPS, sobre todo). Por otra parte, su hidrofobicidad ayuda a que se puedan insertar en las membranas bacterianas, alterando la permeabilidad celular (Chan y *col.* 2005). Se ha descrito que esta alteración puede producirse mediante tres mecanismos distintos, dependiendo del tipo de poro que se genere por la interacción péptido-fosfolípidos (Figura 1.3) (Brogden 2005). En cualquier caso, el resultado final es que –a una concentración suficiente de AMP- estas alteraciones acaban causando la lisis celular por choque osmótico.

A concentraciones sub-inhedorias, muchos AMPs mantienen su capacidad de insertarse en las membranas bacterianas y de actuar como eficaces agentes permeabilizantes. En estas condiciones, es bien conocido que estos AMPs pueden potenciar el efecto de otros agentes antimicrobianos (incluyendo antibióticos y otros AMPs), actuando en sinergia con ellos (Hancock y Sahl 2006; Pino-Angeles y *col.* 2016) Los AMPs suelen clasificarse, en función de su estructura secundaria, en las siguientes clases: i) α -hélice ii) β -lámina iii) mezcla de α -hélice y β -lámina iv) sin estructura secundaria o irregular v) macrocíclicos (Paiva y Breukink 2013). Los dos primeros tipos son los más comunes.

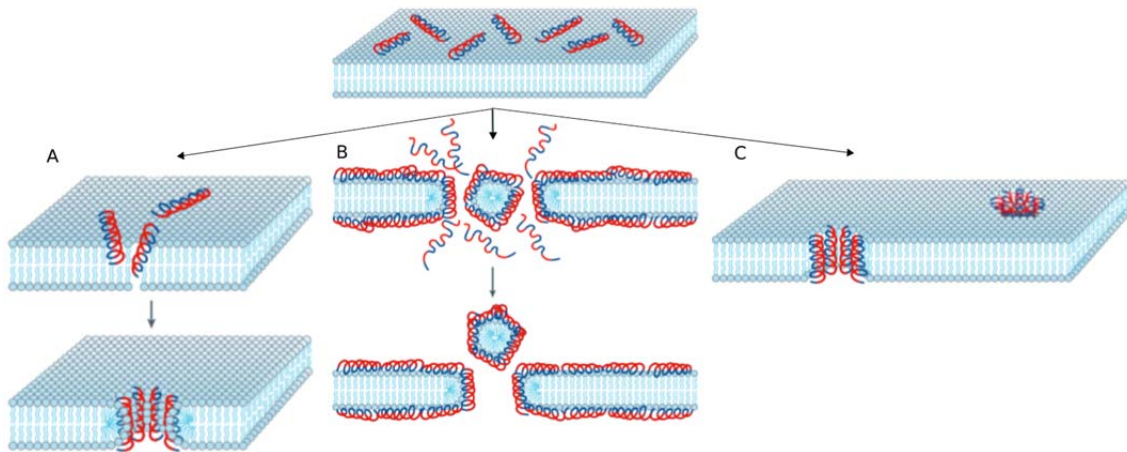


Figura 1.3: Mecanismos de acción por los cuales los AMPs pueden alterar las membranas bacterianas generando poros. A) Poro toroidal; B) Tipo alfombra; C) Barril sin fondo. Adaptado de Brogden 2005.

1.3.2 Ejemplos relevantes de AMPs

Durante las últimas décadas, se han identificado una gran variedad de AMPs, principalmente en los sistemas inmunitarios de animales vertebrados e invertebrados. En el ser humano, existen dos grandes grupos de AMPs denominados defensinas y catelicidinas (Cederlund y *col.* 2011). En este último grupo, destaca el péptido LL-37, presente en macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares. Se ha descrito que LL-37 posee propiedades antibióticas, antiendotóxicas, inmunomoduladoras y cicatrizantes. Este péptido está en evaluación en ensayos clínicos como tratamiento frente a la sepsis (Reinholz y *col.* 2012; Leaf y *col.* 2014).

La lactoferrina, glicoproteína de unión al hierro presente en la leche de mamíferos y en neutrófilos, ha proporcionado péptidos, como la lactoferricina, con interesantes propiedades terapéuticas. La optimización de la secuencia de la lactoferricina para dotarla de mayor capacidad de unión al LPS ha producido compuestos con una buena actividad antiendotóxica, antibacteriana y anti-*biofilm* (Wakabayashi y *col.* 2003; Sanchez-Gomez y *col.* 2015; Martínez de Tejada y *col.* 2012).

Probablemente, los AMPs mejor caracterizados son las polimixinas, lipopéptidos cíclicos producidos por cepas de *Bacillus polymyxa* (Rabanal y Cajal 2017). Las únicas polimixinas usadas en terapia humana son la polimixina B (PMB) y la polimixina E o colistina. Estos AMPs poseen una potente acción bactericida frente a un amplio grupo de bacterias gramnegativas. Sin embargo, la toxicidad de PMB (nefrotoxicidad y/o neurotoxicidad) hace que su uso se limite a las vías oftálmica, o tópica, en terapia individual o conjuntamente con otros antibióticos (Tran y col. 2016). La gran afinidad de PMB por la endotoxina es la base de los procedimientos de detoxificación extracorpórea de endotoxina que emplean filtros con PMB inmovilizada (Tani y col. 2010). Asimismo, en los últimos años se está evaluando el uso de la PMB en hemoperfusión en pacientes con sepsis (Terayama y col. 2017).

En general, las bacterias desarrollan resistencia a las polimixinas con menor frecuencia que a otros antibióticos convencionales. Por ello, estos compuestos mantienen habitualmente una buena actividad frente a microorganismos resistentes a otros antibióticos. De hecho, la colistina, que es menos tóxica que la PMB, se emplea habitualmente en terapia antimicrobiana por vía intravenosa y constituye uno de los antibióticos de último recurso en infecciones por bacterias multi-resistentes. Sin embargo, la aparición de plásmidos portadores del gen de resistencia *mcr-1* desde 2015 hace temer que el antibiótico pierda su efectividad si éstos se transmiten horizontalmente, tal y como ya está ocurriendo (Schwarz y Johnson 2016).

1.3.3 Pep19-2.5 y Pep19-4LF

El presente trabajo persigue avanzar en la caracterización de Pep19-2.5 y Pep19-4LF, dos AMPs sintéticos derivados de una proteína del sistema inmunitario del cangrejo cacerola o herradura, *Limulus polyphemus* (Andra y col. 2007; Gutschmann y col. 2010). Como parte de la respuesta inmunitaria de este artrópodo marino, sus células sanguíneas defensivas (amebocitos) segregan un compuesto que se coagula en presencia de endotoxina (Muta y Iwanaga 1996). Para controlar dicha coagulación, los hemocitos del cangrejo producen una proteína llamada LALF (*Limulus anti-LPS factor*), capaz de unirse y neutralizar la endotoxina (Vallespi y col. 2000). Precisamente, el ensayo basado en la coagulación de los amebocitos de *Limulus* (*Limulus Amebocyte Lysate test*; LAL

test) es todavía el método más ampliamente utilizado en el mundo para la detección y cuantificación de endotoxina (Zijlstra y col. 1997). Los péptidos Pep19-2.5 y Pep19-4LF son homólogos a la región de unión al LPS de LALF, aunque posteriormente sus secuencias fueron sometidas a un exhaustivo proceso de optimización para mejorar su unión al LPS (Gutsmann y col. 2010).

Estos péptidos tienen la capacidad de unirse con muy alta afinidad al LPS (una única molécula de péptido interactúa con hasta tres de LPS en forma libre) y a LPTs, produciendo su inactivación (Brandenburg y col. 2016; Martínez de Tejada y col. 2015). Además, su carácter anfipático hace que sean capaces de permeabilizar la membrana de bacterias gramnegativas y grampositivas, lo que les confiere un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Heinbockel y col. 2013; Gutsmann y col. 2010).

Concretamente, Pep19-2.5 se encuentra actualmente en desarrollo pre-clínico con el nombre comercial de *Aspidasept® I* (o simplemente *Aspidasept*), mientras que Pep19-4LF se denomina *Aspidasept® II*. En otros trabajos se hace referencia a estos compuestos como SALPs (*Synthetic Anti-LPS Peptides*) (Kaconis y col. 2011; Pfalzgraff y col. 2016). El desarrollo de estos compuestos como agentes terapéuticos frente a la sepsis bacteriana está liderado por la *spin-off* de la Universidad de Hamburgo, *Brandenburg Antiinfektiva*, con la que nuestro grupo de investigación colabora activamente. En los últimos años, se ha demostrado la eficacia de Pep19-2.5 para neutralizar la endotoxina *in vivo*, así como su capacidad para actuar en sinergia con antiinflamatorios no esteroideos en distintos modelos murinos (inoculación intraperitoneal de LPS, ligación cecal y punción) (Heinbockel y col. 2013; 2015; Schuerholz y col. 2013).

1.3.4 Caracterización pre-clínica de Pep19-2.5 y Pep19-4LF

Para que un nuevo medicamento pueda comercializarse y finalmente usarse en pacientes, se necesita confirmar, entre otros muchos aspectos, su efectividad en ensayos clínicos. A su vez, para poder iniciar un estudio clínico de un compuesto, ha de completarse exitosamente lo que se conoce como desarrollo pre-clínico. Es en esta fase de la caracterización donde se encuentran Pep19-2.5 y Pep19-4LF a fecha de la escritura

de este trabajo. En Europa, la Agencia Europea del Medicamento dicta los requerimientos que un medicamento ha de cumplir, para lo cual se le exige la realización de una serie de estudios que justifiquen la realización de estudios clínicos bajo la máxima seguridad posible. Entre ellos, generalmente destacan: estudios de eficacia probada en roedores y no-roedores, farmacocinética/farmacodinamia, toxicología a dosis única y repetida, inmunotoxicidad, genotoxicidad, teratogenicidad, carcinogénesis, tolerancia local, estabilidad y biodistribución (Cavagnaro y Sims 2013).

Al inicio de este proyecto, Pep19-2.5 había demostrado su eficacia en distintos modelos murinos de endotoxemia y sepsis (Schuerholz y *col.* 2013) y se había estudiado su toxicidad en ratas Wistar (véase apartado 3.5). Sin embargo, se desconocía la eficacia de Pep19-2.5 en especies no-roedoras, así como la estabilidad y biodistribución del mismo. Pep19-4LF no se consideraba como primer candidato para el desarrollo pre-clínico. Aunque se evaluó su toxicidad a la par que Pep19-2.5 y presentó una menor toxicidad en ratas, su menor efectividad neutralizante de endotoxina lo dejó en un segundo plano del desarrollo.

2. Hipótesis y Objetivos

Dado que:

- Entre las moléculas de origen bacteriano con mayor capacidad de estimulación del sistema inmunitario destaca el lipopolisacárido (LPS o endotoxina) de gramnegativos, mientras que se ha descrito que la molécula equivalente en grampositivos es la lipoproteína (LPT) (Martínez de Tejada y col. 2015).
- Nuestro grupo ha desarrollado un compuesto llamado *Aspidasept I*® (Pep19-2.5) que posee gran afinidad *in vitro* por el LPS, células enteras de *Staphylococcus aureus* y que es capaz de neutralizar al LPS *in vivo* y de proteger con gran eficacia a ratones a los que se había provocado un choque endotóxico (Gutsmann y col. 2010).
- La administración de Pep19-2.5 combinado con antibióticos confiere una elevada protección frente a la sepsis en un modelo murino de peritonitis (Heinbockel y col. 2013) y que ninguno de los componentes por separado tuvo eficacia terapéutica alguna en este modelo animal.
- El desarrollo preclínico con Pep19-2.5 ha de incluir estudios de eficacia terapéutica en un mamífero no roedor (Cavagnaro y Sims 2013).
- Se desconoce la estabilidad de Pep19-2.5 en presencia de proteasas séricas, así como su biodistribución y su posible tropismo hacia órganos de interés tras una administración intravenosa.
- Los conejos reproducen mejor que los ratones los síntomas de la sepsis humana (Parker y Watkins 2001).
- Se ha descrito que el 65 % de las infecciones, incluyendo las que derivan en una sepsis o una herida en la piel, implican la formación de biocapas bacterianas.

Nuestra hipótesis es que Pep19-2.5, por sí mismo o combinado con un antibiótico, podría poseer las características idóneas para el tratamiento de la sepsis en humanos. Si esto no fuera así, se podría comenzar los estudios con otro compuesto relacionado con Pep19-2.5 y denominado *Aspidasept II*® (Pep19-4LF) que posee unas características como antimicrobiano y neutralizante del LPS mejores incluso que las de *Aspidasept I*®.

Por lo tanto, se consideraron los siguientes objetivos específicos:

1. Investigar si Pep19-2.5 es capaz de neutralizar *in vivo* la lipoproteína de una bacteria grampositiva.
2. Evaluar la capacidad de Pep19-2.5 por sí mismo o combinado con un antibiótico para proteger frente a la sepsis empleando un modelo de bacteriemia en conejos.
3. Determinar si Pep19-2.5 es útil como tratamiento tópico frente a las infecciones en un modelo de cicatrización de herida infectada.
4. Estudiar la estabilidad en suero y biodistribución de Pep19-2.5.
5. Empleando Pep19-2.5 como compuesto de referencia, comenzar los estudios pre-clínicos con Pep19-4LF que incluyan la determinación de su actividad: i, antimicrobiana y anti-*biofilm*; ii, potenciadora de antibióticos y iii, neutralizante de la endotoxina en un modelo murino.

3. Material y Métodos

3.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas utilizadas se muestran en la Tabla 3.1. Las bacterias se cultivaron en medio *Trypticase Soy Broth* (TSB; Laboratorios Difco, Detroit, E.E.U.U.) sin suplementar o suplementado con 15 g/L de agar bacteriológico (Laboratorios Conda/Pronadisa, Madrid) a 37 °C. La susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos, se determinó empleando el medio de cultivo Mueller-Hinton con cationes ajustados (20-25 mg/L Ca^{2+} y 10-12,5 mg/L de Mg^{2+}) (MHCA; Laboratorios Difco). Los cultivos líquidos que requerían agitación se incubaron en el agitador orbital Aquatron (Infors HT, Bottmingen, Suiza) a 150 rpm y 37 °C durante 12-15 h. Para su conservación a largo plazo, las cepas se mantuvieron a -80 °C en criotubos con un 10% de leche descremada estéril.

3.2 Antibióticos y péptidos antimicrobianos

Los *stocks* antibióticos en forma de liofilizado se conservaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las soluciones antibióticas se prepararon teniendo en cuenta su pureza y se almacenaron a -20 °C a una concentración de 10 mg/mL en agua ultrapura ($\text{H}_2\text{O}_{\text{up}}$). Los péptidos antimicrobianos Pep19-2.5 y Pep19-4LF fueron suministrados con una pureza mayor del 95% en forma de liofilizado (Brandenburg Antiinfektiva, Borstel, Alemania) y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización. La secuencia de aminoácidos de estos compuestos se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.1: Características relevantes de las cepas usadas.

Cepa		Características relevantes	Fuente o Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Ps4)	CUN 4158-02	Aislamiento clínico de esputo, formadora de biofilm.	Sánchez-Gomez y col. 2011.
	27853	Cepa control de la calidad antibiótica.	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	25922	Cepa control de la calidad antibiótica.	ATCC
	E20	Aislamiento clínico de hisopo uretral que expresa betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	CUN
<i>Staphylococcus aureus</i>	43300	Cepa control resistente a meticilina.	ATCC
	3792	Aislamiento clínico resistente a meticilina.	CUN
	25923	Cepa control de la calidad antibiótica.	ATCC
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	11844-99	Aislamiento clínico de lavado broncoalveolar.	CUN
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10817	Aislamiento clínico de herida abierta multirresistente.	CUN
	19606	Cepa control de la calidad antibiótica.	ATCC
<i>Enterococcus faecium</i>	7777	Aislamiento clínico de hemocultivo que expresa betalactamasas de espectro extendido.	CUN
	1479	Aislamiento clínico de hemocultivo que expresa betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	CUN
<i>Burkholderia cepacia</i>	21482	Aislamiento clínico de esputo.	CUN
<i>Moraxella catarrhalis</i>	6205-3	Aislamiento clínico de hisopado faríngeo que expresa betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	CUN
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2013RYC1	Aislamiento clínico productor de carbapenemasa.	CUN
	CUN K2	Aislamiento clínico de un hisopo perianal que expresa betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	CUN
<i>Salmonella enterica</i> Serovar Minnesota	SF1114	También denominada HL63. Cepa salvaje con LPS liso.	Luderitz y col. 1966
	R60	Mutante con LPS rugoso (Ra) derivado de la cepa salvaje SF1111 .	Fett y col. 1985

ATCC: American Type Culture Collection, CUN:Clínica Universidad de Navarra

Tabla 3.2: Secuencia aminoacídica de Pep19-2.5 y Pep19-4LF.

Péptidos	Secuencia																
Pep19-4LF	G	K	K	Y	R	R	F	R	W	K	F	K	G	K	L	F	L
Pep19-2.5	G	C	K	K	Y	R	R	F	R	W	K	F	K	G	K	F	W

Nomenclatura: G, glicina; K, lisina; Y, tirosina; R, arginina; F, fenilalanina; W, triptófano; L, leucina; C, cisteína.

3.3 Determinación de CMI y CMB

Para cuantificar la actividad antimicrobiana de los compuestos sobre las cepas en estudio se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) según el método de microdilución en caldo y de acuerdo con las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2012). Para ello, se empleó el medio de cultivo MHCA y placas de 96 pocillos de microtitulación con fondo en “U” (TPP; Trasadingen, Suiza). Se realizaron diluciones decrecientes del antimicrobiano en progresión aritmética de base 2 en el medio MHCA, con un rango de concentraciones que iba desde 1 µg/mL hasta 512 µg/mL en un volumen final de 100 µL.

El inóculo bacteriano se preparó en una solución salina (NaCl 0,9%) resuspendiendo varias colonias procedentes de un cultivo fresco en *Trypticase Soy Agar* (TSA). La suspensión resultante se ajustó a una $DO_{600nm}=0,085$, que se corresponde con 5×10^7 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL), aproximadamente, y luego se diluyó 1:100 en MHCA. A continuación, se añadieron 100 µL de esta suspensión a los pocillos donde se habían preparado las diluciones de antimicrobiano, de forma que cada pocillo contenía entre 10^4 y 10^5 UFCs en un volumen total de 200 µL. En todas las placas se incluyó una columna de pocillos inoculados sin antimicrobiano (solo con MHCA), que actuó como control positivo de crecimiento, así como un control de esterilidad (MHCA sin inocular). La microplaca se incubó a 37°C en una atmósfera saturada de vapor de agua durante 18-20 h, y a continuación se procedió a realizar la lectura de los resultados.

De acuerdo con el Método del CLSI M07-A9 para los test de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias aeróbicas, la CMI se definió como la concentración mínima de un compuesto capaz de inhibir visualmente el crecimiento en los pocillos de la microplaca, y la CMB como la concentración mínima capaz de reducir 3 logaritmos (99,9%) la viabilidad del inóculo bacteriano original. La CMI se determinó observando la ausencia de turbidez o la presencia de un depósito bacteriano (botón) en el fondo de los pocillos. Posteriormente, los pocillos sin crecimiento bacteriano se agitaron y se sembraron 10 µL en forma de gota en placas de MH. Este procedimiento se realizó por

duplicado. Las placas se incubaron durante 20-24 h a 37 °C para, posteriormente y mediante un recuento de UFC, determinar la CMB.

3.4 Estudios de sinergia

3.4.1 Índice de concentración mínima fraccionada (CIF)

Para estudiar la existencia de actividad sinérgica entre dos compuestos, se utilizó el método del tablero (*checkerboard test* (Eliopoulos y Moellering 2011); Figura 3.1). En nuestro caso, los estudios se realizaron para combinar antibióticos con péptidos antimicrobianos, o bien péptidos antimicrobianos entre sí. Este ensayo se realizó utilizando las mismas placas que para el cálculo de la CMI, con la particularidad de que, en este caso, además de generar un gradiente de antimicrobiano horizontal (de izquierda a derecha de la placa), se incluyó en los pocillos un segundo compuesto diluido de forma que se generase un gradiente vertical (de arriba a abajo). Los rangos de concentraciones de los antimicrobianos se seleccionaron sobre la base de sus CMIs. Para facilitar el análisis, la dilución correspondiente a la CMI se dispuso hacia la mitad del rango de diluciones ensayado. Por ejemplo: para la cepa *E. coli* CUN E20, la CMI de la ceftriaxona es de 4 µg/mL (véase Tabla 4.2) por lo que el rango seleccionado fue desde 64 hasta 0,125 µg/mL.

Para cuantificar la actividad sinérgica de los dos compuestos en combinación se utilizó el índice de concentración inhibitoria fraccionada (CIF) calculado del siguiente modo:

$$ICIF = \left(\frac{CMI \text{ antimicrobiano } 1 \text{ en la combinación}}{CMI \text{ antimicrobiano } 1} \right) + \left(\frac{CMI \text{ antimicrobiano } 2 \text{ en la combinación}}{CMI \text{ antimicrobiano } 2} \right)$$

Este índice relaciona las CMIs de dos compuestos antimicrobianos por separado y en combinación. Siguiendo las recomendaciones del protocolo descrito por la mayoría de autores, los valores del índice CIF se interpretan de la siguiente manera: CIF ≤ 0,5, efecto sinérgico; CIF entre 0,5 y 2, efecto aditivo o indiferente; CIF > 2, efecto antagónico.

Sinergia por el método de *checkerboard* de Pep19-2.5 y Ceftriaxona en *E. coli* CUN E20

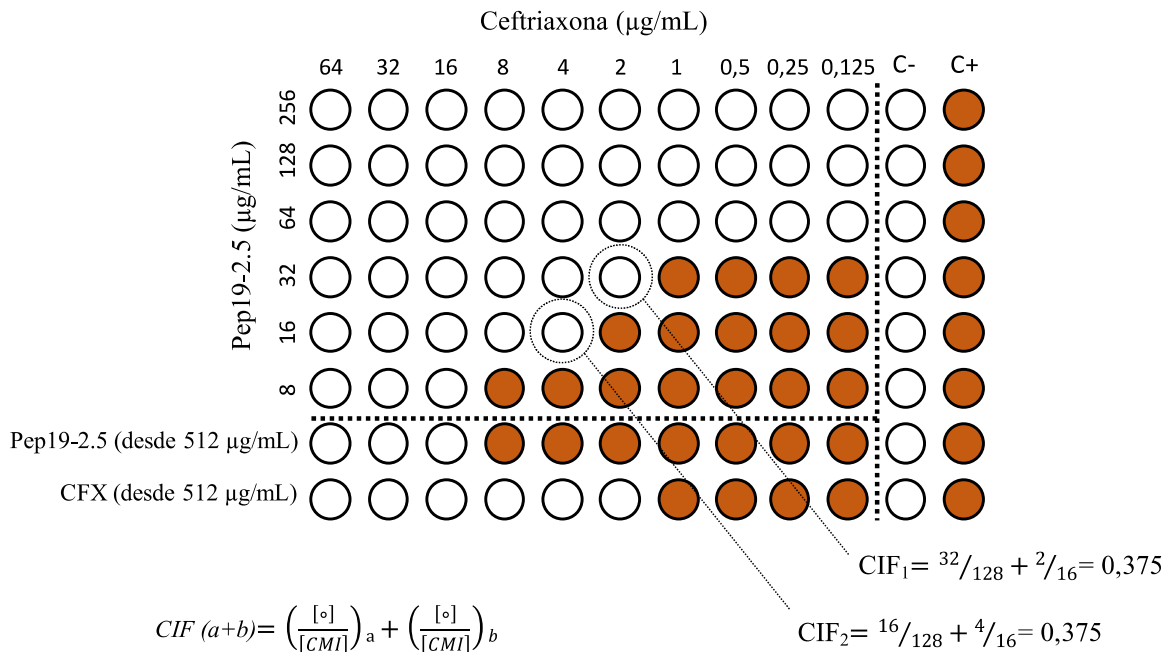


Figura 3.1: Esquema del método *checkerboard* mostrando el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccionada (CIF) con datos de un caso real de sinergia (véase Tabla 4.3). Los pocillos marrones implican crecimiento bacteriano, mientras que los blancos asumen ausencia del mismo.

3.4.2 Turbidimetría: Bioscreen C

En los casos en que el método de *checkerboard* reveló la existencia de sinergia, se realizó un ensayo de comprobación empleando un equipo automático muy sensible, el Bioscreen C (Labsystem Honeycomb, Thermo Labsystems, E.E.U.U.). Este aparato realiza un seguimiento en el tiempo de la turbidez del medio de cultivo manteniendo una temperatura y una agitación constantes. El Bioscreen C permite analizar simultáneamente el efecto de hasta 200 combinaciones distintas de antimicrobianos que se preparan en las microplacas de las que el equipo dispone. El inóculo se preparó de la misma manera que para el método de *checkerboard* y los antimicrobianos se añadieron en los pocillos de las placas de poliestireno suministradas por el fabricante (Labsystems Honeycomb). Los ensayos de sinergia se realizaron a 37 °C durante 48 h en agitación constante, utilizando 3 pocillos por cada condición estudiada. Siempre se añadieron 3 pocillos como control de esterilidad (solo medio sin inocular) y 3 pocillos de control de

crecimiento (medio inoculado sin antimicrobiano). Cada experimento se repitió 3 veces de manera independiente. Las absorbancias se midieron a 420-480_{nm} cada 15 minutos, y las curvas de crecimiento bacteriano en función del tiempo se representaron gráficamente con el software Graphpad Prism V6.01® (GraphPad Software, La Jolla, E.E.U.U.).

3.5 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de *biofilms* bacterianos

3.5.1 Sistema del *Center for Disease Control (CDC) Biofilm Reactor (CBR)*

Una vez evaluada la capacidad antimicrobiana de los compuestos en estudio, solos o en combinación, frente a bacterias planctónicas, se estudió su actividad frente a los microorganismos en forma de biocapa (o *biofilm*). Para ello, se utilizó la cepa *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 (también denominada simplemente *P. aeruginosa* Ps4) y el sistema *Center for Disease Control (CDC) Biofilm Reactor (CBR)*. El elemento principal del CBR (reactor) es un recipiente cilíndrico con tres aperturas, una para la entrada de aire estéril a través de un filtro de 0,22 μm de diámetro, y otras dos para la entrada y salida del medio de cultivo (Figura 3.2). Este diseño permite un crecimiento microbiano en modo continuo con un recambio constante de nutrientes. Dentro del reactor se pueden colocar hasta ocho soportes de polipropileno, cada uno de ellos con capacidad para alojar tres discos de borosilicato extraíbles (1,27 cm de diámetro y 0,3 cm de ancho). Estos discos permanecen durante todo el experimento sumergidos en el medio y sobre ellos se acaba formando un denso *biofilm*. Además, la presencia de un agitador magnético en el fondo del CBR asegura una constante homogeneización y genera condiciones de flujo turbulento (Figura 3.2).

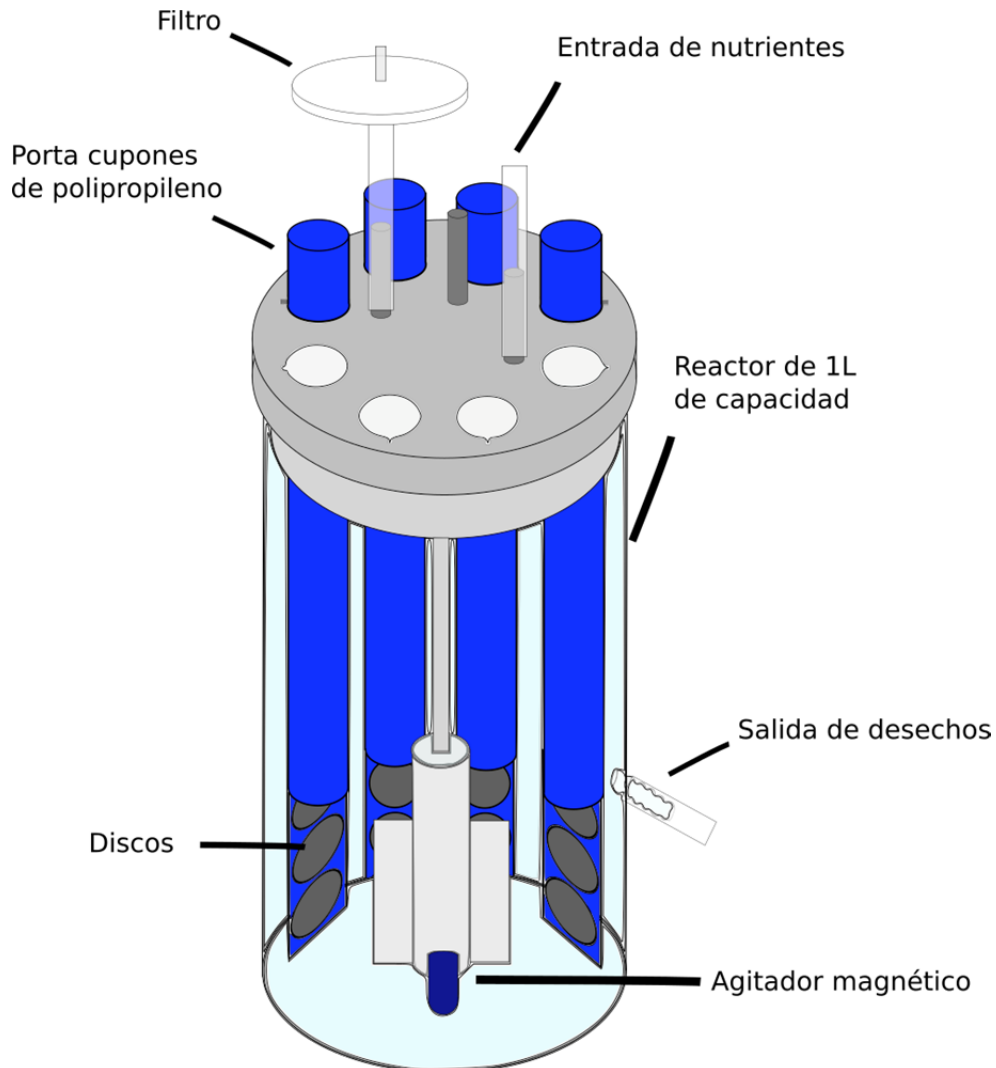


Figura 3.2: Esquema en detalle del elemento principal (reactor) del CBR (adaptado de Ferrer-Espada, 2016).

Los ensayos con CBR se llevaron a cabo según el método estándar de la *American Standards for Testing Materials* (ASTM E2562-12). El CBR se llenó con 400 mL de TSB (30 g/L) estéril, y a continuación se añadió 1 mL de un cultivo en fase exponencial de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 *Ps4* en TSB (30 g/L). Durante las siguientes 24 horas, el CBR se mantuvo en el interior de un incubador a 37°C y situado sobre un agitador magnético oscilando a 125 rpm (Figura 3.3). Para determinar la cantidad de células inoculadas en el reactor, se tomó una muestra del inóculo inicial y se diluyó para realizar un recuento de viables en placas de TSA.

Pasadas las primeras 24 h, se conectó el flujo continuo de medio y la incubación (37 °C, 125 rpm de agitación) se prolongó durante 24 h más. En total, el bidón de

nutrientes (Nalgene; Thermo Fisher, Massachusetts, E.E.U.U.), contenía 20 L de TSB (3 g/L), que se suministraron al interior del CBR con un flujo constante de 11,67 mL/min mediante el uso de una bomba peristáltica (Easy-load Masterflex modelo 7518-00; Masterflex®, Cole-Palmer, Illinois, E.E.U.U.). El medio efluente se recogió en otro bidón autoclavable de la misma capacidad. Todo el sistema se interconectó mediante tubos de silicona autoclavables (Masterflex®, Cole-Palmer) y el tubo de medio influente se acopló a una válvula que impedía el posible reflujó de medio de cultivo contaminado hacia la fuente de nutrientes.

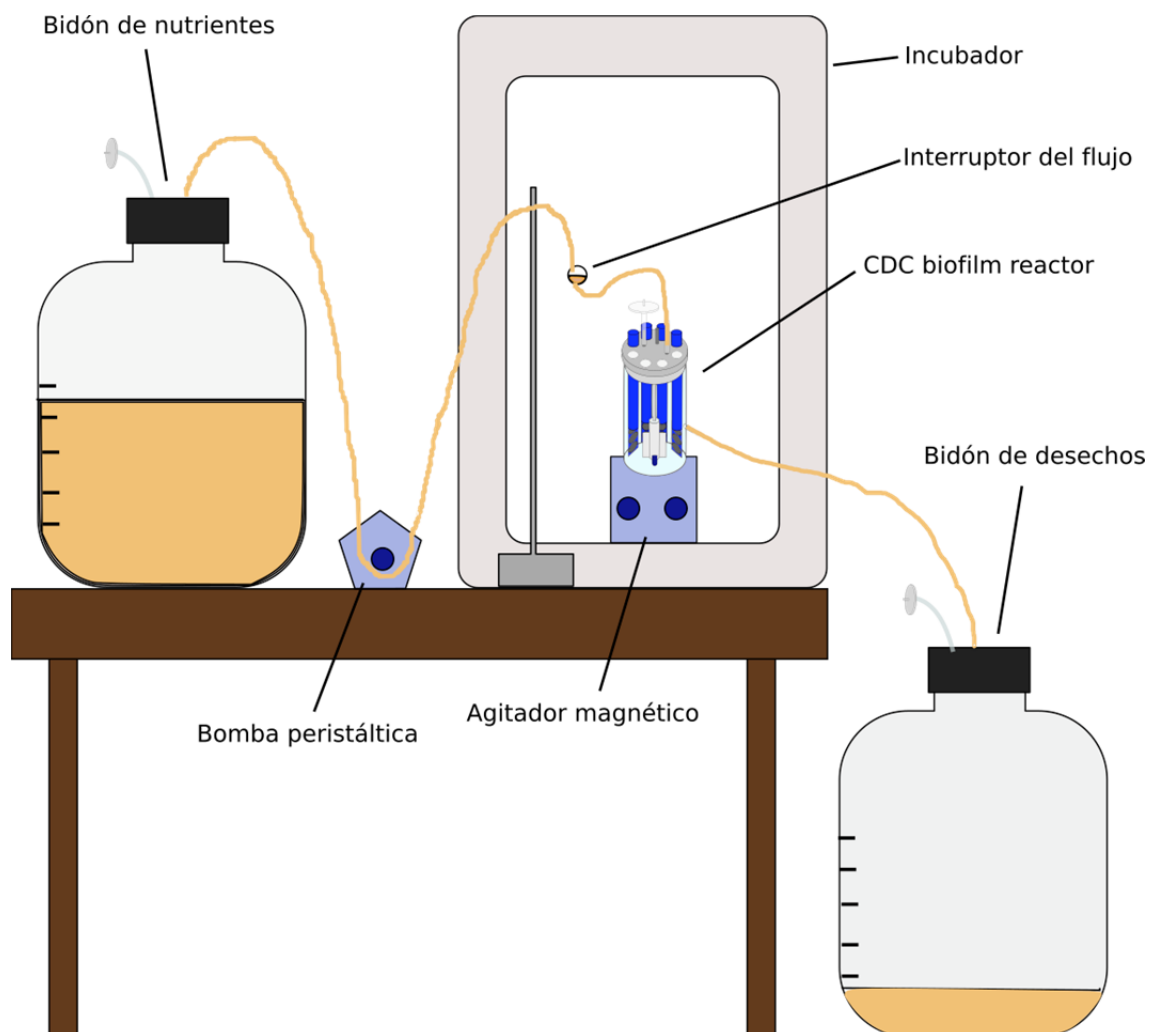


Figura 3.3: Esquema general del CBR con todos sus accesorios (adaptado de Ferrer-Espada, 2016).

3.5.2 Tratamientos anti-*biofilm*

Una vez transcurrido el tiempo de 24+24 h para la formación de *biofilm*, se extrajeron los soportes porta-discos en condiciones de esterilidad y se separaron los discos de los soportes, con cuidado de no dañar el *biofilm* formado en su superficie. Con el fin de eliminar las posibles bacterias planctónicas adheridas, se lavó dicha superficie vertiendo lentamente sobre ella 1 mL de *buffer fosfato* (PB) (625 μ M KH_2PO_4 , 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 7,2).

A continuación, los discos se introdujeron en los pocillos de una placa de poliestireno de 12 pocillos (Falcon, Nueva York, E.E.U.U.), colocando hacia arriba la cara que había estado bañada por el medio de cultivo. Los pocillos se llenaron con un volumen de 800 μ L de PB que contenía los compuestos antimicrobianos en estudio disueltos a las concentraciones finales deseadas. Finalmente, los discos se incubaron en estas condiciones a 37 °C durante 24 h.

3.5.3 Procesamiento de los discos

3.5.3.1 Recuento de UFC

Transcurridas las 24 h de tratamiento, se extrajeron los discos de los pocillos. La superficie superior del disco se lavó cuidadosamente con 2 mL de PB para eliminar las posibles células planctónicas adheridas y las trazas del tratamiento. La solución de lavado se recolectó y la presencia de bacterias vivas en ella se analizó mediante recuento de viables en placas de TSA. El *biofilm* adherido a la cara superior de los discos se despegó raspando su superficie con un palillo de madera estéril en varias direcciones perpendiculares entre sí. El material desprendido se transfirió a un tubo con 5 mL de PB. Para disgregar al máximo el *biofilm*, la muestra se mezcló vigorosamente empleando un agitador mecánico y se sonicó durante 5 min en un baño de ultrasonidos. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de la muestra y 100 μ L de las mismas se sembraron por duplicado en placas de TSA por la técnica de goteo. Tras 18-20 h en incubación a 37 °C, se contaron las UFCs y se calculó el número de bacterias viables adheridas a la superficie del disco, expresado como Log_{10} de UFC/cm^2 . Para el cálculo

de este parámetro, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\log_{10}\left(\frac{UFC}{cm^2}\right) = \log_{10}\left(\left(\frac{\text{Promedio UFC}}{\text{volumen de la gota}}\right) \times (+\text{Dilución}) \times \left(\frac{\text{Volumen al que se ha rascado}}{\text{Área de la superficie}}\right)\right)$$

3.5.3.2 Visualización de *biofilm* mediante microscopía confocal

Para evaluar de forma visual la acción de los tratamientos sobre los *biofilms* se empleó microscopía láser confocal (microscopio Cell observer Z1, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Esta técnica permite estudiar secciones internas del *biofilm* y determinar la capacidad de penetración de un determinado tratamiento a esas regiones. Para favorecer la observación con el microscopio confocal, los discos ya tratados con los antimicrobianos, se tiñeron con una solución que contenía 3 μL de cada uno de los colorantes del *kit* de viabilidad bacteriano LIVE/DEAD BacLight (ThermoFisher Scientific, España) disueltos en 1 mL de agua bidestilada ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$) estéril. Este método se basa en el uso de dos moléculas fluorescentes distintas: i) SYTO 9, un agente intercalante de ADN de color verde, capaz de difundir a través de la membrana bacteriana intacta; y ii) ioduro de propidio, un compuesto de color rojo que también se intercala en el ADN, pero que sólo es capaz de penetrar en la bacteria si la membrana está dañada. Los discos de borosilicato se sumergieron en la solución de tinte durante 20 minutos y, tras un lavado en PB, su superficie se visualizó en un microscopio láser con un objetivo de 10x u otro de 63x y las imágenes se analizaron mediante el software Zen Teen (Zeiss).

3.6 Modelo de inmovilización de antimicrobianos en superficies para inhibir la formación de biofilms

3.6.1 Inmovilización de antimicrobianos en PDMS

El polidimetilsiloxano (PDMS) es una silicona inerte altamente hidrófoba, comúnmente usada como material en implantes médicos. Los compuestos en estudio se inmovilizaron en esta matriz inerte aplicando el protocolo descrito por Alver y *col.* en

2016, que está basado en la polimerización de la dopamina en polidopamina. Para la preparación de PDMS, se mezclaron los dos componentes del *kit* Sylgard 184 (Dow Corning, E.E.U.U.), mezclando en una proporción 10:1 la silicona con el agente solidificante. Antes de que solidificara, la mezcla se homogeneizó y se repartió en los pocillos de placas de poliestireno (Falcon), a razón de 500 u 80 μL /pocillo, dependiendo si la placa era de 24 o 96 pocillos, respectivamente.

Finalmente, la mezcla se dejó endurecer durante 48 h a temperatura ambiente, con lo que el material adquirió un color cristalino y una textura plástica (Figura 3.4).

La parte superior de los pocillos, que estaba libre de polímero, se lavó con $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ estéril. A continuación, la superficie del polímero se sometió a un lavado más intenso, llenando los pocillos con detergente líquido comercial (Tenn, Henkel Ibérica, Barcelona), y sonicando las placas a temperatura ambiente durante 5 min en un baño de ultrasonidos. Finalmente, los pocillos se lavaron de nuevo con $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ estéril antes de una última sonicación con metanol durante 20 min. Tras un periodo de 6-8 h dejando secar la placa en condiciones de esterilidad, se añadió la solución de dopamina (2 mg/mL de dopamina en *Buffer Bicina*, BB (Bicina 10 mM; pH 8,5)) a razón de 500 – 80 μL /pocillo, dependiendo del formato de la placa y se incubó protegida de la luz durante 18-20 h a temperatura ambiente y con agitación orbital constante (70 rpm). Durante ese tiempo, la dopamina polimeriza gracias al pH alcalino de la solución fijándose covalentemente a la superficie del PDMS. Tras la incubación, se descartó el sobrenadante y se lavaron los pocillos con $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ estéril para eliminar los restos de dopamina que no hubiera polimerizado. A continuación, se añadió a los pocillos el antimicrobiano (500 - 80 μL por pocillo) que se deseaba inmovilizar diluido a 2 mg/mL en BB. Para la inmovilización simultánea de dos compuestos en un mismo pocillo, se añadió 1 mg/mL de cada uno de ellos. En cada placa, siempre se dispuso un grupo de pocillos control sin antimicrobiano, que se llenaron solo con BB. Como control positivo, se empleó colistina, ya que su efectividad anti-*biofilm* había sido previamente comprobada. La reacción de fijación de los antimicrobianos a la dopamina se llevó a cabo incubando la placa a temperatura ambiente con agitación orbital de 70 rpm durante 2 h. Finalmente, los pocillos se lavaron con $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ estéril para retirar el exceso del antimicrobiano.

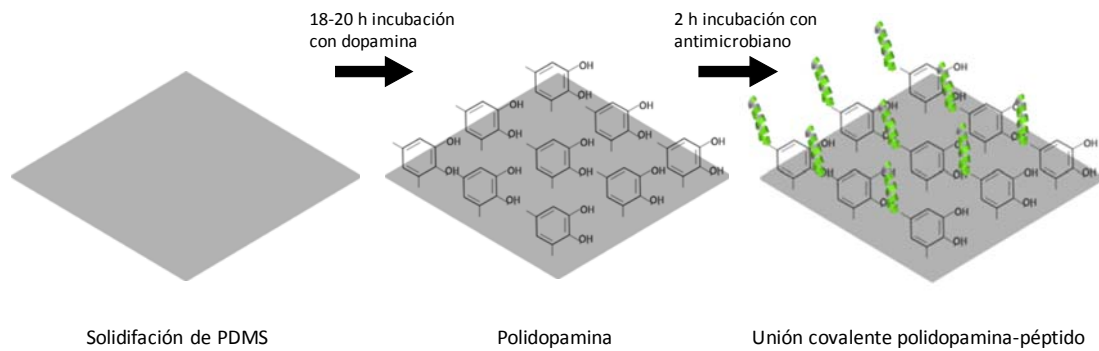


Figura 3.4: Esquema del método de fijación de péptidos por unión covalente mediante polidopamina en PDMS.

Para evaluar la eficacia de la inmovilización, se intentó detectar si la superficie del polímero cambiaba su aspecto microscópico tras la exposición a los antimicrobianos. Para ello, se recubrieron con oro coloidal y mediante pulverización catódica (sputter coater K550, Emitech, Vendargues, Francia) muestras de PDMS tratadas o sin tratar con el antimicrobiano y se visualizó su superficie mediante microscopía electrónica de barrido, SEM, (Digital Scanning Microscope 940A, Zeiss) a 500 y 5.000 aumentos.

3.6.2 Evaluación de la actividad anti-*biofilm* de compuestos inmovilizados

Para estudiar si los antimicrobianos inmovilizados mantenían su capacidad inhibidora de la formación de *biofilm*, se analizó su capacidad para impedir el crecimiento microbiano en la superficie del polímero. Para ello, a partir de un cultivo fresco en TSB de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4, se preparó una suspensión ajustando la OD_{600nm} final a 0,085 (aproximadamente 10^6 UFC/mL) y esta suspensión se diluyó 1:100 en MHCA. A continuación, se añadió a cada pocillo -menos en los pocillos correspondientes al control negativo-, 1 mL de esta dilución en el caso de las placas de 24 pocillos y 200 μ L en el caso de las placas de 96 pocillos. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h en el caso de las placas de 24 pocillos y 24 h en el caso de las placas de 96 pocillos.

Para cuantificar el *biofilm* que permanecía adherido al PDMS tras la exposición a los distintos tratamientos, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos con 1 mL de PB. Ambas operaciones se realizaron despacio y con cuidado para evitar que el *biofilm* se desprendiera. Después, se añadió safranina al 0,1% (500 μ L en las placas de 24 pocillos y 80 μ L en las de 96) y se dejó actuar al colorante durante 10 min. Tras esta incubación, el exceso de safranina se retiró con cuidado y la placa se dejó secar durante 3-5 h. Una vez seco, el *biofilm* teñido se sumergió en H₂O_{dd} (1 mL o 200 μ l, dependiendo del tipo de placa) para disolver la safranina adherida al *biofilm*, y la solución obtenida se diluyó 1:5 con H₂O_{dd} y se homogeneizó vigorosamente con un agitador mecánico. Finalmente, la cantidad de safranina unida al *biofilm* se estimó midiendo la absorbancia de la solución a 490 nm.

Para estudiar el efecto de los antimicrobianos en la viabilidad de las bacterias que formaban los *biofilms*, se empleó una técnica alternativa a la de la tinción con safranina. Para eliminar las bacterias planctónicas y el exceso de antimicrobiano, primero se lavaron los pocillos del mismo modo que en el caso anterior. A continuación, se añadieron 500/80 μ L de PB por pocillo, según el tipo de placa, y los *biofilms* se homogeneizaron en esta solución succionando repetidamente la suspensión con una micropipeta y raspando la superficie con un bastón de madera estéril. Finalmente, la suspensión resultante se diluyó 1:5 en PB y, tras mezclar la nueva suspensión vigorosamente y sonicarla durante 5 minutos con el fin de disgregar las bacterias, se realizó un recuento de viables en placas de TSA mediante la técnica del goteo.

3.7 Obtención del LPS de *Salmonella enterica* Serovar Minnesota R60 mediante el método de extracción fenol-agua

Salmonella enterica Serovar Minnesota R60 es un mutante cuyo LPS expresa un fenotipo mínimamente rugoso (Ra). Su LPS se extrajo siguiendo el método tradicional de extracción por fenol-agua, descrito inicialmente por Westphal y Jann en 1965 y que se resume a continuación.

La cepa *Salmonella enterica* Serovar Minnesota R60 se cultivó en una placa de TSA durante 18-20 h a 37 °C. Unas pocas (3-4) colonias de este cultivo se resuspendieron en 2 mL de suero salino estéril, y 0,5 mL de esta suspensión se emplearon para inocular matraces de 2 L que contenían 800 mL de TSB. Los matraces se incubaron durante 12-14 horas a 37 °C con agitación orbital (150 rpm). Tras finalizar el cultivo, las bacterias se inactivaron con fenol a una concentración final de 0,5% durante 24 h. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 6.000 x g, 20 min (Rotor GS-3, K_f 2600) y el sedimento resultante se resuspendió en H₂O_{dd} para su posterior liofilización. A partir del liofilizado se preparó una nueva suspensión añadiendo 170 mL de H₂O_{dd} por cada 5 g del sólido obtenido. Un volumen de 400 mL de esta suspensión se mezcló en un matraz de 1 L con el mismo volumen de fenol fundido y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 15 min a 66 °C. Finalmente, la emulsión se enfrió en un baño con hielo durante 24 h y se centrifugó a 10.000 x g, 10 min a 4 °C para separar la fase acuosa de la fenólica (Rotor GS-3, K_f 1160).

La fase acuosa -que es donde migra el LPS de *Salmonella* y otras bacterias- se filtró, se precipitó con 5 volúmenes de metanol frío suplementado con 1% (vol/vol) de metanol saturado con acetato de sodio y la mezcla se incubó a -20 °C. En estas condiciones, la precipitación del LPS suele tener lugar en la primera hora de incubación, aunque se permitió que se prolongase durante toda la noche para aumentar el rendimiento. El precipitado obtenido se concentró mediante centrifugación (6.000 x g, 15 min a 4 °C, Rotor GS-3, K_f 2600) y posteriormente se resuspendió en 150 mL de H₂O_{dd} mediante sonicación. Esta solución se dializó utilizando una membrana semipermeable durante al menos un día para eliminar el exceso de sales, y finalmente el LPS se liofilizó para su conservación a temperatura ambiente.

3.8 Modelo murino de sepsis

Todos los experimentos realizados con ratones fueron aprobados por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra (Protocolos 069-09 y E6-11). El cuidado y manejo de los animales se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de armonización de requisitos técnicos para el registro de productos

farmacéuticos para uso humano (ICH) y de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). Para el modelo murino de sepsis se emplearon ratones hembras BALB/c de 7 semanas de edad, con un peso medio de 20 g, provistos por Harlan/Envigo, Barcelona. Los animales se estabularon aleatoriamente en grupos de n=6 con comida y agua *ab libitum* y ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Tras una semana de aclimatación, se les administró una DL90 -previamente calculada- de 400 µg de LPS de *S. enterica* Serovar Minnesota R60 disuelto en 200 µL de suero salino estéril apirógeno (Grifols, Barcelona) por vía intraperitoneal. En experimentos previos, se comprobó que esta dosis era suficiente para matar el 90 % de los ratones a las 48 h de la inoculación. Para favorecer la solubilidad del LPS, se añadieron 3 µL de trietilamina (MERCK, Madrid) por cada mL de suspensión de LPS, se vortexeó vigorosamente y, posteriormente, se sometió a la mezcla a 5 minutos de sonicado para desagregar completamente el LPS en la solución. Los grupos de animales tratados con los compuestos en estudio recibieron, además, la dosis de dicho compuesto a la concentración y a los tiempos indicados en cada experimento, mientras que los animales del grupo control sin tratar recibieron 200 µL de vehículo.

3.8.1 Evaluación de la severidad en ratones. Escala de Shrum

Para evitar el uso de la mortalidad como criterio de punto final en los experimentos con ratones, se usó la escala de Shrum y colaboradores (Shrum y *col.* 2014), que amplía y optimiza las observaciones de Huet (Huet y *col.* 2013). Esta escala permite cuantificar la severidad de la sepsis murina aplicando los siguientes criterios:

Apariencia (valor de 0 a 4 en la escala de Shrum):

- 0- Pelo suave, normal.
- 1- Piloerección local.
- 2- Piloerección extendida por toda la espalda.
- 3- La piloerección puede o no estar presente, el ratón aparece "hinchado".
- 4- La piloerección puede o no estar presente, el ratón aparece caquéctico.

Nivel de consciencia (valor de 0 a 4 en la escala de Shrum):

- 0- El ratón está activo.
- 1- El ratón está activo, pero evita estar de pie.

- 2- La actividad del ratón se ralentiza notablemente, pero aún deambula.
- 3- Actividad muy reducida. El ratón sólo se mueve cuando se le provoca y de forma temblorosa.
- 4- Actividad gravemente afectada. El ratón permanece estacionario incluso cuando se le provoca. Temblor constante.

Actividad (valor de 0 a 4 en la escala de Shrum):

- 0- Actividad normal. El ratón es capaz de: comer, beber, escalar, correr y/o luchar.
- 1- Actividad moderada. El ratón se mueve únicamente alrededor de la parte inferior de la jaula.
- 2- Actividad anulada. El ratón permanece inmóvil con movimientos de investigación ocasionales.
- 3- No hay actividad. El ratón permanece inmóvil.
- 4- No hay actividad. El ratón muestra temblores, especialmente en las patas traseras.

Respuesta al estímulo (valor de 0 a 4 en la escala de Shrum):

- 0- El ratón responde inmediatamente al estímulo auditivo o al tacto.
- 1- Lenta o nula respuesta al estímulo auditivo; Fuerte respuesta al tacto (se mueve para escapar).
- 2- No hay respuesta al estímulo auditivo; Respuesta moderada al tacto (se mueve unos pasos).
- 3- No responde al estímulo auditivo; Respuesta suave al tacto (sin locomoción).
- 4- No hay respuesta al estímulo auditivo. Poca o ninguna respuesta al tacto. No reacciona si es presionado.

Ojos (valor de 0 a 4 en la escala de Shrum):

- 0- Abiertos.
- 1- Ojos semi-abiertos, posiblemente con secreciones.
- 2- Ojos semi-cerrados, posiblemente con secreciones.
- 3- Ojos casi cerrados, posiblemente con secreciones.
- 4- Ojos cerrados o lechosos.

Ritmo respiratorio (valor de 0 a 4 en la escala de Shrum):

- 0- Respiración normal y rápida.
- 1- Respiración ligeramente reducida (tasa no cuantificable a simple vista).
- 2- Respiración significativamente reducida (cuantificable a simple vista).
- 3- Respiración severamente reducida (fácilmente cuantificable a simple vista, 0,5 segundos entre cada respiración).
- 4- Respiración extremadamente reducida (más de 1 segundo entre cada respiración).

Calidad de Respiración (valor de 0 a 4 en la escala de Shrum):

- 0- Normal.
- 1- Períodos breves de respiración dificultosa.
- 2- Costosa, sin jadeo.
- 3- Costosa, con jadeos intermitentes.
- 4- Jadeo.

En experimentos previos, se observó que, tras la inoculación intraperitoneal de 400 µg de LPS en ratones de 20 g, los síntomas de endotoxemia empezaban a agravarse a partir de las 12 h post-inoculación. Por esto, se decidió administrar la endotoxina a las 20:00 horas, lo que permitió proseguir la evaluación del estado de los ratones a partir de las 08:00 horas del día siguiente. Después de esa hora, se realizó el seguimiento del estado de los ratones cada 3 h hasta alcanzar las 24 h post-inoculación. Posteriormente, y hasta el final del experimento, a las 96 horas, la evaluación se realizó cada 12 h. En total, la monitorización de los animales se realizó a los siguientes tiempos: 0, 12, 15, 18, 21, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 h.

Un valor total sumatorio en la escala de Shrum ≥ 7 , o bien ≥ 4 en cualquiera de las subcategorías, se consideró como criterio de punto final. Los animales que alcanzaban dicho nivel, se sacrificaban inmediatamente por dislocación cervical y se computaban como individuos no supervivientes. Tras 96 h y finalizado el estudio, los ratones supervivientes se sacrificaron empleando la misma técnica.

3.9 Estudio de estabilidad y biodistribución de Pep19-2.5

Los estudios de estabilidad y biodistribución de Pep19-2.5 se realizaron en el Departamento de Medicina Nuclear de la Universidad Clínica de Heidelberg, en Alemania, durante la estancia investigadora.

3.9.1 Estudio de estabilidad de Pep19-2.5

La estabilidad de Pep19-2.5 se estudió por HPLC de fase reversa (RP-HPLC)

usando la columna Chromolith RP-18 (3 x 100 mm) (MERCK Millipore, Massachusetts, E.E.U.U.). En experimentos preliminares se determinó que Pep19-2.5 (2.711,3 g/mol) disuelto en H₂O_{up}, tiene un tiempo de retención de 18,58 minutos cuando se aplica un gradiente de 0 % hasta 60 % de acetonitrilo acuoso suplementado con 0,1 % de ácido trifluoroacético y un tiempo total de elución de 30 min. Se midió el área del pico de Pep19-2.5 disuelto a 1 mg/mL en H₂O_{up} a t=0 y se tomó como el 100 % del mismo. A continuación se fue tomando muestra a lo largo del tiempo para comprobar si el tiempo de retención y el área permanecían constantes. El mismo proceso se repitió disolviendo dicha cantidad de péptido en distintos medios, tales como: H₂O_{up}-suero (suero humano sin proteínas de alto peso molecular, obtenido empleando un filtro con un diámetro de exclusión de 30.000 Da y usando el líquido filtrado), o H₂O_{up}-BSA (seroalbúmina bovina) a distintas proporciones, con el fin de estudiar la estabilidad en medios fisiológicos y la posible interacción del péptido con compuestos biológicos. En todo caso, los viales fueron incubados a 37 °C en agitación constante durante todo el tiempo que duró el estudio.

3.9.2 Estudio de biodistribución de Pep19-2.5

Para el estudio de su biodistribución, el péptido Pep19-2.5 se marcó radiactivamente utilizando ¹⁴C durante su proceso de síntesis en fase sólida (compuesto provisto por el Departamento de Medicina Nuclear de la Clínica Universitaria de Heidelberg).

Los animales utilizados para el estudio de biodistribución se estabularon y manipularon en todo momento siguiendo las normas institucionales y en concordancia con la ley alemana de bienestar animal.

3.9.2.1 Administración de ¹⁴C-Pep19-2.5

Se utilizaron ratones NMRI (Janvier, Francia) de 26-29 gramos anestesiados con isofluorano a los cuales se les administró por vía intravenosa (*i.v.*; vena lateral de la cola) 100 µL de ¹⁴C-Pep19-2.5 disuelto a 1 mg/mL en suero salino estéril. Esta concentración de compuesto correspondía aproximadamente a una radiación de 70.000

cuentas por minuto detectada en un contador Geiger-Müller. Un volumen de 5 µL de la muestra inyectada se guardó en un vial de centelleo para el posterior cálculo de la dosis administrada. Como el ^{14}C emite radiación tipo beta (no detectable en el exterior del animal), fue necesario obtener muestras de los órganos y proceder a una cuantificación de la actividad radiactiva en un contador beta. Para ello, se sacrificó a los animales a $t=5, 15, 60$ y 240 min ($n=3$) utilizando CO_2 , e inmediatamente después se extrajeron los órganos y tejidos de interés y una cantidad conocida de muestra se mezcló con líquido de centelleo para su análisis en un contador Tri-Carb 3180TR (Perkin Elmer, Alemania).

3.9.2.2 Solubilización y decoloración de muestras

Se extrajeron los siguientes órganos y tejidos: sangre, corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones, músculo (muestra tomada del cuádriceps), intestino (fragmento de 2 cm) estómago, cerebro y hueso (fémur). En atención a la vía de administración utilizada, también se extrajo la cola, que se dividió en varias secciones. Para su digestión, las muestras (50 mg de cada, o 50 µL en el caso de la sangre) se introdujeron en viales de centelleo y se incubaron durante 14-16 h a 55 °C sumergidas en 1 mL del solubilizador SOLVABLE (Perkin Elmer, Alemania). Una vez digerida, la muestra se decoloró para permitir la posterior medición de la radiación beta. Para ello, se añadieron 200 µL de H_2O_2 al 30% a todos los viales y las soluciones se mantuvieron a 55 °C en constante agitación dentro de una cabina de seguridad química. Durante el proceso de decoloración, los viales de centelleo se destaparon periódicamente para permitir la liberación de los gases que se forman durante este proceso. Además de H_2O_2 , se añadió a cada tubo 100 µL de EDTA 0,1 M, lo que reduce la intensidad de la digestión y evita así la excesiva pérdida de señal en forma de $^{14}\text{CO}_2$ gas. Tras 40-50 minutos de incubación en estas condiciones, las soluciones mostraban un aspecto transparente y/o ligeramente blanquecino.

3.9.2.3 Medición de radiación beta

Antes de medir la radiactividad, se añadieron 10 mL del líquido de centelleo

ULTIMA Gold (Perkin Elmer, Alemania) a cada vial. Este cóctel facilita la medición estabilizando la emisión de radiación beta. Las radiación emitida por las muestras se cuantificó a temperatura ambiente utilizando un contador beta (1414 Wallac Liquid Scintillation Counter, Perkin Elmer).

3.10 Modelo de bacteriemia en conejos

3.10.1 Preparación del inóculo bacteriano

Para la preparación del inóculo, primero se obtuvo un cultivo fresco de *Salmonella enterica* serovar Minnesota SF1114 (cepa lisa) en medio líquido. Posteriormente, el medio se centrifugó a 4.000 x g durante 5 min. El sedimento resultante se resuspendió en suero salino estéril, ajustando la DO_{600nm} a 1.0, lo que corresponde aproximadamente a $3,7 \times 10^7$ UFC/mL.

Tras la administración del inóculo, se comprobó que éste contenía la concentración bacteriana esperada (ver más abajo). Para ello, se realizaron diluciones seriadas 1:10 del inóculo en Tampón Fosfato Salino (PBS) y un volumen de 100 µl de cada dilución se sembró en placas de TSA. Tras incubar las placas a 37 °C durante 16-18 horas, se realizó un recuento de UFC.

3.10.2 Inducción de bacteriemia y tratamientos a evaluar

Los experimentos realizados en conejos, incluyendo la optimización del modelo, fueron aprobados por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra (protocolo número: 182-12).

Para el modelo de bacteriemia se usaron conejos Nueva Zelanda machos de 2-2,5 Kg (Granja San Bernardo, Tulebras, Navarra) estabulados en condiciones estándar con comida y agua *ab libitum*. A su llegada a nuestras instalaciones, los animales dispusieron de 7 días de aclimatación. La comida se retiró 12-14 h antes del inicio del experimento. Por limitaciones en la capacidad de procesamiento, se empleó un máximo

de 2 conejos simultáneamente en cada experimento. Cada animal recibió una dosis intravenosa por la vena marginal de la oreja de 1 mL del inóculo bacteriano que contenía $3,7 \times 10^7$ UFC disuelto en suero salino estéril apirógeno. Inmediatamente después y utilizando la misma vía de administración, los conejos recibieron el tratamiento correspondiente disuelto en suero salino estéril apirógeno con un volumen total de 2 mL. Los animales se dividieron en 4 grupos (n=6) que se correspondieron con los siguientes tratamientos:

Grupo 1: Solo vehículo: control sin tratar

Grupo 2: Ceftriaxona (15 mg/kg; Sigma Aldrich)

Grupo 3: Pep19-2.5 (5 mg/Kg)

Grupo 4: Ceftriaxona (15 mg/kg; Sigma Aldrich) + Pep19-2.5 (5 mg/Kg)

A cada animal se le tomó una muestra de sangre previamente a la inoculación (t= 0) para determinar los parámetros bioquímicos y hematológicos basales. Además, se tomaron muestras de sangre a los siguientes tiempos post-inoculación: t= 2, 30, 90 y 180 min. Este sangrado se realizó en la vena marginal de la oreja previa administración *i.v.* de un compuesto con propiedades vasodilatadoras y sedantes: acepromacina (1 mg/Kg; Sigma Aldrich) por ese mismo vaso. Empleando un termómetro de precisión, se tomó también la temperatura por vía rectal a t= 0, 90, 150, 210 y 330 min post-inoculación. A las 6 h del inicio del experimento, los animales se sacrificaron mediante la administración *i.v.* de una dosis letal de T-61 (Sigma-Aldrich).

3.10.3 Análisis de sangre y suero

Para analizar la bacteriemia, una pequeña porción de cada muestra de sangre se diluyó 1:10 en PBS inmediatamente después de su extracción y un volumen de 100 μ l se sembró por goteo en placas de TSA para realizar un recuento de viables. Para la separación del suero, el resto de la muestra se depositó en el interior de un tubo con gel separador y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Para los análisis hematológicos, se utilizaron tubos tipo “vacutainer” con EDTA, mientras que para la cuantificación de lactato, se emplearon *vacutainers* con Fluoruro/EDTA (Sysmex XT-1800i®; Sant Just Desvern). Los parámetros bioquímicos se determinaron en un

analizador automático Hitachi-911® (Hitachi Medical Systems, Madrid). El resto de muestra se guardó a -80 °C para su posterior análisis.

3.10.4 Análisis *post-mortem*

Tras la eutanasia, se extrajeron y pesaron el hígado, bazo, pulmones y riñones. Para su homogenización, se tomó 1 g de cada órgano y se mezcló con 9 mL de PBS, considerándose la nueva suspensión como la dilución 10^{-1} con respecto al órgano completo. Para el cálculo de la carga bacteriana en cada órgano, las sucesivas diluciones obtenidas a partir de la primera suspensión se procesaron del mismo modo que se explicó anteriormente para la muestra de sangre. Paralelamente, la porción sobrante del bazo se fijó por inmersión en formaldehído al 4% durante 24 h y se incluyó en parafina para después ser procesado y teñido con Hematoxilina-Eosina. Este proceso, junto con el consiguiente análisis histopatológico, se llevó a cabo por técnicos del servicio de diagnóstico anatomopatológico para animales de laboratorio de la Universidad de Zaragoza.

3.10.5 Cuantificación de endotoxina y citoquinas

Los niveles de IL-6 y TNF- α en suero se cuantificaron mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems®; Madrid).

La medida de los niveles de LPS en sangre, como endotoxina principal, se intentó inicialmente mediante el uso del ensayo del Lisado de Amebocitos del Limulus (LAL), pero no se obtuvieron resultados concluyentes, probablemente debido a la interferencia de algún componente presente en la sangre. Finalmente, el LPS se midió de forma indirecta, cuantificando por ELISA la producción de IL-8 en células embrionarias de riñón humano transfectadas con un vector de expresión para TLR4 (HEK-293/TLR-4). En estas células (amablemente cedidas por el Dr. Juan José Lasarte), la activación de TLR-4 dependiente del LPS presente en la sangre provoca la expresión de IL-8. Para verificar si las células se activaban por estímulos independientes de TLR-4, se repitió el experimento con un duplicado de cada muestra de sangre pero esta vez empleando una

línea celular que no expresaba TLR-4 (HEK-293/LacZ).

Para el mantenimiento de las células, se utilizó Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con glucosa (4,5 g/L), suero inactivado bovino (10%), penicilina/estreptomicina y blasticidina (5 µg/mL de cada antibiótico; GIBCO®; Thermo Fisher Scientific, Alcobendas, Madrid). Las células se cultivaron a 37 °C con 5% de CO₂. En el caso de la línea celular HEK-293/TLR-4, se añadió también 25 µg/mL de Higromicina B (Invivogen Ultrapure®; InvivoGen, San Diego EE.UU) para asegurar el mantenimiento del vector de expresión. En cada ensayo, 5 x 10⁵ células se expusieron a los sueros de conejo, una vez diluidos 1:10. Tras 24 h de incubación, se tomó el sobrenadante para cuantificar los niveles de IL-8 mediante un ELISA tipo sándwich (R&D Systems®; Madrid). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

3.11 Modelo murino de cicatrización de heridas

Todos los experimentos realizados con ratones fueron aprobados por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra (Protocolo 013-17) y por el Departamento de Salud del Gobierno de Navarra (Código de aprobación 2017/122402). Se utilizaron ratones Balb/C hembra de 7 semanas de edad de 20 g de peso aproximadamente (Harlan Interfauna Iberica SA, Barcelona, España). Los ratones se enjaularon en grupos de cinco con acceso a alimentos y agua *ad libitum* y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Después de una semana de aclimatación, los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/Kg; Merial SA Barcelona, España) y xilacina (5 mg/Kg, Bayer Hispania, SL Barcelona, España), se rasuró la zona dorsal del animal, se lesionó la piel con un punzón de biopsia de 5 mm de diámetro (Stiefel Farma, Madrid, España) y se infectó cada herida inmediatamente con 3.5 x 10⁴ UFC de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (ATCC 43300) en 10 µl de solución salina libre de pirógenos (excepto el control sin infectar). Una vez esta solución fue absorbida, los ratones se trataron tópicamente con 20 µl de vehículo (suero salino libre de pirógenos), Pep19-2.5 (400 µg/ml) o LL-37 (400 µg/ml) dos veces al día durante 6 días. En el momento de la generación de la herida y cada dos días se tomaron fotos de la zona a estudiar con el objetivo de medir el diámetro de la herida. El sexto día los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

3.12 Estadística

Los resultados de cinética de mortalidad se analizaron estadísticamente de manera conjunta en todos los tiempos mediante análisis de supervivencia de Kaplan-Meyer con el programa SPSS v15.0 (IBM Analytics, Nueva York, E.E.U.U.)

Para los estudios de potenciales diferencias en los recuentos bacterianos, niveles de endotoxina, de citoquinas, parámetros bioquímicos y diámetro de heridas se utilizó el Análisis de la Varianza (ANOVA). Si la distribución de las varianzas se disponía de forma homogénea (homocedasticidad), se realizó el análisis post hoc paramétrico Student-Neuwman-Kleus (SNK). Si, por el contrario, nos encontrábamos con una distribución heterocedástica (detectada mediante el test de Levene) se aplicaba T2 de Tamhane como análisis post hoc no paramétrico. En el modelo de bacteriemia de conejos, para la comparación de las temperaturas basales con las finales, se aplicó T de Student. Los gráficos se diseñaron utilizando el software Graphpad Prism V6.01® (GraphPad Software, La Jolla EE.UU).

4. Resultados

4.1 Pep 19-2.5 como neutralizante de lipoproteínas de grampositivos

Durante el Proyecto Fin de Máster previo al inicio de este estudio se demostró que Pep19-2.5 era capaz de neutralizar la endotoxina de bacterias gramnegativas *in vivo* y proteger con gran eficacia frente al choque endotóxico letal a ratones inoculados intraperitonealmente con LPS y D-galactosamina (Bárcena-Varela y Martínez de Tejada 2013). Sin embargo, se desconocía si el efecto era extrapolable a las moléculas equivalentes al LPS en grampositivos, las lipoproteínas de la pared celular. Se utilizó la lipoproteína FSL-1 (Lipoproteína Estimuladora de Fibroblasto-1) obtenida de *Mycoplasma* como agente endotóxico, ya que había demostrado previamente capacidad pro-inflamatoria (Martínez de Tejada y *col.* 2015).

Como se observa en la Figura 4.1.C, el 80 % de los ratones inoculados con FSL-1 conjuntamente con D-galactosamina morían a las 30 h si no recibían tratamiento. En cambio, una sola dosis en forma de *bolus* de Pep19-2.5 bastó para proteger al 75% de los animales durante todo el curso del experimento. La protección frente a la muerte por endotoxemia se acompañó de una reducción muy significativa de los niveles de una citoquina pro-inflamatoria, el TNF- α . Por el contrario, la disminución observada de los niveles de otra citoquina, la IL-6 no fue significativa. Estos resultados demuestran la capacidad de Pep19-2.5 para neutralizar *in vivo* moléculas inductoras de sepsis de bacterias grampositivas.

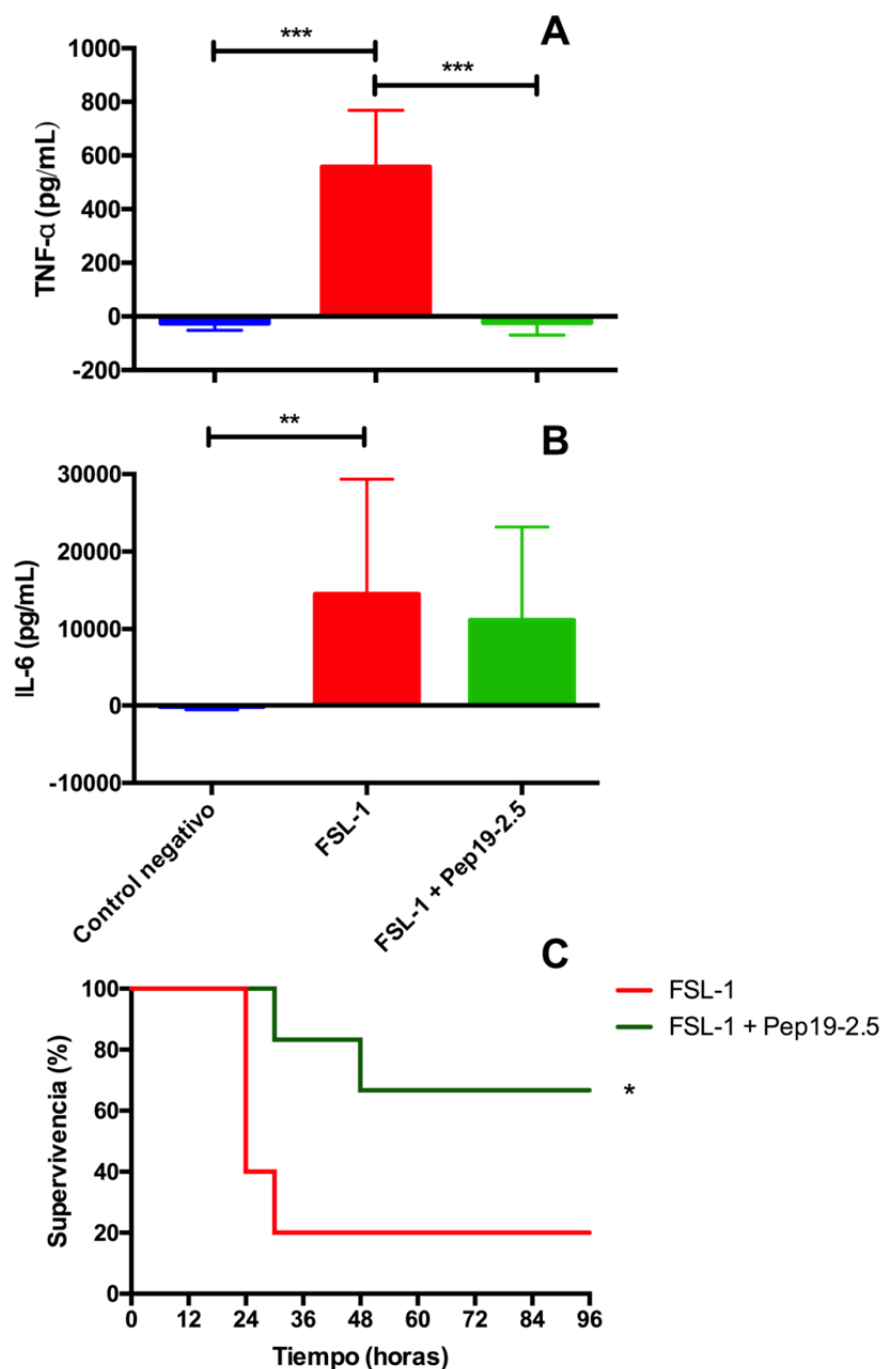


Figura 4.1: Niveles de TNF- α (A) y IL-6 (B) en suero tomado a 1,5 o 4 horas post-inoculación, respectivamente, y cinética de mortalidad de los ratones (C) (n=6) tras recibir 40 μ g de FSL-1 conjuntamente con D-galactosamina (18 mg/ratón) por vía intraperitoneal. El grupo tratado recibió, además, 400 μ g/ratón de Pep19-2.5 inmediatamente después. Los animales fueron monitorizados durante 4 días. Estadística: A) Control negativo (ratones que recibieron solo vehículo) Vs FSL-1: $p < 0,001$; FSL-1 Vs FSL-1 + Pep19-2.5: $p < 0,001$ B) Control negativo Vs FSL-1: $p = 0,0161$ C) Kaplan Meier test $p = 0,024$

4.2 Pep19-2.5 en combinación con tratamiento antibiótico en modelo de sepsis en conejos.

En el Proyecto Fin de Máster, los estudios *in vivo* de capacidad antiendotóxica de Pep19-2.5 se habían realizado exclusivamente en ratones (Heinbockel y *col.*, 2013). En este mismo modelo murino, se había observado también un efecto terapéutico sinérgico entre el péptido y el ibuprofeno (un antiinflamatorio no esteroideo), asociado al bloqueo de la cascada pro-inflamatoria tanto COX-dependiente como TLR-4 dependiente. Sin embargo, estos estudios no analizaron la capacidad del péptido para inhibir el crecimiento microbiano *in vivo*, un dato muy relevante en un compuesto candidato para el tratamiento de la sepsis. Por lo tanto, se decidió evaluar la efectividad de Pep19-2.5 en un modelo de sepsis causado por inoculación intravenosa de *Salmonella enterica minnesota* serovar Minnesota SF1114.

Dado que los conejos reproducen mejor que los ratones los síntomas de la sepsis humana (ver Introducción) y que los ensayos pre-clínicos exigen la evaluación del fármaco en un modelo distinto al murino, este experimento se realizó en conejos. Simultáneamente, se deseaba investigar si Pep19-2.5 era capaz de actuar en sinergia con un antibiótico de probada actividad bactericida, la ceftriaxona. Para la relevancia de este objetivo, hay que tener en cuenta que un fármaco frente a la sepsis debe poder administrarse en combinación con antibióticos convencionales.

En ensayos previos en ratones, nuestro grupo demostró que, a pesar de la baja actividad antimicrobiana *in vitro* de Pep19-2.5 sobre la cepa en estudio (CMI= 128 µg/mL), el péptido era capaz de actuar aditivamente con la ceftriaxona *in vivo* y proteger a los animales frente a la sepsis (Heinbockel y *col.* 2013). Sin embargo, en este trabajo tampoco se estudió la capacidad antimicrobiana del péptido por sí mismo.

4.2.1 Cinética de bacteriemia

Dada la complejidad del experimento y el elevado número de animales (n= 24), sólo fue posible trabajar con dos conejos cada día, lo que obligó a preparar el inóculo bacteriano en días distintos. Los resultados mostrados en la Figura 4.2 demuestran que

no hubo diferencia significativa entre los inóculos que recibieron los cuatro grupos estudiados, todos ellos en torno a $3,7 \times 10^9$ UFC/animal.

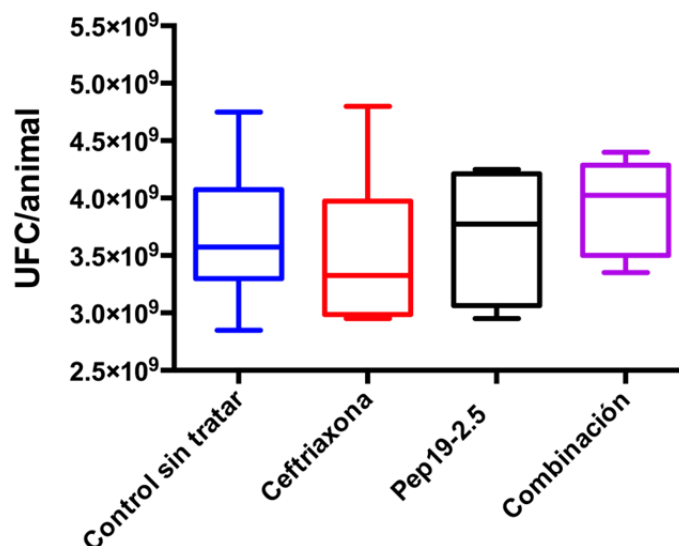


Figura 4.2: Comparación de los inóculos bacterianos (UFC/animal) administrados a los distintos grupos de conejos (n= 6). Recuentos en triplicado.

Inmediatamente después de administrar el inóculo por vía intravenosa, se trató por la misma vía a los animales con Pep19-2.5, ceftriaxona, o la combinación de ambos. El análisis de los hemocultivos a los diferentes tiempos (Figura 4.3) reveló que la reducción de UFCs en la sangre estaba asociada a la capacidad antibiótica de la ceftriaxona. Sin embargo, se detectó un efecto sinérgico péptido-antibiótico en el grupo de doble tratamiento, ya que desde los 2 minutos de la administración de la combinación, se observó una reducción estadísticamente significativa de la bacteriemia con respecto al grupo control ($p=0,039$). Además, a los 30 minutos del inicio del experimento, el único grupo de animales con una bacteriemia indetectable fue el que recibió el tratamiento combinado. Por su parte, la ceftriaxona como tratamiento único demostró una potente capacidad antibiótica que se detectó a partir de los 30 minutos y alcanzó su máximo nivel (bacteriemia indetectable) a los 90 minutos. Por el contrario, Pep19-2.5 se reveló como un tratamiento carente de capacidad antibacteriana.

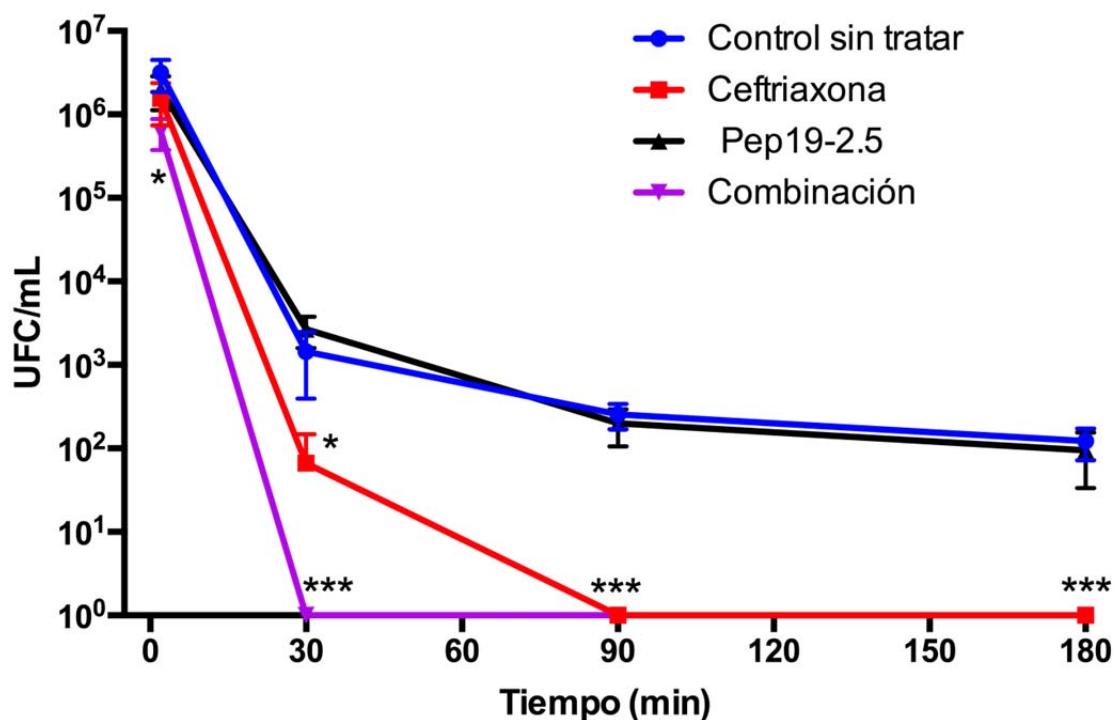


Figura. 4.3: Carga bacteriana en sangre (UFC/mL) a lo largo del tiempo en los distintos grupos de animales. Recuentos en triplicado. Estadística: Se realizó un ANOVA a cada tiempo del análisis. t=2') Control sin tratar Vs Combinación: $p=0,039$; t=30') Control sin tratar Vs Ceftriaxona: $p=0,021$, Control sin tratar Vs Combinación: $p<0,001$; t=90') Control sin tratar Vs Combinación: $p<0,001$; t=180') Control sin tratar Vs Combinación: $p<0,001$.

4.2.2 Niveles de endotoxina en suero

Para dilucidar si alguno de los tratamientos era capaz de neutralizar el LPS, se cuantificaron los niveles de endotoxina en los animales a lo largo del experimento. Para ello, primero se intentó aplicar un método directo comercial, el test LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*), pero no se obtuvieron resultados reproducibles, aun empleando varios protocolos publicados. Probablemente, esto se deba a la presencia de compuestos en la sangre que secuestran la endotoxina y/o que interfieren en alguna de las etapas del ensayo. Por el contrario, la aplicación de un método indirecto basado en la activación de una línea celular transfectada con el receptor de endotoxina TLR-4 se reveló como una alternativa robusta y fiable. En este ensayo, la unión de LPS a su receptor de superficie y la consiguiente activación de la vía TLR-4 da lugar a la secreción de IL-8, una interleucina que puede cuantificarse fácilmente mediante ELISA. Para controlar la

posible presencia de compuestos en el suero que pudieran activar IL-8 independientemente de TLR-4 se empleó una línea celular idéntica a la anterior pero que no expresaba el receptor de endotoxina.

En experimentos preliminares, los niveles máximos de endotoxina en suero se detectaron a los 90 min del inicio del tratamiento. Por ello, este fue el tiempo seleccionado para comparar la endotoxemia en los distintos grupos de animales.

Como se muestra en la Figura 4.4, las concentraciones de los agonistas de TLR-4 (presumiblemente LPS), son mucho mayores en el grupo tratado con ceftriaxona con respecto al grupo control. Tal diferencia no se observa en la línea celular HEK-293/LacZ, carente del receptor TLR-4. A diferencia del tratamiento antibiótico, Pep19-2.5 muestra una potente capacidad neutralizante de los agonistas de TLR-4. Además, este efecto se mantiene en la terapia combinada, puesto que Pep19-2.5 es capaz de contrarrestar totalmente la capacidad de la ceftriaxona para liberar LPS, reduciendo incluso los niveles de agonistas de TLR-4 con respecto al grupo control sin tratar.

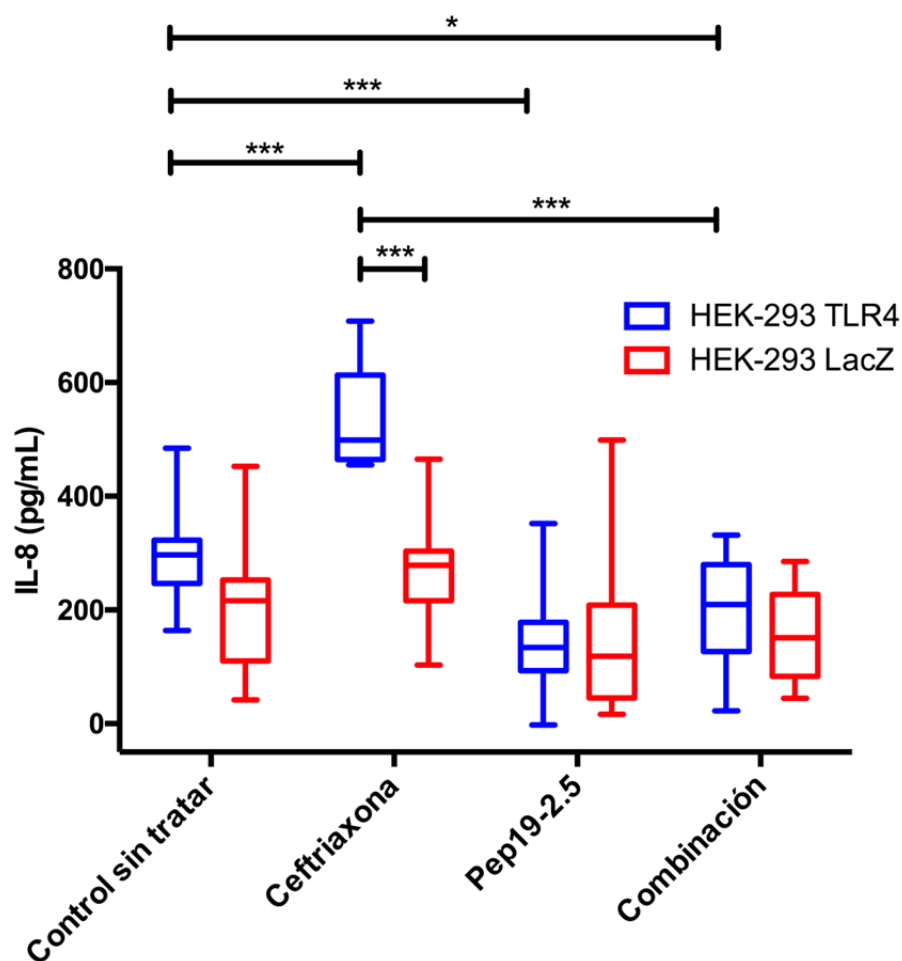


Figura 4.4: Concentración de agonistas de TLR-4 (presumiblemente LPS) en el suero de los conejos a los 90 min de la inoculación. La secreción de IL-8 (pg/mL) en la línea celular HEK-293/TLR-4 se produce en respuesta a la exposición a agonistas de TLR-4. Las células se expusieron al suero de los conejos extraído a los 90 min de la inoculación y los niveles de IL-8 se determinaron mediante ELISA por triplicado. Para controlar una posible activación independiente de la vía TLR-4, los niveles de IL-8 se midieron también en la línea celular HEK-293/LacZ, que no expresa el receptor de la endotoxina. Estadística: ANOVA seguido de Tamhane. Control sin tratar HEK-293 TLR4 Vs Combinación HEK-293 TLR4: $p=0,038$; Control sin tratar HEK-293 TLR4 Vs Pep19-2.5 HEK-293 TLR4: $p=0,008$; Control sin tratar HEK-293 TLR4 Vs Ceftriaxona HEK-293 TLR4: $p=0,009$; Ceftriaxona HEK-293 TLR4 Vs Combinación HEK-293 TLR4: $p=0,002$; Ceftriaxona HEK-293 TLR4 Vs Ceftriaxona HEK-293 LacZ: $p=0,009$.

4.2.3 Citoquinas pro-inflamatorias en suero

Generalmente, la endotoxemia se asocia con altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias en la sangre. Para investigar si la presencia de LPS en la sangre de los conejos iba acompañada de la secreción de este tipo de mediadores, se cuantificó la concentración de TNF- α e IL-6 en el suero de los animales. Debido a que los perfiles de secreción de ambas citoquinas varían con el tiempo, se determinó su concentración en suero a distintos tiempos durante las 3 primeras horas del experimento. Como se muestra en la Figura 4.5, los picos de secreción de TNF- α e IL-6 se detectaron a los 90 min y 180 min, respectivamente. Estos fueron los puntos temporales seleccionados para el estudio comparativo que se hizo a continuación.

En general, los niveles de citoquinas a los tiempos seleccionados (Figura 4.6) fueron proporcionales a las concentraciones de LPS previamente detectadas en el suero de los animales (Figura 4.4). Concretamente, la capacidad de la ceftriaxona para promover la liberación de LPS (Figura 4.4) se asoció en este ensayo con incrementos en los niveles de IL-6 y TNF- α en comparación con el grupo control sin tratamiento. Por el contrario, Pep19-2.5 no sólo carecía de actividad pro-inflamatoria, sino que era capaz de compensar el efecto inductor de TNF- α e IL-6 de la ceftriaxona en el grupo de tratamiento combinado. Este hecho demuestra la capacidad del péptido para neutralizar el LPS *in vivo*. Además, los animales que recibieron la terapia combinada mostraron niveles de IL-6 incluso por debajo de los del grupo sin tratar, lo que sugiere un efecto sinérgico de ambos tratamientos (Figura 4.6)

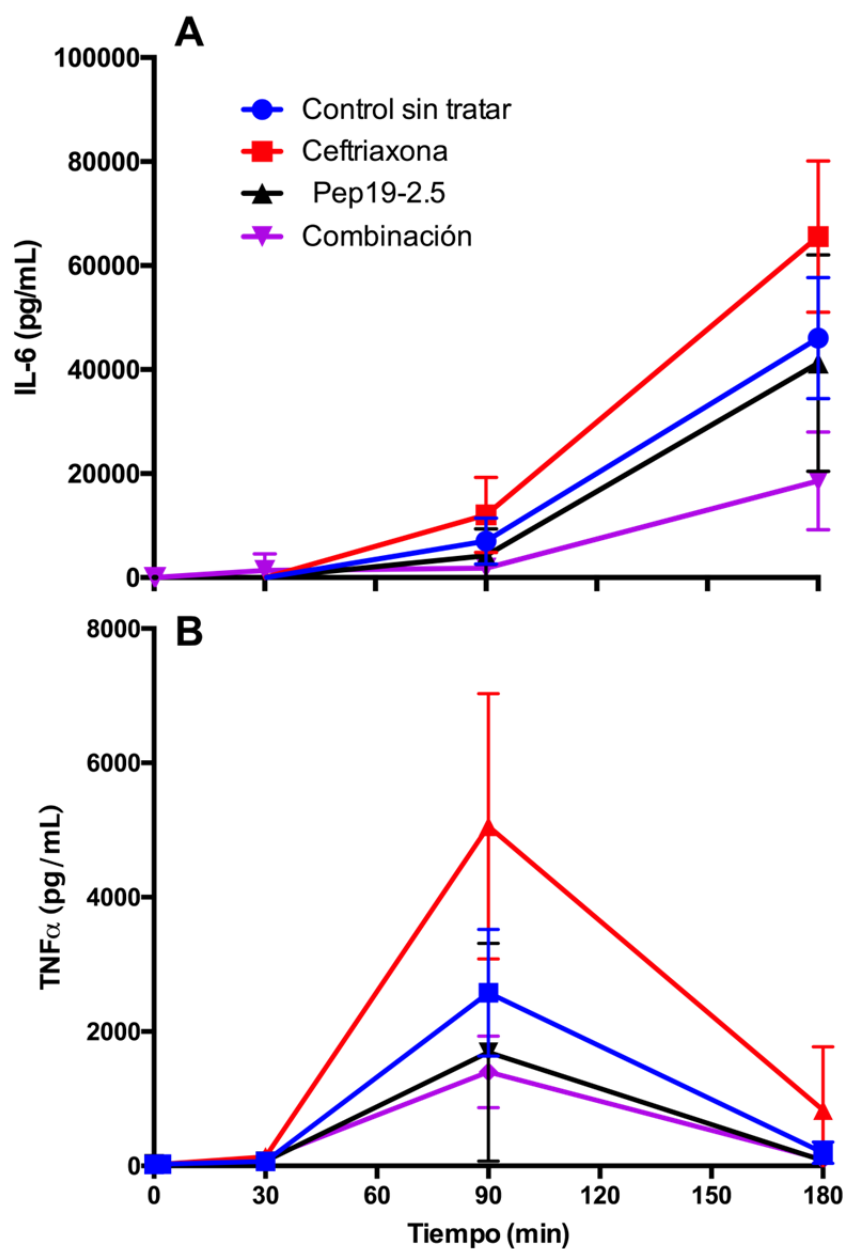


Figura 4.5: Niveles de IL-6 (A) y TNF- α (B) (pg/mL) en el suero de los distintos grupos de animales a lo largo del experimento. Los niveles de citoquinas se determinaron mediante ELISA por triplicado.

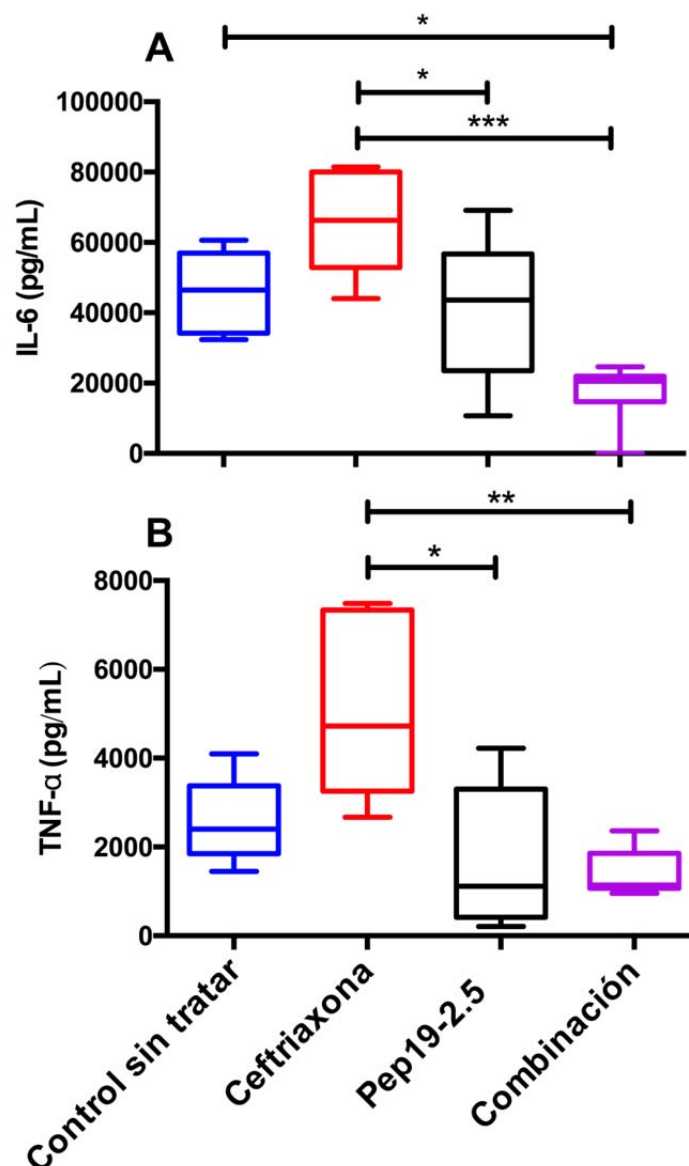


Figura 4.6: Niveles de IL-6 (A) y TNF- α (B) (pg/mL) en el suero de los distintos grupos a $t=180$ min (IL-6) y $t=90$ min (TNF- α) tras la inoculación. Los niveles de citoquinas se determinaron mediante ELISA por triplicado. Estadística: ANOVA seguido de Tamhane: A) Control sin tratar Vs Combinación: $p=0,032$; Ceftriaxona Vs Pep19-2.5: $p=0,046$; Ceftriaxona Vs Combinación: $p<0,001$. B) Ceftriaxona Vs Combinación: $p=0,007$; Ceftriaxona Vs Pep19-2.5: $p=0,031$.

4.2.4 Parámetros metabólicos

En el ser humano, la hiperglucemia e hiperlactatemia son dos de los síntomas característicos de una infección aguda, particularmente en pacientes con sepsis. El

seguimiento de los niveles de glucosa y lactato en suero a lo largo del experimento nos permitió confirmar que nuestro modelo de conejo reproducía tales síntomas (Figura 4.7). Concretamente, la inoculación de *S. enterica* causó un progresivo aumento de la concentración en sangre tanto de lactosa como de glucosa, detectándose los valores máximos de ambos metabolitos en la última muestra tomada. Sin embargo, ninguno de los tratamientos estudiados fue capaz de revertir la hiperglucemia e hiperlactatemia en ninguno de los tiempos estudiados.

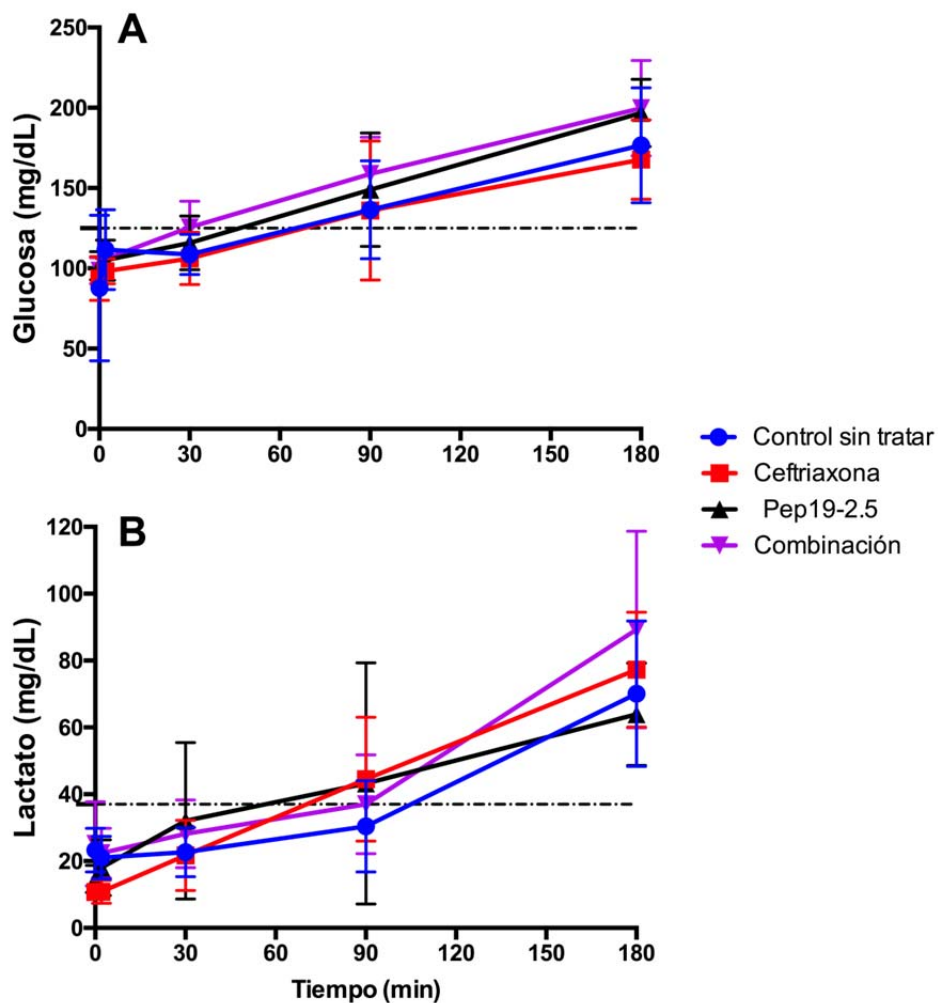


Figura. 4.7: Niveles de glucosa (A) y lactato (B) (mg/dL) en suero de los distintos grupos de animales a lo largo del tiempo. Determinaciones en triplicado.

4.2.5 Marcadores hematológicos

Muchas infecciones cursan frecuentemente asociadas a leucocitosis, o bien a leucopenia. Ambas alteraciones hematológicas son particularmente comunes en

pacientes con sepsis. Como se muestra en la Figura 4.8A, la inoculación de *S. enterica* causó una disminución en los niveles de leucocitos de en torno al 60 % del valor basal, independientemente de si los animales recibían o no tratamiento. Por el contrario, los valores de hematíes y hemoglobina permanecieron dentro de los parámetros normales, aunque mostraron una tendencia no significativa a disminuir de manera progresiva (Figura 4.8 B-C).

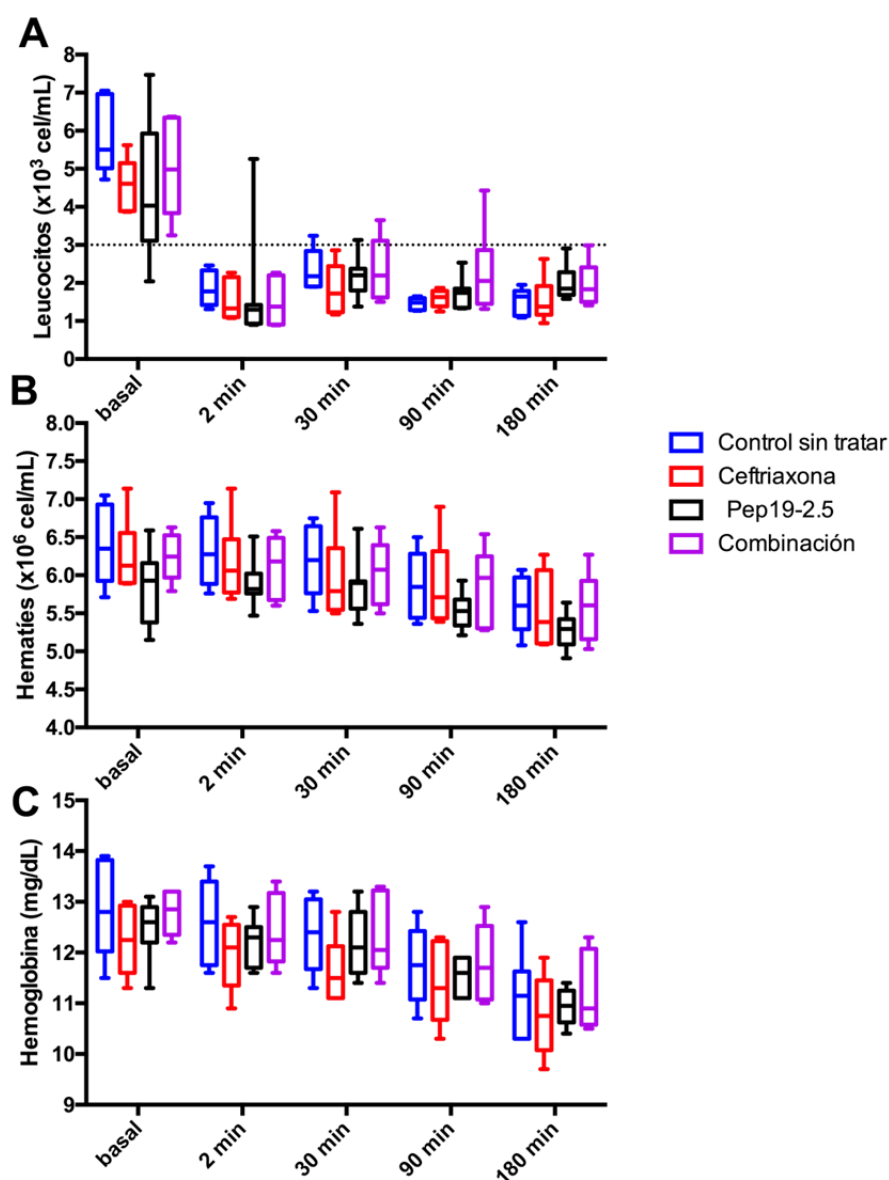


Figura 4.8: Niveles de leucocitos (A, $\times 10^3$ cel/mL), hematíes (B, $\times 10^6$ cel/mL) y hemoglobina (C, mg/dL) en sangre a lo largo del tiempo en los distintos grupos. Determinaciones en triplicado.

4.2.6 Monitorización de temperatura

La sepsis en humanos puede cursar con hipotermia o con hipertermia. Para estudiar si nuestro modelo animal reproducía alguno de estos síntomas, se monitorizó la temperatura rectal de los conejos durante el experimento. En nuestro caso, se observó que la inoculación de *S. enterica* en los conejos control sin tratamiento causaba una hipotermia severa. Concretamente, la temperatura rectal se redujo desde los 38 °C previos a la infección (normotermia en conejos) hasta los 35,5 °C en la última medida, a los 330 minutos post-inoculación (Figura 4.9). La cinética de la hipotermia en los animales tratados únicamente con Pep19-2.5 resultó más aguda y alcanzó los niveles más bajos de temperatura (resultado no significativo). Además, el aparente efecto pro-inflamatorio de la ceftriaxona demostrado previamente no se asoció a un agravamiento de la hipotermia en comparación con el grupo control. Sorprendentemente, cuando ambos tratamientos se administraron de forma combinada, se produjo un efecto anti-hipotérmico sinérgico. Este fenómeno se tradujo en una reversión progresiva de la hipotermia a lo largo del tiempo, y permitió que los animales recuperasen los niveles basales de temperatura a los 330 minutos post-inoculación. De hecho, todos los grupos alcanzaron niveles mínimos de temperatura rectal a los 330 minutos del inicio del experimento a excepción del grupo de tratamiento combinado, que experimentó una reversión completa de su situación en la fase final del experimento.

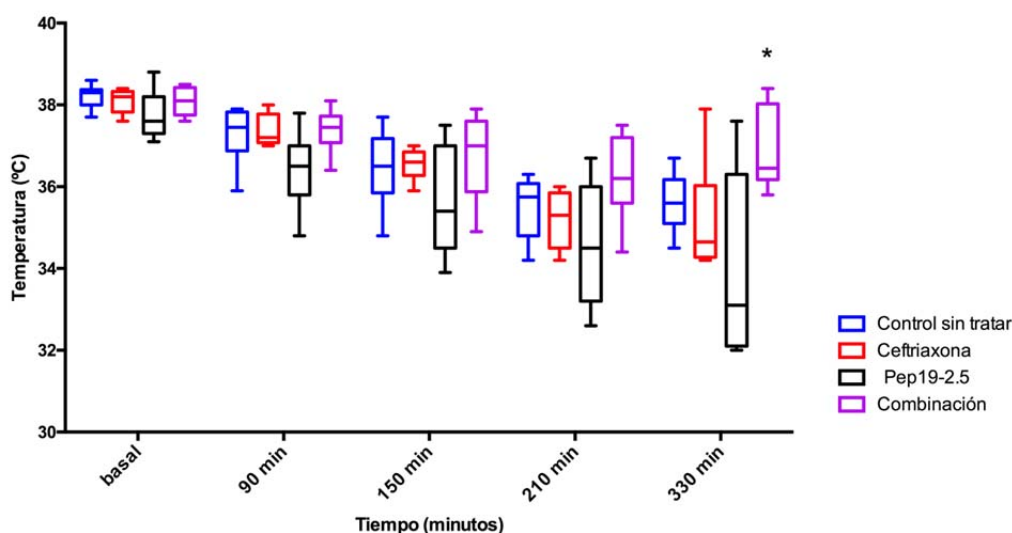


Figura 4.9: Temperatura rectal (°C) medida a lo largo del tiempo en los distintos grupos. Estadística: El asterisco (*) señala el único grupo experimental cuya temperatura rectal al final del experimento no difería significativamente de la

temperatura medida antes de la inoculación (indicada como “basal” en la Figura). T de Student: Ceftriaxona a t=0 Vs Ceftriaxona a t=330 min: p=0,039.

4.2.7 Estudio *post-mortem*

El análisis *post-mortem* de los órganos seleccionados reveló un gran número de UFCs en el hígado, bazo, pulmones y riñones en todos los animales estudiados (Figura 4.10). En los conejos que recibieron el tratamiento antibiótico (solo o en combinación con Pep19-2.5) se detectaron niveles reducidos de bacterias viables, tanto en hígado como en riñones. Sin embargo, no hubo eficacia de la terapia combinada para reducir la carga bacteriana en pulmones. Pep19-2.5 no mostró actividad antimicrobiana *per se*, pues fue incapaz de reducir la carga bacteriana en los animales. En uno de los órganos analizados -el hígado- los animales tratados con el péptido tenían más UFCs que los controles no tratados. Una tendencia similar se observó también en pulmones y riñones, aunque en estos casos las diferencias no fueron significativas.

La inflamación de un órgano con frecuencia se refleja en un aumento de su peso. Para evaluar la existencia de respuesta inflamatoria en los animales, se pesaron los órganos seleccionados para el análisis *post-mortem*. Como se muestra en la Figura 4.11, todos los órganos se mantuvieron dentro del intervalo de pesos considerado como normal a excepción del bazo. Este órgano mostró un elevado incremento de peso en la totalidad de grupos de conejos, sin apreciarse diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

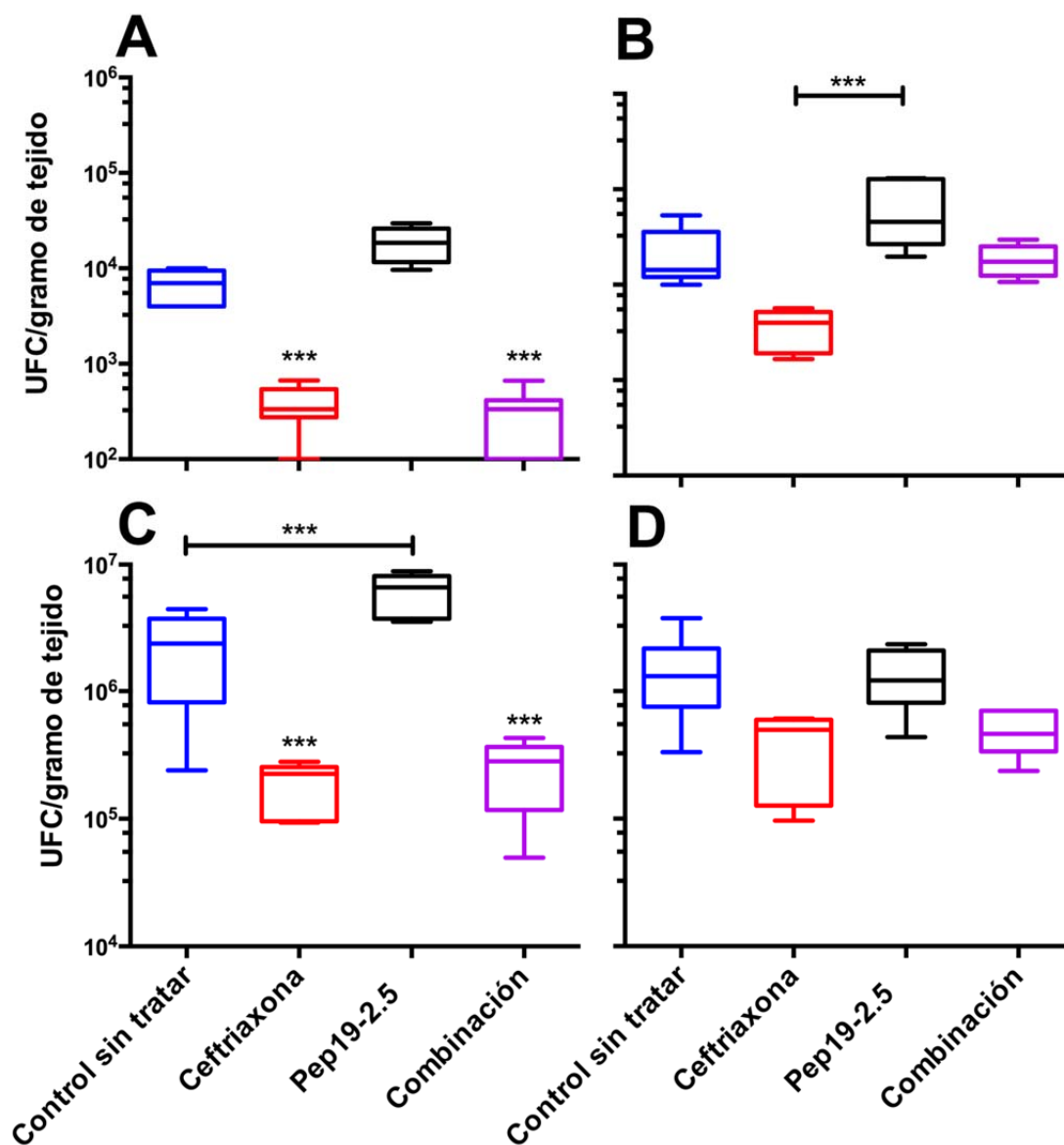


Figura 4.10: Carga bacteriana *post mortem* ($t=6$ h post-inoculación) (UFC/gramo de tejido) en riñón (A), pulmón (B), hígado (C) y bazo (D). Recuentos en triplicado. Estadística: ANOVA seguido de Tamhane: A) Control sin tratar Vs Ceftriaxona: $p<0,001$; Control sin tratar Vs Combinación: $p<0,001$. B) Ceftriaxona Vs Pep19-2.5: $p<0,001$. C) Control sin tratar Vs Pep19-2.5: $p<0,001$; Ceftriaxona Vs Pep19-2.5: $p<0,001$; Combinación Vs Pep19-2.5: $p<0,001$.

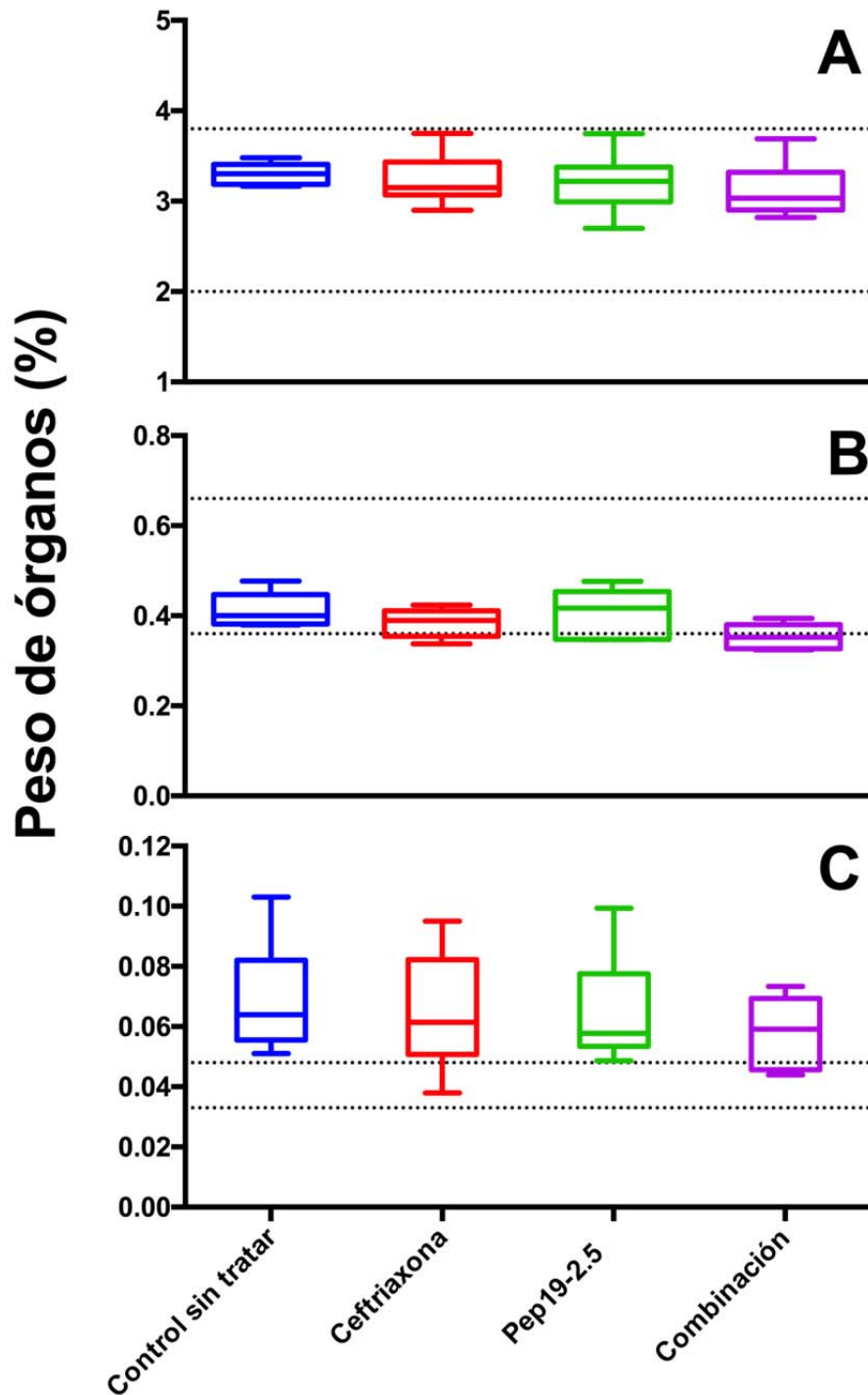


Figura 4.11: Peso de los órganos seleccionados para el análisis *post-mortem* (hígado (A), riñones (B) y bazo (C)) en comparación con el rango de peso normal. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al peso total del animal. El rango de peso normal de cada órgano corresponde al área comprendida entre las líneas de puntos.

4.2.8 Análisis histológico del bazo

El análisis anatomopatológico se concentró en el bazo, a la vista de la esplenomegalia detectada en todos los animales. En general, las patologías que se encontraron fueron similares en todas las muestras, pero de distinta intensidad dependiendo del grupo experimental (Figura 4.12, Tabla 4.1). Todos los animales mostraron esplenitis, causada por una infiltración inflamatoria de heterófilos (células de conejo equivalentes a los polimorfonucleares neutrófilos de los seres humanos). En este infiltrado se detectaron abundantes bacterias, tanto dentro de los macrófagos como en el espacio extracelular. Frecuentemente, las bacterias aparecían deformadas, posiblemente como consecuencia de la activación de los efectores del sistema inmune. Los hallazgos anteriores se acompañaban de hemorragias de distinta severidad dependiendo del grupo en estudio. Aunque se encontró variabilidad entre individuos, en general, el tratamiento con Pep19-2.5, solo o en combinación con ceftriaxona, se asoció con alteraciones patológicas más leves y con menor carga bacteriana en comparación con el control sin tratar y con el grupo que recibió tratamiento antibiótico únicamente (Tabla 4.1).

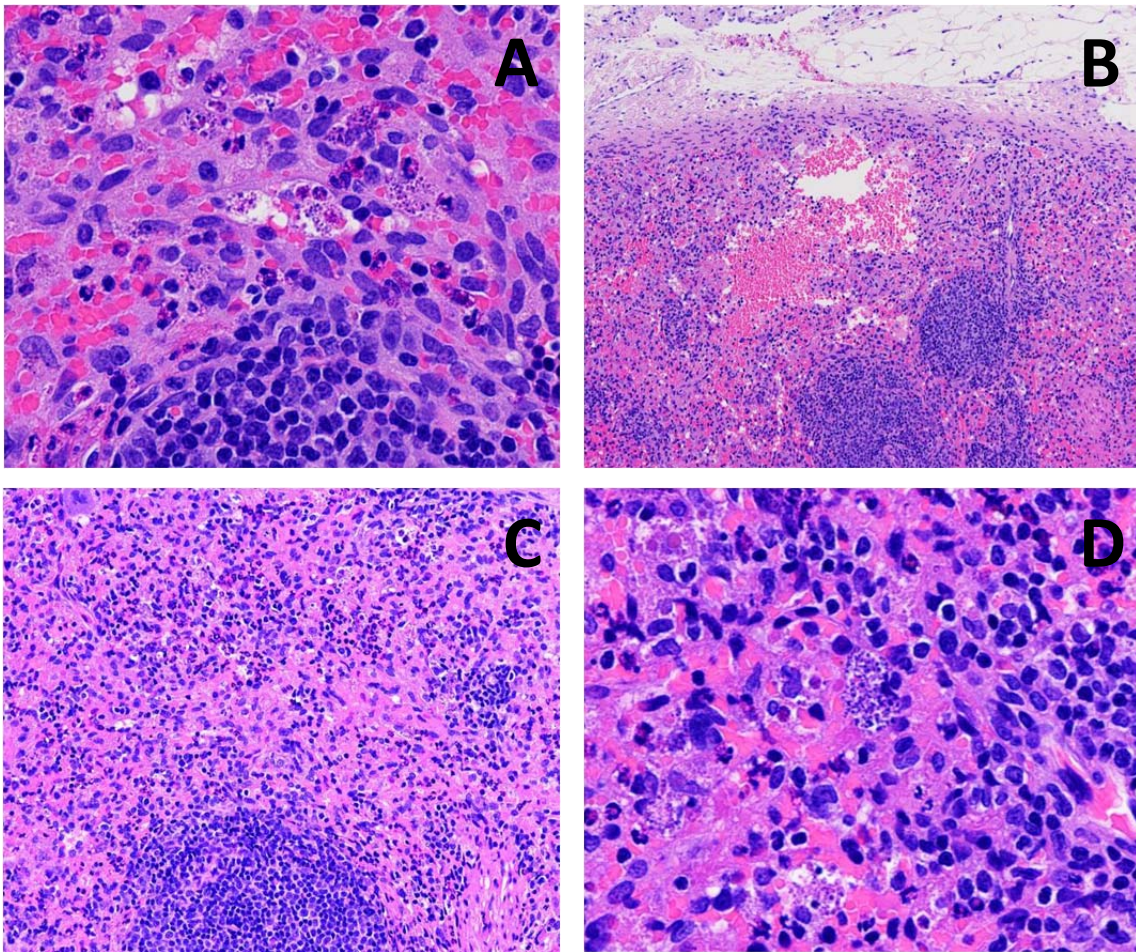


Figura 4.12: Análisis microscópico de varias muestras de bazo teñidas con Hematoxilina-Eosina. Se muestran ejemplos de alteraciones patológicas que se observaron tales como: A) Presencia de bacterias entre los heterófilos (600x). B) Hemorragia dentro del tejido del bazo (100x). C) Masa de color rojo alrededor de folículo linfoide con infiltración de heterófilos (200x). D) Detalle de acumulaciones bacterianas en el citoplasma de los macrófagos (600x).

Tabla 4.1: Alteraciones histopatológicas observadas en las muestras de bazo según los distintos tratamientos. El número de cruces es proporcional a la severidad de la patología o a la intensidad de la colonización bacteriana.

Muestra	Hemorragias	Grado de necrosis	Grado de esplenitis	Tamaño de folículos	Cantidad de bacteria
Control sin tratar 1	+++++	++++	++++	Reducido	+++++
Control sin tratar 2	+++	++++	++++	Reducido	+++++
Control sin tratar 3	++	+++	++++	Normal	++++
Control sin tratar 4	++++	+++	++++	Normal	+++
Control sin tratar 5	+++	++++	++++	Normal	+++
Control sin tratar 6	+++	++++	++++	Normal	+++
Ceftriaxona 1	++	+++	+++	Normal	++
Ceftriaxona 2	++++	+++	+++	Normal	++
Ceftriaxona 3	++++	++	++	Normal	+
Ceftriaxona 4	++++	+++	++++	Normal	++
Ceftriaxona 5	+++	++++	++++	Normal	+++
Ceftriaxona 6	+++	+++	++++	Normal	+++
Pep19-2.5 1	+	++	+++	Normal	+
Pep19-2.5 2	+	+	+	Normal	+
Pep19-2.5 3	++	+	+++	Normal	++
Pep19-2.5 4	++	+	++	Incrementado	++
Pep19-2.5 5	+++	+	++	Normal	+
Pep19-2.5 6	++	+	++	Normal	+
Combinación 1	++	++	+++	Normal	+++
Combinación 2	+	+	++	Normal	+
Combinación 3	++	+	+	Reducido	+
Combinación 4	+	+	+	Normal	+
Combinación 5	++	++	++	Normal	+
Combinación 6	++	+	++	Normal	+

4.3 Pep19-2.5 como agente cicatrizante de heridas infectadas

Paralelamente, se decidió combinar la línea de investigación llevada a cabo en la Universidad Libre de Berlín (Pfalzgraff y *col.* 2016) en la que se evaluaba a Pep19-2.5 como agente cicatrizante con nuestro proyecto en el que estudiábamos la actividad antiendotóxica y antibacteriana del mismo compuesto. Estos experimentos fueron desarrollados entre nuestro grupo y el grupo colaborador. De entre todos los que se ejecutaron, se ha decidido destacar únicamente aquel experimento piloto en el que se pone a prueba, de manera indirecta, la efectividad antimicrobiana de Pep19-2.5. En este caso, el tratamiento consistió en dos administraciones diarias del péptido por vía tópica frente a la herida cutánea infectada con $3,5 \times 10^4$ UFCs de la cepa *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA) ATCC 43300, como se describe en el apartado 3.11 de Material y Métodos. La efectividad de Pep19-2.5 fue evaluada en función de la reducción en el diámetro de la herida generada a lo largo del tiempo, frente a los controles sin infectar ni tratar, infectados sin tratar, y tratados con el péptido control LL-37 (véase Figura 4.13 y 4.14).

Pese a las limitaciones del estudio, los resultados demostraron que Pep19-2.5 fue capaz de favorecer la cicatrización al mismo ritmo que si la herida no hubiese sido infectada. De hecho, la cinética de cicatrización fue indistinguible a la observada para el péptido control LL-37, resultando en una diferencia significativa de las heridas infectadas y tratadas con respecto a una herida infectada sin tratar tras 6 días. Además, durante los días 2 y 4 se apreció una mayor reducción del diámetro de la herida en los ratones que recibieron alguno de los dos AMPs en comparación con el grupo sin infectar ni tratar, pese a ser una diferencia no significativa.

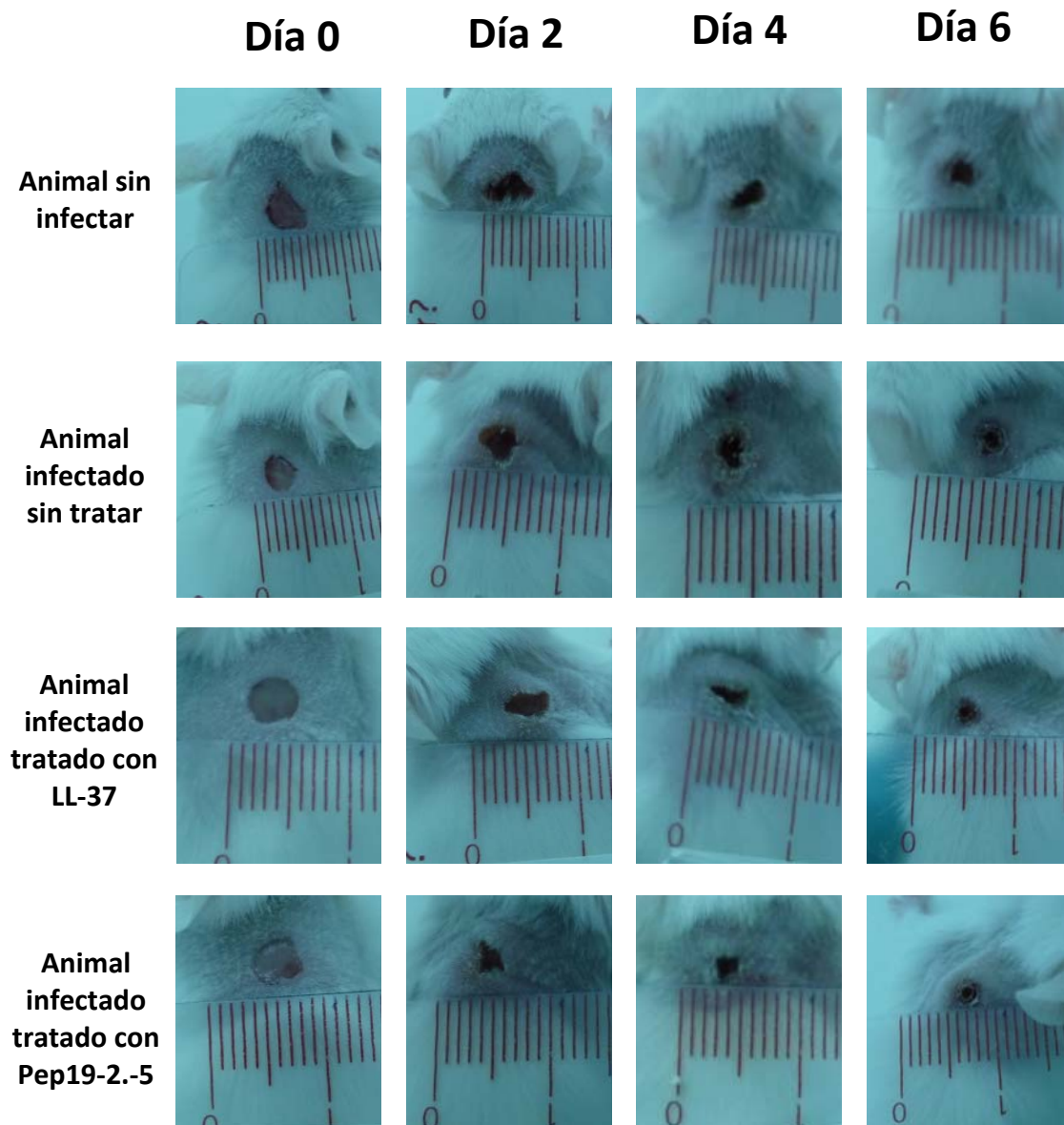


Figura 4.13: Seguimiento a lo largo del tiempo de la cicatrización de heridas infectadas con $3,5 \times 10^4$ UFCs de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA) ATCC 43300 y tratadas de la manera indicada. Ejemplos representativos de la cinética de cicatrización en cada grupo de ratones evaluado.

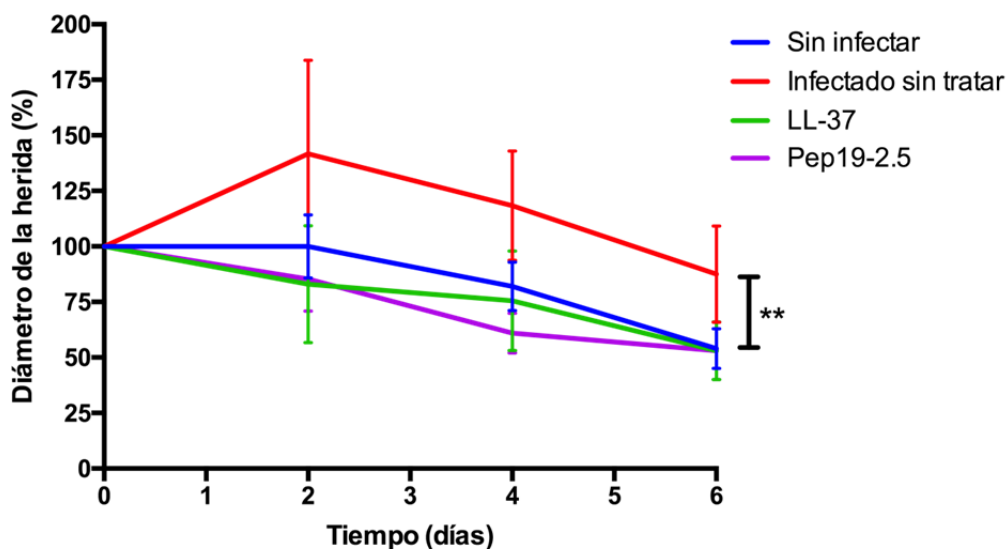


Figura 4.14: Evolución del diámetro de la herida, representado en porcentaje sobre el diámetro a día 0. La diferencia de alta significación (**) se refiere a la diferencia entre el grupo infectado sin tratar y el resto de grupos (n=5). Estadística: ANOVA seguido de Tamhane: Infectado sin tratar Vs Sin infectar: p=0,008; Infectado sin tratar Vs LL-37: p=0,004; Infectado sin tratar Vs Pep19-2.5: p=0,007.

4.4 Estudios de estabilidad y biodistribución de Pep19-2.5

De manera simultánea a su evaluación terapéutica, se analizó la estabilidad y biodistribución de Pep19-2.5. Para el segundo objetivo, se empleó un modelo animal, el ratón, en el que el péptido había demostrado una elevada eficacia terapéutica incluso en ausencia de antibióticos (Bárcena-Varela 2013).

4.4.1 Estabilidad de Pep19-2.5

Para estudiar la estabilidad de Pep19-2.5 en presencia de suero, primero se determinó su capacidad para resistir las proteasas séricas en ensayos *in vitro*. Para ello, se expuso al péptido a concentraciones crecientes de suero humano libre de proteínas de alto peso molecular (>30.000 KDa), y se determinó por HPLC la cantidad de péptido que resistía la digestión. Como se muestra en la Figura 4.15, la cantidad de péptido detectable en estas condiciones decrecía conforme aumentaba la presencia de suero en la mezcla. En todos los casos en los que se añadió suero, Pep19-2.5 era indetectable a partir de las 4 h. Por el contrario, Pep19-2.5 se mostró muy estable en H₂O_{up}.

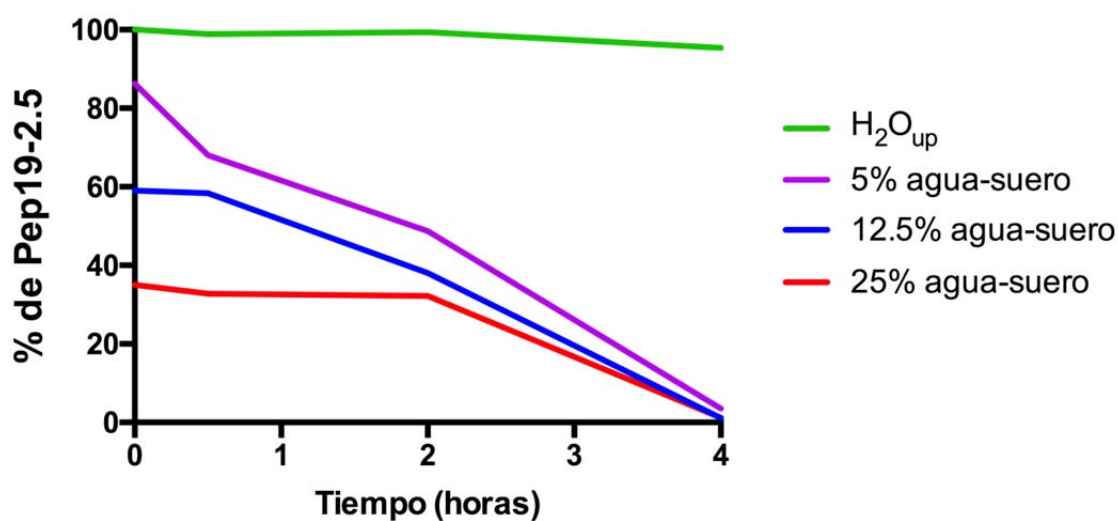


Figura 4.15: Porcentaje de Pep19-2.5 detectable a lo largo del tiempo en presencia de cantidades crecientes de suero. La detección se realizó mediante HPLC y el porcentaje se calculó con respecto a la cantidad de péptido detectada en H₂O_{up}.

La albúmina (66,5 kDa) es la proteína más abundante de la sangre y carece de capacidad proteolítica. Cuando Pep19-2.5 se expuso a seroalbúmina bovina, la cantidad de péptido detectable se redujo muy lentamente hasta llegar al 45% de la inicial tras 96 horas de incubación (Figura 4.16).

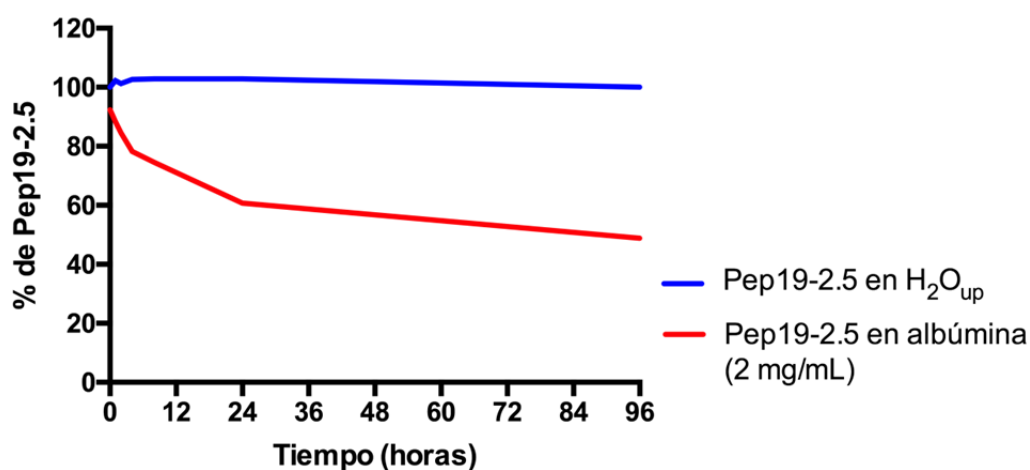


Figura 4.16: Porcentaje de Pep19-2.5 (0,5 mg/mL) detectable a lo largo del tiempo en presencia de 2 mg/mL de seroalbúmina bovina. La detección se realizó mediante HPLC y el porcentaje se calculó con respecto a la cantidad de péptido inicial detectada en H₂O_{up}.

4.4.2 Biodistribución de ^{14}C -Pep19-2.5 tras administración intravenosa en el ratón

Para estudiar la biodistribución de Pep19-2.5, primero se marcó radiactivamente el péptido con ^{14}C y a continuación se administró a ratones de la estirpe NMRI por vía intravenosa. Los animales se sacrificaron a distintos tiempos post-inoculación y, tras extraer y homogeneizar los órganos en estudio, la cantidad de péptido se dedujo a partir del nivel de radiación presente en cada órgano. Como se muestra en la Figura 4.17, la radiación se concentró inicialmente en el pulmón y en el hígado. A los 15 min post-inoculación, también se detectó una cantidad significativa de ^{14}C -Pep19-2.5 en el bazo y en el riñón, en torno al 10 % de la dosis total inyectada. En el pulmón, la cantidad de ^{14}C se redujo progresivamente a lo largo del ensayo, mientras que el pico de concentración en el hígado se detectó a los 60 min de la administración (28 % de la dosis total inyectada) y descendió posteriormente. La radiación en el riñón siguió una cinética aproximadamente opuesta a la del pulmón, aumentando desde el 6 % a los 15 min, hasta el 14 % a los 240 min. Una pequeña proporción de ^{14}C -Pep19-2.5 se detectó en la zona de administración (la cola del animal), mientras que apenas se apreciaron trazas de radiación en la sangre, pese a haber sido administrado el compuesto por la vía intravenosa.

Sin embargo, cuando estos resultados se expresaron en función del peso de cada órgano o tejido, la imagen global del experimento cambió marcadamente (Figura 4.18). Así, a los 15 min, el 26 % de ^{14}C -Pep19-2.5 se localizó en el hígado, aumentando ese porcentaje hasta el 57 % tras una hora, y volviendo a reducirse a los 240 min. En comparación con el hígado, la radiación cuantificada en el resto de los órganos fue muy baja. En torno al 3, 2 y 1 % de la señal se detectó inicialmente en el pulmón, el bazo y la sangre, respectivamente, reduciéndose este porcentaje a lo largo del tiempo. Por el contrario, en los riñones, intestino y estómago se midieron niveles bajos de péptido inicialmente (3, 2 y 1 %, respectivamente), pero posteriormente (a los 60 y 240 min) se alcanzaron cifras algo más elevadas. No se detectó señal en el sistema nervioso central, con lo que posiblemente el compuesto presente dificultades para traspasar la barrera hematoencefálica.

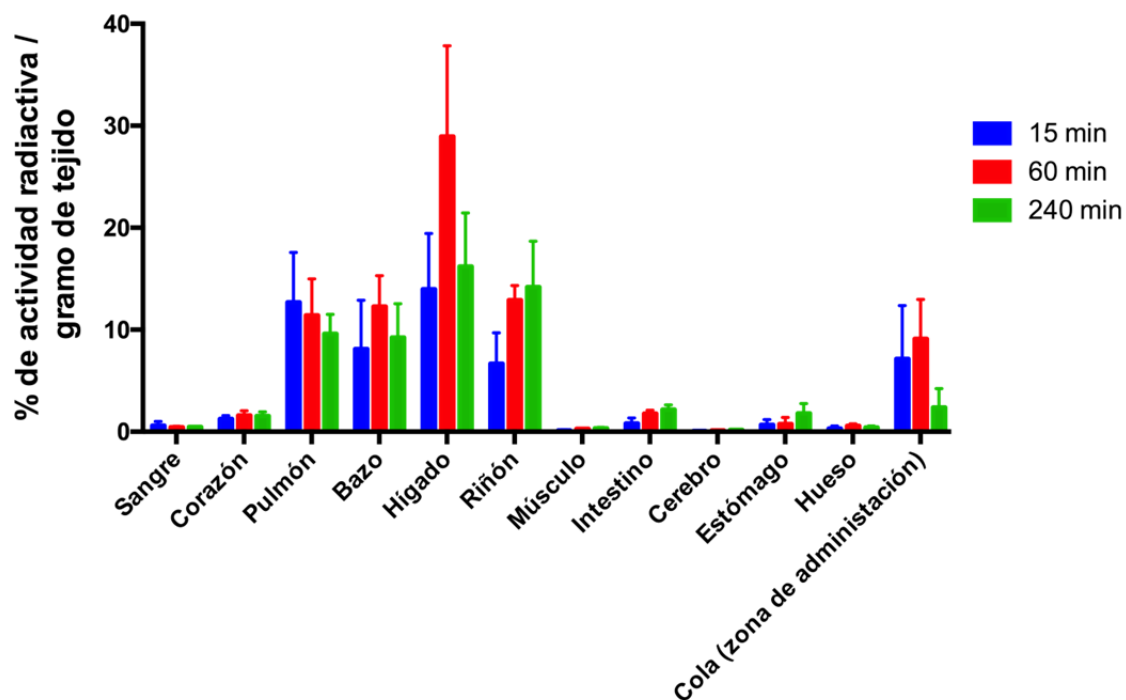


Figura 4.17: Cantidad de ^{14}C -Pep19-2.5 presente en órganos y tejidos del ratón a diferentes tiempos tras la administración del péptido por vía intravenosa (vena caudal). Los resultados se expresan como porcentaje de radiación detectada en cada gramo de tejido con respecto de la actividad radiactiva total inyectada.

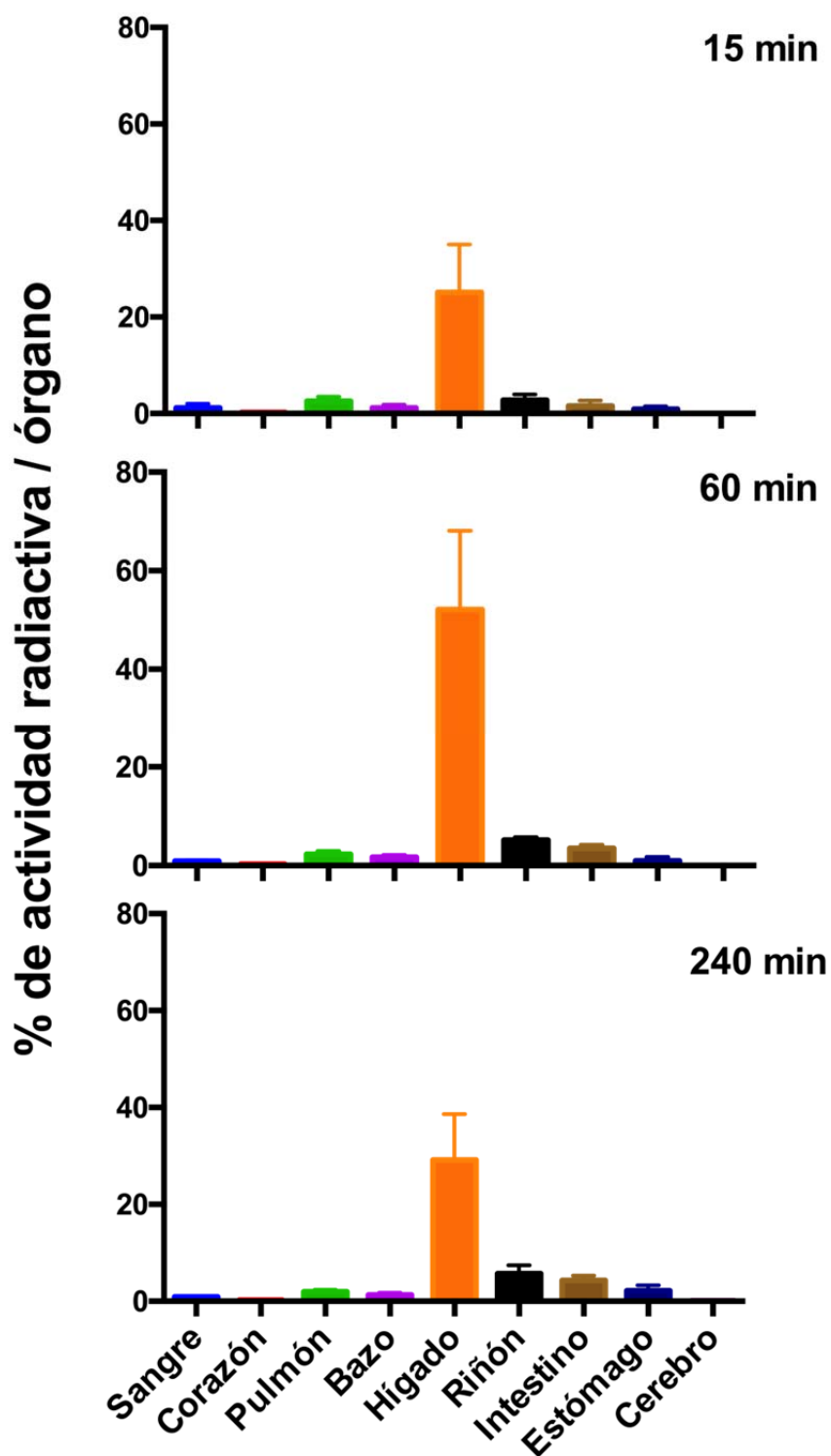


Figura 4.18: Cantidad de ^{14}C -Pep19-2.5 presente en órganos y tejidos del ratón a diferentes tiempos tras la administración del péptido por vía intravenosa (vena caudal). Los resultados se expresan como porcentaje de radiación detectada en cada órgano o tejido con respecto de la actividad radiactiva total inyectada.

4.5 Caracterización preclínica de Pep19-4LF.

Como parte de los ensayos preclínicos de Pep19-2.5, nuestros colaboradores del Centro de Investigación de Borstel, Alemania, llevaron a cabo un estudio de toxicidad de este péptido en ratas. Este estudio concluyó que las dosis simples (*bolus*) superiores a 3 mg/Kg se situaban dentro del rango tóxico. Un estudio posterior reveló que una dosis repetida de 4,5 mg/Kg superaba el umbral de toxicidad (Brandenburg y colaboradores, observaciones no publicadas). Este hecho supuso un grave contratiempo para el desarrollo clínico del péptido Pep19-2.5 y obligó a concentrar los esfuerzos en el desarrollo de un compuesto menos tóxico, el péptido Pep19-4LF (Tabla 3.2).

Los experimentos de toxicidad con Pep19-4LF en ratas demostraron que este compuesto no provocaba la aparición de signos clínicos a niveles de dosis simples inferiores a 20 mg/Kg. Asimismo, el péptido no causó síntomas de toxicidad cuando se administraba en dosis repetidas de 5 mg/Kg (Brandenburg y colaboradores, observaciones no publicadas). Para estudiar la posible aplicación terapéutica de este compuesto, se caracterizó su actividad antimicrobiana y antiendotóxica. En estos estudios se empleó como referencia el péptido Pep19-2.5, cuya eficacia *in vivo* ya había sido investigada.

4.5.1 Determinación de la CMI y CMB de Pep19-4LF

Para estudiar la actividad bacteriostática y bactericida de Pep19-4LF, primero se determinaron los valores de CMI y CMB según el método estandarizado CLSI frente a una colección de cepas bacterianas de relevancia clínica. Como se muestra en la Tabla 4.2, Pep19-4LF resultó poseer una actividad antimicrobiana mucho más potente que Pep19-2.5. Todos los valores de CMI fueron, al menos, 4 veces menores en el primero que en el segundo péptido, aunque no fue infrecuente encontrar diferencias entre las CMI mayores (por ejemplo de 64 veces en *B. bronchiseptica* y de 16 veces en *A. baumannii* ATCC19606, *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* 3792-99). Por otra parte, la coincidencia entre los valores de CMI y CMB en la mayoría de las cepas indica que Pep19-4LF actúa como bactericida a su CMI. La excepción más notable se produjo en el caso de *S. aureus* ATCC 25923 (CMI= 4 µg/mL; CMB= 64 µg/mL). Finalmente,

Pep19-4LF también se reveló como un agente bactericida mucho más potente que Pep19-2.5, pues todas las CMBs obtenidas fueron más bajas en el primero que en el segundo compuesto, con la excepción de *S. aureus* ATCC 25923 (32 µg/mL para Pep19-2.5 y 64 µg/mL para Pep19-4LF).

4.5.2 Actividad de Pep19-4LF en combinación con antibióticos

Para investigar si Pep19-4LF era capaz de actuar en sinergia con antibióticos, se utilizó inicialmente el método del *checkerboard*, en el que una cepa bacteriana se cultiva en presencia de combinaciones de péptido y antibiótico a distinta concentración. Como se muestra en la Tabla 4.3, en general, los péptidos presentaron una baja capacidad potenciadora de la acción de antibióticos y actuaron de manera aditiva. Esto queda reflejado por los índices CIF, que oscilaron en la mayoría de casos entre 0,5 y 2. En los casos en que los péptidos actuaron en sinergia, Pep19-2.5 mostró una potencia ligeramente superior a Pep19-4LF frente a la misma cepa. Por ejemplo, frente a *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, Pep19-2.5 alcanzó un ICIF de 0,13 en combinación con la oxacilina y redujo 128 veces la cantidad del antibiótico requerido para inhibir el crecimiento de la cepa resistente. En cambio, Pep19-4LF se mostró menos potente (ICIF= 0,375) y sólo fue capaz de disminuir 4 veces la CMI del antibiótico. Un fenómeno similar se observó en *E. coli* CUN E20 expuesto a una combinación de ceftriaxona y Pep19-2.5 (ICIF= 0,375), o bien al mismo antibiótico combinado con Pep19-4LF (ICIF= 0,5).

Tabla 4.2: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) expresadas en $\mu\text{g/mL}$ de Pep19-2.5 y Pep19-4LF frente a una colección de cepas de relevancia clínica.

	Pep19-2.5		Pep19-4LF	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158-02 CUN (Ps4)	128	128	16	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	256	256	16	16
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	128	128	8	8
<i>Escherichia coli</i> E20 CUN	128	128	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	128	128	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 3792-99 CUN	128	128	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32	32	4	64
<i>Bordetella bronchiseptica</i> 11844-99	128	128	2	4
<i>Acinetobacter baumannii</i> 10817 CUN	128	128	16	16
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	128	128	8	8
<i>Enterococcus faecium</i> 07777 CUN	32	32	4	8
<i>Enterococcus faecium</i> 01479 CUN	32	32	4	8
<i>Burkholderia cepacia</i> 21482 CUN	32	32	8	16
<i>Moraxella catarrhalis</i> 6205-3 CUN	32	32	8	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC 2013RYC1 CUN	128	128	16	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE K2	128	128	16	16

Tabla 4.3: Concentración mínima inhibitoria de varios antibióticos de uso clínico en presencia de los péptidos Pep19-4LF y Pep19-2.5.

	Pep19-2.5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI Meropenem ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de Pep19-2.5	ICIF	Pep19-4LF ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI Meropenem ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de Pep19-4LF	ICIF
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC 2013RYC1	0	32	N/A	0	32
2		32	1,016	0,5	32	1,031
4		16	0,531	1	16	0,562
8		16	0,562	2	16	0,625
16		16	0,625	4	16	0,75
64		8	0,75	8	8	0,75
128		0	N/A	16	0	N/A
CMI Tazobactam ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de Pep19-2.5			ICIF	CMI Tazobactam ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de Pep19-4LF		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE K2	0	256	N/A	0	256	N/A
	2	256	1,016	0,5	256	1,031
	4	256	1,032	1	256	1,062
	8	256	1,062	2	256	1,125
	16	256	1,125	4	256	1,25
	32	256	1,25	8	256	1,5
	64	1	0,504	16	256	2
128	0	N/A	16	0	N/A	
CMI Oxacilina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de Pep19-2.5			ICIF	CMI Oxacilina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de Pep19-4LF		
MRSA ATCC 43300	0	32	N/A	0	32	N/A
	4	32	1,031	2	8	0,375
	8	32	1,062	4	8	0,5
	16	0,25	0,133	8	8	0,75
	32	<0,125	<0,252	16	2	1,062
	128	0	N/A	16	0	N/A
CMI Ceftriaxona ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de Pep19-2.5			ICIF	CMI Ceftriaxona ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de Pep19-4LF		
<i>Escherichia coli</i> CUN E20	0	16	N/A	0	16	N/A
	8	16	1,062	1	16	1,062
	16	4	0,375	2	8	0,625
	32	2	0,375	4	4	0,5
	64	<0,125	0,508	8	2	0,625
128	0	N/A	16	0	N/A	

Para confirmar estos resultados, se recurrió a un método más sensible basado en el uso del equipo automático de turbidimetría *Bioscreen C*. Este sistema permite obtener con precisión la curva de crecimiento de hasta 200 cultivos microbianos simultáneamente. Cada cultivo puede ser expuesto a una combinación distinta de fármacos o de otros compuestos químicos. Inicialmente se utilizaron las combinaciones y cepas bacterianas escogidas a partir de los datos obtenidos por el método del *checkerboard*. Sin embargo, enseguida se detectaron algunas discrepancias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos. Por ejemplo, no se pudo confirmar mediante *Bioscreen* la capacidad de Pep19-2.5 -observada previamente

por el método del *checkerboard*- para actuar en sinergia con ceftriaxona o con oxacilina frente a *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente (datos no mostrados), con la excepción de la combinación Pep19-2.5 y Levofloxacino frente a *P. aeruginosa* 4158-02 Ps4, que mostró una leve efectividad al exponerse a ambos compuestos (Figura 4.20). Por el contrario, el sistema turbidimétrico sí confirmó que Pep19-4LF era capaz de potenciar los antibióticos oxacilina y ceftriaxona frente a las cepas *S. aureus* ATCC 43300 (Figura 4.22) y *E. coli* CUN E20 (Figura 4.21), respectivamente. Asimismo, este método identificó la capacidad de Pep19-4LF para potenciar el Levofloxacino frente *P. aeruginosa* Ps4 (Figura 4.20).

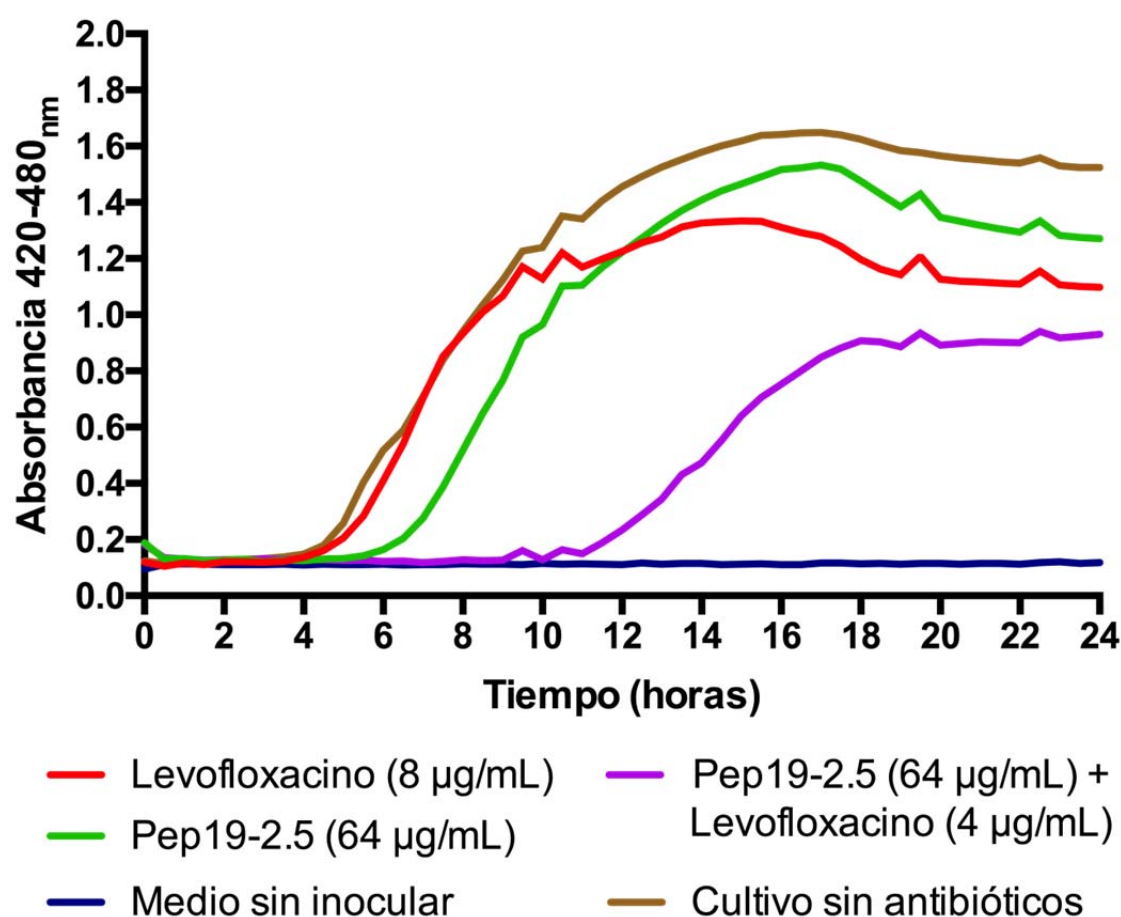


Figura 4.19: Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (*Bioscreen C*) de *Acinetobacter baumannii* 10817 en presencia de Pep19-2.5, Levofloxacino, o la combinación de ambos compuestos a las concentraciones indicadas.

Como se muestra en la Figura 4.19, Pep19-2.5, con una CMI de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y Levofloxacino, CMI= 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no afectaron al crecimiento de *A. baumannii* 10817 individualmente a concentraciones sub-CMI (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente). Sin embargo, cuando se combinaron ambos compuestos, bastó con la mitad de antibiótico para retrasar cinco horas el inicio del crecimiento con respecto del cultivo control sin antibiótico.

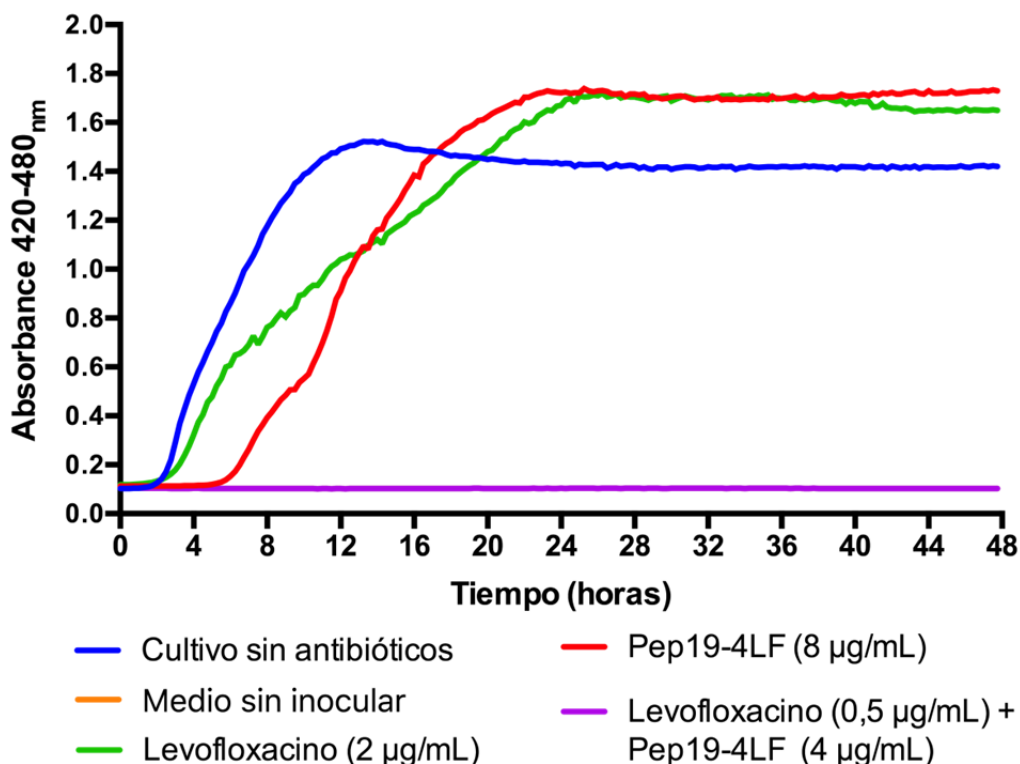


Figura 4.20: Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (Bioscreen C) de *P. aeruginosa* Ps4 en presencia de Pep19-4LF, Levofloxacino, o la combinación de ambos a las concentraciones indicadas.

Frente a *A. baumannii*, Pep19-4LF mostró una significativa capacidad para potenciar la actividad del Levofloxacino, como se observa en la Figura 4.19. Así, cuando se usó este antibiótico a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (una concentración inferior a su CMI (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)), el compuesto no alteró el crecimiento bacteriano. Por su parte, Pep19-4LF a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CMI= 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tan sólo causó un pequeño retraso en ese crecimiento. Sin embargo, la combinación de ambos compuestos se mostró totalmente inhibitoria frente a *P. aeruginosa* Ps4. Es de destacar que para conseguir dicha inhibición, se emplearon concentraciones inferiores a las que se usaron en cada uno de los tratamientos

individuales (4 veces en el caso del antibiótico y dos en el del péptido). Por lo tanto, una concentración sub-inhibitoria del péptido es capaz de convertir en sensible a Levofloxacino a una cepa de *P. aeruginosa* que en ausencia de Pep19-4LF es resistente a ese antibiótico.

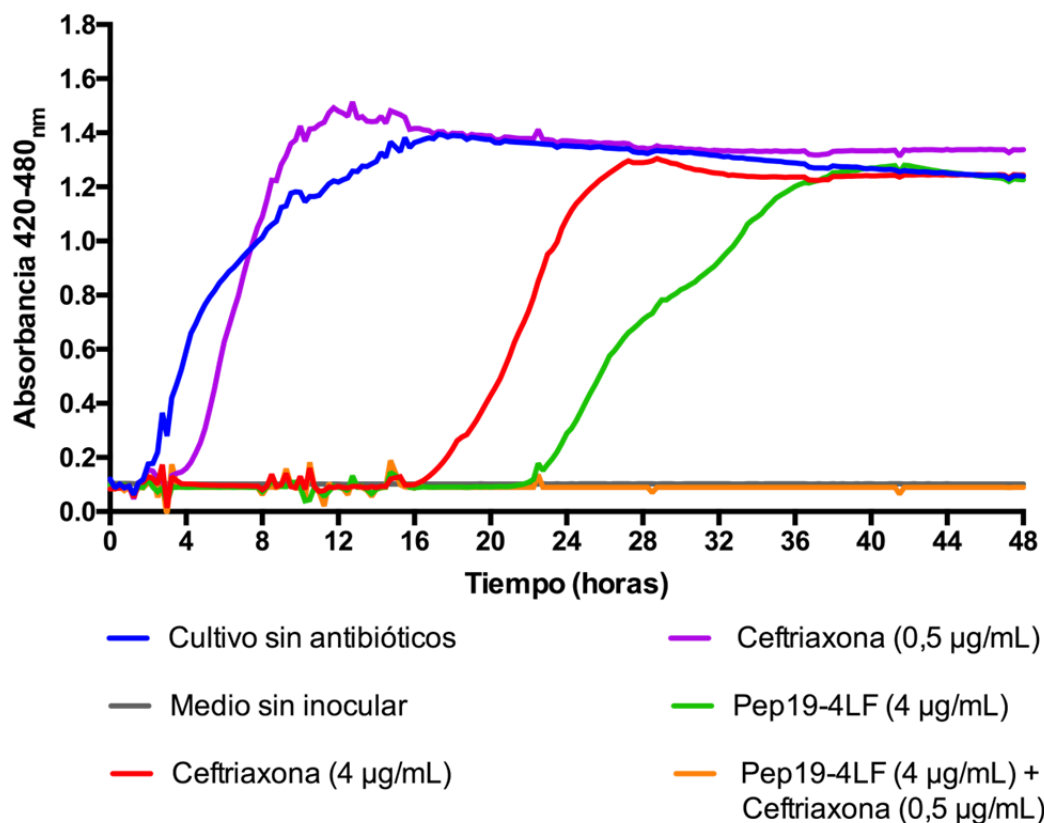


Figura 4.21: Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (*Bioscreen C*) de *E. coli* CUN E20 en presencia de Pep19-4LF, ceftriaxona, o la combinación de ambos a las concentraciones indicadas.

Una potenciación similar se observó en un aislamiento clínico de *E. coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (cepa CUN E20; Figura 4.21). Sin embargo, esta cepa sufrió retrasos en su crecimiento más severos por la acción de los tratamientos administrados individualmente a concentración subinhibitoria (16 h en el caso de ceftriaxona y 22 h en el de Pep19-4LF). Pese a esto, Pep19-4LF se mostró capaz también en este caso de convertir en sensible a la ceftriaxona a una cepa que era resistente a dicho compuesto. Concretamente, la CMI de la ceftriaxona se redujo 32 veces en presencia de una concentración subinhibitoria de Pep19-4LF.

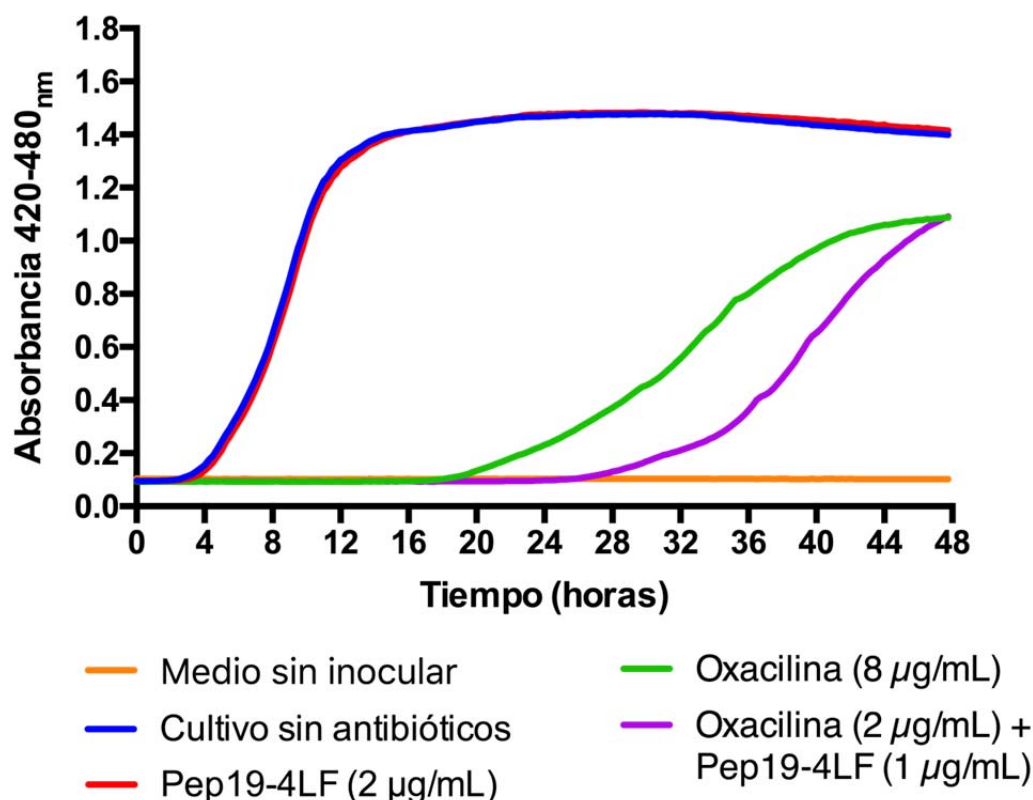


Figura 4.22: Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (*Bioscreen C*) de *S. aureus* ATCC 43300 en presencia de Pep19-4LF, Oxacilina, o la combinación de ambos a las concentraciones indicadas.

En comparación con los tres gramnegativos estudiados previamente, los resultados con el grampositivo *S. aureus* ATCC 43300 (Figura 4.22) fueron más difíciles de interpretar. Esta cepa, que es resistente a la meticilina y a la oxacilina (CMI Oxacilina= 32 µg/mL) se mostró parcialmente susceptible a 8 µg/mL de Oxacilina y totalmente resistente a 2 µg/mL del mismo (dato no mostrado). Aunque no se consiguió inhibir completamente el crecimiento utilizando combinaciones de concentraciones sub-inhedoras, se obtuvieron buenos resultados (inhibición durante 28 h) con tan solo 2 µg/mL de Oxacilina combinada con 1 µg/mL de Pep19-4LF (concentraciones 16 veces menores que sus respectivas CMIs), resultando en un poder inhibitorio mayor que el del tratamiento sencillo con 8 µg/mL de Oxacilina.

4.5.3 Capacidad de Pep19-4LF en sinergia con otros péptidos

Se ha descrito que algunos AMPs son capaces de actuar en sinergia cuando actúan conjuntamente sobre un microorganismo (Yan y Hancock, 2001). Para investigar si Pep19-4LF poseía esta capacidad, se determinó su actividad antimicrobiana en presencia de concentraciones subinhibitorias de Pep19-2.5 sobre una selección de cepas bacterianas. Aunque en la mayoría de cepas no se detectaron resultados positivos según la técnica de turbidimetría (*K. pneumoniae* KPC 2013RYC1, *K. pneumoniae* BLEE K2, *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *E. coli* CUN E20), Pep19-4LF y Pep19-2.5 actuaron claramente en sinergia frente a *A. baumannii* 10817 y *P. aeruginosa* 4158-02 Ps4 (Figura 4.23 A, B). En el caso de *A. baumannii*, la sinergia entre los péptidos resultó ser altamente eficaz, puesto que se logró una inhibición total del crecimiento empleando concentraciones reducidas de ambos compuestos, una octava y una dieciseisava parte (16 µg/mL y 2 µg/mL) de las CMI de Pep19-2.5 y Pep19-4LF, respectivamente. La potenciación mutua de ambos péptidos también resultó efectiva frente a *P. aeruginosa* 4158-02 Ps4, aunque en este caso se consiguió una inhibición total a concentraciones algo mayores de los péptidos: a un cuarto de la CMI de Pep19-2.5 y a una octava parte de la CMI de Pep19-4F.

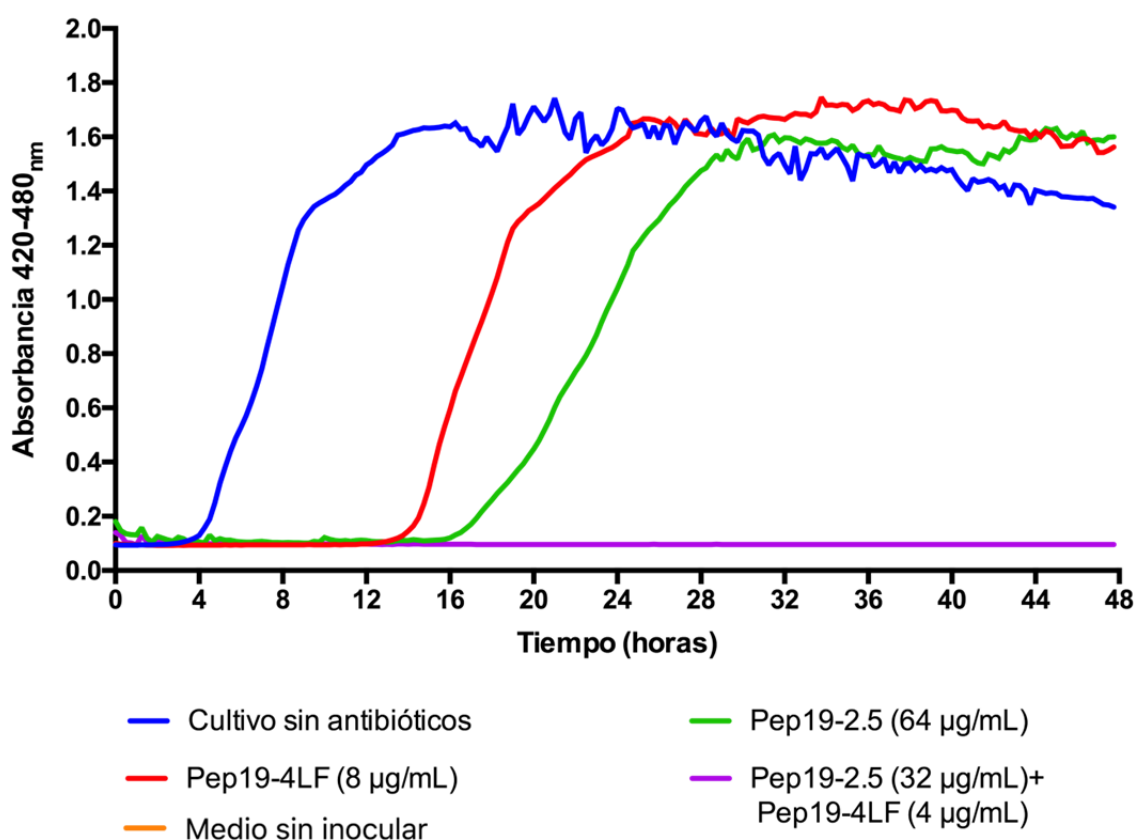
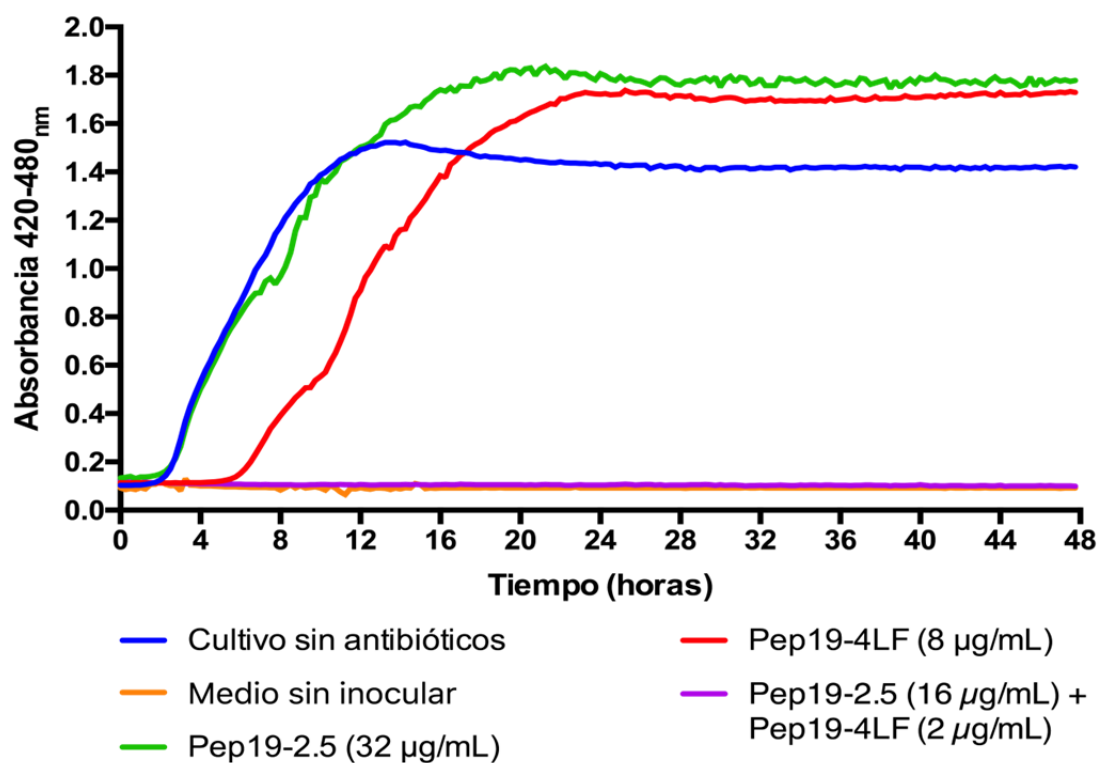


Figura 4.23: Cinética de crescimento determinada por turbidimetria (*Bioscreen C*) de *A. baumannii* 10817 (A) y *P. aeruginosa* 4158-02 Ps4 (B) en presencia de Pep19-4LF, Pep19-2.5, o la combinación de ambos a las concentraciones indicadas.

4.6 Evaluación de la capacidad anti-*biofilm* de Pep19-4LF

4.6.1. Actividad bactericida de Pep19-4LF sobre un *biofilm* pre-formado

Para estos experimentos se empleó la cepa *P. aeruginosa* 4158-02 Ps4, que había mostrado previamente una buena capacidad de formación de *biofilm* (Ferrer-Espada 2016). Además, frente esta misma cepa en fase planctónica, Pep19-4LF poseía una CMI relativamente baja (16 µg/mL) y se había mostrado capaz de actuar en sinergia con Levofloxacino (Figura 4.20). Por todo ello, para la evaluación de la actividad anti-*biofilm* se seleccionó también Levofloxacino y se estudió si Pep19-4LF mantenía su capacidad de potenciación de este antibiótico sobre células formadoras de *biofilm* de la cepa Ps4.

Los tratamientos se evaluaron sobre *biofilm* formado en condiciones de flujo turbulento en el sistema *Center for Disease Control (CDC) Biofilm Reactor (CBR)*. Una vez formados, los *biofilms* se trataron durante 24 h con los compuestos en estudio. Para poder discriminar entre sinergia y aditividad, los tratamientos seleccionados se ajustaron a una concentración 10 veces superior a su CMI planctónica cuando se administraron de forma individual y de 5 veces ese valor cuando se probaron en combinación. Los resultados revelaron una reducción en el número de bacterias viables formadoras del *biofilm* recogidas en los discos del CBR con cualquiera de los tratamientos seleccionados. Como se muestra en la Figura 4.24, la lejía fue capaz de reducir unos 11 logaritmos la viabilidad del *biofilm* de Ps4, mientras que el péptido y el levofloxacino dieron lugar a reducciones de unos 3 y 4 logaritmos, respectivamente. Sin embargo, la combinación de Pep19-4LF y Levofloxacino, -cada uno a la mitad de concentración con respecto a la terapia individual-, mostró los mejores resultados, disminuyendo en 6 logaritmos el número de bacterias viables (un millón de veces) (Figura 4.24). Para confirmar estos resultados, en ensayos paralelos se evaluó la viabilidad del *biofilm* de Ps4 mediante microscopía confocal antes y después de los tratamientos. Para ello, se trataron las muestras con fluorocromos que colorean de verde a las bacterias viables y de rojo a las células muertas (kit comercial LIVE/DEAD BacLight). Como se puede observar en la parte superior de la Figura 4.24, cuando los discos del CBR se dejaron sin tratar adquirieron color verde, lo que indica que la mayoría de células estaban vivas.

Por el contrario, los discos tratados perdieron la coloración verde y adquirieron una tonalidad roja. La falta de coloración de la muestra tratada con lejía probablemente refleja la capacidad desorganizadora y disgregadora de *biofilm* que posee este agente. Las imágenes de microscopía confocal también revelaron diferencias en el modo de actuación de Pep19-4LF y Levofloxacino. Aunque el *biofilm* tratado con el péptido resultó más disgregado, fue posible detectar una notable proporción de células vivas (verdes). Por el contrario, la acción del Levofloxacino no alteró tan visiblemente la estructura de la biopelícula, pero causó una incorporación mayor del colorante rojo, indicativa de una mayor mortalidad. Estas observaciones guardaron una buena correlación con los datos obtenidos mediante recuento de viables (Figura 4.25).

Para profundizar en el estudio del mecanismo de acción de cada tratamiento, se repitieron los experimentos anteriores añadiendo un paso intermedio, consistente en realizar un recuento de viables en el líquido obtenido del lavado de la superficie del *biofilm* pasadas 24 h de tratamiento. Con esto se pretendía evaluar la capacidad disgregadora de *biofilm* de los compuestos y compararla con su respectiva actividad bactericida. Como se muestra en la Figura 4.25, el *biofilm* sin tratar alcanzó los 15 logaritmos de viables por cm^2 de disco del CBR. El hecho de que en el lavado se recojan únicamente 9 logaritmos, indica que la estructura de la biopelícula es estable y soporta el lavado, ya que se desprende una bacteria viable por cada 106 formadoras de *biofilm*. Sin embargo, cuando los *biofilms* se exponen a los tratamientos se pueden apreciar dos tipos de efectos: en primer lugar, se reprodujo el fenómeno comentado en la Figura 4.25, es decir, la reducción altamente significativa ($p < 0,001$) de viabilidad de las bacterias formadoras de *biofilm* debida al efecto bactericida de los tratamientos. En segundo lugar, se puede concluir que la cantidad de células vivas presentes en los lavados no varía estadísticamente entre los diferentes tratamientos, pero sí la proporción con respecto al recuento de las bacterias viables formadoras de *biofilm* expuestas al mismo tratamiento. Así, en las muestras que recibían un único compuesto, las bacterias viables presentes en el lavado eran irrelevantes en relación con las presentes en forma de *biofilm* (12 logaritmos frente a 8 para Pep19-4LF; 10 logaritmos frente a 8 para Levofloxacino). Por el contrario, la biopelícula tratada con la combinación de ambos tratamientos resultó tener una cantidad similar de viables que la presente en el lavado, demostrando la mayor capacidad del tratamiento combinado para disgregar *biofilm* en comparación con el resto de tratamientos.

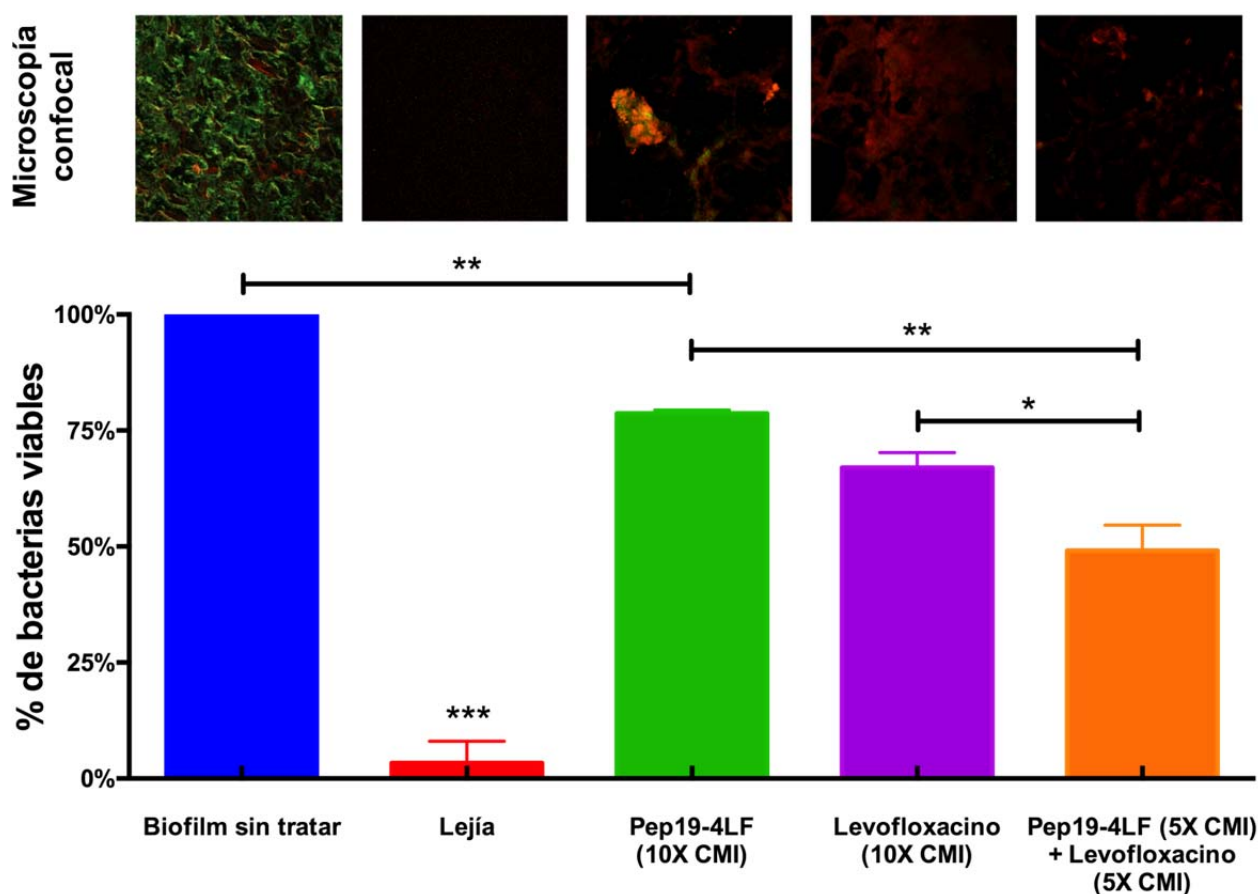


Figura 4.24: Actividad bactericida de Pep19-4LF, Levofloxacino, o la combinación de ambos a las concentraciones indicadas sobre *biofilm* de *P. aeruginosa* 4158-02 Ps4. Las CMI frente a dicha cepa es de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambos compuestos. La viabilidad se expresa como Log_{10} de UFC por cm^2 de disco. Los resultados mostrados son el promedio de 3 experimentos llevados a cabo de forma independiente, utilizando en cada experimento 3 discos por tratamiento. En la parte superior, se muestran las imágenes de microscopía confocal (X10 aumentos) de muestras representativas correspondiente a los distintos tratamientos tras su tinción con la mezcla de fluorocromos comercial SYTO 9. Estadística: ANOVA seguido de SNK: *Biofilm* sin tratar Vs Pep19-4LF (10X CMI): $p=0,002$; Pep19-4LF (10X CMI) Vs Pep19-4LF (5X CMI) + Levofloxacino (5X CMI): $p=0,005$; Levofloxacino (10X CMI) Vs Pep19-4LF (5X CMI) + Levofloxacino (5X CMI): $p=0,030$.

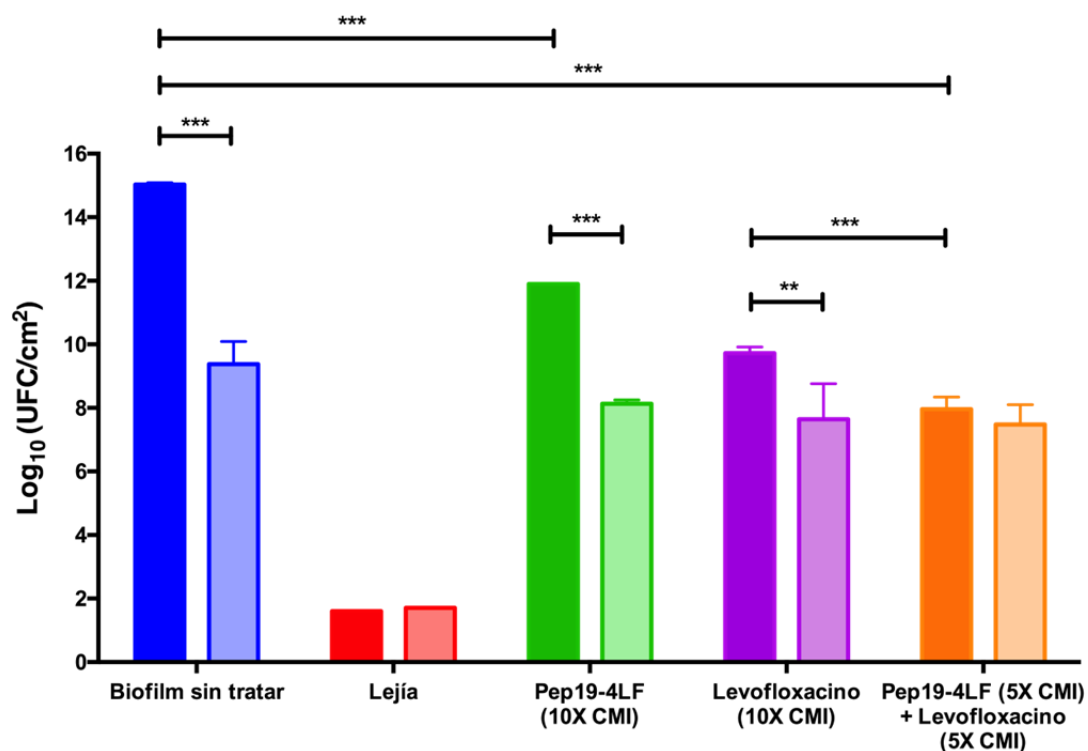


Figura 4.25: Contribución de la capacidad disgregadora de *biofilm* de Pep19-4LF y/o levofloxacino a la actividad bactericida global de cada compuesto. Bacterias viables formadoras de *biofilm* tras 24 horas de exposición al tratamiento indicado (columnas opacas, izquierda de cada pareja) y bacterias viables disgregadas presentes en el lavado correspondiente a ese mismo tratamiento (columnas traslúcidas, a la derecha) de *P. aeruginosa* 4158-02 Ps4. Se emplearon las mismas condiciones que en la Figura 4.24. Estadística: ANOVA seguido de Tamhane: En todos los casos, los tres asteriscos (***) suponen una $p < 0,001$. Bacterias viables de *biofilm* tratadas con Levofloxacino (10X CMI) Vs Bacterias viables disgregadas tratadas con Levofloxacino (10X CMI): $p = 0,003$.

4.6.2 Capacidad preventiva de la formación de *biofilm* de Pep19-4LF inmovilizado sobre una matriz polimérica

En estos experimentos se investigó si Pep19-4LF, una vez inmovilizado sobre una matriz polimérica, era capaz de impedir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* 4158-02 Ps4. Como material polimérico se utilizó el polidimetilsiloxano (PDMS), uno de los compuestos más ampliamente empleados para fabricar catéteres y otros dispositivos médicos implantables. Para caracterizar la eficacia del proceso de

inmovilización, se empleó microscopía electrónica de barrido (Figura 4.26 panel A). Esta técnica reveló que Pep19-4LF recubría de manera menos densa y homogénea la superficie del polímero comparado con el compuesto control, la colistina. A pesar de esto, ambos compuestos inmovilizados mostraron una capacidad muy similar para evitar la colonización del polímero por parte de células formadoras de *biofilm* de Ps4 (Figura 4.26 panel B). Concretamente, estos resultados demostraron que el *biofilm* formado en presencia de Pep 19-4LF o de colistina, contenía 1.000 veces menos células viables que el que se desarrolló sobre el polímero control sin el péptido. Para confirmar estos resultados, en un experimento realizado en paralelo con el anterior se cuantificó el *biofilm* unido al polímero mediante una técnica alternativa. Este método se basa en la tinción de las células formadoras de biopelícula con una solución 0,5% de safranina, seguida de disolución del colorante ligado al *biofilm* y medición de la absorbancia generada por el colorante en un espectrofotómetro (Figura 4.26 panel C). En este caso, aunque las tendencias observadas guardaron un buen paralelismo con las de la gráfica de viabilidad (panel B), las diferencias estadísticas no fueron significativas.

Para investigar el grado de estabilidad del enlace covalente entre el péptido en estudio y la superficie polimérica, se repitió el experimento mostrado en la Figura 4.26B introduciendo una incubación previa de 72 horas a 37 °C en MHCA estéril antes de la inoculación de la cepa Ps4. Los resultados obtenidos (Figura 4.27), son prácticamente idénticos a los del experimento anterior, lo que sugiere que la técnica de inmovilización empleada asegura una fijación estable de los compuestos a la matriz polimérica. Además, este experimento permitió demostrar la nula capacidad de Pep19-2.5 para inhibir la formación de *biofilm* de Ps4, al menos en las condiciones estudiadas.

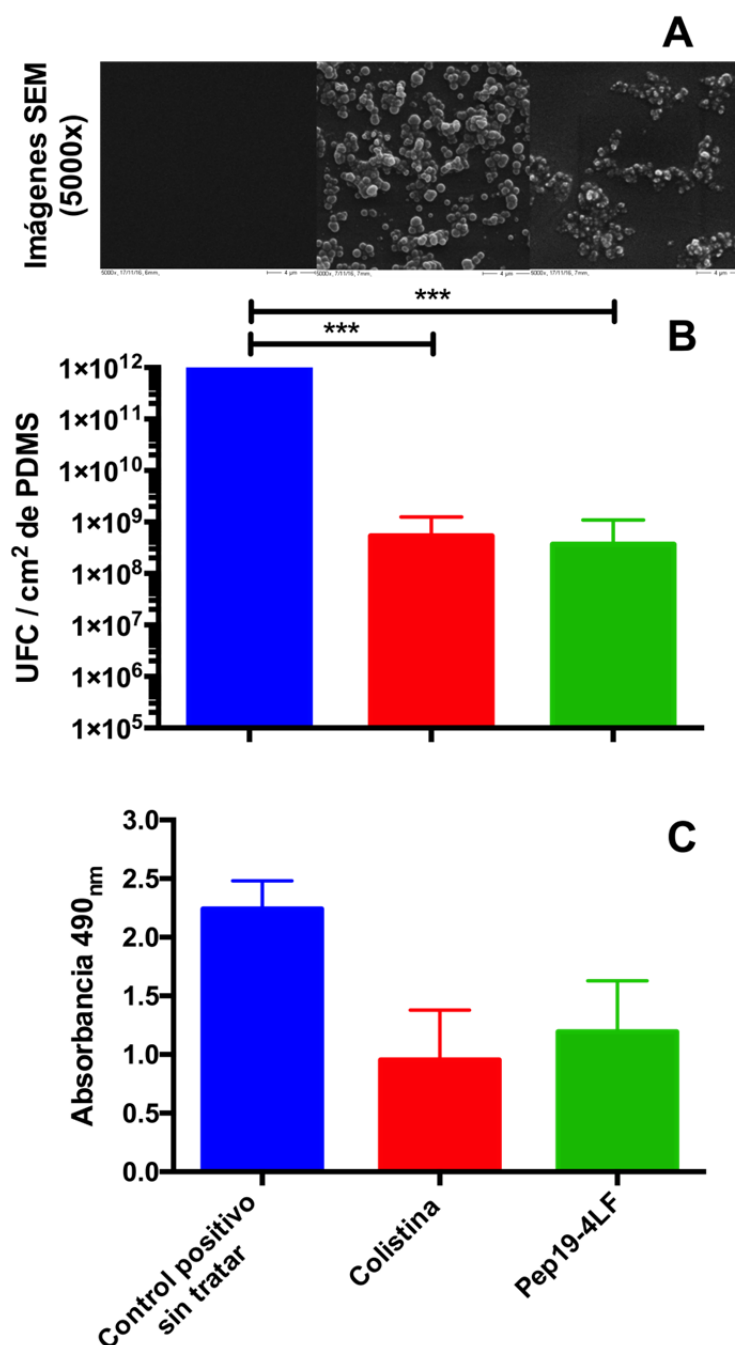


Figura 4.26. Capacidad preventiva de la formación de *biofilm* de Pep19-4LF inmovilizado sobre una matriz polimérica. A) Imágenes de microscopía electrónica de barrido (5.000 aumentos) de colistina o Pep19-4LF fijados en PDMS mediante la técnica de inmovilización con polidopamina. B) Bacterias viables (UFC/cm²) formadoras de *biofilm* recuperadas de cada uno de los tres tipos de superficies tras 24 h de incubación a 37 °C en MHCA. C) Cantidad de safranina (medida como Absorbancia a 490 nm) unida a las células formadoras de *biofilm* en cada uno de los tres tipos de superficies estudiadas. Estadística: ANOVA seguido de SNK: A) Control positivo sin tratar Vs Colistina: $p < 0,001$; Control positivo sin tratar Vs Pep19-4LF: $p < 0,001$.

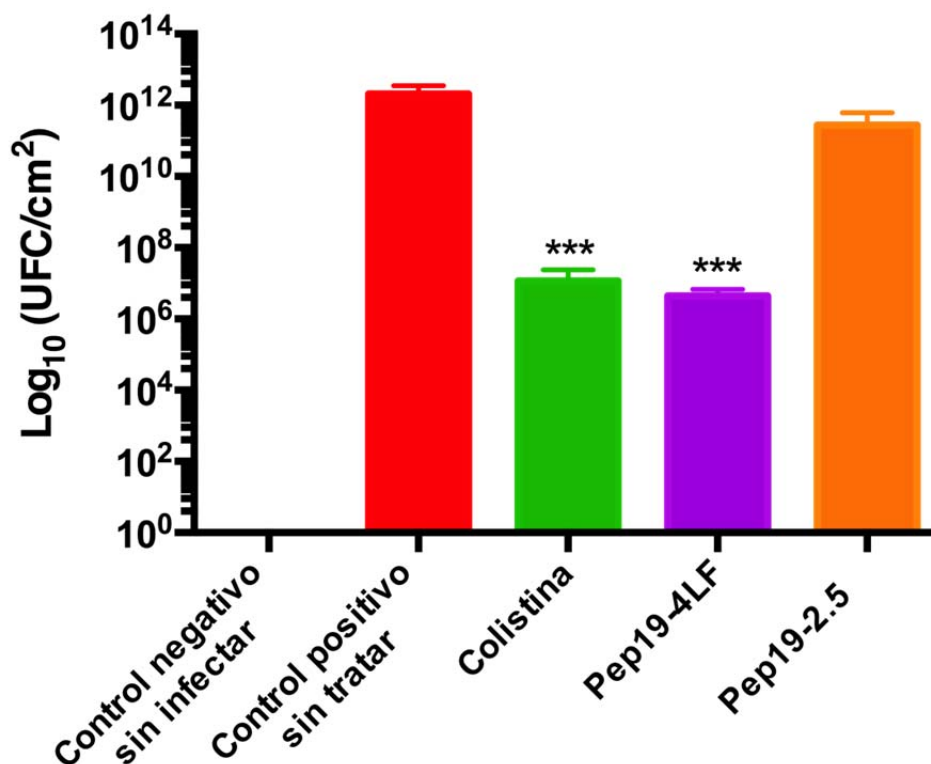


Figura 4.27. Capacidad preventiva anti-*biofilm* de Pep19-4LF en el tiempo, una vez inmovilizado sobre una matriz polimérica. Se repitió el mismo ensayo que el mostrado en la Figura 4.26B introduciendo una incubación previa de 72 horas a 37 °C en MHCA estéril antes de la inoculación de la cepa Ps4. Los resultados se expresan como bacterias viables (UFC/cm²) formadoras de *biofilm* recuperadas de cada uno de los cuatro tipos de superficies a las 24 h de incubación tras la inoculación de *P. aeruginosa* 4158-02 Ps4. Estadística: ANOVA seguido de SNK. Tanto el grupo de la Colistina como de Pep19-4LF mostraron diferencias (***) de $p < 0,001$ con respecto al resto de grupos, sin mostrar diferencias entre ambos.

A continuación, se inmovilizó una solución que contenía una combinación de Pep19-4LF y Pep19-2.5 sobre una misma superficie polimérica y se investigó si los compuestos actuaban en sinergia para inhibir la formación de *biofilm* de Ps4. Paralelamente, también se evaluó de la misma manera la capacidad de Pep19-4LF para actuar en sinergia con colistina. En ninguno de los dos casos se demostró la existencia de potenciación alguna (resultados no mostrados).

4.7 Estudio de la actividad neutralizante de LPS de Pep19-4LF en modelo de endotoxemia murino

A la vista de la mejor capacidad antibiótica y anti-*biofilm* de Pep19-4LF, así como su actividad potenciadora de antibióticos, se decidió evaluar si este compuesto tenía una capacidad antiendotóxica comparable a la de Pep19-2.5. Para ello, primero se investigó en un modelo murino si la administración de una única dosis de Pep19-4LF era capaz de proteger frente a la endotoxemia.

Como se muestra en la Figura 4.28, mientras el 100 % de los animales no tratados morían antes de las 24 h, todos los ratones que recibieron el péptido inmediatamente después de ser inoculados con LPS sobrevivieron 48 h. Esta protección se redujo al 60% a las 96 h. Cuando el tratamiento se administró 30 ó 60 min después de la inoculación del LPS, la eficacia terapéutica descendió proporcionalmente al tiempo de retraso. Aunque todos los ratones que recibieron el péptido tras un lapso de 30 min respecto al LPS acabaron muriendo, se detectó una extensión del tiempo de supervivencia muy significativa (14 h aproximadamente) en comparación con el grupo control sin tratar. Por el contrario, la administración de un único *bolus* (1:1) de Pep19-4LF 1 h después del LPS no tuvo ningún efecto terapéutico detectable.

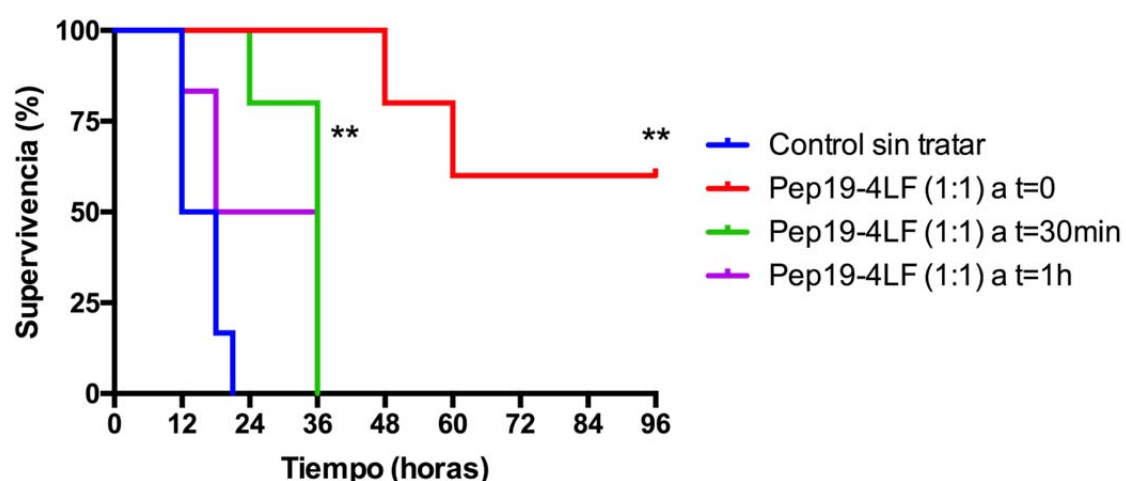


Figura 4.28: Cinética de mortalidad de ratones Balb/C de 20 gramos (n=6) inoculados intraperitonealmente con 400 μ g/ratón de LPS de *Salmonella enterica minnesota* serovar Minnesota R60/SF1114 y tratados con la misma cantidad de Pep19-4LF por vía intraperitoneal a los tiempos indicados. Estadística: Kaplan-Meier.

Para comparar la eficacia terapéutica de Pep19-4LF con la de Pep19-2.5, se repitió el experimento tratando a los animales a $t=0$ y $t=30$ min con los dos compuestos (Figuras 4.29 y 4.30, respectivamente). El primer experimento permite concluir que Pep19-4LF protege mejor a los ratones que Pep19-2.5 cuando se administra simultáneamente al LPS ($p=0,008$ Vs. $p=0,038$), respectivamente, respecto al grupo control no tratado). No obstante, cuando se compararon entre sí las gráficas de los péptidos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,19$). Por otra parte, la comparación de las Figuras 4.28 y 4.29 permitió comprobar la buena reproducibilidad del modelo murino de endotoxemia, ya que Pep19-4LF administrado a $t=0$ mostró en ambos experimentos una eficacia muy similar

Finalmente, cuando se comparó la protección que los dos péptidos proporcionaban al administrarlos 30 minutos tras el LPS (Figura 4.30), Pep19-2.5 resultó ser terapéuticamente superior a Pep19-4LF, pese a que todos los animales tratados con los péptidos acabaron muriendo. En este caso, sí se demostró la existencia de diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de tratamiento, al igual que entre cualquiera de los tratamientos y el grupo control.

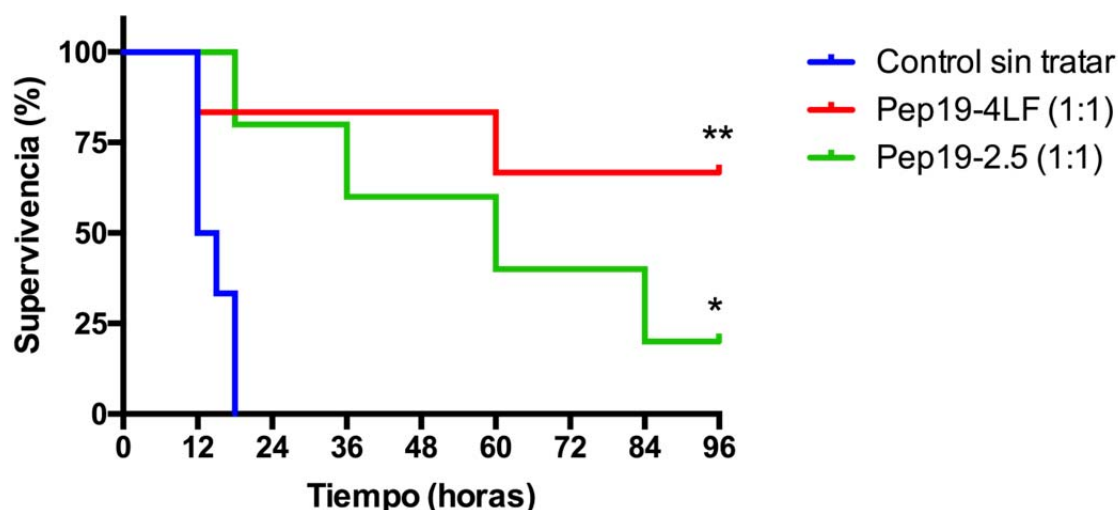


Figura 4.29: Cinética de mortalidad de ratones Balb/C de 20 gramos ($n=6$) inoculados intraperitonealmente con $400 \mu\text{g}/\text{ratón}$ de LPS de *Salmonella enterica minnesota* serovar Minnesota R60/SF1114 y tratados con la misma cantidad de Pep19-4LF o Pep19-2.5 por vía intraperitoneal inmediatamente después. Estadística: Kaplan-Meier.

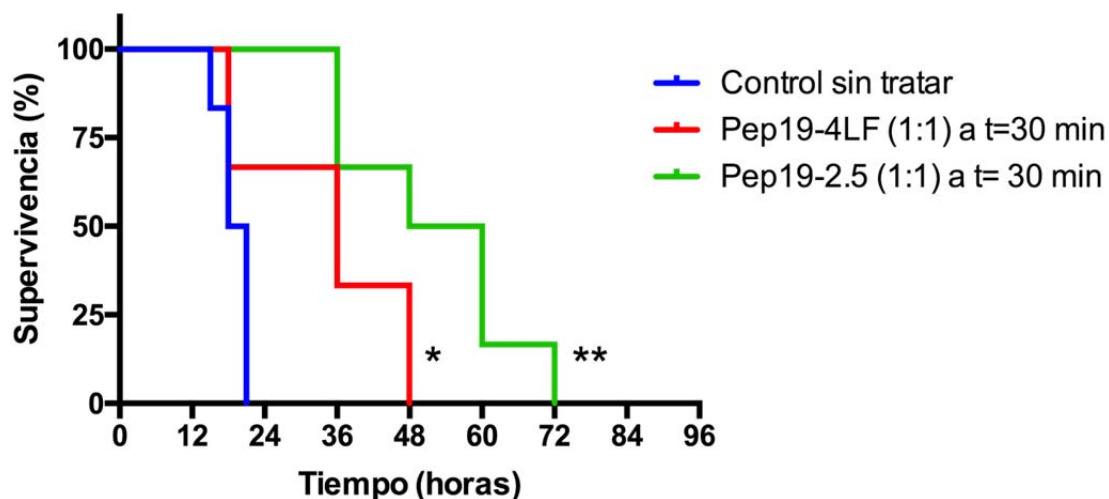


Figura 4.30: Cinética de mortalidad de ratones Balb/C de 20 gramos (n=6) inoculados intraperitonealmente con 400 μ g/ratón de LPS de *Salmonella enterica minnesota* serovar Minnesota R60/SF1114 y tratados a los 30 min con la misma cantidad de Pep19-4LF o Pep19-2.5 por vía intraperitoneal. Estadística: Kaplan-Meier.

5. Discusión

5.1 Evaluación de la efectividad de Pep19-2.5 en combinación con tratamiento antibiótico en modelo de sepsis en conejos

En el presente trabajo se ha demostrado que el AMP Pep19-2.5 actúa en sinergia con el antibiótico ceftriaxona para prevenir o revertir patologías asociadas a la sepsis en un modelo de bacteriemia en conejos. Por un lado, dicha actividad sinérgica quedó patente en la capacidad de la terapia combinada para reducir la carga bacteriana en sangre de manera mucho más rápida que el tratamiento antibiótico por sí mismo (Figura 4.3). Además, los animales que recibieron la terapia combinada mostraron niveles de IL-6 incluso por debajo de los del grupo sin tratar, algo que no sucedió con los animales tratados sólo con el péptido (Figura 4.5A). No obstante, la demostración más evidente de la actividad sinérgica del tratamiento combinado fue su capacidad para revertir la hipotermia causada por la infección, restableciendo la temperatura de los animales al final del ensayo a valores fisiológicamente normales (Figura 4.9).

Nuestra hipótesis es que la actividad sinérgica detectada es debida a la combinación de la potente capacidad bactericida de la ceftriaxona y a la eficacia de Pep19-2.5 para neutralizar los efectos patológicos de la endotoxina bacteriana y de otros PAMPs. En apoyo de esta hipótesis, nuestro grupo de investigación ha demostrado que Pep19-2.5: 1, inhibe de una manera dosis-dependiente la actividad pro-inflamatoria *in vitro* de la endotoxina de *S. enterica* minnesota, así como la de las lipoproteínas OspA y OspC de *Borrelia burgdorferi* y la de las proteínas de membrana externa P6 y H8 de *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*, respectivamente (Martínez de Tejada y col. 2015); 2, se une con gran afinidad a células completas inactivadas por calor de *S. enterica* minnesota de forma directamente proporcional a la dosis (Heinbockel y col. 2013); 3, se asocia de modo dosis-dependiente a la endotoxina de *S. enterica* minnesota mediante un proceso exotérmico que se satura a una relación molar [Pep19-2.5]:[LPS] = 0.3 (Gutsmann y col. 2010); 4, protege frente al choque endotóxico letal con gran eficacia a ratones inoculados intraperitonealmente con LPS de *S. enterica* minnesota (Heinbockel y col. 2013).

Previamente al presente trabajo, nuestro grupo también demostró que Pep19-2.5 coopera *in vivo* con antibióticos (incluida la ceftriaxona) protegiendo a ratones frente a

la sepsis causada por *S. enterica* minnesota en un modelo de infección intraperitoneal (Heinbockel y col. 2013). Dicha protección no se observaba en los grupos tratados con los dos componentes de la combinación por separado. No obstante, en el citado trabajo solo fue posible detectar una acción terapéutica aditiva -no sinérgica- de los dos componentes de la combinación.

La capacidad de muchos AMPs para desestabilizar membranas bacterianas y potenciar la actividad antimicrobiana de antibióticos convencionales *in vitro* e *in vivo* es bien conocida desde hace años (Vaara y Vaara 1983; Ofek y col. 1994). Sin embargo, en el caso de Pep19-2.5 parece improbable que su eficacia terapéutica en combinación con ceftriaxona sea debida a tal tipo de potenciación, ya que nuestro grupo demostró que este péptido, como antimicrobiano, es incapaz de actuar en sinergia ni con ceftriaxona ni con otros antibióticos de uso clínico (Heinbockel y col. 2013). La evidencia presentada en ese mismo trabajo sugiere que Pep19-2.5 actúa de manera aditiva con dichos antimicrobianos frente a *S. enterica* minnesota.

El mecanismo por el que Pep19-2.5 se une al LPS y neutraliza los efectos pro-inflamatorios de esta molécula se ha caracterizado en detalle a nivel molecular (Kaconis y col. 2011, Guttsman y col. 2010; Heinbockel y col. 2013). La unión del péptido al LPS consta de una interacción inicial de carácter electrostático que implica a los aminoácidos básicos del péptido (arginina y lisina) y a las cargas negativas del LPS (fosfatos, carboxilatos). A continuación, tiene lugar una interacción hidrofóbica entre la región C-terminal del péptido (FWFWG) y los ácidos grasos del lípido A del LPS. Esta interacción provoca cambios moleculares que incluyen una fluidización de las cadenas hidrocarbonadas del LPS y un cambio de conformación de los agregados de LPS, que pasan de una orientación en bicapa a una disposición multilaminar. Existe evidencia de que, una vez que adopta esta nueva conformación, la endotoxina es incapaz de interactuar con las proteínas del sistema inmunitario implicadas en su reconocimiento, como la LBP (*LPS binding protein*) o el complejo TLR4-MD2 (Heinbockel y col. 2014).

Con independencia de la actividad sinérgica detectada en los casos mencionados más arriba (reducción de la bacteriemia, inhibición de IL-6, reversión de la hipotermia), el presente trabajo puso de manifiesto en otras ocasiones la existencia de cooperatividad

entre la actividad terapéutica de Pep19-2.5 y la ceftriaxona. En estos últimos casos, el efecto observado se podía asignar claramente a uno de los dos componentes de la combinación. Por ejemplo, el responsable de la reducción de la carga bacteriana en sangre (Figura 4.3) y en los distintos órganos (Figura 4.10) fue claramente el antibiótico, ya que el péptido careció de actividad bactericida *in vivo*. Este hecho no es de extrañar a la vista de la modesta CMI de Pep19-2.5 frente a la cepa usada para las inoculaciones experimentales (CMI= 128 µg/mL). Por su parte, el péptido fue el componente responsable de neutralizar la actividad pro-inflamatoria de la endotoxina (Figura 4.4) y, en consecuencia de inhibir la producción de las citoquinas pro-inflamatorias estudiadas: la IL-6 (Figura 4.5A) y el TNF- α (Figura 4.5B). Del mismo modo, la menor afectación anatómo-patológica del bazo (Tabla 4.1) se asoció con la presencia de Pep19-2.5 en la combinación, pues el grupo tratado con los dos componentes no se distinguió significativamente del que recibió sólo el péptido.

La reducida eficacia del tratamiento actual contra la sepsis podría deberse en parte a que los antibióticos convencionales promueven la liberación de toxinas inductoras de inflamación (LPS, LPTs) cuando interactúan con las envolturas bacterianas (Lepper y *col.* 2002), lo que puede amplificar la respuesta pro-inflamatoria en el paciente. Precisamente, este fenómeno es claramente apreciable en el presente trabajo, ya que los animales tratados con ceftriaxona tenían niveles de agonistas de TLR4 (endotoxina con toda probabilidad; Figura 4.4), así como de IL-6 (Figura 4.6A) y TNF- α (Figura 4.6B), mucho mayores que los animales no tratados. En este contexto, el hecho de que Pep19-2.5 sea capaz de contrarrestar totalmente la actividad pro-inflamatoria de la ceftriaxona cuando se asocia a este antibiótico (Figura 4.4, Figura 4.6A y Figura 4.6B) es una de las observaciones más importantes del presente trabajo. A la vista de lo anterior, nuestros resultados sugieren que la combinación de un antibiótico de amplio espectro con un agente neutralizante de PAMPs, como Pep19-2.5, es una estrategia prometedora para el desarrollo de futuras terapias frente a la sepsis.

Por otra parte, la liberación de endotoxina por parte de bacterias tratadas con antibiótico es un efecto bien documentado tanto *in vitro* (Cohen y McConnell 1986), como *in vivo* en ratones (Sawa y *col.* 1998), ratas (Giacometti 2002) y conejos (Lin y *col.* 1996). La administración de AMPs de forma individual o en combinación con antibióticos ha demostrado reducir los niveles de LPS y compensar el efecto adverso

asociado al uso de antibióticos, dando lugar a una mayor supervivencia en distintos modelos de roedores (Ghiselli y col. 2002; Giacometti y col. 2003; Murakami y col. 2009). Asimismo, en conejos se demostró el efecto beneficioso de la polimixina B por sí misma frente a la endotoxemia (Corrigan y Bell 1971) o septicemia (Corrigan y Kiernat 1979; Flynn y col. 1987).

En lo referente a combinaciones de AMPs y antibióticos, un estudio (Lin y col. 1996) documentó la capacidad del compuesto *bactericidal/permeability-increasing protein* (BPI) combinado con cefamandol para prevenir la disfunción cardiopulmonar, acelerar la desaparición de la bacteriemia y proteger de la muerte a conejos infectados experimentalmente con *E. coli*. Sin embargo, en este trabajo el antibiótico se administró previamente a la infección, a diferencia de en nuestro trabajo. Por último, otro grupo publicó que una proteína recombinante neutralizante de endotoxina (ENP) de *Limulus polyphemus*, combinada con antibióticos prolongaba la supervivencia en un modelo de sepsis por peritonitis en conejos (Saladino y col. 1994, 1996).

Una característica especialmente atractiva de Pep19-2.5 es su capacidad para neutralizar no sólo la endotoxina y otros PAMPs de bacterias gramnegativas, sino también componentes estructurales de grampositivos inductores de la sepsis. Así, en un reciente trabajo, nuestro grupo demostró que Pep19-2.5 también neutraliza *in vitro* la lipoproteína SitC de *Staphylococcus aureus*, la lipoproteína FSL-1 de *Mycoplasma salivarium*, los ácidos lipoteicoicos y el peptidoglicano de *S. aureus* (Martínez de Tejada y col. 2015). Asimismo, en ese mismo trabajo se demostró que Pep19-2.5 protege eficazmente a ratones contra una toxemia letal causada por la inoculación intraperitoneal de FSL-1 (resultados obtenidos y mostrados en el presente trabajo). Finalmente, otros autores han demostrado que Pep19-2.5 contrarresta *in vitro* la actividad pro-inflamatoria de DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns* o “alarminas”), como el heparán sulfato (Martin y col. 2015). Este péptido es el primer compuesto que demuestra poseer capacidad para neutralizar tanto PAMPs como DAMPs, lo que refuerza el atractivo de este tipo de AMPs como base para el desarrollo de agentes antiinflamatorios de amplio espectro frente a la sepsis.

Nuestro modelo evidenció alteraciones metabólicas en los animales, como la hiperglicemia, hiperlactatemia y leucopenia (Figuras 4.7 y 4.8A), concordantes con

otros estudios previos en modelos de sepsis en conejo (Lin y col. 1996; Camerota y col. 1998). Estos síntomas son también característicos de la sepsis en el ser humano (Nemzek y col. 2008; Angus 2013). En los citados estudios, los tratamientos experimentales consiguieron reducir tanto los niveles de glucosa como de lactato, a diferencia de nuestro caso. Sin embargo, es muy posible que la mayor eficacia observada en los trabajos previos se deba a que los tratamientos se administraban antes de la infección o mediante infusión continua, mientras que en nuestro estudio se administró un único *bolus* inmediatamente después de la infección.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones. Por un lado, el modelo de bacteriemia aguda empleado no refleja el desarrollo progresivo de una infección real, ni la interrelación entre los distintos estímulos antigénicos y los componentes del sistema inmune característicos de un proceso infeccioso. Existen, por el contrario, otros modelos quirúrgicos tales como el de la ligación cecal y punción (CLP) que están más cercanos a la realidad clínica de un proceso séptico. Sin embargo, el modelo CLP es técnicamente complejo y emplea un inóculo polimicrobiano con una composición totalmente aleatoria en cada ensayo. Esto con frecuencia aumenta la variabilidad intragrupal y dificulta la reproducibilidad de los experimentos (Schabbauer 2012). Por estas razones, se optó por el modelo de inoculación intravenosa de células viables de *S. enterica*, que asegura una infección controlada y muy reproducible con una cepa conocida y bien caracterizada. Además, este modelo tiene en cuenta que un tercio de los pacientes de sepsis presenta hemocultivos positivos (Angus 2013).

Otra importante limitación de nuestro estudio fue la reducida duración del experimento (6 horas), que impidió hacer un seguimiento más largo y detallado de las patologías asociadas a la sepsis. A su vez, este hecho también imposibilitó conocer el efecto terapéutico a medio-largo plazo de los tratamientos y evaluar su capacidad protectora frente a la muerte debida a sepsis. Sin embargo, la mencionada limitación es la consecuencia de la aplicación de uno de los criterios éticos que rigen la experimentación animal: el principio de refinamiento (Franco y Olsson 2014). Una mayor duración del experimento hubiera expuesto a un severo sufrimiento a los animales. Por otro lado, la normativa actual que regula los experimentos con animales establece que debe evitarse el empleo de la muerte del animal como criterio de punto final (Stokes 2002; Directiva 2010/63/UE).

Este trabajo es la primera evidencia de la capacidad de un AMP para inactivar la endotoxina en conejos (Figura 4.4), neutralizando la producción de citoquinas proinflamatorias (Figura 4.6) y revertiendo una hipotermia a valores fisiológicamente normales (Figura 4.9). Nuestros resultados sugieren también que Pep19-2.5 y ceftriaxona son capaces de actuar en sinergia para combatir varias alteraciones patológicas (Figura 4.3; Figura 4.6A). Si se tiene en cuenta, además, que los tratamientos se administraron en forma de un único *bolus*, es previsible que una estrategia de infusión constante pueda dar lugar a efectos terapéuticos más pronunciados. Dado que nuestro grupo ha demostrado en un modelo murino que Pep19-2.5 actúa en sinergia con ibuprofeno y protege frente a una endotoxemia letal (Heinbockel y *col.* 2015), sería interesante evaluar la eficacia de un tratamiento triple basado en terapia antibiótica, Pep19-2.5, y un antiinflamatorio no esteroideo.

Sin embargo, es preciso destacar el problema que la administración del *bolus* de Pep19-2.5 supuso durante la puesta a punto del modelo. Dos conejos sufrieron una muerte súbita segundos después de recibir una dosis de 10 mg/Kg de Pep19-2.5 por vía intravenosa (el doble de lo que finalmente se administró). La posterior evaluación *post-mortem* sugería una obstrucción del riego sanguíneo, causando el consecuente infarto. Es importante mencionar que los conejos habían recibido inmediatamente antes, además, la dosis de $3,7 \times 10^9$ UFCs, con lo que la afinidad de este AMP por el LPS bacteriano podría haber favorecido la agregación. Es preciso recordar que en estudios toxicológicos previos, la mayor dosis con la cual no se apreciaban efectos adversos era de 20 mg/Kg, pero en estos estudios se administraba únicamente el AMP, sin presencia de bacteriemia. Para solventar este problema, se decidió reducir la dosis de Pep19-2.5 a la mitad (5 mg/Kg), pese a mantener la administración en *bolus* por viabilidad experimental. De esta forma, no se reportó ningún efecto adverso en los animales.

5.2 Estudio de estabilidad y biodistribución de Pep19-2.5

Los resultados de incubación de Pep19-2.5 en presencia de cantidades crecientes de suero (Figura 4.15) sugieren que el péptido es muy sensible a las proteasas sanguíneas. Esta hipótesis concuerda con ensayos publicados por nuestro grupo

empleando un modelo murino de endotoxemia (Heinbockel y col. 2013). En estos experimentos se observó que Pep19-2.5 no era capaz de proteger de la muerte por endotoxemia cuando se inoculaba a los ratones 30 minutos antes que el LPS. En cambio, la acción terapéutica del péptido fue excelente cuando se inoculó inmediatamente después de la endotoxina. Dicha protección se mantuvo a buen nivel incluso cuando la administración del tratamiento con Pep19-2.5 se difirió 30 minutos.

La sensibilidad a las proteasas es una característica habitual de muchos AMPs (Sánchez-Gómez y Martínez de Tejada 2017) que limita en parte su uso terapéutico. Para proteger a los péptidos de la degradación proteolítica y prolongar su vida media en la sangre se han propuesto distintas estrategias entre las que destacan las siguientes: i, la encapsulación en nanopartículas u otros vehículos similares (Brandelli 2012; Li y col. 2016; Brandenburg y col. 2011); ii, la síntesis de péptidos constituidos por D-aminoácidos en vez de L-aminoácidos (Huang y col. 2014); iii, la producción de derivados cíclicos (Andra y col. 2007) y iv, el empleo de moléculas sintéticas que mimetizan a los péptidos (compuestos “peptidomiméticos”), como los ácidos péptidonucleicos (*peptide nucleic acids* (PNAs), los peptoides (*peptoids*) o los β -péptidos (Vaara 2009).

Por otro lado, la facilidad de degradación *in vivo* de un determinado compuesto puede tener implicaciones positivas para su potencial uso terapéutico. Este es el caso de sustancias naturales como Pep19-2.5 y muchos otros AMPs, cuya digestión por proteasas genera solo aminoácidos fácilmente metabolizables. Además, la corta vida media de Pep19-2.5 no debería ser un problema, pues es previsible que este tipo de compuestos se administren no en forma de *bolus*, sino mediante infusión por vía intravenosa. Precisamente, nuestro grupo y otros han demostrado que, inoculado de esta manera en ratones, Pep19-2.5 inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias más eficazmente que el compuesto de referencia, la polimixina B (Heinbockel y col. 2013; Martin y col. 2015).

Alternativamente a la hipótesis anterior, la progresiva desaparición de Pep19-2.5 mostrada en la Figura 4.15 podría deberse, no a una degradación proteolítica, sino a una absorción a proteínas de bajo peso molecular presentes en el suero. Esta segunda hipótesis, que no excluye a la anterior, también explicaría que un aumento en la

cantidad de suero añadida se tradujera en una desaparición más rápida del péptido. En concordancia con esta segunda hipótesis, los resultados mostrados en la Figura 4.16 indican que Pep19-2.5 puede adsorberse a proteínas de la sangre y convertirse en indetectable en este ensayo. Precisamente, es conocido que la corta vida media en sangre de los AMPs es debida -además de a proteólisis- a adsorción a proteínas séricas tales como la BSA (Svenson y *col.* 2007). Para poder demostrar cuál de las dos hipótesis es correcta, se podría repetir el ensayo mostrado en la Figura 4.15 en presencia de inhibidores de proteasas y estudiar si en estas condiciones se evita la desaparición de Pep19-2.5.

Finalmente, no se puede descartar que Pep19-2.5 pueda agregarse en presencia de ciertos componentes biológicos, tales como los que se encuentran en el suero. Esta aparente agregación explicaría los dos casos de muerte repentina en la puesta a punto del modelo de bacteriemia en conejos. Tal y como se ha comentado, esto fue achacado a la posible agregación de Pep19-2.5, tanto entre sí como entre componentes presentes en la sangre y las bacterias inyectadas. Se ha descrito que algunos AMPs tienen tendencia a agregarse *in vivo*, lo que disminuye su bio-disponibilidad (Chi y *col.* 2003; Maes y *col.* 2014). Con independencia de su posible tendencia a agregar, la presencia de un residuo cisteína en la secuencia de Pep19-2.5 facilita la formación de dímeros en este compuesto (Walter Mier y Klaus Brandenburg, comunicación personal).

Con anterioridad al marcaje directo con ^{14}C , se intentaron sin éxito otras estrategias para analizar la biodistribución de Pep19-2.5. Primero se recurrió a un marcaje radiactivo indirecto mediante el uso del quelante DOTA (ácido 1, 4, 7, 10 - tetraazaciclododecano - 1, 4, 7, 10 - tetraacético) marcado con el isótopo radioactivo Galio-68 (^{68}Ga). A continuación, el complejo se unió covalentemente al péptido. Este método no resultó útil debido al gran tamaño relativo del complejo ^{68}Ga -DOTA, que modificó la afinidad del péptido y, por tanto, su biodistribución. Por el contrario, el marcaje directo con ^{14}C proporcionó resultados muy fiables.

En relación con los resultados de biodistribución de ^{14}C -Pep19-2.5 (Figuras 4.17 y 4.18), el resultado más inesperado fue la baja permanencia en la sangre del péptido tras su inoculación intravenosa. Aparentemente, la elevada capacidad de unión y agregación de Pep19-2.5 lo hace prácticamente indetectable en sangre. Aunque en

estudios similares se ha determinado una permanencia en sangre para la polimixina B tan corta como la de Pep19-2.5 (Manchandani y *col.* 2016), ambas moléculas difieren mucho en su biodistribución. Así, mientras la polimixina B (con un peso molecular de 1.400 Da) muestra alta afinidad por los riñones, Pep19-2.5 (2711 Da) tiene un elevado tropismo por el tejido hepático. En este sentido, se ha descrito que los compuestos orgánicos hidrofílicos y de pequeño tamaño se suelen excretar por los riñones, mientras que las sustancias de mayor tamaño molecular y de características anfipáticas son metabolizadas en el hígado (Seo y *col.* 2012).

Por otra parte, sería interesante estudiar cómo se distribuye Pep19-2.5 en animales que estén sufriendo una infección activa o en los que se haya inyectado endotoxina u otro PAMP purificado por vía intravenosa. Es posible que, debida a la alta afinidad de este AMP por el LPS, en esas circunstancias se modificara la biodistribución del péptido y que aumentara su permanencia en sangre, especialmente si los animales tienen bacteriemia (Brouwer y *col.* 2008).

5.3 Caracterización pre-clínica del péptido Pep19-4LF

Como se comentó en la sección de Resultados, Pep19-2.5 resultó tener un índice terapéutico bajo debido a su significativa toxicidad. Para abordar este problema, el péptido se encapsuló en nanopartículas de seroalbúmina humana con la colaboración del Dr. Juan Manuel Irache del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Navarra. El péptido encapsulado de esta manera mantuvo una elevada capacidad para neutralizar la endotoxina bacteriana y mostró una baja actividad hemolítica (Heinbockel y Brandenburg, resultados no publicados). Sin embargo, debido a los sobrecostos que implicaba la nueva formulación, se interrumpieron los estudios pre-clínicos con Pep19-2.5 y se continuó con un nuevo candidato, el péptido Pep19-4LF. No obstante, el desarrollo de Pep19-2.5 para uso tópico en el tratamiento de infecciones de la piel continúa muy activo (Pfalzgraff y *col.* 2016, 2017).

En estudios *in vitro* publicados por otros autores, Pep19-4LF había demostrado una buena capacidad para neutralizar la producción de citoquinas dependiente de LPS

en células mononucleares sanguíneas (Brandenburg y col. 2016). Asimismo, Pep19-4LF fue capaz de antagonizar *in vitro* la actividad pro-inflamatoria de la lipoproteína FSL-1 de *Mycoplasma salivarium* con una potencia muy similar a la de Pep19-2.5 (Pfalzgraff y col. 2016). Sin embargo, se desconocía si Pep19-4LF podía unirse a la endotoxina o a otros PAMPs en la ubicación natural de estas moléculas, es decir formando parte de la envoltura bacteriana. Pese a que los dos compuestos mostraron un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Tabla 4.2), los valores de CMI y CMB demostraron que, en términos generales, Pep19-4LF es, al menos, cuatro veces más potente que Pep19-2.5. Sin embargo, la observación más interesante de este estudio fue la demostración de que Pep19-4LF actúa con una potencia similar frente a gramnegativos y grampositivos. Si bien Pep19-4LF presenta MICs más altas (peores) que otros AMPs -como las polimixinas- frente a gramnegativos, estos últimos compuestos no son activos frente a grampositivos (Garidel y Brandenburg 2009; Fernandez y col. 2012). Por el contrario, otro AMP, el lipopéptido daptomicina, resulta eficaz sólo frente a infecciones causadas por bacterias grampositivas. Nuestra hipótesis es que el amplio espectro de actividad de Pep19-4LF es probablemente consecuencia de su capacidad para unirse a PAMPs distintos del LPS, como las LPTs. Este hecho está de momento demostrado con Pep19-2.5 (Martínez de Tejada y col. 2015), pero es muy posible que Pep19-4LF comparta esta característica con el péptido del que deriva.

La identificación de péptidos antimicrobianos con amplio espectro de actividad antimicrobiana no es un hecho novedoso. Por ejemplo, es conocido que ciertos péptidos naturales como la indolicidina (Selsted y col. 1992), las protregrinas (Bolinteanu y Kaznessis 2011) o las magaininas (Berkowitz y col. 1990), entre otros, poseen esa característica. Otros péptidos sintéticos también han demostrado tener un excelente espectro de acción antibacteriana (Rathinakumar y col. 2009), (Martínez de Tejada y col. 2012). No obstante, la originalidad de Pep19-4LF no radica sólo en la posesión de un espectro amplio de actividad antimicrobiana, sino en que este compuesto combina dicha propiedad con la posesión de una potente capacidad antiendotóxica (ver más adelante).

La comparación directa de las secuencias de Pep19-4 (GKKYRRFRWKFKGKWFVFG) y Pep19-4LF (GKKYRRFRWKFKGLFLVFG), permite deducir que la sustitución del grupo WFWF por LFLV en el extremo C-terminal

mejora la actividad antibacteriana por lo general en un factor de 4 a 16 (Gustmann y *col.* 2010). El mismo fenómeno se puede observar cuando se hace una comparación entre las secuencias de los péptidos equivalentes Pep19-2.5 y Pep19-2.5LF (Sánchez-Gómez, Martínez de Tejada y Brandenburg, resultados no publicados). Por tanto, es muy probable que la mejor actividad antimicrobiana de Pep19-4LF con respecto a Pep19-2.5 se deba también a que el primero posee una secuencia LFLF en su extremo C-terminal, mientras que el segundo presenta el grupo FFWW en esa posición. Nuestra hipótesis es que la presencia de este último grupo, formado por aminoácidos muy voluminosos y de la misma familia (con radicales aromáticos) supone un impedimento estérico que dificulta la correcta interacción del péptido con su diana molecular en la envoltura bacteriana. A la vista de la similar actividad neutralizante de LPS purificado que tienen ambos péptidos, es de esperar que dicho impedimento no exista cuando Pep19-2.5 interactúa con endotoxina libre.

La Tabla 4.2 permite también observar que la actividad antimicrobiana de Pep19-4LF no resulta afectada por la presencia de cualquiera de los mecanismos de resistencia antimicrobiana expresada por las cepas en estudio (Tabla 3.1). De hecho, en la gran mayoría de casos Pep19-4LF fue igual de activo frente a la cepa sensible a los antibióticos (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606) que frente al organismo multi-resistente de la misma especie (*P. aeruginosa* Ps4, *E. coli* E20, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Acinetobacter baumannii* 10817). Incluso en el caso de las cepas de *S. aureus*, el péptido mostró una actividad bactericida mucho más potente sobre las cepas multi-resistentes que sobre la cepa sensible a los antibióticos.

Precisamente, la capacidad de los AMPs para retener su actividad antimicrobiana frente a cepas multi-resistentes es una de las propiedades más atractivas de estos compuestos. A nivel molecular, este hecho depende del peculiar mecanismo de acción de los AMPs, que implica una interacción con dianas muy conservadas de la envoltura bacteriana (LPS, LPTs, fosfatidilglicerol, cardiolipina), que permanecen invariables con independencia del perfil de susceptibilidad a los antibióticos de una determinada cepa. Uno de los pocos mecanismos que puede conferir resistencia cruzada tanto a antibióticos como a AMPs es la sobre-expresión de bombas *efflux* como RosA/RosB de *Yersinia* (Bengoechea y Skurnik 2000). Estos sistemas son capaces de

reconocer y de expulsar al exterior una enorme variedad de sustancias perjudiciales para el microorganismo incluyendo AMPs y antibióticos.

Nuestros resultados demuestran por primera vez la capacidad de Pep19-4LF y, en menor medida de Pep19-2.5, para potenciar antibióticos convencionales. Es de destacar que estos resultados se obtuvieron empleando cepas multi-resistentes a los antibióticos, que en presencia de una cantidad sub-inhibitoria del péptido se convirtieron en sensibles al antimicrobiano. El resultado obtenido en la potenciación del levofloxacino por parte de Pep19-4LF (Figura 4.20) ilustra bien este fenómeno. A concentración subinhibitoria, ninguno de los dos compuestos por separado retrasó la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* Ps4. Sin embargo, en presencia de una concentración de péptido aún menor (la mitad) que la empleada en el tratamiento individual, la bacteria se mostró completamente sensible a 0,5 µg/mL de levofloxacino. Aunque el mecanismo que explica la capacidad potenciadora de antibióticos de Pep19-4LF y Pep19-2.5 no se ha estudiado todavía, sí que existen datos para otros AMPs que poseen esa misma propiedad. Uno de los AMPs con mayor capacidad potenciadora de antimicrobianos es el nonapéptido de polimixina B (PMBN), un derivado deacilado de la polimixina B (Vaara y Vaara, 1983).

La eliminación del grupo acilo hace que PMBN pierda la capacidad bactericida y buena parte de la actividad bacteriostática de su compuesto parental. Mediante resonancia magnética nuclear, Bhattacharjya y colaboradores determinaron la estructura de PMBN unido a LPS y mostraron que el péptido interactúa con la parte más superficial del LPS (Bhattacharjya y *col.* 1997), sin insertarse en la región hidrofóbica de la molécula (el lípido A). Esto explica la falta de actividad antibiótica de PMBN y a la vez sugiere que dicha interacción superficial es suficiente para desestabilizar la membrana externa y permitir la entrada de moléculas al interior de la célula. Dada la afinidad por el LPS de Pep19-4LF y Pep19-2.5, es muy posible que estos péptidos empleen un mecanismo similar a PMBN para permeabilizar la membrana externa.

La capacidad de actuar en sinergia con antibióticos se ha descrito previamente para otros AMPs, incluyendo entre otros las polimixinas (Giamarellos-Bourboulis y *col.* 2003; Vidailiac y *col.* 2012), las magaininas (Giacometti y *col.* 2000) las cecropinas (Moore y *col.* 1996), los péptidos derivados de la lactoferrina (Sánchez-Gómez y *col.*

2008, 2011), y algunos péptidos sintéticos como los descritos por Vaara y Porro (Vaara y Porro 1996). Evidentemente, una de las grandes ventajas de la potenciación antibiótica mediada por péptidos u otros agentes es la posibilidad de reducir la cantidad de antimicrobiano necesaria para causar un efecto inhibitorio o bactericida. De esta manera, disminuye también el riesgo de toxicidad tanto del antimicrobiano, como del agente potenciador.

Otra interesante propiedad de los dos péptidos estudiados en el presente trabajo es su capacidad para potenciar mutuamente su actividad antimicrobiana frente a dos cepas multi-resistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. Este mecanismo parece tener importancia fisiológica en el caso de algunos péptidos naturales humanos que se secretan simultáneamente, como las defensinas y las catelicidinas (Nagaoka y col. 2000). Una relación sinérgica de este tipo también parece existir en el caso de dos tipos de magaininas secretadas en la piel de anfibios (Westerhoff y col. 1995). Otros autores también han descrito la existencia de sinergia entre dos péptidos no relacionados, la ranelexina y la colistina (Giacometti y col. 2000) o las protegrinas y catelicidinas (Yan y Hancock 2001). Un reciente estudio ha descrito que la sinergia entre dos tipos de magaininas se basa en que el tamaño de poro que forma la mezcla peptídica en la bicapa lipídica es mayor y más estable que el formado por cada uno de los dos compuestos por separado (Pino-Angeles y col. 2016). Es posible que un mecanismo similar a este explique la potenciación mutua detectada entre Pep19-2.5 y Pep19-4LF.

Aunque según el método del *checkerboard* el efecto potenciador de antibióticos de Pep19-2.5 y Pep19-4LF no fue tal en todas las cepas estudiadas, sí se encontraron combinaciones prometedoras frente a cepas de *S. aureus* o *E. coli*, y de efectos de aditividad frente a *K. pneumoniae* (véase Tabla 4.3). Sin embargo, cuando se realizaron los mismos estudios mediante cinéticas de crecimiento utilizando el equipo *Bioscreen C*, los resultados no se reprodujeron. La discordancia entre ambas técnicas fue un problema durante la caracterización de las combinaciones en las distintas cepas. Ésta fue achacada principalmente a diferencias en los métodos de incubación (reposo *versus* agitación constante) que podrían variar la precipitación de los componentes. Este aspecto es especialmente plausible al considerar los antecedentes de Pep19-2.5 como agente agregante. En nuestro caso, decidimos proseguir con los estudios de sinergia basándonos en los resultados del *Bioscreen C*, ya que permitía un mejor seguimiento

durante más tiempo y posibilidad de cuantificación de los crecimientos, mientras que la técnica del *checkerboard* se limitaba a observaciones únicamente a las 18-20 horas de la lectura. Además, el *Bioscreen C* mostró una alta reproducibilidad inter-experimental y, por último, se consideró que la agitación representaba mejor las posibles condiciones que se podrían esperar en modelos *in vivo*.

El perfil cinético del crecimiento de las distintas cepas estudiadas mediante *Bioscreen C* reveló que Pep19-4LF presentaba combinaciones más potentes con antibióticos que Pep19-2.5. Además, Pep19-4LF fue el único capaz de mostrar potenciación antibiótica frente a una cepa grampositiva. *S. aureus* ATCC 43300 es un aislamiento resistente a meticilina (MRSA), con una CMI a la oxacilina de 16 µg/mL. Aunque, como se muestra en la Figura 4.22, la combinación antibiótica no mostró una inhibición total, el crecimiento se retrasó más de 24 h en presencia de tan solo 2 µg/mL del antibiótico y 1 µg/mL de Pep19-4LF. Esta prueba abre la puerta a la búsqueda de más combinaciones sinérgicas de AMPs y antibióticos con el objetivo de sensibilizar a las bacterias grampositivas que hayan desarrollado resistencias.

Por último, es importante resaltar la importancia de la concentración de cationes en los medios utilizados durante todos los experimentos *in vitro*. Los cationes divalentes (principalmente Mg²⁺ y Ca²⁺) contribuyen a la estabilización de la membrana externa de las bacterias bajo condiciones fisiológicas (Nikaido 2003). Es conocido que las alteraciones en las concentraciones de Mg²⁺ y Ca²⁺ pueden modificar los valores de la CMI o la actividad sinérgica de ciertos compuestos (Jensen y col. 2006). La unión de los AMPs a la membrana bacteriana provoca el desplazamiento de los cationes divalentes. En medios con alta concentración de cationes, éstos compiten con los AMPs por la unión a las dianas aniónicas de la envoltura bacteriana, con lo que los AMPs pierden efectividad. Nuestro grupo demostró previamente la importancia de la concentración de los cationes divalentes en los medios de cultivo (Sánchez-Gómez y col. 2008). Como ejemplo, el simple aumento de concentración de éstos 1 mM puede generar la pérdida total de actividad bactericida de ciertos compuestos. Por el contrario, el empleo de medios con baja concentración de cationes puede llevar a sobreestimar el efecto de los compuestos en estudio. Por lo tanto, el medio de cultivo Mueller Hinton con cationes ajustados -estándar en ensayos de susceptibilidad antibiótica- fue considerado la mejor opción para evaluar la actividad de los AMPs. Sin embargo, es

preciso tener en cuenta que las condiciones fisiológicas a las que estos compuestos se enfrentarán en posibles estudios *in vivo* serán seguramente más exigentes (Berditsch y col. 2015; Sánchez-Gómez y col. 2008).

5.4 Evaluación de la capacidad anti-*biofilm* de Pep19-4LF

De entre todos los modelos *in vitro* para evaluar la capacidad anti-*biofilm* de los compuestos, se optó por el sistema del CDC-*biofilm* reactor puesto que había mostrado alta reproducibilidad en experimentos anteriores y, sobre todo, porque reproduce las condiciones de flujo y reemplazo de medio que se podrían esperar en condiciones fisiológicas (Goeres y col. 2005). Además, el flujo turbulento empleado asegura la formación de *biofilms* densos y consistentes, lo que impone unas condiciones de evaluación mucho más exigentes a los antimicrobianos en estudio.

Por otra parte, las mejores combinaciones sinérgicas de Pep19-4LF con antibióticos se obtuvieron sobre aislamientos de *E. coli*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, pero solo esta última cepa (4158-02 Ps4) poseía una buena capacidad para formar biopelícula (datos no mostrados). Por lo tanto, esta fue la cepa seleccionada para evaluar la actividad anti-*biofilm* de Pep19-4LF. Además, nuestro grupo de investigación ha caracterizado en detalle la cepa Ps4 en fase planctónica y de *biofilm* en varios trabajos previos (Sánchez-Gómez y col. 2008, 2011, 2015). Como se comentó en la introducción, *P. aeruginosa* es la bacteria que más frecuentemente causa sepsis en pacientes con neumonía relacionada con ventilación mecánica y, además, la mayoría de los casos están asociados a la formación de *biofilm*.

La terapia combinada se está considerando como una de las mejores opciones frente a infecciones asociadas a *biofilm* (Pletzer y Hancock 2016). Dentro de las combinaciones de antibióticos, destacan las que incluyen a un agente permeabilizante o potenciador, generalmente un péptido antimicrobiano. La colistina, por ejemplo, ha sido utilizada como tratamiento de última opción en pacientes con infecciones pulmonares. Sin embargo, diversos estudios muestran cómo las concentraciones plasmáticas de

colistina en pacientes críticos tratados según los estándares clínicos son sub-óptimas en la mayoría de los casos (Garonzik y col. 2011; Plachouras y col. 2009).

Parece claro que una terapia basada en un único antimicrobiano que sólo alcanza concentraciones sub-inhedorias no es suficiente para controlar adecuadamente una infección. El éxito terapéutico es todavía más improbable si la infección está asociada a la formación de *biofilms*, cuya resistencia a los antimicrobianos es sustancialmente mayor (entre 10 y 1.000 veces) que la de las mismas células en fase planctónica (Lewis 2001). De ahí el interés de combinar compuestos que actúen en sinergia y que permitan conseguir actividad anti-microbiana a concentraciones sub-inhedorias.

En nuestro caso, se decidió combinar Pep19-4LF con levofloxacino, un antibiótico que es comúnmente utilizado frente a infecciones pulmonares de *P. aeruginosa* (Yassien y col. 1995) y que posee una excelente capacidad bactericida en modelos *in vivo* e *in vitro* de *biofilm* de *P. aeruginosa* (Ishida y col. 1998). Nuestros resultados demuestran que dicha combinación péptido-antibiótico posee actividad anti-*biofilm* a tan solo cinco veces la CMI planctónica de cada componente (Figura 4.24). Concretamente, la combinación redujo un millón de veces la viabilidad de la biocapa bacteriana tras 24h de incubación.

La actividad alcanzada fue significativamente más potente que la de cada uno de los antimicrobianos por separado a una concentración de diez veces su CMI planctónica. Como punto de referencia -aunque se trate de un estudio *in vivo*-, Hengzhuang y colaboradores destacan la necesidad de utilizar una concentración de colistina 64 veces superior a la CMI planctónica frente a un *biofilm* pulmonar de *P. aeruginosa* para conseguir solo un logaritmo de reducción de carga bacteriana (Hengzhuang y col. 2012).

En el caso de agentes bactericidas, la mayoría de autores consideran que existe sinergia cuando los dos antimicrobianos combinados provocan una reducción de la viabilidad mayor de 100 veces en comparación con el tratamiento más activo por separado (Eliopoulos y Moellering 1982). Dado que la combinación Pep19-4LF-levofloxacino se mostró aproximadamente 100 veces más activa que el siguiente tratamiento (levofloxacino solo) y que la primera contenía la mitad de levofloxacino que

el segundo, nuestros resultados demuestran la capacidad de Pep19-4LF para actuar en sinergia con levofloxacino y eliminar eficazmente el *biofilm* de Ps4.

Las imágenes de microscopía confocal (Figura 4.24) sugieren que Pep19-4LF posee una significativa capacidad disgregante de la matriz extracelular que conforma el *biofilm*, a diferencia del levofloxacino, que a la misma concentración se muestra como un agente principalmente bactericida. Otros autores han descrito la capacidad que tienen ciertos AMPs para disgregar *biofilms* maduros (Di Luca y col. 2014; Mah y O'Toole 2001; Park y col. 2011), subrayando la relevancia de este mecanismo en el tratamiento y eliminación de las biocapas bacterianas. Esta propiedad parece depender de la estructura anfipática de muchos AMPs, que les permite actuar a modo de detergentes (Bechinger y Lohner 2006).

No obstante, los resultados mostrados en la Figura 4.25 sugieren que la hipotética capacidad disgregadora de *biofilm* de Pep19-4LF es compatible con una potente actividad bactericida. Si el péptido se limitara a desprender el *biofilm* sin matar a las células, debería haber muchas más células viables en la suspensión recogida en el primer lavado tras el tratamiento. Sin embargo, en esa suspensión se detectó un número de viables similar en proporción al hallado en los lavados del *biofilm* que no recibió tratamiento o del que se expuso a levofloxacino (resultados no mostrados). Por otra parte, estos resultados confirman la potente capacidad anti-*biofilm* de Pep19-4LF en combinación con levofloxacino detectada previamente.

Es probable que la letalidad mostrada por el tratamiento pueda aumentar todavía más prolongando el tiempo de exposición de las biocapas a la terapia combinada. Hay que señalar que el tiempo de exposición más largo empleado en el presente trabajo fue de 24h mientras que las soluciones que se emplean clínicamente para eliminar *biofilms* de implantes médicos (en técnicas de “sellado antibiótico”; ver Introducción) se aplican de 10 a 14 días (Fernández-Hidalgo y Almirante 2014).

En otro ámbito, existe un gran interés por prevenir la formación de *biofilms*, de manera particular en las prótesis, catéteres y otros dispositivos implantables que se utilizan en tratamientos médicos. Para esta finalidad, se han ensayado muchos tipos de agentes antimicrobianos y de combinaciones de éstos, incluyendo las de AMPs con

antibióticos. Por ejemplo, se ha descrito que ciertos antibióticos (tobramicina, ciprofloxacino y colistina) junto con péptidos antimicrobianos como el LL-37 (Dosler y Karaaslan 2014) y la combinación de la polimixina B y gramicidina (Berditsch y *col.* 2015) son capaces de inhibir en solución la formación del *biofilm* de *P. aeruginosa*. Además, se han ensayado diversas técnicas para inmovilizar los compuestos antimicrobianos en la superficie de los implantes de manera que se intente evitar la colonización de estos dispositivos por parte de *biofilms*.

Los experimentos mostrados en la Figura 4.27 demuestran que el péptido Pep19-4LF inmovilizado sobre una superficie inerte es capaz de inhibir la formación de *biofilm* de *P. aeruginosa* con tanta eficacia como un AMP de uso clínico, la colistina (polimixina E). Para estos estudios se eligió una superficie de silicona (PDMS) porque este material es el más utilizado para la fabricación de catéteres implantables (Keum y *col.* 2017). Aparentemente, la menor homogeneidad de recubrimiento lograda por el péptido en comparación con la colistina (Figura 4.27) no fue obstáculo para que el primero igualara la eficacia inhibitoria del segundo compuesto, sin embargo, sería conveniente idear un método de cuantificación de antimicrobiano inmovilizado. No obstante, este resultado es más sorprendente si consideramos que la colistina tiene una actividad bacteriostática mayor que el péptido (4 $\mu\text{g/mL}$ frente a 16 $\mu\text{g/mL}$). Es de destacar que nuestro protocolo se basó en el de Alves y colaboradores (Alves y Pereira 2016) y que estos autores describieron unos resultados de actividad inhibitoria de *biofilm* para la colistina muy similares a los mostrados en el presente trabajo.

La capacidad de Pep19-4LF para inhibir la formación de *biofilm* podría ser consecuencia de la inestabilidad del enlace péptido-silicona y por tanto de una transferencia del péptido a la solución. De ser esto así, la inhibición detectada ocurriría no por contacto directo, sino por una interacción convencional entre el péptido y su diana celular. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el péptido sigue siendo capaz de inhibir la formación de *biofilm* incluso después de bañar la superficie funcionalizada con medio de cultivo y de retirar esta solución 72 h más tarde. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el enlace covalente entre Pep19-4LF y la silicona es estable y que el péptido inhibe el crecimiento de Ps4 por contacto directo. No obstante, se desconoce si el péptido inmovilizado posee una actividad bacteriostática o bactericida.

La capacidad de AMPs inmovilizados sobre superficies inertes para prevenir la formación de *biofilms* es bien conocida (Ferreira y Zumbuehl 2009). En algunos de estos casos, está bien documentada la habilidad de los compuestos para matar por contacto directo a las células adyacentes (Gabriel y col. 2006; Yala y col. 2011; Chen y col. 2014). Sin embargo, aún no existe una explicación definitiva sobre el mecanismo que explica esta potente actividad bactericida. Algunos estudios sugieren que la muerte ocurre por una penetración del péptido en la membrana celular (Tiller y col. 2001; Milović y col. 2005) mientras que otros autores postulan que el mecanismo de acción implica el intercambio iónico entre las cargas positivas en la superficie y cationes de la membrana que desempeñan funciones críticas a nivel estructural (Kügler y col. 2005; Murata y col. 2007).

Los resultados mostrados en la Figura 4.27 demuestran que, en las mismas condiciones de inmovilización usadas para el péptido Pep19-4LF, Pep19-2.5 es incapaz de prevenir la formación de *biofilm*. Aunque la baja actividad anti-*biofilm* de Pep19-2.5 puede estar en relación con su pobre actividad como antimicrobiano (alta CMI planctónica), hay otros factores que pueden explicar estos resultados. Por un lado, como la superficie funcionalizada con Pep19-2.5 no se caracterizó mediante microscopía electrónica, no se puede descartar que el péptido no se haya ligado correctamente a la silicona. Por otra parte, la estabilidad del enlace entre Pep19-2.5 y la superficie podría ser menor que en el caso de Pep19-4LF, lo que facilitaría la migración del péptido a la solución.

5.5 Estudio de la actividad antiinflamatoria de Pep19-4LF en modelo de endotoxemia murino

Aunque Pep19-4LF había demostrado una capacidad antimicrobiana superior a la de Pep19-2.5, el objetivo principal del desarrollo de los péptidos de la familia *Aspidasept* se centra en su posible aplicación en la terapia contra la sepsis (<http://www.antiinfektiva.com/es/informacion/que-es-aspidasept>). Una primera indicación de que Pep19-4LF podía poseer una buena actividad anti-endotóxica fue la

observación de que este compuesto neutralizaba *in vitro* la secreción de citoquinas dependiente de un PAMP (la lipoproteína FSL-1 de *Mycoplasma salivarium*) con una potencia muy similar a la de Pep19-2.5 (Pfalzgraff y *col.* 2016). Como primer paso para estudiar la capacidad antiendotóxica *in vivo* de Pep19-4LF, se utilizó un modelo murino de endotoxemia desarrollado por nuestro grupo, basado en la inoculación de LPS puro (Heinbockel y *col.* 2015). Es de destacar que este modelo no hace uso de agentes sensibilizadores como la galactosamina, que provocan hepatotoxicidad, por lo que el ensayo refleja mejor los síntomas de un choque séptico agudo.

Nuestros resultados demuestran que una sola dosis de Pep19-4LF administrada inmediatamente después de la endotoxina protege al 100 % de los animales durante 48 h frente a un choque endotóxico letal (Figura 4.28). Por el contrario, el 100 % de los animales no tratados murieron en las primeras 20 h tras la inoculación del LPS. A pesar de que los ratones recibieron una sola dosis de Pep19-4LF, el 60% de ellos seguía vivo 96 h después de la inducción de la endotoxemia. Previsiblemente, este nivel de protección podría mejorarse utilizando dosis repetidas de Pep19-4LF separadas temporalmente, como nuestro grupo demostró con el péptido Pep19-2.5 en un modelo de infección intraperitoneal (Heinbockel y *col.* 2013). Otra opción aún más eficaz implicaría la administración del péptido mediante una continua infusión intravenosa, que es el método de elección para administrar terapia de soporte frente a la sepsis en hospitales (Zhang y *col.* 2017). Precisamente, Schuerholz y colaboradores emplearon este último método en un modelo de ligación cecal y punción y demostraron que Pep19-2.5 protegía tan eficazmente como la Polimixina B frente a la sepsis (Schuerholz y *col.* 2013).

Los resultados mostrados en las Figura 4.28-4.30 ponen de manifiesto la rapidez con que se desencadena la endoxemia letal en este modelo y el corto tiempo del que se dispone para su control. En este sentido, este modelo está lejos de reflejar el curso -mucho más progresivo- que sigue un proceso séptico en el ser humano (Nemzek y *col.* 2008). Por ello, sería interesante confirmar las observaciones realizadas en el presente trabajo en modelos más cercanos a las condiciones fisiológicas en humanos, como los de ligación cecal y punción (Lilley y *col.* 2015). Es posible que, en este último modelo, la eficacia terapéutica de Pep19-4LF mejorase sustancialmente en relación con lo

observado en el modelo de endotoxemia, sobre todo cuando el tratamiento se administra con retraso con respecto al momento de inducción de la sepsis.

El estudio comparativo entre Pep19-4LF y Pep19-2.5 demuestra que ambos péptidos proporcionan una protección similar frente al choque endotóxico (Figuras 4.29 y 4.30). Por un lado, Pep19-2.5 tiene una cierta ventaja terapéutica sobre el primero cuando se administra 30 min después de la inducción de la endotoxemia (Figura 4.30). Por el contrario, la protección que proporciona Pep19-4LF respecto a un control sin tratar es superior a la de Pep19-2.5 cuando los animales reciben el tratamiento inmediatamente después del LPS (Figura 4.29).

Para llegar a resultados más concluyentes sería necesario realizar una experimentación *in vivo* más completa. Concretamente, sería especialmente relevante emplear un modelo de bacteriemia como el presentado en el primer capítulo de la sección de Resultados. De esa manera, se podría investigar si la mayor actividad antimicrobiana de Pep19-4LF *in vitro* se traduce en un mejor control de la sepsis. En esos ensayos se podría estudiar también si Pep19-4LF es capaz de potenciar *in vivo* la actividad de un antibiótico co-administrado con el péptido. A la vista de los resultados de la Figura 4.20, el levofloxacino podría ser un buen candidato para estos experimentos. Finalmente, para investigar la capacidad anti-*biofilm in vivo* de Pep19-4LF en ausencia o en presencia de un antibiótico sería necesario usar un modelo animal de infección asociada a *biofilm* de los muchos que se han descrito hasta el momento (Lovati y col. 2017). Un modelo de este tipo también permitiría investigar si la capacidad que Pep19-4LF tiene *in vitro* para prevenir la formación de *biofilm* se mantiene *in vivo* en un implante recubierto por el péptido.

5.6 Discusión general

Este trabajo ha profundizado en el conocimiento y desarrollo preclínico de Pep19-2.5 como candidato en terapia frente a la sepsis. Se ha demostrado su efectividad antiendotóxica en combinación con el antibiótico ceftriaxona en un modelo de mamíferos no-roedores. Este resultado, junto con la eficacia demostrada en modelos de

roedores de forma individual o combinado con antiinflamatorios no esteroideos, hacen de Pep19-2.5 un interesante candidato como agente terapéutico frente a cuadros de sepsis. Previsiblemente, la capacidad antiendotóxica de Pep19-2.5 supondría una característica muy atractiva, en especial cuando el antibiótico empleado induce la liberación de LPS desde la bacteria, como se ha descrito sobre todo en los β -lactámicos. Sin embargo, pese a la eficacia terapéutica de Pep19-2.5 demostrada en varios modelos animales, los estudios de biodistribución con ^{14}C -Pep19-2.5 sugieren una permanencia muy reducida en sangre, así como una baja estabilidad del péptido en ambientes fisiológicos. No obstante, es preciso destacar que lo que parece en principio una desventaja (que el péptido se degrade rápidamente en presencia de suero o que tenga permanencia reducida en la sangre), puede resultar ser ventajoso para un fármaco que presumiblemente va a infundirse en el paciente. El hecho de que el fármaco se metabolice rápidamente en el cuerpo sin dejar ningún residuo tóxico (sólo aminoácidos) puede ser muy atractivo.

Los problemas de baja biodistribución y las sospechas de agregación hicieron que, además de Pep19-2.5 -catalogado como el mejor compuesto antiendotóxico de los que inicialmente se evaluaron- se añadiese el estudio el AMP Pep19-4LF, que aunque no demostraba la exquisita afinidad por el LPS de Pep19-2.5, sí que mantenía una muy alta actividad.

Este trabajo implica un nuevo enfoque en la lucha contra la sepsis bacteriana, al considerar necesario abarcar el problema del choque séptico por todos sus campos y planteando en un futuro el uso combinado de antibióticos, antiinflamatorios y AMPs:

- i) Por una parte, la presencia de una infección bacteriana ha de ser erradicada por medio de antibióticos, frente a los cuales el microorganismo puede ser resistente. Aunque Pep19-2.5 no sea tan buen antimicrobiano como parece serlo Pep19-4LF, sí que ha demostrado cierta capacidad de sinergia y potenciación de otros compuestos, así como capacidad cicatrizante.
- ii) La liberación de endotoxinas por parte de las bacterias, siendo mayor aún si son lisadas por ciertos antimicrobianos, hace necesario el uso de un

neutralizante de endotoxinas, como ha demostrado serlo el Pep19-2.5 y posteriormente Pep19-4LF.

- iii) Como consecuencia de la excesiva presencia de toxinas, la exacerbada respuesta inflamatoria ha de ser controlada. Pep19-2.5 demostró en estudios previos a este trabajo la capacidad de actuar en sinergia con antiinflamatorios no esteroideos para frenar por todas las vías la desregulación del sistema inmunitario. Pep19-4LF también ha demostrado actividad neutralizante de LPS *in vivo*, aunque no ha sido evaluado aún en combinación con antiinflamatorios no esteroideos. Sin embargo, prevemos un comportamiento parecido en este aspecto.

Además, los AMPs de este trabajo han presentado capacidad de actuar en sinergia con otros antibióticos, contribuyendo de forma eficaz a la eliminación de la infección bacteriana, incluso cuando existen resistencias. Concretamente, Pep19-4LF demostró una clara potenciación de levofloxacino, ceftriaxona y oxacilina frente a distintas cepas en cada caso. Considerando la alta prevalencia de sepsis asociada a biopelículas, es importante destacar que Pep19-4LF ha demostrado capacidad anti-*biofilm*, al menos frente a *P. aeruginosa*, tanto por sí mismo como en sinergia con levofloxacino. Este AMP podría utilizarse de manera similar a como se emplea actualmente la colistina en pacientes con infecciones pulmonares crónicas (vía aerosol) o para tratar y prevenir la infección de heridas, ya que estudios en otros grupos de investigación lo han catalogado también como buen cicatrizante. En relación a su capacidad anti-*biofilm*, se estudió la posibilidad de utilizar este AMP como recubrimiento de material médico implantado para prevenir la formación de biopelículas bacterianas, tal y como se estudia en otros compuestos similares, con resultados prometedores. Aún así, tanto la actividad anti-*biofilm* como la preventiva del mismo deben ser estudiadas y caracterizadas en profundidad, realizando distintos modelos con mayor número de cepas e incluyendo posteriormente experimentación *in vivo*.

6. Conclusions

1. Pep19-2.5 was effective against a lethal dose of the pro-inflammatory lipoprotein FSL-1 in a murine model of endotoxemia. This protection was associated with a reduction in serum levels of the pro-inflammatory cytokine TNF- α and is the first demonstration that Pep19-2.5 can neutralize in-vivo sepsis-inducing toxins from Gram-positive bacteria.
2. We established a rabbit model of acute sepsis caused by the intravenous inoculation of *Salmonella enterica*. The model reproduces numerous symptoms characteristic of human sepsis including hyperlactatemia, hyperglycemia, leukopenia, hypothermia, splenomegaly and the hyperproduction of several pro-inflammatory cytokines.
3. We demonstrated that a combination of Pep19-2.5 and ceftriaxone administered intravenously to the rabbits (1) kills bacteria and eliminates bacteremia 30 min post challenge; (2) inhibits Toll-like receptor 4 agonists in serum 90 min post challenge; (3) reduces serum levels of pro-inflammatory cytokines (interleukin-6 and tumor necrosis factor α); (4) lowers bacterial colonization of kidney and spleen; (5) alleviates pathological lesions in the spleen (6) reverts hypothermia and gives rise to temperature values indistinguishable from basal levels 330 min post challenge. The two components of the combination displayed synergism in some of these activities.
4. Each component of the combination played a specific role being the antibiotic and the peptide responsible for the bactericidal activity and the endotoxin neutralizing activity, respectively.
5. Pep19-2.5 efficiently counteracts the endotoxin induced by a beta-lactam antibiotic in vivo and abolishes the LPS dependent pro-inflammatory activity.
6. None of the treatments tested, alone or in combination, was able to revert some of the symptoms of sepsis such as hyperglycemia, hyperlactatemia, leukopenia or splenomegaly.

7. A murine model of skin wound infection due to *Staphylococcus aureus* was set up for the evaluation of the healing capacity and antimicrobial activity of candidate compounds.
8. Pep19-2.5 showed a wound healing activity as high as the reference compound (LL-37), speeding up the healing of infected wounds to match the rate observed in the uninfected group. Thus, Pep19-2.5 treated wounds cured significantly faster than the infected lesions of untreated animals.
9. Once dissolved in water, Pep19-2.5 remains undegraded, while increasing amounts of animal serum free of high molecular weight proteins cause a proportional and continuous decrease in the bioavailability of the peptide, so that the compound is undetectable after four hours of incubation. Similarly, Pep19-2.5 shows high affinity in solution to bovine serum albumin protein (BSA), although this interaction did not cause peptide degradation.
10. Bioavailability experiments in mice using ¹⁴C labeled Pep19-2.5 showed that the peptide has a low half-life in the blood and tends to accumulate in liver, lung, spleen and kidney, in this order, when expressing data as peptide detected per gram of tissue. While the amount of signal in the lung decreased along time, the opposite trend was observed in the kidney. However, if results are expressed as amount of peptide per organ, Pep19-2.5 showed a high tropism for the liver.
11. As antimicrobial and bactericidal agent, Pep19-4LF shows broad spectrum of activity and is more potent than Pep19-2.5. Specifically, the former compound has MIC values at least four times lower than the latter.
12. Regarding antibiotic enhancing activity, despite the discrepancies between the checkerboard method and the turbidimetry analysis, our results suggest that Pep19-4LF is more potent than Pep19-2.5. This was demonstrated with levofloxacin against *P. aeruginosa* Ps4, with ceftriaxone against *E. coli* CUN E20, or to a lesser extent with oxacillin against *S. aureus* ATCC 43300. On the other hand, Pep19-2.5, showed only a relative effectiveness as enhancer when combined with levofloxacin against strain *A. baumannii* 10817.

13. Pep19-2.5 and Pep19-4LF synergize with each other against *A. baumannii* 10817 and *P. aeruginosa* Ps4 when testing is conducted by turbidimetry.
14. Pep19-4LF has a significant anti-biofilm bactericidal activity against *P. aeruginosa* Ps4 as shown in experiments with the CDC biofilm reactor (CBR). This activity is enhanced and appears to be synergistic when the peptide is combined with levofloxacin.
15. Pep19-4LF retains its antibacterial activity when immobilized on a polymeric matrix and prevents growth of *P. aeruginosa* biofilm as efficiently as colistin. This anti-biofilm activity seems to be stable over time, since the peptide maintains its effectiveness after 72 hours of incubation in sterile medium. On the contrary, Pep19-2.5 does not seem to have significant anti-biofilm activity.
16. Pep19-4LF showed a LPS neutralizing activity higher than that of Pep19-2.5 in the murine model of endotoxemia, provided that the administration of the treatment occurs immediately after the lethal dose of endotoxin. However, when the treatment was administered with half an hour of delay, Pep19-2.5 demonstrated a better neutralizing activity, although none of the treatments significantly improved the survival of the animals.

7. Bibliografía

Abraham, E. y col., 2003. Efficacy and Safety of Tifacogin (Recombinant Tissue Factor Pathway Inhibitor) in Severe Sepsis. *Journal of the American Medical Association*, 290(2), p.238.

AEMPS, 2015. Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos. Segunda edición 2015. pp.1–37.

Alves, D. y Pereira, M.O., 2016. Bio-Inspired Coating Strategies for the Immobilization of Polymyxins to Generate Contact-Killing Surfaces. *Macromolecular bioscience*, 16(10), pp.1450–1460.

Anderson, D.J. y col., 2006. Predictors of mortality in patients with bloodstream infection due to ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5), pp.1715–1720.

Andra, J. y col., 2007. Mechanism of interaction of optimized Limulus-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *The Biochemical journal*, 406(2), pp.297–307.

Angus, D.C. y Van der Poll, T., 2013a. Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*, 369(21), pp.2063–2y col063.

Angus, D.C. y Van der Poll, T., 2013b. Severe Sepsis and Septic Shock. *The New England journal of medicine*, 369(9), pp.840–851.

Annane, D., Bellissant, E. y Cavaillon, J.-M., 2005. Septic shock. *Lancet (London, England)*, 365(9453), pp.63–78.

Antonopoulou, A. y Giamarellos-Bourboulis, E.J., 2011. Immunomodulation in sepsis: state of the art and future perspective. *Immunotherapy*, 3(1), pp.117–128.

Aronoff, D.M., 2012. Cyclooxygenase inhibition in sepsis: is there life after death? *Mediators of inflammation*, 2012(3), pp.696897–7.

Bassetti, M., Righi, E. y Carnelutti, A., 2016. Bloodstream infections in the Intensive Care Unit. *Virulence*, 7(3), pp.267–279.

Bárcena-Varela, S. y col., 2017. Coupling killing to neutralization: combined therapy

with ceftriaxone/Pep19-2.5 counteracts sepsis in rabbits. *Experimental y molecular medicine*, 49(6), p.e345.

Bechinger, B. y Lohner, K., 2006. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(9), pp.1529–1539.

Bengoechea, J.A. y Skurnik, M., 2000. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Molecular Microbiology*, 37(1), pp.67–80.

Berditsch, M. y col., 2015. Synergistic effect of membrane-active peptides polymyxin B and gramicidin S on multidrug-resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), pp.5288–5296.

Berkowitz, B.A., Bevins, C.L. y Zasloff, M.A., 1990. Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides. *Biochemical pharmacology*, 39(4), pp.625–629.

Bhattacharjya, S. y col., 1997. Polymyxin B nonapeptide: Conformations in water and in the lipopolysaccharide-bound state determined by two-dimensional NMR and molecular dynamics. *Biopolymers*, 41(3), pp.251–265.

Bone, R.C. y col., 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. pp. 1644–1655.

Boucher, H.W. y col., 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(1), pp.1–12.

Brandelli, A., 2012. Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial Peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(8), pp.731–741.

Brandenburg, K. y col., 2016. Supramolecular structure of enterobacterial wild-type lipopolysaccharides (LPS), fractions thereof, and their neutralization by Pep19-2.5. *Journal of structural biology*, 194(1), pp.68–77.

Brandenburg, K.S. y col., 2011. Polymyxin B self-associated with phospholipid nanomicelles. *Pharmaceutical Development and Technology*, 17(6), pp.654–660.

Brase, S., 2012. Faculty of 1000 evaluation for In Vivo Biodistribution and Small Animal PET of (64)Cu-Labeled Antimicrobial Peptoids. *Bioconjugate Chemistry*, 2012, 23 (5), pp 1069–1079

Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology*, 3(3), pp.238–250.

Brouwer, C.P.J.M., Wulferink, M. y Welling, M.M., 2008. The Pharmacology of Radiolabeled Cationic Antimicrobial Peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(5), pp.1633–1651.

Calvano, J.E. y col., 2003. Modulation of the Lipopolysaccharide Receptor Complex (CD14, TLR4, MD-2) and Toll-Like Receptor 2 in Systemic Inflammatory Response Syndrome-Positive Patients With and Without Infection: Relationship to Tolerance. *Shock*, 20(5), pp.415–419.

Camerota, A.J. y col., 1998. Delayed treatment with recombinant human tissue factor pathway inhibitor improves survival in rabbits with gram-negative peritonitis. *Journal of Infectious Diseases*, 177(3), pp.668–676.

Cavagnaro, J.A., 2002. Outlook: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(6), pp.469–475.

Cederlund, A., Gudmundsson, G.H. y Agerberth, B., 2011. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *The FEBS journal*, 278(20), pp.3942–3951.

Cervantes-Torres, J. y col., 2017. High stability of the immunomodulatory GK-1 synthetic peptide measured by a reversed phase high-performance liquid chromatography method. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1060, pp.97–102.

Chan, C., Burrows, L.L. y Deber, C.M., 2005. Alginate as an auxiliary bacterial membrane: binding of membrane-active peptides by polysaccharides. *Journal of Peptide Research*, 65(3), pp.343–351.

- Chaudhry, H. y col., 2013. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo*, 27(6), pp.669–684.
- Chen, X. y col., 2014. Antimicrobial GL13K peptide coatings killed and ruptured the wall of *Streptococcus gordonii* and prevented formation and growth of biofilms. *PLoS One*, 9(11):e111579.
- Cheong, H.S. y col., 2008. Clinical significance and predictors of community-onset *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *The American journal of medicine*, 121(8), pp.709–714.
- Chi, E.Y. y col., 2003. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharmaceutical research*, 20(9), pp.1325–1336.
- Chun, K. y col., 2015. Sepsis Pathogen Identification. *Journal of laboratory automation*, 20(5), pp.539–561.
- Chung, P.Y. y Khanum, R., 2017. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology*, 50(4), pp.405-410.
- Clark, N.M., Zhanel, G.G. y Lynch, J.P., 2016. Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter* species: a global threat. *Current opinion in critical care*, 22(5), pp.491–499.
- CLSI, 2012. M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. pp.1–88.
- Cohen, J. y McConnell, J.S., 1986. Release of endotoxin from bacteria exposed to ciprofloxacin and its prevention with polymyxin B. *European Journal of Clinical Microbiology*, 5(1), pp.13–17.
- Corrigan, J.J. y Bell, B.M., 1971. Comparison between the polymyxins and gentamicin in preventing endotoxin-induced intravascular coagulation and leukopenia. *Infection and immunity*, 4(5), pp.563–566.
- Cui, J. y col., 2014. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. *Human vaccines y immunotherapeutics*, 10(11),

pp.3270–3285.

Davey, M.E. y O'Toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), pp.847–867.

Davison y col., 2000. What is antibiotic resistance and how can we measure it?, pp.1–6.

Davison, H.C., Woolhouse, M.E.J. y Low, J.C., 2000. What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends in Microbiology*, 8(12), pp.554–559.

Del Pozo, J.L. y Patel, R., 2013. Are antibiotics and surgery sufficient to treat biofilm-associated infections? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(10), pp.641–642.

Del Pozo, J.L. y col., 2007. Biotechnological war against biofilms. Could phages mean the end of device-related infections? *The International journal of artificial organs*, 30(9), pp.805–812.

Del Pozo, J.L. y col., 2014. Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using electrical current. *Journal of applied biomaterials and functional materials*, 12(2), pp.81–83.

Dellinger, R.P. y col., 2013. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive care medicine*, 39(2), pp.165–228.

Di Luca, M., Maccari, G. y Nifosi, R., 2014. Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. *Pathogens and disease*, 70(3), pp.257–270.

Dijkshoorn, L., Nemec, A. y Seifert, H., 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature reviews. Microbiology*, 5(12), pp.939–951.

Dosler, S. y Karaaslan, E., 2014. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*, 62, pp.32–37.

Döcke, W.D. y col., 1997. Immunodepression in septic disease is associated with a

switch to type-2 cytokine pattern: in vitro reversal of sepsis- / sepsis mediator-induced type 2 switch by IL-12. *Shock*, 7(Supplement), pp.86–87.

Draper, L.A. y col., 2015. Lantibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(2), pp.171–191.

Eliopoulos, G.M. y Moellering, R.C., 1982. Antibiotic synergism and antimicrobial combinations in clinical infections. *Reviews of infectious diseases*, 4(2), pp.282–293.

Falagas, M.E. y Karageorgopoulos, D.E., 2009. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *The Journal of hospital infection*, 73(4), pp.345–354.

Fernandez, L. y col., 2012. Characterization of the Polymyxin B Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), pp.110–119.

Fernández-Hidalgo, N. y Almirante, B., 2014. Antibiotic-lock therapy: a clinical viewpoint. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(1), pp.117–129.

Ferreira, L. y Zumbuehl, A., 2009. Non-leaching surfaces capable of killing microorganisms on contact. *Journal of Materials Chemistry*, 19(42), pp.7796–7806.

Ferrer-Espada, R. Potenciación de antibióticos, inhibidores de betalactamasas y bombas de expulsión mediante péptidos antimicrobianos en bacterias gramnegativas multiresistentes. Martínez de Tejada G., editor. Universidad de Navarra; 2016. pp. 1–257.

Fett, W.F., 1985. Relationship of Bacterial Cell Surface Hydrophobicity and Charge to Pathogenicity, Physiologic Race, and Immobilization in Attached Soybean Leaves. *Phytopathology*, 75(12), p.1414.

Fleischmann, C. y col., 2015. Global burden of sepsis: a systematic review. *Critical Care*, 19(1), p.P21.

Flynn, P.M. y col., 1987. Polymyxin B moderates acidosis and hypotension in established, experimental gram-negative septicemia. *Journal of Infectious Diseases*, 156(5), pp.706–712.

Franco, N.H. y Olsson, I.A.S., 2014. Scientists and the 3Rs: attitudes to animal use in

biomedical research and the effect of mandatory training in laboratory animal science. *Laboratory animals*, 48(1), pp.50–60.

Fux, C.A. y col., 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), pp.34–40.

Gabriel, M. y col., 2006. Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjugate Chemistry*, 17(2), pp.548–550.

Gando, S. y col., 2013. A randomized, controlled, multicenter trial of the effects of antithrombin on disseminated intravascular coagulation in patients with sepsis. *Critical Care*, 17(6), p.R297.

Gandra, S., Barter, D.M. y Laxminarayan, R., 2014. Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know? *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), pp.973–980.

Gao, W. y col., 2017. Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases. *Frontiers in physiology*, 8, p.508.

Garcia, C. y col., 1994. Effect of a recombinant endotoxin-neutralizing protein on endotoxin shock in rabbits. *Critical Care Medicine*, 22(8), pp.1211–1218.

Garidel, P. y Brandenburg, K., 2009. Current Understanding of Polymyxin B Applications in Bacteraemia/ Sepsis Therapy Prevention: Clinical, Pharmaceutical, Structural and Mechanistic Aspects. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 8(4), pp.367–385.

Garonzik, S.M. y col., 2011. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), pp.3284–3294.

Ghiselli, R. y col., 2002. Cationic peptides combined with betalactams reduce mortality from peritonitis in experimental rat model. *The Journal of surgical research*, 108(1), pp.107–111.

Giacometti, A. y col., 2000. Combination studies between polycationic peptides and

clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Peptides*, 21(8), pp.1155–1160.

Giacometti, A. y col., 2002. Therapeutic efficacy of intraperitoneal polymyxin B and polymyxin-like peptides alone or combined with levofloxacin in rat models of septic shock. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49(1), pp.193–196.

Giamarellos-Bourboulis, E.J. y col., 2003. In vitro interaction of colistin and rifampin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, 15(3), pp.235–238.

Girometti, N. y col., 2014. *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection. *Medicine*, 93(17), pp.298–309.

Goeres, D.M. y col., 2005. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 3), pp.757–762.

Goto, M. y Al-Hasan, M.N., 2013. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clinical microbiology and infection*, 19(6), pp.501–509.

Gutsmann, T. y col., 2009. Structural prerequisites for endotoxic activity in the Limulus test as compared to cytokine production in mononuclear cells. *Innate Immunity*, 16(1), pp.39–47.

Hancock, R.E.W. y Sahl, H.-G., 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), pp.1551–1557.

Heinbockel, L. y col., 2015. Therapeutical Administration of Peptide Pep19-2.5 and Ibuprofen Reduces Inflammation and Prevents Lethal Sepsis P. Proost, ed., 10(7), p.e0133291.

Heinbockel, L. y col. eds., 2014. Anti-Infective Polypeptides for Combating Bacterial and Viral Infections. In *Frontiers in Clinical Drug Research: Anti-Infectives*, pp. 3–31.

Hengzhuang, W. y col., 2012. In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), pp.2683–2690.

Holst, B. y col., 2017. Soluble Toll-like receptor 2 is a biomarker for sepsis in critically ill patients with multi-organ failure within 12 h of ICU admission. *Intensive care medicine experimental*, 5(1), p.2.

Hong, D.J. y col., 2015. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection y chemotherapy*, 47(2), pp.81–97.

Huang, Y. y col., 2014. Role of helicity of α -helical antimicrobial peptides to improve specificity. *Protein & cell*, 5(8), pp.631–642.

Hughes, G. y Webber, M.A., 2017. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *British journal of pharmacology*, 174(14), pp.2237–2246.

Hussey, S.E. y col., 2012. TAK-242, a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, unveils similarities and differences in lipopolysaccharide- and lipid-induced inflammation and insulin resistance in muscle cells. *Bioscience Reports*, 33(1), p.E849.

Ishida, H. y col., 1998. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(7), pp.1641–1645.

ISO 29701:2010, *Nanotechnologies. Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems. Limulus amoebocyte lysate (LAL) test*, London: BSI British Standards.

Jenssen, H., Hamill, P. y Hancock, R.E.W., 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), pp.491–511.

Jia, H.P. y col., 2004. Endotoxin responsiveness of human airway epithelia is limited by low expression of MD-2. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 287(2), pp.428–37.

Justo, J.A. y Bookstaver, P.B., 2014. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infection and drug resistance*, 7, pp.343–363.

Kaconis, Y. y col., 2011. Biophysical Mechanisms of Endotoxin Neutralization by Cationic Amphiphilic Peptides. *Biophysical Journal*, 100(11), pp.2652–2661.

Kempker, J.A. y Martin, G.S., 2016. The Changing Epidemiology and Definitions of

Sepsis. *Clinics in chest medicine*, 37(2), pp.165–179.

Keum, H. *Y col.*, 2017. Prevention of Bacterial Colonization on Catheters by a One-Step Coating Process Involving an Antibiofouling Polymer in Water. *ACS applied materials & interfaces*, 9(23), pp.19736–19745.

Kim, E.S. y Hooper, D.C., 2014. Clinical Importance and Epidemiology of Quinolone Resistance. *Infection and chemotherapy*, 46(4), pp.226–238.

Klevens, R.M. *y col.*, 2008. The impact of antimicrobial-resistant, health care-associated infections on mortality in the United States. *Clinical infectious diseases*, 47(7), pp.927–930.

Knapp, S. *y col.*, 2006. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 173(1), pp.122–129.

Kumar, A., 2013. An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock. *Virulence*, 5(1), pp.80–97.

Kügler, R., Bouloussa, O. y Rondelez, F., 2005. Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 5), pp.1341–1348.

Lakshmikanth, C.L. *y col.*, 2016. Sepsis: in search of cure. *Inflammation research*, 65(8), pp.587–602.

Laupland, K.B., 2013. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clinical microbiology and infection*, 19(6), pp.492–500.

Leaf, D.E. *y col.*, 2014. Randomized controlled trial of calcitriol in severe sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 190(5), pp.533–541.

Lebeaux, D., Ghigo, J.M. y Beloin, C., 2014. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(3), pp.510–543.

Lepper, P.M. *y col.*, 2002. Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release

in septic shock. *Intensive care medicine*, 28(7), pp.824–833.

Lewis, A.J., Seymour, C.W. y Rosengart, M.R., 2016. Current Murine Models of Sepsis. *Surgical infections*, 17(4), pp.385–393.

Lewis, K., 2001. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), pp.999–1007.

Li, Y. y col., 2016. Colistin-entrapped liposomes driven by the electrostatic interaction: Mechanism of drug loading and *in vivo* characterization. *International journal of pharmaceutics*, 515(1-2), pp.20–29.

Lilley, E. y col., 2015. Refinement of animal models of sepsis and septic shock. *Shock*, 43(4), pp.304–316.

Lin, Y., Leach, W.J. y Ammons, W.S., 1996. Synergistic effect of a recombinant N-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein and cefamandole in treatment of rabbit gram-negative sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(1), pp.65–69.

Lipinska-Gediga, M., 2016. Sepsis and septic shock-is a microcirculation a main player? *Anaesthesiology intensive therapy*, 48(4), pp.261–265.

Lipuma, J.J., 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), pp.299–323.

LM, F. y col., 2009. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp.1–6.

Lorne, E., Dupont, H. y Abraham, E., 2010. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine? *Intensive care medicine*, 36(11), pp.1826–1835.

Lovati, A.B. y col., 2017. Animal Models of Implant-Related Low-Grade Infections. A Twenty-Year Review. *Advances in experimental medicine and biology*, 971(157), pp.29–50.

Maes, K. y col., 2014. Strategies to reduce aspecific adsorption of peptides and proteins

in liquid chromatography-mass spectrometry based bioanalyses: an overview. *Journal of chromatography. A*, 1358, pp.1–13.

Mah, T.-F., 2012. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(9), pp.1061–1072.

Mah, T.F. y O'Toole, G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), pp.34–39.

Mahlapuu, M. y col., 2016. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, p.194.

Manchandani, P. y col., 2016. Characterization of Polymyxin B Biodistribution and Disposition in an Animal Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), pp.1029–1034.

Maragakis, L.L. y col., 2004. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with pulsatile lavage wound treatment. *JAMA*, 292(24), pp.3006–3011.

Martin, G.S., 2012. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(6), pp.701–706.

Martin, G.S. y Bernard, G.R., 2002. Management of Respiratory Dysfunction in Patients with Severe Sepsis. In *The Sepsis Text*. Boston: Kluwer Academic Publishers, pp. 455–477.

Martin, L., De Santis, R., y col., 2015. The Synthetic Antimicrobial Peptide 19-2.5 Interacts with Heparanase and Heparan Sulfate in Murine and Human Sepsis. *Plos One*, 10(11), p.e0143583.

Martin, L., Schmitz, S., y col., 2015. Peptide 19-2.5 inhibits heparan sulfate-triggered inflammation in murine cardiomyocytes stimulated with human sepsis serum. *Plos One*, 10(5), p.e0127584.

Martin, L., van Meegern, A., y col., 2015. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. *Frontiers in Immunology*, 6(10), p.23.

- Martis, N., Leroy, S. y Blanc, V., 2014. Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. *The Journal of infection*, 69(1), pp.1–12.
- Mas, N. y col., 2015. Análisis comparativo de pacientes ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos españolas por causa médica y quirúrgica. *Medicina Intensiva*, 39(5), pp.279–289.
- Mayr, F.B., 2010. Infection Rate and Acute Organ Dysfunction Risk as Explanations for Racial Differences in Severe Sepsis. *JAMA*, 303(24), pp.2495–2503.
- Mayr, F.B., Yende, S. y Angus, D.C., 2013. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5(1), pp.4–11.
- McCarthy, M., 2017. Woman dies after infection with bacteria resistant to all antibiotics available in US. *British Medical Journal*, 356, p.j254.
- Melzer, M. y Petersen, I., 2007. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *The Journal of infection*, 55(3), pp.254–259.
- Mendu, M.L. y col., 2012. Relationship between neighborhood poverty rate and bloodstream infections in the critically ill. *Critical Care Medicine*, 40(5), pp.1427–1436.
- Mermel, L.A. y col., 2009. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, 49(1), pp.1–45.
- Milović, N.M. y col., 2005. Immobilized N-alkylated polyethylenimine avidly kills bacteria by rupturing cell membranes with no resistance developed. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(6), pp.715–722.
- Mohanty, S. y col., 2013. Phenotypic characterization and colistin susceptibilities of carbapenem-resistant of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Journal of infection in developing countries*, 7(11), pp.880–887.
- Moore, A.J. y col., 1996. Antimicrobial activity of cecropins. *The Journal of*

antimicrobial chemotherapy, 37(6), pp.1077–1089.

Moss, M., 2005. Epidemiology of sepsis: race, sex, and chronic alcohol abuse. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(7), pp.S490–7.

Murata, H. y col., 2007. Permanent, non-leaching antibacterial surface--2: how high density cationic surfaces kill bacterial cells. *Biomaterials*, 28(32), pp.4870–4879.

Nagai, Y. y col., 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. 3(7), pp.667–672.

Nagaoka, I. y col., 2000. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflammation research*, 49(2), pp.73–79.

Nemzek, J.A., Hugunin, K.M.S. y Opp, M.R., 2008. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comparative medicine*, 58(2), pp.120–128.

Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), pp.593–656.

Nimah, M. y Brill, R.J., 2003. Coagulation dysfunction in sepsis and multiple organ system failure. *Critical Care Clinics*, 19(3), pp.441–458.

Ofek, I. y col., 1994. Antibacterial synergism of polymyxin B nonapeptide and hydrophobic antibiotics in experimental gram-negative infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(2), pp.374–377.

Okamoto, K., Tamura, T. y Sawatsubashi, Y., 2016. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Journal of Intensive Care*, 4(1), p.R82.

Pan, B. y col., 2017. CitH3: a reliable blood biomarker for diagnosis and treatment of endotoxic shock. *Scientific Reports*, 7(1), p.8972.

Park, S.-C., Park, Y. y Hahm, K.-S., 2011. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International journal of molecular sciences*, 12(9), pp.5971–5992.

Parker, S.J. y Watkins, P.E., 2001. Experimental models of Gram-negative sepsis. *British Journal of Surgery*, 88(1), pp.22–30.

Parkins, M.D. y col., 2010. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Infection*, 38(1), pp.25–32.

Paterson, D.L. y col., 2004. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical infectious diseases*, 39(1), pp.31–37.

Pfalzgraff, A. y col., 2016. Synthetic antimicrobial and LPS-neutralising peptides suppress inflammatory and immune responses in skin cells and promote keratinocyte migration. *Scientific Reports*, 6(1), p.31577.

Phoenix, D.A., Dennison, S.R. y Harris, F., 2013. *Cationic Antimicrobial Peptides*, Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. KGaA.

Pier, G.B., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 297(5), pp.277–295.

Piers, K.L., Brown, M.H. y Hancock, R.E., 1994. Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(10), pp.2311–2316.

Pino-Angeles, A., Leveritt, J.M. y Lazaridis, T., 2016. Pore Structure and Synergy in Antimicrobial Peptides of the Magainin Family. E. Tajkhorshid, ed. *PLoS computational biology*, 12(1), p.e1004570.

Plachouras, D. y col., 2009. Population Pharmacokinetic Analysis of Colistin Methanesulfonate and Colistin after Intravenous Administration in Critically Ill Patients with Infections Caused by Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), pp.3430–3436.

Pletzer, D. y Hancock, R.E.W., 2016. Antibiofilm Peptides: Potential as Broad-Spectrum Agents G. A. O'Toole, ed. *Journal of Bacteriology*, 198(19), pp.2572–2578.

- Pogue, J.M. y col., 2015. Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(4), pp.302–312.
- Polat, G. y col., 2017. Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches. *The Eurasian journal of medicine*, 49(1), pp.53–58.
- Pompilio, A. y col., 2012. Potential novel therapeutic strategies in cystic fibrosis: antimicrobial and anti-biofilm activity of natural and designed α -helical peptides against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia*. *BMC microbiology*, 12(1), p.145.
- Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 56(1), pp.20–51.
- Rabanal, F. y Cajal, Y., 2017. Recent advances and perspectives in the design and development of polymyxins. *Natural product reports*, 34(7), pp.886–908.
- Ramachandran, G., 2013. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. *Virulence*, 5(1), pp.213–218.
- Ramirez, M.S. y Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 13(6), pp.151–171.
- Rathinakumar, R., Walkenhorst, W.F. y Wimley, W.C., 2009. Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. *Journal of the American Chemical Society*, 131(22), pp.7609–7617.
- Reinhart, K. y Karzai, W., 2001. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Critical Care Medicine*, 29(7), pp.S121–5.
- Reinholz, M., Ruzicka, T. y Schaubert, J., 2012. Cathelicidin LL-37: an antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Annals of dermatology*, 24(2), pp.126–135.
- Rice, T.W. y col., 2010. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 38(8), pp.1685–1694.

- Rosenfeld, Y., Papo, N. y Shai, Y., 2006. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *The Journal of biological chemistry*, 281(3), pp.1636–1643.
- Ruiz-Ruigomez, M. y col., 2016. Direct Electrical Current Reduces Bacterial and Yeast Biofilm Formation. *International journal of bacteriology*, 2016(2), pp.9727810–6.
- Saladino, R. y col., 1994. Efficacy of a recombinant endotoxin neutralizing protein in rabbits with Escherichia coli sepsis. *Circulatory shock*, 42(2), pp.104–110.
- Samuelsen, Ø. y col., 2004. Anti-complement effects of lactoferrin-derived peptides. *FEMS immunology and medical microbiology*, 41(2), pp.141–148.
- Sánchez-Gómez, S. y col., 2015. Antimicrobial activity of synthetic cationic peptides and lipopeptides derived from human lactoferricin against Pseudomonas aeruginosa planktonic cultures and biofilms. *BMC microbiology*, 15(1), p.137.
- Sánchez-Gómez, S. y col., 2008. Comparative analysis of selected methods for the assessment of antimicrobial and membrane-permeabilizing activity: a case study for lactoferricin derived peptides. *BMC microbiology*, 8(1), p.196.
- Sánchez-Gómez, S. y col., 2011. Structural features governing the activity of lactoferricin-derived peptides that act in synergy with antibiotics against Pseudomonas aeruginosa *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), pp.218–228.
- Sans-Serramitjana, E. y col., 2017. Free and Nanoencapsulated Tobramycin: Effects on Planktonic and Biofilm Forms of Pseudomonas. *Microorganisms*, 5(3), p.35.
- Santajit, S. y Indrawattana, N., 2016. Review Article Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, pp.1–8.
- Sawa, T. y col., 1998. Evaluation of antimicrobial and lipopolysaccharide-neutralizing effects of a synthetic CAP18 fragment against Pseudomonas aeruginosa in a mouse model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(12), pp.3269–3275.
- Schabbauer, G., 2012. Polymicrobial sepsis models: CLP versus CASP. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 9(1), pp.e17–e21.

Schwarz, S. y Johnson, A.P., 2016. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 71(8), pp.2066–2070.

Selsted, M.E. y col., 1992. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *The Journal of biological chemistry*, 267(7), pp.4292–4295.

Shankar-Hari, M. y col., 2016. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Journal of the American Medical Association*, pp. 775–787.

Shimada, N. y col., 2000. Hemoperfusion with Polymyxin B-Immobilized Fiber Reduces Urinary Podocyte Numbers in Patients with Severe Sepsis. *Nephron*, 85(4), pp.364–365.

Shrivastava, S., Shrivastava, P. y Ramasamy, J., 2017. World Health Organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Journal of Medical Society*, 0(0), p.0.

Shukla, A., 2012. Updates on role of human recombinant activated protein C in patients with sepsis and severe sepsis: Changed scenario after prowess shock trial. *Indian Journal of Anaesthesia*, 56(6), p.597.

Siegman-Igra, Y. y col., 1993. Nosocomial acinetobacter meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clinical Infectious Diseases*, 17(5), pp.843–849.

Simmons, J. y Pittet, J.-F., 2015. The coagulopathy of acute sepsis. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 28(2), pp.227–236.

Smith, R.A., M'ikanatha, N.M. y Read, A.F., 2014. Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action. *Health Communication*, 30(3), pp.309–314.

Soi, V. y col., 2016. Prevention of catheter-related bloodstream infections in patients on hemodialysis: challenges and management strategies. *International journal of nephrology and renovascular disease*, 9, pp.95–103.

Sommerfeld Ross, S. y col., 2017. Dry powder aerosols to co-deliver antibiotics and

nutrient dispersion compounds for enhanced bacterial biofilm eradication. *International journal of pharmaceutics*, 531(1), pp.14–23.

Stokes, W.S., 2002. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR journal*, 43 Suppl, pp.S31–8.

Svenson, J. y col., 2007. Albumin binding of short cationic antimicrobial micropeptides and its influence on the in vitro bactericidal effect. *Journal of medicinal chemistry*, 50(14), pp.3334–3339.

Tabah, A. y col., 2012. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROACT International Cohort Study. *Intensive care medicine*, 38(12), pp.1930–1945.

Tani, T. y col., 2010. Extracorporeal removal of endotoxin: the polymyxin B-immobilized fiber cartridge. *Contributions to nephrology*, 167, pp.35–44.

Terayama, T. y col., 2017. Polymyxin B Hemoperfusion for Sepsis and Septic Shock: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Surgical infections*, 18(3), pp.225–233.

Tong, S.Y.C. y col., 2015. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), pp.603–661.

Tran, T.B. y col., 2016. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet? *International journal of antimicrobial agents*, 48(6), pp.592–597.

Tse, M.T., 2013. Trial watch: Sepsis study failure highlights need for trial design rethink. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), pp.334–334.

Tsertsvadze, A. y col., 2016. Community-onset sepsis and its public health burden: a systematic review. *Systematic reviews*, 5(1), p.81.

Vaara, M., 2009. New approaches in peptide antibiotics. *Current opinion in pharmacology*, 9(5), pp.571–576.

Vaara, M. y Porro, M., 1996. Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria. *Antimicrobial Agents*

and Chemotherapy, 40(8), pp.1801–1805.

Vaara, M. y Vaara, T., 1983. Sensitization of Gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide. 303(5917), pp.526–528.

Vallespi, M.G. y col., 2000. A Limulus antilipoplysaccharide factor-derived peptide exhibits a new immunological activity with potential applicability in infectious diseases. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7(4), pp.669–675.

van Hal, S.J. y col., 2012. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), pp.362–386.

Vidaillac, C., Benichou, L. y Duval, R.E., 2012. In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9), pp.4856–4861.

Wakabayashi, H., Takase, M. y Tomita, M., 2003. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Current pharmaceutical design*, 9(16), pp.1277–1287.

Wattiau, P., Boland, C. y Bertrand, S., 2011. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and environmental microbiology*, 77(22), pp.7877–7885.

Westerhoff, H.V. y col., 1995. Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. *European journal of biochemistry*, 228(2), pp.257–264.

Wood, T.K., 2017. Strategies for combating persister cell and biofilm infections. *Microbial Biotechnology*, 473, p.216.

Wright, S.D. y col., 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science*, 249(4975), pp.1431–1433.

Xu, L., Sun, X. y Ma, X., 2017. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), p.18.

Yala, J.-F. y col., 2011. Elaboration of antibiofilm materials by chemical grafting of an antimicrobial peptide. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(3), pp.623–634.

Yan, H. y Hancock, R.E., 2001. Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), pp.1558–1560.

Yassien, M. y col., 1995. Modulation of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by quinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(10), pp.2262–2268.

Young, L.S., Sabel, A.L. y Price, C.S., 2007. Epidemiologic, clinical, and economic evaluation of an outbreak of clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a surgical intensive care unit. *Infection control and hospital epidemiology*, 28(11), pp.1247–1254.

Zasloff, M., 2002. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *Lancet (London, England)*, 360(9340), pp.1116–1117.

Zhang, Z. y col., 2017. Early management of sepsis with emphasis on early goal directed therapy: AME evidence series 002. *Journal of thoracic disease*, 9(2), pp.392–405.

Zijlstra, S. y col., 1997. Validation of the limulus amoebocyte lysate (LAL) test for routine PET radiopharmaceuticals. *Applied Radiation and Isotopes*, 48(1), pp.51–54.

8. Anexo I

9. Anexo II

10. Anexo III

Sei wie du bist, tu was du wirklich willst. Aus Lust und Laune.

ORIGINAL ARTICLE

Coupling killing to neutralization: combined therapy with ceftriaxone/Pep19-2.5 counteracts sepsis in rabbits

Sergio Bárcena-Varela¹, Guillermo Martínez-de-Tejada¹, Lukas Martin², Tobias Schuerholz³, Ana Gloria Gil-Royo⁴, Satoshi Fukuoka⁵, Torsten Goldmann^{6,7,8}, Daniel Droemann^{8,9}, Wilmar Correa¹⁰, Thomas Gutschmann¹⁰, Klaus Brandenburg¹⁰ and Lena Heinbockel¹⁰

Sepsis, which is induced by severe bacterial infections, is a major cause of death worldwide, and therapies combating the disease are urgently needed. Because many drugs have failed in clinical trials despite their efficacy in mouse models, the development of reliable animal models of sepsis is in great demand. Several studies have suggested that rabbits reflect sepsis-related symptoms more accurately than mice. In this study, we evaluated a rabbit model of acute sepsis caused by the intravenous inoculation of *Salmonella enterica*. The model reproduces numerous symptoms characteristic of human sepsis including hyperlactatemia, hyperglycemia, leukopenia, hypothermia and the hyperproduction of several pro-inflammatory cytokines. Hence, it was chosen to investigate the proposed ability of Pep19-2.5—an anti-endotoxic peptide with high affinity to lipopolysaccharide and lipoprotein—to attenuate sepsis-associated pathologies in combination with an antibiotic (ceftriaxone). We demonstrate that a combination of Pep19-2.5 and ceftriaxone administered intravenously to the rabbits (1) kills bacteria and eliminates bacteremia 30 min post challenge; (2) inhibits Toll-like receptor 4 agonists in serum 90 min post challenge; (3) reduces serum levels of pro-inflammatory cytokines (interleukin-6 and tumor necrosis factor α); and (4) reverts to hypothermia and gives rise to temperature values indistinguishable from basal levels 330 min post challenge. The two components of the combination displayed synergism in some of these activities, and Pep19-2.5 notably counteracted the endotoxin-inducing potential of ceftriaxone. Thus, the combination therapy of Pep19-2.5 and ceftriaxone holds promise as a candidate for human sepsis therapy.

Experimental & Molecular Medicine (2017) 49, e345; doi:10.1038/emm.2017.75; published online 16 June 2017

INTRODUCTION

Sepsis is one of the leading causes of death in intensive care units worldwide, with mortality rates ranging from 10% to over 40% depending on the clinical associations.¹ Triggered by an infection and characterized by an inflammatory state affecting the patient's whole body, sepsis accounts for 300–1000 cases per 100 000 persons in the United States.² Thus, the urgency for an effective therapy against sepsis cannot be overemphasized.

The established animal models of sepsis differ in their response to the triggering factor of inflammation and

consequently in their reaction to medications. This may partly explain the failure of multiple clinical trials investigating drug strategies for sepsis therapy during recent years. Moreover, the difficulties encountered are likely due to major differences in immune system functioning between animal species and humans.³ Animal sepsis models widely vary and include intraperitoneal (i.p.)/intravenous (i.v.) injection of lipopolysaccharide (LPS) or dead bacteria (endotoxemia), inoculation of live bacteria or specific surgeries such as cecal ligation and puncture, colon ascendens stent peritonitis and polymicrobial

¹Department of Microbiology and Parasitology, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; ²Department of Intensive Care and Intermediate Care, University Hospital Aachen, Aachen, Germany; ³Department of Anaesthesia and Intensive Care, University of Rostock, Rostock, Germany; ⁴Department of Pharmacology and Toxicology, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; ⁵National Institute of Advanced Industrial Science and Technology AIST, Takamatsu, Japan; ⁶Department of Pathology, University Hospital of Luebeck, Luebeck, Germany; ⁷Department of Pathology, Leibniz Research Center, Borstel, Germany; ⁸Airway Research Center North (ARCN), Member of the German Center for Lung Research (DZL), Großhansdorf, Germany; ⁹Medical Clinic III, Pulmonology/Infectious Diseases, University Hospital Schleswig-Holstein, Luebeck, Germany and ¹⁰Division of Biophysics, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Borstel, Germany

Correspondence: Professor K Brandenburg, Division of Biophysics, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Parkallee 10, Borstel D-23845, Germany.

E-mail: kbrandenburg@fz-borstel.de

Received 29 October 2016; revised 5 January 2017; accepted 23 January 2017

peritoneal contamination and infection.⁴ Although surgical models are known to reflect more accurately the clinical scenario, they usually require a long-term evaluation, and their mortality rates vary depending on surgical efficiency. On the other side, non-surgical models (for example, inoculation of cells or antigens into the animal) are widely used for acute sepsis evaluation, being highly controlled and less laborious than models relying on the animal microbiota as the infectious agent.⁵

Furthermore, most tested therapies aim at killing the bacteria or modulating the immune response. Yet, these treatments do not address the major underlying cause of sepsis—that is, the release of toxins (pathogenicity factors) by the bacteria.⁶ Thus, besides the standard supportive intensive care treatment, no satisfactory specific therapeutic option exists to date. Current therapies with antibiotics aim at killing bacteria, but this frequently leads to the release of the pathogenicity factors, hence aggravating the patient's inflammatory response.⁷ Considering the rapid increase in multiresistant strains and the lack of newly approved antibiotics, the situation of the most severely ill patients in intensive care units becomes more and more threatening.

One approach alternative to conventional antibiotic-based therapy entails the use of antimicrobial peptides (AMPs). Until now, there are only a limited number of approved AMP drugs available, although daptomycin⁸ (against skin and skin structure infections) and colistin (against multiresistant Gram-negative bacteria) are two relevant agents. Thus, the recent development of a synthetic anti-LPS peptide, Pep19-2.5 (Aspidasept), appears promising also for a broader application.⁹ Recently, it has been demonstrated that this compound has high affinity not only for Gram-negative LPS but also for Gram-positive lipoprotein (LP) in various *in vitro* and *in vivo* mouse experiments.¹⁰ Pep19-2.5 has also been shown to be protective in a murine model of septicemia as well as in cecal ligation and puncture-challenge, causing a considerable decrease in inflammation that correlated with a survival benefit of the animals.^{10,11} Mouse models have drawbacks with regard to the situation in human sepsis patients and should therefore be complemented with studies in more relevant animals (rabbits or pigs) after initial testing in the practical model.¹² One of the most prominent differences between mouse and man is the relative insensitivity of mice with respect to the induction of inflammation, particularly when LPS is used as an inducer. In fact, along with LPS, animals must be co-administered with galactosamine to sensitize them to endotoxin and cause a pro-inflammatory response similar to that of humans.^{13,14} The dose (LD₅₀) values of LPS inducing severe illness and hypotension in mice and rats are 1000- to 10 000-fold higher, respectively, than in humans.¹⁵ By contrast, rabbits are considerably more responsive to LPS, and results from preclinical studies in this non-rodent species are expected to better predict the results of clinical trials.¹⁶

The aim of this study was to use a novel rabbit model of sepsis to evaluate the tolerability and therapeutic efficacy of a drug combination that was previously shown to be

protective in mice. In this model, bacteremia was induced in the animals by injecting live cells of Gram-negative (*Salmonella*) bacteria. The combined treatment of the antibiotic ceftriaxone to kill the bacteria and Pep19-2.5 to neutralize released LPS was evaluated. The data showed that this combination is able to drastically reduce the strong inflammation as evidenced by a drop in the levels of interleukin 6 (IL-6) and tumor-necrosis-factor α (TNF α). Endotoxin detection in the blood of the animals showed that this decrease in cytokine concentrations is directly correlated with a marked reduction of the detectable LPS concentration in serum. Essentially, we demonstrate that Pep19-2.5 and ceftriaxone work in conjunction to kill bacteria and reduce inflammation.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Salmonella enterica serovar Minnesota (SF1114, smooth form) was grown in tryptic soy broth (TSB; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) at 37 °C with orbital shaking. For inoculum preparation, an overnight liquid culture was centrifuged (4000 g, 5 min), and the pellet was suspended in sterile saline and adjusted to OD_{600nm} = 1.0, approximately corresponding to 3.7×10^9 colony-forming units (CFUs) per ml. For viable cell counting, aliquots were plated onto TSB agar and were incubated for 24 h.

Peptide synthesis

The synthesis and purification of Pep19-2.5 (Lot 1053821) was previously described,¹⁷ and the batch used in the present work was produced under GMP conditions by BACHEM (Bubendorf; Switzerland). The purity was >95%, and the amino-acid sequence of this 20' mer is GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG, containing a C-terminal amidation.

Animal experiments

All experiments were approved by the Animal Ethical Committee of the University of Navarra (protocol number: 182-12). Care and handling of the animals were in accordance with the ICH and OECD guidelines. Male New Zealand rabbits (2–2.5 kg in weight; Granja San Bernardo S.L., Tulebras, Spain) were housed under standard conditions with free access to food and water. The animals were granted a 7-day acclimatization period prior to experimentation, and they were food fasted 12–14 h before inoculation. Each day, three animals were challenged, treated and killed. The inoculum consisted of 1 ml of sterile saline approximately containing 3.7×10^9 CFU of *S. enterica* serovar Minnesota (Supplementary Figure S1). Animals ($n = 6$ per experimental group) were intravenously (i.v.) inoculated by the marginal ear vein. Treatments were administered i.v. with a total volume of 2 ml immediately after the inoculum by the marginal ear and consisted of ceftriaxone (15 mg kg⁻¹; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) dissolved in saline and/or Pep19-2.5 (5 mg kg⁻¹) dissolved in saline. A group of animals was left untreated and received only vehicle. Blood samples were extracted from the marginal ear vein at different time points post challenge (0, 2, 30, 90 and 180 min). Fifteen minutes before each blood extraction, acepromazine (1 mg kg⁻¹; Sigma-Aldrich) was i.v. administered for sedative and vasodilator purposes. All the procedures were performed aseptically and using sterile labware. The rectal temperature was monitored at 0, 90, 150, 210 and 330 min post challenge. Six hours after inoculation, the

animals were killed by the administration of a lethal dose of T-61 (Sigma-Aldrich).

Blood and serum testing

For bacteremia analysis, whole blood was serially diluted (1:10 in sterile saline) and plated in TSB Agar plates. Viable counts were determined after 16–18 h of incubation at 37 °C. For serum preparation, blood samples (4 ml) were taken under sterile conditions, centrifuged (3000 r.p.m., 10 min, 4 °C) using serum-separating tubes and stored at –80 °C for subsequent analysis. Fluoride/EDTA and EDTA-containing vacutainer tubes were used for lactate quantification and hematological analysis, respectively (Sysmex XT-1800i; Sant Just Desvern, Spain). Biochemical parameters were determined using a Hitachi-911 automatic analyzer (Hitachi Medical Systems, Madrid, Spain).

Post-mortem analyses

Post-mortem samples of the spleen, liver, kidneys and lungs were extracted and weighed, and 1 g of each was homogenized and serially diluted for plating and viable counting. The remainder of the organ was fixed by immersion in 4% formaldehyde and was subsequently prepared for inclusion, cutting and hematoxylin–eosin staining. All the procedures were performed aseptically and using sterile labware. Anatomopathological analyses of histological preparations were carried out using the Anatomopathologic Diagnostic Service for Laboratory Animals (University of Zaragoza, Spain).

Endotoxin and cytokine quantification

Endotoxin was indirectly quantified by measuring IL-8 in a Toll-like receptor (TLR)4-expressing cell line that responds to LPS by secreting this cytokine (HEK-293/TLR4; kindly provided by Dr Juan José Lasarte). To account for the presence of potential IL-8 inducing compounds other than LPS in rabbit serum, IL-8 levels were measured in an identical cell line lacking the TLR4 receptor (HEK-293/LacZ). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 4.5 g l⁻¹ glucose, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin/streptomycin and blasticidin (5 µg ml⁻¹ for each; GIBCO; Thermo Fisher Scientific, Alcobendas, Spain) at 37 °C in 5% CO₂. In the case of HEK-293/TLR4, cells were supplemented with 25 µg ml⁻¹ hygromycin B (Invivogen Ultrapure; InvivoGen, San Diego CA, USA). Cells (5 × 10⁵) were exposed to rabbit serum (1:10 dilution) for 24 h, and IL-8 was then quantified in the supernatants by solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems; Madrid, Spain). Assays were performed in triplicate. The serum levels of IL-6 and TNFα were determined using solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems) following the manufacturer's instructions.

Statistics

The data were statistically analyzed using SPSS V15.0 software (IBM España, Madrid, Spain). analysis of variance was applied to study the potential differences in the bacterial load, endotoxin levels, cytokine concentrations and biochemical parameters. If there was homogeneity of variances, parametric Student–Neuman–Keuls *post hoc* test was conducted. Otherwise, the Tamhane test was applied. For the group comparisons of temperatures at different time points, repeated measures factorial design-analysis of variance was applied, followed by Student's *t*-test for related measures, adjusting the average s.d. Graphics were prepared using GraphPad Prism V6.01 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

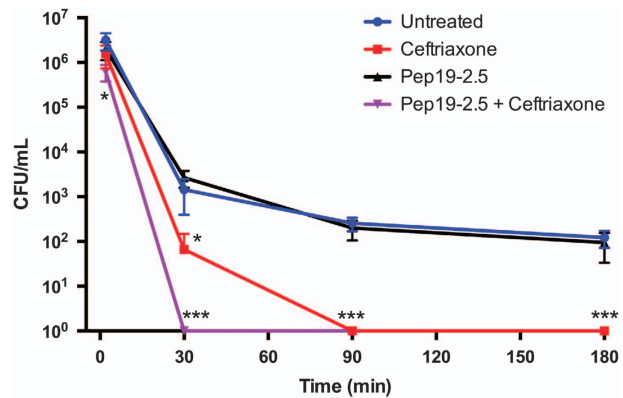


Figure 1 Kinetics of the bacteremia in rabbits infected with *S. enterica* and subsequently treated with Pep19-2.5 and/or ceftriaxone. At time 0, animals ($n=6$ per group) received an i.v. injection containing 3.7×10^9 CFU of *S. enterica* serovar Minnesota. Immediately afterwards, animals were treated with ceftriaxone (15 mg kg^{-1} ; i.v.) and/or Pep19-2.5 (5 mg kg^{-1} ; i.v.). A group of animals was left untreated and received only vehicle (saline). At the indicated time points, whole blood was extracted, serially diluted and plated for viable counting. Differences were statistically analyzed using analysis of variance followed by *post hoc* tests (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

RESULTS

Kinetics of bacteremia

To evaluate whether the combined administration of Pep19-2.5 and ceftriaxone reduces the bacterial burden in rabbits, we intravenously inoculated a group of New Zealand rabbits with $\sim 3.7 \times 10^9$ CFU of *S. enterica*. Immediately after inoculation, the animals received a single i.v. administration of Pep19-2.5 and ceftriaxone. As a control, we treated the animals with either one of those therapies, whereas a third group received only vehicle (saline). In addition, to verify that inocula prepared in different days had a comparable size, we plated each bacterial suspension on solid medium and performed viable counts (Supplementary Figure S1). Interestingly, at the earliest time point (2 min post challenge), the combined therapy was the only treatment capable of reducing bacteremia (Figure 1). The two-component therapy also outperformed the single ceftriaxone-based therapy 30 min post challenge because the former was the only treatment displaying sterilizing activity (Figure 1). By contrast, Pep19-2.5 by itself displayed no detectable antibacterial activity at any time point.

Endotoxin levels in rabbit serum

To investigate whether any of the treatments had LPS-neutralizing activity, we quantified endotoxin levels in rabbit serum 90 min post challenge. We first tried to directly measure LPS levels using an *Limulus* amoebocyte lysate-based method, but this approach rendered poor and unreliable results, likely due to serum compounds interfering with the *Limulus* amoebocyte lysate test. To circumvent this problem, we quantified endotoxin concentrations in serum using TLR4-expressing cells that respond to LPS by secreting IL-8, which was subsequently measured by enzyme-linked

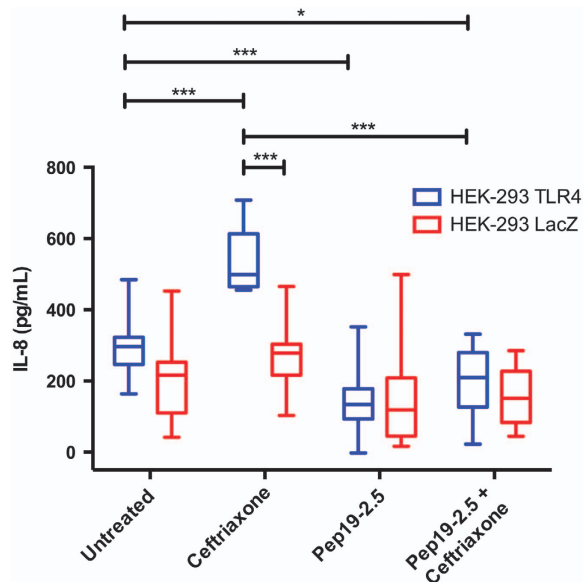


Figure 2 Quantification of the levels of TLR4 agonists in rabbit serum 90 min post challenge. The levels of TLR4 agonist (for example, LPS) were quantified in rabbit serum by measuring the production of IL-8 in TLR4-expressing cells (HEK-293/TLR4) incubated with serum samples ($n=6$ per group). As a control to account for potential IL-8-inducing compounds other than LPS, a duplicate measurement was performed in an identical cell line lacking the TLR4 receptor (HEK-293/LacZ). Cells were exposed to rabbit serum for 24 h, and IL-8 was quantified in the supernatants by solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Assays were performed in triplicate, and the results were analyzed using analysis of variance followed by *post hoc* tests ($*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$). The horizontal line within the boxes represents the median, whereas the lower part represents the 25th percentile, and the upper part represents the 75th percentiles. The whiskers represent the range of the values.

immunosorbent assay. In control experiments, we demonstrated that LPS quantitatively induced IL-8 secretion in these cells (data not shown). To account for the presence of potential IL-8-inducing compounds other than LPS in rabbit serum, IL-8 levels were measured in an identical cell line lacking the TLR4 receptor. As shown in Figure 2, the concentrations of TLR4 agonists in serum from ceftriaxone-treated rabbits were much higher than those measured in infected rabbits not treated with the antibiotic. This difference was not detectable in cells lacking TLR4. In marked contrast to the liberation of TLR4 agonists by ceftriaxone, Pep19-2.5 showed a potent ability to neutralize TLR4 agonists (Figure 2). Notably, rabbits treated with the combined therapy had very low serum levels of TLR4 agonists, demonstrating that Pep19-2.5 counteracts the LPS-releasing potential of ceftriaxone.

Concentration of pro-inflammatory cytokines

Based on the ceftriaxone-related release of TLR4 agonist, we next investigated the pro-inflammatory response of rabbits on *S. enterica* challenge. As shown in Figure 3, we measured the serum concentrations of TNF α and IL-6 at 90 min and 180 min post challenge, respectively, coinciding with the peak

concentration of each cytokine in serum, as determined in preliminary assays (Supplementary Figure S2). Ceftriaxone treatment displayed a trend to increase both the IL-6 and TNF α serum levels compared with untreated animals. By contrast, Pep19-2.5 not only lacked pro-inflammatory activity when given alone but also counteracted the IL-6- and TNF α -inducing ability of ceftriaxone. Notably, animals receiving the combined therapy had levels of IL-6 even lower than those measured in untreated animals (Figure 3a), suggesting that the two components of the combination act in synergy to neutralize this cytokine.

Metabolic parameters

Abnormally high serum values of both glucose and lactate (that is, hyperglycemia and hyperlactatemia, respectively) are common during acute infection, particularly in patients with sepsis. To investigate whether our rabbit model reproduces these symptoms, we measured the serum levels of glucose and lactate throughout the course of the experiment. Inoculation of *S. enterica* caused a significant and progressive increase in glucose and lactate levels that was even more severe for the latter marker (Supplementary Figure S3). Neither the single nor combined treatment, however, was found to significantly reverse these increments at any time point (Supplementary Figure S3).

Hematological markers

Infections are known to induce leukocytosis, whereas leukopenia is characteristic of acute sepsis due to overwhelming infections. As shown in Supplementary Figure S4, the inoculation of *S. enterica* caused a severe decrease in white blood cells, which was of similar magnitude in both the untreated and treated groups (~60% of the initial value).

Temperature monitoring

Sepsis in humans is known to induce either hypothermia or hyperthermia. To study whether any of these symptoms could be detected in our animal model, we monitored the rectal temperature of all the animals throughout the assay. As shown in Figure 4, the inoculation of *S. enterica* markedly reduced the rabbit temperature from 38°C at the beginning of the experiment to ~35.5°C at the late time points post challenge (330 min). The kinetics of hypothermia in animals treated with Pep19-2.5 tended to be more rapid and to reach lower temperature values, but this trend was not significant. However, the apparent pro-inflammatory activity exhibited by ceftriaxone was not associated with aggravated hypothermia compared with untreated animals. Remarkably, when ceftriaxone was administered combined with Pep19-2.5, the two compounds acted jointly, leading to less-intense hypothermia (Figure 4). This convergent activity reverted hypothermia and resulted in a rise of the temperature 330 min after *S. enterica* challenge that was indistinguishable from basal levels (Figure 4).

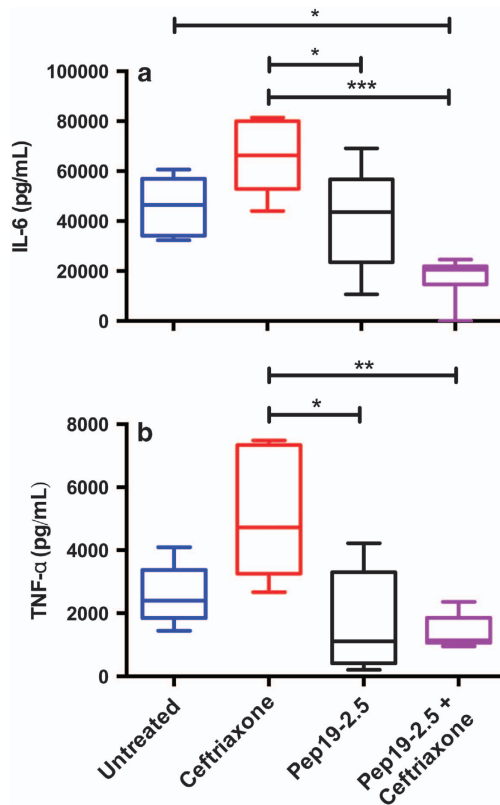


Figure 3 Quantification of the levels of IL-6 and TNF α in rabbit serum at different time points post challenge. IL-6 (a) and TNF α (b) were quantified in animal sera ($n=6$ per group) by solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay at 180 min and 90 min post challenge, respectively, coinciding with the peak concentration of each cytokine (Supplementary Figure S2). Assays were performed in triplicate, and the results were analyzed using analysis of variance followed by *post hoc* tests (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$). The horizontal line within the boxes represents the median, whereas the lower part represents the 25th percentile, and the upper part represents the 75th percentiles. The whiskers represent the range of the values.

Bacterial load in organs

The post-mortem quantification of the bacterial load in selected organs revealed high numbers of viable bacteria in the liver, spleen, lungs and kidneys of all studied rabbits (Figures 5a–d). Animals receiving ceftriaxone (either alone or combined with Pep19-2.5) showed lower levels of CFUs in the kidneys and liver (Figures 5a and c, respectively). However, the efficiency of the combined treatment to reduce bacterial colonization in the lungs was lower than that of the ceftriaxone single treatment (Figure 5b). When Pep19-2.5 was administered as a single treatment, it increased the bacterial load in the liver compared with that in untreated animals (Figure 5c) and showed a non-significant trend to do so in the kidneys and lungs (Figures 5a, b and d). This phenomenon was not detected in the spleen.

To indirectly quantify the extent of the inflammatory response in animals, we measured the weight of the liver, spleen, lung and kidney of the rabbits. All organs studied

remained within the normal weight ranges at the end of the experiment with the exception of the spleen, which showed increased weight in all groups (data not shown).

Histological analysis of the spleen

The presence of splenomegaly prompted us to perform a more detailed histological study to assess potential differences between the groups. In general, microscopic findings were similarly independent of the treatment, but with different intensity (Supplementary Figure S5). Splenitis was confirmed in samples from all groups and was due to the presence of an inflammatory infiltrate of heterophils (that is, rabbit cells equivalent to polynuclear neutrophils). Abundant bacteria were present in this infiltrate. Bacteria were detected both inside macrophages and free in the extracellular space. Bacterial cells frequently appeared distorted likely because of the activation of immune system effectors (Supplementary Figure S5). The previous findings were accompanied by various degrees of hemorrhage in the splenic tissue. Although there were marked individual responses, in general, treatment with Pep19-2.5 either alone or combined with ceftriaxone, was associated with milder alterations and with a lower bacterial burden than in the untreated controls and in animals that received ceftriaxone single treatment (Table 1).

DISCUSSION

The current study demonstrated the therapeutic potential of Pep19-2.5, a synthetic peptide, in combination with the antibiotic ceftriaxone in a rabbit model of sepsis. The dual therapy of Pep19-2.5 and ceftriaxone reduced both the bacterial load (Figures 1 and 5) and endotoxin levels in serum (Figure 2), causing a considerable drop in the production of IL-6 (Figure 3a and Supplementary Figure S2A) and TNF α (Figure 3b and Supplementary Figure S2B). Moreover, we found an abrogation of hypothermia and a re-establishment of normal rectal temperature (Figure 4), as well as milder alterations and a lower bacterial burden in the spleens of Pep19-2.5/ceftriaxone-treated animals (Table 1).

Despite the intense research and innumerable efforts made in the last decades to develop therapies against sepsis, only modest improvements were introduced in the management of septic patients.¹⁶ The standard therapy of sepsis comprises an antimicrobial treatment in conjunction with supportive therapies (for example, hemodynamic stabilization and airway management).¹⁸ In many cases, however, this treatment does not prevent the heavy and fast onset of inflammation characteristic of sepsis. Possible reasons for this failure involve the release of inflammation-inducing toxins (that is, LPS and LP) from the cell envelopes of bacteria triggered by various antibiotics,¹⁹ which may worsen the patient's pro-inflammatory response. Thus, to be efficient, sepsis therapy must combat the bacterial infection while simultaneously being capable to decrease the inflammatory reaction. To achieve this double objective, we used a classical antibiotic, ceftriaxone, to kill the bacteria and Pep19-2.5 to neutralize endotoxin.

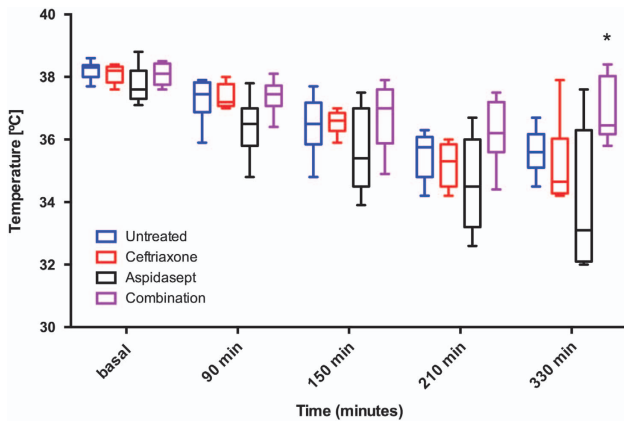


Figure 4 Effect of treatments on rabbit temperature 330 min post challenge. The rectal temperature of each animal group ($n=6$) was monitored before (designated as 'basal' in the figure) and at a progressively later time points post challenge (until 330 min). For group comparisons of the temperatures at different time points, repeated measures factorial design-analysis of variance was performed, followed by Student's *t*-test for related measures, adjusting the average standard deviation. The asterisk indicates the only animal group with a rectal temperature indistinguishable from the control (that is, rabbits receiving the combined treatment, $P<0.05$). The horizontal line within the boxes represents the median, whereas the lower part represents the 25th percentile, and the upper part represents the 75th percentiles. The whiskers represent the range of the values.

The anti-endotoxic activity of Pep19-2.5 shown in our current work extends previous studies revealing that Pep19-2.5 has LPS-neutralizing capacity in *in vitro* assays and that this activity is responsible for the survival benefit of endotoxemic mice treated with the peptide.¹⁷ Using isothermal titration calorimetry, we confirmed the high-affinity binding of Pep19-2.5 to not only purified LPS but also heat-killed Gram-negative and Gram-positive bacterial cells (*S. enterica* Minnesota and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, respectively).²⁰ Nevertheless, it is possible that the immunomodulating activity displayed by Pep19-2.5 in the present work is not only due to the peptide's ability to bind and inactivate LPS but also to its inherent capacity to downregulate the inflammatory response.¹¹ Using mouse models of endotoxemia and septicemia, we previously demonstrated the therapeutic efficacy of Pep19-2.5 in combination with antibiotics, including ceftriaxone.¹⁰ In the current study, the rabbit was chosen as the model organism because it is assumed to more closely reflect the response of the human immune system than mice, which are the most commonly used animals in sepsis research.^{16,21} In fact, rabbits are notably less resistant to LPS than mice, although these non-rodents are still far from the exquisite sensitivity of humans to endotoxin. Thus, in current human studies, 2 ng kg^{-1} of LPS were used to induce endotoxemia;^{22–24} however, in rabbits, a range of $1\text{--}10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ is applied in i.v. applications.^{25,26} Nevertheless, these acute endotoxemia models do not reflect the progressive course of a real infection and, even less so, the interplay between the different antigenic stimuli and components of the immune

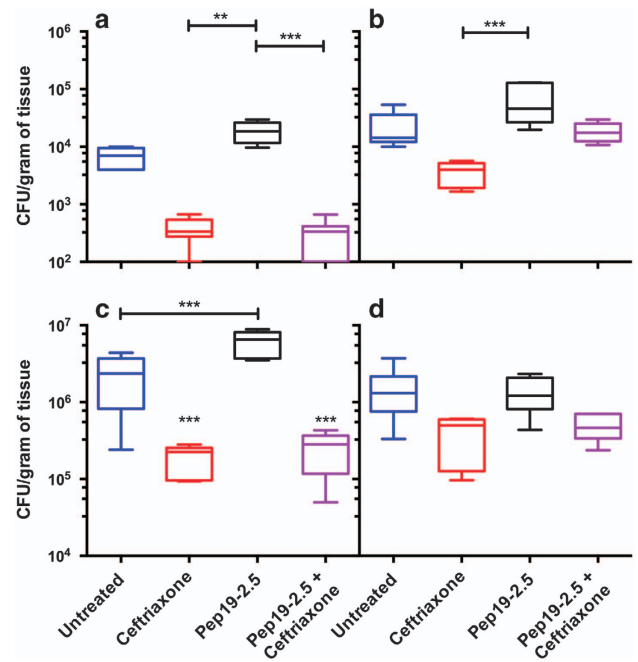


Figure 5 Post-mortem quantification of the bacterial load in selected organs. Post-mortem samples of the kidneys (a), lungs (b), liver (c) and spleen (d) were extracted and weighed. One gram of each sample was homogenized and serially diluted for plating and viable counting. Differences were statistically analyzed using analysis of variance followed by *post hoc* tests ($*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$). The horizontal line within the boxes represents the median, whereas the lower part represents the 25th percentile, and the upper part represents the 75th percentiles. The whiskers represent the range of the values.

system that is characteristic of an infectious process. By contrast, surgical models, such as cecal ligation and puncture, do reflect the pathophysiological features of human sepsis; however, these models use uncharacterized mixtures of bacterial populations as the endotoxic stimulus, thereby hindering the intra-assay and inter-assay reproducibility.²⁷ For these reasons, sepsis was induced in our model by the i.v. inoculation of live *S. enterica* cells to resemble an infectious process, while simultaneously ensuring the necessary reproducibility. Furthermore, the induction of bacteremia in our model is of importance because, in one-third of human sepsis cases, it is possible to obtain a blood-positive culture.²⁸ Finally, patients with blood-positive cultures have a higher risk of experiencing cardiovascular events (for example, myocardial infarction) even years after infection.²⁹

Similar to our findings, other authors using different rabbit models of sepsis reported metabolic disorders such as hyperglycemia and hyperlactatemia,^{30,31} and showed that the experimental treatment reduced lactate levels. However, in these studies, animals received therapy before being infected³⁰ or continuous infusion of the agent,³¹ unlike in our study. Similarly, Garcia *et al.*³² reported amelioration of acidosis in a rabbit model in which animals were pre-treated with the experimental drug.

Table 1 Summary of anatomopathological findings in the histological preparations of the rabbit spleen^a

Sample from the indicated animal group	Hemorrhage	Degree of necrosis	Degree of splenitis	Size of follicles	Number of bacteria
Untreated 1	+++++	++++	++++	Reduced	+++++
Untreated 2	+++	++++	++++	Reduced	+++++
Untreated 3	++	+++	++++	Normal	++++
Untreated 4	++++	+++	++++	Normal	+++
Untreated 5	+++	++++	++++	Normal	+++
Untreated 6	+++	++++	++++	Normal	+++
Ceftriaxone 1	++	+++	+++	Normal	++
Ceftriaxone 2	++++	+++	+++	Normal	++
Ceftriaxone 3	++++	++	++	Normal	+
Ceftriaxone 4	++++	+++	++++	Normal	++
Ceftriaxone 5	+++	++++	++++	Normal	+++
Ceftriaxone 6	+++	+++	++++	Normal	+++
Pep19-2.5 1	+	++	+++	Normal	+
Pep19-2.5 2	+	+	+	Normal	+
Pep19-2.5 3	++	+	+++	Normal	++
Pep19-2.5 4	++	+	++	Increased	++
Pep19-2.5 5	+++	+	++	Normal	+
Pep19-2.5 6	++	+	++	Normal	+
Pep19-2.5+ceftriaxone 1	++	++	+++	Normal	+++
Pep19-2.5+ceftriaxone 2	+	+	++	Normal	+
Pep19-2.5+ceftriaxone 3	++	+	+	Reduced	+
Pep19-2.5+ceftriaxone 4	+	+	+	Normal	+
Pep19-2.5+ceftriaxone 5	++	++	++	Normal	+
Pep19-2.5+ceftriaxone 6	++	+	++	Normal	+

Anatomopathological evaluation of all samples was carried out in a blinded manner by the same pathologist, according to the institutional guidelines.

^aPost-mortem samples of the spleen were fixed by immersion in 4% formaldehyde and were subsequently prepared for inclusion, cutting and hematoxylin–eosin staining.

The release of endotoxin from antibiotic-treated bacteria³³ is well documented both *in vitro*³⁴ and during active infection in mice,³⁵ rats³⁶ and rabbits.³⁰ The administration of AMPs alone or combined with antibiotics has been reported to reduce the LPS levels and counteract sepsis-associated symptoms, leading to survival benefits in several animal models, including mice and rats.^{37–40} Using rabbit models, other authors have reported that polymyxin B alleviated pathophysiological disorders caused by endotoxemia⁴¹ or septicemia.^{42,43} Similarly, Lin *et al.*³⁰ showed that a combination of an AMP (a fragment of the bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21)) and cefamandole accelerated bacterial clearance, improved cardiopulmonary dysfunction and prevented rabbit death; however, in this model, the antibiotic treatment was given before bacterial challenge. Finally, other groups reported that a recombinant endotoxin neutralizing protein from *Limulus polyphemus* combined with antibiotics partially protected rabbits from lethal peritonitis^{44,45} or from lethal endotoxemia if animals received antiendotoxic therapy before being infected.³²

To the best of our knowledge, this is the first report showing evidence in rabbits of AMP-mediated inactivation of endotoxin (Figure 2), leading not only to the neutralization of pro-inflammatory cytokine production (Figure 3) but also to

the recovery of normal temperature values (Figure 4). Our results suggest that Pep19-2.5 and ceftriaxone act in synergy to combat bacteremia (Figure 1) and neutralize IL-6 production (Figure 3). This phenomenon is particularly relevant because any anti-sepsis drug candidate is expected to be administered in combination with one or several antibiotics. Keeping in mind that we administered the drugs as a bolus, it is likely that a constant infusion might result in an even more pronounced therapeutic effect. Taken together, our results indicate that the therapy of Pep19-2.5 and ceftriaxone is a promising drug combination for controlling the crucial causes of sepsis.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Ismael Aizpún Ayesa (Department of Pharmacology and Toxicology, University of Navarra) for his excellent technical assistance in the animal experiments. The gift of the HEK-293/TLR4 and HEK-293/LacZ cell lines by Dr Juan José Lasarte is greatly appreciated. GMT was funded by grants from Proyectos de Investigación Universidad de Navarra (PIUNA-P2011-17 and P2015-14), Spain. SBV is recipient of a doctoral fellowship from Friends of the University of Navarra, Spain. Pep19-2.5 patent OCT/

EP2009/002565. Research at the laboratory of LH is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, project DR797/3-1 611672). KB, LH, TS, SF and GMT are members of the spin-off company 'Brandenburg Antiinfektiva GmbH' (www.antiinfektiva.com) from the Borstel Research Institute.

- 1 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M *et al*. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; **315**: 801–810.
- 2 Kempker JA, Martin GS. The changing epidemiology and definitions of sepsis. *Clin Chest Med* 2016; **37**: 165–179.
- 3 Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukocyte Biol* 2007; **81**: 137–143.
- 4 Lakshmikanth CL, Jacob SP, Chaithra VH, de Castro-Faria-Neto HC, Marathe GK. Sepsis: in search of cure. *Inflamm Res* 2016; **65**: 587–602.
- 5 Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock* 2008; **30**(Suppl 1): 53–59.
- 6 Evans ME, Pollack M. Effect of antibiotic class and concentration on the release of lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1993; **167**: 1336–1343.
- 7 Silverstein R, Wood JG, Xue Q, Norimatsu M, Horn DL, Morrison DC. Differential host inflammatory responses to viable versus antibiotic-killed bacteria in experimental microbial sepsis. *Infect Immun* 2000; **68**: 2301–2308.
- 8 Arbeit RD, Maki D, Tally FP, Campanaro E, Eisenstein BIDaptomycin 98-01 and 99-01 Investigators. The safety and efficacy of daptomycin for the treatment of complicated skin and skin-structure infections. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 1673–1681.
- 9 Martinez de Tejada G, Sanchez-Gomez S, Razquin-Olazaran I, Kowalski I, Kaonis Y, Heinbockel L *et al*. Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents I. Antimicrobial peptides and lipopolymers. *Curr Drug Targets* 2012; **13**: 1121–1130.
- 10 Heinbockel L, Sanchez-Gomez S, Martinez de Tejada G, Domming S, Brandenburg J, Kaonis Y *et al*. Preclinical investigations reveal the broad-spectrum neutralizing activity of peptide Pep19-2.5 on bacterial pathogenicity factors. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 1480–1487.
- 11 Schuerholz T, Doemming S, Hornef M, Martin L, Simon TP, Heinbockel L *et al*. The anti-inflammatory effect of the synthetic antimicrobial peptide 19-2.5 in a murine sepsis model: a prospective randomized study. *Crit Care* 2013; **17**: R3.
- 12 Nemzek JA, Hugunin KM, Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comp Med* 2008; **58**: 120–128.
- 13 Le Roy D, Di Padova F, Adachi Y, Glauser MP, Calandra T, Heumann D. Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria. *J Immunol* 2001; **167**: 2759–2765.
- 14 Galanos C, Freudenberg MA. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology* 1993; **187**: 346–356.
- 15 Taveira da Silva AM, Kaulbach HC, Chuidian FS, Lambert DR, Suffredini AF, Danner RL. Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin. *N Engl J Med* 1993; **328**: 1457–1460.
- 16 Fink MP. Animal models of sepsis. *Virulence* 2014; **5**: 143–153.
- 17 Gutschmann T, Razquin-Olazaran I, Kowalski I, Kaonis Y, Howe J, Bartels R *et al*. New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3817–3824.
- 18 Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM *et al*. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013; **41**: 580–637.
- 19 Morrison DC, Bucklin SE. Evidence for antibiotic-mediated endotoxin release as a contributing factor to lethality in experimental gram-negative sepsis. *Scand J Infect Dis Suppl* 1996; **101**: 3–8.
- 20 Martinez de Tejada G, Heinbockel L, Ferrer-Espada R, Heine H, Alexander C, Barcena-Varela S *et al*. Lipoproteins/peptides are sepsis-inducing toxins from bacteria that can be neutralized by synthetic anti-endotoxin peptides. *Sci Rep* 2015; **5**: 14292.
- 21 Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 2001; **88**: 22–30.
- 22 Schoergenhofer C, Schwameis M, Hobl EL, Ay C, Key NS, Derhaschnig U *et al*. Potent irreversible P2Y12 inhibition does not reduce LPS-induced coagulation activation in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Sci* 2016; **130**: 433–440.
- 23 Doorduyn J, Leentjens J, Kox M, van Hees HW, van der Hoeven JG, Pickkers P *et al*. Effects of experimental human endotoxemia on diaphragm function. *Shock* 2015; **44**: 316–322.
- 24 Kiers D, Gerretsen J, Janssen E, John A, Groeneveld R, van der Hoeven JG *et al*. Short-term hyperoxia does not exert immunologic effects during experimental murine and human endotoxemia. *Sci Rep* 2015; **5**: 17441.
- 25 Krishnamurti C, Carter AJ, Maglasang P, Hess JR, Cutting MA, Alving BM. Cardiovascular toxicity of human cross-linked hemoglobin in a rabbit endotoxemia model. *Crit Care Med* 1997; **25**: 1874–1880.
- 26 Fink MP, Morrissey PE, Stein KL, Clement RE, Fiallo V, Gardiner WM. Systemic and regional hemodynamic effects of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase inhibition in normal and hyperdynamic endotoxemic rabbits. *Circ Shock* 1988; **26**: 41–57.
- 27 Wichtermann KA, Bane AE, Chandry IA. Sepsis and septic shock - a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; **29**: 189–201.
- 28 Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S *et al*. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med* 2012; **366**: 2055–2064.
- 29 Jafarzadeh SR, Thomas BS, Marschall J, Fraser VJ, Gill J, Warren DK. Quantifying the improvement in sepsis diagnosis, documentation, and coding: the marginal causal effect of year of hospitalization on sepsis diagnosis. *Ann Epidemiol* 2016; **26**: 66–70.
- 30 Lin Y, Leach WJ, Ammons WS. Synergistic effect of a recombinant N-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein and cefamandole in treatment of rabbit gram-negative sepsis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 65–69.
- 31 Camerota AJ, Creasey AA, Patla V, Larkin VA, Fink MP. Delayed treatment with recombinant human tissue factor pathway inhibitor improves survival in rabbits with gram-negative peritonitis. *J Infect Dis* 1998; **177**: 668–676.
- 32 Garcia C, Saladino R, Thompson C, Hammer B, Parsonnet J, Wainwright N *et al*. Effect of a recombinant endotoxin-neutralizing protein on endotoxin shock in rabbits. *Crit Care Med* 1994; **22**: 1211–1218.
- 33 Nau R, Eiffert H. Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**: 95–110.
- 34 Cohen J, McConnell JS. Release of endotoxin from bacteria exposed to ciprofloxacin and its prevention with polymyxin B. *Eur J Clin Microbiol* 1986; **5**: 13–17.
- 35 Sawa T, Kurahashi K, Ohara M, Gropper MA, Doshi V, Larrick JW *et al*. Evaluation of antimicrobial and lipopolysaccharide-neutralizing effects of a synthetic CAP18 fragment against *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 3269–3275.
- 36 Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, Paggi AM, Orlando F *et al*. Therapeutic efficacy of intraperitoneal polymyxin B and polymyxin-like peptides alone or combined with levofloxacin in rat models of septic shock. *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 193–196.
- 37 Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Mocchegiani F, Viticchi C, Scalise G *et al*. Cationic peptides combined with betalactams reduce mortality from peritonitis in experimental rat model. *J Surg Res* 2002; **108**: 107–111.
- 38 Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, Viticchi C, Orlando F *et al*. Antiendotoxin activity of protegrin analog IB-367 alone or in combination with piperacillin in different animal models of septic shock. *Peptides* 2003; **24**: 1747–1752.
- 39 Fukumoto K, Nagaoka I, Yamataka A, Kobayashi H, Yanai T, Kato Y *et al*. Effect of antibacterial cathelicidin peptide CAP18/LL-37 on sepsis in neonatal rats. *Pediatr Surg Int* 2005; **21**: 20–24.
- 40 Murakami T, Obata T, Kuwahara-Arai K, Tamura H, Hiramatsu K, Nagaoka I. Antimicrobial cathelicidin polypeptide CAP11 suppresses the production and release of septic mediators in D-galactosamine-sensitized endotoxin shock mice. *Int Immunol* 2009; **21**: 905–912.
- 41 Corrigan JJ Jr, Bell BM. Comparison between the polymyxins and gentamicin in preventing endotoxin-induced intravascular coagulation and leukopenia. *Infect Immun* 1971; **4**: 563–566.


- 42 Corrigan JJ Jr., Kiernat JF. Effect of polymyxin B sulfate on endotoxin activity in a gram-negative septicemia model. *Pediatr Res* 1979; **13**: 48–51.
- 43 Flynn PM, Shenep JL, Stokes DC, Fairclough D, Hildner WK. Polymyxin B moderates acidosis and hypotension in established, experimental gram-negative septicemia. *J Infect Dis* 1987; **156**: 706–712.
- 44 Saladino R, Garcia C, Thompson C, Hammer B, Parsonnet J, Novitsky T *et al*. Efficacy of a recombinant endotoxin neutralizing protein in rabbits with *Escherichia coli* sepsis. *Circ Shock* 1994; **42**: 104–110.
- 45 Saladino RA, Stack AM, Thompson C, Sattler F, Novitsky TJ, Siber GR *et al*. High-dose recombinant endotoxin neutralizing protein improves survival in rabbits, with *Escherichia coli* sepsis. *Crit Care Med* 1996; **24**: 1203–1207.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on Experimental & Molecular Medicine website (<http://www.nature.com/emm>)

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Lipoproteins/peptides are sepsis-inducing toxins from bacteria that can be neutralized by synthetic anti-endotoxin peptides

Received: 28 January 2015

Accepted: 24 August 2015

Published: 22 September 2015

Guillermo Martinez de Tejada¹, Lena Heinbockel², Raquel Ferrer-Espada¹, Holger Heine³, Christian Alexander^{4,5}, Sergio Bárcena-Varela¹, Torsten Goldmann⁶, Wilmar Correa², Karl-Heinz Wiesmüller⁷, Nicolas Gisch⁵, Susana Sánchez-Gómez¹, Satoshi Fukuoka⁸, Tobias Schürholz⁹, Thomas Gutsmann² & Klaus Brandenburg²

Sepsis, a life-threatening syndrome with increasing incidence worldwide, is triggered by an overwhelming inflammation induced by microbial toxins released into the bloodstream during infection. A well-known sepsis-inducing factor is the membrane constituent of Gram-negative bacteria, lipopolysaccharide (LPS), signalling via Toll-like receptor-4. Although sepsis is caused in more than 50% cases by Gram-positive and mycoplasma cells, the causative compounds are still poorly described. In contradicting investigations lipoproteins/-peptides (LP), lipoteichoic acids (LTA), and peptidoglycans (PGN), were made responsible for eliciting this pathology. Here, we used human mononuclear cells from healthy donors to determine the cytokine-inducing activity of various LPs from different bacterial origin, synthetic and natural, and compared their activity with that of natural LTA and PGN. We demonstrate that LP are the most potent non-LPS pro-inflammatory toxins of the bacterial cell walls, signalling via Toll-like receptor-2, not only *in vitro*, but also when inoculated into mice: A synthetic LP caused sepsis-related pathological symptoms in a dose-response manner. Additionally, these mice produced pro-inflammatory cytokines characteristic of a septic reaction. Importantly, the recently designed polypeptide Aspidasept® which has been proven to efficiently neutralize LPS *in vivo*, inhibited cytokines induced by the various non-LPS compounds protecting animals from the pro-inflammatory activity of synthetic LP.

Severe infectious diseases are still a major threat to human health, especially in the light of the global proliferation of antibiotic resistant pathogens. To make this situation worse, the development of new antibiotics stagnated during the last decades¹. Complicated infections cause with increasing frequency a severe pathology called sepsis², which is the leading cause of death in critical care units^{3,4}. Every year,

¹Universidad de Navarra, Dept. de Microbiología y Parasitología, Irunlarrea 1, 31008 Pamplona, Spain. ²Divisions of Biophysics, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Parkallee 1-40, 23845 Borstel, Germany. ³Innate Immunity, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Parkallee 1-40, 23845 Borstel, Germany. ⁴Cellular Microbiology, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Parkallee 1-40, 23845 Borstel, Germany. ⁵Bioanalytical Chemistry, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Parkallee 1-40, 23845 Borstel, Germany. ⁶Clinical and Experimental Pathology, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Biosciences, Parkallee 1-40, 23845 Borstel, Germany. ⁷EMC microcollections, Sindelfinger Straße 3, 72070 Tübingen, Germany. ⁸National Institute of Advanced Industrial Science and Technology AIST, Takamatsu, Japan. ⁹Universitätsklinikum Aachen, Department of Intensive Care and Intermediate Care, Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to K.B. (email: kbrandenburg@fz-borstel.de)

sepsis strikes more than a million Americans and it is estimated that 28–50% of them die—far more than the number of U.S. deaths from prostate cancer, breast cancer and AIDS combined^{5,6}. The majority of sepsis cases is caused by a disproportionate immune response to bacterial products, mainly LPS in the case of Gram-negative bacteria⁷. LPS forms the outer leaflet of the outer membrane for nearly all Gram-negatives. Besides LPS, also other amphiphilic molecules, i.e., lipopeptides and lipoproteins (LP) are found in bacterial envelopes, in Gram-negative as well as in Gram-positive bacteria and in mycoplasma⁸. Recent studies provided substantial evidence that cell-envelope LP from Gram-positive and Gram-negative bacteria trigger inflammatory responses by activation of Toll-like receptor TLR2^{9,10} at minute concentrations and thus seem to be important sepsis-inducing factors beyond LPS. In some prior publications also Gram-positive lipoteichoic acids (LTA) as well as peptidoglycans (PGN) from the cell envelope of Gram-positive organisms were described exhibiting significant cytokine induction via TLR2 in human mononuclear cells (MNC)¹¹. Observations that purified or synthetic LTA or PGN were devoid of such activity likely indicates that previous preparations could be contaminated with LP and that this compound may be responsible for their TLR2 activating properties¹², (review in¹³).

A major contribution to clarify the immunostimulatory potency of LP involved the construction of a Δlgt -mutant of *S. aureus* strain SA113, which was deficient in the lipidation of the pre-LP and showed attenuation in immune activation and growth¹⁴. Subsequent studies demonstrated that the LP are the predominant TLR2-stimuli in LTA preparations of *S. aureus* and not the LTA itself^{12,15}. Furthermore, studies using purified LTA from *lgt*-mutants¹⁵ as well as synthetic LTA¹⁶, (reviewed by Schmidt *et al.*¹⁷) or PGN part structures¹⁸ did not show any TLR2-mediated activity. This indicated again a possible LP contamination in the previously used LTA and PGN preparations responsible for the originally determined bioactivity, thus proving that TLR2 is most likely a specific receptor for LP¹³. The mechanism of this immune activation in humans was determined at the atomic level in several X-ray diffraction studies, namely the signaling induced by triacylated LP occurs via a TLR2/TLR1-heterodimer (as shown by analyzing a hTLR2-hTLR1-Pam₃CSK₄ co-crystal)¹⁹, whereas diacylated LP signals via a TLR2/TLR6-heterodimer (demonstrated by solving a mTLR2-mTLR6-Pam₂CSK₄ co-crystal)²⁰. In murine cells LP that signal via both TLR2/TLR1 and TLR2/TLR6 heterodimer, have been described²¹. In addition, it was shown, that TLR2 is indeed able to bind LTA, but that this binding induces levels of heterodimer formation below those necessary to trigger an intracellular signaling process²⁰. Despite these findings there are recent works that still favour the notion that LTA are the Gram-positive counterparts of LPS¹¹.

To contribute to settle this issue, we first studied the pro-inflammatory activity of selected non-LPS-related LP structures of different natural and synthetic origin. All these compounds are exposed on the microbial cell surface and could bear pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) recognizable by innate immune cells receptors. Furthermore, we studied whether synthetic anti-LPS peptides (SALPs) that efficiently neutralized both LPS and bacterial whole cells^{22–24} could interact with LP as well as with LTA and PGN. The *in vitro* and *in vivo* data gathered in the present study reveal that, in the absence of LPS, LP triggers severe inflammatory host responses with a potency similar to that of LPS. Interestingly, our results show that all the non-LPS amphiphiles tested can be efficiently neutralized by SALPs suggesting that these compounds could form the basis to develop broad-spectrum anti-sepsis drugs. For this, however, some further investigations are necessary outside the scope of this paper regarding the application of the SALP in more detailed models of Gram-positive bacteremia.

Results

In this section, we first present *in vitro* data on the production of pro-inflammatory cytokines by human cells in response to LP or LTA from different origin and its neutralization by SALP. Then, we used a mouse model of acute toxemia to characterize the *in vivo* expression of those cytokines and to study if SALP can protect animals against lethal LP-induced sepsis. It is worth noting that in preceding studies we demonstrated that Aspidasept® (Pep19-2.5) efficiently inhibits the LPS-induced cytokine expression in human MNCs even at [LPS]:[Aspidasept®] weight ratios as low as 1:1^{24–26}.

Staphylococcal LP. In Fig. 1A the stimulation of TNF α production in human macrophages caused by incubation with a native LP (SitC from *Staphylococcus aureus*) is compared to the equivalent stimulation by LPS Ra, a LPS with a complete core oligosaccharide, from *Salmonella minnesota*. This LPS was taken because it corresponds to the bioactive fraction within wild-type LPS. Two key observations are made: (i), LPS was at least 10 times more potent than LP at inducing TNF α expression in macrophages; and (ii), the addition of Aspidasept® almost totally abrogated LP-dependent TNF α secretion at all tested concentrations. In Fig. 1B, the inhibition efficiency of Pep19-2.5 is summarized for the two LP concentrations 1000 and 100 ng/ml from three independent measurements. The data show clearly, that already a 10:1 excess of peptide is sufficient for a strong inhibition.

LP from spirochetes and Gram negative pathogens. Using the same *in vitro* system, we determined the TNF α stimulating potential of synthetic LP identical to the N-terminal part of the surface antigens from *Borrelia burgdorferi* OspA and OspC and from the outer membrane proteins P6 of *Haemophilus influenzae* and H8 of *Neisseria gonorrhoeae*. For the *Borrelia* LP OspA and OspC, our results demonstrate that concentrations up to 1000 to 10000 ng/ml were necessary to induce TNF α levels similar to those brought about by the lowest amount of LPS tested in the previous assay (at 1000 to 10 000 ng/ml

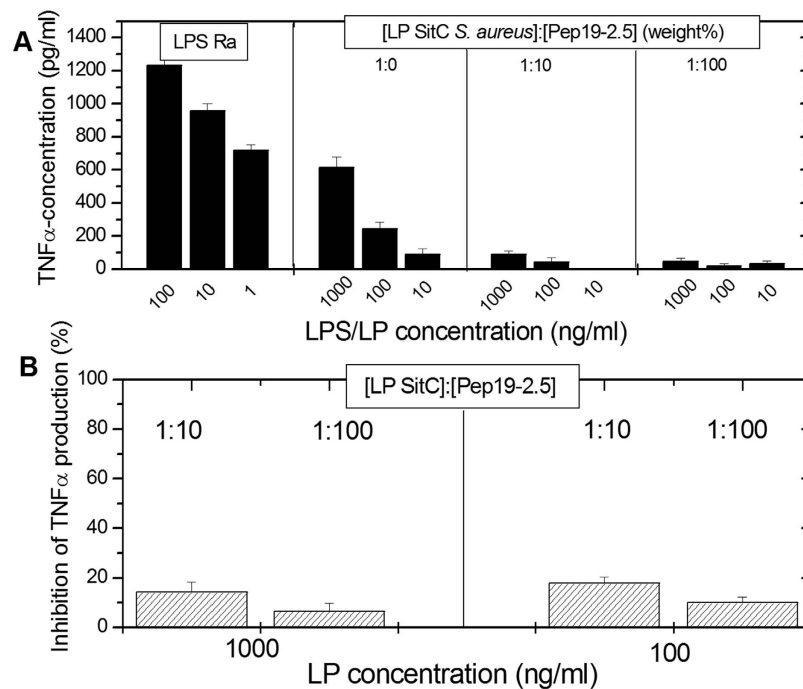


Figure 1. (A) Production of tumor-necrosis-factor α in human macrophages induced by LPS from *Salmonella minnesota* R60, which has a complete core oligosaccharide and corresponds to the bioactive part of wild type LPS, and by the lipoprotein SitC from *Staphylococcus aureus*, each at three different concentrations, the latter also in the presence of different concentrations of Aspidasept® 1:10 and 1:100 [LP]:[Pep] weight%. (B) Presented is the inhibition of the TNF α production at the two excess concentrations (10:1 and 100:1 weight %). Depicted are the means \pm SEM of 3 independent experiments.

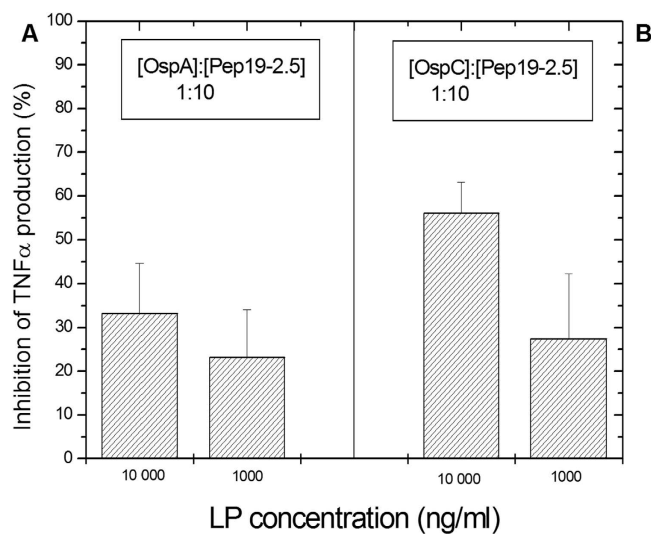


Figure 2. Inhibition of the production of tumor-necrosis-factor α in human mononuclear cells induced by synthetic lipopeptide homologues to the surface antigens of *Borrelia burgdorferi* OspA (A) and OspC (B) at a concentration of 10000 and 1000 ng/ml in the absence and presence of a 10:1 weight % excess concentration of Aspidasept®. Depicted are the means \pm SEM of 3 independent experiments.

OspA and C, 500 to 1000 pg/ml TNF α are produced by the MNCs). Notably, Aspidasept® inhibited the LP dependent cytokine production when added at a peptide:LP ratio of 10:1 (Fig. 2) and brought it down to undetectable levels at a 100:1 concentration ratio (data not shown). For the *Haemophilus* and *Neisseria* LP, also a concentration of 10 μ g/ml was necessary to induce an observable TNF α secretion, and there was no detectable amounts of this cytokine when adding 100 ng/ml of either LP (data not shown).

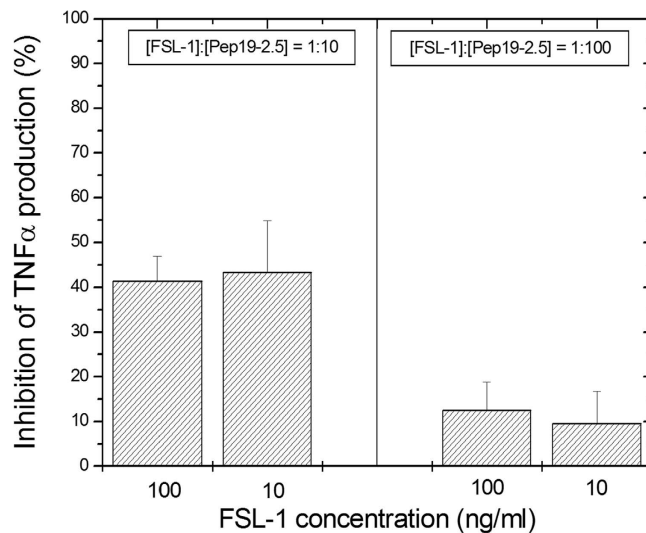


Figure 3. Inhibition of the production of tumor-necrosis-factor α in human mononuclear cells induced by synthetic lipopeptide FSL-1 (fibroblast-stimulating lipopeptide), the N-terminal part of the lipoprotein from *Mycoplasma salivarium* at a concentration of 100 and 10 ng/ml in the absence and presence of an excess concentration of Aspidasept[®] 10:1 weight%. Depicted are the means \pm SEM of 3 independent experiments.

Mycoplasma LP. The pro-inflammatory activity of a bioactive compound from *Mycoplasma*, the LP FSL-1 (fibroblast-stimulating LP) was also investigated. Remarkably, FSL-1 LP stimulated the MNC with potency similar to that of LPS. Addition of a 10-fold excess of Aspidasept[®] with respect to LP led already to a considerable reduction of the TNF α secretion, and at a 100:1 excess the cytokine production was nearly completely abolished (Fig. 3). Similar results were obtained with the compound MALP-2 (macrophage-activating LP), whose pro-inflammatory activity was also subject to nearly complete inhibition by Aspidasept[®] at a 100:1 weight% excess of the peptide (data not shown).

LTA and PGN. In exemplary measurements we have also analysed two commercial lipoteichoic acid (LTA) preparations from *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Cytokine data for the two LTA in the absence and presence of Pep19-2.5 and in comparison to LPS show that LTA from *B. subtilis* exhibits some TNF α induction, although still one order of magnitude lower than LPS, and a complete inhibition by Pep19-2.5 was already noticeable at a 10:1 weight% excess (see also²⁷). The cytokine induction activity of the other commercial preparation LTA from *S. aureus* was in contrast much lower, and was also inhibited when the peptide was added (data not shown). To study whether LTA and PGN had TNF α stimulating activity by themselves these two compounds were isolated from *S. aureus* SA113 Δ lgt, a mutant deficient in the lipidation of LP precursors. The LTA and PGN preparations showed a low pro-inflammatory activity in the range 200 to 250 pg/ml even when added at 10,000 ng/ml (10 μ g/ml). Irrespective of this fact, addition of a 10-fold excess of Aspidasept[®] (Fig. 4) effectively reduced the LTA-dependent TNF α response and totally inhibited the equivalent response induced by PGN.

Shortened triacylated LP. As shortened variant of triacylated LP, synthetic compound Pam₃CSK₄ at a concentration of 100 ng/ml was tested in the absence and presence of excess Aspidasept[®] 100:1 weight%. The data demonstrated that Pam₃CSK₄ is also able to stimulate MNC although at a markedly lower level than LPS. Also at 10 ng/ml some activation takes place, but not at 1 ng/ml (data not shown). As shown in Fig. 5, the addition of compound Aspidasept[®] had only a minor inhibitory effect on cytokine production, even at high concentrations [LP]:[Pep] 1:100, in particular at the lowest Pam₃CSK₄ concentration of 10 ng/ml. This means that the reduction of the length of the amino acid sequence in the polar moiety of the LP, as compared to the other LP compounds investigated above, apparently leads to less binding of the peptide to the LP (see the ITC experiments shown below).

Test of transfected HEK cells. The ability of selected LP, i.e., LP Osp A and OspC, LP H8 and P6, to stimulate interleukin-8 (IL-8) production via TLR2 was quantified in HEK cells transfected with a TLR2 expression vector. In independent experiments, LPS was used as control of TLR4-dependent signaling in HEK cells transfected with a TLR4 expression vector. As expected, TLR4-transfected cells expressed high levels of IL-8 in response to LPS, and nearly no IL-8 signal for the four LP except for LP HI P6, which induced significant amounts of IL-8 when added at high concentration (10 μ g/ml). In TLR-2 transfected cells, all 4 LP as well as Pam₃CSK₄ exhibited considerable IL-8 secreting activity, at relatively high LP concentrations (Fig. 6), which for the LP P6 and H8 is significantly higher as compared to the TNF α

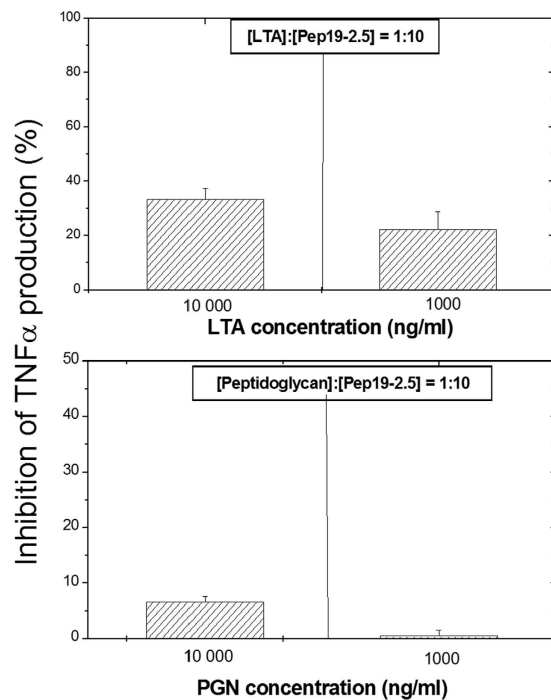


Figure 4. Inhibition of the production of tumor-necrosis-factor α in human mononuclear cells induced by purified lipoteichoic acids (LTA) or by peptidoglycan (PGN) both isolated from *S. aureus* SA113 Δ lgt, each at 10000 and 1000 ng/ml in the absence and presence of Aspidasept[®] at 10:1 excess weight%. Depicted are the means \pm SEM of 3 independent experiments.

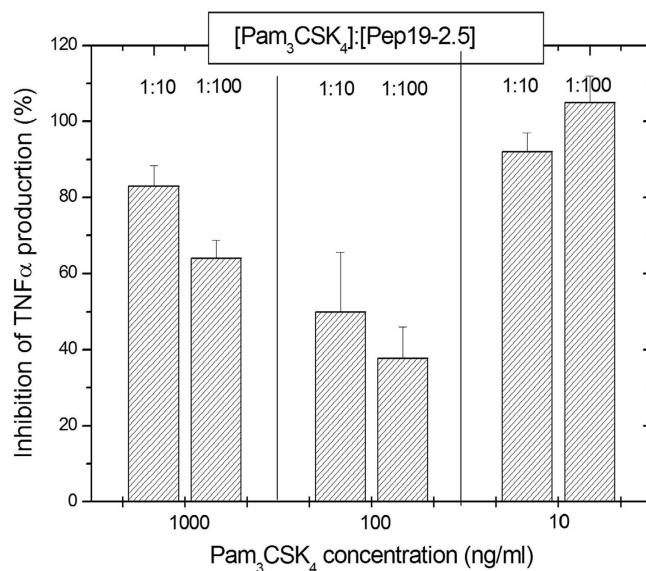


Figure 5. Inhibition of the production of tumor-necrosis-factor α in human mononuclear cells by the synthetic lipid anchored partial structure Pam₃CSK₄ of bacterial lipoproteins at 1000, 100, and 10 ng/ml concentrations in the absence and presence of an excess concentration of Aspidasept[®] 10:1 and 100:1 weight %. Depicted are the means \pm SEM of 3 independent experiments.

levels reached in previous experiments with human MNC. It should be noted at this place, however, that primary cells (MNCs) and cell lines (HEK) are quantitatively not necessarily comparable.

In vivo stimulation in mice. In preliminary assays, Balb/C mice were used for the analysis of the global cytokine response stimulated by the intraperitoneal inoculation of 20 μ g/animal of either LPS or LP SitC. Cytokine quantification in serum was performed at 90 min and 4 h after injection and included

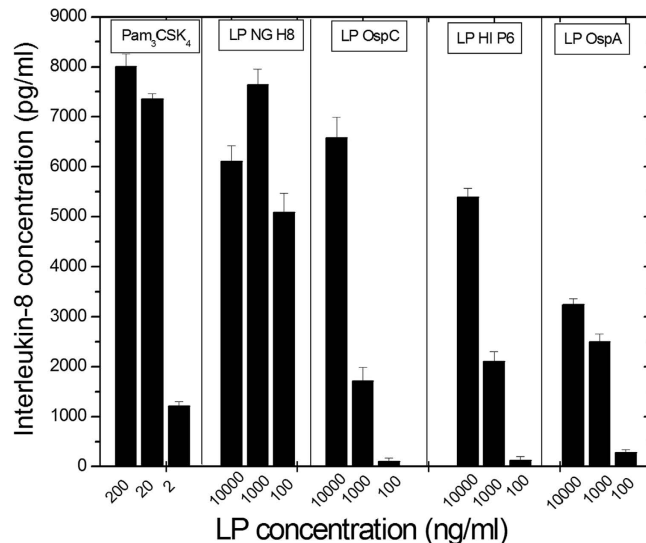


Figure 6. Production of the chemokine interleukin-8 in a HEK cell system transfected with Toll-like-receptor TLR2 by Pam₃CSK₄, LP from *H. influenza* (HI P6), from *N. gonorrhoeae* (NG H8) and from *B. burgdorferi* OspA and OspC. Presented is one exemplary experiment out of two. Errors bars are from the determination of TNF α in duplicate.

TNF α , interferon- γ (IFN γ), interleukin-6 (IL-6), and IL-12 (p40). These assays demonstrated that LPS induced a very potent and uniform stimulation of all those cytokines, in particular at 4 h post-inoculation, whereas the response to LP was significantly lower. The cytokine IL-6 was stimulated by both compounds to a higher level than the other cytokines (data not shown).

In a second set of experiments, pro-inflammatory cytokine levels (TNF α and IL-6) were determined in mice 90 min and 4 hours after the intraperitoneal inoculation of 40 μ g of FSL-1. A duplicate group of animals received 400 μ g of Aspidasept[®] immediately after FSL-1 challenge at a different site of the peritoneum. As shown in Fig. 7A, FSL-1 induced a potent TNF α (top) and IL-6 (bottom) response in the animals. Whereas levels of the former cytokine peaked at 90 min, the latter peaked at 4 hours (data not shown). Remarkably, treatment with Aspidasept[®] totally inhibited FSL-1 induced TNF α stimulation in mice but only caused a slight reduction in IL-6 levels.

In a third set of experiments, galactosamine-sensitized mice, which is known to considerably increase the sensitivity of mice to bacterial toxins, were inoculated with increasing concentrations of FSL-1 and animals were monitored for symptoms of toxemia during 48 h. As shown in Table 1, this assay clearly demonstrated a dose-response relationship between the amount of the LP given to the animals and the severity of the symptoms displayed by them at all time-points after FSL-1 challenge. Interestingly, the amount of FSL-1 necessary to kill 100% of the animals in 48 h (LD₁₀₀) as determined in this experiment, 500 ng/mouse (Table 1), was only 10 times higher than the equivalent LD₁₀₀ of *Salmonella minnesota* LPS when tested under identical experimental conditions²⁴.

To evaluate a possible therapeutic effect of Aspidasept[®] on toxemia caused by FSL-1, galactosamine-sensitized animals received by the intraperitoneal route first 4 μ g of the LP and immediately afterwards 200 μ g of Aspidasept[®] at a different site of the peritoneum (i.e., the peptide excess concentration was 50:1 w/w). Animals inoculated with FSL-1 displayed symptoms of sepsis (reduced motor activity, lethargy, shivering, and piloerection) within the first 120 min. At 12 h post-inoculation, these symptoms worsened and areas of clotted blood appeared in the nails, a pathology characteristic of septic shock. Administration of Aspidasept[®] resulted in a marked reduction of symptoms in 80% of the animals. The data presented in Fig. 7B clearly show a significant survival benefit of the mice treated with Aspidasept[®], which continued for up to 4 days.

Isothermal calorimetric titration of LP with Aspidasept[®]. Isothermal titration calorimetry (ITC) allowed us to characterize thermodynamically the LP-Aspidasept[®] interaction. For this assay, FSL-1 and Pam₃CSK₄ were selected, since they displayed a disparate behavior when interacting with Aspidasept[®], with good degree of inhibition by the peptide of the former (Fig. 3) and no significant influence when added to the latter (Fig. 5).

The analysis of the Pam₃CSK₄:peptide interaction revealed a weak exothermic reaction (Fig. 8A) lacking the typical binding kinetics, whereas the FSL-1:peptide interaction was indicative of an exothermic reaction with saturation kinetics (Fig. 8B). These data indicate that the inability of Aspidasept[®] at low or medium concentrations to inhibit the Pam₃CSK₄ dependent cytokine secretion is the consequence of poor affinity of the peptide towards the LP.

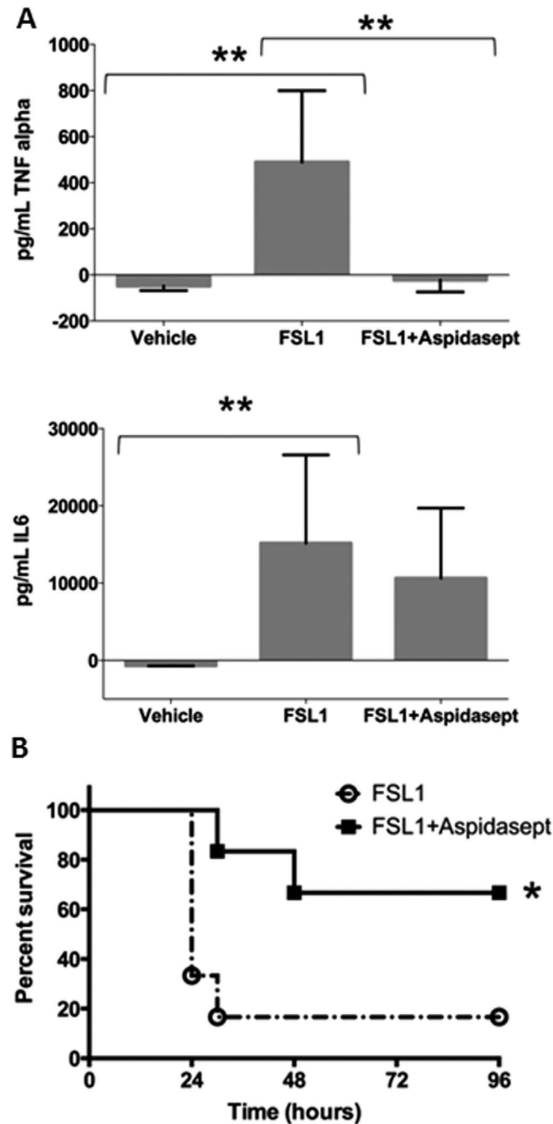


Figure 7. (A) Serum levels of tumor-necrosis-factor α (upper panel), and interleukin-6 (lower panel) in a group of mice ($n = 4$) intraperitoneally (i.p.) inoculated with $40\mu\text{g}$ of FSL-1 (central bars) compared to another group receiving i.p. $400\mu\text{g}$ of Aspidasept[®] immediately after an identical FSL-1 challenge (right bars; $n = 5$) and a third group administered only with pyrogen free saline i.p. (vehicle; left bars; $n = 5$). TNF α (top) and IL-6 (bottom) levels were measured at 1.5 h or 4 h after challenge, respectively, coinciding with the peak of cytokine secretion, as determined in preliminary experiments. Double asterisks denote significant statistical differences between the two groups indicated by the bracket ($p < 0.01$; Mann-Whitney U test). (B) Survival rate of Balb/C mice intraperitoneally inoculated with FSL-1 (open circles; $n = 6$) or receiving FSL-1 and then treated with Aspidasept[®] (solid squares; $n = 6$). All the animals received FSL-1 ($4\mu\text{g}/\text{mouse}$) co-administered with D-galactosamine ($18\text{mg}/\text{mouse}$) intraperitoneally. A group of animals was treated with Aspidasept[®] ($200\mu\text{g}/\text{mouse}$) immediately after FSL-1 challenge at a different site of the peritoneum and animal mortality was monitored every 4 h for 4 days. Results were globally analysed by means of a Kaplan-Meier survival analysis. Asterisk denotes significant statistical differences ($p < 0.05$).

Förster resonance energy transfer of peptide binding to LP. To gather more information about the LP-Aspidasept[®] interaction at the molecular level, we studied whether Aspidasept[®] could intercalate into LP aggregates by FRET. In these assays, we investigated two LP systems, namely the FSL-1 sample in the presence of different concentrations of Aspidasept[®] (Fig. 9A), and the LP SitC from *S. aureus* in the presence of three peptides, Aspidasept[®], Pep19-4 and Pep19-8 (Fig. 9B). As depicted in Fig. 9A, the addition of Aspidasept[®] to FSL-1 led to an instantaneous incorporation of the former into the LP aggregate, already at the low peptide concentration ([LP]:[Aspidasept[®]] 1:0.1 molar). The increase in peptide concentration did not lead to a further increase in intercalation, apparently due to saturation.

Amount of FSL-1	4 hours	8 hours	24 hours	48 hours
50 ng	1 2 2	1 1 2	1 1 2	1 1 2
500 ng	3 3 3	3 3 †	† † †	† † †
5 µg	4 4 4	5 5 4	† † †	† † †
50 µg	5 5 5	4 † †	† † †	† † †

Table 1. Survival and physical activity of Balb/C mice at different time points after inoculation of increasing doses of FSL-1. Groups of animals (n=3) were intraperitoneally inoculated with the indicated amount of FSL-1 supplemented with D-Galactosamine (18 mg/mouse) in pyrogen-free sterile saline and at the indicated time-point the physical activity of each animal was rated according to the following criteria: 1 = very active; 2 = active; 3 = less active; 4 = slow; 5 = lethargic; † = dead.

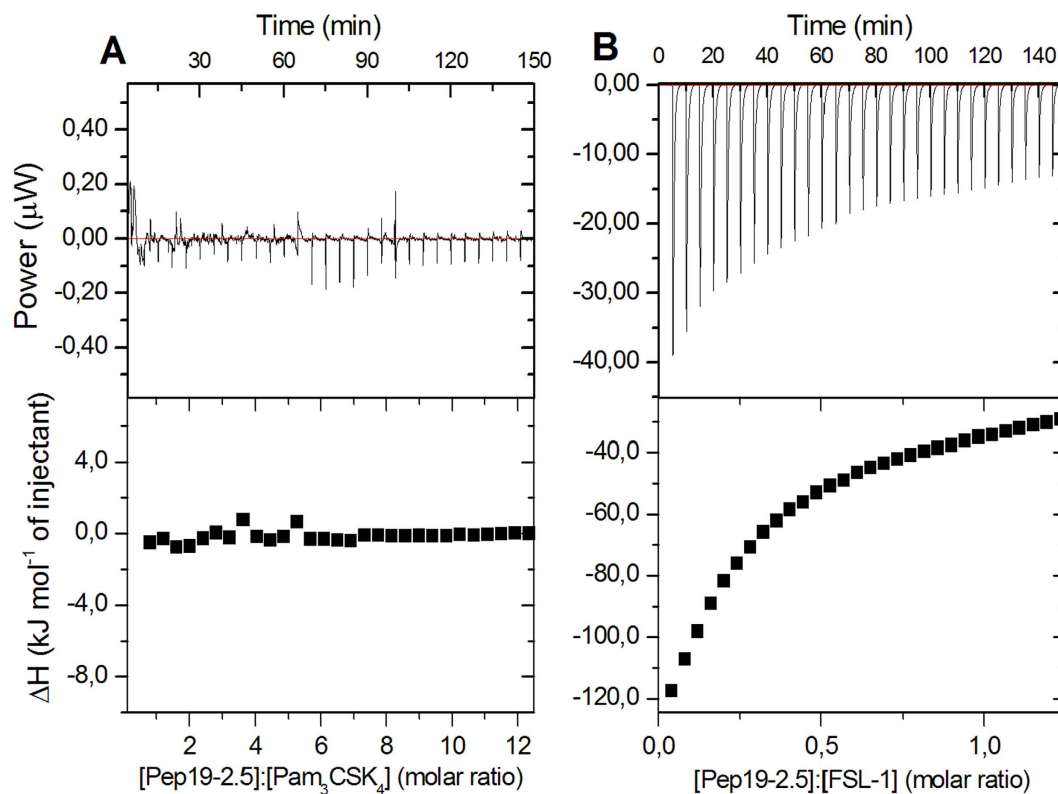


Figure 8. Isothermic calorimetric experiments of the titration of Aspidasept® to the lipopeptide Pam₃CSK₄ (A) and FSL-1 (B). The lipopeptides were prepared as 0.05 mM dispersions and the peptide at a concentration of 1 mM was titrated in 3 µl portions every 5 min at 37 °C.

The data on the incorporation of three different peptides into LP SitC (Fig. 9B) show very similar instantaneous and strong increases of the FRET signals, indicating a general tendency of the three peptides to efficiently intercalate into LP aggregates independently of their inhibition efficiency in the biological experiments [Pep19-4 and Pep19-8 have only moderate or low inhibition efficiency, respectively, see²⁵].

Discussion

In the present study the role of essential pathogenicity factors of bacteria, which are responsible for the severe inflammation reactions in mammals but are structurally non-related to endotoxin, were investigated. In previous publications a variety of different amphiphilic membrane-associated compounds were described exerting manifold immunologically relevant reactions, but no clear line has been drawn so far. Lipoteichoic acids and peptidoglycans as well as lipopeptides and lipoproteins all were found or suspected to be inflammation-inducing toxins (pathogenicity factors) from Gram-positive bacteria, mycoplasma and non-LPS related Gram-negative bacterial components^{8,11,28,29}. In particular, no reports are

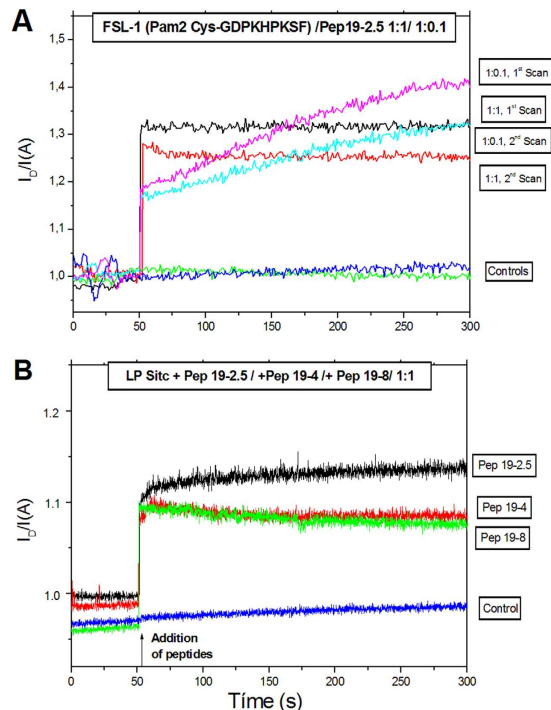


Figure 9. Förster resonance energy transfer (FRET) spectroscopic data of the intercalation of Aspibasept[®] into FSL-1 aggregates (A) and of Pep19-4, Pep19-8, and Aspibasept[®] into LP SitC aggregates (B). To the LP at a concentration of $1\ \mu\text{M}$ the peptides were added after 50 s and the concentration ratio I_D/I_A was monitored for 300 s. ad A) FSL-1:Pep19-2.5 1:0.1 M/M: 1st scan: magenta, 2nd scan: light blue. FSL-1:Pep19-2.5 1:1 M/M: 1st scan: black, 2nd scan: red. Controls (only FSL-1): blue/green ad B) LP SitC: Pep19-2.5 1:1 M/M: black. LP SitC: Pep19-4 1:1 M/M: red. LP SitC: Pep19-8 1:1 M/M: green. Control (only LP SitC) blue.

known to the best of our knowledge that conclusively identify the non-endotoxin related sepsis-inducing compounds from bacteria including mycoplasma species.

The use of the various shortened lipopeptides used here instead of the parental lipoproteins should be justified by the fact that the stimulation property of a given lipoprotein depends exclusively on the presence and structure of its lipid moiety, as proven exemplarily for the shortened variant Pam₃CSK₄, similar as in the case of LPS in which the lipid A moiety and not the sugar part is the 'endotoxic principle'^{7,9,10,22}.

As a second essential purpose of this work, the ability of previously described antimicrobial peptides^{24,25}, called synthetic anti-LPS peptides (SALP) to inhibit inflammation reactions due to various LP, LTA and PGN, from natural and synthetic origin, was investigated. The focus here was on the anti-septic therapeutic drug candidate Aspibasept[®].

Cytokine induction. The data reveal that all compounds investigated induce cytokine production in human MNC, measured as TNF α expression, but with considerable variations in their potency. The investigated lipopeptides/-proteins, i.e., lipoprotein from *S. aureus* (Fig. 1), LP OspA and OspC from *B. burgdorferi* (Fig. 2), LP from *H. influenzae* and *N. gonorrhoeae* and staphylococcal LTA (Fig. 4) induce cytokines only at a 10- to 1000-fold higher concentration than LPS (Fig. 1). Staphylococcal PGN exhibits only negligible inflammatory activity even at high concentrations (Fig. 4). In mouse experiments (Fig. 7) it could be shown by the expression of interleukin-6 and TNF α that the FSL-1 can induce inflammation also *in vivo*. Here, in accordance to the *in vitro* data, the response to LP is much lower than that to LPS.

It was previously shown that bacterial LPS signals via Toll-receptor-4 (update in²⁹), whereas bacterial lipoproteins and lipopeptides signal via TLR2, depending on the lipid anchor, in combination with TLR1 or TLR6^{19,20,30–32}. Here, we could show with TLR2-transfected HEK cells, that all investigated lipopeptide compounds, LP from *N. gonorrhoeae*, from *B. burgdorferi* OspA and OspC, and from *H. influenzae* induce interleukin-8 (Fig. 6). These compounds, in contrast, did not provoke IL-8 activity (except for a minor expression in the case of LP *H. influenzae*) in TLR4-transfected cells, which of course are highly stimulated by LPS. These results confirm previous results³⁰ that bacterial LP products signal via TLR2 as the decisive surface receptor and that reported TLR2 activity from particular LPS such as that from *Porphyromonas gingivalis* could result from a LP contamination³².

The observation that only FSL-1 and MALP-2 are similarly active in the activation of human MNC as LPS is in accordance with the findings for the lipopeptides Pam₂CSK₄, Pam₃CSK₄ and lipolan, a triacylated compound consisting of the same polar head group as the former two, but with amide rather than ester linkages. The former LP were shown to be biologically active and to adopt non-lamellar aggregates corresponding to a conical conformation, whereas lipolan was biologically inactive and adopted a lamellar aggregate structure³³. Similar arguments regarding the bioactive conical conformation of the molecules have been presented for the shortened variant of the 19 KDa LP from *M. tuberculosis*³⁴. When comparing the cytokine induction caused by the different LP structures, it is striking that the diacylated lipopeptides are significantly more active than the triacylated LP, whereas the detailed amino acid sequence of the polar head groups of the LP apparently plays only a secondary role: Thus, the charge of the head groups varies from +4 (Pam₃CSK₄), over +1 (FSL-1), 0 (LP OspA), -1 (LP OspC, LP HiP6, MALP-2), to -2 (LP Ng H8). This indicates that (i) the general amphiphilic aggregate structure is a more decisive parameter than the detailed chemical primary structures and (ii) the lipid moiety of the lipoproteins/-peptides determines the stimulation activity as found elsewhere^{10,19,20}, which is exactly the same as in the case of LPS⁷.

Role of LP in Gram-negative species. In particular for Gram-negative bacteria, in which LPS is a membrane-building unit by forming the complete outer monolayer of the outer membrane, the role of lipoproteins/-peptides is still unclear, for example of the Braun lipoprotein linked to the murein-layer of the bacteria³⁵. Generally, as shown also here, LPS is more active than LP, therefore the first line induction of inflammation in the host seems to be triggered mainly by LPS. However, there are relevant exceptions regarding the bacterial organisms. Thus, it is known that *Neisseria* frequently expresses modified LPS/lipid A structures with high heterogeneity and less inflammation-inducing ability than other enterobacterial lipid A³⁶. Here lipoprotein/peptide compounds may partially take over the role of LPS. In a similar way, *Borrelia* belongs to the small number of Gram-negative bacteria which do not possess any LPS³⁷. In this bacterium the surface antigens OspA and OspC may play an important biological role as inflammation-inducing compounds (Fig. 2).

LP as sepsis-inducing compounds. Sepsis is mainly caused by bacterial infections with an approximate identical contribution of Gram-positive and -negative species, whereas the contribution of mycoplasma and fungi - depending on the studies - lies around 5–15%³⁸. Whereas for Gram-negative species the major inflammation- and sepsis-inducing compounds are endotoxins, the responsible compounds for endotoxin-free organisms (Gram-positive bacteria, fungi, mycoplasma, some Gram-negative bacteria) are poorly described or unknown. From the present data, however, it appears to be that LP are the decisive compounds for inflammation- and sepsis-induction, while LTA and PGN, which even recently were described as the responsible compounds³⁸, play, if at all, only a minor role. The lipopeptide FSL-1 selected here exemplarily, showed strong inflammation in our mouse model (Table 1 and Fig. 7). High *in vivo* biological activity induced by FSL-1 was also reported by Hübschle *et al.* in rats³⁹ and by Greis *et al.* in guinea pigs⁴⁰.

Inhibition of cytokine induction by SALP. The second purpose of the present study was to analyze the ability of a SALP, the peptide Aspidasept[®], to suppress the cytokine production induced by the three amphiphilic compounds (LP, LTA, and PGN) in hMNC similar as it was found for LPS^{24,25}, see Fig. 1. As shown in Figs 2–5, the inhibition of the cytokine TNF α induction takes place in most cases already at a 10:1 excess weight ratio of the peptide, and at 100:1 weight ratio there is no longer any detectable cytokine expression. For FSL-1 (Fig. 7) (i) the sepsis-inducing capability of a LP leading to a high mortality in an animal model is similar to that caused by LPS and (ii) the ability of Aspidasept[®] to provide a survival benefit could be demonstrated in the mouse model of toxemia. It should be mentioned that the galactosamine lethality model does not reproduce the course of sepsis in humans and therefore the therapeutical efficiency shown by Aspidasept[®] in this model needs to be evaluated in more realistic animal models. However, the use of galactosamine allowed us to study *in vivo* the TNF α inducing potential of a well-characterized synthetic compound, the lipopeptide FSL-1. This is not possible in models that rely on polymicrobial infections as the causative factor of sepsis (e.g., cecal ligation and puncture). Importantly, mice used in this study for the evaluation of the FSL-1 dependent cytokine response did not receive galactosamine and therefore it is likely that the pro-inflammatory response detected in those animals may be only due to FSL-1.

It should be noted furthermore, that the kind of application of FSL-1 in the mouse model (intra-peritoneally) with a direct subsequent application of the SALP in one bolus does not correspond to the situation in septic patients where already a strong 'cytokine storm' takes place, and in which the therapeutical approach would be the continuous infusion. We think, however, that the data presented here are promising, and the retarded application of the SALP after the heavy inflammation has already started will be a task for further experiments similar as we have done it for endotoxemia²⁴.

General mechanism of LP-induced inflammation and inhibition by SALP. The peptides do not confer protection against the shortened LP variant Pam₃CSK₄, for which no or only a small inhibition is observed by Aspidasept® (Fig. 5), nor with another inhibiting peptide Pep19–12 (not shown). To understand this discrepancy to the behaviour of lipopeptides with longer polar moiety, isothermal titration calorimetric (ITC) experiments were performed comparatively with the lipopeptides Pam₃CSK₄ and FSL-1 in the presence of Aspidasept® (Fig. 8). The data exhibit no clear thermal reaction with the former LP (Fig. 8A), but a considerable reaction with saturation characteristics with the latter LP (Fig. 8B). These data can be understood by considering former ITC data of the LPS:peptide interaction. The inhibition of the LPS-induced cytokine secretion was interpreted as resulting from a polar (Coulomb) interaction of the N-terminal region of the peptide with the backbone region of LPS and a hydrophobic interaction of the C-terminal region with the acyl chain moiety of LPS. The data found here for the FSL-1:peptide interaction indicate a similar mechanism, leading to LP neutralization in the biological experiment by forming less immunologically active LP aggregates. Furthermore, it can be assumed that the LP have a bioactive non-lamellar aggregate structure which converts into a multilamellar organization in the presence of the peptide, similar as found for LPS^{41,42}. We are presently investigating these questions to extend the hypothesis of such ‘generalized supramolecular conformation’, see³³.

As reason for the lacking interaction of Pam₃CSK₄ with the peptide, which does not lead to an inhibition of the cytokine induction, the polar backbone of this LP should be considered. It has only the short amino acid sequence SKKKK with four positive charges, which therefore prevents a strong Coulomb interaction with the positively charged N-terminal region of the peptide. Regarding the biological relevance, it should be noticed that Pam₃CSK₄ is a synthetic shortened variant of naturally occurring lipoproteins, and is not a constituent component in bacterial membranes.

When adding the polycationic polymyxin B (PMB), a traditional AMP⁴³ to the shortened 19 KDa LP, a similar lack of interaction was observed³⁴. In the latter publication it was found that the non-lamellar cubic structure of LP 19 KDa did not change upon interaction with PMB in accordance with a lack of biological inhibition of the stimulation of macrophages.

Former publications described LTA and PGN as inflammation-inducing components of Gram-positive bacteria (reviews in¹¹ and³⁸). Other authors have found that these compounds in purified or synthetic form did not show any activity or only at high concentrations (>10 µg/ml)¹⁵, (see also reviews by Nakayama *et al.*⁹ and by Zähringer *et al.*¹³). Our own data indicate that commercial LTA from *B. subtilis* exhibits some activity, whereas the signal from *S. aureus* LTA is only marginal (Fig. S3 and²⁷), which might be a hint that the activity from the former LTA actually could be due to a contamination. The observation of a minor activity is also valid for PGN (Fig. 4). However, in this context the more important observation is, that the SALP are able to inhibit any cytokine production, whether induced by LTA or by a LP contaminant and are thus able to represent a general neutralizing agent of infection-inducing Gram-negative as well as Gram-positive amphiphiles.

Finally, the question with respect to the physiological importance of the findings reported here may arise. In the case of endotoxins, LPS concentrations of as low as 1 ng/ml may be sufficient to induce sepsis in humans⁴⁴. Possible LP concentrations in septic patients induced by LPS-lacking bacteria are unknown. But for various of the LP investigated here, concentrations in the range of 10 to 100 ng/ml were sufficient to induce cytokines, which might be easily reached by a sufficiently high number of bacteria in human blood.

Methods

Bacterial cell wall compounds. LPS from *Salmonella enterica* Minnesota rough mutant R60 was extracted from log-phase bacteria growing in LB medium (at 37 °C) by the phenol:chloroform:petrol ether (PCP) method, purified, and used in the natural salt form⁴⁵. The purity was examined by MALDI-TOF mass spectrometry and only LPS samples with the predominant *Salmonella* lipid A chemical species (a hexa-acylated diglucosamine backbone phosphorylated at positions 1 and 4' and bearing acyl chains in amide and ester-linkage at positions 2 and 2', and 3 and 3', respectively), were used for subsequent assays.

LTAs were purchased from Sigma-Chemie (Deisenhofen, Germany), one type from *Staphylococcus aureus* (L-2515) and another from *Bacillus subtilis* (L-3265) and used without further purification. LTA from *S. aureus* SA113Δ*lgt* was prepared as described elsewhere¹⁵.

The LP (SitC) from *Staphylococcus aureus* was overexpressed in a his-tagged form from *S. aureus* SA113 (pTX30SitC-his) and purified as described by Müller *et al.*⁴⁶. *S. aureus* was reported to express either diacylated or triacylated LP depending on the environmental conditions⁹. Asanuma *et al.*⁸, however, showed that in *S. aureus* the LP occur mainly in the N-acylated triacyl form.

For the isolation of PGN from *Staphylococcus aureus* strain SA113Δ*lgt*¹⁴, kindly provided by F. Götz (Tübingen, Germany)), a mutant strain that is deficient in acylation of its prelipoproteins, was grown as an overnight culture in Todd Hewitt Medium at 37 °C and stirring at 140 rpm (until an OD₆₆₀ of 1.7, approximately). For killing of bacteria, the culture was boiled for 30 min and then allowed to cool down to room temperature. Cells were collected by centrifugation (9,000 rpm, 20 min, 4 °C), and washed three times with water, three times with acetone and again with water. The resulting pellet was freeze-dried. PGN was then prepared following the protocol of de Jonge *et al.*⁴⁷, including treatment with α-amylase, DNase, RNase, trypsin, alkaline phosphatase and hydrofluoric acid.

Lipopeptide (LP) synthesis. Various LP were synthesized by EMC microcollections GmbH (Tübingen, Germany). The synthesis of LP was carried out by fully automated solid phase peptide synthesis and Fmoc/tBu chemistry on TCP resin. For coupling of amino acids a seven-fold molar excess of single Fmoc-L-amino acids was used. The peptide resins carrying the sequences were elongated with the unusual lipoamino acid Pam₃Cys-OH. Pam₂. The LP FSL-1 and MALP-2 were obtained by elongation of the peptide with the unusual amino acid Fmoc-Dhc (Dhc: (S)-2,3-dihydroxy-2-(R,S)-propyl-(R)-cysteine) followed by O-palmitoylation and Fmoc deprotection. The couplings were carried out in DMF:CH₂Cl₂ (1:1) with DIC/HOBt in threefold excess within 3 h and were monitored by Kaiser assay. The LP were cleaved off the resin by treatment of the resins with trifluoroacetic acid/phenol/ethanedithiol/thioanisole (96:2:1:1) and purified by precipitation. Analytical characterisation of all LP was done by electrospray mass spectrometry (ESI-MS).

Specifically, the chemical structures of the LP are as follows:

Synthetic di- and triacyl LP homologous to the N-terminal part of bacterial LP:

Pam₃CSK₄: 'Water-soluble' analogue of natural LP with modified sequence.

Pam₃Cys-SKSKK.

LP OspA: A shortened analogue of OspA from *Borrelia burgdorferi*

Pam₃Cys-KQNVSSLDEKNSVSV.

LP Osp: A shortened analogue of OspC from *Borrelia burgdorferi*

Pam₃Cys-NNSGKDGNTSANSAD.

LP P6: A shortened analogue of protein P6 from *Haemophilus influenzae*.

Pam₃Cys-SSSNDAAGNGAAQT.

LP H8: A shortened analogue of LP blp NG from *Neisseria gonorrhoeae*.

Pam₃Cys-SQEPAAPAAEATPAG.

Synthetic diacyl LP:

FSL-1: A shortened analogue of the 44-kDa LP LP44 of *Mycoplasma salivarium*.

Pam₂Cys-GDPKHPKSE.

MALP-2: A shortened analogue of macrophage-activating LP from *Mycoplasma fermentans*.

Pam₂Cys-GNNDENISFKEK.

Details of these compounds can be found on the homepage of EMC-Microcollections (Tübingen, Germany). (<http://www.microcollections.de/>).

Synthetic anti-LPS peptides (SALP). The synthesis and purification of the Pep19-2.5 (Aspidasept®) was described previously²⁵, the batches used here were produced by BACHEM (Bubendorf, Switzerland). The amino acid sequence of this 20' mer is GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG. The peptides Pep19-4 (GKKYRRFRWKFKGKFWFWG), Pep9-8 (GRRYKKFRWKFGRFWFWG) and Pep19-12 (GCRRFKFKKWRGRFWFWCFG) were synthesised in the Research Center Borstel as described earlier²⁶.

All peptides were amidated at the C-terminal end and had a purity of >95% as measured by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry.

Stimulation of MNC cells and macrophages by LPS and LP. The stimulation of MNC was performed as described previously^{24,25}. Briefly, MNC were isolated from heparinized blood of healthy donors by the Hypaque-Ficoll density gradient method. The cell number was equilibrated at 5×10^6 cells/ml RPMI 1640 containing 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. For stimulation, 200 µl/well MNC were transferred into 96-well culture plates. The stimuli were serially diluted in RPMI 1640 and added to the cultures at 20 µl per well. The cultures were incubated for 4 h at 37 °C under 5% CO₂. Cell-free supernatants were collected after centrifugation of the culture plates for 10 min at 400 × g and stored at -20 °C until the determination of the cytokine content. Immunological determination of TNFα in the cell supernatant was performed in a sandwich-ELISA as described earlier (OptEIA; BD, Heidelberg, Germany). TNFα was determined and measured following manufacturer's instructions and results are the average of two assays.

In some stimulation experiments, also macrophages were used. Briefly, MNC were isolated from peripheral blood from healthy donors by the Hypaque-Ficoll gradient method. To differentiate the monocytes to macrophages cells were cultivated in Teflon bags in the presence of 2 ng/ml M-CSF in RPMI 1640 medium (endotoxin <0.01 EU/ml; Biochrom, Berlin, Germany) containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 4% heat-inactivated human serum type AB at 37 °C and 6% CO₂. On day 6, cells were washed with PBS, detached by Trypsin-EDTA treatment and seeded at 1×10^6 cells/ml in complete medium in 96-well tissue culture dishes (Nunc, Wiesbaden, Germany). After stimulation of cells with various LP for 4 h, cell-free supernatants of duplicate samples were collected, pooled and stored at -20 °C until determination of cytokine content. Data shown are representative of at least three independent experiments.

LP preparations were pre-warmed for 30 min at 37 °C, and added to the cultures at 20 µl per well. In inhibition experiments, different SALP were added directly after LPS/LP/LTA administration.

Since the data of the stimulation of human MNC by the bacterial and synthetic LP was taken over a time period of more than 6 years, the TNF α production lead to considerable variations due to different batches of LP and of Pep19-2.5, and in particular due to variations resulting from blood samples of different donors. Because the main emphasis laid here is the efficiency of the peptide to inhibit the cytokine production, most figures describe the inhibition efficiency of the peptide in %, by presenting the means \pm SEM of at least 3 independent experiments. The absolute values of the cytokine production, where of note, is given separately in the text.

Transient Transfection and Stimulation of HEK293 Cells. For HEK cell activation, human IL-8 was determined by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using IL-8 cytoset from BIOSOURCE (Life Technologies GmbH, Darmstadt Germany) exactly according to the manufacturer's protocol. For transient transfection, HEK293 cells were plated at a density of 2.5×10^4 /well in 96-well plates in Dulbecco's modified Eagle's medium (PAA, Pasching, Germany). The following day, cells were transfected using Lipofectamine (Life technologies) according to the manufacturer's protocol. Expression plasmid containing the FLAG-tagged version of human TLR2 was a kind gift from P. Nelson, Seattle, WA and subcloned into pREP9 (Life Technologies). TLR2 plasmid was used at 100 ng/transfection. After 24 hours of transfection, cells were washed and stimulated for 18 hours with indicated compounds and positive controls. Finally, supernatants were collected and the interleukin-8 content was quantified using a commercial ELISA (Life technologies).

Data shown are the mean \pm S.D. of triplicate samples of one experiment and representative of two independent experiments.

Mouse model of cytokine induction and toxemia. Seven-week-old female SPF-free Balb/C mice of 20 g of body weight, approximately, were purchased from Harlan Spain (Harlan Interfauna Iberica S.A., Barcelona, Spain) and randomly distributed in experimental groups (at least 4 animals per group except for the determination of lethal dose ($n = 3$)). Sample size was calculated based on previous results with the same animal model²⁴. Animals were housed in individually ventilated cages (5 mice per cage) bedded with hardwood bedding. Mice were provided ad libitum access to feed and water and lighting was adjusted to a 14-hour light/10-hour dark cycle. During the experiments, the condition of the animals was monitored daily every 4 hours and animals displaying persistent motor ataxia and hunched posture were euthanized. For this purpose, mice were sacrificed by cervical dislocation by a technician with a demonstrated high degree of technical proficiency.

To study if FSL-1 had pro-inflammatory cytokine-inducing activity, animals were intraperitoneally inoculated with 40 μ g of FSL-1 resuspended in 200 μ l of pyrogen-free saline. Blood samples were taken both at 1.5 h or 4 h after FSL-1 challenge to measure TNF α and IL-6 levels. For this purpose, mice were anesthetised, a blood sample was obtained by the retroorbital plexus and serum cytokine levels were measured using Quantikine Immunoassays kits (R&D systems, Minneapolis, USA) following manufacturer's instructions. Differences between groups were statistically analyzed using the Mann-Whitney U test.

To evaluate the ability of Aspidasept[®] to neutralize the FSL-1 induced pro-inflammatory cytokines, a group of animals received by the intraperitoneal route first 40 μ g of FSL-1 and then 400 μ g of the drug resuspended in 100 μ l of pyrogen-free saline. This second injection was administered immediately after FSL-1 challenge at a different site of the peritoneum. TNF α and IL-6 levels were measured (see above) at 1.5 h or 4 h after challenge, respectively, coinciding with the peak of cytokine secretion, as determined in preliminary experiments.

To determine the lethal dose of FSL-1 in mice, the method of Galanos and collaborators⁴⁸ was followed with some modifications. Briefly, animals were intraperitoneally inoculated with increasing amounts of FSL-1 (50 ng, 500 ng, 5 μ g and 50 μ g) supplemented with 18 mg of D-galactosamine in a final volume of 200 μ l of pyrogen-free saline. Galactosamine is known to sensitize mice to pro-inflammatory compounds such as LPS, thus making it possible to use lower amounts of the stimulatory drug⁴⁶. The ability of Aspidasept[®] to protect mice from FSL-1 dependent lethal toxemia was assessed by co-administering FSL-1 (4 μ g/mouse) with D-galactosamine (18 mg/mouse) intraperitoneally. Aspidasept[®] (200 μ g/mouse) was administered immediately after FSL-1 at a different site of the peritoneum and the physical activity of each animal was rated every 4 hours according to the following criteria: 1 = very active; 2 = active; 3 = less active; 4 = slow; 5 = lethargic; † = dead.

Results were globally analyzed by means of a Kaplan-Meier survival analysis (SPSS 15.0). When the survival plots were parallel, the data were compared by the log-rank test, whereas the Breslow-Gehan-Wilcoxon test was applied when the plots intersected.

Procedures involving animals were conducted in accordance with the European and Spanish regulations (Directive 2010/63/EU, Recommendation 2007/526/EC, Real Decreto 53/2013 and Ley 32/2007) and were approved by the Animal Research Committee of the University of Navarra (protocol No. E50-12(069-09 E4)[A]).

Isothermal Titration Calorimetry (ITC). Microcalorimetric measurements of peptide binding to selected LP, i.e., Pam₃CSK₄ and FSL-1 were performed on a MCS isothermal titration calorimeter (Microcal, Freiburg, Germany) at 37 $^{\circ}$ C, as previously described^{24,25}. The LP containing solutions

(0.05 mM, prepared as described above) were dispensed into the microcalorimetric cell (volume 1.5 ml), and the peptide solutions (1 mM) were loaded into the syringe compartment (volume 0.1 ml). After temperature equilibration, the peptide was titrated in 3 μ l aliquots every 5 min into the LP-containing cell under constant stirring and the heat of interaction after each injection measured by the MCS instrument was plotted versus time.

Förster Resonance Energy Transfer Spectroscopy (FRET). The ability of selected peptides to intercalate into LP aggregates was investigated exemplarily for FSL-1 and for LP SitC by FRET as described earlier²⁶. Briefly, the LP samples were doubly labelled with the fluorescent phospholipid dyes N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-phosphatidyl ethanolamine (NBD-PE) and N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)-phosphatidylethanolamine (Rh-PE) (Molecular Probes, Life Technologies). Intercalation of unlabeled molecules into the doubly labeled liposomes leads to probe dilution and to a lower FRET efficiency: Therefore, the emission intensity of the donor I_D increases and that of the acceptor I_A decreases (for the sake of clarity, only the quotient of the donor and acceptor emission intensity will be shown here).

In all the experiments, the peptides (100 μ l of a 100 μ M Hepes solution) were added to doubly labelled LP (900 μ l of a 10 μ M solution) at 50 s after equilibration. NBD-PE was excited at 470 nm and the donor and acceptor fluorescence intensities were monitored at 531 and 593 nm, respectively, and the fluorescence signal I_D/I_A was recorded for further 250 s. The measurement was repeated twice.

References

- Seam, N. & Suffredini A. F. Mechanisms of sepsis and insights from clinical trials. *Drug Disc Today Dis Mech* **4**, 83–89 (2007).
- Dellinger, R. P. *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic. *Crit Care Med* **41**, 580–637 (2012).
- van Zanten, A. R. Unravelling post-ICU mortality: predictors and causes of death. *Eur J Anaesthesiol* **27**, 486–490 (2010).
- Russell, J. A. Management of sepsis. *N Engl J Med* **355**, 1699–1713 (2006).
- Hall, M. J., Williams, S. N., DeFrances, C. J. & Golosinskiy, A. Impatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief*. **62**, 1–8 (2011).
- Wood, K. A. & Angus, D. C. Pharmacoeconomic implications of new therapies in sepsis. *Pharmaco Economics* **22**, 895–906 (2004).
- Alexander, C. & Rietschel, E. T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* **7**, 167–202 (2001).
- Asanuma, M. *et al.* Structural evidence of α -aminoacylated lipoproteins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS J* **278**, 716–728 (2011).
- Nakayama, H., Kurokawa, K. & Lee, B. Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways. *FEBS J* **23**, 4247–4268 (2012).
- Ray, A., Cot, M., Puzo, G., Gilleron, M. & Nigou, J. Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. *Biochimie* **95**, 33–42 (2013).
- Rockel, C. & Hartung, T. Systematic review of membrane components of gram-positive bacteria responsible as pyrogens for inducing human monocyte/macrophage cytokine release. *Front Pharmacol*. **3**, 56 (2012).
- Hashimoto, M. *et al.* Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* **177**, 3162–3169 (2006).
- Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H. & Alexander, C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* **213**, 205–224 (2008).
- Stoll, H., Dengjel, J., Nerz, C. & Götz, F. *Staphylococcus aureus* deficient in lipidation of prelipoproteins is attenuated in growth and immune activation. *Infect Immun* **73**, 2411–2423 (2005).
- Gisch, N. *et al.* Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. *J Biol Chem* **288**, 15654–15667 (2013).
- Pedersen, C. M. *et al.* Total synthesis of lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae*. *Angewandte Chemie* **49**, 2585–2590 (2010).
- Schmidt, R. R., Pedersen, C. M., Qiao, Y. & Zähringer, U. Chemical synthesis of bacterial lipoteichoic acids: an insight on its biological significance. *Org Biomol Chem* **9**, 2040–2052 (2011).
- Inamura, S. *et al.* Synthesis of peptidoglycan fragments and evaluation of their biological activity. *Org Biomol Chem* **4**, 232–242 (2006).
- Jin, M. S. *et al.* Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* **130**, 1071–1082 (2007).
- Kang, J. Y. *et al.* Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* **31**, 873–884 (2009).
- Farhat, K. *et al.* Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol* **83**, 692–700 (2008).
- Martinez de Tejada, G. *et al.* Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents. I. Antimicrobial peptides and lipopolyamines. *Curr Drug Targets* **13**, 1121–1130 (2012).
- Schuerholz, T. *et al.* Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents II. Immunological and clinical aspects. *Curr Drug Targets* **13**, 1131–1137 (2012).
- Heinbockel, L. *et al.* Broad-spectrum neutralizing activity of peptide Pep19-2.5 on bacterial pathogenicity factors. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 1480–1487 (2013).
- Gutsmann, T. *et al.*, New antiseptic peptides to protect from endotoxin-mediated shock. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3817–3824 (2010).
- Kaconis, Y. *et al.* Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides. *Biophys J* **100**, 2652–2661 (2011).
- Schürholz, T. *et al.* Neue Sepsistherapie am Horizont: Antiinflammatorische Peptide. *New sepsis therapies on the horizon: Anti-inflammatory peptides DIVI* **4**, 144–152 (2013).
- Schröder, N. W. *et al.* lipopolysaccharide Binding Protein Binds to Triacylated and Diacylated Lipopeptides and Mediates Innate Immune Responses. *J Immunol* **173**, 2683–2691 (2004).
- Peri, F. & Calabrese, V. Toll-like Receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update. *J Med Chem* **57**, 3612–3622 (2014).
- van Bergenhenegouwen, J. *et al.* TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors. *J Leukoc Biol* **5**, 885–902 (2013).

31. Ranoa, D. R., Kelley, S. L. & Tapping, R. I. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex. *J Biol Chem* **288**, 9729–9741 (2013).
32. Jain, S., Coats, S. R., Chang, A. M. & Darveau, R. P. A novel class of lipoprotein lipase-sensitive molecules mediates Toll-like receptor 2 activation by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **81**, 1277–1286 (2013).
33. Schromm, A. B. *et al.* Physicochemical and biological analysis of synthetic bacterial lipopeptides: Validity of the concept of 'endotoxic conformation'. *J Biol Chem* **282**, 11030–11037 (2007).
34. Schromm, A. B. *et al.* Influence of serum on the immune recognition of a synthetic lipopeptide mimetic of the 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Inn Immun* **16**, 213–225 (2010).
35. Neilsen, P. O., Zimmerman, G. A. & McIntyre, T. M. *Escherichia coli* Braun lipoprotein induces a lipopolysaccharide-like endotoxic response from primary human endothelial cells. *J Immunol* **167**, 5231–5239 (2001).
36. John, C. M., Liu, M. & Jarvis, G. A. Profiles of structural heterogeneity in native lipooligosaccharides of *Neisseria* and cytokine induction. *J Lipid Res* **50**, 424–438 (2009).
37. Kenedy, M. R. *et al.* Structural modeling and physicochemical characterization provide evidence that P66 forms a β -Barrel in the *Borrelia burgdorferi* outer membrane. *J Bacteriol* **196**, 859–872 (2014).
38. Reinhart, K., Bauer, M., Riedemann, N. C. & Hartog, C. S. New approaches to sepsis: Molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev* **25**, 609–634 (2012).
39. Hübschle, T. *et al.* Pyrexia, anorexia, adipsia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R180–R187 (2006).
40. Greis, A. *et al.* Characterization of the febrile response induced by fibroblast-stimulating lipopeptide-1 in guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R152–R161 (2007).
41. Schromm, A. B. *et al.* Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem* **267**, 2008–2013 (2000).
42. Andrä, J. *et al.* Mechanism of interaction of optimized *Limulus*-derived cyclic peptides with endotoxins. Thermodynamical, biophysical, and microbiological analysis. *Biochem J* **406**, 297–307 (2007).
43. Garidel, P. & Brandenburg, K. Current understanding of Polymyxin B applications in bacteraemia/sepsis therapy prevention: Clinical, pharmaceutical, structural and mechanistic aspects. *Antiinfect Agents Medic Chem* **8**, 367–385 (2009).
44. Opal, S. M. The clinical relevance of endotoxin in human sepsis: a critical analysis. *J Endotoxin Res* **8**, 473–476 (2002).
45. Galanos, C., Lüderitz, O. & Westphal, O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* **9**, 245–249 (1969).
46. Müller, P. *et al.* The *Staphylococcus aureus* lipoprotein SitC colocalizes with Toll-like receptor 2 (TLR2) in murine keratinocytes and elicits intracellular TLR2 accumulation. *Infect Immun* **78**, 4243–4250 (2010).
47. de Jonge, B. L., Chang, Y. S., Gage, D. & Tomasz, A. Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein 2A. *J Biol Chem* **267**, 11248–11254 (1992).
48. Galanos, C., Freudenberg, M. A. & Reutter, W. Galactosamine induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 5939–5943 (1979).

Acknowledgements

We greatly acknowledge the help of Nina Hahlbrock and Christine Hamann in performing TNF α -, ITC-, and FRET-experiments, and Nina Grohmann for help in the LP SitC extraction. The help of Birte Buske and Simone Thomsen in generating the used peptidoglycan is kindly acknowledged. K.B., T.S. and L.H. are indebted to the German Ministry (Ministerium für Bildung und Forschung) BMBF, project 01GU0824 and the Else-Kröner-Fresenius-Stiftung, project 2011_A140 for financial help. T. Goldmann acknowledges help from the Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL). G.M.T. was also funded by a grant from Proyectos de Investigación Universidad de Navarra (PIUNA-P2011-17), Spain. R.F.E. and S.B.V. are recipients of doctoral fellowships from Gobierno Vasco and Friends of the University of Navarra, Spain, respectively. N.G. was funded by the cluster of excellence "Inflammation at Interfaces". Moreover, the contribution of Clinique La Prairie Research, Clarens-Montreux, Switzerland in funding of this study is gratefully acknowledged.

Author Contributions

G.M.T., R.F.-E., S.S.-G. and S.B.-V. were responsible for the conception, performance, and evaluation of the animal experiments, L.H., T.Go., S.F., T.Gu. and K.B. for the *in vitro* experiments of the cytokine induction and the FRET measurements, W.C. for the ITC experiments, H.H. for the HEK data, C.A. made available the lipoprotein SitC, K.-H.W. the synthetic lipopeptides, and N.G. the staphylococcal LTA and peptidoglycan. T.S. together with G.M.T., L.H. and K.B. were responsible for the basic concept of the paper. All authors have discussed the data and finalized the different chapters of the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: de Tejada, G. M. *et al.* Lipoproteins/peptides are sepsis-inducing toxins from bacteria that can be neutralized by synthetic anti-endotoxin peptides. *Sci. Rep.* **5**, 14292; doi: 10.1038/srep14292 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

RESEARCH ARTICLE

Therapeutical Administration of Peptide Pep19-2.5 and Ibuprofen Reduces Inflammation and Prevents Lethal Sepsis

Lena Heinbockel^{1,8*}, Sebastian Marwitz^{1,8*}, Sergio Barcena Varela², Raquel Ferrer-Espada², Norbert Reiling³, Torsten Goldmann^{1,8}, Thomas Gutschmann⁴, Walter Mier⁵, Tobias Schürholz⁶, Daniel Drömann^{7,8}, Klaus Brandenburg^{3*}, Guillermo Martinez de Tejada²



1 Clinical & Experimental Pathology, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Bioscience, Borstel, Germany, **2** Department of Microbiology and Parasitology, University of Navarra, Pamplona, Spain, **3** Microbial Interface Biology, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Bioscience, Borstel, Germany, **4** Biophysics, Research Center Borstel, Leibniz-Center for Medicine and Bioscience, Borstel, Germany, **5** Department of Nuclear Medicine, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany, **6** Department of Intensive Care, University Hospital Aachen, Aachen, Germany, **7** Medical Clinic III, University of Schleswig-Holstein, Lübeck, Germany, **8** Airway Research Center North (ARCN), Member of the German Center for Lung Research (DZL), Großhansdorf, Germany

OPEN ACCESS

Citation: Heinbockel L, Marwitz S, Barcena Varela S, Ferrer-Espada R, Reiling N, Goldmann T, et al. (2015) Therapeutical Administration of Peptide Pep19-2.5 and Ibuprofen Reduces Inflammation and Prevents Lethal Sepsis. PLoS ONE 10(7): e0133291. doi:10.1371/journal.pone.0133291

Editor: Paul Proost, University of Leuven, Rega Institute, BELGIUM

Received: March 4, 2015

Accepted: June 25, 2015

Published: July 21, 2015

Copyright: © 2015 Heinbockel et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Research at the laboratories of the authors is supported by the Else-Kröner-Fresenius Stiftung (project 2011_A140), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, project DR797/3-1 611672). G.M.T. was also funded by a grant from Proyectos de Investigación Universidad de Navarra (PIUNA-P2011-17), Spain. S.B.V. and R.F.E. were recipients of doctoral fellowships from "Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra" and from Gobierno Vasco, Spain, respectively. The funders

These authors contributed equally to this work.
* kbrandenburg@fz-borstel.de

Abstract

Sepsis is still a major cause of death and many efforts have been made to improve the physical condition of sepsis patients and to reduce the high mortality rate associated with this disease. While achievements were implemented in the intensive care treatment, all attempts within the field of novel therapeutics have failed. As a consequence new medications and improved patient stratification as well as a thoughtful management of the support therapies are urgently needed. In this study, we investigated the simultaneous administration of ibuprofen as a commonly used nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) and Pep19-2.5 (Aspidasept), a newly developed antimicrobial peptide. Here, we show a synergistic therapeutic effect of combined Pep19-2.5-ibuprofen treatment in an endotoxemia mouse model of sepsis. *In vivo* protection correlates with a reduction in plasma levels of both tumor necrosis factor α and prostaglandin E, as a likely consequence of Pep19-2.5 and ibuprofen-dependent blockade of TLR4 and COX pro-inflammatory cascades, respectively. This finding is further characterised and confirmed in a transcriptome analysis of LPS-stimulated human monocytes. The transcriptome analyses showed that Pep19-2.5 and ibuprofen exerted a synergistic global effect both on the number of regulated genes as well as on associated gene ontology and pathway expression. Overall, ibuprofen potentiated the anti-inflammatory activity of Pep19-2.5 both *in vivo* and *in vitro*, suggesting that NSAIDs could be useful to supplement future anti-sepsis therapies.

had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Sepsis is one of the leading causes of death in hospitalized patients worldwide. Current estimations calculate 800,000 cases of severe sepsis annually only in United States, potentially rising to 1,600,000 cases by 2050 [1]. There are indications, that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) modify the course of the disease [2], but it remains controversial whether their administration to sepsis patients is beneficial. NSAIDs are one of the most widely used and best selling medicines, due to their analgesic and anti-inflammatory effect. These drugs inhibit the activity of the prostaglandin-synthesizing enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) and most of them also the activity of the cyclooxygenase-1 (COX-1).

One of those frequently used non-selective COX inhibitors is ibuprofen. Besides its pain-relieving and anti-inflammatory properties, ibuprofen also possesses anti-pyretic activity. However, treatment of septic patients with ibuprofen has not been reported to reduce significantly their mortality [3]. This is in contrast to results from various animal models where a survival benefit was shown in endotoxemic mice or rabbits treated with ibuprofen [4, 5].

Generally, sepsis is a systemic pathology caused by the invasion of microorganisms or their toxins into the bloodstream. Recognition of microbial components like lipopolysaccharide (LPS; endotoxin) by specific immune cell receptors induces secretion of pro-inflammatory cytokines, such as Tumor Necrosis Factor α (TNF α). Whereas this response is in general instrumental to control infection, excessive activation of immune cells can lead to septic shock, which is frequently lethal [6].

The primary site of infections leading to sepsis can be manifold with lung, gut and urinary tract infections having the highest incidence [7]. Just as diverse as the causes are the clinical progressions of the disease. Consequently, the simulation of sepsis in the animal models is challenging and the validity of the different available models is always questioned [8, 9]. However, regardless of the different models and species, the positive effect of the COX-inhibition in hemodynamic parameters as well as in survival was consistently reported. A comprehensive discussion about the various animal models of sepsis and potential reasons for their discrepancy with regard to human studies was put forward by D. M. Aronoff [10].

Two different mouse models of sepsis, namely the endotoxemia and the cecal ligation and puncture model, were used to demonstrate the potent endotoxin-neutralising effects of our secondly investigated drug, the peptide Pep19-2.5 [11, 12]. This synthetic compound belongs to a class of short cationic peptides called host-defense peptides or antimicrobial peptides (AMPs). AMPs are characterized by their ability to bind to conserved anionic components of the microbial envelope, such as LPS in Gram-negative bacteria, and to disrupt or perturb microbial membranes [13–15].

AMPs are attractive candidates for the development of new drugs, due to the low likelihood of resistant mutant emergence, their fast mechanism of killing and their controlled biodegradability [16]. However, to efficiently kill the invading microorganisms during sepsis does not necessarily imply to stop the progression of the disease [17]. Lysed bacteria can release vast amounts of toxic components, such as endotoxins and lipoproteins, which belong to the most potent immune stimulators known.

In our current study, we stimulated mice with endotoxin and demonstrated that the synergistic effect of ibuprofen and Pep19-2.5 reduces the pro-inflammatory cytokine serum levels and increases the overall survival of the animals. To complement this relevant *in vivo* data we performed a transcriptome analysis of LPS-stimulated human monocytes. Results from gene expression experiments confirmed the findings from murine *in vivo* results and showed a clear benefit of the combined application of both drugs on the host response to LPS.

Material and Methods

LPS purification

LPS used throughout this project was isolated from *Salmonella enterica* Serovar Minnesota R60 [18] by applying the traditional phenol:water method [19] and purified according to [20, 21]. To promote LPS solubilisation, 3 µl of triethylamine (MERCCK, Madrid, Spain) were added to each ml of LPS suspension [22]. To induce a uniform aggregation state and to promote interassay reproducibility LPS was subjected to three consecutive cycles of heating and cooling (56°C for 15 min.; 5 min. on ice) prior to each experiment.

Peptide synthesis

For preliminary tests the peptide Pep19-2.5 (Aspidasept: Amino acid sequence: GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG) was synthesized with an amidated C terminus by the solid-phase peptide synthesis technique in an automatic peptide synthesizer (model 433A; Applied Biosystems) on Fmoc-Rink amide resin, according to the 0.1-mmol FastMoc synthesis protocol of the manufacturer, including the removal of the N-terminal Fmoc group. For the final experiments Pep19-2.5 was synthesized commercially (BACHEM, Bubendorf, Switzerland, Lot No. 1053821). The purity of all applied peptides was above 90%.

Animal model of endotoxic shock

All the animal experiments were approved by the Animal Research Committee of University of Navarra (Protocols 069–09 y E6-11) and were carried out in female 7 week-old Balb/c mice weighting approximately 20 g (Harlan Interfauna Iberica S.A., Barcelona, Spain). Mice were randomly caged in groups of six with access to food and water *ad libitum* and light-dark cycles of 12 h. After one week of acclimatization, animals were intraperitoneally inoculated with 400 µg of LPS of *S. enterica* Serovar Minnesota R60 dissolved in 200 µl of sterile saline solution (0.9% w/v of NaCl). After 1 h of LPS challenge, either ibuprofen (4 µg/mouse) or Pep19-2.5 (400 µg/mouse) or the combination of both compounds dissolved in sterile saline was intraperitoneally administered. In independent assays, the same treatments were given at different times with respect to endotoxin inoculation (30 min. before LPS, or immediately after LPS challenge). During the experiments, the condition of the animals was monitored daily every 6 h and animals displaying persistent motor ataxia and hunched posture were euthanized. For this purpose, mice were sacrificed by cervical dislocation by a technician with a demonstrated high degree of technical proficiency.

Mouse serum cytokine measurement. Levels of cytokines were determined in animal serum 2h after LPS administration. Blood samples were centrifuged (10.000 x g, 5 min.), coagulated blood was discarded and serum was transferred to clean cryotubes for immediate ELISA analysis or stored for further experiments at -80°C. For TNFα quantification, an ELISA commercial kit was used (Mouse TNFα, Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Madrid) following manufacturer's instructions. For prostaglandin E2 (PGE2) analysis, a final concentration of 10 µM indomethacin (Sigma-Aldrich, Haverhill, United Kingdom) was added to the serum immediately after extraction to block COX activity and prevent ex-vivo formation of prostaglandin. PGE metabolites were quantified using a commercial system (Prostaglandin E Metabolite ELISA Kit, Cayman Chemical Company, Michigan, USA). This technique required special sample purification, derivatization and acidification prior to performing the assay, as described in the manufacturer's protocol. Those steps were necessary for converting all PGE metabolites into stable compounds that were measurable.

Statistical analysis of the mouse experiments. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Statistical differences between groups (data for 6 or 8 mice per treatment or 3 or 5 independent *ex vivo* experiments) were analysed by Mann-Whitney U Test or One-Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). All data are shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM).

Stimulation of human monocytes

Monocytes were used for LPS stimulation experiments to reflect a sensitive human blood cell type involved in the inflammatory onset of sepsis. Briefly, cells were isolated from heparinized blood of 3 healthy donors by the Hypaque-Ficoll density gradient method [23]. Monocytes were subsequently purified from PBMC by counterflow elutriation (purity consistently greater than 95%) [24]. The cell number was adjusted to 5×10^5 cells/ml RPMI 1640 containing 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. For stimulation, 200 μ l of the monocyte cell suspension was transferred into 96-well culture plates. The stimuli were serially diluted in RPMI 1640 and added to the cultures at 20 μ l per well. Concentrations of 0.1 ng/ml LPS R60 from *Salmonella enterica* Minnesota rough mutants, 10 ng/ml Pep19-2.5 (Bachem, Lot. 1053821) and 1 μ g/ml ibuprofen (Fluka 11892, Lot. BCBI499V) were applied in 0.9% NaCl. The cultures were incubated for 4 h at 37°C under 5% CO₂. Cell-free supernatants were collected after centrifugation of the culture plates for 10 min. at 400 x g and stored at -20°C until determination of the cytokine content. Immunological determination was performed in the cell supernatant in duplicate by using the OptEIA ELISA (BD, Heidelberg, Germany) for TNF α and for the determination of PGE2 the PGE2 ELISA Kit (Thermo Scientific EHPGE2, Rockford, USA). Monocytes for the extraction of RNA were stimulated under the same conditions as described above.

Statistical analysis of the stimulation of human monocytes. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Data of 3 different donors were analysed by using one-way ANOVA with Bonferroni correction as post-hoc test (*p < 0.5, **p < 0.01, ***p < 0.01). All data are shown as mean \pm SEM.

RNA isolation. Total RNA from stimulated human monocytes was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions and stored at -80°C until analysis.

Transcriptome analysis. For microarray analysis, a total of 21 samples from 3 biological replicates were used for evaluation. Quality control of total RNA samples was conducted using the Agilent Bioanalyzer with the RNA 6000 Nano Kit (Agilent, Waldbronn, Germany). For cDNA synthesis, amplification and labelling with Cy3 during reverse transcription by T7 RNA polymerase, the Low Input Quick Amp labelling kit (Agilent, Waldbronn, Germany) was used according to manufacturer's instructions. Cy3-labelled cRNA was purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the specific activity was calculated using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For each sample 1650 ng of labelled cRNA was hybridized to Agilent Human Whole Genome Gene Expression 4x44k V2 arrays and scanned with an Agilent SureScan microarray scanner at a resolution of 5 μ m. Raw data was extracted applying the 1-color gene expression protocol from within the Agilent Feature Extraction Software v11. GeneSpring software version 13 was used for statistical analyses (One-Way ANOVA with Tukey HSD post hoc test and Benjamini-Hochberg multiple testing correction, cut-off $p \leq 0.05$) on probe-level experiment. Before statistical evaluation, intrinsic controls were used to remove compromised and non-detected probes from data set. For displaying expression levels of selected genes (based on statistical evaluation within

GeneSpring), the raw data were quantile-normalized according to Bolstad et al. [25] using the DirectArray software (Oaklabs, Hennigsdorf, Germany). Gene ontology terms for lists of genes were identified by the Gorilla web application [26] using a p-value cut-off of 10^{-7} and the default options. All entities present on the Agilent 4x44K V2 arrays served as background list for analysis of GO term enrichment. Enrichment for pathways was conducted within GeneSpring software from Wikipathways Analysis, Reactome and Biocyc databases (cut-off of ≤ 0.05) from significantly up-regulated genes (Fold Change ≥ 2 , $p \leq 0.05$) against medium control.

The complete dataset has been deposited at Gene Expression Omnibus under ID GSE65855 and will be released upon publication.

Results

Anti-endotoxic activity of ibuprofen and Pep19-2.5 in mice

In preliminary experiments, we found that intraperitoneal (i.p.) inoculation of 400 μg of *S. enterica* Serovar Minnesota R60 LPS caused a mortality of 90% in mice at 48 h post-inoculation. To study if ibuprofen could protect animals against endotoxic shock we inoculated i.p. the compound (40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) at different time-points with respect to LPS challenge. As shown in Fig 1, neither prophylactically nor therapeutically administered ibuprofen improved the survival of mice.

Pep19-2.5 was shown to protect mice against endotoxic shock, although protection progressively diminished if treatment with the peptide was delayed with respect to LPS challenge [11]. Because ibuprofen and Pep19-2.5 are expected to block different pro-inflammatory pathways (COX and TLR4 dependent cascades, respectively), we hypothesized that these compounds could act in synergy *in vivo* to protect against septic shock. To investigate such potential synergistic activity we examined whether ibuprofen could enhance the poor Pep19-2.5 anti-endotoxic performance previously observed at late time points. As shown in Fig 2, administration of a single dose of Pep19-2.5 combined with ibuprofen conferred long-term protection against mortality due to septic shock. Notably, none of the treatments was protective when given alone.

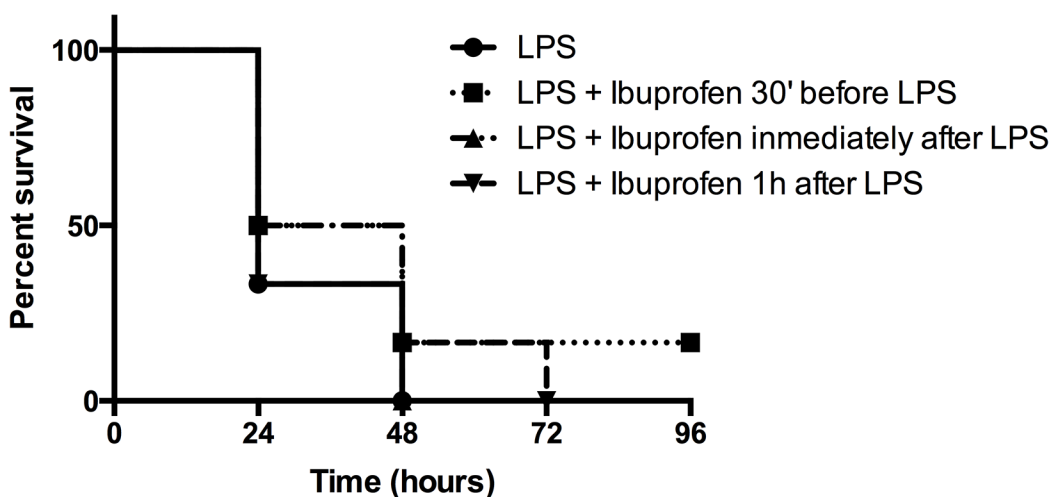


Fig 1. Administration of Ibuprofen to mice before or after LPS challenge has no protective effect. Kinetics of mortality of groups of mice ($n = 6$) intraperitoneally challenged with LPS from *S. enterica* Serovar Minnesota R60 (400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) and treated with (40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) of ibuprofen at different time points with respect to LPS inoculation (30 minutes before or immediately afterwards or 1 h subsequent to challenge). A control group (labeled as "LPS") received only 400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ of LPS. The Kaplan Meier test was used for statistical analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g001

Pep19-2.5 acts mainly on TNF- α rather than PGE2 in the murine endotoxemia model

To study if there is a correlation between animal survival and inhibition of pro-inflammatory cytokines the experiment shown in Fig 2 was repeated and serum levels of TNF α and PGE2 were determined by ELISA 2 h after LPS challenge. Blood was obtained from the retro orbital plexus of anesthetized animals and then exsanguinated mice were sacrificed. Due to its very short half-life *in vivo*, PGE2 levels were measured indirectly by quantifying its metabolic products (“PGE metabolites”; see Material and Methods).

As shown in Fig 3A, all the experimental treatments reduced TNF α levels in comparison to those measured in LPS challenged mice left untreated. This reduction was more pronounced in the case of animals receiving either the combined treatment ($p < 0.01$) or Pep19-2.5 ($p = 0.002$). Mice treated with ibuprofen had significantly higher levels of TNF α ($p = 0.016$) than the Pep19-2.5 treated group. However, addition of the peptide to ibuprofen (i.e. the combined treatment) did not enhance the ability of the NSAID to decrease TNF- α any further. Regarding the activity of the COX-dependent pathway, as shown in Fig 3B, LPS-induced PGE metabolites levels decreased upon treatment with ibuprofen (LPS vs. LPS+ ibuprofen ($p = 0.020$)); LPS vs. combined treatment ($p = 0.021$)). In contrast, presence of Pep19-2.5 alone or in combination with ibuprofen appeared to have little influence on the levels of PGE metabolites.

Pep19-2.5 acts mainly on TNF- α rather than PGE2 response of human monocytes to LPS

Human monocytes were used for the stimulation and closer investigation of the LPS-induced effects on human cells. For a comparison with the mouse data we first analysed the levels of TNF α and PGE2 in the supernatants of the stimulated cells (Fig 4). The results revealed a similar picture for the *in vitro* as for the *in vivo* experiments. Both, the addition of Pep19-2.5 as well as the addition of ibuprofen led to a decreased TNF α response compared to LPS without additives (Fig 4A). This effect was slightly amplified in the combinational treatment. On the

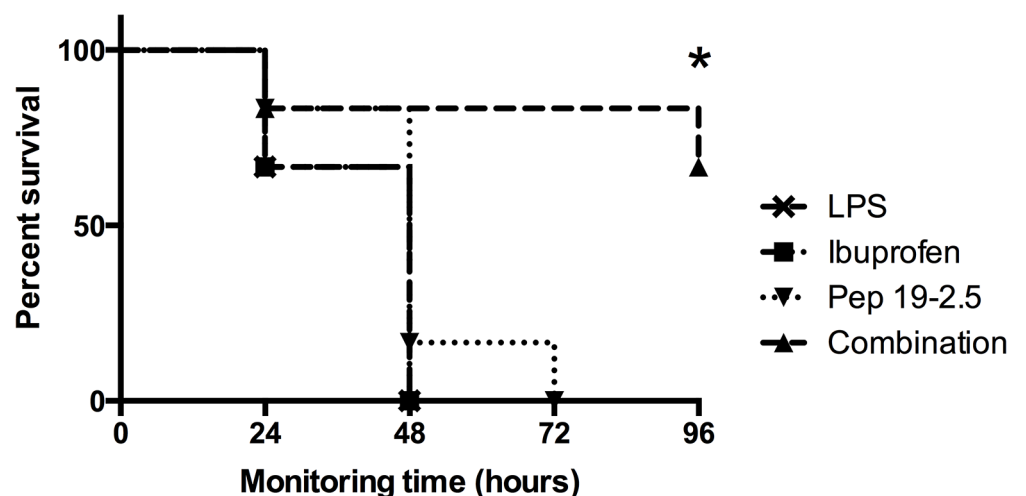


Fig 2. Pep19-2.5 acts in synergy with ibuprofen and protects mice against lethal endotoxemia. Kinetics of mortality of groups of mice ($n = 6$) intraperitoneally inoculated with LPS from *S. enterica* Serovar Minnesota R60 (400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) and treated 1 h later with either ibuprofen (40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$), or Pep19-2.5 (400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) or a combination of both treatments. A control group (labelled as “LPS”) received only 400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ of LPS. The Kaplan Meier test was used for statistical analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g002

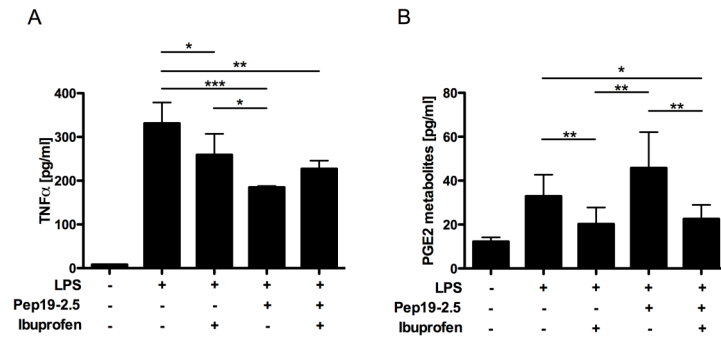


Fig 3. Animals receiving the combined ibuprofen-Pep19-2.5 treatment have low serum levels of both TNF α and PGE 2h after LPS administration. Plasma TNF α (pg/ml) (A) and PGE Metabolites (pg/ml) (B) levels in groups of mice (at least n = 6) intraperitoneally inoculated with LPS from *S. enterica* Serovar Minnesota R60 (400 μ g/mouse). Groups received the same treatments as detailed in Fig 2. Negative control group (n = 3) received neither LPS nor treatment. Statistical differences were analysed using ANOVA followed by DMS (parametrical, A) and Thamhane (no parametrical, B as there was heterogeneity of variances) post hoc tests (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; *** $p < 0.001$). Very significant statistical differences ($p < 0.01$ for PGE2 or $p < 0.001$ for TNF α) were found between the negative control group (labelled with the symbol #) and the rest of the groups.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g003

contrary, no effect was observed for the PGE2 level after peptide treatment, while a strong decrease in PGE2 was observed for the ibuprofen addition, as expected (Fig 4B).

Treatment with Pep19-2.5 and ibuprofen downregulates the global gene expression response to LPS of monocytes

Transcriptomes of challenged human monocytes were analysed by One-Way ANOVA with Tukey post hoc testing (cut-off $p \leq 0.05$) to identify significant differentially expressed genes between experimental groups (see S1 Table). Since the animal survival experiments suggested a possible synergistic effect of Pep19-2.5 and ibuprofen if applied in combination, the microarray data was further evaluated for this purpose. The variance in global gene expression with regards to their range in intensity is plotted in Fig 5A. In general, LPS-stimulation led to more regulated genes which were also found to be more strongly expressed than co-stimulation with ibuprofen or Pep19-2.5 alone. The combination of both compounds with LPS resulted in a decrease of gene expression intensity as well as in the number of highly expressed genes. To further analyse the possible synergistic effect of the combination the set of genes from

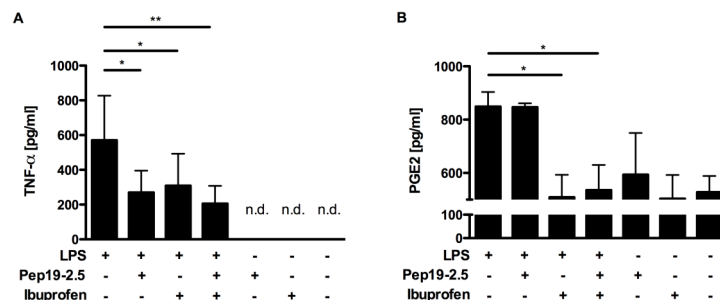


Fig 4. The secretion levels of the inflammatory markers TNF α and PGE2 after LPS stimulation. Expression levels in cell supernatants of TNF α (pg/ml) (A) and PGE2 (pg/ml) (B) of human monocytes after 4 h and 24 h of stimulation, respectively. Not detectable n.d. One-way ANOVA with Bonferroni correction as post-hoc test (* $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$) was used to statistically analyse cells from 3 different donors. All data are shown as mean \pm SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g004

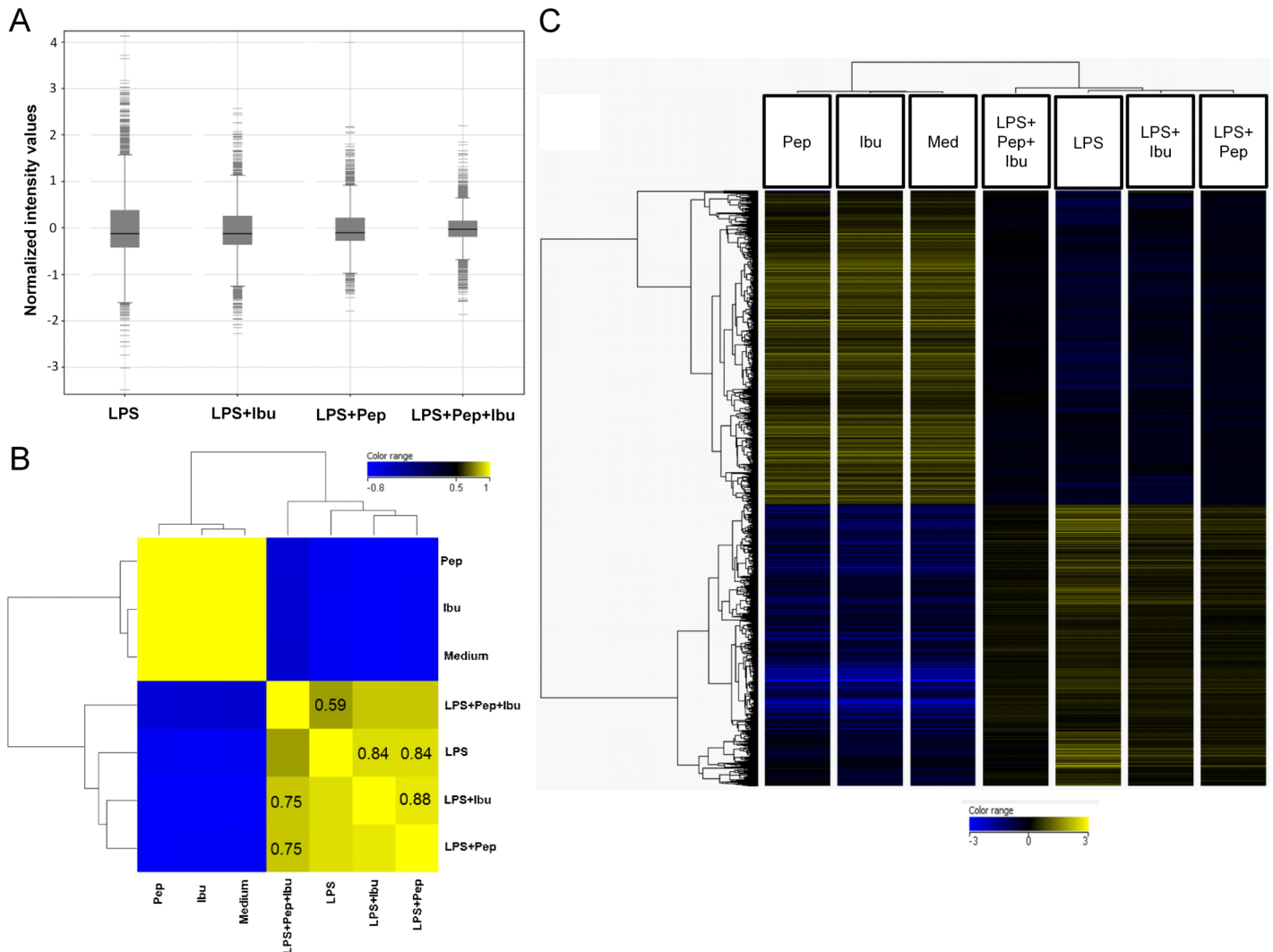


Fig 5. The combination of ibuprofen and Pep19.2–5 alleviates the transcriptional LPS-response of human monocytes. Gene expression analysis of human monocytes stimulated with LPS, ibuprofen, Pep and combinations of both after 4 h of stimulation. Samples from 3 biological replicates of different donors were analysed by 1W-ANOVA with Tukey HSD post hoc testing for detection of differentially expressed genes between parameters with a Benjamini-Hochberg multiple testing correction (cut-off ≤ 0.05). A: Variance in gene expression as indicated by the mean value of gene expression as well as its range with regard to LPS, LPS+Ibu, LPS+Pep and LPS+Ibu+Pep stimulation. The variance in gene expression upon LPS-stimulation is reduced by treatment with anti-inflammatory drugs ibuprofen, Pep or both. B: Pearson correlation analysis of significantly regulated genes from 1W-ANOVA analysis with subsequent hierarchical clustering (squared Euclidian distance; Ward’s linkage rule) on experimental conditions ordered the samples according to their similarity. Correlation coefficients are colour coded and exact numbers provided inside the boxes. C: Hierarchical clustering of significantly regulated genes from those genes that were found to be significantly regulated by LPS were subjected to Hierarchical Clustering (Pearson Centered distance matrix, Wards Linkage Rule) and relative gene expression is displayed for all experimental parameters as a heatmap.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g005

1W-ANOVA was subjected to Pearson correlation analysis and hierarchically clustered according to experimental conditions (Fig 5B). The correlation coefficient of LPS vs. LPS+Ibu +Pep was 0.59 and hence lower than the coefficients from LPS vs. LPS+Pep (0.84) and LPS vs. LPS+Ibu (0.84), suggesting stronger dissimilarities between these conditions (see S2 Table for complete list of correlation coefficients).

Hierarchical clustering of the significantly differentially regulated genes resulted in a distinct pattern of gene expression (Fig 5C). Overall, samples stimulated with either Medium or with one of the drugs (i.e. Pep19-2.5 or ibuprofen) clustered together. This suggests that these

experimental conditions induce a higher degree of similarity in gene expression pattern compared to the other conditions. Treatment with Pep19-2.5 or ibuprofen alleviated expression levels of most of LPS up-regulated genes (Fig 5C), as indicated by the propensity of these samples to cluster together.

The most remarkable effect on the LPS-induced gene expression pattern was caused by the combined treatment ibuprofen-Pep19-2.5. The gene expression intensity of those genes, which were either induced or repressed by LPS was clearly restored to basal levels after application of ibuprofen and Pep19-2.5 in combination.

Treatment with Pep19-2.5 and ibuprofen modulates the innate immune response to LPS

Gene ontology (GO) analysis was conducted to evaluate the effects of monocytes by LPS stimulation. 23 GO-terms were found to be enriched with a factor of ≥ 2 (Table 1) and a p-value cutoff $\leq 10^{-7}$. Among the enriched GO-terms the most prominent were found to be involved in the innate immune response, pattern recognition receptor signalling and different TLR signalling pathways. Fig 6A displays the genes with the GO term “cellular response to lipopolysaccharide” as a heat-map with hierarchical clustering. A strong response to LPS can be observed of prominent genes such as IRG1, IL18 or IL10 and others indicating a LPS-reactive set of genes. Upon stimulation with both anti-inflammatory drugs, the expression of these genes was more reduced compared to the application of either ibuprofen or Pep19-2.5 (Fig 6B) alone.

Table 1. Enriched GO terms among the regulated genes suggest a central involvement of the innate immune response.

GO term	Description	P-value	FDR q-value	Enrichment (N, B, n, b)
GO:0002218	activation of innate immune response	1,98E-015	1,13E-012	2.02 (17671,149,5469,93)
GO:0034142	toll-like receptor 4 signaling pathway	2,23E-015	1,22E-012	2.27 (17671,97,5469,68)
GO:0002758	innate immune response-activating signal transduction	5,50E-015	2,58E-012	2.03 (17671,142,5469,89)
GO:0002221	pattern recognition receptor signaling pathway	2,30E-014	9,17E-012	2.01 (17671,140,5469,87)
GO:0034138	toll-like receptor 3 signaling pathway	2,33E-014	9,02E-012	2.34 (17671,80,5469,58)
GO:0002224	toll-like receptor signaling pathway	2,84E-014	1,07E-011	2.08 (17671,121,5469,78)
GO:0002756	MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway	3,11E-013	8,71E-011	2.29 (17671,79,5469,56)
GO:0032480	negative regulation of type I interferon production	4,36E-013	1,12E-010	2.82 (17671,39,5469,34)
GO:0035666	TRIF-dependent toll-like receptor signaling pathway	7,07E-013	1,72E-010	2.30 (17671,76,5469,54)
GO:0034134	toll-like receptor 2 signaling pathway	1,61E-012	3,64E-010	2.30 (17671,73,5469,52)
GO:0032479	regulation of type I interferon production	6,41E-012	1,30E-009	2.03 (17671,108,5469,68)
GO:0038124	toll-like receptor TLR6:TLR2 signaling pathway	8,62E-012	1,64E-009	2.28 (17671,71,5469,50)
GO:0038123	toll-like receptor TLR1:TLR2 signaling pathway	8,62E-012	1,62E-009	2.28 (17671,71,5469,50)
GO:0002755	MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	1,65E-010	2,55E-008	2.11 (17671,81,5469,53)
GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	9,79E-010	1,24E-007	2.02 (17671,88,5469,55)
GO:0034166	toll-like receptor 10 signaling pathway	1,15E-009	1,42E-007	2.19 (17671,65,5469,44)
GO:0034146	toll-like receptor 5 signaling pathway	1,15E-009	1,40E-007	2.19 (17671,65,5469,44)
GO:0034162	toll-like receptor 9 signaling pathway	2,00E-009	2,37E-007	2.11 (17671,72,5469,47)
GO:0050688	regulation of defense response to virus	2,73E-009	3,12E-007	2.03 (17671,81,5469,51)
GO:0035872	nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing receptor signaling pathway	3,45E-008	3,29E-006	2.30 (17671,45,5469,32)
GO:0031663	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	2,81E-007	2,17E-005	2.54 (17671,28,5469,22)
GO:0007249	I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	9,05E-007	5,92E-005	2.18 (17671,43,5469,29)
GO:0002753	cytoplasmic pattern recognition receptor signaling pathway	9,51E-007	6,13E-005	2.35 (17671,33,5469,24)

Enrichment (N, B, n, b) is defined as follows: N is the total number of genes. B is the total number of genes associated with a specific GO term. n is the number of genes in the top of the input list or in the target set when appropriate. b is the number of genes in the intersection. Enrichment: (b/n)/(B/N)

doi:10.1371/journal.pone.0133291.t001

Treatment with Pep19-2.5 and ibuprofen dampens the LPS-induced expression of pro-inflammatory pathways

We were further interested in the effects of Pep19-2.5 and ibuprofen on underlying signalling pathways in response to LPS. Enrichment analysis was conducted on each experimental

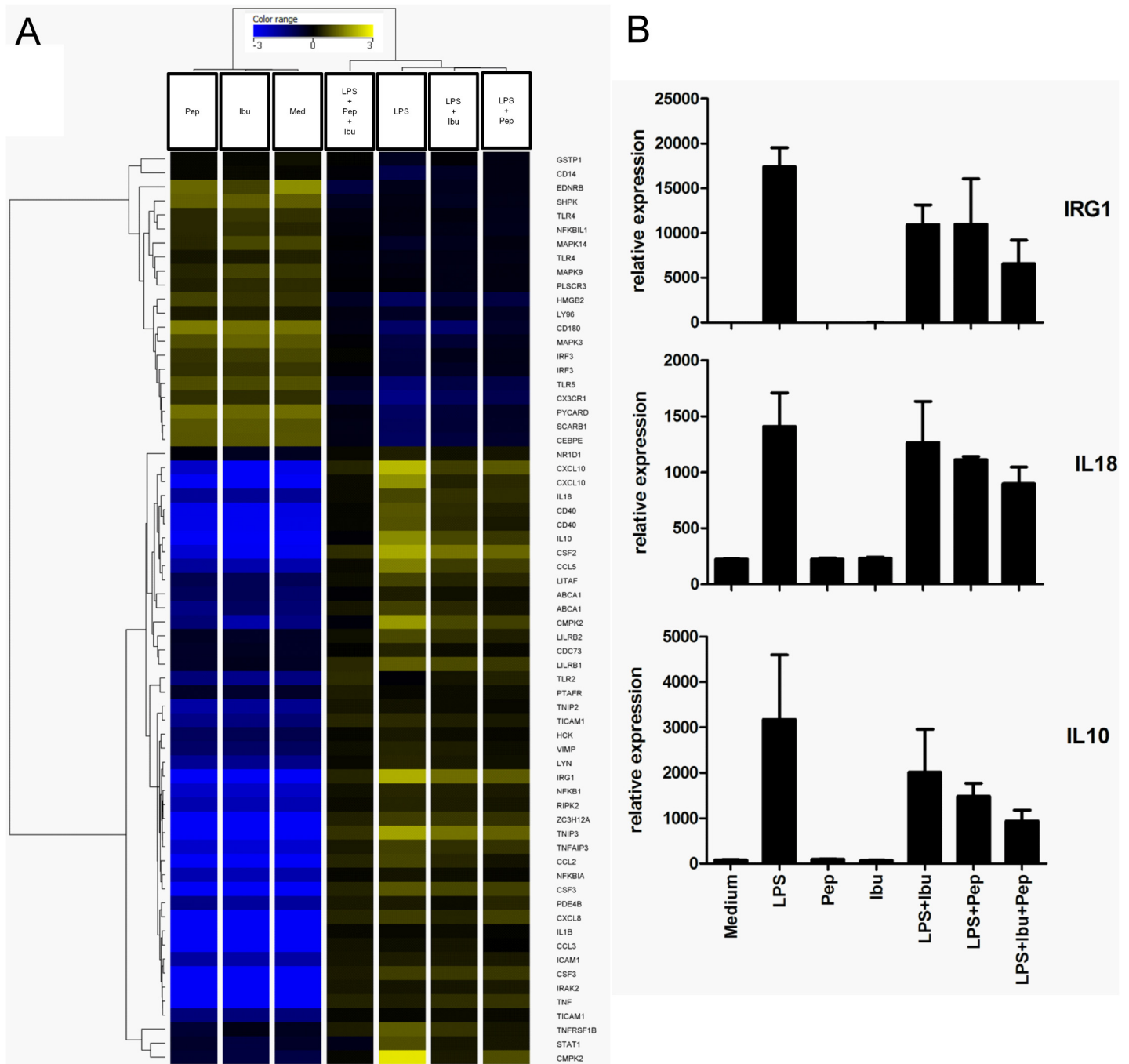


Fig 6. The cellular response to LPS of monocytes is influenced by different combinations of anti-inflammatory drugs. Results from Gene Ontology analysis of data set retrieved from 1W-ANOVA. (A) List of genes belonging to GO term “Cellular Response to LPS” displayed as heatmap of hierarchical clustering (Pearson Centered distance matrix; Ward’s linkage rule) according to their relative expression. (B) Selected single genes from (A) displayed with their relative, quantile-normalized expression.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g006

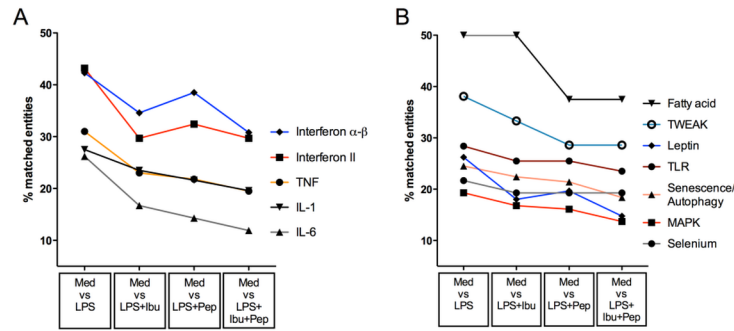


Fig 7. Pep19-2.5 and ibuprofen modulate the LPS-responsive inflammatory signalling pathways. The 10 most significant (lowest p-value) pathways from the LPS stimulation (Med vs LPS) were used as an example for the inflammatory response pattern of monocytes to LPS and compared to the effects of different combinations of anti-inflammatory treatments. Information for pathways is displayed as the % of matched entities to each pathway ($[\text{Number of entities found to be significantly enriched in experimental condition} / \text{Total number of entities in pathway}] * 100$). For means of classical LPS-response we included IL-6 signaling_pathway and fatty acid activation which were also found to be significantly enriched upon LPS-stimulation.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g007

condition and the resulting list from LPS stimulation served as standard for comparison of therapeutic efficacy. The 10 most significantly enriched pathways from each condition were compared to the results of single anti-inflammatory treatment or the combination of ibuprofen and Pep19-2.5 (Fig 7). Not unexpectedly, stimulation of monocytes with LPS resulted in a high number of matched entities that belong to pathways involved in the inflammatory response, such as Interferon or TNF and IL-1 (Fig 7A). The overall percentage of matched entities to these pathways was reduced upon administration of ibuprofen or Pep19-2.5. Here, ibuprofen alone exerted its maximal effect on Interferon $\alpha\beta$ and Type II Interferon signalling cascades, unlike Pep19-2.5 which exhibited its most potent activity on TNF, IL-1 and IL-6 pathways. In general, the combination of both drugs caused a global down-regulation in genes involved in these pathways. Besides this direct effect at the cytokine expression level, upstream pathways that are involved in general processes were also found to be significantly enriched (Fig 7B). Among these, TLR and TWEAK signalling as well as the MAPK signalling cascade were highly upregulated upon LPS stimulation. In general, treatment with either ibuprofen or Pep19-2.5 dampened to a similar extent the level of matched members with a more significant effect when the compounds were applied in combination. Interestingly, fatty acid activation seemed to be an activity exclusively dependent on the presence of Pep19-2.5. Addition of ibuprofen did not enhance the effect any further.

Overall, combination of both drugs resulted in a reduced percentage of matched genes to these inflammatory pathways which were induced by LPS.

Discussion

During sepsis treatment the application of NSAIDs is under discussion since decades. Prostaglandin E2 (PGE2) is a lipid-signalling molecule composed of 20-carbons that plays an essential role in homeostasis and inflammatory reactions. The inhibition of prostaglandin synthesis by a blockade of COX enzymes by NSAIDs is commonly used in a wide variety of medical indications. The convenience of administering NSAIDs to septic patients has been under discussion since decades. We investigated in this study the simultaneous anti-septic activity of the NSAID ibuprofen and Pep19-2.5, a promising anti-septic peptide, currently in preclinical development.

Probably, our most important finding is the demonstration that ibuprofen acts in synergy with Pep19-2.5 to stop LPS-dependent mortality *in vivo*. This could be explained by the simultaneous blockage of different cascades involved in inflammatory activation, as investigated here by transcriptome analysis. However, to study the applicability of our findings to sepsis treatment, it will be necessary to test the combinatorial therapy in more realistic animal models induced by the inoculation of viable microorganisms and as supplement to the recommended antibiotic therapy.

Furthermore, we showed that administration of ibuprofen greatly inhibits PGE₂ production as expected of a drug down-regulating the COX-dependent pathway. However, this inhibitory effect appears to be insufficient for improving mice survival, and might be due to its suboptimal capacity to reduce TNF α levels *in vivo*, as we showed in Fig 3A. Conversely, Pep19-2.5 appears to have an optimal ability to decrease TNF α levels but it has no inhibitory effect on the production of COX dependent metabolites, such as PGE (Fig 3B). Our results suggest that only when both the COX and the TLR4 dependent pathways are inhibited—as it happens when combining both treatments—the protection increases significantly. Nevertheless, blocking the TLR4-dependent inflammatory pathway seems to be more relevant for mice survival, in accordance with previous results [11].

Independently from their ability to bind and neutralize microbial targets, some antimicrobial peptides have been reported to have immuno-modulatory activities [27]. Indeed, this would be an attractive property for an agent intended to be used in anti-sepsis therapy. Schuerholz and collaborators showed that, after induction of sepsis in the mouse model of cecal ligation and puncture (CLP), administration of Pep19-2.5 led to marked reduction of CD14 expression in various tissues and to diminished IL-6 as well as IL-1 levels in plasma after 24 h, compared to the untreated control group. Using the same model, these authors showed that this therapeutic activity was even more pronounced than the inflammation inhibiting effect of Polymyxin B, considered as the standard antimicrobial and LPS neutralizing peptide in clinical use [12]. Interestingly this observation comes in line with our findings from the microarray analysis, where Pep19-2.5 tuned down TNF, IL-1 as well as IL-6 pathways of human monocytes in response to LPS.

In this study, the combination of Pep19-2.5 with ibuprofen caused a decrease of TNF α and PGE₂ levels in the mouse model of endotoxemia. Particularly important, it led to a drastic advantage in survival compared not only to the untreated mice, but also to the single medications. Since the treatment was administered 1 h after LPS challenge, protection was achieved under therapeutically relevant conditions.

Due to numerous reports in the past concerning the discrepancy of the mouse studies and the situation in humans, especially regarding the use of NSAIDs, we further extended our findings by implementing a comprehensive analysis of *in vitro* LPS-stimulated human cells. Here again a significant reduction in TNF α protein and PGE₂ lipid expression levels could be observed by the application of Pep19-2.5 and ibuprofen. The microarray data comes in line with the observations from both, human and mouse experiments. The combined administration of ibuprofen and Pep19-2.5 does not only alleviate the variance as well as expression intensity in global gene expression as indicated in Fig 5, but also restores the expression of those genes which were found to be induced upon LPS stimulation (Fig 5C). A closer examination at the gene ontology term of the cellular response to LPS also indicates the advantage of the combinatorial treatment (Fig 6). Combined administration of Pep19-2.5 and ibuprofen decreases the IL-18 transcription, that was slight in the case of the single Pep19-2.5 treatment, and greatly enhanced upon combination of the peptide with ibuprofen. The IL-18 protein, also known as Interferon- γ inducing factor, has been reported to have pro-inflammatory activity and to play a major role in the development of sepsis [28, 29]. Elevated IL-18 concentrations in the blood

are associated with a poor clinical outcome and this biomarker has been proposed as target for therapeutic intervention as well as a potential diagnostic tool.

Interestingly, our data show that combination of Pep19-2.5 and ibuprofen, led to a decrease in LPS induced IL-10 production, an anti-inflammatory cytokine. At present, we do not know whether this is a consequence of the inhibition of the TLR-4 dependent pathway due to LPS neutralization by the peptide or it results from the blockade of PGE2 production by ibuprofen. IL10 reduction caused by the combination is in line with the described role of PGE2 in combination with LPS regarding the induction of an anti-inflammatory phenotype in macrophages characterized by the IL-10 expression [30]. In accordance, the LPS-induced immune responsive gene 1 (IRG1) transcription is reduced by Pep19-2.5 and ibuprofen. The IRG1 protein is expressed during inflammation in macrophages, but its function is not entirely elucidated yet. This protein has been proposed to have antimicrobial [31] and anti-inflammatory activity. A dominance of the latter activity could lead to immunosuppression, which is frequently observed in sepsis patients and constitutes a common risk of death [32]. Since the combined treatment downregulates IRG1, it could have beneficial effects for sepsis therapy.

To further decipher the transcriptomic responses to LPS and the therapeutic effects, Gene Ontology as well as pathway analyses were conducted. The 10 strongest influenced pathways after LPS stimulation compared to medium control were evaluated for the treatment effects (Fig 7). A significant inhibitory effect of the peptide treatment on LPS-induced inflammation was observed for the pathway of fatty acid activation. The most prominent LPS up regulated genes were found to be the very long-chain acyl-CoA synthetase and the long chain fatty acid CoA-ligase 4. The induction of the expression of the acyl-CoA synthetase by LPS in monocytes and macrophages was proposed by Rubinow et al. to play a role in inflammation and innate immunity [33], further fatty acid induced monocyte inflammation can contribute to various chronic inflammatory and cardiovascular diseases [34, 35].

Another interesting pathway, also with regard to its potential use in the classification of the severity of the sepsis disease status is the TWEAK pathway [36]. Here we show that this pathway is also down-regulated in the treated groups and considerably induced during LPS stimulation.

As expected, well established LPS-induced inflammatory pathways and typical markers for the onset of sepsis, such as IL-1, IL-6, TNF α , are also among the pathways with the most significant up regulation after LPS-challenge.

Our work expands previous sepsis-related research with regard to the comprehensive analysis of LPS-induced pathways and demonstrates the protective effect of therapies based on combined anti-inflammatory treatments.

Supporting Information

S1 Table. Significantly differentially expressed genes among the experimental groups.
(TXT)

S2 Table. Complete table of Pearson Correlation Coefficients for each experimental group.
(TXT)

Acknowledgments

The authors are grateful for the excellent technical support of Sabrina Groth, Jasmin Tiebach and Lisa Niwinski as well as to Rainer Bartels and Volker Grote for the peptide synthesis. Pep19-2.5 patent OCT/EP2009/002565. Research at the laboratories of the authors is supported by the Else-Kröner-Fresenius Stiftung (project 2011_A140), and the Deutsche

Forschungsgemeinschaft (DFG, project DR797/3-1 611672). G.M.T. was also funded by a grant from Proyectos de Investigación Universidad de Navarra (PIUNA-P2011-17), Spain. S.B.V. and R.F.E were recipients of doctoral fellowships from “Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra” and from Gobierno Vasco, Spain, respectively.

The use of blood from human donors was authorised at the 17.06.2011 with the reference number 11–061 from the ethic commission of the University of Lübeck.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LH KB GMT T. Gutschmann T. Goldmann. Performed the experiments: LH SM SBV RFE WM. Analyzed the data: TS DD LH SM KB. Contributed reagents/materials/analysis tools: WM LH T. Gutschmann T. Goldmann GMT SBV RFE. Wrote the paper: LH SM SBV RFE NR T. Gutschmann T. Goldmann WM TS DD KB GMT.

References

1. Kumar A. An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock: implications for optimizing antimicrobial therapy. *Virulence*. 2014; 5(1):80–97. doi: [10.4161/viru.26913](https://doi.org/10.4161/viru.26913) PMID: [24184742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24184742/); PubMed Central PMCID: [PMC3916387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3916387/).
2. Fink MP. Prostaglandins and sepsis: still a fascinating topic despite almost 40 years of research. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001; 281(3):L534–6. Epub 2001/08/16. PMID: [11504677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11504677/).
3. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 1997; 336(13):912–8. Epub 1997/03/27. doi: [10.1056/NEJM199703273361303](https://doi.org/10.1056/NEJM199703273361303) PMID: [9070471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9070471/).
4. Mansilla-Rosello A, Ferron-Orihuela JA, Ruiz-Cabello F, Garrote-Lara D, Fernandez-Mondejar E, Delgado-Carrasco ML. Differential effects of IL-1 beta and ibuprofen after endotoxic challenge in mice. *The Journal of surgical research*. 1997; 67(2):199–204. Epub 1997/02/01. doi: [10.1006/jsre.1996.4982](https://doi.org/10.1006/jsre.1996.4982) PMID: [9073568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9073568/).
5. Celik I, Akbulut A, Kilic SS, Rahman A, Vural P, Canbaz M, et al. Effects of ibuprofen on the physiology and outcome of rabbit endotoxic shock. *BMC infectious diseases*. 2002; 2:26. Epub 2002/11/26. PMID: [12445332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12445332/); PubMed Central PMCID: [PMC137589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC137589/).
6. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013; 369(9):840–51. Epub 2013/08/30. doi: [10.1056/NEJMra1208623](https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623) PMID: [23984731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23984731/).
7. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grund S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*. 2007; 33(4):606–18. Epub 2007/02/27. doi: [10.1007/s00134-006-0517-7](https://doi.org/10.1007/s00134-006-0517-7) PMID: [17323051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17323051/).
8. Fink MP, Warren HS. Strategies to improve drug development for sepsis. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13(10):741–58. Epub 2014/09/06. doi: [10.1038/nrd4368](https://doi.org/10.1038/nrd4368) PMID: [25190187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25190187/).
9. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*. 1998; 9(1):1–11. Epub 1998/02/18. PMID: [9466467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9466467/).
10. Aronoff DM. Cyclooxygenase inhibition in sepsis: is there life after death? *Mediators of inflammation*. 2012; 2012:696897. Epub 2012/06/06. doi: [10.1155/2012/696897](https://doi.org/10.1155/2012/696897) PMID: [22665954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22665954/); PubMed Central PMCID: [PMC3361325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3361325/).
11. Heinbockel L, Sanchez-Gomez S, Martinez de Tejada G, Domming S, Brandenburg J, Kaconis Y, et al. Preclinical investigations reveal the broad-spectrum neutralizing activity of Peptide pep19-2.5 on bacterial pathogenicity factors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(3):1480–7. Epub 2013/01/16. doi: [10.1128/AAC.02066-12](https://doi.org/10.1128/AAC.02066-12) PMID: [23318793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23318793/).
12. Schuerholz T, Doemming S, Hornef M, Martin L, Simon TP, Heinbockel L, et al. The anti-inflammatory effect of the synthetic antimicrobial peptide 19–2.5 in a murine sepsis model: a prospective randomized study. *Crit Care*. 2013; 17(1):R3. Epub 2013/01/11. doi: [10.1186/cc11920](https://doi.org/10.1186/cc11920) PMID: [23302299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23302299/).
13. Hancock RE, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in biotechnology*. 1998; 16(2):82–8. Epub 1998/03/06. PMID: [9487736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9487736/).
14. Findlay B, Zhanel GG, Schweizer F. Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(10):4049–58. Epub 2010/08/11. doi: [10.1128/AAC.00530-10](https://doi.org/10.1128/AAC.00530-10) PMID: [20696877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20696877/); PubMed Central PMCID: [PMC2944624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2944624/).

15. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*. 2011; 29(9):464–72. doi: [10.1016/j.tibtech.2011.05.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001) PMID: [21680034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21680034/)
16. Bradshaw J. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2003; 17(4):233–40. Epub 2003/08/06. PMID: [12899640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12899640/).
17. Cohen J. Non-antibiotic strategies for sepsis. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15(4):302–7. Epub 2009/05/07. doi: [10.1111/j.1469-0691.2009.02753.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02753.x) PMID: [19416301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19416301/).
18. Luederitz O, Risse HJ, Schulte-Holthausen H, Strominger JL, Sutherland IW, Westphal O. Biochemical Studies of the Smooth-Rough Mutation in Salmonella Minnesota. *Journal of bacteriology*. 1965; 89:343–54. PMID: [14255700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14255700/); PubMed Central PMCID: [PMC305514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC305514/).
19. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in carbohydrate chemistry*. 1965; 5:83–91.
20. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol*. 2000; 165(2):618–22. PMID: [10878331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10878331/).
21. Leong D, Diaz R, Milner K, Rudbach J, Wilson JB. Some structural and biological properties of Brucella endotoxin. *Infect Immun*. 1970; 1:174–82. PMID: [16557710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16557710/)
22. Garidel P, Rappolt M, Schromm AB, Howe J, Lohner K, Andra J, et al. Divalent cations affect chain mobility and aggregate structure of lipopolysaccharide from Salmonella Minnesota reflected in a decrease of its biological activity. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1715(2):122–31. Epub 2005/09/03. doi: [10.1016/j.bbame.2005.07.013](https://doi.org/10.1016/j.bbame.2005.07.013) PMID: [16137644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16137644/).
23. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum*. 1968; 97:77–89. PMID: [4179068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4179068/).
24. Grage-Griebenow E, Lorenzen D, Fetting R, Flad HD, Ernst M. Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *European journal of immunology*. 1993; 23(12):3126–35. doi: [10.1002/eji.1830231213](https://doi.org/10.1002/eji.1830231213) PMID: [7504990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7504990/).
25. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003; 19(2):185–93. PMID: [12538238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12538238/).
26. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC bioinformatics*. 2009; 10:48. doi: [10.1186/1471-2105-10-48](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-48) PMID: [19192299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19192299/); PubMed Central PMCID: [PMC2644678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2644678/).
27. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology*. 2000; 8(9):402–10. PMID: [10989307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10989307/).
28. Tschoeke SK, Oberholzer A, Moldawer LL. Interleukin-18: a novel prognostic cytokine in bacteria-induced sepsis. *Crit Care Med*. 2006; 34(4):1225–33. doi: [10.1097/01.CCM.0000208356.05575.16](https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000208356.05575.16) PMID: [16540967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16540967/).
29. Opal SM. Dual inhibition of interleukin-1beta and interleukin-18: a new treatment option for sepsis? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014; 189(3):242–4. doi: [10.1164/rccm.201312-2292ED](https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2292ED) PMID: [24484327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24484327/).
30. MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, McGuire VA, Noehren G, Kristariyanto Y, et al. PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J Immunol*. 2013; 190(2):565–77. doi: [10.4049/jimmunol.1202462](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202462) PMID: [23241891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23241891/); PubMed Central PMCID: [PMC3620524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3620524/).
31. Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(19):7820–5. doi: [10.1073/pnas.1218599110](https://doi.org/10.1073/pnas.1218599110) PMID: [23610393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23610393/); PubMed Central PMCID: [PMC3651434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3651434/).
32. Li Y, Zhang P, Wang C, Han C, Meng J, Liu X, et al. Immune responsive gene 1 (IRG1) promotes endotoxin tolerance by increasing A20 expression in macrophages through reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2013; 288(23):16225–34. doi: [10.1074/jbc.M113.454538](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.454538) PMID: [23609450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23609450/); PubMed Central PMCID: [PMC3675562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3675562/).
33. Rubinow KB, Wall VZ, Nelson J, Mar D, Bomsztyk K, Askari B, et al. Acyl-CoA synthetase 1 is induced by Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide and is required for phospholipid turnover in stimulated macrophages. *J Biol Chem*. 2013; 288(14):9957–70. doi: [10.1074/jbc.M113.458372](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.458372) PMID: [23426369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23426369/); PubMed Central PMCID: [PMC3617295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3617295/).

34. Snodgrass RG, Huang S, Choi IW, Rutledge JC, Hwang DH. Inflammasome-mediated secretion of IL-1beta in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *J Immunol.* 2013; 191(8):4337–47. doi: [10.4049/jimmunol.1300298](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300298) PMID: [24043885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24043885/); PubMed Central PMCID: [PMC3825708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3825708/).
35. Watkins PA. Very-long-chain acyl-CoA synthetases. *J Biol Chem.* 2008; 283(4):1773–7. doi: [10.1074/jbc.R700037200](https://doi.org/10.1074/jbc.R700037200) PMID: [18024425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18024425/).
36. Nagai M, Hirayama K, Ebihara I, Higuchi T, Imaizumi M, Maruyama H, et al. Serum TNF-related and weak inducer of apoptosis levels in septic shock patients. *Therapeutic apheresis and dialysis: official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy.* 2011; 15(4):342–8. doi: [10.1111/j.1744-9987.2011.00966.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-9987.2011.00966.x) PMID: [21884467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21884467/).