



Universidad de Navarra
Facultad de Ciencias

Diseño racional de péptidos derivados de la lactoferricina humana con actividad permeabilizante mejorada y capacidad de producir Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico (PAEP)

Memoria presentada por D./D^a Iosu Razquin Olazarán 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 autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, ... de de 2012

Dr. Guillermo Martínez de Tejada de Garaizábal

Servicio de Publicaciones de la Universidad de Navarra

ISBN 978-84-8081-298-6

A mi madre y a mi padre

A mis hermanas

A Alba

“A veces lo que es duro de padecer es dulce de recordar”

(Lucio Anneo Séneca)

El apartado de agradecimientos quizá es la sección más difícil de escribir por lo mucho que tienes para expresar a todas aquellas personas que han estado a tu lado alentando el espíritu de seguir luchando hasta el final. Por lo que:

Quisiera agradecer a todas las personas, que de una u otra manera han participado en la elaboración de este trabajo.

A la Universidad de Navarra por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo y tratarme siempre de la mejor manera posible. Agradecer, también, a la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra y al Gobierno de Navarra por las becas concedidas para la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Guillermo Martínez de Tejada, mi director de tesis, por permitirme formar parte de este departamento y suscitar el interés por el apasionante mundo de los péptidos catiónicos. Por todo lo que he aprendido y consejos transmitidos durante todos estos años.

Al Dr. Ignacio Moriyón, director del departamento, porque siempre ha sabido contagiarme su gran entusiasmo por la microbiología, así como infinitas sugerencias moleculares y enseñarme a caminar por el sendero correcto.

Al Dr. Díaz, el “jefe” del departamento, porque con él he aprendido las curiosidades de la brucelosis y aspectos de los cambios serológicos durante la infección. Por su preocupación y disposición.

Al resto de profesores del departamento. Al Dr. Carlos Gamazo por sus efectivos consejos de cultivos celulares e inmunología. Al Dr. López Goñi, por darme la oportunidad de iniciarme en la docencia práctica de los alumnos venideros. A la Dra. Maite Iriarte, por su preocupación, sugerencias e interés mostrado. A las Dras. Isabel García-Jalón, Anabel Vitas, y personal de Cifa, en especial a María Díez y Elena Ojer por mostrar siempre interés y enseñarme los trucos de la microbiología alimentaria. A la Dra. Begoña Alonso por las interminables horas de prácticas, por enseñarme que la perseverancia tiene sus frutos, por saber siempre elegir las palabras correctas para cada momento, por su inestimable preocupación, ánimos y cariño.

Al departamento de Microbiología de la CUN. Es de agradecer el enorme trabajo que realizan, pues en sus manos y sabiduría está la salud de cada persona. Al Dr. Manolo Rubio y el Dr. Del Pozo, Ana Ramos y todos los técnicos de laboratorio (en especial a Charo, Patricia

y Yasmina) por ayudarme en todas las cuestiones y enseñarme el funcionamiento del servicio. Al Dr. Leiva, actual director del servicio, por sus consejos antibióticos y técnicos, por sus buenas palabras y su preocupación mostrada. A las residentes (algunas ya no) Maru, Alejandra, Andreas y Ana por siempre tener palabras de ánimo y cariño hacia mí y querer que sea su pequeño R1. Gracias a Marisol por sus ánimos y consejos siempre agradecidos. Gracias en especial a Melania por su preocupación en todo momento, por alentarme en los malos momentos y tus notas de humor. Porque no hay nadie más que sepa de carbapenemasas y factores de riesgo. Por tu trabajo desinteresado y por 'dejarme prestado' todas aquellas cosas que te pedí. Porque 'Yes we can always'. Mil gracias por todo.

A Aitziber, por esos cafés y conversaciones, y los que quedan pendientes. Por todas las confianzas compartidas dentro y fuera del laboratorio. Gracias por escucharme en los buenos y malos momentos. Gracias de corazón, nos veremos.

A todos los participantes en publicaciones compartidas. El Dr. Klaus Brandenburg, Dr. Gutschmann, Ina y Lena. Por ayudarnos con los aspectos fisicoquímicos de los péptidos. Al Dr. Roman Jerala y el Dr. Bostjan Jjapelj, por ayudarnos a realizar optimizaciones de las secuencias y generar compuestos mejores. Al Dr. Oliver del Hospital Son Dureta por prestarnos las cepas mutantes de AmpC. A Maite, Ana y Maica del CEIT (San Sebastián) por darme la oportunidad y enseñarme a manejar el AFM, ese instrumento que parece imposible de utilizar y calibrar.

A los alumnos internos por mostrar una gran admiración por nuestro trabajo y estar siempre dispuestos a contagiarse del espíritu de la investigación.

A los cuidadores y trabajadores del animalario por cuidar tan bien los ratones de todos nuestros experimentos y por preocuparse siempre del estado de los animalitos.

A la Dra. Raquel Martínez y Eneko Larrañeta, del departamento de química, por facilitarme y enseñarme a utilizar el fluorímetro y HPLC. Por todas las sugerencias químicas y dudas que me habéis solucionado.

Al departamento de bioquímica, en especial a Teresa, Marina, Antonia y María por dejarme utilizar tantas veces el lector de Elisa y prestarme cosas que sólo en bioquímica tenéis, y sobre todo, por recibirme siempre con una sonrisa y muestras de cariño.

Al departamento de genética por enseñarme a utilizar el microscopio de fluorescencia y el programa de FISH. En especial a Miren y María por estar siempre dispuestas a hacer más fácil el día a día.

A nuestra querida secretaria y ‘mamá’ del departamento María Orbe. Por ayudarnos siempre con los vales de papel e informáticos. Por estar siempre dispuesta a ayudarnos en todo lo que se le ponga por delante.

A ti Rosario. Por ser la referencia de este departamento. Tu labor como profesional, y sobre todo como persona, es, quizás, una de las cosas más importantes de todas las tesis. Por la cantidad de litros de café que hemos perdido por el camino y por tu preocupación e interés profesional y personal. Muchas gracias.

A las ya Drs. David González, David García, Marcos, Raquel, Vicky, Cris, Ibai, Leyre, Yoli, Amaia y Susana.

A ti David González. Gracias por preocuparte siempre por mí, por estar siempre dispuesto a ayudar y contagiarme, en aquel primer día de prácticas, las ganas de dedicarme a la microbiología.

A ti David García. Por enseñarme todos los trucos del vino, por ayudarme a distinguir los buenos vinos de los malos. Por enseñarme el apasionante mundo de las levaduras y los caldos macerados.

A ti Marcos. Por tener siempre una solución para los problemas de laboratorio, por tus sugerencias y clases en la escalada deportiva y profesional. Mucha suerte.

A ti Raquel Conde. Por tu alegría, por tu afán de superación y perfeccionismo. Por tener siempre gestos de cariño para mí en los malos momentos y por saber transmitir las ganas de aprender y enseñar. Eres una gran persona. Milesker bihotzez.

A ti Vicky. Por tu alegría y risas malagueñas compartidas. Por ayudarme desde el primer día a integrarme en el laboratorio. Por enseñarme todos tus trucos pulsados. Por ser un gusto haberte conocido *quilla*.

A ti Cris. Por ser la alegría personificada. Por ayudar a mantener la armonía de toda la gente. Gracias por preocuparte siempre por mí y animarme en todos los aspectos.

Zuri Ibai. Zure jakintza guztia irakasteagatik. Momentu guztietan beharrezkoak diren ideiak, hitzak, aburuak eta sentimenduak aukeratu eta plazaratzeagatik. Nire bizitzagatik kezkatu eta edozein gauzatan laguntzeko prest egoteagatik. Bihotzez milesker.

A ti Leyre. Es un placer tenerte al lado. Derrochas alegría, buen humor y preocupación por los demás. Capaz de ayudar en todo momento a entender las cosas de otra manera. Quizás la música, es capaz de sacar de ti sentimientos que sólo de esta manera pueden salir. Gracias.

A ti Yoli. Es increíblemente fácil congeniar contigo. La ternura en persona. Eres comprensiva, cariñosa, dulce, capaz de sacar lo mejor de cada uno. Gracias por ser un apoyo en todo momento, por las mil confidencias y secretos compartidos. Eres siempre capaz de arrancar una sonrisa hasta en los momentos de dificultad.

A ti Amaia. He pasado unos meses a tu lado con la escritura y me has ayudado con todo. Gracias por hacerme llevar mejor esta difícil fase de la tesis, sin ti no hubiera sido lo mismo. Me has enseñado a ser constante y entender que aunque las cosas vayan mal y la vida te golpee, hay que seguir hacia delante. Gracias por preocuparte por mí en todo momento.

Y a ti Susana. Qué voy a decirte que no sepas. Profesionalmente, eres mi referencia, todo lo que sé te lo debo a ti. Tú me has enseñado las técnicas, protocolos y sumergirme en el apasionante mundo de las *Pseudomonas* y la actividad de los péptidos. Eres la jefa del ‘péptidos team’ y en gran parte el éxito de esta línea de investigación es gracias a ti. Personalmente, me has enseñado a no ser tan negativo, que las cosas hay que mirarlas de otra manera. Que no sirve de nada enfadarse con el mundo, que hay que mirar al frente sin miedo a equivocarse. Por las innumerables horas en el animalario y laboratorio. Muchas gracias de corazón.

A los que en breve o en un tiempo más lejano serán doctores. Ana, Juli, Pedro y Raquel.

A vosotras, Ana y Juli, las chicas del *western* “*Shigella y el cacahuete*”, siempre dando una nota de alegría en los malos ratos. Porque siempre contagiáis vuestro humor allá donde vais y gracias a eso mantenéis la buena armonía del departamento.

A ti Pedro. Siempre dispuesto a escuchar. Por mantener y guardar secretos y confidencias. Por los miles ratos compartidos y los que quedan por compartir. Es imposible no congeniar contigo, transmites humor, alegría, seguridad y tranquilidad. Gracias de corazón.

A ti Raquel. Dejo en ti un legado que seguro sabrás sacarle el mejor partido posible. Gracias por ayudarme en la fase final de mis experimentos y escritura, mostrando siempre interés y preocupación. Qué pena no haber podido estar unos cuantos años más contigo. Mucha suerte.

A las nuevas incorporaciones Estrella y Roberto. Mucho ánimo y suerte para vuestros respectivos proyectos. Gracias por el apoyo dedicado todos estos meses.

A los que estuvieron con nosotros. Olalla, gracias por el buen ambiente que generaste en el departamento. Por preocuparte por mi trabajo y por saber aportar la alegría necesaria. A María Pardo por el interés y apoyo mostrado durante los meses que estuviste con nosotros. A ti Lucía. Por esas semanas de risas y buenos ratos que hemos pasado juntos y por el apoyo mostrado en estas semanas. Un placer conocerte, de verdad. Te deseo lo mejor, nos veremos pronto.

A ti Alberto. Por tus ganas de vivir, tu afán de libertad y justicia. Por ser un referente de la superación. En el trabajo, un *crack*. Lo sabes hacer todo, y aun más importante, lo sabes enseñar. Ten el orgullo de ser una de las personas más importantes en esta familia, por la cantidad de cosas profesionales y personales que aportas a la gente, que sin duda, nos has hecho crecer como buenas personas. Como amigo, me has enseñado que no es mejor el que más rápido llega, sino el que sabe llegar, contemplando y disfrutando todos los momentos que te aporta la vida. Gracias por todo, por las aventuras montañosas, secretos y consejos, gracias por hacer de mí un amigo inseparable de fatigas.

A ti Naiara. Ejemplo de vitalidad. Como un marcador de peso molecular siempre estás cuando y como tienes que estar. Me conoces muy bien y me has aportado todo lo que uno puede pedir como compañero y amigo. Has sabido escucharme en los malos momentos, has sabido relajarme en los momentos de tensión y sobre todo has sabido comprenderme y darme la confianza necesaria durante todos estos años, que por suerte para mí, me llevo a una buenísima amiga.

A ti Javi. Compañero y amigo, buen amigo. En los buenos y malos momentos, siempre presente, dejando cualquier cosa por ayudarme, tranquilizarme y darme la pausa necesaria. Saber dar consejos es, dentro de tus numerosas virtudes, una más. Gracias por entenderme y ser el apoyo necesario durante todos estos años. Nos veremos.

A ti Estela. Compañera de trabajo en el departamento vecino y amiga fuera de él. Por apoyarme siempre y animarme a seguir adelante. Por recibirme siempre con cariño y preocupación.

A ti Izas. Por tus consejos y ayuda prestada en la microscopía de fluorescencia. Siempre dispuesta a perder unos minutos en dedicarme una sonrisa y preguntarme siempre ¿qué tal estás? Siempre preocupada por mi estado de ánimo, por mi pasado, por mi presente y mi futuro. Lagun ona zaitut, bihotzez eskertzen dizut nigatik egindako guztia. Egonen gara.

A ti Marina. Por los años compartidos en la carrera, durante la tesis y en especial este último año. Por lo buena persona que eres, por los millones de favores, y cantidad de cosas que tenemos en común. Gracias por abrirme las puertas de tu amistad. Te deseo lo mejor. Nos veremos.

A ti Edurne. Por las vivencias aquí y fuera del departamento. Por las millones de conversaciones y desahogos mutuos que hemos tenido, porque sabes escuchar, enseñar, preocuparte por los demás y aportar la tranquilidad y saber estar necesario en cada momento. Zureak izan dira niretzako hitzik politenak, ‘egun ona’ behintzat bada ere. Zuregandik mila gauza ikasi dut. Beti duzu niretzako zerbait, mahaiaren gainean notatxo bat, bixita azkar bat edota beharrezkoa den besarkada. Horregatik, hemendik kanpo ere ikusiko dugu elkar.

A mi cuadrilla de clase. Guti, Ainhoa, Palo, Güito, Mikel, Amaya, Miri, Gorka y Sergio. Por esas comidas semanales, donde el estrés no encuentra cabida, por hacerme reír y por preocuparos por mí siempre. Por vuestras muestras de cariño y sinceridad, porque somos inseparables. Gorka eta Sergio, bereziki, zuekin izan ditut elkarrizketarik sakonenak, momentu oso onak eta baita txarrak ere, baina beti elkarrekin. Bihotzez eskerrik asko. Zuri Laura, nitaz kezkatu eta behar izan dudana laguntza emateagatik.

A mi cuadrilla. David, Josu, Maite, Laura, Aitor y Edurne. Mil gracias por todo, siempre mostrando interés por mis ratoncitos y bacterias, por preocuparos por mi estado de ánimo y por ayudarme siempre a ser mejor persona. Por los miles de momentos compartidos. Gracias de corazón.

A Carlos y Bego. Gracias por escuchar mis “chapas” sobre bacterias o sobre los ‘pobres ratones, ¿qué les haces?’ Gracias chicos por hacer de mí una persona mejor, ayudarme siempre a afrontar los problemas de otra manera, a no ser tan negativo e intentar cambiar

dinámicas negativas de sensibilidad incontrolada. Siempre dispuestos a todo, ofreciéndome vuestra ayuda siempre y haciéndome partícipe de vuestra vida en todo momento. Gracias de corazón.

A mis padres y mis hermanicas. Siempre atentos y preocupados, animándome siempre con la tesis e intentando entender los entresijos de la micro, aunque, muchas veces no lleguéis a comprender la mayoría de las cosas, ponéis vuestro interés en hacerlo. Dulce hogar después de interminables horas trabajando ayudan a sobrellevar mejor el ajetreo diario. Gracias.

A ti Alba. Gracias por todo. Gracias por hacer estos 4 años más fáciles y felices. Gracias por entender y sobrellevar mis chapas infecciosas, por aconsejarme siempre pensando en lo mejor para mí, tanto en el trabajo, como sobre todo fuera de él. Gracias por ser la primera en ayudarme, en dejar todo para correr a echarme una mano siempre que lo necesito. Gracias por aguantar mis nervios y mis momentos *Fernando* que tanto te gustan, por aguantar mis agonías y malos ratos y obligarme a desconectar. Has sabido inculcarme la tranquilidad y el sosiego, la esperanza y la constancia, el esfuerzo y la alegría, la templanza y serenidad. Por todo esto y más. Gracias.

ABREVIATURAS

ACP: Análisis de componentes principales

AFM: *Atomic force microscopy*

ANEPID: *Antimicrobial endotoxin Neutralizing Peptides to combat Infectious Diseases*

ATCC: *American Type Culture Collection*

BC: *Bodipy TR Cadaverine*

CCMI: Cociente de CMI

CIF: Índice de concentración mínima fraccionada

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMB: Concentración mínima bactericida

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMNh: Células mononucleares humanas

CUN: Clínica Universidad de Navarra

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CEIT: Centro de Estudios e Investigaciones Técnicas

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*

DMF: *Dimethylformamide*

DPBS: *Dulbecco's phosphate buffered saline*

DPX: *Dibutyl phtalate xylene*

DO: Densidad óptica

EDTA: *Ethyldiamine tetraacetic*

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

FQ: Fibrosis quística

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GRAVY: *Grand average of hydropathy*

HEPES: *2-[4(2-hydroxyethyl)-1-piperaciny]ethanosulfonic acid*

HR-HPLC: *High Resolution High Performance Liquid Chromatography*

IP: Ioduro de propidio

ITU: Infección del tracto urinario

KDO: *3-keto-2-deoxi-D-manno-octonic acid*

LPS: Lipopolisacárido

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standard*

MH: Müller-Hinton

MHA: Müller-Hinton con cationes ajustados

MHNA: Müller-Hinton con cationes no ajustados

MTT: *3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium*

PAE: Efecto Postantibiótico

PAEP: Permeabilidad asociada al efecto postantibiótico

PAMP: *Pathogen associated molecular pattern*

PEDES: *Peptide descriptors for sequence*

PFA: *Paraformaldehyde*

PMB: Polimixina B

PMBN: Nonapéptido de Polimixina B

PLS: *Partial least square*

PRR: *Pattern recognition receptor*

QSAR: *Quantitative Structure-Activity Relationship*

RLM: Regresión lineal múltiple

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

S-PAEP: Sensibilización al antibiótico en el periodo PAEP

TEMED: *N,N,N',N'-tetramethylethyl diamine*

TLR: *Toll-Like Receptor*

TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*

TSA: Agar triptona soja (*Tryptic Soy Agar*)

TSB: Caldo triptona soja (*Tryptic Soy Broth*)

TRITC: *Tetramethylrhodamine isothiocyanate*

UCI: Unidad de cuidados intensivos

UFC: Unidades formadoras de colonias

ÍNDICE GENERAL	i
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1. Características generales.....	1
1.2. Epidemiología y patogenicidad	1
1.3. Factores de virulencia	4
1.4. El lipopolisacárido (LPS o endotoxina).....	5
1.5. Interacción del LPS con el sistema inmunológico y choque séptico.....	6
1.6. Resistencia antibiótica	12
1.6.1. Relevancia clínica.....	12
1.6.2. Mecanismos de resistencia antibiótica de <i>P. aeruginosa</i>	14
A. Baja permeabilidad	14
B. Bombas de expulsión activa (<i>efflux pumps</i>)	15
C. Enzimas modificantes	17
D. Modificación de la diana antibiótica.....	18
2. Efecto postantibiótico.....	19
2.1. Relevancia clínica del PAE	20
2.2. Mecanismo del PAE	21
2.2.1. Persistencia limitada del agente en el sitio de acción.....	21
2.2.2. Reparación del daño producido en las estructuras celulares	22
2.2.3. Regeneración de macromoléculas esenciales	22
2.3. Efecto subinhibitorio postantibiótico (PA SME) y combinaciones antibióticas	23
3. Péptidos antimicrobianos	24
3.1. Distribución y funciones de los péptidos antimicrobianos	25
3.2. Mecanismo de acción	28

3.3. Efecto postantibiótico de péptidos antimicrobianos	32
3.4. Mecanismos de resistencia a los péptidos antimicrobianos.....	33
3.5. Polimixinas	36
3.6. Péptidos antimicrobianos y aplicaciones en estudio.....	37
4. Lactoferrina	38
4.1. Actividades antimicrobianas.....	39
4.2. Actividades no antimicrobianas.....	40
4.3. Estructura y mecanismo de acción de la lactoferrina y péptidos derivados	41
5. Análisis cuantitativo de relaciones estructura actividad (QSAR)	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento	53
2. Péptidos	53
3. Antibióticos	54
4. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana	54
5. Estudios de sinergia.....	56
6. Modelo murino de sepsis.....	58
7. Efecto postantibiótico (<i>Post-antibiotic Effect</i>) (PAE).....	59
8. Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico (Post Antibiotic Effect Associated Permeabilization; PAEP) y Sensibilización en el periodo PAEP (Sensitization during Post Antibiotic Effect Associated Permeabilization (S-PAEP))..	61
9. Detección fenotípica de β -lactamasa AmpC desreprimida en <i>P. aeruginosa</i> 4158 Ps4	63
10. Visualización del efecto permeabilizante producido por P4-9 en la cepa salvaje PAO1-gfp mediante microscopía de fluorescencia	64
11. Visualización de alteraciones en superficie producido por P4-9 en la cepa clínica <i>P. aeruginosa</i> 4158 Ps4 mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)	65

12. Obtención del LPS de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 mediante el método de extracción fenol-agua	66
13. Purificación del LPS de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	66
14. Determinación del ácido 2-ceto-3-deoxioctónico (KDO)	67
15. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	68
16. Tinción y visualización del LPS de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	68
17. Afinidad de los péptidos por el LPS <i>in vitro</i>	69
18. Toxicidad celular y capacidad hemolítica de los péptidos	71
19. Diseño, predicción y análisis de estructura actividad de nuevas secuencias de péptidos optimizados	72
RESULTADOS	75
CAPÍTULO 1: Optimización de la capacidad permeabilizante y antiendotóxica de los péptidos P4 frente a <i>P. aeruginosa in vitro</i>	79
Desarrollo de un modelo cuantitativo de relación estructura química-actividad (QSAR) para el diseño de péptidos con actividad potenciadora de antibióticos	79
Correlación entre valores de actividad permeabilizante calculada y experimental de los péptidos P4	82
Evaluación de la actividad sinérgica de los péptidos P4 y la novobiocina frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ps4 mediante ensayo <i>checkerboard</i>	85
Evaluación de la actividad sinérgica y bactericida de los péptidos P4 y la novobiocina frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158 Ps4 mediante curvas de letalidad	88
Análisis complementarios y estudios de correlación de parámetros con interés en terapia antimicrobiana y antiendotóxica.....	90
Actividad antimicrobiana	91
Afinidad de los péptidos por el LPS <i>in vitro</i>	92
Toxicidad celular y actividad hemolítica de los péptidos	95
Estudios de correlación de parámetros con interés en terapia antimicrobiana y antiendotóxica y análisis de relación estructura- actividad de los péptidos P4.....	98

CAPÍTULO 2: Caracterización de la actividad potenciadora de antibióticos de los péptidos P5 frente a <i>P. aeruginosa</i> in vitro e in vivo	103
Desarrollo de un modelo cuantitativo de relación estructura química-actividad (QSAR) para el diseño de péptidos con actividad potenciadora de antibióticos	103
Correlación entre valores de actividad permeabilizante calculada y experimental de los péptidos P5	107
Evaluación de la actividad sinérgica de los péptidos P5 y la novobiocina frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ps4 mediante ensayo <i>checkerboard</i>	109
Evaluación de la actividad sinérgica de los mejores péptidos P5 y antibióticos diferentes a novobiocina frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158-02 Ps4	112
Estudio de correlación de parámetros con interés en terapia antimicrobiana y análisis de relación estructura- actividad de los péptidos de la quinta generación	115
Capacidad de los péptidos para potenciar la actividad antibiótica <i>in vivo</i>	117
CAPÍTULO 3: Efecto postantibiótico de péptidos sobre <i>P. aeruginosa</i> e identificación de la Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico	125
Cuantificación del Efecto Postantibiótico (PAE) producido por el péptido P4-9 frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158 Ps4	125
Identificación de la Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico (PAEP).....	126
Aprovechamiento de la PAEP por antibióticos distintos a la novobiocina	129
Caracterización fenotípica de la producción de β -lactamasa AmpC en la cepa clínica <i>P. aeruginosa</i> 4158 Ps4	132
Determinación de la PAEP en un mutante de <i>P. aeruginosa</i> que sobreexpresa cefalosporinasa AmpC y su sensibilización a la ceftazidima.....	135
Susceptibilidad de mecanismos de resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> distintos de AmpC a la PAEP provocada por P4-9	136
Evaluación del efecto permeabilizante producido por P4-9 sobre la envoltura de <i>P. aeruginosa</i> mediante microscopía de fluorescencia.....	138
Visualización de posibles alteraciones producidas por P4-9 sobre la envoltura de <i>P. aeruginosa</i> mediante microscopía de fuerza atómica (<i>atomic force microscopy, AFM</i>) ...	140

Capacidad de agentes antimicrobianos distintos a P4-9 para provocar PAEP en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ps4	145
DISCUSIÓN	149
Péptidos derivados de la lactoferricina humana con actividad permeabilizante mejorada	149
Optimización de la actividad permeabilizante de los péptidos mediante análisis QSAR ..	159
Características fisicoquímicas que gobiernan la actividad de los péptidos P4 y P5.....	160
Mecanismo de acción de los péptidos P4 y P5	167
Consideraciones metodológicas de los ensayos <i>in vitro</i>	169
Efecto postantibiótico	174
Permeabilidad asociada al efecto postantibiótico (PAEP)	177
Consideraciones metodológicas sobre PAEP	187
Conclusión y perspectivas futuras	188
CONCLUSIONES.....	193
BIBLIOGRAFÍA	199
ANEXOS	223
Anexo 1	223
Anexo 2	231
Anexo 3	235
Anexo 4	239
APÉNDICE I.....	243
Índice de Tablas	
Tabla 1: Principales patologías asociadas a <i>P. aeruginosa</i> y su lugar de infección.....	3
Tabla 2: Patógenos principales causantes del choque séptico	10
Tabla 3: Fenotipos de resistencia a los β -lactámicos en <i>P. aeruginosa</i>	16
Tabla 4: Funciones inmunomoduladoras de algunos péptidos antimicrobianos (AMP) humanos.....	26
Tabla 5: Cepas utilizadas.....	53

Tabla 1.1: Actividad potenciadora de novobiocina de los péptidos de la cuarta generación frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158 Ps4	84
Tabla 1.2: Actividad antimicrobiana y potenciadora de la acción de la novobiocina de los mejores péptidos de la generación P2 y P4 frente a <i>P. aeruginosa</i> 4158 Ps4	87
Tabla 1.3: Actividad antimicrobiana de los péptidos P4 frente a varias cepas bacterianas	92
Tabla 1.4: Cuantificación de la afinidad de los péptidos por el LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	95
Tabla 1.5: Actividad hemolítica y citotoxicidad de los péptidos P4	97
Tabla 1.6: Valores de correlación Rho de Spearman entre varias propiedades de los péptidos P4	100
Tabla 1.7: Valores de correlación Rho de Spearman de análisis de estructura-actividad de los péptidos P4.....	100
Tabla 2.1: Actividad permeabilizante de los péptidos de la 5ª generación en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158 Ps4	108
Tabla 2.2: Actividad potenciadora de la novobiocina de los mejores péptidos de la 4ª y 5ª generación frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158 Ps4	111
Tabla 2.3: Capacidad de los mejores permeabilizantes para potenciar la actividad de la doxiciclina, cefotaxima y azitromicina frente a la cepa clínica <i>P. aeruginosa</i> 4158 Ps4	113
Tabla 2.4: Valores de correlación de Rho de Spearman de la actividad biológica de los péptidos P5 y los descriptores constitucionales pertenecientes a los análisis QSAR ..	116
Tabla 2.5: Valores de correlación de Rho de Spearman de la actividad biológica de P4 y P5 y los descriptores constitucionales pertenecientes a los análisis QSAR	116
Tabla 3.1- Valores de Efecto Post Antibiótico (PAE) y Sensibilización en el periodo de Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico (S-PAEP) en varias cepas de <i>P. aeruginosa</i> determinados mediante la técnica automatizada Bioscreen C	132
Tabla 3.2- Valores de Efecto Post Antibiótico (PAE), Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico (PAEP) de antibióticos y Sensibilidad a la novobiocina durante el periodo PAEP en la cepa clínica <i>P. aeruginosa</i> Ps4 determinados mediante la técnica automatizada Bioscreen C	146

Índice de Figuras

Figura 1: Funciones biológicas de los péptidos antimicrobianos.....	27
Figura 2: Modelos de poros formados por los péptidos catiónicos en la envoltura bacteriana.....	31
Figura 3: Mecanismos involucrados en la resistencia adaptativa a los compuestos catiónicos en <i>P. aeruginosa</i>	36
Figura 4: Estructura de la lactoferrina y su derivado lactoferricina.....	39

Figura 5: Conformación y representación esquemática de la orientación e inserción en la membrana del péptido P2-33	43
Figura 6: Cálculo del PAE mediante las dos metodologías empleadas	61
Figura 7: Cálculo del S-PAEP mediante las dos metodologías empleadas.....	63
Figura 1.1: Análisis PLS-RLM de los valores CIF mínima de los péptidos P1 y P2 calculada y experimental	81
Figura 1.2: Esquema del proceso de análisis estructura-actividad (QSAR) realizado en el proyecto ANEPID.....	82
Figura 1.3: Curvas de letalidad. Determinación de la cinética de potenciación de la novobiocina en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158 Ps4 por parte de péptidos de la 4ª generación.....	90
Figura 2.1: Análisis de componentes principales y regresión lineal múltiple basado en los valores de CMI de las generaciones P1, P2 y P4 frente a la cepa de <i>P aeruginosa</i> 4158 Ps4	105
Figura 2.2: Análisis de componentes principales y regresión lineal múltiple basado en los valores de índice de CIF mínima de las generaciones P1, P2 y P4 frente a la cepa de <i>P aeruginosa</i> 4158 Ps4.....	106
Figura 2.3: Curvas de letalidad. Determinación de la cinética de potenciación de la azitromicina en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158 Ps4 por el péptido P5-12.....	114
Figura 2.4: Cinética de supervivencia de ratones neutropénicos infectados con <i>P. aeruginosa</i> 4158 Ps4 y tratados con los péptidos P2-15 y P5-12.....	118
Figura 2.5: Cinética de supervivencia de ratones neutropénicos infectados con <i>P. aeruginosa</i> 4158 Ps4 y tratados con los péptidos P2-15 y P4-1 en combinación con azitromicina	119
Figura 2.6: Cuantificación de la concentración de bacterias en sangre y niveles de TNF α en suero tras la inoculación de <i>P. aeruginosa</i> 4158 Ps4 en ratones neutropénicos	121
Figura 3.1: Efecto postantibiótico de P4-9 frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158 Ps4	126
Figura 3.2: Permeabilidad asociada al efecto postantibiótico de P4-9 frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158 Ps4 mediante el uso de novobiocina	129
Figura 3.3: Permeabilidad asociada al efecto postantibiótico de P4-9 frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4158 Ps4 mediante el uso de antibióticos diferentes a novobiocina	131
Figura 3.4: Prueba fenotípica de la inhibición de AmpC desreprimida.....	134
Figura 3.5: Permeabilidad asociada al efecto postantibiótico de P4-9 frente a cepas mutantes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con mecanismos de resistencia conocidos	136

Figura 3.6: Permeabilidad asociada al efecto postantibiótico de P4-9 frente a cepas mutantes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 que sobreexpresan AmpC	137
Figura 3.7- Observación al microscopio de fluorescencia de las células de <i>P. aeruginosa</i> PAO1-gfp tras el pre-tratamiento con P4-9.....	139
Figura 3.8- Imágenes obtenidas mediante AFM de la cepa clínica <i>P. aeruginosa</i> 4158Ps4 tras el tratamiento con P4-9	142
Figura 3.9- Imágenes y perfiles topográficos obtenidos mediante AFM de la cepa clínica <i>P. aeruginosa</i> 4158 Ps4 tras el tratamiento con P4-9	144

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1. Características generales

La familia *Pseudomonaceae* reúne bacterias gramnegativas con morfología bacilar, aerobias, móviles y dotadas de uno o varios flagelos polares. Su tamaño es de 1,5-5 μm de largo y 0,5-1 μm de ancho. Las bacterias pertenecientes a la especie *Pseudomonas aeruginosa* son generalmente mesófilas, producen catalasa y contienen citocromo c oxidasa en su cadena transportadora de electrones. Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, aunque tienen preferencia por ambientes húmedos, por lo que con frecuencia aparecen en el agua, suelos, superficie de materia orgánica y asociadas a las plantas. Debido a su ubicuidad, facilidad para crecer y habilidad para colonizar espacios acuáticos, este microorganismo supone un grave problema en el ámbito hospitalario, ya que puede proliferar en desinfectantes, sistemas de refrigeración, bañeras, duchas (Feazel et al., 2009), fluidos de diálisis, equipos médicos e instrumentos quirúrgicos (Kiska and Gilligan, 1999).

1.2. Epidemiología y patogenicidad

P. aeruginosa es un importante patógeno oportunista, y aunque rara vez produce infecciones en personas sanas (Cheong et al., 2008; Hatchette et al., 2000), puede afectar gravemente a personas inmunodeprimidas, como los pacientes con quemaduras severas, cáncer, SIDA o sometidos a quimioterapia. Por ello, *P. aeruginosa* es uno de los patógenos más frecuentemente aislados en infecciones nosocomiales. Se calcula que en Estados Unidos, *P. aeruginosa* produce cada año 2 millones de infecciones nosocomiales (Klevens et al., 2007), con una mortalidad del 1%, mientras que en la Unión Europea (European Centre for Disease Prevention and Control (2007)), las estimaciones equivalentes son de más de 3 millones y 1,6 %.

P. aeruginosa ocupa el segundo lugar como agente causal de infecciones nosocomiales de piel y tejidos blandos por detrás de *S. aureus* y por delante de *E. coli* (Fluit et al., 2001; Fung et al., 2003), aunque esto varía dependiendo de los países en los que se ha llevado a cabo el estudio (Moet et al., 2007). En España, según el informe de EPINE 2010 (Sociedad Española de Medicina Preventiva, 2010), *P. aeruginosa* fue el

segundo agente causal de infecciones, tanto en el ámbito nosocomial (10,9 %), como en el comunitario (6,3 %). Este patógeno ocupa el cuarto lugar entre los gramnegativos en frecuencia de aislamiento en hemocultivos en Estados Unidos (Wisplinghoff et al., 2004) y es el cuarto patógeno más frecuentemente aislado en bacteriemias asociadas a unidades de cuidados intensivos (UCI-s) en Europa con una prevalencia en torno al 8 %. La frecuencia de aislamientos en muestras de sangre depende del tejido en el que se produce la infección. Por ejemplo, en bacteriemias producidas por quemaduras severas, *P. aeruginosa* es el patógeno aislado con más frecuencia de entre los componentes de la microbiota endógena, o proveniente de fuentes ambientales (Altöparlak et al., 2004; Church et al., 2006). En España, en el año 2010, *P. aeruginosa* fue el séptimo patógeno (4,4 %) más frecuentemente aislado de bacteriemias nosocomiales (Sociedad Española de Medicina Preventiva, 2010) y es uno de los causantes más habituales de bacteriemias asociadas a catéter.

Además de estos procesos infecciosos, *P. aeruginosa* puede causar infecciones gastrointestinales, óseas, infecciones de ojos y oídos, infecciones de heridas quirúrgicas, y más raramente puede producir abscesos cerebrales, endocarditis y meningitis (Kiska and Gilligan, 1999) (Tabla 1). Por otra parte, *P. aeruginosa* se encuentra entre las cinco especies bacterianas más frecuentemente aisladas en infecciones del tracto urinario (UTI) (Mathai et al., 2001). En España, en el año 2010, esta bacteria fue el segundo patógeno (9,8 %) más frecuentemente aislado, por detrás de *E. coli* (34,3 %), en las infecciones del tracto urinario (UTI) adquiridas en el ámbito hospitalario (Sociedad Española de Medicina Preventiva, 2010).

P. aeruginosa tiene especial relevancia etiológica en la neumonía nosocomial, es decir, aquella que se presenta a partir de las 48 h del ingreso hospitalario y previa exclusión de que la infección no estuviera presente o en período de incubación en el momento del ingreso. De hecho, en España en el año 2010, *P. aeruginosa* fue el patógeno más frecuentemente aislado en infecciones respiratorias nosocomiales (18,6 %) (Sociedad Española de Medicina Preventiva, 2010). Si bien no es la infección nosocomial más frecuente, lugar que ocupa la infección urinaria, la neumonía representa la segunda causa de infección adquirida en el hospital y la más frecuente en las UCIs de adultos. Esta enfermedad es la que comporta mayor morbi-mortalidad, y provoca frecuentemente que los pacientes que la presentan vean prolongada su estancia

hospitalaria (Craig and Connelly, 1984; Dixon, 1978; Graybill et al., 1973). *P. aeruginosa* es la bacteria gramnegativa más comúnmente aislada (18,1 %) en pacientes con neumonía en Estados Unidos (Gaynes and Edwards, 2005; Tam et al., 2007) y su aislamiento se asocia con altas tasas de fracasos del tratamiento, recurrencias y aparición de resistencias en el transcurso del mismo.

Tabla 1.- Principales patologías asociadas a *P. aeruginosa* y su lugar de infección (adaptado de la Guía de Terapéutica Antimicrobiana (Mensa et al., 2011) y Microbiología médica (Murray, 2006)).

Lugar de infección	Patología asociada
Tracto respiratorio	Neumonía aguda Traqueobronquitis Bronconeumonía difusa Bronconeumonía necrosante
Tracto urinario	Infecciones agudas y crónicas Infecciones asociadas a cateterización permanente
Piel y tejidos blandos	Dermatitis Infección de heridas y quemaduras Foliculitis Ectima gangrenoso
Ojo	Conjuntivitis Endoftalmitis Úlceras corneales Queratitis
Oído	Otitis externa (oído de nadador) Otitis externa maligna Otitis media crónica
Hueso y articulaciones	Osteítis del pie Pioartritis estenoarticular Osteomielitis vertebral Osteomielitis crónica
Corazón	Endocarditis
Tracto gastrointestinal	Enterocolitis necrosante
Sistema nervioso central	Meningitis Abscesos cerebrales

Por otro lado, la infección por *P. aeruginosa* supone una grave y frecuente complicación de la fibrosis quística (FQ). Inicialmente, esta enfermedad congénita ocasionaba una alta mortalidad infantil, ya que los niños afectados apenas superaban el

primer año de vida y morían a causa de trastornos gastrointestinales (Lewis, 1996; Quinton, 2007). En la actualidad, la esperanza de vida de los pacientes de FQ supera con frecuencia los 30 años y las complicaciones más importantes se relacionan con la infección bacteriana crónica broncopulmonar y la inflamación concomitante. En este tipo de cuadros clínicos, *P. aeruginosa* se aísla en el 50 % de los pacientes menores de 18 años y en más del 80 % de los de mayor edad. La colonización-infección por *P. aeruginosa* se relaciona claramente con una mayor morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ y se asocia a un progresivo deterioro de la función pulmonar y a una disminución de la supervivencia. Además, se ha comprobado que la adquisición de este patógeno en edades tempranas influye negativamente en el pronóstico de la enfermedad (De Gracia et al., 2002; Emerson et al., 2002; Ernst et al., 2007).

1.3. Factores de virulencia

P. aeruginosa posee numerosos factores de virulencia, entre los que se encuentran componentes estructurales, toxinas y enzimas. No obstante, es difícil definir el papel que juega cada uno de ellos en su patogenia, y la mayoría de los estudios realizados sugieren que la virulencia de este microorganismo es multifactorial. Así, *P. aeruginosa* posee factores de virulencia vinculados a la propia célula, como los *pili* y otras adhesinas que desempeñan un papel importante en la primera fase de unión a las células epiteliales. Además, *P. aeruginosa* sintetiza una cápsula polisacárida compuesta de alginato, que parece estar implicada, no sólo en la unión de la bacteria a las células epiteliales y a la mucina traqueobronquial, sino también en la protección frente a la fagocitosis y los antibióticos (Leid et al., 2005; Pier et al., 2001; Slack and Nichols, 1981). La producción de este polisacárido está sometida a una compleja regulación y los genes que la controlan pueden activarse en cepas que infectan pacientes con fibrosis quística o enfermedades respiratorias crónicas. Uno de los factores más importantes en la virulencia de *P. aeruginosa* es el lipopolisacárido (LPS o endotoxina), un constituyente estructural de la membrana externa (apartado siguiente).

Por otro lado, *P. aeruginosa* secreta numerosos factores extracelulares que incluyen: i) pigmentos fluorescentes como pioverdina y piocinanina, ésta última con capacidad quimiotáctica sobre neutrófilos, en los que induce la producción de radicales tóxicos del oxígeno que ocasionan daños tisulares; ii) exotoxina A, producida por cepas

patógenas y capaz de alterar la síntesis de proteínas por inhibición de la elongación de la cadena peptídica (Morlon-Guyot et al., 2009), probablemente esta toxina esté involucrada en la dermatonecrosis asociada a quemaduras, así como en el daño corneal de las infecciones oculares y el daño tisular en las infecciones pulmonares crónicas; iii) exoenzimas S y T, dos moléculas efectoras que la bacteria inyecta en las células del huésped mediante su sistema de secreción de tipo III; estas enzimas producen un daño en las células epiteliales que facilita la diseminación bacteriana, la invasión celular y la necrosis (Veesenmeyer et al., 2009). Además, *P. aeruginosa* secreta otros componentes como elastasas, proteasa alcalina, fosfolipasa C y ramnolípido que participan en la destrucción celular y tisular del huésped (Ben Haj et al., 2011; Murray, 2006).

1.4. El lipopolisacárido (LPS o endotoxina)

El LPS, un complejo glicolípido exclusivo de gramnegativos, se localiza en la monocapa más superficial de la membrana externa bacteriana, donde ocupa el 75 % de su superficie (Vaara, 1999). Esta molécula juega un papel esencial en el mantenimiento de la estructura y estabilidad de la membrana externa, así como en la función de barrera de permeabilidad de esta membrana, debido al carácter simultáneamente anfipático y aniónico que el LPS posee (Nikaido, 2003; Vaara, 1999). La estructura y composición del LPS, así como su localización en la parte más externa de la bacteria, le permiten contribuir en la primera fase de la patogenicidad de *P. aeruginosa*: la adhesión. Además, la liberación de LPS durante una infección puede producir, indirectamente, graves patologías como la sepsis y el choque endotóxico, que son consecuencia de una sobreestimulación del sistema inmunológico en respuesta a la presencia de LPS, entre otros componentes microbianos.

El LPS de *P. aeruginosa*, como el de las enterobacterias, está estructurado en tres porciones bien diferenciadas: la cadena O (o antígeno O), el núcleo y el lípido A, que es la parte responsable de la endotoxicidad (Rosenfeld and Shai, 1999);(Galanos et al., 1985). La cadena O está constituida por un número variable de unidades repetidas de monosacáridos. Es una región que presenta gran variabilidad, y que al ser inmunogénica, permite la clasificación en serogrupos dentro de la especie. El núcleo del LPS suele ser de longitud muy inferior a la cadena O y está compuesto por hasta 15 unidades de monosacáridos, incluyendo compuestos exclusivos de procariotas. Esta

estructura, que suele estar ramificada, une la cadena O con el lípido A. El núcleo se subdivide en dos porciones, la interna está constituida por L-glicero-D-manano heptosa y ácido 3-deoxy-D-mano-octulosónico (KDO), y la parte externa contiene varias hexosas y presenta mayor grado de variabilidad (Holst, 1999). La presencia de varios grupos fosfato y de otros compuestos cargados negativamente, como el KDO, confiere al núcleo interno un marcado carácter aniónico.

El lípido A de *P. aeruginosa* presenta la estructura típica del lípido A de muchas bacterias gramnegativas, y en particular el de las enterobacterias, es decir, un esqueleto de 2-desoxi-D-glucosa-2-amina (GlcN) fosforiladas en posiciones C4' y C1 y unidas mediante enlace β -(1'→6). Varios de los carbonos del esqueleto de diglucosamina están unidos por enlace amida o éster a 5 o 6 cadenas de ácidos grasos dispuestas paralelamente unas a otras. La mayoría de los lípidos A sintetizados por *P. aeruginosa* (75 %) se encuentran acilados en 5 posiciones diferentes (pentaacilados), mientras que el resto se encuentran hexaacilados, o excepcionalmente heptaacilados (Ernst et al., 2003).

Según algunos autores, el grado de acilación depende de las condiciones de crecimiento de *P. aeruginosa*. La heterogeneidad del lípido A se debe tanto a su grado de acilación, como al tipo de enlace entre los ácidos grasos y la diglucosamina (éster o amida) (Bhat et al., 1990; Holst et al., 1993). Así, el LPS de *E. coli*, otro patógeno gramnegativo de gran relevancia clínica, es hexaacilado (Holst et al., 1993) y se ha descrito que este LPS es más endotóxico que el LPS de *P. aeruginosa* (Pier et al., 1981). Por otra parte, los LPS hexaacilados de *P. aeruginosa* provocan en el huésped una respuesta inflamatoria mayor que los LPS pentaacilados y un aumento de la liberación de citoquinas proinflamatorias (Ernst et al., 2003). Además, se conoce que las cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística o cultivadas en medios con bajas concentraciones de Mg^{2+} presentan, predominantemente, un LPS hexaacilado, lo que podría explicar, al menos en parte, la gravedad de las infecciones por *P. aeruginosa* en estos pacientes (Ernst et al., 2003; Ernst et al., 2007).

1.5. Interacción del LPS con el sistema inmunológico y choque séptico

El sistema inmunológico reacciona frente a las infecciones desencadenando una respuesta inflamatoria que implica a muchos mediadores celulares y plasmáticos. La

primera etapa de esta reacción se inicia con la activación local de los efectores del sistema inmunitario innato, y prosigue con una respuesta a nivel sistémico, que puede provocar la aparición de respuestas agudas. Aunque las respuestas inflamatorias son habitualmente beneficiosas, también pueden ocasionar daños en los tejidos y, por tanto, contribuir a empeorar los síntomas de la enfermedad. Entre los procesos de la inflamación aguda destacan: i) la expansión de los capilares para aumentar el flujo sanguíneo, lo que causa enrojecimiento o exantema localizado; ii) el aumento de la permeabilidad de los capilares sanguíneos con la consiguiente acumulación de líquido en los tejidos (edema) y iii) la diapédesis o salida de los leucocitos desde los capilares y posterior migración hacia el foco de la lesión.

Además, la respuesta inflamatoria incluye síntomas sistémicos como fiebre, taquicardia, taquipnea (aumento de la frecuencia respiratoria), fatiga, malestar general, mialgias, escalofríos y sudoración. Los receptores del sistema inmunológico innato están especializados en reconocer estructuras microbianas ajenas al huésped, incluyendo no sólo moléculas asociadas a la envoltura bacteriana tales como la endotoxina (LPS), lipoproteínas, proteínas de membrana externa, flagelina, fimbrias, peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos, sino también componentes intracelulares como el ADN procariótico. Para ello, estos receptores poseen dominios moleculares denominados PRRs (*pattern recognition receptor*) que reconocen porciones (“patrones”) -a menudo conservadas dentro de un mismo grupo microbiano-, característicos de los patógenos y conocidos como PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*). Los receptores implicados en este reconocimiento se integran dentro de la familia TLRs (*toll-like receptor*).

La excesiva respuesta inflamatoria frente a los PAMPs (y en particular frente al LPS en el caso de las bacterias gramnegativas), puede dar lugar a una grave patología denominada sepsis, cuya complicación más grave es el choque séptico (o endotóxico). En la literatura médica, la sepsis se equipara al denominado “síndrome de respuesta inflamatoria sistémica” (SRIS) asociado a una infección. Para que se diagnostique a un paciente SRIS deben concurrir dos o más de los siguientes síntomas: temperatura corporal de 38 °C o menor de 36 °C, taquicardia, taquipnea y recuentos leucocitarios anormales. Se define choque séptico como la sepsis con hipotensión que persiste después de la reposición adecuada de líquidos. En esta patología, caracterizada por un

fallo multiorgánico, participan las células endoteliales, neutrófilos, monocitos, macrófagos y el complemento sanguíneo. El fallo multiorgánico generalizado está provocado por mecanismos específicos y distintos en cada uno de los órganos, pero en todos los casos la activación de la respuesta inflamatoria y de los sistemas neuroendocrinos juegan un papel esencial. Los órganos o sistemas más afectados en el choque séptico son el sistema termorregulador (lo que causa hipertermia o fiebre), la función respiratoria (taquipnea e hiperventilación), el sistema cardiovascular (hiperdinamia y taquicardia), la función metabólica (perfusión de oxígeno disminuida y aporte nutricional alterado), el sistema renal (fracaso renal), la función hepática, hematológica (coagulación intravascular diseminada (CID) y neuromuscular (debilidad neuromuscular prolongada y alteraciones en el sistema nervioso central como letargia, obnubilación o coma).

La estimulación dependiente de LPS ocurre a través de varias interacciones de esta molécula con proteínas del huésped, como la *LPS-binding protein* (LBP), que tiene una gran afinidad por la región más conservada del LPS, el lípido A. A continuación, la LBP transfiere el LPS a la molécula CD14, una proteína glicosilfosfatidilinositol, que se encuentra bien en forma soluble o bien anclada a la membrana de las células mieloides. El CD14 facilita la transferencia del LPS a TLR-4/MD-2, un complejo receptor que modula la cascada de reconocimiento de LPS (Wright et al., 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 (Gioannini et al., 2004; Nagai et al., 2002; Shimazu et al., 1999). Aunque no existe ninguna evidencia de que el LPS pueda unirse directamente a TLR-4, se sabe que éste puede potenciar la unión entre MD-2 y LPS (Mitsuzawa et al., 2006).

Tras el reconocimiento del LPS, TLR-4 es capaz de oligomerizarse, y a través de sus dominios TIR (*Toll-inteleukin-1 receptor*), reclutar a varias proteínas adaptadoras específicas que transducen y amplifican la señal. Las proteínas adaptadoras reclutadas por estos dominios son: MyD-88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), y SARM (*sterile α and HEAT-Armadillo motifs-containing protein*) (O'Neill and Bowie, 2007). Estas proteínas a su vez interactúan con otras proteínas, como IRAK o TRAF6, y finalmente

la cascada de señales confluye en la activación de la transcripción de NF- κ B y AP-1. Estos dos efectores intracelulares promueven la producción de citoquinas proinflamatorias, como algunas interleuquinas (IL-1, IL-6 e IL-8) o el factor de necrosis tumoral (TNF- α). Asimismo, mediante la vía principal de señalización TLR4/MD-2, los macrófagos pueden secretar otros mediadores, como el factor activador de plaquetas, prostaglandinas, IFN- γ y óxido nítrico. Independientemente de este sistema de reconocimiento, el LPS también interactúa con el complemento sanguíneo y promueve su activación a través de la denominada ruta alternativa del complemento (Fujihara et al., 2003; Munford, 2006).

En Estados Unidos, la incidencia de la sepsis es de 50-95 casos por cada 100 000 ingresos, y en los últimos años esta cifra ha aumentado en torno a un 9 % (Martin et al., 2003). Se estima que aproximadamente el 9 % de los casos de sepsis evoluciona a sepsis severa y un 3 % de éstos se complica a un choque endotóxico (Rangel-Frausto et al., 1998). Además, la sepsis afecta a un 10 % de los pacientes ingresados en UCIs en Estados Unidos (Annane et al., 2005). Esta patología causa una alta morbi-mortalidad en todo el mundo, con unas tasas de mortalidad de 35-70 %, dependiendo de factores como el sexo, la edad, el origen étnico, la presencia de una infección pulmonar previa o un síndrome de disfunción respiratoria aguda, el fallo renal, o el origen de la infección (más grave si es nosocomial y polimicrobiana). Finalmente, la sepsis y el choque séptico incrementan el riesgo de sufrir infecciones por patógenos oportunistas resistentes a antibióticos y complicaciones musculares asociadas al cuidado intensivo del paciente (Annane et al., 2005). Las infecciones pulmonares, las gastrointestinales y las bacteriemias primarias causan el 80 % de las sepsis diagnosticadas y aproximadamente el 90 % de ellas son provocadas por patógenos bacterianos (Annane et al., 2005; Martin et al., 2003). En la Tabla 2 se muestran las frecuencias estimadas de choque séptico en función del patógeno causante en Estados Unidos.

Tabla 2- Patógenos principales causantes del choque séptico. Adaptado de (Annane et al., 2005).

	Frecuencia estimada
Bacterias Gram-positivas	30-50 %
<i>S. aureus</i> sensible a meticilina	14-24 %
<i>S. aureus</i> resistente a meticilina	5-11 %
Otros <i>Staphylococcus</i> spp.	1-3 %
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9-12 %
Otros <i>Streptococcus</i> spp.	6-11 %
<i>Enterococcus</i> spp.	3-13 %
Anaerobios	1-2 %
Otras bacterias Gram-positivas	1-5 %
Bacterias Gram-negativas	25-30 %
<i>E. coli</i>	9-27 %
<i>P. aeruginosa</i>	8-15 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2-7 %
<i>Enterobacter</i> spp.	6-16 %
<i>Haemophilus influenzae</i>	2-10 %
Anaerobios	3-7 %
Otras bacterias Gram-negativas	3-12 %
Hongos	
<i>Candida albicans</i>	1-3 %
Otras <i>Candida</i> spp.	1-2 %
Levaduras	1 %
Parásitos	1-3%
Virus	2-4%

Durante un proceso infeccioso, las bacterias gramnegativas liberan cierta cantidad de LPS al multiplicarse. Además, los mecanismos de defensa del huésped causan frecuentemente la lisis bacteriana con el consiguiente aumento de liberación de LPS. Además, se ha descrito que algunas terapias antibióticas provocan, como efecto indeseado, la liberación de la endotoxina. Entre los antibióticos que promueven esta liberación de LPS se encuentran los β -lactámicos, las quinolonas y los aminoglucósidos (Kirikae et al., 1998; Lepper et al., 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 (PMB), o de la colistina (Sánchez-Gómez et al., 2011).

Actualmente, no existe una terapia directa y eficaz contra la sepsis o el choque séptico. La prevención del choque séptico está basada en el uso de vacunas y antibióticos como estrategias preventivas de infecciones iatrogénicas (desarrolladas después de un acto médico), aunque también se recurre a la administración de inmunoterapia (Annane et al., 2005). Los tratamientos antimicrobianos se complementan con otras estrategias que persiguen mantener las constantes vitales del paciente dentro de determinados rangos. El choque séptico, a menudo, provoca hiperglicemia y déficit de electrolitos, por lo que se recurre a la infusión de insulina y a la reposición de electrolitos mediante soluciones que los contengan. Además, el paciente puede presentar problemas hemodinámicos y coagulopatías, por lo que se recurre a la administración de transfusiones sanguíneas, plaquetas, anticoagulantes, corticoesteroides y fármacos vasoconstrictores (dopamina y norepinefrina). 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. 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.

No obstante, estos tratamientos basados en el control de la infección y el soporte de los órganos resultan a menudo insuficientes, lo que está estimulando una activa investigación encaminada a desarrollar terapias más directas frente al choque endotóxico. Entre estos tratamientos experimentales, se encuentran aquellos dirigidos a neutralizar citoquinas y mediadores proinflamatorios, como TNF- α e IL-1 (Reinhart and Karzai, 2001). Otros investigadores estudian el posible uso de compuestos como la antitrombina II, o inhibidores de la vía del complemento (Samuelsen et al., 2004), del factor tisular (tifacogin) o del receptor TLR-4 (Nakamura et al., 2007). Además, se ha estudiado el empleo de anticuerpos monoclonales anti- TNF- α (afelimomab) y la administración de IFN- γ como estrategia para mejorar la actividad monocítica (Docke et al., 1997). Finalmente, se están probando compuestos que podrían neutralizar la

endotoxina bacteriana, como antisueros humanos, estatinas, macrólidos, así como la depuración extracorpórea, hemofiltración y hemoadsorción de endotoxinas con PMB inmovilizada (Toraymyxin ®) (Shoji, 2003). Hasta ahora, estas estrategias no han cosechado resultados del todo satisfactorios y la administración de proteína C reactiva recombinante (drotrecogin- α) ha sido hasta el año 2011 el único método, junto a la administración de hidrocortisona, aprobados para el tratamiento clínico de pacientes con choque séptico (Bernard et al., 2001). No obstante, la proteína C reactiva ha sido retirada del mercado por su dudosa relación coste/beneficio (Angus, 2012).

En principio, un tratamiento antiendotóxico ideal debería ser capaz de inhibir el desencadenamiento de la patología en las fases más tempranas, bien neutralizando la molécula causante de la misma (el LPS, sobre todo, en el caso de infección por bacterias gramnegativas), o bien inhibiendo las vías iniciales de señalización dependientes de TLR. En cuanto a la primera estrategia, se conocen péptidos catiónicos con gran afinidad por el LPS, y se ha demostrado en modelos animales, que estos compuestos son capaces de proteger frente al choque endotóxico. Así, se han descrito varios péptidos que neutralizan al LPS *in vivo*, como los derivados de la catelicidina, como LL-37, de la cecropina como el péptido CM4 (Lin et al., 2008), o péptidos híbridos derivados de la cecropina y melitina como MBI-27, MBI-28 (Gough et al., 1996) y CA(1-8)M(1-18) (Velasco et al., 1997); derivados de la NK-lisina, como NK-2 (Andra et al., 2004), de la indolicidina (Scott and Hancock, 2000) o del factor LAL (*Limulus* anti-LPS), como el péptido Pep 19-2.2 (Gutsmann et al., 2010). Otros péptidos son capaces de competir con el LPS por la unión al receptor TLR-4, impidiendo la translocación de NF- κ B al núcleo e inhibiendo la liberación de citoquinas proinflamatorias. Algunos de estos compuestos han mostrado ser terapéuticamente eficaces en modelos animales de choque séptico (Gutsmann et al., 2010).

1.6. Resistencia antibiótica

1.6.1. Relevancia clínica

Además de la propia gravedad de la enfermedad debida a una determinada infección, la dificultad para instaurar una terapia eficaz depende de un problema añadido: la aparición de cepas multiresistentes a los antibióticos.

La mayoría de cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes son aisladas de pacientes con fibrosis quística o de personas que sufren inmunodepresión de distinta etiología. Este patógeno adquiere fácilmente resistencias antibióticas, que son rápidamente seleccionadas tras una terapia antibiótica. Así, un estudio describe que el 27-72 % de las cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes aisladas eran sensibles antes de la terapia antibiótica (Obritsch et al., 2005). Además, la adquisición de *P. aeruginosa* multiresistente en el ámbito hospitalario, en especial en pacientes de fibrosis quística, se está incrementando, lo que puede dar lugar a graves brotes (Saiman et al., 1996). Un estudio realizado entre 1993 y 2002 en UCIs de hospitales de EEUU reveló que la frecuencia de aislamiento de cepas multiresistentes ha aumentado en numerosas especies bacterianas, siendo para *P. aeruginosa* (al menos resistente a tres de cuatro antibióticos: ceftazidima, imipenem, ciprofloxacino y tobramicina) del 7,6 %. Ese mismo estudio describió que el 21-35 % de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas eran resistentes a cefalosporinas de tercera generación (NNIS System, 2004), y otro estudio, también en EEUU, demostró un incremento de la resistencia a carbapenemes (Tam et al., 2007). En otro estudio multicéntrico español sobre 1.014 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de 136 hospitales, se comprobó que ninguno de los antimicrobianos evaluados era activo frente a todos los aislamientos. Las tasas de resistencia para los principales compuestos fueron: piperacilina-tazobactam 7%, meropenem 8%, amikacina 9%, tobramicina 10%, imipenem 14%, ceftazidima 15%, cefepima 17%, aztreonam y ciprofloxacino 23% y gentamicina 31%. Las cepas comunitarias eran más frecuentemente resistentes a fluoroquinolonas, mientras que las resistentes a carbapenemes procedían del entorno hospitalario (Bouza et al., 2003).

En bacteriemias, *P. aeruginosa* es, junto a *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y *Acinetobacter baumannii*, la bacteria gramnegativa con más tendencia a presentar fenotipos multiresistentes. La mortalidad asociada a la bacteriemia por estos fenotipos es muy elevada (33,3 % en *P. aeruginosa*) (Michalopoulos et al., 2011). Otro estudio, donde se realizó un seguimiento de aislamientos de *P. aeruginosa* en bacteriemias entre los años 2005 y 2007 en Houston, mostró que el 10-17 % de los aislamientos clínicos obtenidos eran multiresistentes (Tam et al., 2010). La frecuencia de aparición de este fenotipo en *P. aeruginosa* ha sido relativamente constante y baja (1,6-3 %) en Norteamérica, mientras que en América

Latina y Europa ha habido una tendencia al incremento, del 12 % al 18 % y del 5 % al 11 %, respectivamente.

Numerosos estudios han demostrado que la administración de una terapia experimental inapropiada está asociada con los fallos terapéuticos en infecciones por organismos multiresistentes. De hecho, se ha descrito que un retraso en la instauración de la terapia antibiótica adecuada incrementa las frecuencias de morbi-mortalidad y la duración de la estancia en el hospital (Fraser et al., 2006; Kang et al., 2005). Por ejemplo, un estudio ha publicado que la mortalidad asociada a la prescripción de una terapia inicial inadecuada era del 30,7 % frente al 17,8 % observado en los pacientes con tratamientos anti-pseudomonas eficaces (Micek et al., 2005).

En algunas patologías como la fibrosis quística, la multiresistencia de *P. aeruginosa* tiene tal relevancia cualitativa y cuantitativa, que las opciones terapéuticas se ven limitadas al uso de la colistina y la polimixina B (Falagas and Kasiakou, 2005; Michalopoulos et al., 2011), antibióticos que prácticamente se dejaron de utilizar por su toxicidad (Landman et al., 2008). De hecho, la polimixina B es el antibiótico con mayor actividad frente a *P. aeruginosa*, pues el 98,7 % de los aislamientos son susceptibles a este compuesto (Gales et al., 2006).

1.6.2. Mecanismos de resistencia antibiótica de *P. aeruginosa*

Los principales mecanismos de resistencia antibiótica de *P. aeruginosa* son: i) la baja permeabilidad de la membrana externa; ii) la expresión de bombas de expulsión activa (*efflux pumps*) de antibióticos; iii) la inactivación de los antibióticos por modificación enzimática; iv) la modificación de las dianas antibióticas por mutaciones previas.

A. Baja permeabilidad

Las bacterias gramnegativas presentan una envoltura celular con una estructura característica, basada en dos membranas separadas por un espacio periplásmico, donde se sitúa una delgada capa de peptidoglucano. Como se ha comentado anteriormente, la membrana externa constituye una importante barrera de permeabilidad para muchos agentes antimicrobianos y, en general, para compuestos que resultan tóxicos para la bacteria. El LPS, que se encuentra en la zona más externa de esta membrana, se

encuentra cargado negativamente a pH fisiológico, debido a los grupos monofosfato del lípido A y del núcleo interno, así como a los grupos carboxilo de los compuestos del núcleo. Esta carga negativa está parcialmente neutralizada por uniones electrostáticas entre estos grupos y cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}). Por todo ello, esta región superficial de la envoltura bacteriana es muy polar e impide la difusión de antibióticos, sobre todo hidrofóbicos, al interior de la bicapa lipídica (Hancock, 1997b). *P. aeruginosa* puede reducir todavía más esta baja permeabilidad adquiriendo mutaciones que reducen o eliminan la expresión de ciertas porinas (OprD, OprF, OprE y OprC). Estas proteínas integrales de membrana externa proporcionan una vía de entrada a algunos antibióticos, sobre todo hidrofílicos, al interior de la célula. Un ejemplo de este mecanismo es la adquisición de resistencia a imipenem por una mutación que resulta en la inhibición de la producción de la porina OprD (Farra et al., 2008).

B. Bombas de expulsión activa (*efflux pumps*)

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. En las bacterias, estos sistemas tienen la capacidad de captar y expulsar antibióticos. La multiresistencia debida a bombas de flujo parece depender estrechamente de la integridad de la membrana externa y de la capacidad de ésta para actuar como barrera de permeabilidad (Nikaido, 1994).

Las bombas de expulsión activa que posee *P. aeruginosa* están integradas dentro de 5 “superfamilias”, divididas en dos grupos dependiendo de cuál sea su fuente de energía, bien el gradiente electroquímico transmembrana de protones (o de sodio), o bien la hidrólisis de ATP. En *P. aeruginosa* predominan los sistemas pertenecientes a la familia RND (*resistance-nodulation-cell division*), cuya fuente de energía proviene de la entrada de protones a la célula a favor de gradiente. Este tipo de bombas está integrado por tres componentes: la bomba propiamente dicha constituida por un transportador situado en la membrana citoplasmática, otra proteína con estructura de porina situada en la membrana externa que actúa como canal de expulsión, y una tercera (proteína de fusión a membrana (MFS)) que se encuentra en el espacio periplásmico y que acopla las dos anteriores. Las bombas de expulsión más comunes y con más

relevancia clínica en *P. aeruginosa* son: MexAB-OprM (Poole et al., 1993), MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM, aunque también pueden aparecer MexJK-OprM, MexHI-OpmD, y MexVW-OprM (Li et al., 2003). Estas bombas pueden expulsar en mayor o menor grado no sólo los antibióticos β -lactámicos, sino también otros antibióticos como fluoroquinolonas, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, lincomicina y novobiocina (Strateva and Yordanov, 2009). En la Tabla 3 se resumen los principales fenotipos de resistencia esperados según el sistema de expulsión activa expresado.

Tabla 3- Patrones de susceptibilidad antibiótica a los β -lactámicos en *P. aeruginosa* y su correspondencia con la posesión de un determinado mecanismo de resistencia (adaptado de (Vila and Marco, 2010)).

Fenotipos de resistencia									
TIC	TCL	PIP	PTZ	CAZ	CEF	ATM	IMP	MER	Mecanismo de resistencia
S	S	S	S	S	S	S	R	r	Pérdida porina OprD
R	R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	S	r	Sistema MexAB-OprM
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	R	r/R	S	S	Sistema MexCD-OprJ
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	R	r	Sistema MexEF-OprN*
r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	r/R	S	S	Sistema MexXY-OprM
r	R	r	r	r	S/r	r	S	S	Desrepresión parcial AmpC
R	R	R	R	R	r/R	R	S	S	Desrepresión total AmpC

ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CEF: cefepima; IMP: imipenem; MER: meropenem; PIP: piperacilina; PTZ: piperacilina-tazobactam; R: resistente; S: sensible; r: sensibilidad disminuida; TCL: ticarcilina-ác. clavulánico; TIC: ticarcilina.

*Sistema activado por MexT, que simultáneamente regula negativamente la expresión de la porina OprD, por lo que la disminución de la sensibilidad a los carbapenemes en este fenotipo no es debido a la acción de la bomba efflux sino a la pérdida de la porina.

Sólo las bombas MexAB-OprM y MexXY-OprM se expresan de forma constitutiva, aunque a bajo nivel, en *P. aeruginosa*. Sin embargo, ciertas mutaciones que inactivan los genes reguladores de la expresión de estas bombas (*mexR* y *mexZ*, respetivamente) desreprimen constitutivamente estos sistemas, produciendo su sobreexpresión y aumentando consiguientemente la resistencia a sus antibióticos sustrato. Otros genes como *nalB*, *nalD* y *nalC* también participan en la regulación de

estos operones y su alteración puede provocar la sobreexpresión de las bombas. Por otro lado, *P. aeruginosa* posee genes para dos bombas, MexCD-OprJ y MexEF-OprN, que no se expresan constitutivamente y que dependen de los reguladores codificados por *nfxB* y *mexS-mexT* (represor/activador), respectivamente. La mutación de *nfxB* puede provocar la expresión de MexCD-OprJ y la consiguiente adquisición de resistencia a β -lactámicos, con preferencia por cefalosporinas de cuarta generación. La alteración en el balance de MexS y MexT puede dar lugar a la producción de MexEF-OprN, un sistema cuyo funcionamiento confiere resistencia a las fluoroquinolonas, y reduce la sensibilidad a los carbapenemes, en especial a imipenem (Vila and Marco, 2010).

C. Enzimas modificantes

Una vez que el antibiótico penetra al interior de la bacteria, existen enzimas capaces de inactivarlo, bien por hidrólisis, como en el caso de las β -lactamasas, o bien por modificación química, como hacen las enzimas modificantes de aminoglucósidos (Rodríguez-Esparragón et al., 2000).

La enzima modificante más importante y mejor estudiada en *P. aeruginosa* es la β -lactamasa cromosómica inducible de clase C (AmpC), codificada por el gen *ampC*, y que tiene homología estructural y funcional con β -lactamasas de algunas enterobacterias (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter*, *Serratia marcescens* y *Morganella morgani*). En condiciones normales esta enzima con actividad cefalosporinasa tiene bajo nivel de expresión y es responsable de la resistencia a aminopenicilinas (amoxicilina y ampicilina) y cefalosporinas de espectro reducido (de primera y segunda generación). Sin embargo, la bacteria puede aumentar la producción de esta enzima de 100 a 1000 veces en presencia de antibióticos inductores, como la ceftioxitina o el imipenem, aunque esta sobreexpresión es reversible y cesa al retirar el agente inductor. Además, la producción de AmpC también puede verse incrementada por mutaciones cromosómicas en genes que codifican proteínas reguladoras de la producción de AmpC. Este es el caso de *ampD*, que codifica una N-acetil-anhidromuramil-L-alanina-amidasa citosólica involucrada en el reciclaje del péptidoglucano y de *ampR*, que codifica un regulador transcripcional tipo LysR (Moyá et al., 2009). Este tipo de mutaciones producen una expresión constitutiva de AmpC de alto nivel y establemente desreprimida. Cuando, debido a estos mecanismos, la bacteria produce niveles de AmpC suficientemente altos,

adquiere resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, con la excepción de los carbapenemes (Tabla 3). Además de las proteínas mencionadas, hay otras moléculas que podrían jugar un papel esencial en la regulación de la expresión de AmpC, como dos proteínas homólogas a AmpD, denominadas AmpDh2 y AmpDh3, y la PBP4 codificada por el gen *dacB*, (Juan et al., 2006; Moyá et al., 2009).

Otras enzimas importantes, pero que aparecen con menos frecuencia en *P. aeruginosa*, son las β -lactamasas de clase A (β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)), clase B (metalo- β -lactamasas) y clase D (oxacilinasas). En los últimos años se ha detectado un importante aumento en el aislamiento de cepas que expresan metalo- β -lactamasas. Este hecho es especialmente preocupante, ya que estas enzimas inactivan eficazmente los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones producidas por cepas multiresistentes de *P. aeruginosa*, los carbapenemes (imipenem y meropenem, entre otros). La mortalidad asociada a la bacteriemia producida por cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenemes supera el 30 % (Suárez et al., 2010).

La modificación enzimática del antibiótico también es el mecanismo de resistencia más importante de entre los que confieren resistencia a los aminoglucósidos. Dicha modificación, que implica habitualmente una acetilación, una fosforilación o una adenilación, disminuye la afinidad del antibiótico por su diana, la subunidad ribosómica 30S.

D. Modificación de la diana antibiótica

El segundo mecanismo que puede actuar una vez que el antimicrobiano ha entrado en la célula bacteriana es el basado en la alteración de la diana intracelular del antibiótico. Esta alteración disminuye o incluso inhibe totalmente la capacidad del antibiótico para unirse a su blanco de acción. Este es el mecanismo más importante de entre los responsables de la resistencia de *P. aeruginosa* a quinolonas y fluoroquinolonas. Es bien conocido que estas dos familias de antibióticos pierden su actividad frente a cepas que han modificado las dianas intracelulares de estos compuestos, la ADN girasa y la topoisomerasa IV, debido a mutaciones en sus genes codificantes, *gyrA* y *parC* respectivamente (Hancock and Speert, 2000; Vila and Marco, 2010).

Generalmente, *P. aeruginosa* no presenta un único mecanismo de resistencia frente a un determinado antibiótico, sino que posee varios mecanismos que además pueden actuar conjuntamente. Este hecho dificulta todavía más el tratamiento frente a las infecciones debidas a este microorganismo.

2. Efecto postantibiótico

El efecto postantibiótico (*Post Antibiotic Effect* (PAE)) es el término utilizado para describir el retraso observado en el crecimiento de un cultivo microbiano tras ser expuesto a un agente antimicrobiano y una vez que el agente ha sido retirado (McDonald et al., 1977). De esta manera, un organismo expuesto a un agente con PAE crecerá más despacio -al menos durante el periodo inmediatamente posterior a la retirada del agente- que un organismo no tratado. Desde el descubrimiento de la penicilina, este efecto ha sido estudiado por muchos grupos de investigación. Un estudio realizado por Parker y Marsh describió un retraso de hasta 30 minutos en el crecimiento de un cultivo de *Staphylococcus* expuesto a penicilina G una vez eliminado el antibiótico (Parker and Marsh, 1946). Este efecto fue posteriormente estudiado por otros investigadores tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre todo en bacterias grampositivas, y en la década de 1970 se comenzó a estudiar el PAE sistemáticamente en gramnegativos.

La existencia o no de un retraso en el crecimiento bacteriano tras la exposición a un antimicrobiano y la magnitud del mismo dependen de muchos factores, entre los que destaca el tipo de antibiótico utilizado y las características del organismo en estudio. En general, los inhibidores de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, como la novobiocina, los macrólidos, aminoglucósidos o quinolonas, producen mayores PAEs que los antibióticos β -lactámicos. Además, en las bacterias grampositivas los antibióticos β -lactámicos producen PAEs de corta duración, mientras que en bacterias gramnegativas como *E. coli* o *P. aeruginosa*, o bien no se obtiene retraso en el crecimiento bacteriano, o bien se obtienen resultados paradójicos, como PAEs inferiores a 0. Un PAE negativo implica que el tiempo de generación del cultivo pre-expuesto al antibiótico es menor que el de un cultivo no tratado. Otros factores que pueden afectar en mayor o menor medida a la magnitud del PAE son los siguientes: la concentración del antimicrobiano empleado, la duración de la exposición, la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo, el tamaño de la población microbiana, las

condiciones de pH, temperatura, presión parcial de oxígeno y el tipo de medio utilizado (Craig and Gudmundsson, 1996).

En contraste con la abundante información recopilada sobre el PAE en estudios *in vitro*, la información sobre este fenómeno *in vivo* es más escasa, debido a las dificultades que entrañan este tipo de estudios. Para medir PAEs de antimicrobianos *in vivo* se recurre a realizar recuentos periódicos de la carga microbiana presente en tejidos blandos y fluidos corporales tras un tratamiento antibiótico. Asimismo, se han descrito algunos modelos animales, como la infección de muslo, neumonía, infección subcutánea y modelo de hilo de algodón en ratones, así como de meningitis en conejos y endocarditis en ratas (Craig et al., 1991; Eagle et al., 1950; Renneberg and Walder, 1988; Sande et al., 1981).

2.1. Relevancia clínica del PAE

La posesión de PAE por parte de un antimicrobiano tiene importantes implicaciones clínicas, en particular sobre los protocolos de dosificación de estos agentes. Así, un antimicrobiano que indujera un PAE prolongado sobre un determinado microorganismo podría administrarse de forma más espaciada que otro que no tuviera PAE, sin que se perdiera la eficacia terapéutica (Craig and Gudmundsson, 1996). Este mayor espaciamiento se traduciría en una pauta de dosificación más cómoda para el paciente y en una potencial reducción de la toxicidad del tratamiento, así como en la disminución de los costes sanitarios (material desechable, personal especializado en la administración del fármaco, etc). Asimismo, la producción de PAE por parte de un antibiótico podría contribuir al control de las infecciones de manera indirecta, pues se ha descrito que los microorganismos son más sensibles a la acción de los leucocitos mientras dura este fenómeno (Craig and Gudmundsson, 1996). Finalmente, en ensayos clínicos centrados en el control de infecciones en pacientes con cáncer, se ha estudiado la dosificación intermitente como una alternativa a la terapia continua con resultados satisfactorios en algunos de los casos.

Los aminoglucósidos son los antibióticos empleados como prototipo de los agentes con PAE. La eficacia terapéutica de estos antimicrobianos se ha asociado con su capacidad para provocar PAE tanto en modelos animales como en ensayos clínicos en seres humanos (Craig, 1995; Wood et al., 1988). Aunque la mayoría de publicaciones

muestran resultados similares en cuanto a eficacia y toxicidad, existen estudios donde se ha observado una mejora de la eficacia y una disminución de reacciones adversas, o bien un retraso de la aparición de la nefrotoxicidad con un régimen de dosificación de una dosis por día de aminoglucósido con respecto a protocolos donde se realizan dos, incluso tres, administraciones diarias del mismo aminoglucósido (Craig, 1995). En relación con esta observación, la alta eficacia lograda con una dosis diaria de aminoglucósidos –capaz de generar concentraciones en suero y tejidos superiores a su CMI durante el 30-40 % del intervalo entre dosis-, sugiere que los antimicrobianos con PAE pueden tener un gran impacto clínico. Sin embargo, son necesarios más estudios en modelos animales y ensayos clínicos en humanos para determinar el verdadero valor terapéutico del PAE.

2.2. Mecanismo del PAE

La explicación biológica del PAE, sobre todo a nivel celular y fisiológico, no está del todo clara, y se han formulado varias hipótesis para intentar explicar este fenómeno en función de: i) la persistencia limitada del agente antimicrobiano en el sitio de acción; ii) la reparación del daño producido en las estructuras celulares; y iii) la regeneración de macromoléculas esenciales (Craig and Gudmundsson, 1996).

2.2.1. Persistencia limitada del agente en el sitio de acción

Esta hipótesis considera que el PAE es consecuencia del tiempo que dura la interacción entre el antibiótico y su diana molecular. Esta explicación se postula sobre todo para antibióticos cuyas dianas moleculares son subunidades específicas de los ribosomas bacterianos (eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol, entre otros). No obstante, hay estudios que demuestran que los retrasos asociados a los PAEs de algunos antibióticos superan el tiempo calculado para la interacción antibiótico-diana (Gerber and Craig, 1981). Sin embargo, en el caso de los antibióticos β -lactámicos, cuyo blanco de acción son las PBPs (*penicillin binding proteins*), hay algunos datos que apoyan esta hipótesis. Así, se estima que el complejo PBP-penicilina se disocia tras unos 10 minutos, regenerando de nuevo la enzima activa para la síntesis del peptidoglucano (Georgopapadakou and Liu, 1980). También concuerda con esta hipótesis, la distinta magnitud del PAE observada para los β -lactámicos en bacterias grampositivas y

gramnegativas (ver más arriba), pues este fenómeno podría reflejar diferencias en el grado de accesibilidad de la capa de peptidoglucano en los dos tipos de bacterias.

2.2.2. Reparación del daño producido en las estructuras celulares

Esta hipótesis sostiene que el PAE es consecuencia del daño estructural al que el antimicrobiano somete al organismo y que su duración depende de la rapidez con que dicho daño puede repararse. En conformidad con esta propuesta, el daño ultraestructural existente en las bacterias que manifiestan PAE es muy similar al daño observado tras una exposición continuada al antibiótico a concentraciones subinhibitorias. Existe evidencia de alteraciones estructurales vinculadas a PAE y de su reparación, que parece ser necesaria para que el microorganismo recupere su velocidad de crecimiento normal (Gottfredsson et al., 1993). Este hecho se ha observado, por ejemplo, tras el tratamiento con anfotericina B, un antifúngico que se une a esteroides de la membrana celular de levaduras produciendo una desestabilización estructural, que debe ser reparada para permitir la multiplicación del hongo (Turnidge et al., 1994). Por otra parte, se ha descrito que los antibióticos que se unen a la ADN girasa produciendo una inhibición de la replicación del ADN (las quinolonas, por ejemplo), provocan una acumulación de hebras de ADN monocatenario, y que este material actúa como activador de la reparación del ADN. De nuevo y según esta hipótesis, el retraso asociado al PAE coincidiría con el tiempo necesario para la reparación de estas alteraciones.

2.2.3. Regeneración de macromoléculas esenciales

Esta hipótesis se basa en el hecho de que muchos antimicrobianos, como los aminoglucósidos o los macrólidos, se unen a los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis proteica. Esto provocaría una depleción de proteínas esenciales para el metabolismo, que debido a esto, quedaría ralentizado o incluso interrumpido durante cierto tiempo. Según esta hipótesis, el PAE se correspondería con el tiempo que el organismo tendría que invertir en sintetizar esas macromoléculas necesarias para su metabolismo y crecimiento. Algunos estudios han demostrado que la síntesis de ácidos nucleicos, medida a través de la captación de timidina, se ve inhibida tras el tratamiento de *Staphylococcus aureus* con dicloxacilina, vancomicina y rifampicina, tres antibióticos que producen PAE. Por el contrario, se ha descrito que *E. coli* mantiene un nivel de síntesis de ADN prácticamente normal durante el periodo de retraso asociado al

PAE que se observa tras la exposición a tobramicina o gentamicina (Gottfredsson et al., 1995). En conformidad con esta observación, otro estudio demostró que en *E. coli* la exposición a tobramicina producía un PAE que era compatible con una síntesis de ADN y ARN casi inalterada, mientras que la síntesis de proteínas no se restableció hasta pasadas las 4 horas de la eliminación del antimicrobiano (Barmada et al., 1993). Estos últimos estudios demuestran que la duración del PAE producido por los aminoglucósidos se correlaciona con el periodo de tiempo necesario para reanudar la síntesis de proteínas, pero no guarda relación con una posible inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Craig and Gudmundsson, 1996).

2.3. Efecto subinhibitorio postantibiótico (PA SME) y combinaciones antibióticas

El efecto de las concentraciones inhibitorias o subinhibitorias de un antibiótico sobre la morfología y el crecimiento bacterianos ha sido muy estudiado durante años. Numerosos estudios demuestran que, como consecuencia de la exposición a concentraciones de un antibiótico superiores a la CMI, un organismo se convierte transitoriamente en susceptible a concentraciones subinhibitorias del mismo antibiótico (Jacobs et al., 2003; Licata et al., 1997). Este efecto se denomina efecto subinhibitorio postantibiótico (sub-CMI; *Postantibiotic Sub MIC Effect* o PA SME en la literatura en lengua inglesa), un término que engloba el PAE y la sensibilidad a la re-exposición a concentraciones subinhibitorias del mismo antibiótico (Cars and Odenholt-Tornqvist, 1993). Este efecto se ha descrito en compuestos como la penicilina y la vancomicina actuando sobre estreptococos y neumococos, así como para la amikacina en *E. coli* y el imipenem en *P. aeruginosa* (Odenholt-Tornqvist et al., 1991; Odenholt-Tornqvist et al., 1992; Odenholt-Tornqvist et al., 1995). Se han realizado observaciones similares para otros tipos de antibióticos, como los macrólidos azitromicina o isepamicina, frente a *Staphylococcus aureus* y *E. coli* (Fuentes et al., 1998). El efecto sub-CMI tiene implicaciones clínicas, pues permite reducir el número y la concentración de las dosis en terapias más o menos largas sin pérdida de eficacia en el tratamiento. Esto es particularmente importante para los antibióticos más tóxicos o para aquellos que producen efectos secundarios de mayor entidad.

Asimismo, se ha descrito que la combinación de dos o más antimicrobianos puede provocar un PAE mayor que el de la suma de los PAEs de los agentes cuando actúan por separado (Craig and Gudmundsson, 1996). Al menos en bacterias gramnegativas, los incrementos en PAE obtenidos de esta manera son proporcionales a la capacidad de cada uno de los antimicrobianos para inducir su propio PAE. De hecho, los estudios de sinergia realizados en *P. aeruginosa* indican un aumento significativo del retraso en el crecimiento cuando se combinan antibióticos aminoglucósidos como amikacina, con β -lactámicos (ceftazidima o imipenem) o quinolonas (ciprofloxacino) (Giamarellos-Bourboulis et al., 2005).

3. Péptidos antimicrobianos

Actualmente, hay una intensa investigación para desarrollar compuestos antimicrobianos que posean capacidad bactericida y/o que sean buenos inhibidores del choque endotóxico. Muchos péptidos antimicrobianos poseen estas dos propiedades y, debido a su peculiar mecanismo de acción, las bacterias afrontan importantes obstáculos para desarrollar una resistencia de alto nivel a estos agentes. De hecho, como ya se ha comentado, estos compuestos son a veces los únicos que retienen actividad sobre organismos multiresistentes, como algunas cepas de *P. aeruginosa*. El compuesto de este tipo que se ha empleado con más frecuencia como modelo de péptido antimicrobiano es la polimixina B (PMB), un lipopéptido catiónico producido por *Bacillus polymyxa*. Este compuesto posee una potente actividad bactericida sobre gramnegativos y una elevada afinidad por el LPS, lo que le capacita para neutralizar eficazmente el choque endotóxico, al menos en modelos animales (Gales et al., 2006; Gales et al., 2011). Sin embargo, se ha descrito que este agente y sus derivados (como la polimixina E o colistina) tienen una no despreciable toxicidad renal y neurológica, lo que ha condicionado seriamente su uso para tratamientos sistémicos (Landman et al., 2008). Aunque el mecanismo principal de los péptidos antiendotóxicos consiste en la unión al LPS, se han descrito mecanismos de inhibición del choque endotóxico a otros niveles, como por ejemplo, mediante la regulación de los niveles de transcripción de factores como NF- κ B o la unión al receptor de LPS, TLR-4/MD-2 (Rosenfeld et al., 2006; Rosenfeld and Shai, 2006).

Los péptidos antimicrobianos son generalmente pequeños (12-100 aminoácidos), con carga neta positiva y de naturaleza anfipática. Estos compuestos se clasifican en los siguientes grupos atendiendo a su estructura secundaria (Devasia et al., 2012): i) α -hélice ii) β -lámina iii) mezcla de α -hélice y β -lámina iv) sin estructura secundaria o irregular v) macrocíclicos. También se han empleado otras propiedades para clasificar a los péptidos antimicrobianos, como la composición de aminoácidos, la hidrofobicidad, la proporción de residuos básicos e hidrofóbicos, así como el número y localización de los puentes disulfuro (Devasia et al., 2012).

3.1. Distribución y funciones de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son un componente muy importante en la primera línea de defensa del huésped y constituyen un mecanismo de la inmunidad innata que se ha conservado a lo largo de la evolución (Cederlund et al., 2011; Wiesner and Vilcinskis, 2010). Los péptidos antimicrobianos han sido aislados de diversos microorganismos (gramicidina A, bacteriocinas, polimixina), invertebrados (drosocina, abaecina, lebecina, melitina, polifemusina y cecropina), plantas (MiAMP1 y purotionina), anfibios (magainina 1 y PGLa), pájaros, peces y mamíferos incluyendo a los seres humanos (indolicidina, lactoferricina, catelicidinas y defensinas, entre otros). La expresión de estos péptidos puede ser constitutiva o inducible por componentes microbianos o estímulos inflamatorios, incluyendo las citoquinas proinflamatorias, bacterias enteras o ciertos componentes bacterianos como el LPS (Nguyen et al., 2011; Pasupuleti et al., 2011). En organismos superiores, los péptidos antimicrobianos pueden ser producidos por células epiteliales que recubren el tracto respiratorio, gastrointestinal o el tracto genitourinario. Así, muchos péptidos han sido descubiertos en tejido epitelial de las plantas, insectos y mamíferos (Schroder and Harder, 2006). Sin embargo, es en células circulantes del sistema inmunitario donde se han localizado la mayor cantidad y variedad de péptidos antimicrobianos, tanto en animales vertebrados como en invertebrados. Entre los últimos organismos, se ha estudiado en profundidad el sistema inmunitario innato del cangrejo *Limulus polyphemus*, que almacena los péptidos antimicrobianos en los gránulos de los hemocitos y los libera al plasma tras la estimulación de componentes bacterianos como el LPS (Iwanaga et al., 1998).

Tabla 4- Funciones inmunomoduladoras de algunos péptidos y proteínas antimicrobianas humanas. Adaptado de (Nguyen et al., 2011).

	Fuente	Funciones adicionales no antimicrobianas ¹	Ref.
<i>Péptidos antimicrobianos</i>			
Catelicidinas (LL-37)	Leucocitos, epitelio	Antiendotóxico, quimiotaxis, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), curación de heridas, desgranulación de mastocitos	(Soehnlein, 2009)
Defensinas	Leucocitos, epitelio	Antiendotóxico, opsonización, quimiotaxis, formación de ROS, inhibición del complemento, curación de heridas	(Soehnlein, 2009)
Dermcidinas	Piel	Quimiotaxis	(Harris et al., 2009)
Histatinas	Saliva	cura de heridas	(Oudhoff et al., 2008)
Lactoferricina	Proteína de leche digerida	Antiendotóxico, inhibición del complemento, factor de transcripción	(Gifford et al., 2005)
<i>Proteínas antimicrobianas</i>			
Quimioquinas	Leucocitos	Quimiotaxis	(Yang et al., 2003)
Esprocidinas neutrófilos (catepsina G, elastasa, azurocidina)	Neutrófilos	Proteasa, formación de ROS, opsonización, actividad macrófagos	(Soehnlein, 2009)
Proteínas potenciadoras de permeabilidad	Neutrófilos	Antiendotóxicos	(Soehnlein, 2009)
Lipocalinas	Fluidos, neutrófilos	Secuestra sideróforos	(Fluckinger et al., 2004)
Lisozima	Fluidos, neutrófilos	Digestión de peptidoglucano	(Soehnlein, 2009)
Lactoferrina	Fluidos de secreción y neutrófilos	Secuestra hierro, antiendotoxicidad, Estimulación de la fagocitosis	(Soehnlein, 2009)
RNAse 7	Piel	Ribonucleasa	(Schroder and Harder, 2006)
Psoriasin	Piel	Activación de neutrófilos, formación de ROS	(Schroder and Harder, 2006)
Histonas	Núcleo celular	Regulación de la cromatina	(Parseghian and Luhrs, 2006)
Proteína priónica	Cerebro, otros tejidos	Desconocido	(Pasupuleti et al., 2009)

¹Generalmente, las funciones indicadas son secundarias en los péptidos antimicrobianos, mientras que ocupan un papel principal en las proteínas antimicrobianas

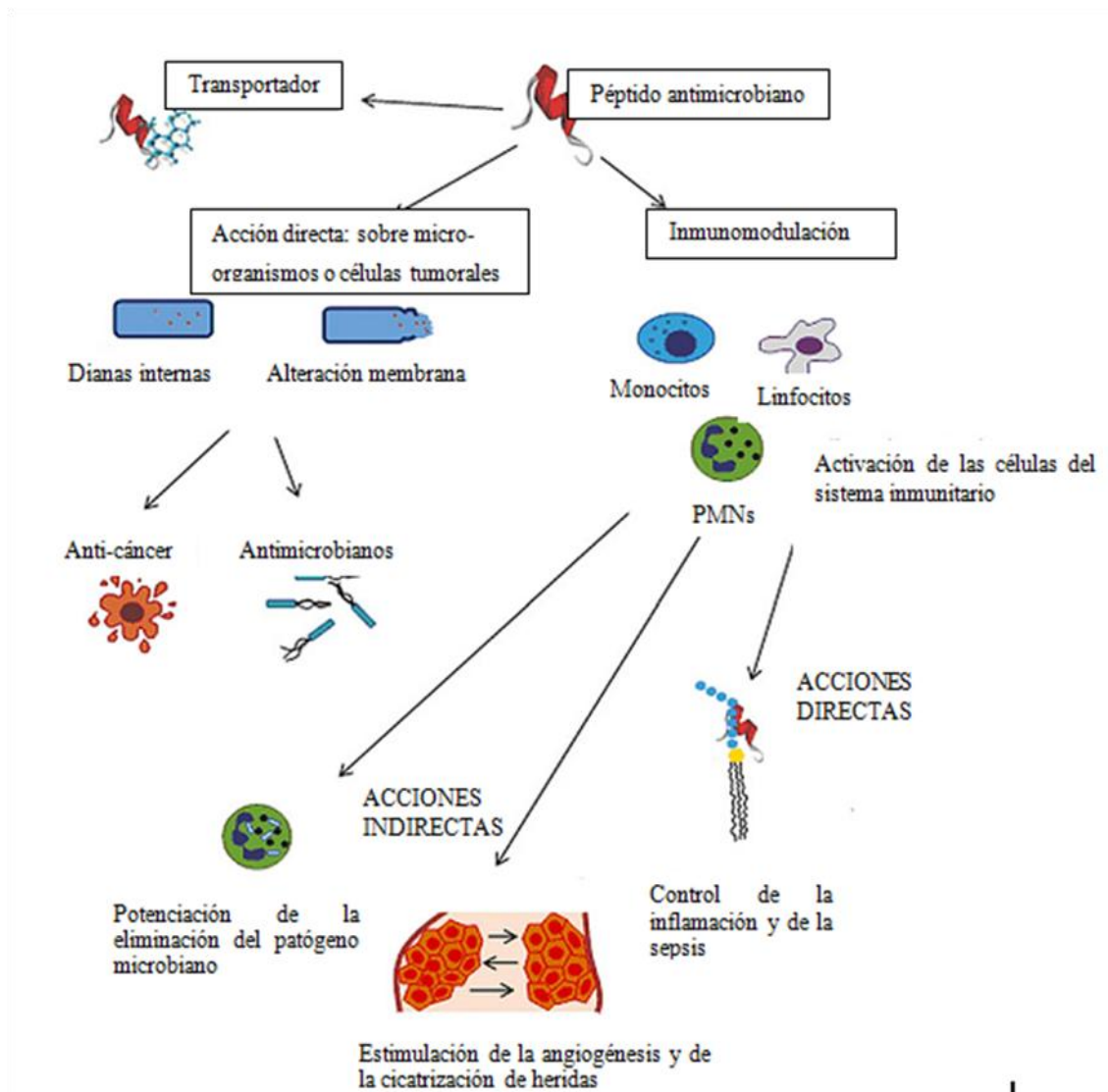


Figura 1.- Funciones biológicas de los péptidos antimicrobianos. Además de actividad antimicrobiana directa, se ha descrito que algunos péptidos tienen capacidad quimiotáctica y/o son capaces de reclutar células del sistema inmunitario o de transportar componentes microbianos, como por ejemplo el lipopolisacárido, hasta su receptor correspondiente. Adaptado de (Yeung et al., 2011).

Además de jugar un papel importante en la inmunidad innata, los péptidos antimicrobianos también pueden participar en funciones inmunomoduladoras. Este es el caso de las defensinas y catelicidinas, que además de actividad antimicrobiana directa, poseen funciones quimiotácticas sobre células del sistema inmunológico (Nguyen et al., 2011). No obstante, también se ha descrito la existencia de péptidos capaces de controlar infecciones únicamente mediante su acción activadora de la inmunidad del huésped, sin tener actividad directa sobre los patógenos (Easton et al., 2009). A estos compuestos se les denomina “reguladores de la defensa innata” (*innate defense*

regulator, IDR). En la Tabla 4 se muestran los mecanismos inmunomoduladores de algunos péptidos y proteínas antimicrobianas y en la Figura 1 se resumen las posibles funciones de estos compuestos.

3.2. Mecanismo de acción

La naturaleza catiónica y anfipática que presentan la mayoría de los péptidos antimicrobianos les permite interactuar con estructuras específicas, como motivos cargados negativamente de biomoléculas de la envoltura celular bacteriana, así como con ácidos nucleicos y proteínas fosforiladas. En bacterias gramnegativas, la interacción inicial entre el péptido y la membrana externa es inicialmente electrostática, e, implica las secciones aniónicas del LPS (núcleo interno y lípido A) y de algunos fosfolípidos. Dependiendo de la estructura secundaria que adoptan los péptidos, su interacción con la membrana externa de las bacterias gramnegativas es diferente. Los péptidos que adquieren conformación en α -hélice presentan una mayor superficie hidrofóbica y sus regiones anfipáticas se sitúan a lo largo de todo el eje de la hélice. Según algunos autores, esto permite que, en su interacción con la membrana externa, los péptidos se orienten en la misma dirección que las moléculas de fosfolípidos (o de LPS), con las regiones polares del péptido localizadas en la zona hidrofílica de la bicapa y las hidrofóbicas en contacto con los ácidos grasos (Dawson and Liu, 2008). Los péptidos que poseen conformaciones en β -lámina suelen estabilizarse mediante enlaces covalentes, como por ejemplo mediante la formación de puentes disulfuro. Sin embargo, la presencia de estos enlaces intramoleculares no siempre es necesaria para la actividad antimicrobiana, ya que, por ejemplo, los péptidos derivados de la lactoferrina y taquipesina -con estructuras lineales extendidas- poseen también una buena actividad antimicrobiana (Gifford et al., 2005; Ramamoorthy et al., 2006).

La inserción de los péptidos en la membrana externa produce una desestabilización de ésta debido al desplazamiento de los cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}). Se ha descrito que la alteración producida por la inserción de los péptidos en la membrana externa permeabiliza la membrana a otros péptidos en un proceso denominado “*self-promoted uptake*” (Piers and Hancock, 1994; Sawyer et al., 1988). Parece ser que los aminoglucósidos, que también poseen naturaleza catiónica, podrían cruzar la membrana externa empleando este mecanismo (Moore et al., 1984; Nicas and Hancock, 1983; Piers and Hancock, 1994; Sawyer et al., 1988). El resultado final es que

los péptidos acceden a la membrana citoplasmática donde se incorporan a su región interfacial (la interfase entre las porciones hidrofílicas e hidrofóbicas de la membrana) en un proceso promovido por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. El potente gradiente electroquímico, típico de membranas bacterianas, y la presencia de una elevada carga negativa en el lado citoplasmático de la bicapa lipídica, facilitan sin duda este fenómeno. Así, se ha demostrado que un potencial de membrana tan pequeño como -20 mV incrementa 200 veces la constante de unión del péptido catiónico taquipesina (Yeaman and Yount, 2003).

La inserción de las moléculas peptídicas en la membrana celular da lugar en última instancia a la formación de poros. En general, la formación de poros en la membrana se resume en los siguientes pasos: 1) unión del péptido a la membrana; 2) agregación de las moléculas peptídicas en el interior de la membrana, y 3) formación del poro, seguida a menudo, por una lisis celular debida al aumento de la permeabilidad y al consiguiente choque osmótico (Delcour, 2009; Nikaido, 2003; Nikaido and Vaara, 1985). Existen varios modelos para explicar cómo se produce la interacción de los péptidos con la membrana y la formación de los poros. Entre estos modelos, destacan los de barril sin fondo, en alfombra y en poro toroidal (Lazarev and Govorun, 2010) (Figura 2).

El modelo de barril sin fondo propone la existencia de una interacción del péptido con la membrana cargada negativamente seguida de una dimerización y polimerización del péptido. El péptido penetraría de forma transversal a la membrana, y la parte más hidrofóbica del péptido quedaría en contacto con la bicapa lipídica mientras que la parte más hidrofílica se orientaría hacia el interior del poro, formando la luz del orificio (Figura 2). La formación de este tipo de poros generaría, finalmente, una pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana. El poro toroidal, por su parte, se formaría de manera similar al barril sin fondo, pero la diferencia más importante sería el tipo de unión del péptido (fijación) a la membrana y la formación de un canal mixto formado por los péptidos y los fosfolípidos. Parece ser que la mayoría de los péptidos, como la melitina o magainina, poseen este segundo mecanismo de acción. Por último, el modelo de alfombra postula que los péptidos cubrirían o tapizarían primero la membrana para posteriormente actuar de manera similar a la de los detergentes, desorganizando por completo las bicapas lipídicas. En este caso, además de los poros, se generarían estructuras micelares recubiertas de péptido que albergarían

fragmentos de membrana en su interior (Figura 2) (Dawson and Liu, 2008; Lazarev and Govorun, 2010).

Además de estos tres modelos, se han postulado otros, como el de electroporación molecular, que propone que los péptidos son capaces de generar un potencial electrostático suficientemente alto para que se formen poros. Sin embargo, este fenómeno sólo parece posible para péptidos con un alto contenido de aminoácidos catiónicos (Chan et al., 2006). Otro modelo que merece la pena mencionar es el llamado de la “balsa hundida” (del inglés *sinking raft*, Figura 2), que postula la formación de poros de carácter temporal que darían lugar a una desorganización transitoria de la membrana y a la entrada de péptidos al interior de la monocapa interna de la membrana (Dawson and Liu, 2008). Aunque es un hecho que la mayoría de péptidos interactúan con la envoltura bacteriana, se ha descrito que estos agentes pueden también unirse a dianas intracelulares aniónicas como el ADN y ciertas proteínas, lo que podría ocasionar la inhibición de procesos metabólicos como la síntesis de ADN o la de proteínas (Lazarev and Govorun, 2010).

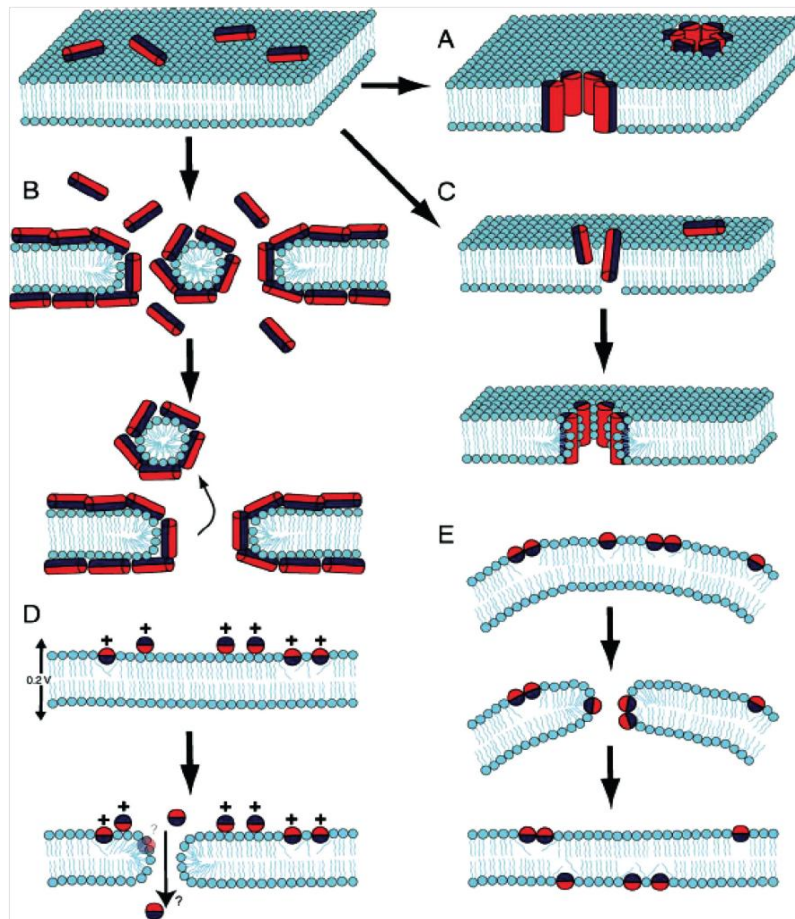


Figura 2.- Modelos de poros formados por los péptidos antimicrobianos en la envoltura bacteriana. A) Barril sin fondo; B) Tipo alfombra; C) Poro toroidal; D) Electroporación molecular; E) Poro de tipo “balsa hundida”. Adaptado de (Dawson and Liu, 2008).

Muchos péptidos antimicrobianos son bactericidas a concentraciones iguales a su concentración mínima inhibitoria, mientras que a concentraciones subinhibitorias, alteran la permeabilidad de la membrana permitiendo que compuestos, que en condiciones normales son incapaces de penetrar al interior de la bacteria, puedan acceder con mayor facilidad (Vaara, 1992). Por otra parte, se ha descrito que algunos péptidos pueden actuar sinérgicamente con antibióticos mediante mecanismos indirectos. Por ejemplo, la permeabilización causada por la lactoferrina bovina puede eliminar el potencial transmembrana necesario para la síntesis de ATP e impedir así el funcionamiento de las bombas de expulsión de antibióticos dependientes de ATP.

Durante la infección, se ha descrito que el sistema inmunitario del huésped es capaz de liberar diferentes isoformas de péptidos estructuralmente similares para aumentar el espectro de acción y lograr un efecto sinérgico (Mangoni and Shai, 2009).

Además, alguno de los péptidos mejor estudiados, como la magainina o la indolicidina, parecen tener diferentes modos de acción, lo que les podría permitir neutralizar con más eficacia los mecanismos de resistencia del patógeno (Peschel and Sahl, 2006).

3.3. Efecto postantibiótico de péptidos antimicrobianos

Aunque hay pocos estudios disponibles, también se ha investigado la existencia de PAE en péptidos antimicrobianos. Así, se ha descrito que algunos péptidos derivados de la lactoferrina bovina podrían tener PAEs menores de una hora frente a algunas cepas de *E. coli* (Haukland and Vorland, 2001). La colistina y su derivado metanosulfonado han mostrado ser capaces de provocar PAEs superiores a una hora frente a aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística (Li et al., 2001). Por otro lado, se ha descrito que exposiciones cortas a péptidos antimicrobianos ricos en los aminoácidos prolina y arginina (PR), como PR-39 y PR-26, a concentraciones superiores a su CMI provocan PAEs de hasta 2 horas en *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium. En estos trabajos, se ha aportado evidencia microscópica de que los péptidos actúan a nivel de la envoltura celular o dificultando la división celular (Shi et al., 1996). Finalmente, se ha demostrado que la melitina puede causar PAEs de entre 1 y 4 horas sobre *Staphylococcus aureus* y *E. coli* (Han et al., 2009).

No existe prácticamente información sobre qué modelo de entre los anteriormente expuestos podría explicar mejor el fenómeno del PAE. Las pocas propuestas realizadas en este sentido se centran en postular fenómenos indirectos que expliquen los PAEs negativos que algunos péptidos causan. En este sentido, se ha propuesto que la unión de los péptidos a los ácidos teicoicos de grampositivos impediría la interacción de éstos con la autolisina, lo que dificultaría la división celular y facilitaría la formación de organismos multicelulares (Haukland and Vorland, 2000). También se ha especulado con la posibilidad de que los péptidos puedan activar a proteasas y, por tanto, aumentar la concentración intracelular de aminoácidos, lo que podría explicar la disminución del tiempo de generación observada en estos casos (Haukland and Vorland, 2001).

3.4. Mecanismos de resistencia a los péptidos antimicrobianos

Como ya se mencionó, las bacterias desarrollan resistencia a los péptidos antimicrobianos con menor frecuencia que a los antibióticos convencionales. Esto ha hecho crecer el interés en el posible empleo de estos compuestos como base para las terapias frente a bacterias multirresistentes. Los mecanismos de resistencia a los péptidos antimicrobianos han sido caracterizados en bacterias gramnegativas, como *E. coli*, *Salmonella entérica* o *Pseudomonas aeruginosa* y en el grampositivo *Staphylococcus aureus*. La resistencia de las bacterias a los péptidos antimicrobianos está determinada por varias propiedades intrínsecas, que incluyen la carga y estructura de los componentes de la envoltura, como el LPS, otros lípidos y los ácidos teicoicos, así como el potencial electroquímico de membrana. Además, también existen mecanismos basados en el transporte, la expulsión y la degradación del péptido (Devine, 2003). Por ejemplo, se ha descrito que *Staphylococcus aureus* puede aumentar su resistencia a los péptidos antimicrobianos sustituyendo aminoácidos cargados negativamente en los ácidos teicoicos por residuos neutros, como la D-alanina (Collins et al., 2002). Este microorganismo también puede modificar su membrana por la vía dependiente de MprF, introduciendo residuos L-lisina, e incrementando así la carga neta positiva (Andra et al., 2011).

En bacterias Gram-negativas, como por ejemplo *Yersinia enterocolitica*, la resistencia a péptidos antimicrobianos se relaciona con la capacidad de modificar el lípido A, sustituyendo parcial o totalmente los grupos fosfato por moléculas con carga positiva, como la 4-arabinosamina. También se ha descrito que este microorganismo puede modificar la producción de proteínas reguladoras de la vía de síntesis del lípido A, provocando un cambio estructural en esta molécula para aumentar la resistencia a la acción bactericida de los péptidos antimicrobianos y/o evitar una respuesta inmunológica (Winfield et al., 2005). Asimismo, se ha descrito que algunas especies de *Salmonella* aumentan el grado de acilación del lípido A o modifican la composición química de sus ácidos grasos para incrementar las interacciones hidrofóbicas y reducir la fluidez de la membrana externa. Se cree que esta modificación retarda o evita la inserción de los péptidos antimicrobianos en la membrana y la formación de poros en ella (Brogden, 2005). En otros organismos se ha descrito la producción de enzimas proteolíticas capaces de degradar los péptidos antimicrobianos; esta actividad se ha

relacionado con la presencia de elastasas, gelatinasas, metaloproteasas, proteasas de cisteína y proteasas de superficie en especies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. (Nizet, 2006).

Otros mecanismos de resistencia se basan en la neutralización de los péptidos antimicrobianos, ya sea por la producción de moléculas de membrana o por la liberación de compuestos que se unen a los péptidos en el medio extracelular. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* produce una proteína llamada estafilocinasa, que es capaz de unirse directamente a las α -defensinas humanas, logrando una inhibición de su efecto bactericida (Jin et al., 2004). Al igual que ocurre con los antibióticos convencionales, existen algunos transportadores transmembrana capaces de bombear los péptidos antimicrobianos al medio extracelular, como las bombas de expulsión MtrC-MtrD-MtrE de *Neisseria meningitidis* (Tzeng et al., 2005) o RosA/RosB en *Yersinia* spp. (Bengoechea and Skurnik, 2000).

Finalmente, parece ser que en algunas bacterias, los polisacáridos de la cápsula limitan la interacción de los péptidos antimicrobianos con la envoltura, un fenómeno que explicaría la mayor sensibilidad de los mutantes sin cápsula de *Klebsiella pneumoniae* a los péptidos antimicrobianos (Campos et al., 2004; Powers and Hancock, 2003). Asimismo, se ha descrito que el alginato de la matriz extracelular de cepas de *P. aeruginosa* formadoras de biofilm incrementa la resistencia de las bacterias a los péptidos antimicrobianos (Chan et al., 2004; Chan et al., 2005).

Como en otros gramnegativos, en *P. aeruginosa*, la detección de péptidos antimicrobianos y la respuesta defensiva frente a ellos es dependiente de la acción de los sistemas de dos componentes. De entre los sistemas de este tipo presentes en *P. aeruginosa* y en otras bacterias gramnegativas (Macfarlane et al., 2000), los mejor caracterizados son los sistemas PhoP-PhoQ, PmrA-PmrB y ParR-ParS. El sistema PhoP-PhoQ controla el operón *arnBCADTEF-pmrE*, que produce modificaciones en el LPS. Este sistema es capaz de introducir el aminoazúcar 4-aminoarabinosa en el lípido A, produciendo así una disminución neta de cargas negativas en el LPS. Además, PhoP-PhoQ responde a niveles bajos de Mg^{2+} y Ca^{2+} , se activa a bajo pH y tiene la capacidad de inducir la expresión de la proteína de membrana externa OprH. Se ha descrito que esta proteína estabiliza la membrana por ocupación de los sitios de unión al Mg^{2+} ,

generando resistencia a PMB (Macfarlane et al., 1999; Skiada et al., 2011), aminoglucósidos y péptidos antimicrobianos.

El segundo sistema de dos componentes implicado en la resistencia a PMB y péptidos antimicrobianos es PmrA-PmrB, que se activa por niveles bajos de Mg^{2+} e induce la modificación del lípido A a través de la activación del operón *arnBCADTEF* (McPhee et al., 2003; Skiada et al., 2011).

Ambos sistemas son independientes y constan de un sensor transmembrana con actividad histidina quinasa (PhoP o PmrB) que transfiere un fosfato a una proteína reguladora citoplasmática (PhoQ o PmrA). Estas proteínas son activadas por fosforilación e inhibidas por desfosforilación. La fosforilación permite la activación de genes que están relacionados con las modificaciones en el LPS y con la resistencia a péptidos antimicrobianos y aminoglucósidos (Figura 3) y otros relacionados con la virulencia (Gooderham et al., 2009). En *P. aeruginosa* los péptidos antimicrobianos son capaces de activar los operones *pmrAB* y *arnBCADTEF* independientemente de los sistemas PhoP-PhoQ y PmrA-PmrB, lo que sugiere que existe algún otro sistema implicado en este proceso (Gooderham et al., 2009; Gooderham and Hancock, 2009; MCPhee et al., 2006).

Recientemente, se ha descrito un tercer sistema en *P. aeruginosa* denominado ParR-ParS (Fernández et al., 2010). Este sistema es activado por concentraciones subinhibitorias de péptidos antimicrobianos y parece ser un punto importante en la modificación del LPS y la resistencia adaptativa. A diferencia de los dos sistemas descritos anteriormente, que requieren una baja concentración de Mg^{2+} para su activación, ParR-ParS es activado directamente por los péptidos antimicrobianos con independencia de los niveles de Mg^{2+} . Este sistema activa el operón *arnBCADTEF* que modifica el LPS a través de la actuación del gen *pmrAB*.

La bomba de expulsión MexXY-OprM, el principal sistema de resistencia adaptativa a aminoglucósidos, parece no estar relacionado con la resistencia a péptidos antimicrobianos. No obstante, se ha observado que la bomba de expulsión MexAB-OprM está sobreexpresada en poblaciones metabólicamente activas de biofilms de *P. aeruginosa*, y este hecho se ha asociado con un fenotipo de tolerancia a las polimixinas (Pamp et al., 2008).

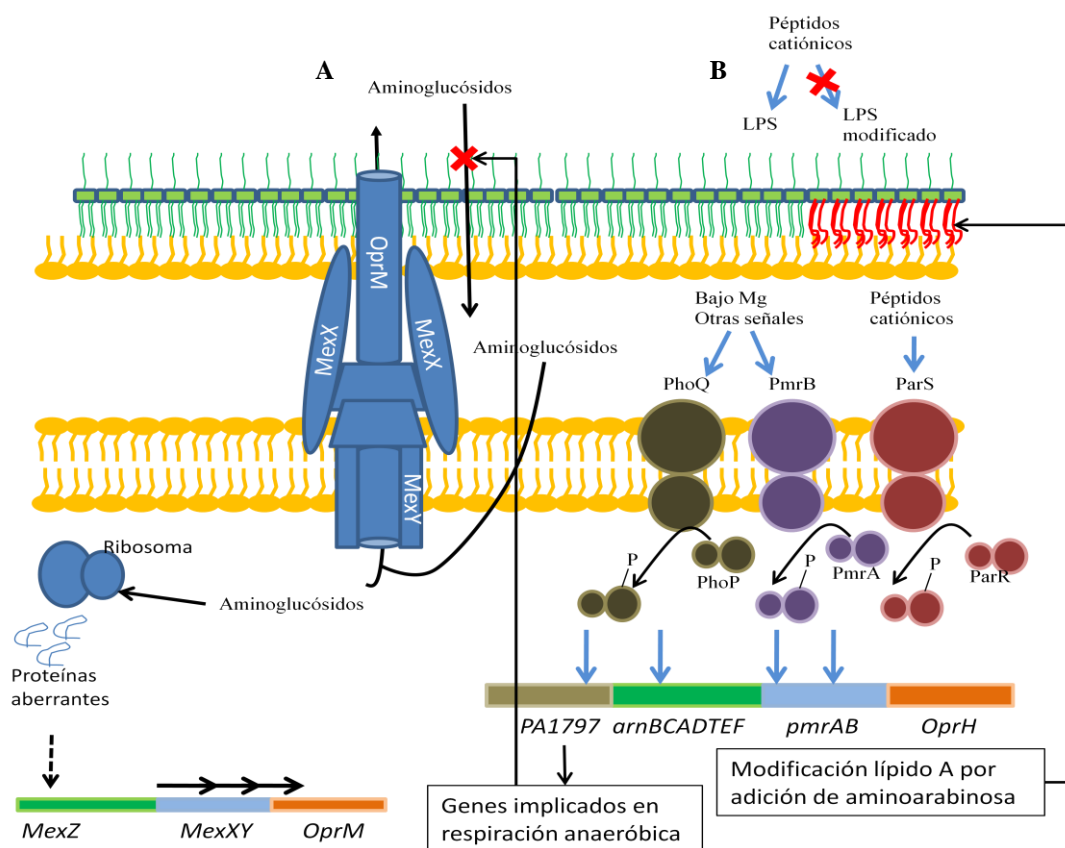


Figura 3.- Ilustración esquemática de los mecanismos involucrados en la resistencia adaptativa a los compuestos antimicrobianos en *P. aeruginosa*. A) La producción de la bomba de expulsión de aminoglucósidos MexXY está regulada por el operón *mexXY*. Este operón se activa por la interacción con polipéptidos aberrantes tras la acción de los aminoglucósidos sobre el ribosoma. Concretamente, estos polipéptidos activan genes que inhiben la expresión de MexZ, represor de MexXY. (B). Los péptidos antimicrobianos activan el sistema ParR–ParS, que a través de *pmrAB* activa el operón *arnBCADTEF*, implicado en la modificación del LPS. El operón *arnBCADTEF* también puede ser activado por los péptidos, bajo condiciones de baja concentración de Mg^{2+} , a través de los sistemas reguladores PhoP–PhoQ y PmrA–PmrB.

3.5. Polimixinas

Las polimixinas son polipéptidos cíclicos de unos 1000 Da que fueron purificados a partir de varias cepas del género *Bacillus* a mediados del siglo pasado. Se han descrito cinco tipos de polimixinas diferentes, polimixina A, B, C, D, E (o colistina), aunque sólo la polimixina B y la colistina se usan en terapia antimicrobiana y tienen aplicaciones clínicas. La estructura de la colistina consiste en un anillo formado por diez aminoácidos, dos D-leucinas, dos L-treoninas y seis residuos de L-ácido diaminobutírico (DAB). Cada residuo DAB posee un grupo amino, lo que supone una carga neta positiva a pH neutro. Además, este anillo está ligado a una cadena lateral constituida por un ácido graso, un componente que facilita la interacción hidrofóbica

con la bicapa lipídica y la inserción en la membrana. La polimixina B tiene la misma estructura que la colistina, pero contiene un residuo D-fenilalanina en lugar de una D-leucina (Falagas and Kasiakou, 2005).

Las polimixinas tienen una rápida acción bactericida sobre una gran variedad de gramnegativos, pero su actividad sobre grampositivos es muy modesta. Se ha descrito que el principal blanco de acción de las polimixinas es el LPS, al cual se unen mediante interacción electrostática e hidrofóbica. Esta unión produce una desorganización y una posterior permeabilización en la membrana externa (Stratton, 1996). La polimixina B, además de ser un potente agente bactericida y permeabilizante, posee gran capacidad antiendotóxica. Esta última actividad es dependiente de la unión del antibiótico al LPS y el consiguiente bloqueo de la interacción entre la endotoxina y los receptores de LPS del huésped (Cooperstock, 1974). Como resultado de la neutralización del LPS en el huésped, las polimixinas inhiben la producción de mediadores celulares y citoquinas proinflamatorias, como el TNF α (Gutsmann et al., 2010). A pesar de tener unas propiedades antibacterianas y antiendotóxicas notables, el problema inherente a este antibiótico es su toxicidad por vía sistémica, siendo los efectos adversos más destacados la nefrotoxicidad y la neurotoxicidad (Landman et al., 2008).

La digestión enzimática con papaína de la PMB permite eliminar el ácido graso de su estructura, generando un compuesto conocido con el nombre de nonapéptido de polimixina B (PMBN). Este compuesto retiene la capacidad permeabilizante de la molécula parental a costa de perder buena parte de su actividad bactericida (Vaara and Viljanen, 1985). El PMBN puede actuar en sinergia con otros antibióticos y ha demostrado ser capaz –combinado con un determinado antibiótico– de sensibilizar tanto *in vitro* como *in vivo* a bacterias que, en ausencia de PMBN, eran resistentes a ese antibiótico (Lam et al., 1986; Ofek et al., 1994; Viljanen and Vaara, 1984).

3.6. Péptidos antimicrobianos y aplicaciones en estudio

Actualmente, existen varios péptidos antimicrobianos con posible aplicación como antibióticos o antiendotóxicos en distintas fases de evaluación clínica (Lazarev and Govorun, 2010). En estudios preclínicos, se ha demostrado que el péptido MBI594AN derivado de la indolicidina posee una notable actividad frente a cepas sensibles y resistentes a los antibióticos de *Propionibacterium acne*. Este péptido ha

superado la fase clínica IIB, en la que 225 pacientes recibieron una administración tópica del péptido diaria durante 6 semanas. El resultado reveló un descenso significativo de la inflamación con respecto al control (Gordon et al., 2005). Por otra parte, en estudios realizados con el péptido K4_S4(1–15), se ha confirmado una excelente actividad frente a *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus paracasei* y *Actinomyces viscosus*, patógenos asociados con la caries y periodontitis (Altman et al., 2006). Además, en pacientes infectados con el virus VIH, se han probado varios péptidos derivados de las histatinas, como el P-113 (Demegen, Pittsburg, PA, Estados Unidos), con resultados prometedores en fase clínica II frente a infecciones producidas por *Candida* spp (Okorochev et al., 2011). Asimismo, se ha demostrado la eficacia de este compuesto en pacientes con mucoviscidosis en infecciones pulmonares causadas por *P. aeruginosa*. Otro péptido que está siendo investigado en ensayos clínicos es la protegrina I, IB-367 Iseganan® (Itrabiotics Pharmaceuticals; Mountain View, CA, Estados Unidos), cuya eficacia ha sido demostrada en pacientes con mucoviscidosis causadas por infecciones pulmonares en estudios de fase I (Cazzola et al., 2003; Toney, 2002). Finalmente, el rBPI₂₁ Neuprex® (Xoma Corporation, Berkeley, CA, Estados Unidos), un derivado de la proteína BPI (*Bactericidal/permeability increasing*) presente en neutrófilos, fue objeto de ensayos de fase I/II destinados a probar su eficacia en la prevención de infecciones tras operaciones de corazón en niños (Mackin, 1998) y meningococemias infantiles (Levin et al., 2000). Actualmente, rBPI₂₁ Neuprex® se encuentra bajo el procedimiento de ensayos clínicos de fase III (Domingues et al., 2009).

4. Lactoferrina

La lactoferrina, también conocida como lactotransferrina, es una glicoproteína globular de 80 kDa perteneciente a la familia de las transferrinas. Este grupo de proteínas muestra una gran afinidad por iones hierro. La lactoferrina fue inicialmente purificada a partir de la leche, pero está presente en otros fluidos corporales como lágrimas, saliva y secreciones bronquiales. Esta proteína es producida por los neutrófilos circulantes y por varios tipos de células, incluyendo algunas células acinares. La región funcionalmente más importante de esta proteína es un péptido de 45 aminoácidos, denominado lactoferricina, que se encuentra en el extremo N-terminal y que se obtiene por hidrólisis ácida. Este péptido retiene la mayoría de las actividades de

la proteína nativa (Gifford et al., 2005) y se ha descrito que la sección que concentra dichas actividades comprende los aminoácidos 20 a 37. Existen dos formas de este péptido, la lactoferricina H (LfcinaH), derivada de la lactoferrina humana, y la lactoferricina B (LfcinaB), su homólogo bovino (Bellamy et al., 1992). En la Figura 4 se representan las estructuras de la lactoferrina y lactoferricina.

Se han identificado varios compuestos derivados de la lactoferricina que poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias, virus, hongos y parásitos (Orsi, 2004), además de actividades inmunomoduladoras y antitumorales (Gifford et al., 2005).

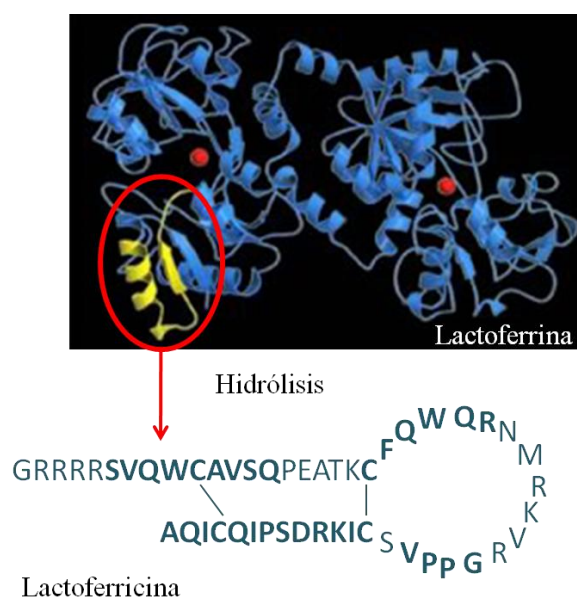


Figura 4. - Estructuras de la lactoferrina y de su derivado, la lactoferricina.

4.1. Actividades antimicrobianas

La actividad bacteriostática de la lactoferrina parece ser debida a su capacidad para secuestrar el hierro del medio. La carencia de hierro dificulta el crecimiento, la actividad metabólica y la liberación de factores de virulencia bacterianos. Los estudios iniciales con lactoferricina demostraron que tanto LfcinH como LfcinB poseen actividad antimicrobiana *in vitro*. No obstante, se observó que la LfcinB tenía capacidad bactericida, mientras que su homólogo humano era bacteriostático frente a un gran número de patógenos grampositivos y gramnegativos. Debido a su marcado carácter catiónico y a su anfipaticidad, la lactoferricina tiene capacidad para unirse al LPS de la

envoltura de las bacterias gramnegativas y a los ácidos teicoicos de las grampositivas. Como resultado de esta interacción se produce una alteración y desorganización de la envoltura bacteriana. También se ha descrito que la lactoferricina puede translocarse al interior de la bacteria e inhibir la síntesis de ADN, ARN o proteínas (Ulvatne et al., 2004). Además de esta capacidad antibacteriana, se ha descrito que la lactoferricina puede tener las siguientes actividades adicionales: inhibición del crecimiento y adhesión de *Helicobacter pylori* (Dial et al., 1998), atenuación de la patogenicidad de *Haemophilus influenzae in vitro*, inhibición de la invasión intracelular de *E. coli* (Ochoa et al., 2006), *Listeria monocytogenes* (Moriishi et al., 1999) y *Shigella flexneri* (Ochoa and Cleary, 2009), amplificación de las señales apoptóticas de *L. monocytogenes*, inhibición del crecimiento de hongos filamentosos, mohos y levaduras, como *Candida albicans* y dermatofitos, activación de la producción de radicales libres del oxígeno, como el ión superóxido, y óxido nítrico (NO), en polimorfonucleares en contacto con *Candida* spp., actividad antiparasitaria frente a patógenos como *Entamoeba histolytica* (González-Chavez et al., 2009) o *Toxoplasma gondii* mediante la unión a superficie de los taquizoítos, inhibición de la multiplicación de numerosos virus como adenovirus y enterovirus (Seganti et al., 2004), Herpes simplex 1 y 2 (Hasegawa et al., 1994; Siciliano et al., 1999), citomegalovirus (Beljaars et al., 2004) y virus del VIH (Viani et al., 1999). Por último, se ha descrito que la lactoferrina es capaz de estimular la motilidad e inhibir la formación de biofilm de *P. aeruginosa* (Singh, 2004), aunque no se conoce el mecanismo que origina dichos fenómenos.

4.2. Actividades no antimicrobianas

A pesar de que la relevancia fisiológica de estas actividades no está bien definida, se ha descrito que tanto la lactoferrina como la lactoferricina poseen capacidad antitumoral en líneas celulares de leucemia, fibrosarcoma, melanoma y carcinoma de colon (Eliassen et al., 2002). Parece ser que esta actividad no afecta ni a fibroblastos ni a eritrocitos sanos presentes en las muestras. El mecanismo de acción antitumoral parece comprender interacciones con la membrana de las células tumorales seguido de la activación de la apoptosis. Por otra parte, la lactoferrina y la lactoferricina parecen tener un papel inmunomodulador, pues estos compuestos son capaces de reducir las respuestas inflamatorias excesivas mediante una inhibición de la vía clásica del complemento (Samuelsen et al., 2004). En relación con este papel inmunomodulador, se

ha descrito que estos dos compuestos tienen afinidad por el LPS y capacidad antiendotóxica. Asimismo, la capacidad de la lactoferrina y la lactoferricina para formar combinaciones sinérgicas con lisozima y anticuerpos (Orsi, 2004) o antibióticos, antivirales y antifúngicos, parece indicar que posee cierta capacidad permeabilizante de membranas (Vorland et al., 1999a). Finalmente, en algunos ensayos, la lactoferrina parece poseer cierta actividad enzimática amilasa, DNAsa, RNAsa y ATPasa, aunque estas actividades parecen depender de la estructura que adopte la proteína en determinadas condiciones fisicoquímicas (González-Chavez et al., 2009).

Actualmente, existe una investigación muy activa que persigue desarrollar compuestos sintéticos derivados de diferentes regiones de la lactoferrina. Estas investigaciones incluyen el desarrollo de péptidos derivados de la lactoferrina humana con actividad bactericida (Adao et al., 2011; Zweytick et al., 2011) y con capacidad potenciadora de la actividad antibiótica (Sánchez-Gómez et al., 2011). Otros autores se centran en el desarrollo de péptidos antivirales derivados de la lactoferrina (Abe et al., 2007), así como en terapias experimentales que hacen uso de la capacidad antiendotóxica de esta molécula (Chapple et al., 2004; Zhang et al., 1999a).

4.3. Estructura y mecanismo de acción de la lactoferricina y péptidos derivados

Como se ha explicado anteriormente, la digestión de la lactoferrina humana produce una molécula denominada lactoferricina H. Esta molécula contiene una región que forma una α -hélice anfipática (residuos 21-31; FQWQRNMRKVR), denominada “péptido LF11” y diferente del dominio de unión al hierro (residuos 28-34). Se ha descrito que la lactoferricina humana adopta una conformación en forma de horquilla (del inglés *β -hairpin*) debido a un puente disulfuro formado por dos cisteínas (Figura 4) (Hwang et al., 1998). Parece ser que la región del péptido LF11 es la responsable de la actividad antimicrobiana de la lactoferricina frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, así como de su capacidad de unión al LPS. Se han realizado varios estudios para investigar la estructura tridimensional y el mecanismo de acción de LF11, como el realizado por Japelj y colaboradores mediante resonancia magnética nuclear (NMR) en diferentes ambientes anfífilos (LPS, micelas de docecilsulfato sódico

(SDS) que simulan membranas bacterianas, o micelas de dodecilsulfocolina (DPC) de tipo *zwitterionico* para imitar las membranas eucariotas) (Japelj et al., 2005).

Por otra parte, también se ha investigado la estructura y el mecanismo de acción de compuestos derivados de LF11, como el péptido P2-33 (Zorko et al., 2009). Para desarrollar este péptido, estos investigadores eliminaron los aminoácidos de la molécula parental LF11 que no contribuían directamente a la unión al LPS y los sustituyeron por otros residuos con el fin de potenciar su actividad antimicrobiana y su capacidad neutralizante de LPS. El compuesto derivado de esta serie de cambios, el péptido P2-33 (denominado como “PFR” en el trabajo citado), posee la siguiente secuencia de aminoácidos: PFWRIRIRR. La estructura de este péptido asociado a micelas de SDS se caracteriza por la presencia de una α -hélice entre los residuos W3 y R6 (Figura 5-A). Sin embargo, esta α -hélice se sitúa entre los residuos F2 e I5 (Figura 5-B) cuando el péptido se asocia a micelas de DPC. La principal diferencia entre ambas estructuras radica en la zona hidrofóbica del extremo N-terminal, que adopta una estructura más compacta en micelas de DPC que en micelas de SDS. Zorko y colaboradores sugieren que estas diferencias podrían explicar la especificidad de P2-33 por membranas de procariontas, pues en éstas el péptido presentaría una estructura más extendida que sería responsable de la permeabilización de estas membranas.

En contraste con los péptidos clásicos que adoptan una estructura de α -hélice como la magainina (Tossi et al., 2000), el momento anfipático de P2-33 está situado a lo largo del eje de la hélice, y no perpendicular a éste. Parece ser que esta propiedad es una característica de los péptidos de menor tamaño. Según Zorko y colaboradores, este hecho hace que, cuando interactúa con la membrana bacteriana, el péptido adopte una orientación perpendicular a la bicapa lipídica, lo que parece facilitar su inserción en ella (Figura 5-C; izquierda) (Zorko et al., 2009). Además, en este mismo estudio, se evaluó la interacción de P2-33 con membranas miméticas de diferente composición, concluyendo que este péptido tiene mayor afinidad por membranas con carga negativa (fosfatidilglicerol (POPG)) que por las neutras (fosfatidilcolina (POPC)) (Zorko et al., 2009).

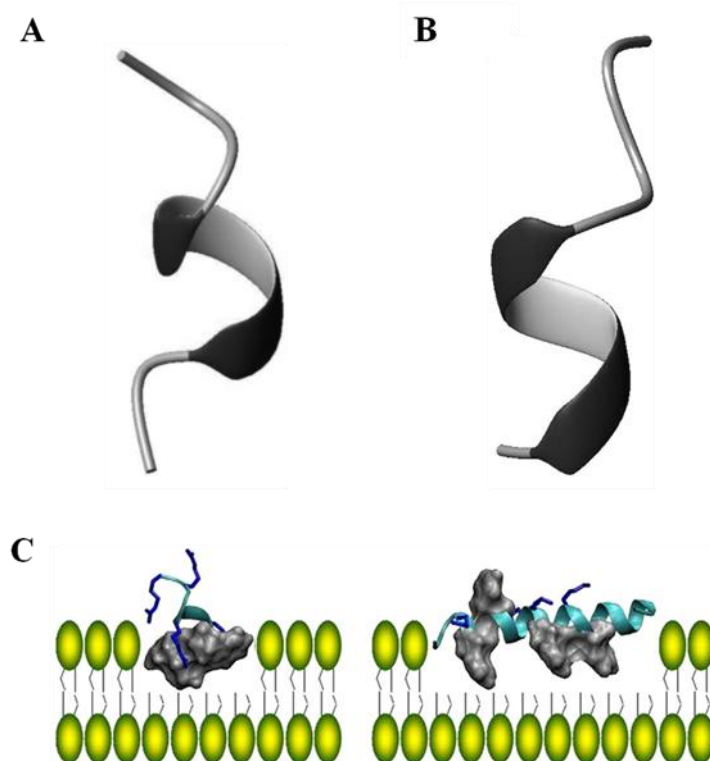


Figura 5.- Conformación en forma de “columna” (*backbone*) del péptido P2-33 formando complejo con SDS (A) o DPC (B); C: Representación esquemática de la orientación de P2-33 (izquierda) y un péptido con una conformación en α -hélice clásica (magainina, derecha) insertados en la membrana. Las cadenas laterales de los residuos catiónicos se representan como bastones de color azul y la superficie de color gris representa los residuos hidrofóbicos. Imagen adaptada de (Zorko et al., 2009).

5. Análisis cuantitativo de relaciones estructura actividad (QSAR)

La mayoría de péptidos antimicrobianos naturales han sido modificados con el fin de obtener moléculas con características biológicas mejoradas. La optimización de secuencias busca, por un lado, aumentar la actividad de la molécula parental y por otro reducir aquellos factores que podrían limitar el uso terapéutico del compuesto que se quiere desarrollar. Entre estos últimos, la toxicidad sobre células eucariotas, o la inestabilidad en medios fisiológicos ocupan un lugar destacado. Una estrategia para desarrollar péptidos con propiedades nuevas se basa en la generación de un elevado número de secuencias de manera aleatoria seguido de un cribado para seleccionar los mejores compuestos (Chen et al., 2000). Alternativamente, sobre todo en la última década se están instaurando estrategias basadas en el diseño racional mediante análisis cuantitativo de estructura-actividad (*Quantitative Analysis Structure-Activity Relationships*; QSAR). Estos análisis son posibles gracias a potentes ordenadores que

analizan las miles o millones de posibles secuencias y predicen la actividad de cada una de ellas en función de descriptores fisicoquímicos previamente establecidos. Lo ideal es que estos descriptores sean calculados a partir de modelos tridimensionales, como por ejemplo los estudios de resonancia magnética nuclear, pero en muchos casos se utiliza una modelización homóloga debido al escaso número de estructuras tridimensionales disponibles.

Los análisis QSAR emplean diferentes metodologías basadas en la construcción de modelos matemáticos que incluyen redes artificiales, métodos PLS (*Partial Least Square*), análisis kNN (*k-nearest neighbor*) y regresión lineal múltiple. La fiabilidad de esta estrategia está avalada por numerosos estudios (Cherkasov et al., 2009; Fjell et al., 2009; Frecer et al., 2004; Karakoc et al., 2006). Las actividades que pueden mejorarse mediante esta estrategia son, por ejemplo, la capacidad bactericida y la capacidad permeabilizante. Para ello, estos estudios deben tener en consideración los parámetros que gobiernan la interacción de los péptidos con la envoltura bacteriana incluyendo i) la carga positiva que permite la unión a superficies aniónicas de la envoltura bacteriana, ii) la anfipaticidad, implicada en la agregación de los péptidos sobre la superficie bacteriana y iii) la lipofilidad, que influye en la capacidad de difusión al interior de la membrana.

El análisis QSAR ofrece resultados que ayudan a dirigir la optimización de la secuencia en estudio. Por ejemplo, se ha descrito que la estabilidad y la actividad de la taquipesina I es dependiente de puentes disulfuro, puesto que la reducción de dichos puentes da lugar a moléculas que carecen de actividad antimicrobiana y antiviral. Otros estudios realizados sobre la magainina 2 revelan que los primeros tres aminoácidos no juegan un papel importante en la actividad antimicrobiana, pero la eliminación del residuo número 4 (lisina) reduce significativamente la actividad. Asimismo, la eliminación de los residuos 5 y 6 (fenilalanina y leucina) de este péptido provoca la pérdida total de la actividad antimicrobiana (Zasloff et al., 1988). Otro estudio sobre la magainina 2 demostró que el incremento de 5+ cargas positivas en la secuencia se corresponde con un aumento de la actividad antimicrobiana (Dathe et al., 2001).

La lactoferrina humana también ha sido objeto de estudio mediante este tipo de análisis (Haug and Svendsen, 2001; Sánchez-Gómez et al., 2011; Strom et al., 2002). Concretamente, nuestro grupo de investigación demostró la utilidad del análisis QSAR

como herramienta para la síntesis de secuencias derivadas de este péptido con actividad bactericida y permeabilizante mejorada. Así, la actividad bactericida se vio notablemente incrementada al aumentar la cantidad de residuos hidrofóbicos, confirmándose los resultados que obtuvieron otros autores (Eliassen et al., 2003; Haug and Svendsen, 2001). En cambio, la excesiva concentración de aminoácidos básicos y la longitud de la secuencia provocaron la disminución de la actividad antibacteriana. Asimismo, la actividad permeabilizante de los péptidos pudo mejorarse aumentando el número de residuos aromáticos de la secuencia o disminuyendo la densidad de residuos cargados positivamente (Sánchez-Gómez et al., 2011). Mediante esta estrategia se realizaron dos ciclos de optimización que produjeron compuestos mejorados con respecto a la generación anterior.

Para los estudios de la estructura de los péptidos se suelen emplear los siguientes parámetros: i) Momento hidrofóbico: medida cuantitativa de la anfipaticidad del péptido o suma vectorial de la hidrofobicidad de cada aminoácido; ii) Hidrofobicidad: capacidad del péptido para moverse de la fase acuosa a la lipídica; iii) Helicidad (*helicity*): estructura secundaria que contiene los residuos polares alineados longitudinalmente en un lado del péptido y los residuos hidrofóbicos alineados en el lado opuesto. Esta estructura permite una interacción óptima entre los péptidos y las secciones anfifílicas de las membranas biológicas; iv) ángulo hidrofílico/hidrofóbico: ángulos formados por la cara polar o hidrofóbica de la hélice respecto al eje longitudinal; v) carga: medida cuantitativa de la carga neta positiva basada en el número de aminoácidos con carga positiva presentes en la secuencia.

En este trabajo se estudiarán nuevos descriptores de péptidos antimicrobianos y se utilizará el análisis QSAR para predecir la actividad permeabilizante de nuevas generaciones de derivados de la lactoferricina humana. De esta manera se pretenden sintetizar péptidos optimizados en su capacidad para actuar en sinergia con antibióticos frente a *P. aeruginosa* multiresistente. Además, en el presente trabajo se investigará el efecto postantibiótico de los péptidos catiónicos y se evaluará la potenciación de esta propiedad mediante el uso de terapias combinadas con antibióticos convencionales.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dado que:

- ciertos péptidos catiónicos derivados de la lactoferrina humana permeabilizan la membrana externa de *P. aeruginosa* y potencian la acción de antibióticos convencionales

- si bien muchos estudios han profundizado en las bases estructurales que gobiernan la actividad bactericida de los péptidos antimicrobianos, no existe información sobre qué parámetros influyen en la capacidad permeabilizante de estos compuestos

- se ha descrito que algunos péptidos derivados de la lactoferrina poseen efecto post-antibiótico sobre gramnegativos

nuestra hipótesis de trabajo es que un estudio de relación estructura-actividad de los péptidos actualmente disponibles podría proporcionar información sobre las propiedades que debe tener un péptido para permeabilizar la envoltura de una bacteria gramnegativa, como *P. aeruginosa*. Estos estudios podrían permitir el diseño de compuestos con una capacidad permeabilizante mejorada. Estos nuevos permeabilizantes podrían usarse en combinación con antibióticos para neutralizar los mecanismos de resistencia a antibióticos basados en la impermeabilidad de la membrana externa y quizás en la posesión de bombas de expulsión activa. Además, dado que los péptidos se derivan de proteínas con conocida capacidad de interacción con el LPS bacteriano, se espera que esta terapia combinada sea capaz de inhibir o al menos atenuar el choque endotóxico. De esta manera, se pretenden desarrollar tratamientos antimicrobianos y antiendotóxicos frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Por otra parte, debido a que el efecto postantibiótico es un parámetro con una gran relevancia clínica, sería importante investigar si los péptidos poseen esta propiedad y si la presencia simultánea de los antibióticos en las terapias combinadas podría potenciar el efecto post-antibiótico de los péptidos. Si esto fuese así, se podrían reducir las dosis necesarias de la terapia combinada sin afectar a la eficacia del tratamiento.

Para la realización de este estudio, se establecieron los siguientes objetivos:

1. Desarrollar un modelo cuantitativo que relacione la estructura química con la actividad permeabilizante de los péptidos disponibles actualmente y diseñar una nueva generación de péptidos con capacidad permeabilizante mejorada.
2. Determinar la actividad permeabilizante y antimicrobiana de los nuevos péptidos frente a *P. aeruginosa* y caracterizar su espectro de acción frente a otras especies bacterianas.
3. Caracterizar la capacidad neutralizante de endotoxina de los nuevos péptidos y estudiar posibles asociaciones entre parámetros con interés terapéutico.
4. Determinar la toxicidad y actividad hemolítica de los nuevos péptidos.
5. Estudiar las relaciones estructura-actividad y establecer las bases estructurales que determinan la actividad permeabilizante de péptidos catiónicos sobre *P. aeruginosa*.
6. Seleccionar los mejores péptidos permeabilizantes y evaluar su capacidad para potenciar antibióticos *in vitro* y en un modelo animal de sepsis por *P. aeruginosa*.
7. Determinar si los péptidos pueden producir efecto postantibiótico y si la presencia simultánea de antibióticos en las terapias combinadas puede potenciar el efecto post-antibiótico de los péptidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento

Las cepas utilizadas se muestran en la Tabla 5. Las bacterias se cultivaron en el medio *Trypcase Soy Broth* (TSB; BioMerieux, Mercy l'Etoile, Francia) sin suplementar o suplementado con 16 g/L de agar bacteriológico (Pronadisa, Alcobendas-Madrid, España) a 37 °C. Para las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos y ensayos de efecto postantibiótico se utilizó el medio de cultivo Müller-Hinton con cationes ajustados (20-25 mg/L Ca²⁺ y 10-12,5 mg/L de Mg²⁺) (MHA; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, Estados Unidos) o sin ajustar para algunos experimentos de potenciación de antibióticos (MHNA; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, Estados Unidos). Los cultivos líquidos, cuando fue necesario, se agitaron a 135 rpm en un agitador orbital. Las cepas se conservaron a -80 °C en viales de leche descremada estéril.

Tabla 5.- Cepas utilizadas.

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	tipo salvaje	CECT ¹ 4122
ATCC 27853	cepa control de calidad de antibióticos	ATCC ²
4158-02 Ps4	aislamiento clínico	CUN ³ (Sánchez-Gómez et al., 2011)
LC1-6	mutante derivado de PAO1 que sobreexpresa la bomba MexAB/OprM	(Conejo et al., 2003)
PAΔAD	mutante derivado de PAO1 con mutación en <i>ampD</i>	(Moyá et al., 2009)
PAΔDDh2Dh3	mutante derivado de PAO1 con triple mutación en <i>ampD</i> (<i>ampD-ampDh2-ampDh3</i>)	(Moyá et al., 2009)
Otras		
<i>E. coli</i> 25922	cepa control de calidad de antibióticos	ATCC
<i>S. aureus</i> 25923	cepa control de calidad de antibióticos	ATCC
<i>B. bronchiseptica</i> 11844-99	aislamiento clínico	CUN

1: Colección Española de Cultivos Tipo. 2: American Type Culture Collection. 3: Clínica Universidad de Navarra.

2. Péptidos

Los péptidos (7-14 aminoácidos) utilizados fueron suministrados por NEO *Multiple Peptide System* (NEOMPS; San Diego, Estados Unidos) y *PolyPeptide Laboratories* (Estrasburgo, Francia). En todos los casos, los péptidos se sintetizaron

mediante el método de amidación del carboxilo terminal en fase sólida usando 9-fluorinylmethyloxycarbonil (Fmoc) y se purificaron mediante HR-HPLC. Las secuencias de los péptidos se muestran en el anexo 1. Los péptidos se resuspendieron en agua ultrapura estéril a una concentración de 10 mg/mL y se conservaron a -20 °C. Como péptidos modelo de actividad bactericida y permeabilizante, se emplearon, respectivamente, polimixina B (PMB; Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, Estados Unidos) y su derivado no acilado polimixina B nonapéptido (PMBN; Sigma-Aldrich).

3. Antibióticos

Las soluciones antibióticas se prepararon teniendo en cuenta su potencia y se diluyeron, según las recomendaciones del fabricante, a una concentración de entre 100 y 200 veces su concentración de trabajo. Se comprobó la actividad de todos los antibióticos utilizados mediante controles de calidad empleando las cepas de la Colección Americana de Cepas Tipo (ATCC) recomendadas. Para ello, se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI; apartado 4a) de cada antibiótico y se comparó con los rangos establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI; anteriormente denominado National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2003). Se emplearon los siguientes antibióticos: novobiocina, eritromicina, azitromicina, doxiciclina, fosfomicina, ceftazidima, cefotaxima e imipenem (Sigma-Aldrich), Zithromax® i.v. solución inyectable (Pfizer Corporation; Viena, Austria)

4. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana

a) Determinación cuantitativa: técnica de microdilución en caldo

Para cuantificar la capacidad antimicrobiana de los péptidos sobre las cepas en estudio, se determinó la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los compuestos, según los protocolos descritos por el CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standard 2006) y siguiendo el método de Sánchez-Gómez y colaboradores (Sánchez-Gómez et al., 2008). Para ello, sobre placas de microtitulación con fondo en 'U' (TPP, Trasadingen, Suiza) se dispensaron concentraciones decrecientes del antimicrobiano en progresión aritmética de base 2 en medio MH. El rango de concentraciones empleado fue 1-512 µg/mL en un volumen de 100 µL.

El inóculo bacteriano se preparó por el método directo de suspensión de colonias. Para ello, a partir de una placa de TSA cultivada durante 18 horas, se tomaron varias colonias y se resuspendieron en una solución salina (NaCl 0,9 %) estéril hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 0,04 (equivalente a 5×10^7 ufc/mL, aproximadamente). Esta suspensión bacteriana se diluyó 1:100 en MH y se añadieron 100 μ L a cada uno de los pocillos. Por lo tanto, el número de ufc final en cada uno de los pocillos fue de entre 10^4 y 10^5 . Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37 °C y posteriormente se procedió a realizar la lectura de los resultados.

Se define CMI como la concentración mínima de antimicrobiano capaz de inhibir visualmente el crecimiento bacteriano; y CMB como la concentración mínima de antimicrobiano capaz de eliminar la viabilidad del 99,9 % (3 log) del inóculo original. La CMI se detectó visualmente, seleccionando el primer pocillo con ausencia total de turbidez o botón celular. Posteriormente, los pocillos sin crecimiento bacteriano se agitaron y se sembró una alícuota en placas de MH. Este procedimiento se realizó por duplicado. Tras incubar las placas 24 horas a 37 °C se procedió a realizar el recuento de colonias y se determinó la CMB.

b) Turbidimetría: Bioscreen C

La concentración mínima de antimicrobiano que no produce retraso en el crecimiento normal de un microorganismo (apartado 7, PAEP) se determinó empleando el equipo semiautomático Bioscreen C (Labsystems Laboratories, Helsinki, Finlandia), que mide la turbidez de un cultivo bacteriano a intervalos periódicos. El inóculo se preparó de manera idéntica a la de los anteriores métodos de sensibilidad, y las diluciones seriadas del antimicrobiano se realizaron en las placas de poliestireno de 100 pocillos suministradas por el fabricante (*Labsystems Honeycomb*, Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia). Los ensayos de susceptibilidad se realizaron a 37 °C durante 24 horas con agitación intermedia y partiendo de un inóculo idéntico al de los experimentos anteriores. Las absorbancias se midieron a 600 nm cada 15 minutos, y las curvas de crecimiento bacteriano se representaron gráficamente. Para los experimentos posteriores, se seleccionó aquella concentración de antibiótico que, a la vista de la curva de crecimiento del microorganismo en ausencia del antimicrobiano, no causaba una disminución apreciable en la velocidad de crecimiento.

5. Estudios de sinergia

a) Método cualitativo: checkerboard test

Para determinar la existencia de actividad sinérgica entre dos compuestos antimicrobianos, se empleó la técnica del tablero (*checkerboard test*, (Eliopoulos and Moellering, Jr., 2011)). Este ensayo se realizó en placas de microtitulación con fondo en 'U' (TPP) combinando varias concentraciones de antibiótico y péptido en medio MH. Horizontalmente, se realizaron diluciones dobles seriadas del antibiótico seleccionado (novobiocina) en un rango de concentraciones 1-512 $\mu\text{g/mL}$, mientras que, verticalmente, se dispusieron las diluciones seriadas del péptido en un rango de 1,56-50 $\mu\text{g/mL}$. El inóculo bacteriano se preparó de manera idéntica a los ensayos de actividad antibacteriana (apartado 4a). Para poder cuantificar la actividad sinérgica de los péptidos se calcularon los siguientes parámetros:

- Índice de concentración mínima fraccionada (CIF)

Este índice relaciona las CMI del péptido y la novobiocina por separado y en combinación, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CIF} = \frac{\text{CMI}_{\text{nov+pép}}}{\text{CMI}_{\text{nov}}} + \frac{\text{CMI}_{\text{nov+pép}}}{\text{CMI}_{\text{pép}}}$$

Cuando el inóculo no era inhibido ni siquiera por la concentración de antimicrobiano más alta de entre las disponibles, se tomó como valor para el cálculo de CIF la dilución inmediatamente superior a la más alta. Siguiendo las recomendaciones del protocolo descrito por la mayoría de los autores, los resultados de estos ensayos se interpretaron de acuerdo con los siguientes criterios: efecto sinérgico, $\text{CIF} \leq 0,5$; efecto aditivo o indiferencia $0,5 < \text{CIF} < 2$; efecto antagonista $\text{CIF} > 2$

- Cociente de CMI (CCMI)

Este cociente mide el número de veces que disminuye la CMI de la novobiocina cuando se combina con el correspondiente péptido:

$$\text{CCMI} = \frac{\text{CMI}_{\text{Nov sola}}}{\text{CMI}_{\text{Nov en presencia de pép}}}$$

Las combinaciones con valor de CCMI ≥ 4 se consideraron sinérgicas, de acuerdo con el criterio descrito anteriormente por la mayoría de autores.

b) Método cuantitativo: curvas de letalidad

El inóculo bacteriano se preparó a partir de una placa fresca cultivada durante 18-24 horas. Una colonia procedente de esta placa se inoculó en un matraz que contenía 10 mL de TSB y el matraz se incubó durante una noche a 37 °C en agitación orbital. Al día siguiente, se empleó inóculo procedente de este caldo para iniciar un cultivo en un matraz que contenía 10 mL con medio MHA. El matraz se incubó en las condiciones descritas anteriormente durante 2-3 horas, hasta que el cultivo alcanzó la fase de crecimiento logarítmico. A partir de este último cultivo, se preparó una suspensión bacteriana que se ajustó a una D.O₆₀₀ de 0,085 (equivalente a 10⁸ ufc/mL, aproximadamente).

Para el cálculo de la actividad sinérgica péptido-antibiótico, se emplearon tubos de vidrio de 20 mL con 10 mL de MHA, a los que se añadieron combinaciones del péptido seleccionado y novobiocina, ambos a concentración subinhibitoria. Simultáneamente, se dispusieron tubos control sin antimicrobiano alguno, o con antibiótico o péptido solo. A cada uno de los tubos se añadieron 50 μ L del inóculo ajustado y los tubos se incubaron a 37 °C con agitación orbital durante 24 horas. Para el recuento de viables, se tomaron muestras a los tiempos 0, 3, 6, 8 y 24 horas del comienzo de la incubación, se realizaron diluciones y una alícuota de éstas se sembró sobre placas de TSA por duplicado. Tras incubar las placas a 37 °C durante 18-24 horas se procedió a realizar el recuento de viables. Para evaluar la existencia de sinergia, se comparó el efecto de la combinación con el del antimicrobiano más activo por sí solo. De acuerdo con el criterio de Eliopoulos y Moellering (Eliopoulos and Moellering, Jr., 2011), la existencia de sinergia, antagonismo y aditividad en una combinación péptido-antibiótico tras 24 horas de incubación se definió de la siguiente manera: 1, sinergia: una disminución en la población bacteriana ≥ 100 veces (2 log); 2, antagonismo: una reducción de la muerte bacteriana de ≥ 100 veces; 3, aditividad o indiferencia: un cambio de menos de 10 veces en la población. En todos ellos se comparó la combinación con el antimicrobiano más activo en solitario. Además, se interpretaron los resultados de la actividad bactericida temprana (a las 6 horas) de las combinaciones, siguiendo los mismos criterios descritos anteriormente.

6. Modelo murino de sepsis

Para el modelo murino de sepsis se emplearon ratones hembras Balb/C de 8 semanas de edad con 18-20 g suministrados por Harlan (Harlan Interfauna Ibérica S.A. Barcelona, España). Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales (n=8) y se realizó una cuarentena de 5-7 días antes de la manipulación. Se empleó un diseño de inmunodepresión que consistió en la administración de tres inyecciones subcutáneas de ciclofosfamida los días -5 (150 mg/kg), -3 (100 mg/kg) y -1 (100 mg/kg). En experimentos previos se comprobó que este tratamiento indujo una neutropenia severa (una reducción del 90 % tanto de la línea leucocitaria total como de neutrófilos) en los animales el día posterior a la última administración del inmunodepresor. Para el recuento de leucocitos totales y neutrófilos, y por lo tanto, la confirmación de la neutropenia, los ratones fueron anestesiados con una solución de ketamina (Imalgene 1000, Merial, Barcelona, España) y Xilacina (Rompún 2%, Bayer, Barcelona, España) diluido en suero salino apirógeno estéril (1,5 : 0,5 : 3,0) por vía intraperitoneal. Se extrajo la sangre mediante el procedimiento de exanguinación por punción cardíaca con una jeringa de 1 mL y una aguja de grosor 23-G, y finalmente se sacrificó a todos los animales por dislocación cervical. El recuento de neutrófilos fue realizado por el Departamento de Toxicología de la Universidad de Navarra.

El inóculo de *P. aeruginosa* 4158 Ps4 consistió en 10^6 ufc/ratón, la cual fue determinada en experimentos de dosis letal (DL_{100}) en 24-48 h realizados previamente. La infección de *P. aeruginosa* 4158 Ps4 se realizó por vía intraperitoneal, así como la posterior administración del tratamiento en estudio. Se monitorizó la bacteriemia mediante hemocultivos de muestras de sangre tomadas de la arteria submaxilar a varios tiempos tras la infección. Ésta fue detectada a partir de las 6-8 horas y por ello se decidió administrar el tratamiento una hora después (primera dosis) y 6 horas después (segunda dosis) de la inoculación de *P. aeruginosa*. El tratamiento consistió en dos dosis de péptido de 10 mg/kg cada una y una única dosis de azitromicina (Zitromax®, Pfizer, Viena, Austria) de 25 mg/kg.

Por otra parte, se extrajo sangre a los animales (n=4 de cada grupo experimental) de la arteria submaxilar 1,5 horas después de la infección para la cuantificación de $TNF\alpha$, que se realizó mediante un ELISA *sandwich* (Mouse Kit $TNF\alpha$ immunoassay, Quantikine, R&D systems, Minneapolis, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones

del fabricante. Además, 7,5 horas después de la infección se volvió a extraer sangre (n=4 de cada grupo experimental) para la cuantificación de la bacteriemia. Para ello, se sembraron 20 μ L de sangre por duplicado justamente después de su obtención en placas de TSA y se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas. Al día siguiente, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias.

En cada experimento independiente, los resultados de mortalidad se analizaron de manera conjunta en todos los tiempos mediante análisis de supervivencia de Kaplan-Meyer (SPSS v15). Cuando las rectas de supervivencia fueron paralelas los datos se compararon mediante el test Log-Rank, mientras que para las rectas que se entrecruzaban se empleó el test de Breslow-Gehan-Wilcoxon. Los valores de *P* se obtuvieron siempre comparando los datos de mortalidad del mismo experimento (mortalidad en grupos tratados vs. no tratados).

Todos los protocolos con animales usados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Navarra (número de protocolo 069/09).

7. Efecto postantibiótico (*Post-antibiotic Effect*) (PAE)

El efecto postantibiótico (PAE) se definió como la capacidad de algunos antimicrobianos para producir un retraso en el crecimiento normal de un microorganismo tras una corta exposición al mismo (McDonald et al., 1977). El PAE se determinó siguiendo dos métodos diferentes (Craig and Gudmundsson, 1996): recuento de viables y análisis de turbidez mediante Bioscreen C. Ambos métodos comparten la fase inicial de preparación del cultivo bacteriano y tratamiento.

Una colonia de *Pseudomonas aeruginosa* 4158 Ps4 obtenida a partir de un cultivo fresco en TSA se inoculó en 10 mL de MH y el caldo se incubó en agitación a 37 °C hasta alcanzar una D.O₅₈₀ de 0,2-0,3 (equivalente a 10⁸ ufc/mL, aproximadamente). Esta suspensión bacteriana se diluyó 10 veces en MH y 1 mL de la suspensión se mezcló con el péptido P4-9 o el antibiótico en un tubo tipo eppendorf, obteniéndose una concentración final de 32 μ g/mL del péptido (dos veces su CMI). Los tubos se incubaron en un agitador giratorio durante 1 hora a 37° C. Tras la incubación, el péptido se eliminó mediante tres lavados por centrifugación (1500 x g; 15 minutos; rotor SX4750), seguida de decantación del 90 % del sobrenadante y de adición de MH fresco

previamente atemperado a 37 °C. Como control para el cálculo del PAE, un duplicado de la suspensión de partida no tratado con péptido fue sometido a una sucesión idéntica de procedimientos. Tras los lavados, se obtuvieron dos cultivos bacterianos de 1 mL, tratado y no tratado con el péptido, que fueron procesados de una de las dos maneras siguientes:

a) Método de recuento de viables

Ambos cultivos bacterianos se incubaron a 37 °C en un agitador orbital durante 24 horas y la cinética de crecimiento se determinó mediante recuento de viables. Concretamente, se recogieron muestras a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 horas del comienzo de la incubación, se realizaron diluciones y una alícuota de éstas se sembró en placas de TSA. Tras 18-24 horas de incubación a 37 °C se procedió al recuento de viables y al cálculo del PAE mediante la siguiente fórmula (Craig and Gudmundsson, 1996):

$$\text{PAE (h)} = T - C$$

donde *T* y *C* son el tiempo en horas requerido por el cultivo tratado y no tratado, respectivamente, para incrementar 10 veces (1 log) su población bacteriana. En la Figura 6-A se muestra un ejemplo para el cálculo del PAE.

b) Método turbidimétrico

Una alícuota del cultivo se distribuyó por triplicado en placas de 100 pocillos y la cinética de crecimiento se monitorizó en un equipo Bioscreen C. La temperatura se ajustó a 37 °C y el control de agitación se colocó en la posición intermedia. Se tomaron medidas de D.O₆₀₀ cada 15 minutos y tras representar gráficamente las curvas, se calculó el PAE mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PAE (h)} = T_{50} - C_{50}$$

donde *T*₅₀ and *C*₅₀ son el tiempo requerido por el cultivo tratado y no tratado, respectivamente, para alcanzar un valor de absorbancia (*A*₅₀) correspondiente a la mitad del valor de absorbancia final del cultivo control (Lowdin et al., 1993). El valor de absorbancia alcanzado por el cultivo control al final del ensayo (tras 20 h de incubación) fue de 1,8-1,9 en la mayoría de los experimentos. En la Figura 6-B se muestra un ejemplo para el cálculo del PAE.

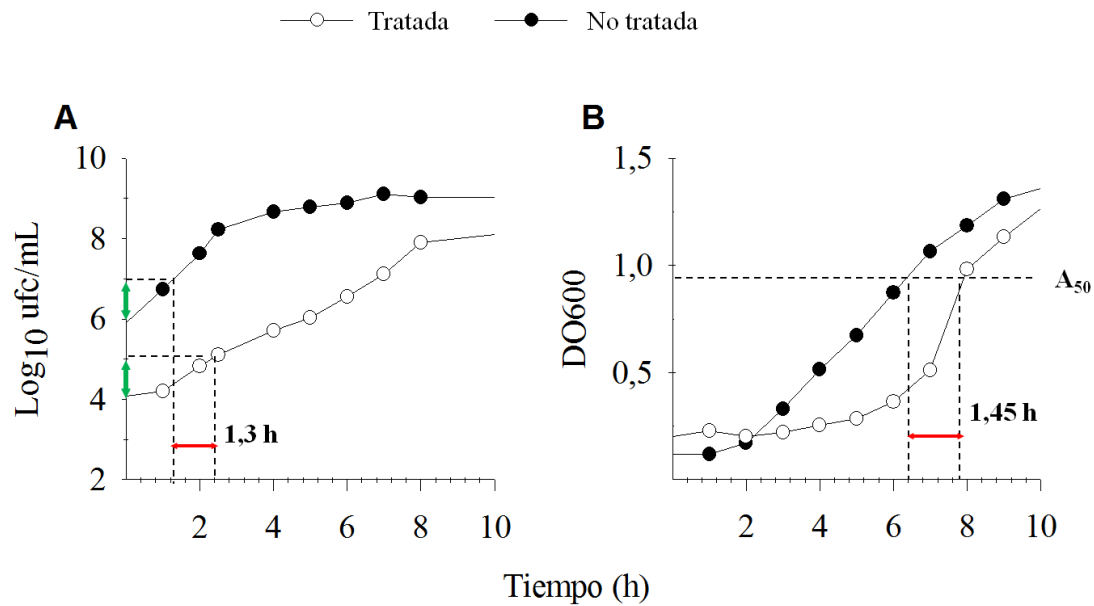


Figura 6: Cálculo del efecto postantibiótico mediante el método de recuento de viables (A) y el método turbidimétrico Bioscreen C (B). La flecha verde indica el aumento de 1 log de la población bacteriana. La flecha roja indica el PAE.

8. Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico (Post Antibiotic Effect Associated Permeabilization; PAEP) y Sensibilización en el periodo PAEP (Sensitization during Post Antibiotic Effect Associated Permeabilization (S-PAEP)).

Se definió Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico como el incremento transitorio en la permeabilidad que experimentan las células bacterianas como resultado de una exposición previa a un antimicrobiano. La PAEP proporciona información sobre la intensidad y persistencia del PAE. Se definió Sensibilización en el periodo PAEP (S-PAEP) como el retraso adicional causado por un antibiótico que ha sido añadido dentro del periodo PAEP. El cálculo del S-PAEP se realizó mediante los dos métodos descritos anteriormente para el cálculo del PAE, pero con ligeras modificaciones. Brevemente, tras los lavados, ambos cultivos pre-tratado y no tratado, se incubaron a 37 °C o se distribuyeron por triplicado en placas de 100 pocillos para su monitorización mediante Bioscreen C en las condiciones descritas anteriormente. En ambos experimentos, se añadió el antibiótico seleccionado a concentraciones subinhibitorias a diferentes tiempos (0, 1 y 2 horas) tras el comienzo de la incubación. Para la técnica de recuento de viables, la S-PAEP se calculó siguiendo la siguiente fórmula:

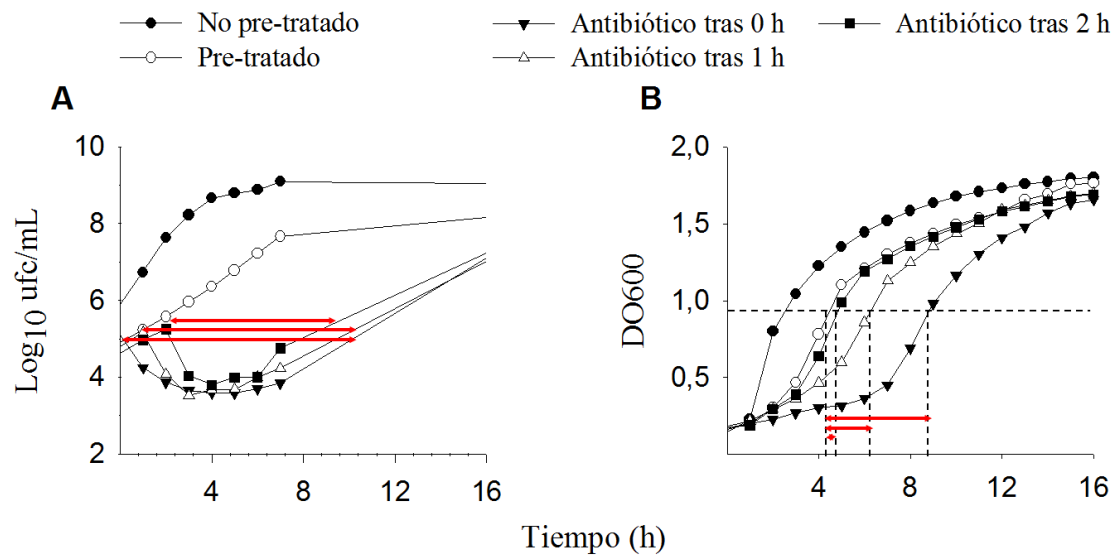
$$S\text{-PAEP (h)} = T - t$$

donde t es el tiempo en el cual se añadió el antibiótico al cultivo bacteriano y T el tiempo en el cual el cultivo recuperó el número de UFC/mL que tenía en el momento de la adición del antibiótico. Para el método de Bioscreen C, la S-PAEP se calculó siguiendo la misma metodología descrita por Lowdin y colaboradores para el PAE con ligeras modificaciones (Lowdin et al., 1993). Tras la obtención de los puntos de absorbancia para cada una de las curvas de crecimiento, el S-PAEP se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$S\text{-PAEP (h)} = T_{50} - P_{50}$$

donde T_{50} y P_{50} son el tiempo requerido por el cultivo pre-tratado con el péptido y posteriormente con antibiótico, y pre-tratado con el péptido pero no tratado con antibiótico, respectivamente, para alcanzar un valor de absorbancia (A_{50}) correspondiente a la mitad del valor de absorbancia final del cultivo control (sin tratamiento). El valor de absorbancia alcanzado por el cultivo control al final del ensayo (tras 20 h de incubación) fue de 1,8-1,9 en la mayoría de los experimentos.

Cuando la metodología empleada fue la técnica turbidimétrica mediante Bioscreen C para los ensayos PAE y S-PAEP, se dispuso de varios cultivos control con diferente inóculo inicial y se hicieron los cálculos comparando el cultivo tratado con un cultivo control que hubiera partido del mismo número de UFC/mL que el tratado en el momento de la eliminación del péptido. Para ello, fue necesario determinar el número de viables tras la eliminación del péptido en cada ensayo.



C

Técnica empleada	Horas tras la eliminación del pre-tratamiento		
	0	1	2
Recuento de viables	10,5	9	6
Bioscreen C	4,8	2,7	0,45

Figura 7: Cálculo de S-PAEPs mediante el método de recuento de viables (A) y el método turbidimétrico Bioscreen C (B). La flecha roja indica el S-PAEP determinado para el antibiótico seleccionado y momento en el que ha sido añadido. (C) Valores de S-PAEPs según el método utilizado.

9. Detección fenotípica de β -lactamasa AmpC desreprimida en *P. aeruginosa* 4158 Ps4

Para la detección fenotípica de una β -lactamasa AmpC desreprimida se empleó el método de inhibidores específicos de AmpC. Para ello, se realizó un inóculo de *P. aeruginosa* Ps4 con una turbidez bacteriana de 0,5 MacFarland y se sembró en modo césped en una placa de MH y una placa de MH que contenía oxacilina a una concentración de 250 μ g/mL. Posteriormente, se depositó un disco de ceftazidima 30 μ g en el centro de cada una de las placas y se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas. Al día siguiente, se midieron los halos de inhibición en cada una de las placas y se compararon entre sí. Como controles del experimento se utilizó la cepa salvaje PAO1, un mutante de

PAO1 (PA Δ AD) que presenta un fenotipo AmpC hiperinducible no desreprimido y un triple mutante de PAO1 (PA Δ AD Δ Dh2 Δ Dh3) que muestra un fenotipo AmpC establemente desreprimido. Un aumento significativo del halo de inhibición en la placa de MH con oxacilina con respecto a la que no la contiene, indicó la presencia fenotípica de una β -lactamasa AmpC desreprimida.

10. Visualización del efecto permeabilizante producido por P4-9 en la cepa salvaje PAO1-gfp mediante microscopía de fluorescencia

Para la visualización del efecto permeabilizante de P4-9 en la cepa salvaje *P. aeruginosa* PAO1, se empleó una cepa que contenía un plásmido con el gen de la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein: gfp*) desarrollada por Sánchez-Gómez (Sánchez-Gómez, 2008). La preparación del inóculo bacteriano, el tratamiento con el péptido P4-9 y los lavados por centrifugación fueron realizados de la misma manera descrita en el apartado 6. Tras los lavados por centrifugación, el *pellet* bacteriano se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril y se realizó un segundo lavado, tras el cual, se añadió 1 mL de una solución de paraformaldehído (PFA) (Merck) al 4% (p/v) para fijar las células. Posteriormente, se realizaron dos lavados con solución salina en un volumen final de 1 mL y se añadieron 20 μ L de una solución de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich), se incubó 10 minutos en oscuridad y se realizaron dos lavados en suero salino. Por último, se depositó una gota de 20 μ L en un portaobjetos y tras dejarlo secar a temperatura ambiente se montó un cubreobjetos con pegamento DPX (*dibutyl phthalate xylene*; BDH, Poole, Inglaterra).

Para la observación al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TS100; Nikon Instruments Inc., Tokio, Japón) se utilizaron dos filtros, uno FITC empleado para la observación de la señal verde (*gfp*), y otro, TRITC para la observación de la señal roja (yoduro de propidio). Las muestras se fotografiaron en la misma posición en cada uno de los dos filtros y se superpusieron mediante el programa informático *Isis FISH Imaging System* (Metasystems, Alemania).

11. Visualización de alteraciones en superficie producido por P4-9 en la cepa clínica *P. aeruginosa* 4158 Ps4 mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)

Para la visualización del efecto permeabilizante del péptido P4-9 en la cepa clínica *P. aeruginosa* 4158 Ps4 se utilizó un microscopio de fuerza atómica (*atomic force microscopy*; AFM) (JPK Instruments; Berlín, Alemania) sobre cubreobjetos de cristal (Menzel-Gläser; Saarbrückener, Braunschweig). Se eligieron cubreobjetos de un tamaño de 24 x 24 mm y se sometieron a un proceso de lavado que consistió en sonicar durante 2 minutos en una solución al 2 % de detergente PCC (Thermo Scientific; Rockford, Estados Unidos) en agua ultrapura. Tras aclararlo en agua ultrapura el cubre se introdujo en una solución de metanol y se dejó secar a temperatura ambiente, cubierto con papel de aluminio para evitar que se pegara cualquier impureza del ambiente. Posteriormente, se realizó un tratamiento químico para mejorar la adherencia de las bacterias que consistió en sumergir el cubre durante 5 minutos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) al 0,01 % en agua ultrapura y se dejó secar a temperatura ambiente.

La preparación del inóculo bacteriano, el tratamiento con el péptido P4-9 y los lavados por centrifugación fueron realizados de la misma manera descrita en el apartado 6 excepto que los lavados posteriores a las incubaciones se realizaron en Hepes (Sigma-Aldrich) 20 mM pH 7,2 en vez de MHA. Como control negativo y positivo se utilizaron inóculos bacterianos no tratado y tratado con polimixina B a una concentración dos veces superior a su CMI, respectivamente, que se manipularon de la misma manera que los anteriores.

Se depositó una gota de 20 μ L de cada uno de los inóculos en el centro del cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la visualización mediante el microscopio de fuerza atómica. El aparato de AFM estaba acoplado a un cantiliver de Si-N (0,01-0,025 ohm/cm; L = 125 μ m, W = 35 μ m, T = 4,5 μ m) que en su extremo contenía una punta (radio < 10 nm, H = 14-16 μ m, f = 200-400 kHz, k = 25-75 N/m) recubierta de Aluminio (Réflex nd). Se realizaron escaneos de diferente región y tamaño de la gota, intentando obtener una representatividad suficiente de la población bacteriana. Además, tras elegir la zona de trabajo, se seleccionaron regiones más pequeñas para realizar nuevos escaneos a mayor aumento. El software utilizado para el manejo del aparato, procesamiento y edición de las imágenes fue SPM de JPK y se fijaron los parámetros de *Setpoint*, *IGain* y *PGain* en 0,65 V, 150 Hz y

0,0048, respectivamente. Estos ensayos se realizaron en el Centro de Estudios e Investigaciones Técnicas (CEIT) de San Sebastián, Guipúzcoa.

12. Obtención del LPS de *P. aeruginosa* PAO1 mediante el método de extracción fenol-agua

El lipopolisacárido (LPS) se extrajo a partir de células de *P. aeruginosa* PAO1 aplicando el método de extracción fenol-agua (Westphal and Jann, 1965).

P. aeruginosa PAO1 se cultivó en un *slant* de TSA fresco durante 24 horas a 37 °C. Las bacterias se resuspendieron en 2 mL de suero salino estéril, y de esta suspensión, se añadieron 0,5 mL a matraces de 2 L que contenían 800 mL de TSB. Los matraces se incubaron en agitación durante una noche a 37 °C. Tras finalizar el cultivo, las bacterias se mataron con fenol a una concentración final del 0,5% durante 24 horas y se lavaron mediante centrifugación con suero salino (6000 x g, 20 min. Rotor GS-3, K_f 2600). Una vez eliminado el sobrenadante, las células se resuspendieron en agua destilada y se liofilizaron. Para la extracción del LPS, 5 g del liofilizado se resuspendieron en 170 mL de agua destilada a 66 °C y la suspensión se mezcló con el mismo volumen de fenol fundido a la misma temperatura. Esta mezcla se agitó con un agitador mecánico provisto de un vástago con aspas de teflón durante 15-20 minutos manteniendo la temperatura a 66 °C. Finalmente, la emulsión se enfrió en un baño con hielo picado durante 24 horas y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C (Rotor GS-3, K_f 1160) para separar las fases.

La fase acuosa, que es donde migra el LPS de PAO1, se separó, se filtró y se precipitó con 5 volúmenes de metanol frío suplementado con 1% (vol/vol) de metanol saturado con acetato de sodio. Tras dejar reposar la muestra durante al menos una noche a -20 °C, el precipitado se recogió mediante centrifugación (6.000 x g, 15 min a 4 °C. Rotor GS-3, K_f 2600) y se resuspendió mediante sonicación en 150 mL de agua destilada. Finalmente, la muestra se dializó y se liofilizó.

13. Purificación del LPS de *P. aeruginosa* PAO1

El LPS liofilizado se resuspendió mediante sonicación en Tris-HCl-NaN₃ a razón de 10 mg/mL y se sometió a una digestión enzimática con nucleasas y proteasas. Para ello, se añadieron DNasa y RNasa (ICN; Irvine, California, Estados Unidos), ambas a

una concentración final de 50 µg/mL, y la solución se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se añadió proteinasa K (Merck; Madrid, España) a una concentración final de 50 µg/mL y se incubó la muestra durante 3 horas a 55 °C. Esta digestión con proteinasa K se repitió dos veces más, añadiendo nueva enzima cada vez. El LPS se precipitó con metanol suplementado con 1% (vol/vol) de metanol saturado con acetato de sodio. Tras una incubación de 1-2 horas a -20 °C, el precipitado se recogió por centrifugación (6000 x g, 15 min a 4 °C. Rotor GS-3, K_f 2600) y se resuspendió mediante sonicación en agua desionizada. Finalmente, la muestra se dializó y se ultracentrifugó (100.000 x g, 6 h, 4 °C. Rotor 70.1Ti), y el sedimento obtenido se resuspendió en agua destilada y se liofilizó.

14. Determinación del ácido 2-ceto-3-deoxioctónico (KDO)

El KDO se midió por el método del ácido tiobarbitúrico (Warren, 1959), modificado como describen Díaz-Aparicio y colaboradores. (Díaz-Aparicio et al., 1993) para eliminar la interferencia generada por los desoxiazúcares. La muestra de LPS se resuspendió a razón de 1 mg/mL en SDS al 0,2 % mediante sonicación. Como estándares, se utilizaron KDO (Sigma-Aldrich) a 50 µg/mL y desoxirribosa (Sigma-Aldrich), a 25 µg/mL en agua ultrapura. Tanto las diluciones de las muestras como las de los estándares se hicieron en agua ultrapura hasta un volumen final de 200 µL por tubo. Las muestras se hidrolizaron con 20 µL de ácido sulfúrico 1,25 N a 100 °C durante 20 minutos y la hidrólisis se interrumpió enfriando en hielo. Los azúcares liberados se oxidaron con 250 µL de ácido periódico 0,042 N en ácido sulfúrico 0,125 N a temperatura ambiente durante 20 minutos y la reacción se detuvo añadiendo 0,5 mL de arsenito sódico al 2 % en ácido clorhídrico 0,5 N (2 minutos a temperatura ambiente). La detección del KDO se llevó a cabo añadiendo a los tubos 2 mL de ácido tiobarbitúrico al 0,3 % e incubando éstos a 100 °C durante 20 minutos. Por último, se añadió a los tubos dimetilsulfóxido (1 mL) para eliminar cualquier turbidez y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 536 y a 552 nm y la cantidad de KDO en las muestras se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol KDO} = \frac{M_{Dx}^{536} \cdot A^{552} - M_{Dx}^{552} \cdot A^{536}}{M_{kdo}^{552} \cdot M_{Dx}^{536} - M_{kdo}^{536} \cdot M_{Dx}^{552}}$$

donde M es el cociente entre la absorbancia a la longitud de onda que se indica y los micromoles del estándar correspondiente (KDO o desoxirribosa [Dx]), y A es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda indicada.

15. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Se realizó según el procedimiento de Laemmli (Laemmli, 1970), en un sistema discontinuo. El gel de separación se preparó con una solución de acrilamida (N',N'-bis-metilenacrilamida, Bio-Rad) al 10% en Tris-HCl 375 mM (pH 8,8) calentada a 60 °C y desgaseada a vacío. Seguidamente, se añadieron N,N,N,N'-tetrametiletildiamina (TEMED, Bio-Rad), 0,1 % SDS y peroxidisulfato amónico al 0,05%. En el gel de separación se empleó una solución de acrilamida al 4% en Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) calentada a 60 °C y desgaseada a vacío, a la cual se añadieron TEMED 0,1 %, SDS 0,1 % y peroxidisulfato amónico al 0,05%. La solución de electrodo empleada fue Tris-HCl 30 mM (pH 8,3), glicina 192 mM y SDS al 0,1 %. Las muestras se resuspendieron a razón de 1 ó 2 mg/mL en Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), glicerol al 10 % (vol/vol), SDS al 2%, 2-mercaptoetanol al 5 % y azul de bromofenol al 0,00125 %, y se hirvieron durante 5-10 minutos antes de la electroforesis. Las condiciones de electroforesis empleadas fueron 15 mA durante 2 horas y 20 minutos para geles de formato 10 x 7,3 cm (sistema *Mighty Small*, Pharmacia). El marcador de peso molecular empleado fue *High-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (Amersham Bioscience).

16. Tinción y visualización del LPS de *P. aeruginosa* PAO1

Una vez acabada la electroforesis, uno de los geles se tiñó con plata alcalina para LPS según el método descrito por Tsai y Frasch (Tsai and Frasch, 1982). Para ello, primero el gel se fijó en metanol al 50 % y ácido acético al 5 % durante 1-16 horas. Posteriormente, se procedió a una oxidación con periodato al 0,7 % en una solución de metanol 7,5 %-ácido acético glacial 5% durante 10 minutos. Tras un lavado con agua ultrapura, el gel se tiñó con plata amoniacal (NaOH al 0,077 %, amoniaco [Merck KGaA] al 0,35%, nitrato de plata al 0,8 %) durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se revelaron con ácido cítrico al 0,005 %- formaldehido al 0,0185 % y se procedió a la detención de la reacción con ácido acético al 1 %. El gel se escaneó empleando un sistema de escáner *ScanJet 7400C* (Hewlett-Packard) y se secó en un secador de geles a vacío sobre papel de filtro.

El segundo gel se tiñó con plata alcalina para proteínas siguiendo el método de Merrill y colaboradores (Merrill et al., 1979). Esta tinción se empleó para comprobar la ausencia de proteínas en la muestra de LPS tras el método de extracción y posterior purificación (apartados 12 y 13 de Material y métodos).

17. Afinidad de los péptidos por el LPS *in vitro*

a) Ensayo fluorimétrico con el complejo Bodipy-cadaverina

Para medir la afinidad de los péptidos por el LPS se empleó el método de desplazamiento BODIPY TR cadaverine (5-(((4-(4,4-difluoro-5-(2-thienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-yl)phenoxy)acetyl)amino)pentylamine, hydrochloride) (Molecular Probes, Madrid, España), siguiendo un método ya descrito (Wood et al., 2004). Las medidas de fluorescencia se realizaron en cubetas desechables de poliestireno (BIO-RAD; Hercules, California, Estados Unidos) en un fluorímetro (Edinburgh Instruments; fuente Xe 900; Edinburgo, Escocia) equipado con un baño ajustado a una temperatura de 25 °C. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 580 y 620 nm, respectivamente, con una anchura de ventanas de 2,5 nm.

Antes de cada experimento, el LPS de *P. aeruginosa* PAO1, extraído y purificado como se especificó en los apartados 12 y 13, se sometió a 3 ciclos de temperatura (15 minutos a 56 °C seguido de 5 minutos a 4 °C). Este proceso asegura que el tamaño y la estructura de los agregados de LPS son uniformes (Kowalski et al., 2010). La Bodipy cadaverina (BC) se utilizó a una concentración final de 5 µM, el LPS a 1,25 µg/mL y los péptidos a 12,5 µg/mL. Las medidas se llevaron a cabo en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4.

Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de desplazamiento respecto a la PMB (control de 100% de desplazamiento). El desplazamiento de la BC se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Desplazamiento} = 1 - \frac{F_0 - F}{F_0 - F_{max}}$$

siendo F la intensidad de fluorescencia emitida por la mezcla BC + LPS + el agente desplazante; F₀ la intensidad de la fluorescencia debida a la BC sola y F_{max} la

fluorescencia debida a la mezcla BC y LPS. Posteriormente, se calculó el valor con respecto a la PMB tomando el desplazamiento producido por ésta como el 100 %.

b) Ensayo de inhibición de la liberación de TNF- α inducido por LPS en células mononucleares humanas

Este ensayo se empleó para evaluar la capacidad de los péptidos para unirse al LPS de *P. aeruginosa* PAO1 e inhibir la inducción y posterior liberación de TNF- α en células mononucleares humanas (CMNh) *in vitro*.

Se extrajeron CMNh a partir de sangre periférica de pacientes voluntarios sanos y se utilizó la técnica de centrifugación en gradiente de Ficoll (Histo-Paque-1077, Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras recoger cuidadosamente el halo blanquecino donde se encuentran las células mononucleares, se realizaron tres lavados sucesivos (250 x g, 10 minutos. Rotor SX4750) en DPBS (Gibco, Invitrogen S.A., Barcelona, España) y un último lavado en RPMI 1640 (Gibco) en las mismas condiciones. Posteriormente, se resuspendieron las células en RPMI 1640 fresco y se realizó un recuento celular en una cámara de Neubauer, ajustándose la suspensión a 5×10^6 células/mL con RPMI 1640. Las células se dispensaron a razón de 1×10^6 células por pocillo en placas de poliestireno de 96 pocillos (TPP) con fondo en 'U'.

Los tratamientos aplicados sobre las células fueron los siguientes: LPS a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, una mezcla de LPS péptido a dos relaciones LPS: péptido diferentes (1:40 y 1:100) y los péptidos solos a 40 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$. Todas las soluciones que iban a añadirse sobre las células se estabilizaron mediante incubación previa a 37 °C durante 30 minutos. Se añadieron 20 μL de cada uno de los tratamientos por triplicado sobre las células y, como control negativo, se dejaron pocillos con células sin tratamiento. Posteriormente, las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ durante 4 horas. Tras la incubación, se centrifugaron las placas (250 x g, 10 minutos. Rotor SX4750), se recogieron los sobrenadantes y se guardaron a -80 °C hasta que se procedió a la cuantificación de TNF- α .

La cuantificación de TNF- α se realizó mediante un ELISA *sándwich* (Human Kit TNF α /TNFSF1A, Quantikine, R&D systems, Minneapolis, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

18. Toxicidad celular y capacidad hemolítica de los péptidos

Para los ensayos de toxicidad celular se emplearon fibroblastos obtenidos de dermis humana. Para ello, la línea celular fue mantenida en frascos de cultivo de 75 cm² (Corning Flask, Estados Unidos) en medio DMEM (*Dulbecco's Minimum Essential Medium*, Gibco) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (Gibco) y una mezcla de antibióticos (penicilina G 10,000 u/mL y estreptomina a 10,000 ug/mL en una solución 100 veces concentrada (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Cuando los cultivos llegaron a la confluencia, se eliminó el medio y las células se lavaron con una solución amortiguadora de fosfato salino sin cationes (DPBS, Gibco) y se tripsinizaron con una solución de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich) caliente. Los recuentos de células se realizaron en una cámara de Neubauer. Las incubaciones de los péptidos se realizaron en medio DMEM sin suplementar y en los ensayos realizados en microplaca los pocillos de los bordes se rellenaron con medio DMEM para mantener una adecuada humedad relativa.

Ensayo colorimétrico del metiltiazoltetrazolio (MTT)

Se incubaron 200 µL de células por pocillo a una concentración de 3·10⁵ células/mL, en placas de 96 pocillos (TPP) a 37 °C y con una atmósfera de 5% de CO₂. Después de 24 horas de incubación y tras comprobar la confluencia de las células (80-90% aproximadamente), se realizaron diluciones dobles seriadas de los péptidos (desde 200 µg/mL hasta 1,56 µg/mL) en una placa diferente y se transfirió, en paralelo, el contenido de cada pocillo a la placa con los fibroblastos y se continuó la incubación durante 24 horas en las mismas condiciones. Finalmente, las células se incubaron con 200 µL de MTT [(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromide), Sigma] a una concentración de 0,5 mg/mL en medio DMEM durante 4 horas en las mismas condiciones descritas anteriormente. Como medida de viabilidad celular se utilizó la conversión del MTT a sal de tetrazolio. Para ello, se añadieron 100 µL de DMSO a cada pocillo y se midió la absorbancia a 540 nm.

Los datos fueron representados como supervivencia celular en relación a la concentración de péptido empleada y se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de cada péptido.

Para cuantificar la capacidad hemolítica de los péptidos se obtuvo sangre de voluntarios sanos y se centrifugó (250 x g, 10 minutos. Rotor SX4750). Posteriormente se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados sucesivos en solución tamponada de fosfato salino (PBS; Gibco) en las mismas condiciones de centrifugación. Tras obtener los eritrocitos, se realizó una dilución decimal (1 mL de eritrocitos en 9 mL de solución tamponada de fosfato salino (PBS; Gibco)).

En una placa de microtitulación con fondo en 'U' (TPP) se realizaron diluciones dobles seriadas de los péptidos a concentraciones que fueron desde 200 µg/mL hasta 1,56 µg/mL en una solución tamponada de fosfato salino (Gibco) a los que se añadieron 8 µL de la suspensión final de eritrocitos previamente preparada. De esta manera, se obtuvo una concentración de eritrocitos por pocillo del 0,4 % (vol/vol). Como control del 100 % hemólisis se emplearon dos pocillos a los que se le añadió un detergente (tritón (Sigma-Aldrich)) al 10 %. Las placas se incubaron a 37 °C durante dos tiempos diferentes (30 min y 24 horas). Tras la incubación, las placas se centrifugaron (250 x g, 10 minutos. Rotor SX4750), se extrajo cuidadosamente el sobrenadante de cada uno de los pocillos y se transfirió a una nueva placa con fondo plano (TPP). Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm.

Los datos fueron representados como porcentaje de hemólisis en relación a la concentración de péptido empleada y se calculó la dosis hemolítica 50 (DH₅₀) de cada péptido.

19. Diseño, predicción y análisis de estructura actividad de nuevas secuencias de péptidos optimizados

Para el diseño y modelización de nuevas secuencias peptídicas (P4) se desarrollaron análisis de estructura-actividad (*Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR)*) a partir de los datos de CMI y CIF de los péptidos de generaciones previas de compuestos (P1y P2; (Sánchez-Gómez et al., 2008; Sánchez-Gómez, 2008; Sánchez-Gómez et al., 2011)). Una vez obtenidas las secuencias de péptidos de la generación P4, se realizó el cálculo de la CMI y CIF mediante los métodos descritos en los apartados (4a y 5a). De nuevo, estos resultados pertenecientes a la generación P4, junto con los que se obtuvieron para las generaciones P1 y P2, se integraron en un nuevo modelo de análisis QSAR más detallado que fue realizado por

los Drs. Bostjan Japelj y Roman Jerala (*National Institute of Chemistry*, Ljubljana, Eslovenia) y se usaron dos modelos de predicción: Análisis de Componentes Principales (ACP) y Regresión Lineal Múltiple (RLM), que sirvieron para predecir numerosos descriptores, así como su signo y magnitud, con base en propiedades fisicoquímicas, estructurales y espaciales de las secuencias. Estos descriptores se calcularon mediante el *software* informático PEDES (Japelj, 2005). El algoritmo PEDES calculó tanto los descriptores fisicoquímicos que dependen de la composición (constitucionales), como los que dependen directamente de la secuencia, estos últimos basados únicamente en la secuencia de aminoácidos de los péptidos. La salida PEDES consistió en un archivo que contenía una lista de 32 descriptores para cada péptido y otro archivo que representó la matriz necesaria para los análisis de estructura –actividad. Las definiciones de los descriptores constitucionales y dependientes de la secuencia se muestran en el anexo 2.

Para los péptidos con un mecanismo de acción similar, la actividad biológica de un péptido i puede ser representada como una combinación lineal de los descriptores fisicoquímicos de la siguiente manera:

$$\log \frac{1}{BA_i} = a_1 P_1(i) + a_2 P_2(i) + \dots + a_m P_m(i) + C,$$

donde m es el número total de parámetros fisicoquímicos independientes, $P_n(i)$ es el n parámetro del péptido (i), BA_i es la medida biológica expresada como CMI o CIF y a_n es el coeficiente de la ecuación lineal múltiple correspondiente al $P_n(i)$ (Purcell, 1973). La actividad biológica calculada se integró en un sistema de modelización usando un análisis PLS (*Partial Least Square*) usando el *software* CODESSA (Katritzky, 1996). Previamente a este análisis, los descriptores de los péptidos se centralizaron y normalizaron para asegurar que todos tenían la misma influencia sobre el modelo.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1:

**OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD
PERMEABILIZANTE Y ANTIENDOTÓXICA DE
LOS PÉPTIDOS P4 FRENTE A *P. AERUGINOSA* IN
*VITRO***

CAPÍTULO 1: OPTIMIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PERMEABILIZANTE Y ANTIENDOTÓXICA DE LOS PÉPTIDOS P4 FRENTE A *P. aeruginosa* IN VITRO

Desarrollo de un modelo cuantitativo de relación estructura química-actividad (QSAR) para el diseño de péptidos con actividad potenciadora de antibióticos

En el anexo 1A, 1B, 1C y 1D se muestran las secuencias de los 126 péptidos sintéticos cuya caracterización permitió diseñar los compuestos empleados en el presente proyecto. Estos 126 compuestos se diseñaron en colaboración con otros equipos de investigación europeos y americanos durante el Proyecto Europeo ANEPID (*Antimicrobial endotoxin neutralizing peptides to combat infectious diseases*; QLK2-CT-2002-01001). Por ello, en el presente proyecto nos referiremos a estos compuestos como “péptidos ANEPID”. La caracterización de estos compuestos ha sido descrita en parte por Sánchez-Gómez y colaboradores (Sánchez-Gómez et al., 2008; Sánchez-Gómez et al., 2011). Los péptidos ANEPID se prepararon en tres sucesivas etapas de optimización, de manera que se obtuvieron péptidos denominados de “primera generación” (péptidos P1; n=71), de “segunda generación” (péptidos P2; n=55), y de “tercera generación” (péptidos P3; n=58). El objetivo, que en buena parte se logró (Sánchez-Gómez et al., 2008), se centró en la mejora de la actividad antimicrobiana y neutralizante de endotoxina de una generación de péptidos a la siguiente. Todos estos compuestos están actualmente protegidos por la patente europea EP 2 078 529 A1. El péptido que sirvió de base para diseñar la primera generación (LF-11; FQWQRNIRKVR-NH₂) deriva del dominio de unión al LPS de la lactoferrina humana.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo del presente proyecto es estudiar si, aplicando un método de diseño racional, es posible aumentar la actividad permeabilizante de un péptido sobre la membrana externa de una bacteria gramnegativa. Para ello y en colaboración con los Drs. Roman Jerala y Bostjan Japelj del *National Institute of Chemistry*, Ljubljana, Eslovenia, se desarrolló un modelo cuantitativo de relación estructura química-actividad (QSAR). Este modelo se basó en los datos experimentales de los péptidos P1 y P2 de ANEPID. Se excluyeron del estudio los péptidos P3 porque se comprobó que ninguno de estos compuestos (muchos de ellos lipopéptidos) mejoraba la capacidad permeabilizante de los mejores péptidos P2. En el análisis QSAR se incluyeron todos los datos de actividad biológica de los péptidos, tales

como la actividad antimicrobiana (CMI, CMB), la capacidad permeabilizante (CIF, cociente de CMI [CCMI]; ver más abajo) y la afinidad por el LPS. Además, se incorporaron los datos sobre la estructura tridimensional de los péptidos que se dedujeron a partir de los estudios de resonancia magnética nuclear realizados con el péptido LF11 durante el proyecto ANEPID. Para facilitar el análisis, se generaron un grupo de 32 descriptores estructurales y fisicoquímicos, también llamados PEDES (*Peptide descriptors from sequence*), los cuales describen las propiedades fisicoquímicas de los péptidos en relación a su actividad permeabilizante y antimicrobiana (anexo 2), como se detalló anteriormente en la sección Material y Métodos.

Los descriptores de los péptidos contienen tanto información sobre su composición peptídica como datos relacionados con sus secuencias, tales como el contenido de residuos básicos o número de *clusters* con residuos hidrofóbicos, entre otros. Los descriptores se ordenaron en una matriz-*x*, donde cada péptido se situó en una fila y cada descriptor en una columna. De la misma manera, con los valores de CMI (factor 1) y las CIF (factor 2) se construyó una matriz-*y* de 126x2 (126 péptidos y 2 variables en estudio). Este análisis reveló la correlación entre algunos descriptores fisicoquímicos y la actividad antimicrobiana y permeabilizante de los péptidos. En la Figura 1.1 se muestra el análisis de regresión lineal múltiple donde se asociaron la CIF mínima calculada y la experimental de las generaciones P1 y P2 con un grupo de 5 descriptores (32, 31, 26, 22 y 37), presentando un coeficiente de determinación de $R^2=0,499$ (coeficiente de correlación $R = 0,7$). Tras computar los datos en forma de log (1/CIF) se obtuvo una distribución de valores más homogénea, aunque el coeficiente de correlación disminuyó ligeramente ($R = 0,620$; descriptores 32, 8, 22, 26 y 33).

Sobre la base de este análisis, se diseñó una nueva generación de 20 compuestos, denominados péptidos de cuarta generación (péptidos P4), cuyas secuencias se muestran en el anexo 1E. Para evaluar la precisión del análisis QSAR, las nuevas secuencias de la generación P4 se integraron mediante un análisis de regresión de tipo *Partial Least-Squares* (también conocida como *partial least-squares projection to latent structures* [PLS]), que generó la predicción de la actividad permeabilizante de los péptidos P4. En la Figura 1.2 se resumen las etapas llevadas a cabo durante el proyecto ANEPID (optimización sólo de actividad antimicrobiana; P1, P2 y P3) y en el presente estudio (optimización de la capacidad permeabilizante; péptidos P4 y P5).

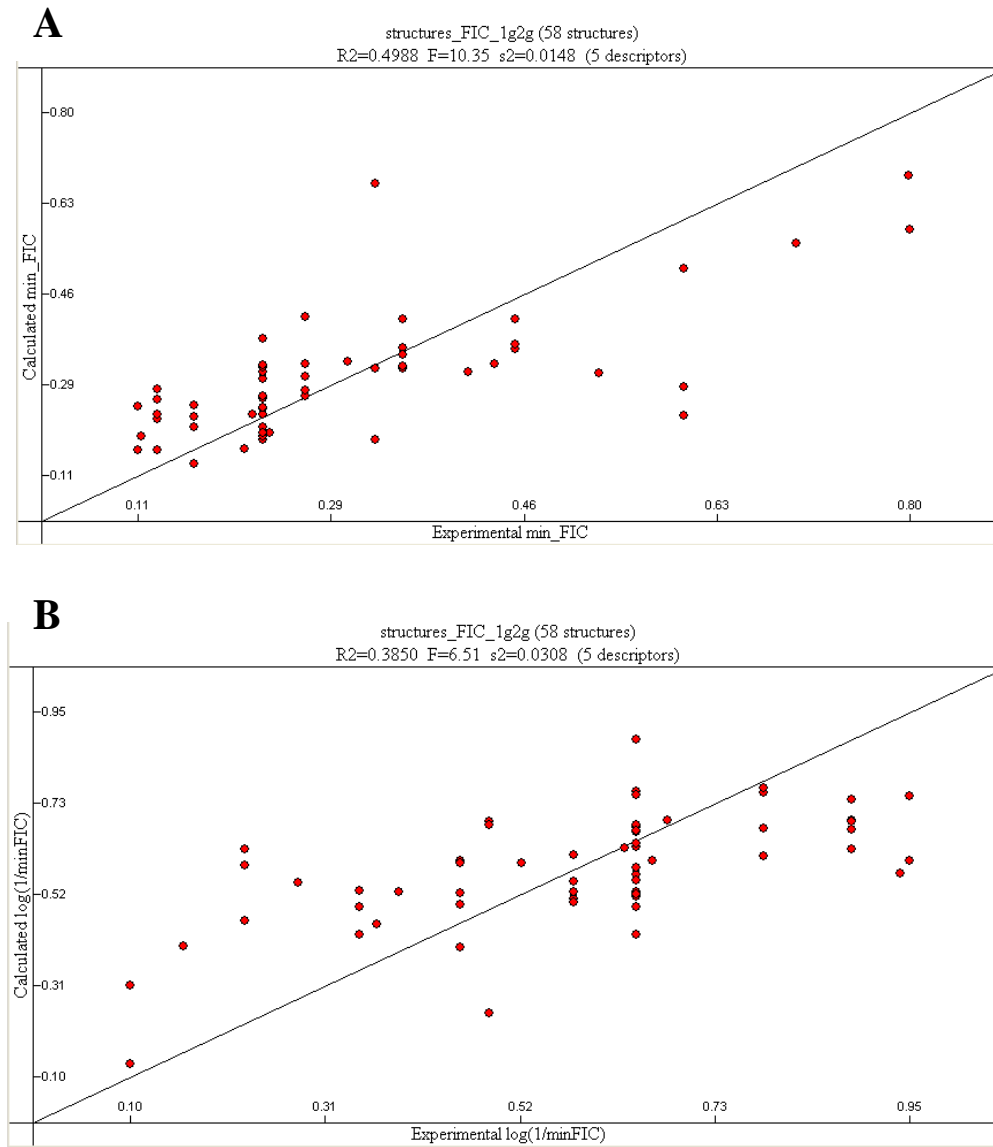


Figura 1.1- Análisis PLS-RLM de los valores CIF mínima (A) y $\log 1/\text{CIF}_{\min}$ (B) de los péptidos P1 y P2 calculada y experimental en base a los 5 descriptores más importantes obtenidos tras el estudio de ACP.

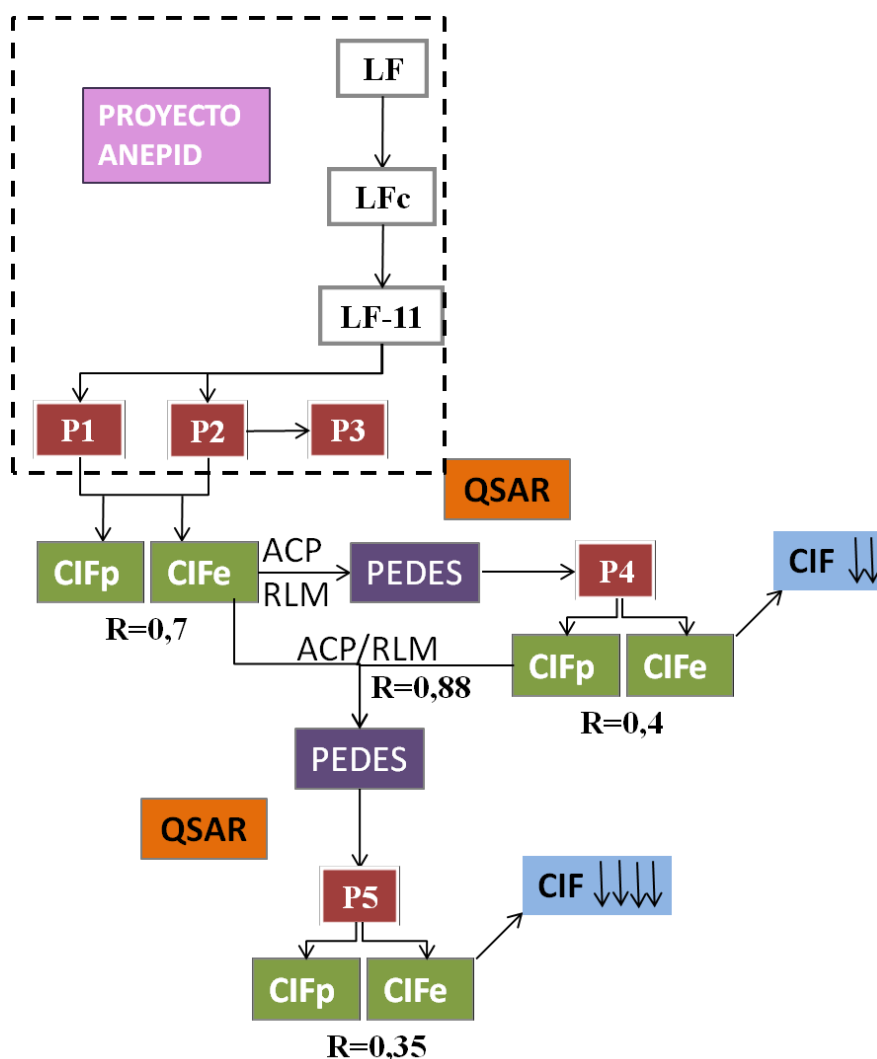


Figura 1.2: Esquema del proceso de análisis estructura-actividad (QSAR) realizado en el proyecto ANEPID y en el presente estudio. A partir de la región activa de la lactoferrina humana (LF-11) derivaron dos generaciones de péptidos (P1 y P2) de las que se calcularon su CIF experimental (CIFE) y CIF predicha mediante un estudio racional (CIFp). A partir de estos datos se generaron mediante análisis de componentes principales (ACP) y regresión lineal múltiple (RLM) una serie de descriptores (PEDES) que sirvieron de base para sintetizar la generación P4. Este proceso se repitió tomando los valores CIF de las generaciones P1, P2 y P4, que mediante un nuevo análisis QSAR, dieron lugar a la generación P5. R: estadístico de correlación R de Pearson entre las CIF predicha y experimental determinada para cada caso. El recuadro punteado representa la parte del proceso realizado durante el proyecto ANEPID.

Correlación entre valores de actividad permeabilizante calculada y experimental de los péptidos P4

Empleando el aislamiento clínico multiresistente *P. aeruginosa* 4158 Ps4 (*P. aeruginosa* Ps4; Sánchez-Gómez et al., 2011), se estudio la capacidad de los péptidos P4 para potenciar la actividad de la novobiocina, un antibiótico hidrofóbico incapaz de atravesar una membrana externa intacta y, por tanto, de alcanzar su blanco de acción

intracelular. Para cuantificar la existencia de sinergia, se calculó el cociente de CMI de la novobiocina en ausencia (CMI = 512 µg/ml) y en presencia de una concentración subinhibitoria de cada péptido, 50 µg/ml (CCMI₅₀; Tabla 1.1). Para corregir este parámetro en función de la CMI del péptido, se calculó también el índice de concentración inhibitoria fraccionada (CIF; Material y Métodos) para todas las combinaciones péptido-novobiocina. La mayoría de autores considera una combinación como sinérgica cuando su índice CIF es $\leq 0,5$ o cuando su CCMI tiene un valor mínimo de 4 (Eliopoulos and Moellering, Jr., 2011). Como se observa en la Tabla 1.1, la mayoría de péptidos (13 de 20, es decir el 65 %) formaron combinaciones sinérgicas con la novobiocina. Además, los dos parámetros empleados para medir sinergia proporcionaron, en general, información comparable.

La Tabla 1.1 también permite comparar los valores de actividad permeabilizante experimentales con los resultados predichos por el análisis QSAR y expresados como el valor de CIF mínima para cada péptido. Concretamente, en la columna de la derecha de esa Tabla se indica la posición relativa que el estudio QSAR asigna a cada péptido en un *ranking* de actividad potenciadora que va de 1 (mayor actividad) a 4 (menor). Los péptidos P4-1, P4-2, P4-3 y P4-16, que resultaron ser los mejores permeabilizantes, formaron combinaciones con valores de CIF mínima similares a las calculadas. Por otra parte, la mayoría de los péptidos que no poseían actividad potenciadora de la novobiocina habían sido correctamente asignados en los grupos 3 y 4, salvo los péptidos P4-8, P4-9 y P4-17. Precisamente, estos compuestos eran los que tenían CMI más bajas, lo que puede explicar el pobre valor de CIF experimental obtenido. Aunque el análisis QSAR proporcionó compuestos con potente actividad permeabilizante, no se mostró capaz de predecir adecuadamente dicha actividad. Este hecho quedó de manifiesto por la ausencia de correlación estadística entre los resultados de los dos *rankings*, el experimental y el asignado por el análisis QSAR (Rho de Spearman=0,40; $p=0,081$).

Tabla 1.1: Actividad potenciadora de novobiocina de los péptidos de la cuarta generación frente a *Pseudomonas aeruginosa* 4158 Ps4: actividad calculada vs. actividad predicha por el análisis QSAR basado en datos de los péptidos de la primera y segunda generaciones.

Péptido	Secuencia	CMI ¹ Péptido	CMI de novobiocina a la concentración de péptido indicada (µg/mL)					CIF ² min	CCMI ³	CIF min experimental ⁴	CIF min predicha ⁵
			0	6,25	12,5	25	50				
P4-1	P F W R R F W R R R -NH ₂	128	1024	32	16	8	2	0,08	512	1	1
P4-2	R R R W F R R W F I -NH ₂	16	1024	4	nc ⁶	nc	nc	0,39	256 (6,25)	1	1
P4-3	P F W R R R F I W R R R -NH ₂	256	1024	1024	64	32	4	0,11	256	1	1
P4-4	P F I W R R R R -NH ₂	1024	1024	1024	1024	1024	256	0,27	4	2	3
P4-5	R R R I W R R W F I -NH ₂	32	512	16	4	1	nc	0,23	512 (25)	2	2
P4-6	P F W R I I R R R -NH ₂	1024	1024	1024	128	32	16	0,06	64	4	3
P4-7	P F W I I R R R R -NH ₂	128	1024	1024	128	32	8	0,22	128	2	3
P4-8	P F W R I R I R R W I R R -NH ₂	8	1024	1024	nc	nc	nc	>0,5	1 (6,25)	4	2
P4-9	P F W R I R I R R W W R R -NH ₂	8	1024	1024	1024	nc	nc	>0,5	1 (6,25)	3	1
P4-10	F W R R I I F W R R -NH ₂	128	1024	1024	2	1	1	0,10	1024	3	2
P4-11	F W R W R W R W F -NH ₂	64	1024	1024	1024	1024	nc	>0,5	1 (25)	4	3
P4-12	R R F W N F W R R -NH ₂	256	512	64	16	8	8	0,08	64	2	2
P4-13	R W R W R -NH ₂	1024	512	512	512	512	256	0,30	2	3	4
P4-14	W W R W R W R -NH ₂	>512	1024	1024	1024	64	16	0,13	64	2	4
P4-15	W R W W R W -NH ₂	128	1024	1024	1024	16	4	0,13	256	1	4
P4-16	F W Q R R I R R V R R I R R -NH	512	1024	1024	128	64	16	0,11	64	1	1
P4-17	F W I R I W R I W R -NH ₂	32	1024	1024	1024	nc	nc	>0,5	1 (12,5)	4	2
P4-18	F W I R I W R I W R R -NH ₂	32	1024	1024	1024	1024	nc	>0,5	1 (25)	4	3
P4-19	F W I W W I R I R R -NH ₂	>512	1024	1024	1024	1024	1024	>0,5	1	3	4
P4-20	W W I R I W W -NH ₂	>512	1024	1024	1024	1024	1024	>0,5	1	3	4

¹ Concentración mínima inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en caldo Müeller-Hinton con cationes no ajustados.

² Índice mínimo de concentración inhibitoria fraccionada determinado mediante ensayo *checkerboard* como en 1.

³ Cociente de CMI (determinado mediante ensayo *checkerboard* igual que en 1) en ausencia y presencia de 50 µg/mL de péptido. Las CCMI's calculadas a otra concentración diferente, ésta se indica entre paréntesis.

⁴ Clasificación de los péptidos en cuanto a su CIF mínima predicha en 4 grupos. Grupo 1: el 25 % de las CIF más bajas. Grupo 2: del 25 % al 50 % de las CIF más bajas. Grupo 3: el 25 % al 50 % de las CIF más altas. Grupo 4: el 25 % de las CIF más altas.

⁵ Clasificación de los péptidos en cuanto a su CIF mínima experimental en 4 grupos. Grupo 1: el 25 % de las CIF más bajas. Grupo 2: del 25 % al 50 % de las CIF más bajas. Grupo 3: el 25 % al 50 % de las CIF más altas. Grupo 4: el 25 % de las CIF más altas.

⁶ no crecimiento del control tratado sólo con péptido, es decir, el crecimiento bacteriano fue inhibido sólo por el péptido a la concentración indicada.

Evaluación de la actividad sinérgica de los péptidos P4 y la novobiocina frente a *Pseudomonas aeruginosa* Ps4 mediante ensayo *checkerboard*

Como Sánchez-Gómez y colaboradores han descrito, la capacidad discriminativa de los métodos de cribado de péptidos permeabilizantes aumenta cuando los ensayos se realizan en medio con una baja concentración de cationes divalentes (Sánchez-Gómez et al., 2008). En estas condiciones, es bien conocido que se refuerza la interacción electrostática entre los péptidos y las secciones electronegativas del LPS, a las que éstos se unen. Por esta razón y por coherencia con la metodología empleada en los ensayos QSAR previos (Sánchez-Gómez et al., 2011), los estudios mostrados en la Tabla 1.1 se realizaron empleando un medio de cultivo con cationes divalentes no ajustados (MHNA).

Para investigar el efecto de la concentración de cationes en la actividad permeabilizante de los péptidos P4, se repitieron los ensayos de potenciación de la novobiocina en medio de cultivo MH con cationes ajustados (MHA; 0,4-0,5 mM Mg²⁺ y 0,5-0,6 mM Ca²⁺) y los resultados se compararon con los obtenidos en medio MHNA (0,131-0,214 mM Mg²⁺ y 0,07-0,14 mM Ca²⁺). Además, se aprovecharon estos ensayos para comparar si la actividad permeabilizante de los compuestos P4 superaba o no a la de los péptidos P2. Esta comparación permitía deducir si el análisis QSAR había proporcionado compuestos con actividad permeabilizante mejorada. Para estos ensayos se empleó como péptido modelo el nonapéptido de polimixina B (PMBN), un péptido de nueve aminoácidos producto de la hidrólisis enzimática de la PMB y que retiene la capacidad permeabilizante de la molécula a costa de perder buena parte de su actividad bactericida.

Como se muestra en la Tabla 1.2, el índice CIF de PMBN en combinación con la novobiocina, siempre fue notablemente mejor (más bajo) que el de los péptidos en estudio, ya que el PMBN fue capaz de formar combinaciones sinérgicas incluso a las mínimas concentraciones evaluadas (0,78 µg/mL; resultado no mostrado), tanto en MHA como MHNA. Sin embargo, las CIF de algunos péptidos en medio MHNA igualaron, incluso mejoraron la CIF del PMBN a concentraciones superiores a la empleada para el cálculo de la CIF mínima de PMBN. Además, varios péptidos presentaron CCMI mejores (más altas) que el PMBN en el rango de concentraciones y medios estudiados. Así, por ejemplo el péptido P4-5 (CMI=32 µg/mL), que fue capaz de disminuir la CMI de la novobiocina en

medio MHNA de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1 y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (512 y 128 veces) a una concentración de péptido de 25 y 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Tabla 1.2).

En general, como se esperaba todos los péptidos mostraron mayor capacidad bactericida y permeabilizante en MHNA que en MHA. En el caso de MHNA, los péptidos P2 mostraron CCMIIs mayores que las de P4, pero la capacidad potenciadora global de los péptidos P4 fue notablemente superior, como indican los valores de CIF mínima. De hecho, los valores CIF de la mayoría de péptidos P4 no variaron prácticamente al ser medidos en MHA respecto a MHNA. Además, los péptidos P4 mostraron actividad permeabilizante a menor concentración que los péptidos P2. Por ejemplo, se identificaron dos péptidos (P4-5 y P4-12) capaces de permeabilizar la envoltura de *P. aeruginosa* en medio MHNA incluso a una concentración de 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, disminuyendo la CMI de la novobiocina 32 y 4 veces, respectivamente, mientras que en ningún péptido P2 se detectó actividad permeabilizante a esa concentración.

En condiciones de medio ajustado, más restrictivas que en el caso anterior, *P. aeruginosa* mostró una mayor resistencia a la combinación péptido-novobiocina. En estas condiciones, los péptidos P2 apenas mostraron actividad permeabilizante, mientras que los péptidos P4 demostraron ser activos incluso a bajas concentraciones. Los mejores permeabilizantes P4 fueron los péptidos P4-1, P4-2, y en menor medida P4-5. Los dos primeros fueron capaces de disminuir hasta 8 y 64 veces, respectivamente, la CMI de la novobiocina cuando se ensayaron a concentraciones de 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en cambio, los péptidos P2 sólo mostraron cierta actividad a la máxima concentración probada (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabla 1.2: Actividad antimicrobiana y potenciadora de la acción de la novobiocina de los mejores péptidos de la generación P2 y P4 frente a *Pseudomonas aeruginosa* 4158 Ps4 en medio con cationes ajustados (MHA; valor a la izquierda) y con cationes no ajustados (MHNA; valor a la derecha).

Péptidos	CMI ¹ Péptido (µg/mL)	CMI de la novobiocina a la concentración de péptido indicada (µg/mL)					CIF ² mín	CCMI ³
		0	6,25	12,5	25	50		
PMBN	2048/32	512/512	1/16	1/16	4/8	8/nc ⁴	0,008/0,028	64/64 (25)
P2-15	1024/64	512/1024	512/256	256/16	128/2	32/nc	0,111/0,216	16/512 (25)
P2-25	512/64	512/1024	512/512	512/32	512/4	32/0,5	0,16/0,781	16/2048
P2-27	1024/64	512/1024	512/128	512/8	512/nc	512/nc	>0,5/0,208	1/128 (12,5)
P2-29	512/32	512/1024	512/512	512/256	512/1	2/nc	0,101/>0,5	256/512 (25)
P2-30	128/32	512/1024	512/512	512/256	512/2	1/0,25	0,392/>0,5	512/4096
P2-33	1024/64	512/1024	512/128	512/32	512/8	256/1	>0,5/0,225	2/1024
P4-1	512/128	512/1024	128/32	64/16	16/8	16/8	0,08/0,08	32/512
P4-2	128/16	1024/1024	512/4	16/nc	8/nc	8/nc	0,11/0,39	128/256 (6,25)
P4-3	1024/256	1024/1024	1024/1024	1024/64	1024/32	64/4	0,11/0,11	16/256
P4-5	256/32	512/512	512/16	512/4	16/1	2/nc	0,13/0,23	256/512 (25)
P4-6	2048/1024	1024/1024	1024/1024	1024/128	1024/32	64/16	1,00/0,06	1/64
P4-7	512/128	512/1024	512/1024	512/128	512/32	32/8	0,16/0,22	16/128
P4-10	128/128	512/1024	512/1024	512/2	512/1	2/1	0,39/0,10	256/1024
P4-12	1024/256	1024/512	512/64	128/16	64/8	32/8	0,22/0,08	32/64
P4-14	512/512	1024/1024	1024/1024	1024/32	1024/16	32/8	0,13/0,13	32/128
P4-15	512/128	1024/1024	1024/1024	1024/16	1024/4	8/2	0,11/0,13	128/512
P4-16	1024/512	1024/1024	1024/1024	1024/128	1024/64	64/16	0,11/0,11	16/64

¹ Concentración mínima inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en caldo Müller-Hinton con cationes ajustados/ no ajustados.

² Índice mínimo de concentración inhibitoria fraccionada (determinado mediante ensayo *checkerboard* como en 1).

³ Cociente de CMI de la novobiocina (determinado mediante ensayo *checkerboard* igual que en 1) en ausencia y presencia de 50 µg/mL de péptido. Los cocientes de CMI que se calcularon a otra concentración de péptido diferente, ésta se indica entre paréntesis.

⁴ no crecimiento del control tratado sólo con péptido, es decir, el crecimiento bacteriano fue inhibido sólo por el péptido a la concentración indicada.

Evaluación de la actividad sinérgica y bactericida de los péptidos P4 y la novobiocina frente a *Pseudomonas aeruginosa* 4158 Ps4 mediante curvas de letalidad

Para investigar la fiabilidad de los resultados de sinergia obtenidos por el método *checkerboard*, se repitieron estos estudios empleando un método alternativo, las curvas de letalidad (*killing curves*). Este método es considerado por muchos autores como el de referencia para evaluar la actividad sinérgica de agentes antimicrobianos (Eliopoulos and Moellering, Jr., 2011). Además y a diferencia de los ensayos de tipo *checkerboard*, los experimentos de curvas de letalidad permiten obtener información sobre la capacidad bactericida de las combinaciones de antimicrobianos y sobre la cinética de muerte bacteriana. Para poder comparar los resultados de ambas metodologías, se realizaron los ensayos de curvas de letalidad empleando péptidos de muy variada actividad sinérgica, de acuerdo con los resultados proporcionados por los ensayos *checkerboard* realizados en medio con cationes divalentes MHA. Como representantes de los mejores permeabilizantes se escogieron los péptidos P4-1, P4-2 y P4-5, mientras que como compuesto de actividad intermedia se empleó P4-14, y como péptido carente de actividad sinérgica a las concentraciones ensayadas se seleccionó P4-19.

En los ensayos de curvas de letalidad se evaluaron dos concentraciones subinhibitorias del péptido, CMI/10 y CMI/20, y se combinaron con una concentración 1/10 de la CMI de la novobiocina frente a la cepa *P. aeruginosa* 4158 Ps4. Siguiendo lo descrito por algunos autores (Eliopoulos and Moellering, Jr., 2011; Glew and Pavuk, 1984), los resultados se interpretaron de la siguiente manera: se definió como sinérgica una combinación que, tras 24 horas de incubación, provocaba una reducción de la población bacteriana de 100 veces o más respecto a la reducción causada por el compuesto más activo en solitario; si dicha reducción ocurría en las primeras 6 horas de incubación la sinergia se consideraba como temprana; si la combinación no alcanzaba el nivel de actividad para considerarla sinérgica se clasificaba como indiferente.

Como se observa en la Figura 1.3, los tres péptidos que habían demostrado mayor capacidad permeabilizante en los ensayos *checkerboard* formaron combinaciones bactericidas de potencia similar cuando se combinaron con la novobiocina a la máxima concentración. Aunque en los tres casos se detectó sinergia temprana, sólo el péptido P4-1 fue capaz de formar combinaciones sinérgicas tras 24 horas de tratamiento.

Además, dicha capacidad se observó a las dos concentraciones ensayadas, causando en ambos casos una reducción de la población bacteriana de más de 4 logaritmos. Por otra parte, el péptido P4-5 demostró ser más potente que el P4-2, pues el primero fue capaz de formar combinaciones sinérgicas tempranas a ambas concentraciones ensayadas, mientras que el segundo actuó sinérgicamente sólo a la mayor concentración ensayada (1/10 de su CMI). Además, P4-5 fue el compuesto con acción bactericida más rápida mostrándose capaz de reducir en más de 10.000 veces la población bacteriana inicial durante las tres primeras horas a las dos concentraciones evaluadas (Figura A3). Estos resultados demuestran que los tres compuestos permeabilizan la envoltura de *P. aeruginosa* de manera rápida, intensa y en algunos casos muy persistente.

Por el contrario, el péptido P4-14, en combinación con la novobiocina, sólo produjo un leve descenso de la población bacteriana a la concentración más alta evaluada tras 8 horas de incubación. Además, su acción fue notablemente más lenta que en los tres casos anteriores, lo que pone de manifiesto la inferior capacidad permeabilizante del compuesto P4-14. Por último, el péptido P4-19 mostró una nula actividad sinérgica en combinación con la novobiocina (Figuras B y C). Estos resultados indican que las dos metodologías empleadas en el presente trabajo para la determinación de la capacidad sinérgica proporcionan información comparable.

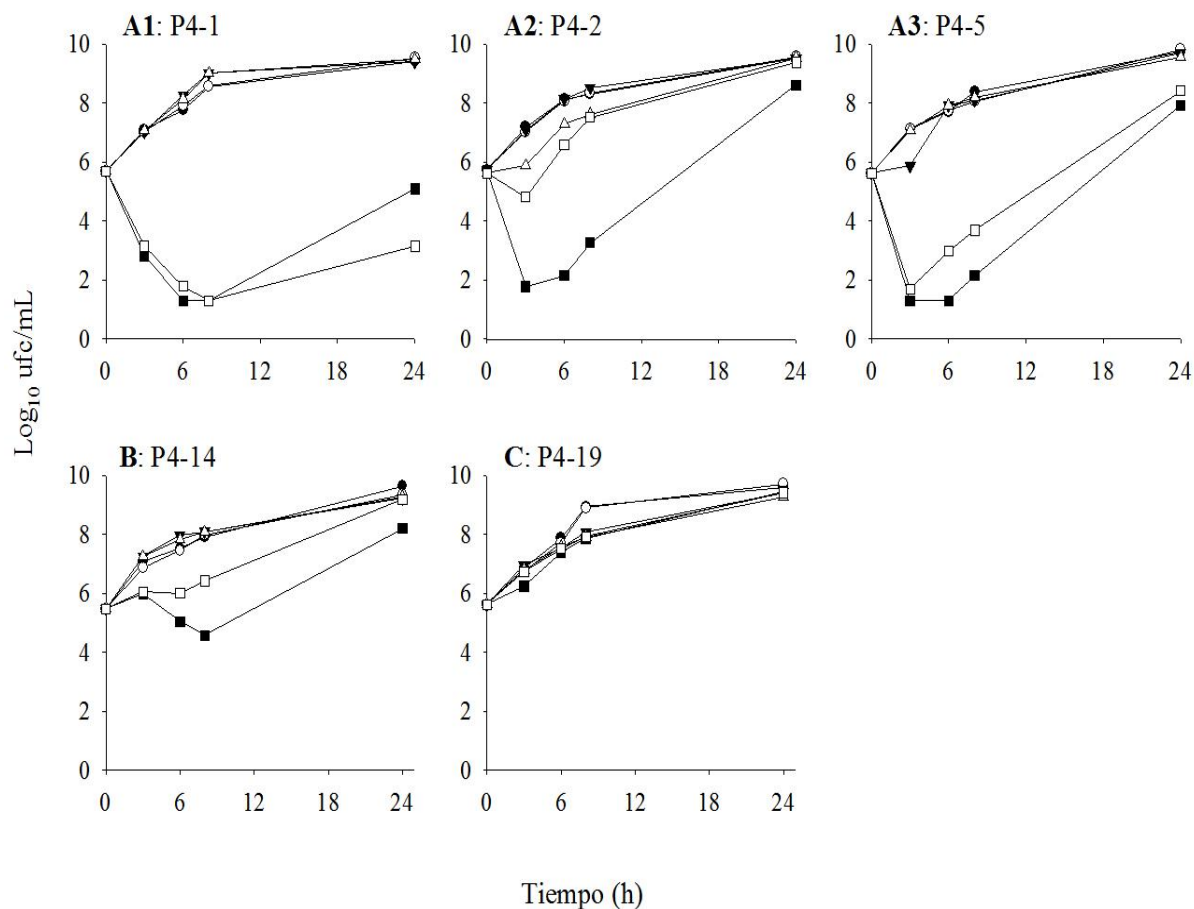


Figura 1.3: Curvas de letalidad. Determinación de la cinética de potenciación de la novobiocina en *Pseudomonas aeruginosa* 4158 Ps4 por parte de péptidos de la 4ª generación. Las Figuras representadas en A, B y C muestran los resultados obtenidos empleando compuestos clasificados por la técnica del tablero como de alta, media, y baja actividad sinérgica, respectivamente. En el tiempo 0 se añadieron a los cultivos las combinaciones péptido-novobiocina y se realizaron recuentos de viables a intervalos de tiempo de 0, 3, 6, 8 y 24 horas desde el comienzo de la incubación. En paralelo a estos ensayos, se realizó el seguimiento del crecimiento de cultivos sin tratar o tratados sólo con los péptidos o sólo con la novobiocina: ●: control de crecimiento; ○: novobiocina sola a 1/10 su CMI; ▼: péptido solo a 1/10 su CMI; △: péptido solo a 1/20 su CMI; ■: combinación de novobiocina a 1/10 su CMI y péptido a 1/10 su CMI; □: combinación de novobiocina a 1/10 su CMI y péptido a 1/20 su CMI.

Análisis complementarios y estudios de correlación de parámetros con interés en terapia antimicrobiana y antiendotóxica

La disponibilidad de los péptidos P4 hacía posible llevar a cabo una caracterización detallada de otras actividades biológicas distintas a la actividad permeabilizante y así estudiar si existe alguna asociación entre parámetros con interés terapéutico. Para ello, se procedió a analizar propiedades tales como: i) actividad antimicrobiana frente a cepas gramnegativas y grampositivas; ii) capacidad antiendotóxica; iii) toxicidad celular y capacidad hemolítica.

Actividad antimicrobiana

Para estudiar la susceptibilidad de los aislamientos clínicos y las cepas de laboratorio a los péptidos P4, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) empleando la técnica de microdilución en caldo MHA (según normas de la CLSI).

Como se puede apreciar en la Tabla 1.3, con frecuencia la CMI de los péptidos P4 era marcadamente inferior a su CMB, lo que indica que estos compuestos tienen un mecanismo de acción bacteriostático a baja concentración. Este hecho distingue a los péptidos P4 de sus precursores de primera y segunda generación, que habían sido diseñados no como agentes permeabilizantes, sino como bactericidas. Por otra parte, las cepas bacterianas mostraron marcadas diferencias de sensibilidad a los péptidos P4. Así, la cepa clínica multiresistente *P. aeruginosa* 4158 Ps4 mostró una buena sensibilidad a la PMB pero un nivel de resistencia muy alto a los péptidos P4, excepto a algunos compuestos como P4-8 y P4-9. Este efecto es debido, probablemente, a los mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos que esta bacteria posee (Sánchez-Gómez, 2008). Por otra parte, *B. bronchiseptica* 11844-99 fue la especie más sensible a los péptidos y *E. coli* ATCC 25922 mostró un nivel de sensibilidad intermedio. Aunque los péptidos P4 se diseñaron específicamente para permeabilizar la envoltura celular de bacterias gramnegativas, algunos compuestos mostraron una buena actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC 25923. Por ejemplo, la CMI del compuesto P4-18 sobre esta bacteria fue de sólo 2 µg/mL. En general, una buena actividad frente a gramnegativos se asoció también a una elevada capacidad inhibitoria sobre *S. aureus* (por ejemplo, los resultados obtenidos con los compuestos P4-8, P4-9 y P4-17). Este hecho distinguió claramente a los péptidos P4 de la PMB, que se mostró muy poco activa sobre *S. aureus*. Por último, también se identificaron péptidos con baja actividad sobre gramnegativos y con buena CMI frente a *S. aureus*, como el compuesto P4-20.

Tabla 1.3: Actividad antimicrobiana de los péptidos P4 frente a varias cepas bacterianas

Péptido	CMI (CMB) ¹ µg/mL			
	<i>Bordetella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus</i>
	<i>bronchiseptica</i> CUN 11844-99	<i>aeruginosa</i> CUN 4158-02	ATCC 25922	<i>aureus</i> ATCC 25923
PMB	2 (8)	1 (1)	0,5 (0,5)	32 (32)
P4-1	4 (8)	512 (512)	64 (512)	16 (128)
P4-2	4 (8)	128 (>512)	32 (32)	16 (16)
P4-3	16 (32)	>512 (>512)	16 (16)	16 (512)
P4-4	512 (>512)	>512 (>512)	512 (>512)	512 (>512)
P4-5	8 (8)	256 (>512)	32 (32)	32 (32)
P4-6	16 (>512)	>512 (>512)	128 (128)	128 (>512)
P4-7	32 (64)	512 (>512)	64 (64)	64 (64)
P4-8	4 (4)	16 (128)	8 (16)	8 (32)
P4-9	4 (128)	16 (128)	8 (16)	4 (8)
P4-10	8 (128)	512 (>512)	16 (128)	16 (64)
P4-11	8 (128)	128 (512)	16 (128)	8 (64)
P4-12	16 (256)	512 (>512)	64 (64)	64 (64)
P4-13	128 (>512)	>512 (>512)	>512 (>512)	512 (>512)
P4-14	16 (128)	512 (>512)	32 (64)	16 (16)
P4-15	8 (32)	512 (>512)	64 (64)	16 (32)
P4-16	16 (256)	>512 (>512)	32 (128)	32 (128)
P4-17	8 (512)	256 (>512)	16 (64)	4 (8)
P4-18	4 (256)	64 (>512)	16 (32)	2 (32)
P4-19	32 (>512)	>512 (>512)	512 (>512)	4 256
P4-20	128 (128)	>512 (>512)	512 (>512)	4 (256)

¹ Concentración mínima inhibitoria (o bactericida, entre paréntesis) determinada mediante la técnica convencional de microdilución en caldo MHA, según el protocolo de la CLSI.

Afinidad de los péptidos por el LPS *in vitro*

La afinidad de los péptidos por el lipopolisacárido liso (estructura completa: cadena O, núcleo y lípido A; LPS-S) se cuantificó mediante un ensayo que emplea un complejo fluorescente formado por el fluorocromo *Bodipy* y la amina cadaverina. Concretamente, el ensayo cuantifica la capacidad de los péptidos para desplazar al complejo *Bodipy*-cadaverina (BC) de la región del LPS donde éste se une. El ensayo se basa en que la fluorescencia de la BC ligada al LPS es mucho menor que en solución, por lo que si un péptido se une al LPS, la BC es desplazada y su fluorescencia aumenta de manera proporcional al desplazamiento. En estudios previos, se confirmó que los péptidos carecían de fluorescencia.

Por otra parte, se evaluó la capacidad de los péptidos para inhibir la liberación de TNF α inducido por el LPS en células mononucleares. Estos estudios se basan en la capacidad que las células mononucleares humanas (CMNh) poseen para reconocer mediante receptores específicos el LPS, y desencadenar una producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF α y varias interleuquinas. Por tanto, la capacidad de los péptidos para unirse y neutralizar la endotoxicidad del LPS se manifestará en un descenso en los niveles de TNF α cuando el LPS se incubaba previamente con el péptido. Como control de máximo desplazamiento de BC y de máxima inhibición de la liberación de TNF α se utilizó la polimixina B (PMB), uno de los policonjugados con mayor afinidad por el LPS que se conocen.

En la Tabla 1.4 se muestran los resultados de estos estudios expresados como porcentaje de desplazamiento de BC y porcentaje de inhibición de la liberación de TNF α por parte de los péptidos respecto a la de PMB (100 %). Ninguno de los péptidos estudiados fue capaz de superar al lipopéptido PMB en capacidad de desplazamiento de la BC. Sin embargo, 6 de los 20 péptidos evaluados mostraron porcentajes de desplazamiento cercanos o ligeramente superiores al 50 %, que fue el porcentaje obtenido para el derivado no acilado de PMB (PMBN). Se identificó un péptido, el P4-6, que alcanzó niveles de desplazamiento cercanos a la PMB (80 %). En relación con la inhibición de la producción de TNF α , 10 de los 20 compuestos estudiados fueron capaces de inhibir la producción de TNF α por encima del 60 % cuando se incubaron con el LPS a la concentración de péptido más baja de las ensayadas. En estas condiciones, se identificaron 6 péptidos (P4-1, P4-2, P4-5, P4-8, P4-9 y P4-11) con una capacidad inhibitoria por encima del 72 % de la de la PMB. Cuando se aumentó la cantidad de péptido en el ensayo, este valor igualó o superó el 89 % de inhibición para los compuestos P4-1, P4-8, P4-9, P4-11 y P4-19.

Por otra parte, se observó que algunos péptidos (compuestos P4-4, P4-16 y P4-20) cuando se combinaban con el LPS eran capaces de producir un aumento de la liberación de TNF α con respecto a los niveles alcanzados por el LPS solo. Este hecho sugería que el péptido podía tener actividad inductora de TNF α por sí mismo. Sin embargo, en estudios posteriores se demostró que ninguno de estos compuestos por sí solo era capaz de inducir la liberación de niveles apreciables de TNF α (datos no mostrados).

Por último, ningún péptido evaluado fue capaz de combinar niveles altos de desplazamiento de BC con una significativa inhibición de la liberación de TNF α . Únicamente los péptidos P4-1 y P4-8 fueron capaces de desplazar la BC en torno a un 50 % y a su vez inhibir la producción de TNF α entre un 80 y un 90 %. Por todo ello, se puede deducir que las dos metodologías empleadas para cuantificar la afinidad de los péptidos por el LPS proporcionan información diferente.

Tabla 1.4: Cuantificación de la afinidad de los péptidos por el LPS de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mediante un método directo (desplazamiento del complejo Bodipy-cadaverina) y otro indirecto (inhibición de la liberación de TNF α inducida por el LPS de PAO1 en células mononucleares humanas).

Péptido	% Desplazamiento \pm DT LPS ¹ PAO1	% Inhibición liberación TNF α a la razón LPS ² :péptido indicada	
		1:40	1:100
		PMB ³	100
PMBN	50 \pm 1	nd ⁴	nd
LF-11	19 \pm 2	nd	nd
P4-1	54 \pm 15	78 \pm 6**	92,8 \pm 3**
P4-2	25 \pm 5	84,2 \pm 5**	80,7 \pm 9*
P4-3	47 \pm 20	-10 \pm 5	87,3 \pm 8*
P4-4	45 \pm 6	-48 \pm 6	-42 \pm 13
P4-5	23 \pm 1	76 \pm 2**	83,5 \pm 4*
P4-6	80 \pm 10	8,9 \pm 2	23,1 \pm 5
P4-7	34 \pm 11	62,4 \pm 10	78,51 \pm 4
P4-8	54 \pm 9	81,6 \pm 1**	90,5 \pm 8**
P4-9	20 \pm 1	72,5 \pm 3*	99,8 \pm 8***
P4-10	32 \pm 2	68,1 \pm 7*	69 \pm 7
P4-11	11 \pm 4	80,3 \pm 4**	89,5 \pm 6**
P4-12	53 \pm 2	43,9 \pm 5	64,3 \pm 9
P4-13	26 \pm 11	-3,6 \pm 12	15,7 \pm 8
P4-14	27 \pm 2	3,88 \pm 3	4,39 \pm 5
P4-15	10 \pm 3	15,1 \pm 7	23,6 \pm 3
P4-16	42 \pm 5	-27,3 \pm 13	-32,1 \pm 15
P4-17	23 \pm 3	55,3 \pm 6	77,3 \pm 10
P4-18	23 \pm 4	61,4 \pm 4	76,9 \pm 6
P4-19	4 \pm 1	64,6 \pm 2	89,9 \pm 9**
P4-20	11 \pm 1	-24,1 \pm 11	-54,1 \pm 8

¹La concentración de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 utilizado en este estudio fue de 1,25 μ g/mL y la de los péptidos 12,5 μ g/mL.

²La concentración de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 utilizado en este estudio fue de 1 μ g/mL.

³Se tomaron los valores de desplazamiento y de inhibición de la liberación de TNF α de la PMB como el 100%, y se calcularon el resto de porcentajes en función de éste.

⁴no determinado.

Las diferencias estadísticas se analizaron respecto del grupo control (sin péptido) con el test ANOVA-Scheffé, * (p<0,05): diferencias significativas ** (p<0,01): diferencias muy significativas *** (p<0,001): diferencias altamente significativas.

Toxicidad celular y actividad hemolítica de los péptidos

La citotoxicidad de los péptidos se determinó sobre la línea celular de fibroblastos humanos, empleando el método del metiltetrazolio (MTT). Este compuesto cambia de color dependiendo de su estado de oxidación-reducción e informa sobre el nivel

de la respiración oxidativa mitocondrial, permitiendo así evaluar la supervivencia celular tras un determinado tratamiento. Para la cuantificación de la supervivencia celular, se calculó la concentración máxima inhibitoria 50 (CI₅₀) y la concentración máxima inhibitoria 80 (CI₈₀), es decir, las concentraciones a las cuales se inhibe el crecimiento del 50 % y el 80 % de las células, respectivamente. Los resultados se evaluaron a las 24 h y como controles positivos de actividad citotóxica se emplearon dimetilsulfóxido (DMSO) y melitina, un péptido obtenido del veneno de la abeja con conocida acción hemolítica y citotóxica. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con los mejores permeabilizantes de entre los péptidos P4. En experimentos independientes, se estudió la actividad hemolítica de todos los péptidos P4 empleando eritrocitos humanos expuestos a los péptidos durante 30 minutos o 24 horas. Los resultados se expresaron como dosis hemolítica 50 (DH₅₀) y dosis hemolítica 80 (DH₈₀), es decir, las concentraciones a las cuales se lisan el 50 % y el 80 % de los eritrocitos, respectivamente. Como control de 100 % de lisis se utilizó Tritón, un potente detergente que produce la lisis total de los eritrocitos.

En la Tabla 1.5 se muestran los resultados de la toxicidad celular y la actividad hemolítica de los péptidos. Ninguno de los péptidos ensayados mostró una CI₅₀ menor de 160 µg/mL tras 24 horas de incubación, lo que sugiere que los péptidos a las concentraciones a las que potencian la acción de antibióticos en bacterias tienen un efecto nulo o muy poco significativo sobre la respiración celular. Sin embargo, el péptido P4-18 mostró una DH₅₀ menor de 50 µg/mL tras una incubación de 30 min y los compuestos P4-11 y P4-18 alcanzaron también ese nivel de hemólisis tras una incubación de 24 h. Además, para P4-18 apenas variaron las DH₅₀ y DH₈₀ cuando se trataron 30 min o 24 horas, lo que sugiere que este péptido produce una lisis rápida de los eritrocitos humanos. Sin embargo, las DH₅₀ y DH₈₀ del P4-11 y P4-17 fueron mucho menores (más tóxicos) tras 24 horas de incubación, un dato indicativo de que la toxicidad producida por estos péptidos es más progresiva.

Tabla 1.5: Actividad hemolítica y citotoxicidad de los péptidos P4 determinadas sobre eritrocitos humanos y fibroblastos dérmicos humanos, respectivamente.

Péptido	Eritrocitos humanos				Fibroblastos humanos	
	30 min		24 h		24 h	
	DH ₅₀ ¹	DH ₈₀ ²	DH ₅₀	DH ₈₀	CI ₅₀ ³	CI ₈₀ ⁴
DMSO ⁵	nd ⁶	nd	nd	nd	4,5	7
Melitina ⁷	4,92	7,87	5,24	11,87	5,48	11,09
PMB	>200	>200	>200	>200	200	>200
P4-1	>200	>200	>200	>200	>200	>200
P4-2	>200	>200	>200	>200	nd	nd
P4-3	>200	>200	>200	>200	nd	nd
P4-4	>200	>200	>200	>200	nd	nd
P4-5	>200	>200	>200	>200	>200	>200
P4-6	>200	>200	>200	>200	nd	nd
P4-7	>200	>200	>200	>200	>200	>200
P4-8	>200	>200	>200	>200	>200	>200
P4-9	>200	>200	127,3	>200	164	>200
P4-10	>200	>200	182,1	>200	>200	>200
P4-11	154,96	176,50	37,0	67,6	nd	nd
P4-12	>200	>200	>200	>200	nd	nd
P4-13	>200	>200	>200	>200	nd	nd
P4-14	>200	>200	>200	>200	nd	nd
P4-15	202,57	274	198,3	>200	>200	>200
P4-16	>200	>200	>200	>200	nd	nd
P4-17	80,21	131,31	39,2	75,8	nd	nd
P4-18	34,38	47,37	29,7	43,0	nd	nd
P4-19	>200	>200	>200	>200	nd	nd
P4-20	>200	>200	>200	>200	nd	nd

¹ Dosis hemolítica (µg/mL) máxima a la cual se lisan el 50 % de los eritrocitos (se consideró el 100 % de hemólisis la ocasionada tras la adición de detergente Tritón X-100).

² Dosis hemolítica (µg/mL) máxima a la cual se lisan el 80 % de los eritrocitos.

³ Concentración inhibitoria máxima (µg/mL) a la cual se inhibe el metabolismo celular del 50 % de las células.

⁴ Concentración inhibitoria máxima (µg/mL) a la cual se inhibe el metabolismo celular del 80 % de las células.

⁵ Se empleó DMSO (dimetilsulfóxido) como el agente químico control de máxima toxicidad celular.

⁶ no determinado

⁷ Se empleó Melitina como péptido control de máxima toxicidad celular y actividad hemolítica.

Estudios de correlación de parámetros con interés en terapia antimicrobiana y antiendotóxica y análisis de relación estructura- actividad de los péptidos P4

Para determinar la posible asociación entre las diferentes actividades de los péptidos, se seleccionaron las variables independientes cuantitativas que se analizaron en este capítulo. Los parámetros seleccionados fueron los siguientes: la CMI de los péptidos frente a *P. aeruginosa* 4158 Ps4, CIF de la combinación péptido-novobiocina, porcentaje de desplazamiento de Bodipy-cadaverina (BC), inhibición de la liberación de TNF α en células mononucleares humanas a dos relaciones LPS- péptido distintas (1:40 y 1:100), toxicidad en fibroblastos humanos y la capacidad hemolítica. Los resultados de los test de correlación de Spearman y su significación estadística asociada se muestran en la Tabla 1.6.

Por otra parte, se estudió la relación estructura-actividad correlacionando algunos de los descriptores PEDES utilizados en la optimización de secuencias peptídicas con los resultados de los parámetros estudiados en este capítulo. De esta manera, se intentó identificar una posible asociación estadística entre las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los péptidos y su actividad biológica experimental (Tabla 1.7). Para ello, se realizaron test estadísticos de correlación Rho de Spearman y se fijó una significación bilateral del 5 %.

La CMI frente a Ps4 mostró una asociación estadística negativa ($p = 0,001$) con la inhibición de la liberación de TNF α a las dos ratios estudiadas. Es decir, los mejores antimicrobianos coincidieron con los péptidos que tenían mayor capacidad de unirse y neutralizar el LPS. Además, se observó una correlación negativa entre la CIF mínima y el porcentaje de desplazamiento de la BC, que mide la afinidad de los péptidos por el LPS. Esto significa que, cuanto mayor es la afinidad de los péptidos por el LPS, mayor es su capacidad de permeabilizar la envoltura de Ps4.

Muchos de los péptidos estudiados en este trabajo no mostraron buena actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* 4158 Ps4, salvo los péptidos P4-5, P4-8, P4-9, P4-17 y P4-18 ($CMI \leq 32 \mu\text{g/mL}$). Así, como se muestra en la Tabla 1.7, se identificó una correlación estadísticamente significativa entre la longitud de la secuencia o el número de residuos hidrofóbicos y la actividad antimicrobiana. Además, ambos descriptores también mostraron correlación positiva con la capacidad de inhibición de TNF α . No obstante, no sólo la longitud determina la actividad pues el péptido más largo

de todos (P4-16, con 14 aminoácidos) no fue capaz ni de sensibilizar a la cepa *P. aeruginosa* 4158 Ps4, ni de disminuir los niveles de TNF α en el estudio de inducción de esta citoquina.

Por otra parte, los resultados demuestran que el número de triptófanos presentes en la secuencia está asociado a una menor capacidad permeabilizante, y una pérdida de la afinidad por LPS. Por último, no se encontraron diferencias significativas en el test de correlación de Spearman que comparó la hidrofobicidad de los péptidos y las propiedades biológicas en estudio. No obstante, se observó una ligera tendencia a que los péptidos menos hidrofóbicos (índice Gravy más negativo) mostraran mejor capacidad permeabilizante y los más hidrofóbicos (índice Gravy más positivo) fueran mejores antimicrobianos.

En el anexo 3A se muestran algunas propiedades fisicoquímicas de los péptidos P4.

Tabla 1.6: Valores de correlación Rho de Spearman entre varias propiedades de los péptidos P4

Parámetro	CMI Ps4	CIFmín	Bodipy-cadaverina	Inhibición TNF α 1:40	Inhibición TNF α 1:100	Citotoxicidad (IC50)	Hemólisis (DH50)
CMI Ps4	1,00	-0,14	0,02	-0,69 **	-0,65 **	0,50 *	0,50 *
CIFmín	-0,14	1,00	-0,70 **	-0,00	0,07	0,06	-0,41
Bodipy-cadaverina	0,02	-0,70 **	1,00	0,03	0,08	-0,09	0,50 *
Inhibición TNF α 1:40	-0,69 **	-0,00	0,03	1,00	0,83 **	-0,37	-0,19
Inhibición TNF α 1:100	-0,65 **	0,07	0,08	0,83 **	1,00	-0,51 *	-0,14
Citotoxicidad (IC50)	0,50 *	0,06	-0,09	-0,37	-0,51 *	1,00	0,15
Hemólisis (DH50)	0,50 *	-0,41	0,50 *	-0,19	-0,14	0,15	1,00

* Correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$)** Correlación estadísticamente muy significativa ($p < 0,01$)**Tabla 1.7:** Valores de correlación Rho de Spearman de análisis de estructura- actividad de los péptidos P4¹.

Descriptor	CMI Ps4	CIF mín	Bodipy-cadaverina	Inhibición TNF α 1:40	Inhibición TNF α 1:100	Citotoxicidad (IC50)	Hemólisis (DH50)
Peso molecular	-0,54 *	0,05	0,16	0,42	0,61 **	-0,34	-0,13
nº de aminoácidos	-0,55 *	0,07	0,18	0,36	0,57 **	-0,32	-0,16
nº de W ²	-0,17	0,53 *	-0,74 **	0,15	0,11	-0,17	-0,51 *
nº residuos hidrofóbicos	-0,5 *	0,56 *	-0,26	0,4	0,52 *	-0,32	-0,36
nº residuos básicos	-0,36	-0,29	0,55 *	0,25	0,42	-0,31	0,22
Densidad básica	0,08	-0,43	0,56 *	0,06	0,02	-0,04	0,46 *
Hidrofobicidad	-0,24	0,41	-0,28	0,21	0,13	0,06	-0,27
Momento hidrofóbico	0,45 *	0,07	0,80	0,33	0,29	-0,22	0,34

¹ Considerando un aumento para los descriptores, una correlación negativa con CMI, CIF, citotoxicidad y hemólisis implica una mayor actividad; una correlación positiva con Bodipy-cadaverina e inhibición de TNF implica una mayor actividad.² Triptófano* Correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$). ** Correlación estadísticamente muy significativa ($p < 0,01$)

CAPÍTULO 2:

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
POTENCIADORA DE ANTIBIÓTICOS DE LOS
PÉPTIDOS P5 FRENTE A *P. AERUGINOSA* *IN*
VITRO E *IN VIVO***

CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD POTENCIADORA DE ANTIBIÓTICOS DE LOS PÉPTIDOS P5 FRENTE A *P. aeruginosa* IN VITRO E IN VIVO

Desarrollo de un modelo cuantitativo de relación estructura química-actividad (QSAR) para el diseño de péptidos con actividad potenciadora de antibióticos

Los resultados obtenidos hasta el momento demostraban que, mediante un análisis QSAR, era posible diseñar péptidos con actividad permeabilizante mejorada respecto a los compuestos de partida. Sin embargo, nuestro estudio sugería que los mejores permeabilizantes (péptidos con los índices CIFs más bajos) correspondían frecuentemente a aquellos compuestos con menor actividad antimicrobiana (péptidos con CMI altas; Tabla 1.1.). Esta observación no se confirmó en los estudios de correlación de parámetros del capítulo anterior, donde no se detectó una asociación inversa entre la CMI y el índice CIF de los péptidos P4 (Tabla 1.6). Nuestra hipótesis es que esta falta de correlación podía deberse al pequeño número de compuestos analizados. Para investigar esta posibilidad, nos planteamos caracterizar la actividad biológica de un nuevo grupo de péptidos. A la vista de los datos obtenidos con el compuesto modelo PMBN, era evidente que aún quedaba margen de mejora de la capacidad permeabilizante de nuestros compuestos. Para intentar mejorar esa capacidad, se realizó un nuevo análisis QSAR aplicando la información experimental obtenida del estudio con los péptidos P4 y se diseñó y sintetizó una nueva generación de compuestos, denominados péptidos de quinta generación (péptidos P5; Figura 2.1).

El nuevo análisis QSAR se basó en el modelo explicado anteriormente en el capítulo 1, incorporando los datos de CMI (factor 1) e índice de CIF mínima (factor 2) obtenidos para los compuestos P1, P2 y P4 en medio MHNA. También en este caso los datos estructurales se combinaron con una regresión parcial de mínimos cuadrados o *PLS* (del inglés *partial least-square*) y se generaron un grupo de 32 descriptores estructurales y fisicoquímicos (PEDES; *Peptide descriptors from sequence*, anexo 2). Estos ensayos se realizaron en colaboración con los Drs. Roman Jerala y Bostjan Japelj del *National Institute of Chemistry*, Ljubljana, Eslovenia.

El análisis de componentes principales (ACP) para el parámetro $\log(1/\text{CMI}_{\text{péptido}})$ reveló una notable dispersión de los descriptores, probablemente debido a la variación de los valores de CMI de los péptidos (Figura 2.1A). Puesto que el

valor de CMI disminuye cuando $\log(1/\text{CMI}_{\text{péptido}})$ aumenta, el modelo predecía que los descriptores orientados en la misma dirección que el vector $\log(1/\text{factor } 1)$ en el plano factor 1- factor 2 (cuadrante superior izquierdo), aumentaban la capacidad antimicrobiana (CMI), mientras que aquellos situados en el cuadrante opuesto la disminuían. Esto permitió deducir que los descriptores que influyen positivamente en la capacidad antimicrobiana son el número de triptófanos, el número de residuos aromáticos, la máxima distancia entre triptófanos y la máxima distancia entre residuos aromáticos (Figura 2.1-A). Por el contrario, se observó una correlación negativa en los siguientes descriptores: el número de *clusters* con residuos básicos, la máxima carga del *cluster* básico, la máxima carga media de 2 residuos consecutivos y la máxima carga media de 3 residuos consecutivos. La precisión del estudio QSAR se evaluó mediante un análisis de regresión lineal múltiple empleando los 5 descriptores más importantes identificados (max_dis_W , $\text{momh}(180\text{deg})$, $\text{\%res_bas+hidrofóbcos}$, $\text{n}^{\circ}\text{hidrofóbcos}$, $\text{n}^{\circ}\text{clust_2res_hidrofóbcos}$; Tabla de descriptores, anexo 2). Como se muestra en la Figura 2.1-B, el análisis demostró la existencia de una excelente correlación ($R=0,88$, $R^2=0,79$) entre la CMI calculada para los péptidos P1, P2 y P4 y la experimental.

Por otra parte, el ACP reveló que los descriptores que mejor se correlacionaban con la actividad permeabilizante de los péptidos expresada como $\log(1/\text{CIF min})$ (factor 2) eran la densidad básica (número de residuos básicos/ longitud) y la máxima carga media de dos residuos consecutivos. Los descriptores para los que se detectó una correlación negativa incluyeron el número de residuos hidrofóbcos, la distancia media entre residuos hidrofóbcos y el número de triptófanos (Figura 2.2-A). También en este caso el análisis de regresión del modelo basado en los 5 descriptores más importantes ($\text{n}^{\circ}\text{clust_2res_básicos}$, $\text{suma_aromáticos+básicos}$, mom_anfip_lineal , $\text{max_caarg_med_2sec}$, $\text{dist_med_hidr_clust}$); Tabla de descriptores anexo 2), demostró una excelente correlación entre el índice de CIF mínima calculado y el experimental ($R=0,88$, $R^2=0,785$; Figura 2.2-B). Sobre la base de este análisis, se diseñó una nueva generación de 24 compuestos, denominados péptidos de quinta generación (péptidos P5). En el anexo 3B se muestran algunas propiedades fisicoquímicas de los péptidos P5 relevantes para este estudio.

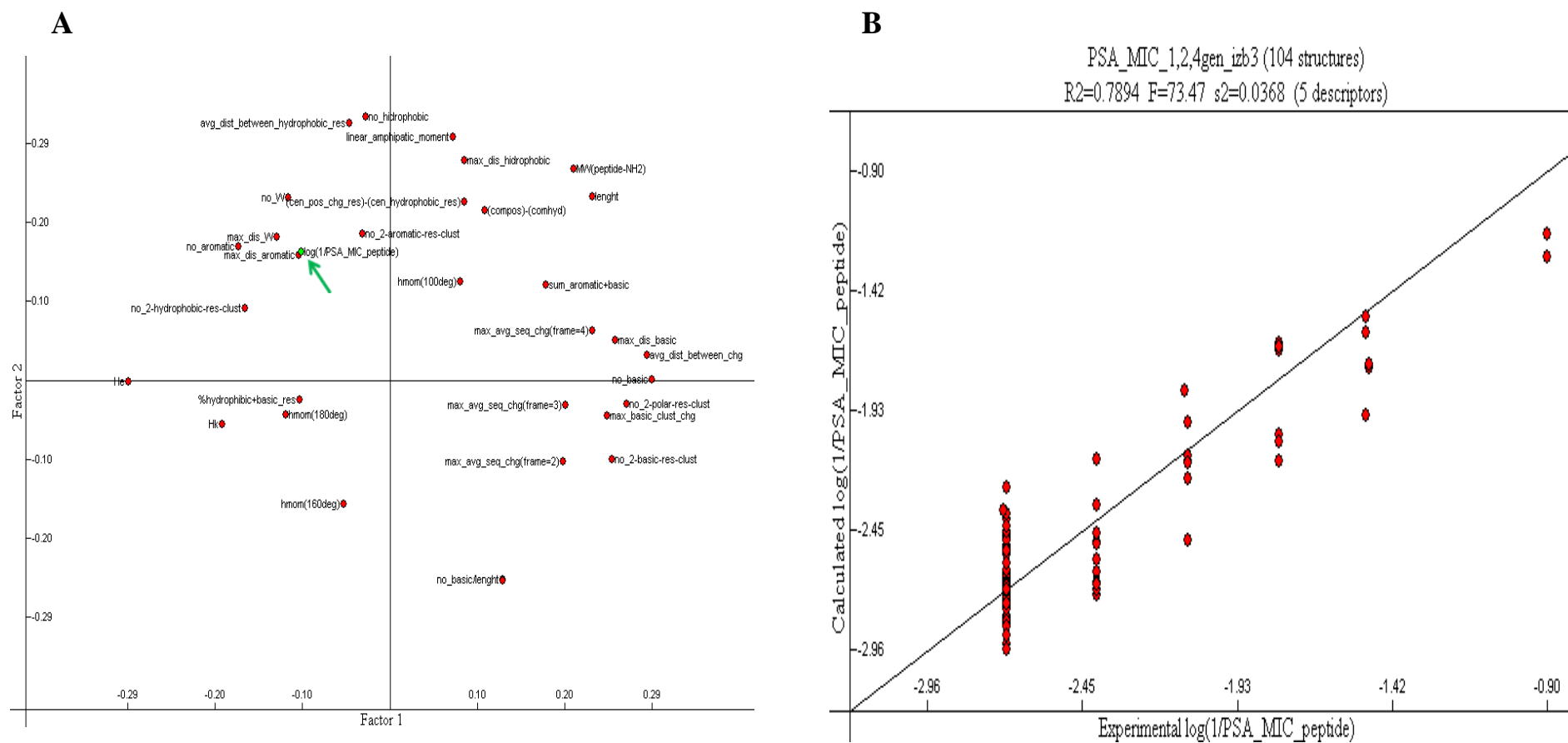


Figura 2.1- A: Análisis de componentes principales basado en los valores de CMI de las generaciones P1, P2 y P4 frente a la cepa de *P aeruginosa* 4158 Ps4. Se muestran los descriptores (puntos rojos) obtenidos y su disposición con respecto al parámetro $\log(1/MIC_{peptide})$ (punto verde; flecha verde). Los descriptores situados alrededor de este parámetro se correlacionan positivamente con él, mientras aquellos que están en el cuadrante opuesto (derecho-inferior) se correlacionaron negativamente. B: Análisis de regresión lineal múltiple (PLS-RLM) de la CMI calculada y experimental de los péptidos P1, P2 y P4 con base en los 5 descriptores más importantes obtenidos tras el estudio de ACP.

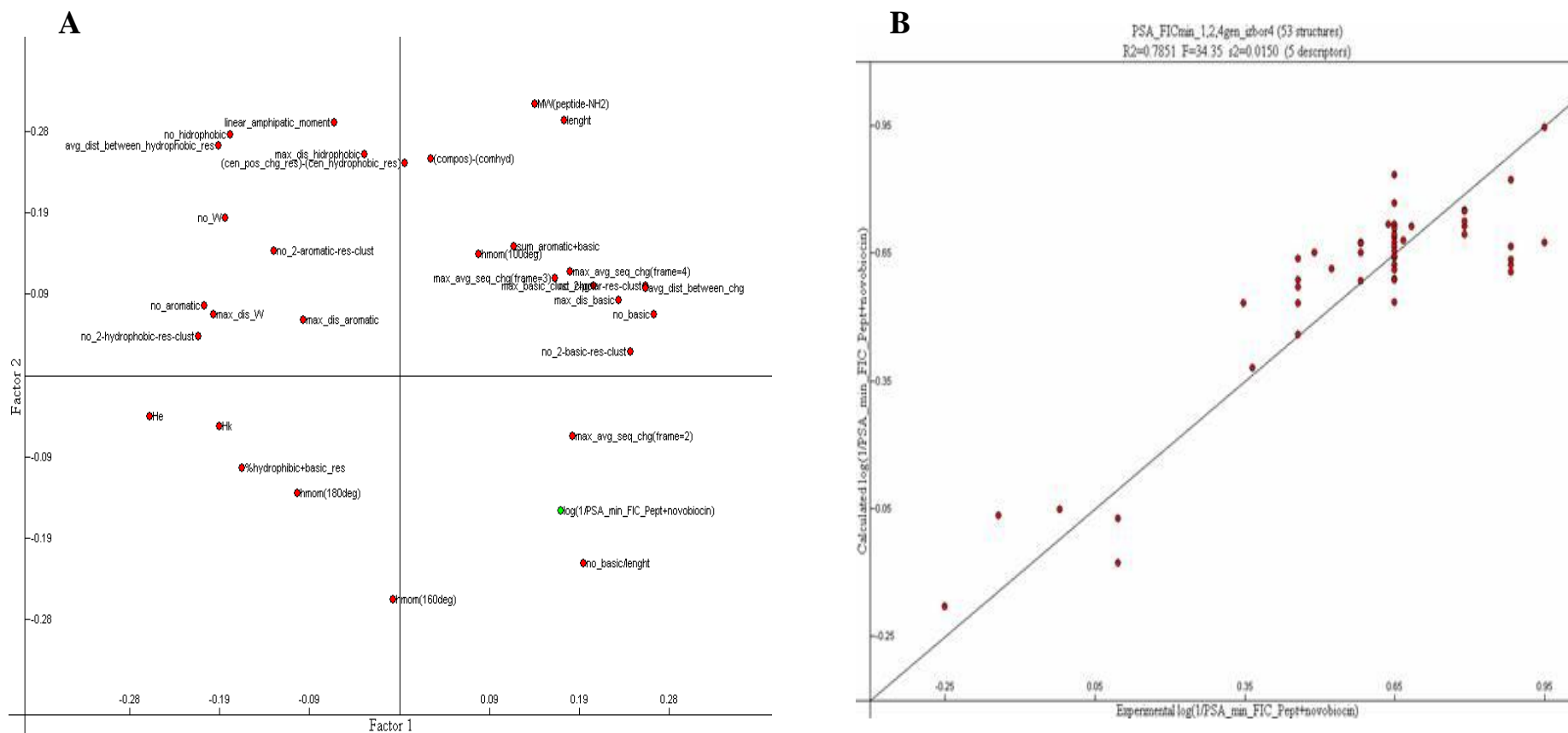


Figura 2.2- A: Análisis de componentes principales basado en los valores de índice de CIF mínima de las generaciones P1, P2 y P4 frente a la cepa de *P aeruginosa* 4158 Ps4. Se muestran los descriptores (puntos rojos) obtenidos y su disposición con respecto al parámetro $\log(1/FIC_{min})$ (punto verde). Los descriptores situados alrededor de este parámetro se correlacionan positivamente con él, mientras aquellos que están en el cuadrante opuesto (izquierdo-superior) se correlacionaron negativamente. B: Análisis de regresión lineal múltiple (PLS-RLM) de la CIF calculada y experimental de los péptidos P1, P2 y P4 con base en los 5 descriptores más importantes obtenidos tras el estudio de ACP.

Correlación entre valores de actividad permeabilizante calculada y experimental de los péptidos P5

Para evaluar la fiabilidad del estudio QSAR, las nuevas secuencias de la generación P5 se sometieron a un análisis *PLS* que generó la predicción de su actividad permeabilizante. Esto permitió elaborar un *ranking* de compuestos ordenados de menor a mayor, según su índice de CIF mínima. En paralelo, se cuantificó la actividad potenciadora de novobiocina de los péptidos P5 expresada como índice de CIF mínima y CCMI. Estos ensayos se realizaron en MHNA, que fue también el medio empleado para obtener los datos de actividad permeabilizante previos usados en el análisis QSAR. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 2.1, donde se indica la posición relativa que ocupa cada péptido en el *ranking* de actividad permeabilizante, de acuerdo con las predicciones realizadas. 21 de los 24 péptidos P5 estudiados (87,5 %) fueron capaces de formar combinaciones sinérgicas con la novobiocina, disminuyendo 4 veces o más la CMI del antibiótico a alguna de las concentraciones ensayadas en medio MHNA. Cuando las condiciones de ensayo fueron más estrictas (medio MHA), este porcentaje se redujo al 50 %. En relación con los parámetros de sinergia estudiados, aunque la CIF mínima obtenida y el cociente de CMI (CCMI) mostraron cierta correlación negativa (Rho de Spearman= -0,371), las diferencias no fueron significativas ($p=0,075$), es decir, únicamente en el 37,1 % de los casos, ambas variables se asociaron significativamente.

En la mayoría de los casos no hubo buena correlación entre la posición predicha por el análisis QSAR y la que le correspondía al compuesto por su actividad permeabilizante experimental. De hecho, el índice Rho de Spearman indicó la existencia de cierta correlación negativa entre el *ranking* predicho y el experimental, aunque tal asociación no fue estadísticamente significativa (Rho de Spearman = -0,35; $p=0,14$). Sin embargo, cuando se repitieron los ensayos empleando medio MHA, se obtuvo una correlación positiva entre la actividad permeabilizante predicha y la calculada (Rho de Spearman=0,31; $p\geq 0,05$; siguiente apartado).

Tabla 2.1: Actividad permeabilizante de los péptidos de la 5ª generación en *Pseudomonas aeruginosa* 4158 Ps4 determinada mediante ensayo *checkerboard*: actividad observada vs actividad predicha mediante análisis QSAR

Péptido	Secuencia	CMI ¹ Péptido (µg/mL)	CMI de la novobiocina a la concentración de péptido indicada (µg/mL)					CIF ² mín	CCMI ³	Ranking experimental ⁴	Ranking predicho ⁵
			0	6,25	12,5	25	50				
P5-1	F W I R I W R I W R R W NH ₂	64	1024	1024	1024	1024	nc ⁶	1,02	1	4	1
P5-2	F W R I W R W R R NH ₂	16	1024	64	nc	nc	nc	0,45	16 (6,25)	3	1
P5-3	W R R W R R W R R W R R NH ₂	16	1024	32	nc	nc	nc	0,42	32 (6,25)	3	1
P5-4	F W R I W R W R R R NH ₂	32	512	8	4	nc	nc	0,21	64	3	1
P5-5	F W R R N F W R R N I R R NH ₂	256	1024	1024	64	64	32	0,11	32	1	1
P5-6	W R R W R R R W R R W R R NH ₂	8	1024	128	nc	nc	nc	0,91	8 (6,25)	4	1
P5-7	F P W R R W I R R W N R R NH ₂	8	1024	8	nc	nc	nc	0,79	128 (6,25)	3	2
P5-8	P F W R I R W R R NH ₂	256	512	64	32	8	8	0,11	64	2	2
P5-9	F W R W R R W I R R NH ₂	64	512	8	8	2	nc	0,11	256 (25)	2	2
P5-10	F W R R F W R R V W R R NH ₂	8	1024	8	nc	nc	nc	0,79	128 (6,25)	4	2
P5-11	P F W R R W R R NH ₂	1024	1024	256	128	64	32	0,08	32	1	2
P5-12	W F R R I W R R I R R NH ₂	32	512	4	2	nc	nc	0,11	256 (12,5)	2	2
P5-13	F W R W R R V I R R NH ₂	512	1024	128	32	32	16	0,06	16	1	3
P5-14	P I W R R W N R R NH ₂	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1,00	1	4	3
P5-15	P F W R I W R R NH ₂	1024	1024	1024	1024	16	8	0,04	128	1	3
P5-16	F W R R W I R R W I R R NH ₂	4	1024	nc	nc	nc	nc	1,39	-	4	3
P5-17	F W R R I W R R NH ₂	1024	512	32	16	8	4	0,04	128	1	3
P5-18	P F W R I V R R NH ₂	1024	1024	1024	1024	256	128	0,17	8	3	3
P5-19	R R P F W R R P F W R R NH ₂	128	1024	1024	32	32	8	0,13	128	2	4
P5-20	W R R W I R R W I R R NH ₂	8	512	2	nc	nc	nc	0,40	256 (6,25)	3	4
P5-21	P W R R W I R R W I R R NH ₂	8	1024	4	nc	nc	nc	0,79	256 (6,25)	4	4
P5-22	P I W R R W I R R NH ₂	512	1024	1024	256	128	32	0,13	32	2	4
P5-23	P I W R R W I R K NH ₂	1024	1024	1024	256	64	32	0,08	32	1	4
P5-24	P W R R W I R R NH ₂	1024	1024	1024	256	256	128	0,17	8	2	4

¹ Concentración mínima inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en caldo Müeller-Hinton con cationes no ajustados.

² Índice mínimo de concentración inhibitoria fraccionada.

³ Cociente de CMI (determinado igual que en 1) en ausencia y presencia de 50 µg/mL de péptido. Las CCMI calculadas a otra concentración diferente, ésta se indica entre paréntesis.

⁴ Clasificación de los péptidos en cuanto a su CIF mínima experimental en 4 grupos. Grupo 1: el 25 % de las CIF más bajas. Grupo 2: del 25 % al 50 % de las CIF más bajas. Grupo 3: el 25 % al 50 % de las CIF más altas. Grupo 4: el 25 % de las CIF más altas.

⁵ Clasificación de los péptidos en cuanto a su CIF mínima predicha en 4 grupos. Grupo 1: el 25 % de las CIF más bajas. Grupo 2: del 25 % al 50 % de las CIF más bajas. Grupo 3: el 25 % al 50 % de las CIF más altas. Grupo 4: el 25 % de las CIF más altas.

⁶ no crecimiento del control tratado sólo con péptido, es decir, el crecimiento bacteriano fue inhibido sólo por el péptido a la concentración indicada.

Evaluación de la actividad sinérgica de los péptidos P5 y la novobiocina frente a *Pseudomonas aeruginosa* Ps4 mediante ensayo *checkerboard*

Para investigar si el nuevo análisis QSAR había proporcionado compuestos con actividad permeabilizante mejorada respecto a los péptidos anteriores se compararon los resultados de índice de CIF mínima y CCMI de los mejores permeabilizantes de la generación P5 con sus homólogos de la generación P4. Estos ensayos se realizaron empleando la técnica *checkerboard* en medio MHA y MHNA.

De nuevo, la capacidad bactericida y permeabilizante de los péptidos mejoró, en la mayoría de los casos, en medio MHNA comparado con MHA (Tabla 2.2.). De hecho, en algunos casos, como en el del compuesto P5-13, no se observó sinergia alguna en medio MHA, mientras que en medio MHNA el péptido mostraba una buena capacidad permeabilizante (índice de CIF mínima= 0,06). Un comportamiento muy similar se observó en el compuesto P4-6. En general, ningún péptido superó a PMBN, que fue capaz de producir combinaciones sinérgicas con la novobiocina incluso a la concentración más baja evaluada (0,78 µg/mL; resultado no mostrado) y en cualquiera de las dos condiciones de cultivo ensayadas. No obstante, a diferencia de lo que ocurre con los péptidos derivados de la lactoferricina, se observó un fenómeno de pérdida progresiva de la capacidad permeabilizante de PMBN en presencia de cationes a medida que su concentración aumentaba (resultado también evidente en la Tabla 1.2 del capítulo 1). Se identificaron péptidos como el P5-4, P5-9 y P5-12, que en condiciones menos restrictivas (MHNA) fueron capaces de disminuir la CMI de la novobiocina entre 128 y 256 veces a una concentración de péptido de 6,25 µg/mL. Además, el compuesto P5-12 redujo 8 veces la CMI de la novobiocina en medio MHA a una concentración de 6,25 µg/mL, mostrando una potencia permeabilizante no alcanzada por ninguno de los péptidos P4. Por otra parte, el índice CIF del péptido P5-9 (0,06) fue incluso mejor que el del compuesto más potente de la generación P4 (P4-1; CIF mín = 0,08) en medio MHA, mientras que en MHNA, el péptido P5-17 mostró la mejor CIF mínima experimental (0,04), superando también en estas condiciones la actividad sinérgica de los compuestos P4.

Por otro lado, en medio MHNA el 70,8 % de los péptidos P5 se combinó sinérgicamente con la novobiocina, mientras que sólo en el 60 % de los compuestos P4 se detectó dicha actividad. En cambio, en las condiciones experimentales más estrictas (medio MHA), el porcentaje de péptidos que actuaban en sinergia con la novobiocina se redujo y fue el mismo (55 %) para ambas generaciones. Estos resultados demuestran la capacidad del análisis QSAR para proporcionar péptidos con actividad potenciadora de antibióticos mejorada respecto a los compuestos de partida.

Tabla 2.2: Actividad potenciadora de la novobiocina de los mejores péptidos de la 4ª y 5ª generación frente a *Pseudomonas aeruginosa* 4158 Ps4 en medio MHA/MHNA determinada mediante ensayo *checkerboard*.

Péptido	CMI ¹ Péptido (µg/mL)	CMI de la novobiocina a la concentración de péptido indicada (µg/mL)					CIF ² mín	CCMI ³
		0	6,25	12,5	25	50		
PMBN	2048/32	512/512	1/16	1/16	4/8	8/nc ⁴	0,008/0,028	64/64 (25)
P4-1	512/128	512/1024	128/32	64/16	16/8	16/2	0,08/0,08	32/512
P4-2	128/16	1024/1024	512/4	16/nc	8/nc	8/nc	0,11/0,39	128/256 (6,25)
P4-3	1024/ 256	1024/ 1024	1024/ 1024	1024/ 64	1024/ 32	64/ 4	0,11/ 0,11	16/ 256
P4-5	256/ 32	512/ 512	512/ 16	512/ 4	16/ 1	2/ nc	0,13/ 0,23	256/512 (25)
P4-6	2048/ 1024	1024/ 1024	1024/ 1024	1024/ 128	1024/ 32	1024/ 16	1,00/ 0,06	1/ 64
P4-7	512/ 128	512/ 1024	512/ 1024	512/ 128	512/ 32	32/ 8	0,16/ 0,22	16/ 128
P4-10	128/ 128	512/ 1024	512/ 1024	512/ 2	512/ 1	2/ 1	0,39/ 0,10	256/ 1024
P4-12	1024/ 256	1024/ 512	512/ 64	128/ 16	64/ 8	32/ 8	0,22/ 0,08	32/ 64
P4-14	512/ 512	1024/ 1024	1024/ 1024	1024/ 32	1024/ 16	32/ 8	0,13/ 0,13	32/ 128
P4-15	512/ 128	1024/ 1024	1024/ 1024	1024/ 16	1024/ 4	8/ 2	0,11/ 0,13	128/ 512
P5-3	64/16	1024/1024	1024/32	128/nc	16/nc	nc/nc	0,32/0,42	64 (25)/32 (6,25)
P5-4	512/32	1024/512	1024/8	1024/4	32/nc	8/nc	0,08/0,21	64/128 (12,5)
P5-8	1024/256	1024/512	1024/64	1024/32	128/8	32/8	0,08/0,11	32/64
P5-9	1024/64	1024/512	1024/8	1024/8	1024/2	16/nc	0,06/0,11	64/256 (25)
P5-12	128/32	1024/512	128/4	8/2	2/nc	nc/nc	0,11/0,11	512 (25)/256 (12,5)
P5-13	1024/512	1024/1024	1024/128	1024/32	1024/32	1024/16	1,00/0,06	1/16
P5-17	1024/1024	1024/512	1024/32	1024/16	64/8	32/4	0,08/0,04	32/128
P5-19	1024/128	512/1024	512/1024	512/32	512/32	64/8	0,17/0,13	16/128
P5-20	128/8	512/512	512/2	16/nc	2/nc	1/nc	0,13/0,40	128/256 (6,25)
P5-21	32/8	512/1024	512/4	32/nc	1/nc	nc/nc	0,45/0,79	512 (25)/256 (12,5)

¹ Concentración mínima inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en caldo Müller-Hinton con cationes ajustados/ no ajustados.

² Índice mínimo de concentración inhibitoria fraccionada (determinado igual que en 1).

³ Cociente de CMI (determinado igual que en 1) en ausencia y presencia de 50 µg/mL de péptido. Las CCMI calculadas a otra concentración diferente, ésta se indica entre paréntesis.

⁴ no crecimiento del control tratado sólo con péptido, es decir, el crecimiento bacteriano fue inhibido sólo por el péptido a la concentración indicada.

Evaluación de la actividad sinérgica de los mejores péptidos P5 y antibióticos diferentes a novobiocina frente a *Pseudomonas aeruginosa* 4158-02 Ps4

Para investigar si los péptidos de la generación P5 podían potenciar la acción de antibióticos diferentes a novobiocina, se seleccionaron los compuestos que habían mostrado mayor actividad potenciadora de la novobiocina (Tabla 2.2) y se combinaron con doxiciclina, cefotaxima y azitromicina. Los péptidos analizados fueron P5-12 y P5-20. Además, se incluyeron los mejores péptidos permeabilizantes de la generación P2 y P4. Los resultados se muestran en la Tabla 2.3.

Todos los péptidos ensayados formaron combinaciones sinérgicas con la doxiciclina, disminuyendo su CMI 32 veces, incluso 64 veces en el caso del péptido P5-12 (CIF=0,113). Además, los dos péptidos de la generación P5 fueron capaces de reducir la CMI de la doxiciclina (64 µg/mL) a 1 µg/mL incluso a una concentración de péptido de 12,5 µg/mL, mientras que los péptidos P2 y P4, no mostraron esa potencia ni siquiera a la máxima concentración ensayada (50 µg/mL). De los antibióticos estudiados, la cefotaxima fue el más resistente a la potenciación, y sólo los péptidos de la generación P4 y P5 actuaron en sinergia con esta cefalosporina, presentando P5-12 la mejor actividad permeabilizante (CIF=0,258). Finalmente, los péptidos de la generación P2 no formaron combinaciones sinérgicas con la azitromicina, mientras que P4-1 fue el compuesto con menor CIF (0,174). No obstante, los péptidos P5 claramente superaron a los P4 en capacidad potenciadora de azitromicina, reduciendo la CMI de este antibiótico de 128 µg/mL a 2 µg/mL (64 veces) a concentraciones entre 25 y 50 µg/mL.

Tabla 2.3- Capacidad de los mejores permeabilizantes para potenciar la actividad de la doxiciclina, cefotaxima y azitromicina frente a la cepa clínica *P. aeruginosa* 4158 Ps4 determinada mediante ensayo *checkerboard*.

Péptidos	CMI péptido (µg/mL)	CMI de los antibióticos en presencia de la cantidad de péptido indicada (µg/mL)																	
		Doxiciclina						Cefotaxima						Azitromicina					
		0	6,25	12,5	25	50	CIF min ¹	0	6,25	12,5	25	50	CIF min	0	6,25	12,5	25	50	CIF min
P2-15	1024	64	32	8	4	2	0,080	512	512	512	512	256	0,598	64	64	64	64	32	0,695
P2-27	512	64	16	8	4	2	0,129	512	512	512	512	256	0,598	128	128	128	128	64	0,549
P4-1	1024	64	8	4	2	2	0,080	512	512	512	256	128	0,299	128	128	64	32	16	0,174
P4-2	256	64	8	4	2	2	0,227	512	512	256	128	64	0,320	128	64	32	16	8	0,258
P4-5	256	64	16	8	4	2	0,227	512	nd ²	nd	nd	nd	nd	128	nd	nd	nd	nd	nd
P5-12	512	64	4	1	1	1	0,113	512	256	256	64	32	0,258	128	64	32	8	2	0,211
P5-20	64	64	8	1	1	nc ³	0,406	512	256	128	32	nc	0,453	128	64	8	2	nc	0,406

¹CIF min: concentración inhibitoria fraccionada mínima de entre todas las combinaciones de péptido antibiótico ensayadas (1,56-50 µg/mL).

² nd: no determinado;

³ nc: no crecimiento de la bacteria por la acción del péptido.

En negrita se muestran los CIF ≤ 0,5. El medio de cultivo seleccionado para realizar las combinaciones sinérgicas fue MH con cationes ajustados (MHA).

Para cuantificar la actividad bactericida del péptido P5-12 y la azitromicina en el tiempo, se realizó una curva de letalidad con ambos compuestos a concentraciones subinhibitorias (12,5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Los resultados se interpretaron de la misma manera que en el capítulo 1. Como se muestra en la Figura 2.3, la combinación P5-12 con azitromicina mostró tanto una sinergia temprana (6-8 horas de incubación), como sinergia de larga duración (tras 24 horas de incubación). Además, se logró una disminución de casi 4 logaritmos la población bacteriana inicial, lo que sugiere que el péptido es capaz de permeabilizar relativamente rápido la envoltura de *P. aeruginosa*, con la consiguiente entrada y acción letal de la azitromicina. Además, esta sinergia resultó ser persistente, pues la reducción de la viabilidad prácticamente se mantuvo en torno a 3 logaritmos durante las 24 horas del estudio.

En conjunto, estos ensayos demuestran que la combinación de P5-12 y azitromicina es la más potente de las estudiadas, pues actúa de manera rápida, potente y persistente.

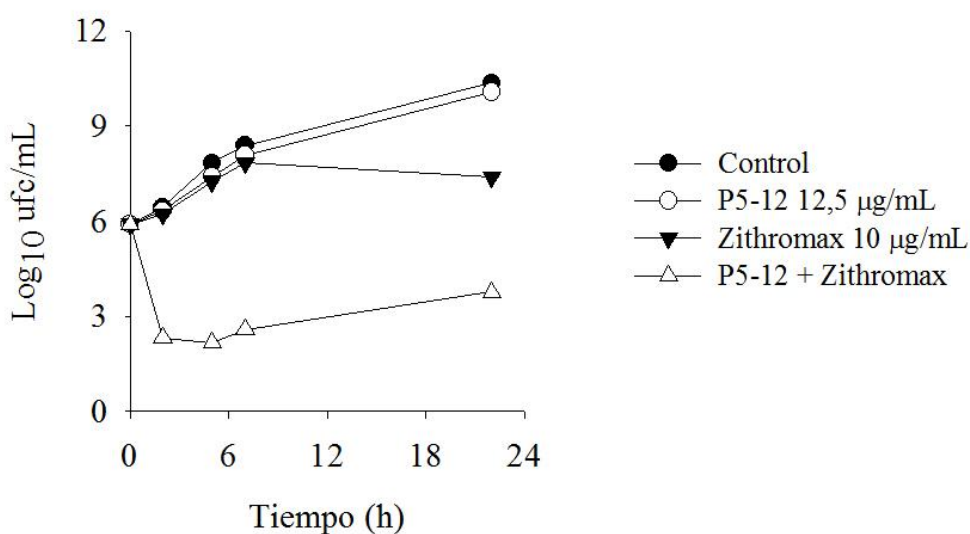


Figura 2.3: Curvas de letalidad. Determinación de la cinética de potenciación de la azitromicina (Zithromax) en *Pseudomonas aeruginosa* 4158-02 por el péptido P5-12. En el tiempo 0 se añadieron el péptido P5-12 a una concentración de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ y azitromicina 10 $\mu\text{g/mL}$ y se realizaron recuentos de viables a intervalos de tiempo de 0, 3, 6, 8 y 24 horas desde el comienzo de la incubación. En paralelo se realizó el seguimiento del crecimiento de cultivos sin tratar o tratados sólo con P5-12 o sólo con azitromicina a la concentración indicada.

Estudio de correlación de parámetros con interés en terapia antimicrobiana y análisis de relación estructura- actividad de los péptidos de la quinta generación

Para determinar la posible asociación entre las diferentes actividades de los péptidos P5, se seleccionaron las variables independientes cuantitativas que se investigaron en este capítulo, es decir, la CMI de los péptidos y el índice CIF de la combinación péptido- novobiocina frente a *P. aeruginosa* Ps4. Además, se estudió la correlación de estas dos actividades biológicas con algunos de los descriptores constitucionales PEDES utilizados en el análisis QSAR, como el peso molecular, el número de aminoácidos, el número de triptófanos, el número de residuos hidrofóbicos, el número de residuos básicos, la densidad básica y el índice Gravy (*Grand average of hydrophathy*) de hidrofobicidad. Los resultados de correlaciones se muestran en la Tabla 2.4 y expresan como el estadístico de correlación Rho de Spearman y su significación estadística asociada para cada una de las comparaciones realizadas.

Los resultados muestran que la CMI de los péptidos P5 presenta una asociación negativa con el índice CIF mínimo (Rho de Spearman = -0,74; $p \leq 0,01$). Este resultado indica que aquellos péptidos con mejor actividad antimicrobiana poseen menor capacidad potenciadora de novobiocina, y viceversa. Por otra parte, al igual que ocurrió en la generación P4, se detectaron asociaciones negativas estadísticamente significativas entre la CMI y el peso molecular, el número de aminoácidos, el número de triptófanos y el número de residuos básicos. Esto quiere decir que los péptidos con mejor capacidad antimicrobiana coinciden con aquellos de mayor longitud y con mayor proporción de residuos triptófano y aminoácidos básicos. En cambio, a diferencia de la CMI, una buena capacidad permeabilizante está asociada a péptidos más cortos y con un número menor de residuos de triptófano. A pesar de que ninguno de los dos parámetros estudiados se correlacionó significativamente con la hidrofobicidad de la secuencia, a diferencia de lo que sucedía en la cuarta generación, se observó una tendencia a que los péptidos más hidrofílicos (índice Gravy más negativo) se asociaran con una mejor capacidad antimicrobiana y los más hidrofóbicos (índice Gravy más positivo) coincidieran con los mejores permeabilizantes. Estas conclusiones se confirmaron cuando se analizaron conjuntamente los datos experimentales obtenidos con los péptidos P4 y P5 (Tabla 2.5).

Tabla 2.4: Valores de correlación de Rho de Spearman de la actividad biológica de los péptidos P5 y los descriptores constitucionales pertenecientes a los análisis QSAR

	Actividad biológica ¹		Descriptores constitucionales ²							
	CMI	CIF min	PM ³	n° aminoácidos	n° W ⁴	n° Res Hidrofob.	n° Res Básicos	Densidad básica	Hidrofobicidad (Gravy)	/μ/
CMI	1,00	-0,74 **	-0,73 **	-0,66 **	-0,81 **	-0,38	-0,51 **	-0,16	0,18	-0,56 **
CIFmin	-0,74 **	1,00	0,58 **	0,55 **	0,66 **	0,35	0,22	-0,18	-0,24	0,38

¹ Capacidad bactericida y permeabilizante de los péptidos determinada frente a *P. aeruginosa* Ps4 en medio MH no ajustado. ² Descriptores que dependen fundamentalmente de la composición de aminoácidos del péptido. ³ Peso molecular del péptido. ⁴ Triptófano.

* Correlación estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$). ** Correlación estadísticamente muy significativa ($p \leq 0,01$)

Tabla 2.5: Valores de correlación de Rho de Spearman de la actividad biológica de los péptidos P4 y P5 y los descriptores constitucionales pertenecientes a los análisis QSAR.

	Actividad biológica ¹		Descriptores constitucionales ²							
	CMI	CIF min	PM ³	n° aminoácidos	n° W ⁴	n° Res Hidrof.	n° Res Básicos	Densidad básica	Hidrofobicidad (Gravy)	/μ/
CMI	1,00	-0,58 **	-0,62 **	-0,59 **	-0,43 **	-0,43 **	-0,37 **	-0,10	-0,11	-0,362 *
CIFmin	-0,58 **	1,00	0,35 *	0,32 *	0,57 **	0,49 **	-0,36	-0,33 *	0,17	0,159

¹ Capacidad bactericida y permeabilizante de los péptidos determinada frente a *P. aeruginosa* Ps4 en medio MH no ajustado. ² Descriptores que dependen fundamentalmente de la composición de aminoácidos del péptido. ³ Peso molecular del péptido. ⁴ Triptófano.

* Correlación estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$). ** Correlación estadísticamente muy significativa ($p \leq 0,01$).

Capacidad de los péptidos para potenciar la actividad antibiótica *in vivo*

Para evaluar la efectividad del tratamiento combinado entre péptidos permeabilizantes y antibióticos *in vivo*, se puso a punto un modelo murino de sepsis experimental causada por la inoculación intraperitoneal del aislamiento clínico *P. aeruginosa* 4158 Ps4. Se decidió utilizar ratones que habían sido previamente inmunodeprimidos (neutropenia con valores por debajo de 1000 neutrófilos/mL) mediante la administración de ciclofosfamida. De esta manera, se simulaba en cierto modo una situación inmunológica habitual en los seres humanos que adquieren infecciones nosocomiales por patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*. Para estos experimentos, se seleccionó el antibiótico azitromicina y el péptido que había mostrado la actividad permeabilizante más potente combinado con este antibiótico (P5-12). La cepa Ps4 es altamente resistente a la azitromicina (CMI = 64 µg/mL), pero como se demostró anteriormente, el péptido P5-12 potencia a este antibiótico eficazmente *in vitro* (CMI en combinación 2 µg/mL; Tabla 2.3 y Figura 2.3). Además, como control se empleó el péptido P2-15, un compuesto que mostró muy buenos resultados en combinación con eritromicina en experimentos realizados por Sánchez-Gómez y colaboradores (Sánchez-Gómez et al., 2011).

En primer lugar, se investigó si los péptidos por sí mismos tenían algún efecto protector frente a la infección experimental. Para ello, inmediatamente después de la inoculación intraperitoneal de *P. aeruginosa* 4158 Ps4, los ratones recibieron en una zona distinta del peritoneo 10 mg/kg de P5-12 (o P2-15) y una segunda dosis de este tratamiento 5 horas después de la primera. En vez de proteger, la administración del péptido P5-12 aceleró significativamente la muerte de los ratones en comparación con los animales no tratados ($p = 0,035$) (Figura 2.4), un resultado que concuerda con la cierta de toxicidad *in vitro* observada en fibroblastos tratados con este péptido (IC₅₀ 75,33 µg/mL). Aunque el péptido P5-20 también mostró una buena actividad permeabilizante en combinación con azitromicina *in vitro* (Tabla 2.3), este compuesto fue inicialmente descartado por la elevada toxicidad en fibroblastos humanos que presentaba (IC₅₀ 41 µg/mL).

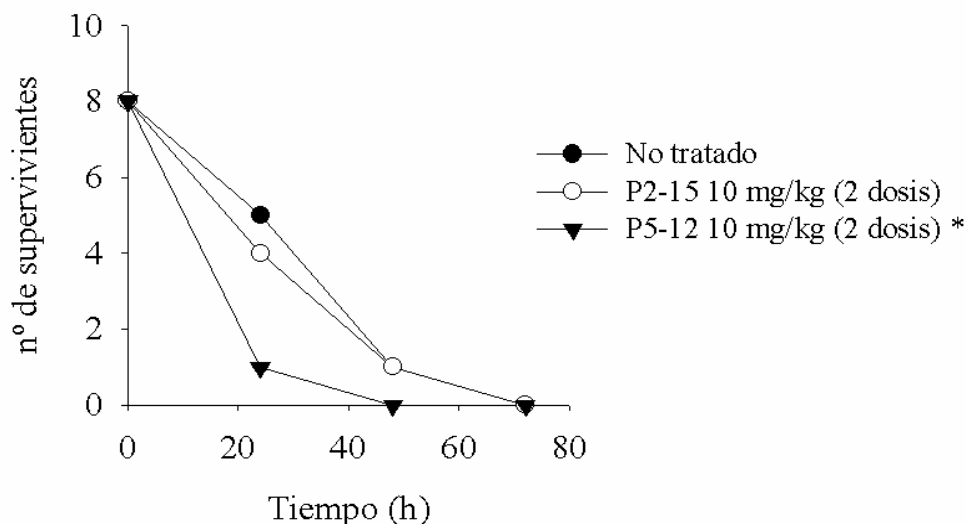


Figura 2.4: Cinética de supervivencia de ratones neutropénicos infectados con *P. aeruginosa* 4158 Ps4 y tratados con los péptidos P2-15 y P5-12. Previamente a la infección, se inmunodeprimió a los animales mediante la inyección de ciclofosfamida por vía subcutánea. Una vez confirmada la neutropenia, cada grupo ($n = 8$) recibió una dosis de 10^6 ufc/ratón de *P. aeruginosa* 4158 Ps4 intraperitonealmente. Inmediatamente después de esta inoculación, los animales recibieron una dosis de péptido a una concentración de 10 mg/kg (0,2 mg/ratón) en otra zona del peritoneo, seguido de un tratamiento idéntico a las 6 horas después del primero. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante el test estadístico de Kaplan-Meier (*, $p < 0,05$).

Debido a estos resultados, se decidió evaluar la eficacia del péptido P4-1, uno de los mejores permeabilizantes de la cuarta generación (Tabla 2.3 y Tabla 2.1), que no presentó toxicidad *in vitro* (Tabla 1.5). Como se muestra en la Figura 2.5-A, los péptidos administrados en dos dosis (1 hora y 6 horas después de la infección; 10 mg/kg cada dosis) no protegieron a los animales y tampoco aceleraron su muerte. Como era de esperar la azitromicina (una dosis de 25 mg/kg una hora después de la inoculación) tampoco protegió por sí misma a los ratones (Figura 2.5-A).

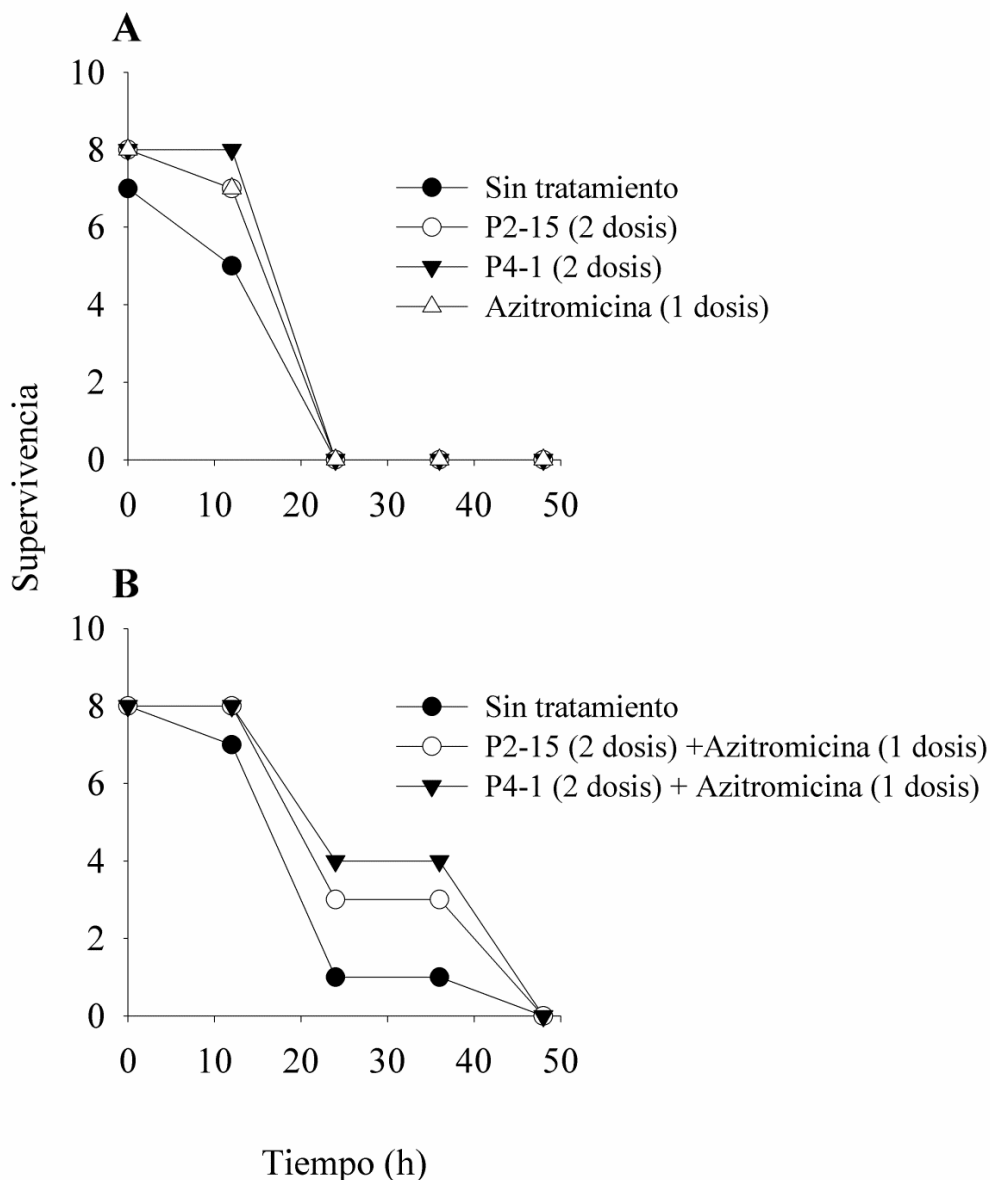


Figura 2.5: Cinética de supervivencia de ratones neutropénicos infectados con *P. aeruginosa* 4158 Ps4 y tratados con los péptidos P4-1 o P2-15 en combinación con azitromicina. Previamente a la infección, se inmunodeprimió a los animales mediante la inyección de ciclofosfamida por vía subcutánea. Una vez confirmada la neutropenia, cada grupo ($n = 8$) recibió una dosis de 10^6 ufc/ratón de *P. aeruginosa* 4158 Ps4 intraperitonealmente. A) Una hora y 6 horas después de esta inoculación los grupos tratados recibieron intraperitonealmente una dosis de péptido a una concentración de 10 mg/kg (0,2 mg/ratón) o una dosis de azitromicina (25 mg/kg, sólo en el primero de los tiempos) siempre en monoterapia. B) Una hora después de la infección los grupos recibieron una dosis combinada de péptido (10 mg/kg) y azitromicina (25 mg/kg) y 6 horas después de la infección una segunda dosis de péptido (10 mg/kg). Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante el test estadístico de Kaplan-Meier (*, $p < 0,05$).

Por otra parte, se extrajo sangre a los ratones 1,5 y 7,5 horas después de la infección para la cuantificación de los niveles de TNF α en suero y bacteriemia, respectivamente. Como se observa en la Figura 2.6-A, los péptidos no fueron capaces de reducir significativamente la bacteriemia, pero sí lo hizo la azitromicina, disminuyendo 0,86 logaritmos la concentración de bacterias en sangre, aunque esta reducción no fue suficiente para proteger a los animales. Por otro lado, ninguno de los compuestos redujo significativamente los niveles de TNF α en suero respecto al control sin tratar, e incluso se observó un aumento estadísticamente no significativo de los niveles de TNF α en los grupos tratados con P4-1 y azitromicina (Figura 2.6-B).

Por otro lado, la terapia combinada péptido-azitromicina confirió a los animales una protección estadísticamente no significativa y de corta duración (Figura 2.5-B). Concretamente, este tratamiento protegió al 50% de los animales durante 36 horas ($p = 0,086$), hecho que ninguno de los compuestos por separado fue capaz de lograr (comparar con Figura 2.5-A). No obstante, el tratamiento no resultó eficaz pasado ese tiempo de estudio. De manera similar, el tratamiento P2-15- azitromicina también fue capaz de conferir una ligera protección al 37,5 % de los animales durante 36 horas.

En cuanto a la bacteriemia, el tratamiento P4-1- azitromicina redujo diez veces (un logaritmo decimal) la concentración de bacterias en sangre, mientras que la combinación P2-15-azitromicina lo hizo 0,64 veces (Figura 2.6-C). No obstante, las diferencias en la concentración de bacterias en sangre entre el grupo no tratado y los dos grupos tratados fueron estadísticamente no significativas. Asimismo, como se observa en la Figura 2.6-D ambos tratamientos no fueron capaces de reducir significativamente los niveles de TNF α en suero, e incluso se observó un ligero aumento de la concentración de esta citoquina en los dos grupos tratados respecto al grupo de animales no tratado.

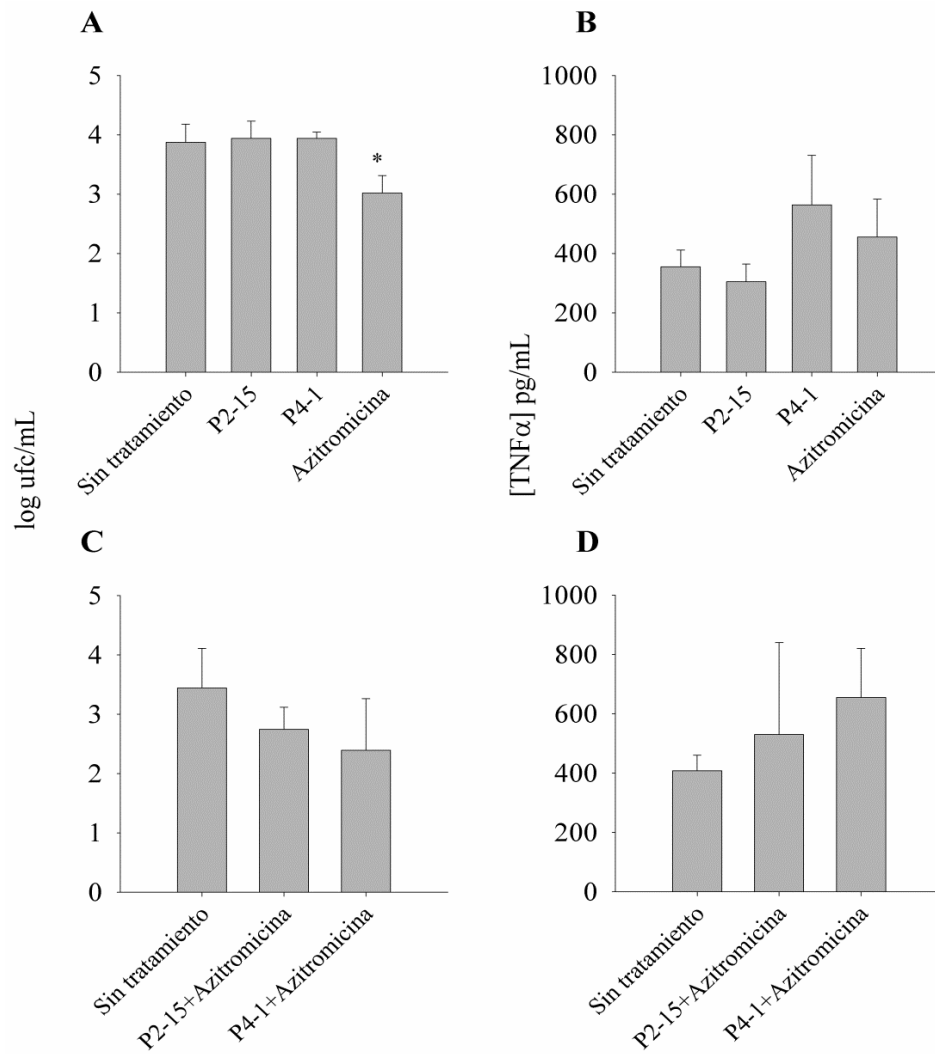


Figura 2.6: Cuantificación de la concentración de bacterias en sangre (bloque izquierdo de la Figura) y niveles de TNF α en suero (bloque derecho de la Figura) 7,5 y 1,5 horas después de la inoculación de *P. aeruginosa* 4158 Ps4 en ratones neutropénicos, respectivamente. Panel superior (A y B): tratamiento no combinado de P2-15 o P4-1 (dos dosis de 10 mg/kg; 1 h y 6 h después de la infección), o bien de azitromicina (25 mg/kg 1 h después de la infección). Panel inferior (C y D): tratamiento combinado de P2-15- azitromicina y P4-1- azitromicina empleando las mismas dosis y tiempos descritos para el caso anterior. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante la prueba de la mediana y los grupos se compararon dos a dos mediante el test estadístico U-Mann Whitney (*, $p < 0,05$).

CAPÍTULO 3:

**EFECTO POSTANTIBIÓTICO DE PÉPTIDOS
SOBRE *P. AERUGINOSA* E IDENTIFICACIÓN DE
LA PERMEABILIDAD ASOCIADA AL EFECTO
POSTANTIBIÓTICO**

CAPÍTULO 3: EFECTO POSTANTIBIÓTICO DE PÉPTIDOS SOBRE *P. aeruginosa* E IDENTIFICACIÓN DE LA PERMEABILIDAD ASOCIADA AL EFECTO POSTANTIBIÓTICO

Cuantificación del Efecto Postantibiótico (PAE) producido por el péptido P4-9 frente a *Pseudomonas aeruginosa* 4158 Ps4

Una de las propiedades que hacen a un compuesto antimicrobiano más atractivo es la capacidad de provocar el denominado efecto postantibiótico (PAE), es decir, un daño en las células que persiste tras la interrupción del tratamiento. El PAE se manifiesta en un retraso en el crecimiento de las células que sobreviven al tratamiento con respecto a aquellas células no tratadas. Este fenómeno se ha descrito raras veces en relación con péptidos antimicrobianos (Han et al., 2009). Para estudiar si los péptidos P4 poseían esta propiedad, *P. aeruginosa* 4158 Ps4 se expuso a una concentración dos veces superior a la CMI del péptido correspondiente durante una hora, y posteriormente, el péptido se eliminó mediante varios lavados por centrifugación. Para este estudio se seleccionaron aquellos péptidos P4 que mostraron mejor capacidad bactericida frente a la cepa Ps4 (P4-8, P4-9 y P4-18), de manera que se pudiera reducir la cantidad de péptido necesaria.

Para la cuantificación del PAE de los péptidos se empleó el método de referencia, basado en el recuento de viables (Craig and Gudmundsson, 1996). Además, se evaluó el uso del sistema automatizado Bioscreen C (Lowdin et al., 1993) para la medida del PAE por su fácil manejo y por el ahorro de tiempo y trabajo que supone frente a la técnica de referencia. En ambas técnicas y siguiendo el criterio de la mayoría de los autores, se consideró que existía un PAE significativo cuando el retraso observado en el cultivo tratado respecto al no tratado era igual o superior a 0,5 horas. De los tres péptidos estudiados, únicamente P4-9 provocó un PAE significativo, mientras que los péptidos P4-8 y P4-18 no produjeron retraso alguno en el crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* 4158 Ps4 (resultados no mostrados). Como se muestra en la Figura 3.1-A, el retraso que produjo P4-9 fue de 1,3 horas, es decir, el cultivo tratado con P4-9 necesitó 1,3 horas más que el cultivo no tratado para incrementar en diez veces (un logaritmo) su población a partir de la eliminación del compuesto.

Además, se calculó el tiempo de generación de ambos cultivos, lo que reveló que la población del cultivo control no tratado se duplicaba cada 27,1 minutos, mientras que la del cultivo tratado tardaba en duplicarse 45,1 minutos tras la eliminación del péptido.

En el caso de la técnica turbidimétrica automatizada Bioscreen C, el PAE se definió como el tiempo adicional respecto al cultivo control que el cultivo tratado necesitó para alcanzar un mismo valor de absorbancia (sección de Material y Métodos). Como se muestra en la Figura 3.1-B, el PAE de P4-9 calculado mediante el Bioscreen C fue muy similar, aunque ligeramente superior, (1,45 horas) al obtenido mediante la técnica convencional.

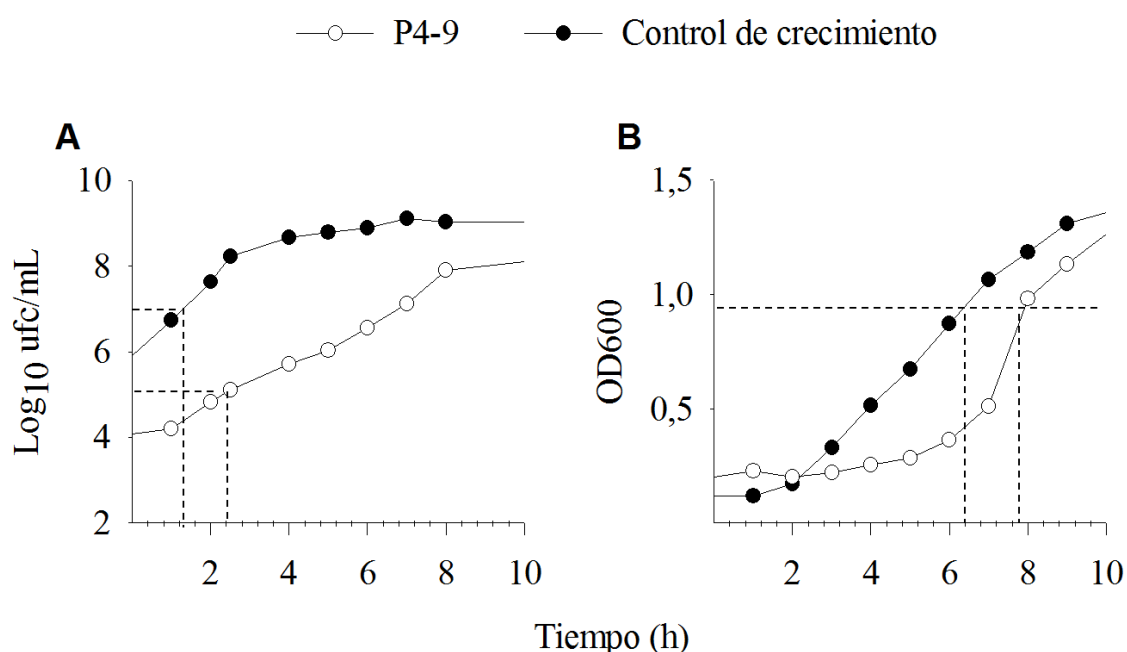


Figura 3.1- Curvas de crecimiento de *P. aeruginosa* Ps4 sin tratar (círculos negros) o tratado con P4-9 (círculos blancos). Las células frescas en fase exponencial se dejaron sin tratar o se trataron con P4-9 a 2 veces la CMI del péptido durante 1 h. Tanto el cultivo tratado como el no tratado se lavaron tres veces en medio fresco atemperado a 37°C. El tiempo 0 de las gráficas corresponde al comienzo de la monitorización del crecimiento inmediatamente después del tercer lavado y tras la resuspensión de las células. A: Técnica de recuento de viables. B: Técnica de análisis turbidimétrico automatizado Bioscreen C (cálculo en sección de Material y Métodos).

Identificación de la Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico (PAEP)

La capacidad de P4-9 para causar PAE, indicaba que las células que sobrevivían al tratamiento con este péptido estaban dañadas y necesitaban tiempo para recuperar su velocidad de crecimiento normal. Como el mecanismo de acción de la mayoría de péptidos antimicrobianos implica una perturbación en la envoltura celular bacteriana, se

investigó si las células supervivientes al tratamiento con P4-9 presentaban alteraciones funcionales en su envoltura celular. Una evidencia indirecta de la existencia de tales alteraciones podría ser la demostración de que, como consecuencia del PAE, la envoltura de *P. aeruginosa* 4158 Ps4 fuera temporalmente permeable a sustancias rechazadas por una envoltura celular funcional. Para estudiar esta hipótesis, se trató a las células de Ps4 con P4-9 como en el apartado anterior y, tras la eliminación del péptido, las células se expusieron a concentraciones subinhibitorias de novobiocina, un antibiótico al que *P. aeruginosa* 4158 Ps4 presenta resistencia intrínseca. Concretamente, para estos ensayos se seleccionó una concentración de 1/8 de la CMI de la novobiocina, pues en un experimento preliminar esta concentración no produjo efecto alguno sobre la curva de crecimiento de un cultivo de *P. aeruginosa* 4158 Ps4 sin tratar con el péptido (apartado PAEP en Material y Métodos). Estos experimentos se realizaron empleando las dos técnicas anteriormente descritas para el estudio del PAE.

En un primer experimento, el antibiótico se añadió coincidiendo con el tiempo 0, es decir inmediatamente después de los lavados de eliminación del péptido. En este experimento (triángulos negros invertidos en la Figura 3.2-A), la adición de la novobiocina tuvo un efecto letal instantáneo en los cultivos que fueron pre-tratados con P4-9, mientras que el cultivo control no tratado con P4-9 fue totalmente insensible a la novobiocina (círculos negros). La sensibilidad al antibiótico del cultivo expuesto al péptido probablemente indica que P4-9 produce un daño sobre la envoltura de Ps4 que persiste tras la retirada del péptido, y que se manifiesta en la pérdida de la capacidad de la célula para evitar la entrada de novobiocina. No se tiene constancia de que un fenómeno así se haya descrito con anterioridad, por lo que se acuñó el término “Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico” (o en inglés, *Post-Antibiotic Effect associated Permeabilization* (PAEP)) para definir el incremento transitorio en la sensibilidad a un antibiótico que experimentan las células bacterianas como resultado de una exposición previa a un antimicrobiano.

En experimentos posteriores y para estudiar la duración de la PAEP, la adición de la novobiocina se retrasó progresivamente (1 h ó 2 h, es decir tiempo 1 (triángulos blancos) o tiempo 2 (cuadrados negros), respectivamente, en la Figura 3.2-A) en relación con la reanudación del crecimiento del cultivo tratado. Como se muestra en la Figura 3.2-A, el efecto producido fue más marcado y de mayor duración cuanto más próxima al tiempo 0 se añadía la novobiocina. Concretamente, cuando se añadía el

antibiótico en el tiempo 0 del ensayo, el cultivo tardaba 10,5 h en recuperar la población que tenía en el momento de la adición de la novobiocina, mientras que este tiempo fue de 9 y 6 horas si el antibiótico se añadía a los tiempos 1 y 2, respectivamente. Este hecho indica que la alteración de la permeabilidad de la envoltura de Ps4 y por tanto la PAEP persiste durante al menos dos horas tras la eliminación del péptido. Cuando la novobiocina se añadió a las 3 h del comienzo de la monitorización, no se detectó ninguna alteración en la curva de crecimiento del cultivo (resultado no mostrado). Por tanto, el experimento de la Figura 3.2 permitió deducir que el periodo PAEP de Ps4 tratado con P4-9 era inferior a 3 h.

El retraso en horas que un antimicrobiano produce en una población cuando se añade durante el periodo PAEP se denominó como “Sensibilización en el periodo de Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico” (*Sensitization during Post Antibiotic Effect associated Permeabilization (S-PAEP)*). Por tanto, el experimento de la Figura 3.2 permitió calcular que el S-PAEP de la novobiocina ($S_{\text{novobiocina-PAEP}}$) era de 10,5 h, 9 h y 6h dependiendo de que el antibiótico se añadiera en el tiempo 0, 1, o 2 tras la reanudación del crecimiento, respectivamente.

Por otro lado, se investigó si las observaciones anteriores se podían reproducir en la técnica turbidimétrica Bioscreen C, mucho menos laboriosa que el método de recuento de viables. Como se muestra en la Figura 3.2-B, la PAEP en el Bioscreen C se manifestó por un retraso en el crecimiento del cultivo tratado con novobiocina en relación al cultivo no tratado (ambos pre-tratados con P4-9). También en este caso, la S-PAEP fue mayor cuando la novobiocina se añadió justamente después de reanudarse el crecimiento tras la eliminación de P4-9 y los posteriores lavados (tiempo 0; 4,8 horas de retraso). Dicho retraso se fue reduciendo a medida que aumentaba el tiempo entre la eliminación de P4-9 y la adición de la novobiocina (2,7 y 0,45 horas de retraso en los tiempos 1 y 2, respectivamente). De nuevo se observó mediante la técnica turbidimétrica que la PAEP persistía al menos 2 h después de la eliminación de P4-9, pues la adición de novobiocina a las 3 h no causó alteración alguna de la curva de crecimiento del cultivo (resultados no mostrados). Aunque algunos de los parámetros obtenidos mediante las dos técnicas no coincidieron, dado que el sistema automatizado Bioscreen C permitió cuantificar la PAEP y S-PAEP, y que este método ofreció numerosas ventajas respecto al recuento de viables, como mayor versatilidad y ahorro de tiempo, se seleccionó el ensayo turbidimétrico para los experimentos posteriores.

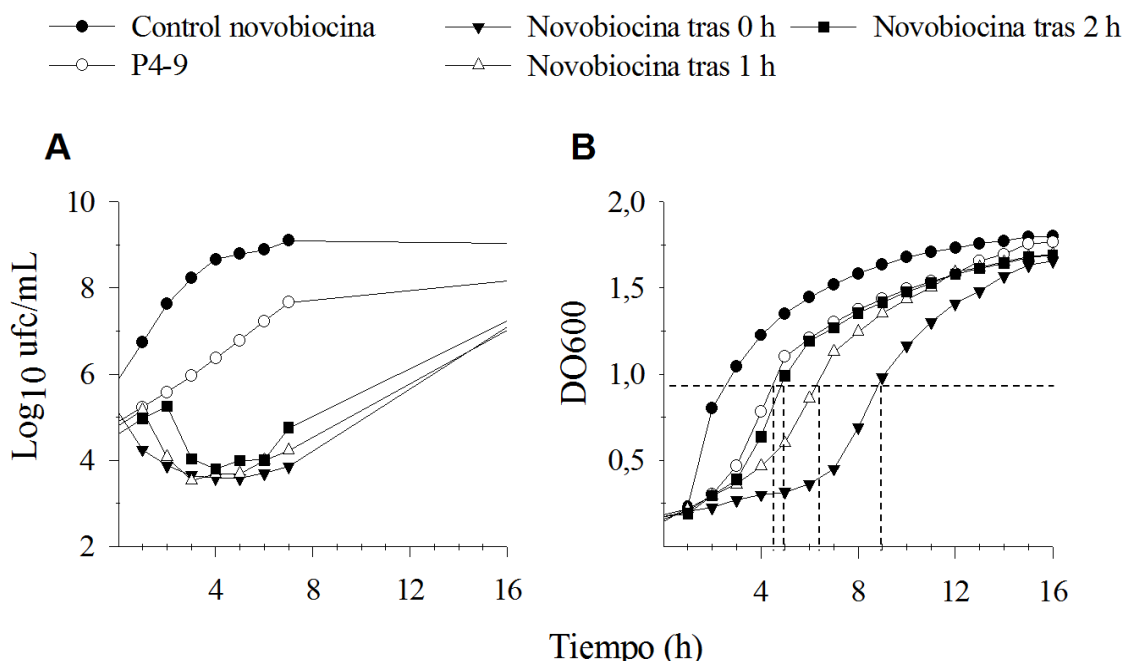


Figura 3.2- Curvas de crecimiento de un cultivo de *P. aeruginosa* Ps4 tratado sólo con P4-9 (○) o con P4-9 y, después de la eliminación del péptido, expuesto a novobiocina. Las células frescas en fase exponencial se trataron con P4-9 a 2 veces la CMI del péptido durante 1 h y después se lavaron tres veces en medio fresco atemperado a 37°C. El tiempo 0 de las gráficas corresponde al comienzo de la monitorización del crecimiento inmediatamente después del tercer lavado y tras la resuspensión de las células. Los cultivos pre-tratados con P4-9 se expusieron a novobiocina (1/8 de su CMI): ▼ en el tiempo 0; △ en el tiempo 1 h; ■ y en el tiempo 2 h. Como control, un cultivo sin tratar con el péptido se incubó con novobiocina en el tiempo 0 (●). A: Técnica de recuento de viables. B: Técnica de análisis turbidimétrico automatizado Bioscreen C.

Aprovechamiento de la PAEP por antibióticos distintos a la novobiocina

Para evaluar si la PAEP causada por P4-9 en la cepa *P. aeruginosa* 4158 Ps4 posibilitaba la entrada a la célula de antibióticos diferentes de la novobiocina, se repitieron los experimentos del apartado anterior empleando antibióticos de otras familias y con mecanismos distintos de entrada al compartimento interno de la bacteria. Los antibióticos seleccionados fueron una fosfomicina (fosfomicina), un macrólido (eritromicina) una cefalosporina de primera generación (cefalotina) y una de tercera generación (ceftazidima), así como la rifampicina y una quinolona (ciprofloxacino). Se eligieron estos compuestos porque la cepa Ps4 es naturalmente resistente a ellos, lo que permitía detectar una potencial sensibilización derivada del PAEP.

De manera similar al apartado anterior, se realizaron experimentos preliminares para identificar la concentración del antibiótico que no producía efecto alguno sobre la

curva de crecimiento de un cultivo de Ps4 sin tratar con el péptido. Las concentraciones detectadas de esta manera fueron las siguientes: 1/8 veces de la CMI para el caso de la eritromicina, fosfomicina, rifampicina y ciprofloxacino, 1/4 de su CMI para la ceftazidima y 1/2 de su CMI para la cefalotina.

En la Figura 3.3 se muestran las curvas de crecimiento de Ps4 en Bioscreen C tras el tratamiento con P4-9 y su posterior eliminación, y el post-tratamiento con el antibiótico seleccionado. En los tres casos estudiados, como ocurrió con la novobiocina, se observó que la S-PAEP fue mayor cuanto menos tiempo transcurrió entre la eliminación de P4-9 y la adición del antibiótico. Aunque la fosfomicina y la eritromicina fueron capaces de aprovechar la PAEP y de retrasar significativamente el crecimiento de Ps4, ninguno de los dos compuestos superó la acción de una dosis equivalente de novobiocina (paneles 3.3-B y 3.3-C y compararlos con el panel 3.2-B). Concretamente, la fosfomicina fue capaz de producir un retraso de 2,45 horas, mientras que el mismo fenómeno tuvo casi el doble de duración (4,8 h; Tabla 3.1.) cuando se empleó novobiocina. La eritromicina se mostró aún menos potente y causó un retraso de la mitad de duración (1,2 h; Tabla 3.1.) que el producido por la fosfomicina. No obstante, estas diferencias de potencia entre antibióticos se atenuaron e incluso se invirtieron cuando estos agentes se añadieron después de una o dos horas de la reanudación del crecimiento. De hecho, en este último punto temporal, el retraso causado por la fosfomicina cuadruplicó el causado por la novobiocina (1,95 h frente a 0,45 h, respectivamente; Tabla 3.1). La cefalotina, la rifampicina y el ciprofloxacino fueron los antibióticos que menores retrasos provocaron (0,6-0,8 h), aunque los dos primeros ocasionaron S-PAEPs detectables incluso 2 h después de la reanudación del crecimiento.

Por último, la ceftazidima, a una concentración cuatro veces inferior a su CMI (CMI 64 µg/mL), inhibió el crecimiento de Ps4 pre-tratado con P4-9 con más potencia incluso que la novobiocina, y provocó un S-PAEP a tiempo 0 y 1 que superó las 14 horas (Figura 3.3-A y Tabla 3.1.).

En concordancia con lo descrito en el apartado anterior, la duración de la PAEP generada por P4-9 fue en todos los casos inferior a 3 h, pues la adición de cualquiera de los antibióticos en ese momento o a partir de él no causó alteraciones en la curva de crecimiento del cultivo pretratado con el péptido.

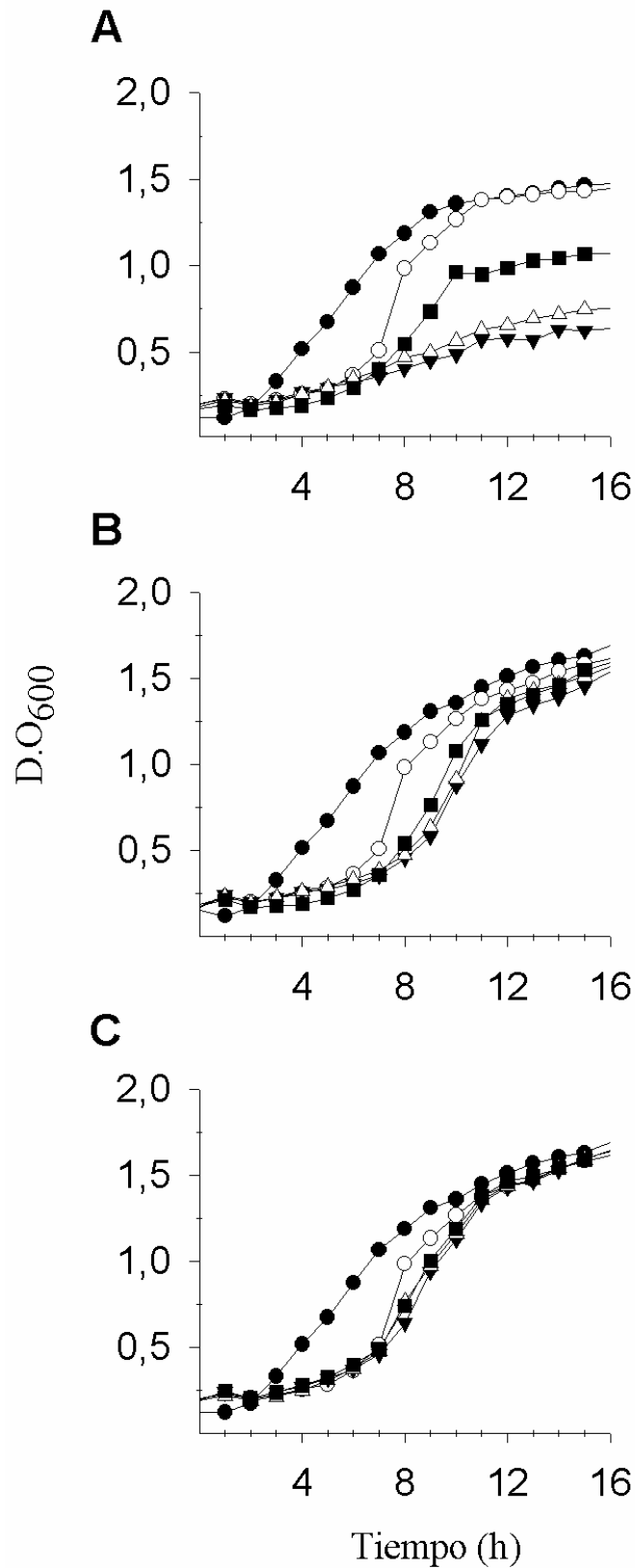


Figura 3.3- Curvas de crecimiento obtenidas mediante Bioscreen C de un cultivo de *P. aeruginosa* Ps4 tratado con P4-9 (dos veces su CMI) durante 1 h, e incubado, tras la eliminación de péptido y los lavados posteriores (tiempo 0), con: ceftazidima (A), fosfomicina (B) o eritromicina (C): ▼ inmediatamente después de la reanudación del crecimiento; Δ 1 hora después de la reanudación del crecimiento; ■ 2 horas después de la reanudación del crecimiento; ○ control sin antibiótico pero tratado con el péptido. ● control sin tratar con el péptido, pero incubado a tiempo 0 con la misma cantidad de antibiótico usada en el experimento.

Tabla 3.1- Valores de Efecto Post Antibiótico (PAE) del péptido P4-9 y Sensibilización en el periodo de Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico (S-PAEP) en varias cepas de *P. aeruginosa* determinados mediante la técnica automatizada Bioscreen C.

Cepa	PAE ^a (h)	PAEP ^b (h)	Antibiótico	Concentración empleada (µg/mL) (sub-CMI)	S-PAEP ^c (h)		
					0	1	2
Ps4	1,44	2-3	NOV	64 (1/8X)	4,8	2,7	0,45
		2-3	FOS	64 (1/8X)	2,45	2,2	1,95
		1-2*	FOS	32 (1/16X)	1	0,6	< 0,25
		2-3	RIF	2 (1/8X)	0,6	0,6	0,25
		2-3	ERI	16 (1/8X)	1,2	0,95	0,9
		2-3	CAZ	16 (1/4X)	>14	>14	1,95
		2-3	CAZ	4 (1/16X)	2	1,25	0,1
		2-3	CEF	512 (1/2X)	0,8	0,7	0,7
		0-1*	CIP	0,25 (1/8X)	0,7	< 0,25	< 0,25
0*	GEN	0,5 (1/4X)	< 0,25	< 0,25	< 0,25		
PAO1 ^e	1,9	2-3	NOV	64 (1/16X)	8,125	2,9	1,125
LC1-6	0,75	2-3	NOV	512 (1/16X)	7,5	3,75	0,75
PAO1 ^d	1,3	0-1	CAZ	0,5 (1/4X)	1	< 0,25	< 0,25
PAΔADDh2Dh3	1,2	2-3	CAZ	16 (1/4X)	4,41	3,4	3,4

NOV, novobiocina; FOS, fosfomicina; RIF, rifampicina; ERI, eritromicina; CAZ, ceftazidima; CEF, cefalotina; CIP, ciprofloxacino; GEN, gentamicina.

^a Efecto postantibiótico.

^b Periodo en el que se puede detectar Permeabilidad asociada al Efecto Postantibiótico.

^c Sensibilización en el periodo de Permeabilización asociada al Efecto Postantibiótico: retraso en h causado por el antibiótico en el cultivo pretratado con el péptido en comparación con un cultivo tratado con el péptido pero no expuesto al antibiótico. Los tiempos en h (0, 1, 2) indican las horas transcurridas desde la reanudación del crecimiento hasta el momento de la adición del antibiótico. El umbral de detección considerado fueron valores de S-PAEP superiores a 0,25 horas.

^e Cepa PAO1 de nuestra colección; Departamento de Microbiología. Universidad de Navarra.

^d Cepa PAO1 facilitada por el Hospital de Son Dureta (Palma de Mallorca, España) (Moyá et al., 2009).

* El dato no refleja la PAEP total del péptido debido a la falta de efecto del antibiótico empleado.

Los PAEs y S-PAEPs se obtuvieron a partir de curvas cuyos valores corresponden a la media aritmética de las muestras por triplicado.

Caracterización fenotípica de la producción de β-lactamasa AmpC en la cepa clínica *P. aeruginosa* 4158 Ps4

Como se explicó en la Introducción, *P. aeruginosa* produce una β-lactamasa cromosómica inducible denominada AmpC con capacidad para hidrolizar cefalosporinas como la ceftazidima. La expresión basal de AmpC no es capaz por sí misma de conferir resistencia a las cefalosporinas, pero las cepas que sobreexpresan dicha enzima adquieren resistencia a este grupo de antibióticos. El hecho de que Ps4

fuera resistente a la ceftazidima sugería que este aislamiento clínico podría sobreexpresar AmpC. Sin embargo, la elevada sensibilidad mostrada por Ps4 a este antibiótico durante la PAEP no concordaba bien con esta hipótesis. Para investigar la producción de AmpC en Ps4, se determinó la susceptibilidad de esta cepa a ceftazidima en ausencia y presencia de un inhibidor específico de AmpC, como la cloxacilina. Como controles, se emplearon las siguientes cepas i) la cepa salvaje PAO1; ii) una cepa derivada de PAO1 con una mutación que provoca la inactivación del regulador AmpD (PA Δ AD), lo que da lugar a una expresión de AmpC superior al nivel basal pero todavía sensible a la inducción (no desreprimida); iii) una cepa mutante triple derivada de PAO1 que posee tres mutaciones en los genes reguladores *ampD*, *ampDh2* y *ampDh3*, y que presenta una sobreexpresión establemente desreprimida de AmpC (Moyá et al., 2009). Es de destacar que la ceftazidima es un inductor débil de la AmpC (Jacoby et al., 2009).

En la Figura 3.4 se muestra la inhibición provocada por la ceftazidima en las cuatro cepas estudiadas, en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de cloxacilina. Tanto PAO1 como PA Δ AD mostraron una susceptibilidad (diámetro en el halo de inhibición) similar a la ceftazidima en presencia y ausencia de inhibidor, lo que es indicativo de que no presentan AmpC desreprimida. Por el contrario, la cepa triple mutante con AmpC establemente desreprimida y el aislamiento clínico Ps4 muestran un aumento considerable en los halos de inhibición en presencia de cloxacilina con respecto al control sin cloxacilina. Esto indica que, fenotípicamente, ambas cepas producen una β -lactamasa AmpC desreprimida, es decir, la enzima es expresada a niveles altos sin necesidad de una inducción previa. Esta observación implica que la resistencia a la ceftazidima de la cepa clínica Ps4 depende, al menos en parte, de la expresión de una β -lactamasa AmpC desreprimida.

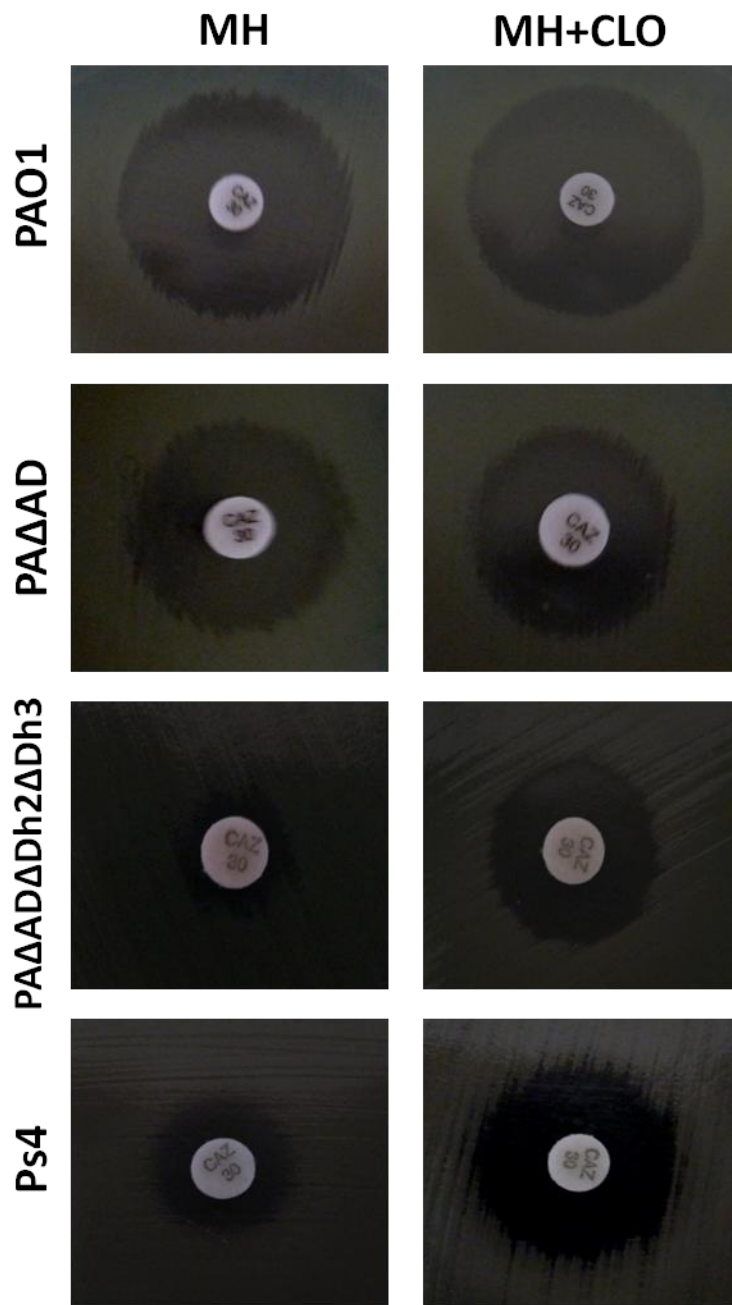


Figura 3.4- Detección fenotípica de la producción de AmpC desreprimida basada en un ensayo de susceptibilidad a ceftazidima en ausencia (paneles izquierdos) y presencia (paneles derechos) de un inhibidor de AmpC (cloxacilina; CLO) y en medio agar MHA. Las cepas empleadas fueron de arriba a abajo las siguientes: la cepa salvaje PAO1; un mutante de PAO1 (PA Δ AD) que presenta un nivel moderado de expresión de AmpC, pero no desreprimida; un triple mutante de PAO1 (PA Δ AD Δ Dh2 Δ Dh3) con sobreexpresión de AmpC establemente desreprimida y el aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* 4158 (Ps4).

Determinación de la PAEP en un mutante de *P. aeruginosa* que sobreexpresa cefalosporinasa AmpC y su sensibilización a la ceftazidima

Los resultados del apartado anterior indican la presencia en Ps4 de una enzima AmpC desreprimida. Como se mostró en la Figura 3.3-A, la ceftazidima aprovechó la PAEP provocada por P4-9 y sensibilizó notablemente al aislamiento clínico Ps4. Estos resultados sugieren que la PAEP puede ser empleada por antibióticos β -lactámicos para neutralizar mecanismos de resistencia basados en la superproducción de β -lactamasas. Sin embargo, los resultados no fueron totalmente concluyentes al no estar completamente caracterizados los mecanismos de resistencia de Ps4. Para intentar confirmar estas observaciones, se repitieron los ensayos mostrados en la Figura 3.3.A empleando la cepa PA Δ AD Δ Dh2Dh3, un mutante isogénico de PAO1 que sobreexpresa la cefalosporinasa AmpC de forma establemente desreprimida (apartado anterior).

Como se muestra en la Tabla 3.1, el valor del PAE de P4-9 en el triple mutante PA Δ ADDh2Dh3 (CMI_{CAZ} de 64 $\mu\text{g/mL}$), 1,2 horas, fue similar al detectado en Ps4 (CMI_{CAZ} de 64 $\mu\text{g/mL}$) (1,44 h), lo que indica que el daño provocado por P4-9 es similar en ambas cepas. El hecho de que también en el triple mutante la PAEP causada por P4-9 fuera de al menos dos horas, como en todos los casos anteriores, confirma esta observación. Por otra parte, la ceftazidima también fue capaz de sensibilizar al triple mutante en el tiempo que duró la PAEP, provocando retrasos de entre 4,4 y 3,4 horas de duración en comparación con el cultivo pretratado con el péptido pero no tratado con el antibiótico. Estos resultados confirman que un β -lactámico puede inhibir el crecimiento de una cepa superproductora de β -lactamasas aprovechando la PAEP. No obstante, el triple mutante se mostró notablemente más resistente a la acción de la ceftazidima que Ps4, cuyos valores de S-PAEP a este antibiótico fueron mayores de 14 horas, incluso 1 hora después de la reanudación del crecimiento (Figura 3.3-A y Tabla 3.1), lo que confirma la gran importancia de la producción desreprimida de AmpC en la resistencia a la ceftazidima. En condiciones equivalentes, la cepa PAO1 (CMI_{CAZ} 2 $\mu\text{g/mL}$) se mostró más resistente, presentando un S-PAEP de sólo una hora a tiempo 0 de la adición de la ceftazidima. Esta observación está evidentemente en relación con la baja cantidad de ceftazidima que hubo que emplear en este ensayo (0,5 $\mu\text{g/mL}$, es decir, $\frac{1}{4}$ de la CMI_{CAZ} de PAO1) para no inhibir a esta cepa, combinada con la expresión basal de AmpC que PAO1 posee.

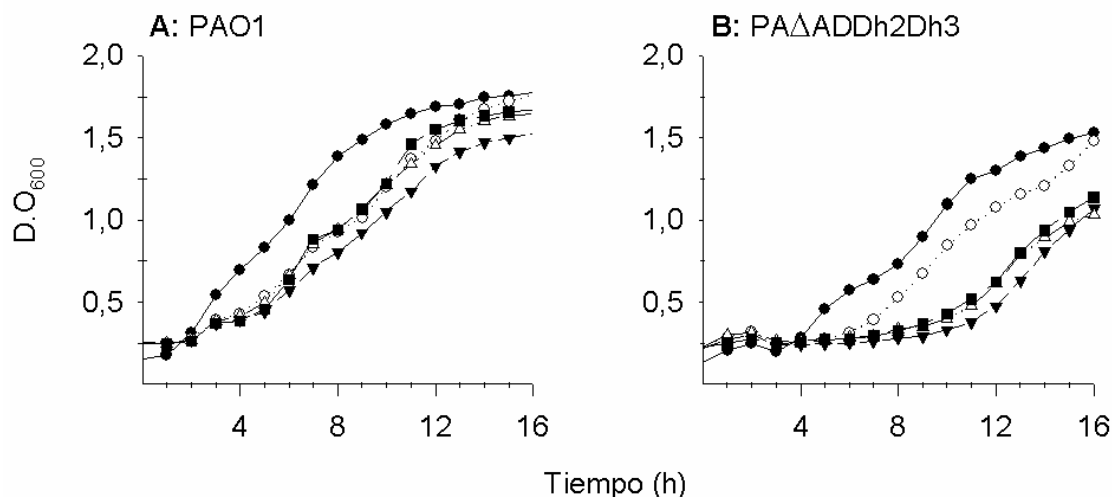


Figura 3.5- Curvas de crecimiento obtenidas en Bioscreen C de las cepas PAO1 (A) o PAΔADDh2Dh3 (B), un mutante derivado de PAO1 que sobreexpresa la cefalosporinasa AmpC, tratadas con P4-9 (2 veces su CMI) durante 1 h e incubadas tras la eliminación del péptido y los posteriores lavados (tiempo 0) con ceftazidima: ▼ inmediatamente después de la reanudación del crecimiento; △ 1 hora después de la reanudación del crecimiento; ■ 2 horas después de la reanudación del crecimiento; ○ control tratado con P4-9 pero sin antibiótico; ● control no tratado con P4-9 pero incubado a tiempo 0 con una concentración del antibiótico idéntica a la empleada en el ensayo. En ambos casos las cepas se trataron con ¼ de su CMI a la ceftazidima, es decir 0,5 µg/mL para PAO1 y 16 µg/mL para el triple mutante)

Susceptibilidad de mecanismos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* distintos de AmpC a la PAEP provocada por P4-9

Los resultados anteriores sugieren que el péptido P4-9 produce una alteración en la envoltura de *P. aeruginosa* 4148 Ps4 que persiste tras su eliminación y que puede ser aprovechada, al menos durante dos horas, por diferentes antibióticos a concentración subinhibitoria para ejercer un efecto inhibitorio y/o letal. Además, la sensibilización producida fue suficiente para neutralizar un importante mecanismo de resistencia de *P. aeruginosa*, la sobreexpresión de la cefalosporinasa AmpC. Para estudiar si la PAEP podía ser aprovechada por antibióticos sustrato de otros mecanismos de resistencia para vencer esos mismos mecanismos, se determinó la PAEP de P4-9 sobre cepas mutantes de *P. aeruginosa* con mecanismos de resistencia conocidos. Concretamente, se seleccionó el mutante *P. aeruginosa* LC1-6, una cepa que presenta una sobreexpresión de la bomba de expulsión MexAB/OprM. Como antibiótico sustrato del sistema se escogió la novobiocina. Como control a efectos comparativos, se empleó la cepa PAO1, de la cual deriva el mutante en estudio.

En experimentos previos, se comprobó que la concentración de antibiótico seleccionada (16 veces inferior a su CMI sobre LC1-6) no producía ninguna inhibición sobre el crecimiento del mutante sin tratar con el péptido. Como se observa en la Figura 3.6-B, P4-9 provocó un PAE de menor intensidad en LC1-6 (0,75 horas; Tabla 3.1) que en la cepa parental PAO1 (PAE =1,9 horas; Tabla 3.1). Este hecho sugiere que el péptido podría ser sustrato de la bomba de expulsión MexAB-OprM. Es de destacar que esta cepa PAO1 es de distinto origen a la cepa PAO1 de la que deriva el mutante PA Δ ADDh2Dh3 (apartado anterior). Sin embargo, aunque el péptido causó aparentemente más daño a la cepa parental que al mutante LC1-6, las S-PAEP obtenidas con novobiocina fueron comparables en ambas cepas (Tabla 3.1.). Incluso PAO1 se mostró algo más resistente al antibiótico que el mutante tras 1 h de incubación (2,9 vs. 3,75 h, respectivamente; Tabla 3.1). Finalmente, la sobreexpresión de la bomba de expulsión no se tradujo en una disminución en la duración de la PAEP, que fue similar (al menos 2 h) en ambas cepas.

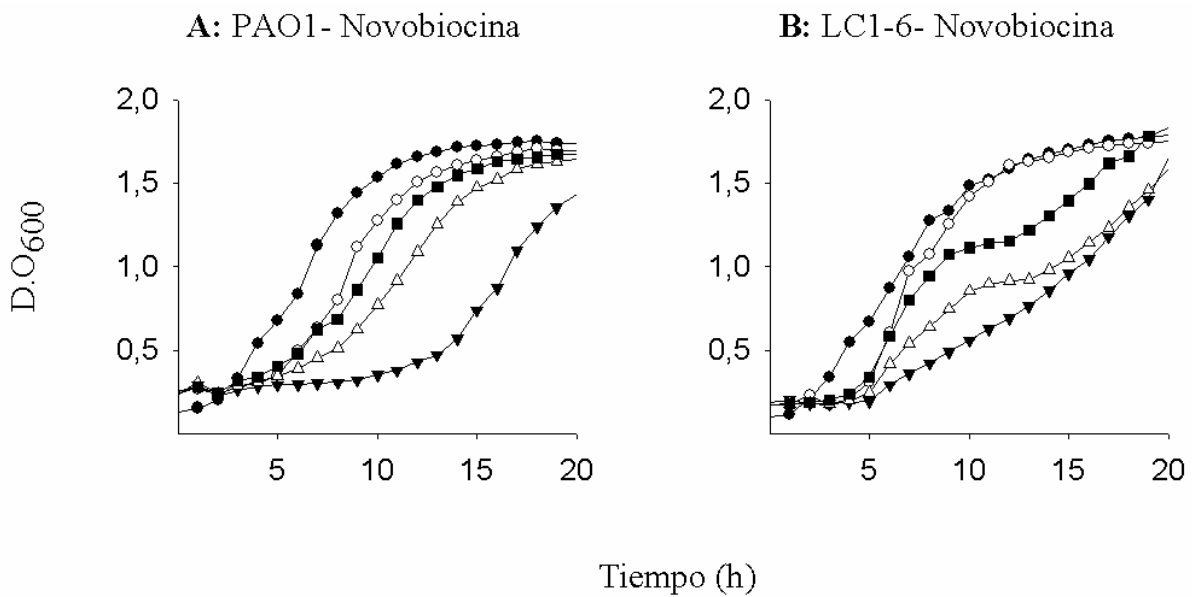


Figura 3.6- Curvas de crecimiento obtenidas mediante el Bioscreen C de las cepas (A) PAO1 y (B) LC1-6 (un mutante derivado de PAO1 que sobreexpresa la bomba MexAB-OprM) tratadas con P4-9 (2 veces su CMI) durante 1 h e incubadas tras la eliminación del péptido (tiempo 0) con un antibiótico sustrato de la bomba, la novobiocina. El antibiótico se añadió en los tiempos indicados tras la reanudación del crecimiento: ▼ inmediatamente después; Δ 1 hora después; ■ 2 horas después; ○ control tratado con P4-9 pero sin antibiótico; ● control no tratado con P4-9 pero incubado a tiempo 0 con una concentración del antibiótico idéntica a la empleada en el ensayo. En ambos casos, las cepas se trataron con 1/16 de su CMI a la novobiocina, es decir 64 μg/mL para PAO1 y 512 μg/mL para el mutante.

Evaluación del efecto permeabilizante producido por P4-9 sobre la envoltura de *P. aeruginosa* mediante microscopía de fluorescencia

En los apartados anteriores, la PAEP de P4-9 se estudio de manera indirecta, cuantificando la sensibilización a un antibiótico que el péptido provocaba en *P. aeruginosa* durante el tiempo de duración de este fenómeno. Para estudiar la PAEP de manera más directa, se evaluó el daño producido por el péptido P4-9 sobre la envoltura de *P. aeruginosa* mediante microscopía de fluorescencia empleando la cepa PAO1-gfp, un mutante derivado de la cepa salvaje PAO1 que expresa constitutivamente el gen de la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*; GFP). Para estos ensayos, se usó el protocolo de efecto postantibiótico descrito anteriormente, es decir, un pretratamiento con el péptido durante 1 h a una concentración dos veces superior a su CMI seguida de la eliminación del péptido mediante lavados por centrifugación. Posteriormente, las células se trataron con yoduro de propidio (IP). Se ha descrito que el IP es excluido por la envoltura celular cuando el organismo está vivo, pero puede penetrar y teñir la bacteria si ésta muere. De esta manera, se esperaba que las células vivas mantuvieran la fluorescencia verde característica de la proteína GFP, mientras que las células muertas se tiñeran de rojo, debido a la incorporación de IP en su interior por la pérdida de integridad de su envoltura.

En la Figura 3.7 se muestran imágenes representativas del aspecto de las células PAO1-gfp tratadas con P4-9 o polimixina B tras la eliminación del agente antimicrobiano mediante lavado. Como se puede observar, la práctica totalidad de las células tratadas con polimixina B se tiñeron de color rojo, lo que es indicativo de una potente acción letal de este agente sobre las células. Este efecto es el previsible en un péptido que es rápidamente bactericida a su CMI. Por el contrario, muy pocas células tratadas con el péptido P4-9 en las mismas condiciones aparecieron teñidas de color rojo. De hecho, la mayoría de células adquirieron una gama de colores que osciló entre el verde y el amarillo, muy probablemente debido a la superposición de las longitudes de onda verde de GFP y roja de IP. Esta observación indica que un porcentaje significativo de células tratadas con P4-9 permanece viable, lo que no es de extrañar, dado que la CMB de este péptido es bastante más alta que su CMI (CMI 16 µg/mL; CMB 128 µg/mL).

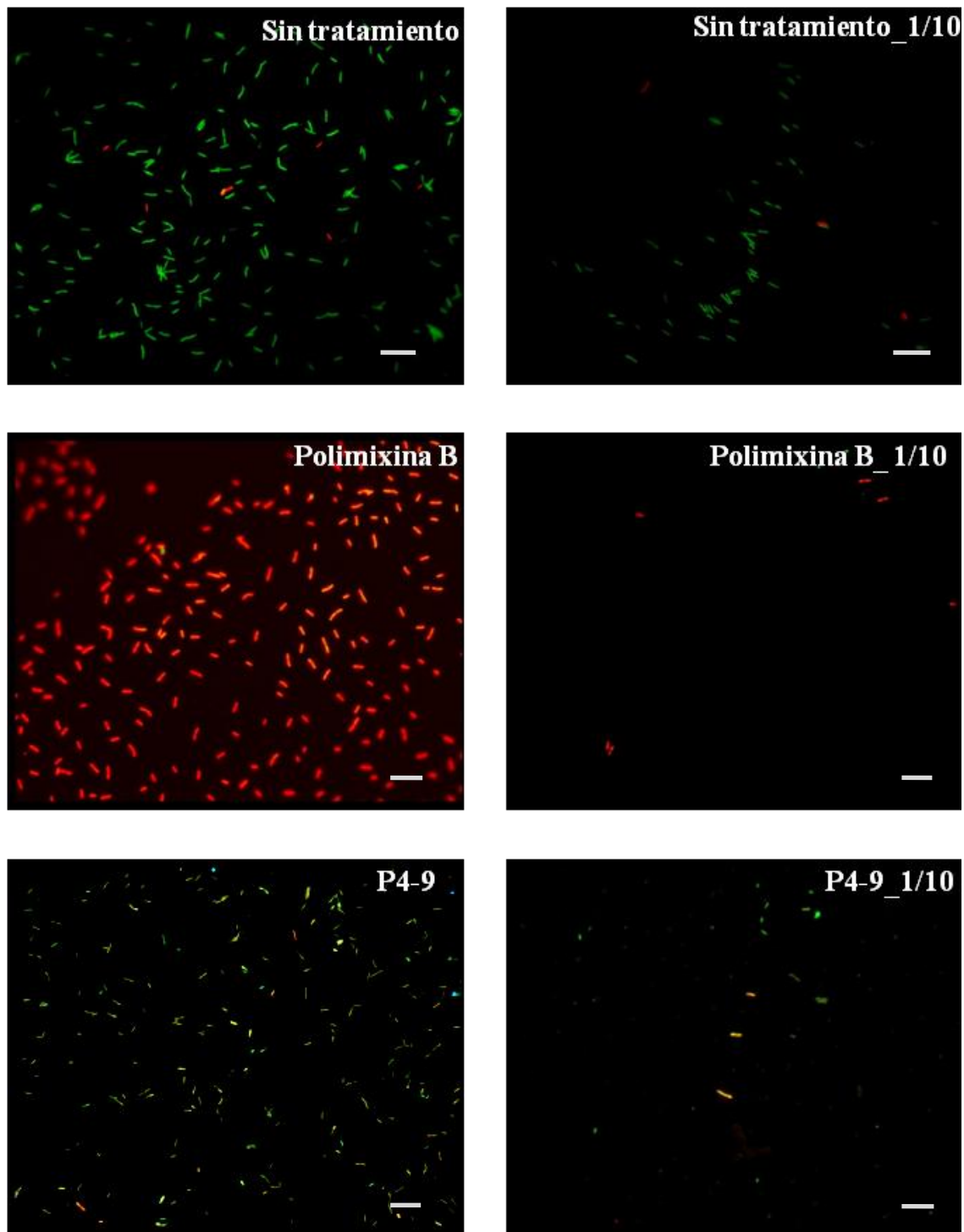


Figura 3.7- Evaluación del efecto permeabilizante producido por P4-9 sobre la envoltura de *P. aeruginosa* PAO1-gfp mediante microscopía de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas obtenidas a 1000 aumentos de células control sin tratamiento (paneles superiores), tratadas con polimixina B a 2 veces su CMI (paneles intermedios) y tratadas con P4-9 a 2 veces su CMI (paneles inferiores) durante una hora, tras tres lavados por centrifugación (para eliminar el péptido en los 4 paneles inferiores) y una posterior incubación con yoduro de propidio. La obtención de imágenes se realizó sobre muestras sin diluir (paneles de la izquierda) o diluidas diez veces (paneles de la derecha). Las células vivas emiten fluorescencia verde (debido a la expresión de la proteína *gfp*) y las células muertas se observan de color rojo (debido a la entrada de yoduro de propidio). Las células amarillas probablemente representen células viables que han perdido la capacidad de excluir el yoduro de propidio por daño o alteración en su envoltura celular. La barra equivale a una longitud de 5 μ m.

Visualización de posibles alteraciones producidas por P4-9 sobre la envoltura de *P. aeruginosa* mediante microscopía de fuerza atómica (*atomic force microscopy, AFM*)

Para intentar visualizar posibles alteraciones producidas por P4-9 en la superficie de *P. aeruginosa*, se trataron células de la cepa Ps4 con el péptido a dos veces su CMI y las células lavadas se observaron mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). Además, para estudiar la posible persistencia de las lesiones causadas por el péptido, también se obtuvieron imágenes de células tratadas con P4-9 a las que se permitió crecer en medio MH durante 1 ó 2 h después de dicho tratamiento. El AFM es un instrumento mecano-óptico capaz de rastrear la topografía de una muestra mediante una sonda (*cantilever*) acoplada a un listón flexible provisto de un láser que cambia su difracción según la rugosidad de la superficie. El constante escaneo físico de la muestra produce imágenes bidimensionales o tridimensionales dotadas de una elevada resolución y en las que es posible determinar con gran precisión la profundidad de campo. En estas imágenes, las zonas más claras corresponden a regiones más elevadas y las más oscuras se asocian con áreas más profundas.

La imagen de la Figura 3.8-A se obtuvo sobre células no tratadas y fue tomada con poco aumento para evaluar si el aspecto de las células era homogéneo. Estas imágenes mostraron que la superficie de las células sin tratar era clara y aparentemente muy lisa, sin surcos, poros o fisuras. Este fue el aspecto de la mayor parte de las células control observadas (n=15). Por el contrario, las imágenes equivalentes tomadas sobre bacterias tratadas con PMB revelaron la presencia de células oscuras y de aspecto rugoso. Además, se observaron diferencias de tonos y de intensidad de luz entre los distintos individuos, lo que refleja una gran heterogeneidad en la población (Figura 3.8-B). Las imágenes de células individuales tomadas a mayor aumento confirmaron estas observaciones. Así, la superficie de las células tratadas con PMB tenía un aspecto muy rugoso y alternaba zonas muy oscuras con otras más claras (Fig. 3.8-D). Por el contrario, las células no tratadas con el péptido poseían una envoltura clara, homogénea y aparentemente sin irregularidades (Fig 3.8-C).

El AFM permite explorar el perfil topográfico de superficies con una gran resolución. Para caracterizar con mayor detalle el efecto de la PMB sobre la envoltura

de *P. aeruginosa*, se obtuvo el perfil de la sección indicada con una línea negra en la Figura 3.8-D y se comparó con un perfil equivalente tomado de una célula sin tratar (línea negra en Figura 3.8-C). Como se observa en la Figura 3.8-F, el análisis de la superficie de la célula tratada con PMB proporcionó un perfil en sierra que alternaba zonas elevadas hasta 5 nm sobre la superficie con regiones que se hundían hasta 15 nm por debajo de ella. En cambio, la exploración de la superficie de la célula no tratada reveló una topografía muy regular sin zonas hundidas y con algún área que se elevaba suavemente desde la superficie celular (Figura 3.8-E). No obstante, las diferencias más marcadas entre las bacterias tratadas y sin tratar, se observaron al comparar las imágenes tridimensionales generadas por el AFM. Mientras que la forma curvada y alargada típica de un bacilo era fácilmente reconocible en la célula control, la superficie del microorganismo tratado con PMB aparecía profundamente alterada y desorganizada (Figuras 3.8-G y 3.8-H, respectivamente).

Por otra parte, las células tratadas con P4-9 y procesadas para AFM justamente después de la eliminación del péptido (Figura 3.9-A) mostraron cierta similitud con las bacterias tratadas con PMB, observándose una heterogeneidad en las envolturas con zonas más grises (profundas) que alternaban con zonas más claras (protuberancias). Esta heterogeneidad se puso de manifiesto con más claridad a mayor aumento (Figura 3.9-B), aunque también se observó que algunas células poseían aún zonas de su envoltura bien organizadas y ésta estaba menos alterada en general que en las bacterias tratadas con PMB. El análisis del perfil topográfico de las células tratadas con P4-9 reveló una gráfica en sierra similar a la observada en las células tratadas con PMB, aunque en este caso las diferencias de desnivel entre las zonas más profundas y las más elevadas (-5 nm y +10 nm, respectivamente *vs.* -15 nm y +5 nm) no fueron tan marcadas. El aspecto general de las células mejoró en la población bacteriana procesada para AFM después de crecer en ausencia del péptido durante 1h (resultados no mostrados). En general, en estas células se observó más abundancia de zonas claras y su perfil reveló que poseían una superficie menos alterada que en el caso anterior (Figura 3.9-D y 3.9-E). Sin embargo, en la envoltura de estas células se detectó una rugosidad muy uniforme, aunque de pequeña magnitud, con una diferencia entre “picos” y “valles” de aproximadamente 1 nm (perfil en Figura 3.9-E realizado a través de la sección indicada por la línea negra de la Figura 3.9-D).

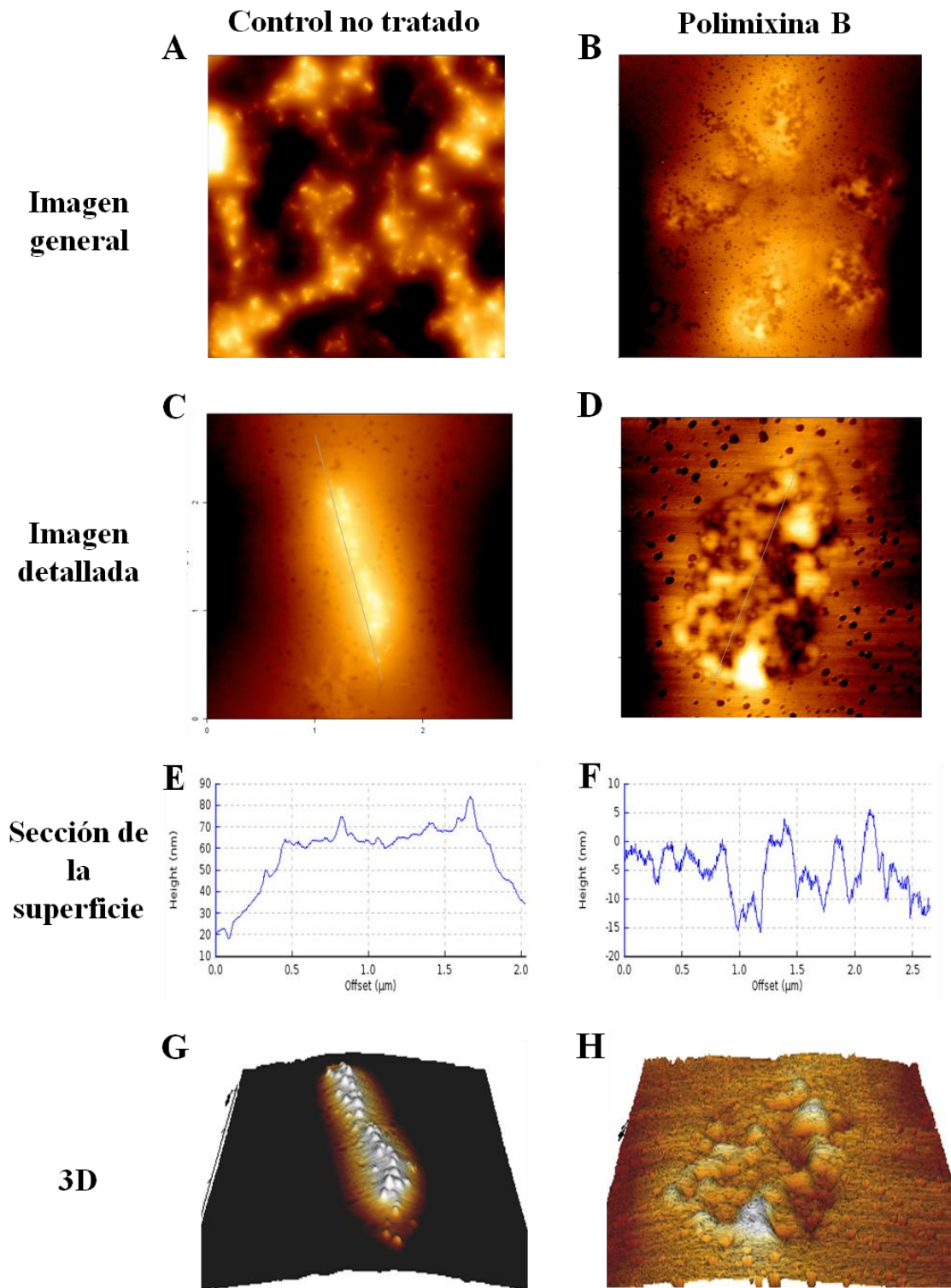


Figura 3.8- Imágenes obtenidas mediante AFM de la cepa clínica *P. aeruginosa* 4158 Ps4 sin tratar (bloque izquierdo de la Figura) y tras el tratamiento con PMB (2 veces su CMI) durante 1 hora (bloque derecho de la Figura). De cada cultivo se obtuvo: una imagen general (A,B); una imagen detallada de la imagen anterior (C,D); una sección longitudinal de la superficie de la imagen detallada (E,F); Imagen en 3D (G,H).

En cambio, los ensayos realizados con células que se habían cultivado en ausencia del péptido durante dos horas tras el tratamiento con P4-9, revelaron una población bacteriana más homogénea y más similar a la del control sin tratar (Figura 3.9-F). Esta observación se confirmó tras analizar el perfil de la sección indicada por la línea negra de la Figura 3.9-F, que reveló una envoltura homogénea y lisa mucho más similar a la de las células control sin tratar (Figura 3.9-G). No obstante, este último análisis permitió detectar zonas en la que persistía una leve rugosidad (comparar perfil de Figura 3.9-G con perfil de Figura 3.8-E), lo que sugiere que incluso tras dos horas de crecimiento en ausencia del péptido la envoltura de estas bacterias aún permanece ligeramente alterada.

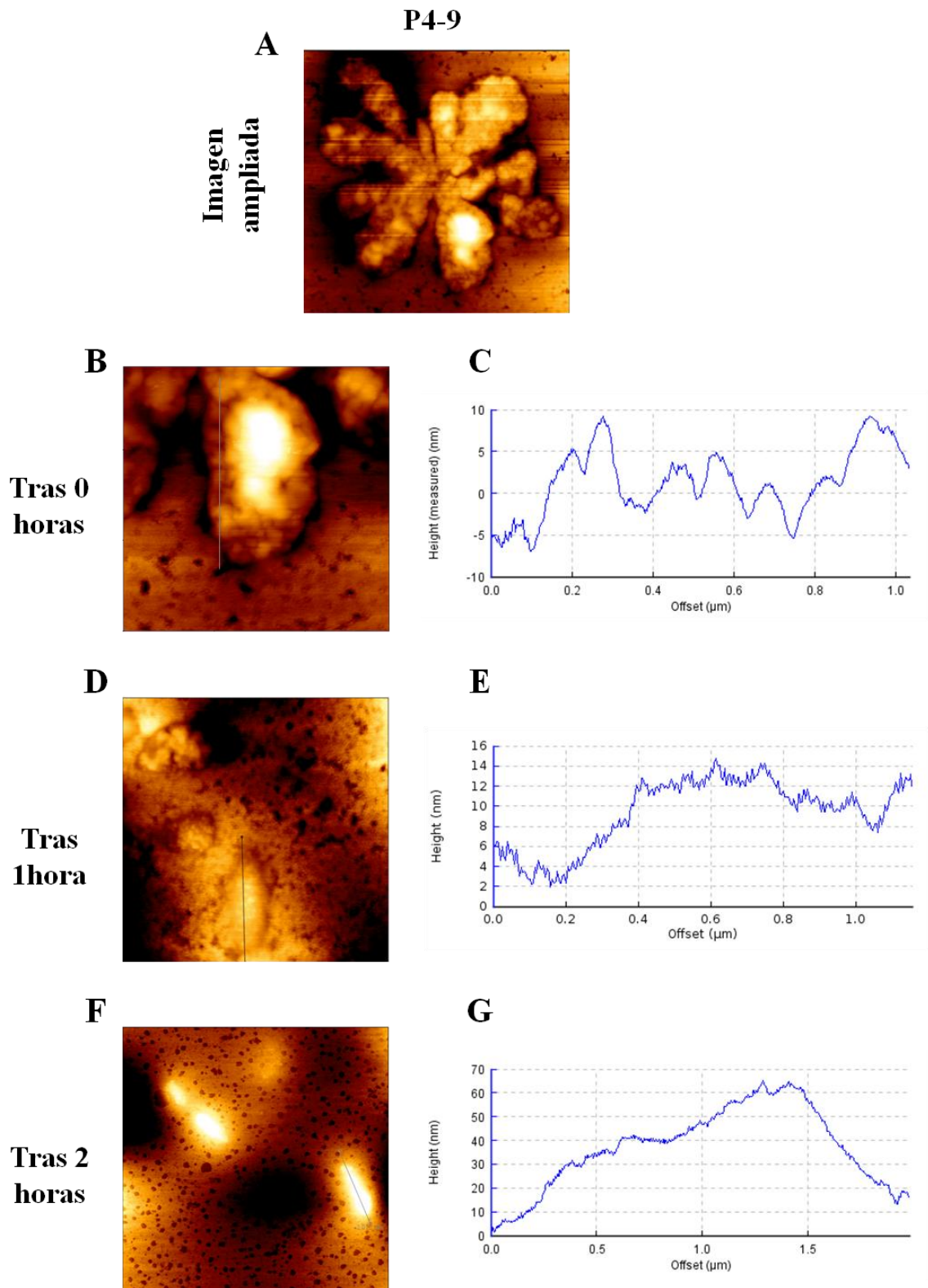


Figura 3.9- Imágenes obtenidas mediante AFM de la cepa clínica *P. aeruginosa* 4158 Ps4 tras el tratamiento con P4-9 (2 veces su CMI) durante 1 hora. Tras la eliminación de P4-9, las células se recogieron y se procesaron para AFM, bien inmediatamente después de la eliminación de P4-9 (A imagen general; B imagen detallada), o bien tras una hora (D) o tras dos horas (F) de re-crecimiento a 37 °C. El perfil de la sección indicada por la línea negra en los paneles B, D y F se muestra en los paneles C, E y G, respectivamente.

Capacidad de agentes antimicrobianos distintos a P4-9 para provocar PAEP en *Pseudomonas aeruginosa* Ps4

Para confirmar si la capacidad de provocar PAEP era o no exclusiva de péptidos catiónicos como P4-9, se repitieron los ensayos anteriores empleando antibióticos pertenecientes a diferentes familias y que poseían un mecanismo de acción distinto al de P4-9. Los antibióticos seleccionados fueron gentamicina, ciprofloxacino, imipenem y polimixina B. Como en los experimentos previos, la concentración utilizada para cada antibiótico fue de dos veces su correspondiente CMI, que en todos los casos osciló entre 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 3.2). Inmediatamente después del lavado y eliminación del agente antimicrobiano, o bien tras dejarlas crecer 1 o 2 horas en MH a 37 °C, las células se expusieron a concentraciones subinhibitorias de novobiocina. Concretamente, para estos ensayos se seleccionó una concentración de 1/8 de la CMI de la novobiocina, pues en experimentos preliminares esta concentración no produjo efecto alguno sobre la curva de crecimiento de un cultivo de Ps4 sin tratar con el péptido. Estos ensayos se realizaron empleando las técnica turbidimétrica Bioscreen C descrita anteriormente.

En correspondencia con lo descrito por otros autores, tanto la gentamicina como el ciprofloxacino causaron PAEs sobre *P. aeruginosa*. Concretamente, este último antibiótico mostró el doble de potencia que el primero causando un retraso de 1,5 h frente a las 0,75 h del aminoglucósido (Tabla 3.2). Por su parte, la PMB fue capaz de provocar un PAE muy débil, de sólo 0,1 h, mientras que dicho efecto fue indetectable en el caso del imipenem. Como se observa en la Tabla 3.2, únicamente para la PMB se detectó la existencia de PAEP, que como en el caso de P4-9, fue superior a 2 h pero inferior a 3 h. Concretamente, cuando la novobiocina se añadió en el tiempo 0, es decir, justamente después de reanudar el crecimiento tras la eliminación de PMB, se detectó un retraso ($S\text{-PAEP}_{\text{NOV}}$) de 3,2 horas. De manera similar a lo que ocurrió con P4-9, las células tratadas con PMB presentaron S-PAEPs gradualmente más cortos conforme se espaciaba la adición del antibiótico con respecto a la reanudación del crecimiento. En concreto, los valores de $S\text{-PAEP}_{\text{NOV}}$ fueron de 2,7 y 1,11 horas tras 1 h y 2 h de recrecimiento, respectivamente. Es de destacar que los valores de S-PAEP obtenidos para P4-9 en ensayos similares fueron de 4,8 h, 2,7 h y 0,45 h. Por tanto, aunque P4-9 superó inicialmente a la PMB en la magnitud del S-PAEP (tiempo 0 h), el comportamiento fue el inverso en la segunda hora, mientras que los agentes se igualaron en el periodo intermedio.

Tabla 3.2- Valores de Efecto Post Antibiótico (PAE), Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico (PAEP) de antibióticos y Sensibilización a la novobiocina durante el periodo PAEP en la cepa clínica *P. aeruginosa* Ps4 determinados mediante la técnica automatizada Bioscreen C

Pre-tratamiento	CMI/CMB (µg/mL)	Concentración empleada (µg/mL)	PAE ^a (h)	PAEP ^b (h)	S _{nov} -PAEP ^c (h)		
					0	1	2
GEN	2/2	4	0,75	0	<0,25	<0,25	<0,25
CIP	2/2	4	1,5	0	<0,25	<0,25	<0,25
IMI	2/2	4	0	0	<0,25	<0,25	<0,25
PMB	1/1	2	0,1	2-3	3,2	2,7	1,1

CIP, ciprofloxacino; IMI, imipenem; GEN, gentamicina; PMB, polimixina B.

^a Efecto postantibiótico.

^b Periodo en el que se puede detectar Permeabilidad Asociada al Efecto postantibiótico.

^c Sensibilización a la novobiocina durante el periodo PAEP: retraso en h causado por el antibiótico en el cultivo pretratado con el péptido en comparación con un cultivo tratado con el péptido pero no expuesto al antibiótico. Los tiempos en h (0, 1, 2) indican las horas transcurridas desde la reanudación del crecimiento hasta el momento de la adición del antibiótico. Los S-PAEP fueron cuantificados a diferentes tiempos tras la eliminación del pre-tratamiento antibiótico.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Péptidos derivados de la lactoferricina humana con actividad permeabilizante mejorada

Este trabajo demuestra que, mediante un análisis cuantitativo de relaciones estructura actividad (QSAR), es posible diseñar péptidos con capacidad permeabilizante mejorada. Este hecho confirma nuestra hipótesis de trabajo. Aunque la mejora de la capacidad antimicrobiana de péptidos antimicrobianos ha sido objeto de numerosos estudios, no tenemos constancia de que nadie haya investigado antes las bases estructurales de la actividad permeabilizante de estos compuestos.

En trabajos previos, nuestro grupo también empleó un análisis QSAR con éxito para mejorar la capacidad antimicrobiana y antiendotóxica de péptidos y lipopéptidos (generaciones P1, P2 y P3) derivados del dominio de unión al LPS de la lactoferricina humana (Sánchez-Gómez et al., 2008). El presente trabajo se basa en dos observaciones realizadas durante la caracterización de los péptidos P1. Por una parte, nuestros estudios revelaron que los mejores antimicrobianos no se correspondían con los permeabilizantes más potentes (Sánchez-Gómez et al., 2008; Sánchez-Gómez, 2008), lo que sugería que ambas actividades podían tener bases estructurales distintas. Por otra parte, un análisis preliminar de las secuencias de los péptidos P1 y de sus actividades permeabilizantes permitió deducir posibles descriptores de esta última actividad. Una vez diseñada la generación P2 (con la intención de mejorar, no la actividad permeabilizante de la generación anterior, sino la bactericida), estos descriptores se emplearon con éxito para predecir la actividad permeabilizante de los péptidos P2 (Sánchez-Gómez et al., 2011). Este último resultado sugería que era posible diseñar péptidos con capacidad permeabilizante mejorada mediante un diseño racional. Este fue el primer objetivo del presente trabajo.

Como se señaló anteriormente, el análisis QSAR empleado se basó en los datos experimentales de los péptidos P1 y P2, puesto que ninguno de los compuestos P3 (muchos de ellos lipopéptidos) superaba la capacidad permeabilizante de los mejores péptidos P2. Nuestros resultados demuestran que la mayoría de los péptidos de la generación P4 formaron combinaciones sinérgicas con la novobiocina frente a la cepa clínica multiresistente *P. aeruginosa* 4158 Ps4 en cualquiera de los medios utilizados.

Concretamente, el porcentaje de péptidos P4 con $CIF \leq 0,5$ fue del 65 % en medio de cultivo MHNA y del 55 % en el medio con mayor concentración de cationes divalentes (MHA). Los mejores péptidos permeabilizantes de esta cuarta generación mostraron, en general, mejor actividad permeabilizante que los mejores péptidos de la generación P2. Así, únicamente uno de los seis mejores péptidos de la generación P2 fue capaz de reducir la CIF por debajo de 0,5 en cualquiera de los medios empleados, en cambio, los mejores péptidos de la generación P4 actuaron en sinergia tanto en MHA como MHNA. Un ejemplo claro de mejora de la actividad es el péptido P4-1, que muestra una CIF de 0,08 en cualquiera de los medios empleados, superando al permeabilizante más potente de la segunda generación, P2-15 (CIF de 0,111 y 0,216 en MHA y MHNA, respectivamente).

Por otro lado, los datos de CCMI demuestran que los péptidos de esta nueva generación fueron capaces de ejercer su actividad potenciadora a concentraciones mucho menores que las de los mejores compuestos de la generación anterior. Por ejemplo, P4-2 redujo 256 veces la CMI de la novobiocina a una concentración de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ en medio MHNA, mientras que la reducción equivalente con el péptido más activo a baja concentración de la generación P2 (P2-27) fue de 8 veces. Una vez más, el péptido P4-1 ejemplifica bien la optimización de la capacidad potenciadora de antibióticos. Este péptido (PFWRRFWRRR-NH₂), que deriva directamente del péptido P2-27 (FWRRFWRR-NH₂) por adición de una prolina (P) y de una arginina (R) en los extremos amino y carboxi terminales, respectivamente, supera ampliamente la capacidad potenciadora de la novobiocina de su compuesto parental ($CIF_{P2-27} = 1,048$; $CIF_{P4-1} = 0,08$; medio MHA). Estos datos sugieren que los compuestos P4 poseen mayor afinidad por la membrana de *P. aeruginosa* que los compuestos parentales. No obstante, es necesario realizar estudios más detallados (por ejemplo, mediante calorimetría isotérmica de titulación con LPS de *P. aeruginosa* purificado) para demostrar esta hipótesis.

Algunas observaciones previas sugerían que una mejora de la actividad permeabilizante podía reducir la actividad antimicrobiana de péptidos derivados de lactoferricina humana (Sánchez-Gómez, 2008). Para investigar esta posibilidad, se determinó la CMI de los péptidos P4 sobre *P. aeruginosa* 4158 Ps4. Esta cepa se caracterizó parcialmente en estudios anteriores (Sánchez-Gómez, 2008), y en el presente

trabajo se demostró que producía una β -lactamasa AmpC desreprimida, lo que explica su resistencia frente a todos los antibióticos β -lactámicos excepto los carbapenemes. Contrariamente a lo esperado, en general los péptidos P4 superaron a los compuestos P2 también en actividad antimicrobiana. En concreto, el 18,2 % de los péptidos de la generación P2 (10 de 55) frente al 35 % (7 de 20) de los péptidos P4, mostraron una CMI ≤ 64 $\mu\text{g/mL}$ sobre *P. aeruginosa* 4158 Ps4 en medio MHNA. Además, frente a esta misma cepa, los péptidos P4-8 y P4-9 presentaron una CMI de 8 $\mu\text{g/mL}$, mientras que ningún péptido de la generación anterior alcanzó unas CMIs tan bajas.

Por otra parte, el aislamiento clínico *Bordetella bronchiseptica* 11844, fue la cepa que se mostró más sensible a los péptidos. Así, el 85 % (17 de 20) de los péptidos P4 logró inhibir el crecimiento de esta cepa a una concentración igual o inferior a 32 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para los péptidos de la generación P2, ese porcentaje fue del 63,6 % (35 de 55). Probablemente, la notable diferencia de sensibilidad a los péptidos catiónicos de *B. bronchiseptica* y *P. aeruginosa* radica en el hecho de que el primer organismo produce un lipopolisacárido con una cadena O mucho más corta que la del segundo (Caroff et al., 2001). En apoyo de esta hipótesis, en experimentos con mutantes de *Salmonella* con cadena O progresivamente más corta, nuestro grupo demostró que la actividad antimicrobiana del péptido LF11 (del que se deriva la generación P1) se reduce conforme aumenta la longitud de la cadena O del LPS (Japelj et al., 2007).

Aunque la PMB superó ampliamente a los péptidos P4 en capacidad antimicrobiana frente a los tres organismos gramnegativos ensayados, la mayoría de nuestros compuestos mejoraron la CMI de la PMB sobre *S. aureus*. De hecho, el 70 % (14 de 20) de los péptidos P4 logró CMIs iguales o inferiores a 32 $\mu\text{g/mL}$ (la CMI de la PMB sobre *S. aureus*), incluyendo cuatro compuestos con una CMI de 4 $\mu\text{g/mL}$ (P4-9, P4-17, P4-19, P4-20) y uno con CMI de 2 $\mu\text{g/mL}$ (P4-18). La buena actividad frente a grampositivos de los péptidos derivados de la lactoferricina ya había sido observada en generaciones anteriores (Sánchez-Gómez et al., 2011). No obstante, nuestros resultados muestran que también esta actividad mejoró de una generación a la siguiente. Así, el 70 % de los péptidos de la generación P4 logró inhibir el crecimiento de *S. aureus* a una concentración igual o inferior a 32 $\mu\text{g/mL}$, mientras que sólo el 36,3 % de los péptidos P2 presentó una actividad equivalente. Aunque se ha descrito que la carga negativa de los ácidos teicoicos, lipoteicoicos o el fosfatidilglicerol de la envoltura de las bacterias

grampositivas podría facilitar la interacción inicial de los péptidos antimicrobianos con la envoltura de grampositivos (Peschel et al., 1999; Senyurek et al., 2009; Vorland et al., 1999a; Vorland et al., 1999b), no conocemos qué características son responsables de la actividad antimicrobiana de nuestros compuestos frente a estos organismos. Actualmente, estamos investigando si los péptidos potencian la acción de antibióticos frente a cepas clínicas de grampositivos.

Por otro lado, se evaluó la toxicidad de los péptidos sobre una línea celular de fibroblastos obtenidos de la dermis humana. A diferencia de otras líneas celulares empleadas en estudios de toxicidad, la estirpe usada en nuestro estudio no es inmortal ni deriva de un proceso canceroso, lo que permite obtener conclusiones de mayor relevancia clínica (Riedl et al., 2011). Además, la cuantificación mediante el parámetro “concentración máxima inhibitoria 50” (IC₅₀), es decir, la concentración de péptido necesaria para inhibir el crecimiento del 50 % de las células, facilita la comparación del grado de toxicidad de los péptidos. Finalmente, en los estudios de hemólisis se emplearon dos tiempos de tratamiento para poder investigar una posible actividad lítica aguda o temprana (30 minutos) y tardía (24 horas) de los péptidos. Nuestros resultados revelaron que los péptidos P4 no tenían apenas capacidad inhibitoria sobre los fibroblastos, incluso cuando se usaron concentraciones de los péptidos muy superiores a las necesarias para causar inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa*. Asimismo, los péptidos mostraron una capacidad muy reducida para lisar eritrocitos humanos. De hecho, salvo los péptidos P4-11, P4-17 y P4-18 (IC₅₀ de 30-40 µg/mL a las 24 h), el resto de los compuestos apenas presentó capacidad hemolítica. Este hecho sugiere que estos péptidos, en general, poseen una elevada especificidad por la membrana de células procariontas.

En relación con otras interacciones biológicas, como las que ocurren entre un receptor y su ligando (K_d avidina-estreptavidina $\approx 10^{-6}$ nM) (Livnah et al., 1993) o un anticuerpo y su antígeno ($K_d \approx 1$ nM) (Friguet et al., 1985), la afinidad de los péptidos antimicrobianos por sus dianas moleculares es menor (K_d LPS-PMB ≈ 500 nM) (David, 2001). Este hecho disminuye la especificidad de la interacción y probablemente explique que el estudio de correlación entre los parámetros biológicos revelara una asociación positiva entre la toxicidad (citotoxicidad y hemólisis) y la CMI de los compuestos P4. Se ha descrito que el blanco de acción de los péptidos antimicrobianos

en las membranas celulares eucarióticas, son las moléculas de naturaleza anfipática, como los fosfolípidos (Papo et al., 2002). Un análisis de estructura-actividad realizado *a posteriori* sugiere que aquellos péptidos P4 cuya secuencia contiene un bajo número de triptófanos, una alta densidad básica, un ángulo hidrofóbico amplio (ψ de P4-18= 240°) y un momento hidrofóbico elevado (> 9 en P4-17 y P4-18) son los más hemolíticos (definición de estos parámetros en el apartado 5 de la Introducción). Estos cálculos se realizaron en el programa de predicción de estructuras *MPEX* (*Membrane Protein Explorer* (<http://blanco.biomol.uci.edu>)) asumiendo que los péptidos pueden formar α -hélices en membranas lipídicas. Esta premisa parece ser correcta, al menos en algunos de nuestros compuestos, pues el péptido P2-33, que posee una secuencia muy similar a varios de los péptidos P4 y P5, forma una estructura en α -hélice cuando se asocia a micelas de dodecilsfosfocolina (apartado 4.3 de Introducción; (Zorko et al., 2009)) Además, nuestros péptidos carecen de cisteína y metionina, dos aminoácidos que permiten formar puentes disulfuro y estabilizar a estructuras de tipo β -horquillas (*β -hairpin*), que son características de la lactoferricina nativa y de otros péptidos como las taquiplesinas y protegrinas (Bellm et al., 2000; Tang and Hong, 2009).

No obstante, incluso los péptidos P4 más tóxicos presentaron CI50 y capacidad hemolítica mucho más reducida que la de la melitina (Dempsey, 1990), un péptido prototipo entre los que forman α -hélices. Parece ser que este tipo de péptidos pueden alterar la estructura de la membrana debido a la inserción estable de la α -hélice anfipática dentro de las cabezas polares de los fosfolípidos (Figura 5 de la Introducción). Esta inserción puede provocar la formación de canales iónicos dependientes de voltaje que aumenten la permeabilidad de la membrana. Alternativamente, estos compuestos podrían formar estructuras micelares en la bicapa lipídica, promoviendo una discontinuidad de la membrana que tendría el mismo efecto perturbador que el fenómeno anterior (Dempsey, 1990). A pesar de que la baja toxicidad *in vitro* de los péptidos P4 es un resultado prometedor, son necesarios estudios de toxicidad y farmacocinética más completos en modelos animales para poder determinar las dosis tóxicas y terapéuticas de estos compuestos.

Nuestros resultados sugerían que los mejores permeabilizantes P4 (péptidos con los índices CIFs más bajos) correspondían frecuentemente a aquellos compuestos con menor actividad antimicrobiana (péptidos con CMI altas). Nuestro grupo realizó una

observación similar a ésta con los péptidos P1 y P2 (Sánchez-Gómez et al., 2011), pero ni en las citadas generaciones, ni en los péptidos P4, se detectó correlación inversa entre CIF y CMI. Para investigar la posibilidad de que estos dos parámetros estuvieran inversamente relacionados, caracterizamos la actividad biológica de un nuevo grupo de péptidos, los compuestos P5.

El nuevo ciclo de optimización integró los datos de estructura y actividad biológica obtenidos en las generaciones P1, P2 y P4 para generar los 24 péptidos P5. El estudio de estos compuestos reveló que el 87,5 % (frente al 65 % de la generación P4 y 27,2 % de la generación P2) de ellos fueron capaces de formar combinaciones sinérgicas en MHNA, mientras que el 50 % lo hizo cuando las condiciones de crecimiento fueron más estrictas (MHA). Este último resultado fue similar al obtenido con los compuestos P4. Además, en MHNA, casi el 30 % de los péptidos P5 fue capaz de disminuir la CMI de la novobiocina a la mínima concentración evaluada (6,25 µg/mL), mientras que sólo el 15 % de los péptidos P4 mostró una actividad sinérgica a esa concentración. Este hecho demuestra que el nuevo análisis QSAR proporcionó, no sólo un mayor número de agentes permeabilizantes (mejora cuantitativa), sino además péptidos capaces de actuar a una concentración inferior a la de sus compuestos parentales (mejora cualitativa). Esta última es una característica importante para aquellos agentes que puedan ser candidatos potenciales a ser utilizados en modelos animales.

En relación con su capacidad potenciadora de novobiocina, el 20 % de los compuestos P5 presentó CIFs mínimas inferiores a 0,1 (frente al 15 % de la generación P4), y en dos de los casos se obtuvo la CIF mínima más baja de todas las generaciones estudiadas (péptidos P5-15 y P5-17 con una CIF de 0,04). Además, los nuevos péptidos superaron a las generaciones anteriores en el parámetro CCMI (número de veces que disminuye la CMI de la novobiocina en presencia del péptido). Por ejemplo, los péptidos P5-12 y P5-21 disminuyeron 512 veces la CMI de la novobiocina a 25 µg/mL en MHA, mientras que dicha reducción fue de 256 veces en el caso de los péptidos P5-20 y P5-21 a 6,25 µg/mL en MHNA. Esta potente actividad potenciadora de la novobiocina no fue igualada, salvo por el péptido P4-2, por ningún otro péptido de las generaciones anteriores. Estas observaciones demuestran la eficacia del análisis QSAR empleado para optimizar la capacidad permeabilizante de los péptidos derivados de la

lactoferricina. Además, el análisis de correlación de actividades biológicas realizado sobre los péptidos P5 confirmó la hipótesis de que aquellos péptidos con menores CIF se corresponden con CMI's más elevadas. Un análisis equivalente realizado sobre el conjunto de los péptidos P4 y P5 apoyó la existencia de correlación inversa entre estos dos parámetros, si bien con un nivel de significación estadística inferior al alcanzado al analizar los compuestos P5 por separado.

Por otro lado, el estudio comparativo de los 6 mejores permeabilizantes de las tres generaciones (dos P2, dos P4 y dos P5) en combinación con tres antibióticos de uso clínico diferentes de la novobiocina, confirmó las observaciones anteriores. Así, la cefotaxima fue el antibiótico que se mostró menos susceptible a la potenciación y sólo los péptidos P4-2 y P5-12 actuaron en sinergia con este compuesto. Concretamente, este último péptido resultó ser el más activo de todos, pues fue capaz de disminuir hasta 16 veces la CMI de la cefotaxima a 50 µg/mL ($CMI_{P5-12} = 512 \mu\text{g/mL}$). La mayor dificultad de los péptidos para potenciar la actividad de los β -lactámicos ya se había descrito en generaciones previas (Sánchez-Gómez, 2008) y sugiere que la cepa clínica *P. aeruginosa* 4158 Ps4 presenta mecanismos de resistencia muy eficaces frente a estos antibióticos. Concretamente, la presencia de una cefalosporinasa AmpC desreprimida en la cepa Ps4, un hecho demostrado en este trabajo, puede explicar en parte la resistencia de esta cepa a la cefotaxima y a otros β -lactámicos. Nuestra hipótesis es que la permeabilización causada por el péptido, con la consiguiente entrada adicional de antibiótico, no es suficiente para saturar la enzima, aunque resulte en una cierta reducción de su eficacia. Actualmente, estamos investigando si los péptidos pueden cooperar con inhibidores de AmpC, como cloxacilina o ácido borónico, para potenciar la acción de las cefalosporinas. La resistencia de la cepa clínica Ps4 a la cefotaxima también podría ser debida a la sobreexpresión de la bomba MexAB/OprM, pues se ha descrito que las cefalosporinas de tercera generación son sustratos de este sistema de expulsión (Vila and Marco, 2010), que la cepa Ps4 sobreexpresa (Sánchez-Gómez, 2008).

A diferencia de lo observado con la cefotaxima, todos los péptidos mostraron buena capacidad sinérgica con la doxiciclina, probablemente debido a que este antibiótico –que es más hidrofóbico que las cefalosporinas– posee buena capacidad para atravesar membranas lipídicas a través de canales iónicos (Chopra, 1988). En

concordancia con los resultados anteriores, los péptidos P5 mostraron mejor actividad potenciadora de doxiciclina que los compuestos de generaciones previas. Concretamente, algunos péptidos P5 fueron capaces de reducir hasta 64 veces la CMI del antibiótico (de 64 $\mu\text{g/mL}$ a 1 $\mu\text{g/mL}$), incluso a una concentración de péptido de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los compuestos P2 y en menor medida los P4, sólo fueron capaces de hacerlo 32 veces a 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. No obstante, este antibiótico no permitió una buena discriminación entre los seis péptidos, puesto que todos ellos formaron combinaciones sinérgicas con CIFs similares a alguna de las concentraciones evaluadas.

Por el contrario, la combinación de los péptidos con azitromicina permitió discriminar entre péptidos no sinérgicos (P1) y péptidos sinérgicos (P4 y P5). Una vez más, los compuestos más activos a baja concentración y con CCMI más potente fueron los péptidos P5. En concreto, los compuestos P5-12 y P5-20 disminuyeron hasta 64 veces la CMI del antibiótico a 50 $\mu\text{g/mL}$ y a 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Además, la combinación de P5-12 (12,5 $\mu\text{g/mL}$) y azitromicina (10 $\mu\text{g/mL}$) estudiada mediante curvas de letalidad en la cepa Ps4 resultó poseer una actividad bactericida potente y muy rápida. De hecho, este tratamiento combinado disminuyó casi cuatro logaritmos la concentración inicial de viables en las primeras dos horas de incubación. Además, esta actividad sinérgica se mantuvo tras 24 horas de incubación, momento en el que la diferencia en el número de viables entre la combinación y el antimicrobiano más activo en solitario se situó por encima de los tres logaritmos. Es interesante destacar que ninguno de los dos tratamientos por separado causó reducción alguna de la viabilidad bacteriana en las primeras 6 h de tratamiento. Dada la reducida vida media de los péptidos en terapias experimentales, la rápida acción sinérgica detectada resultaba muy prometedora e invitaba a la realización de estudios *in vivo*.

Desde el punto de vista terapéutico y a pesar de no ser un antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*, la azitromicina presenta características interesantes para ser utilizada en combinación con péptidos permeabilizantes frente a este patógeno. Por un lado, se ha descrito que este compuesto posee capacidad para inhibir la formación de biofilm de *P. aeruginosa in vitro* (Ichimiya et al., 1996). Además, la azitromicina posee cierta actividad frente a *P. aeruginosa* en fase estacionaria *in vitro* (Mulet et al., 2009), incluso cuando es utilizado

a concentraciones subinhibitorias (Vranes, 2000). Otros trabajos han demostrado la capacidad de este antibiótico para inhibir la formación de alginato en cepas de *P. aeruginosa* productoras de *biofilm* (Hoffmann et al., 2007; Kobayashi et al., 1997; Mulet et al., 2009). Los mismos estudios indican que la azitromicina podría desestructurar la matriz extracelular de *biofilms* maduros de *P. aeruginosa*. Esta última propiedad podría permitir que el agente antimicrobiano atravesara la matriz de la biocapa y pudiera interactuar con las células bacterianas. Dicha propiedad haría de la azitromicina un antimicrobiano muy atractivo para el tratamiento de infecciones por este patógeno en pacientes con fibrosis quística (Baumann et al., 2004; Tsai et al., 2009).

Además, se ha descrito que la azitromicina se acumula en tejidos blandos como el pulmón, que es el órgano principalmente afectado en enfermos de fibrosis quística. Este antibiótico se emplea también para el control de infecciones causadas por patógenos que promueven el reclutamiento de macrófagos, por su facilidad para atravesar membranas, acumularse en el citoplasma de este tipo celular y liberarse de forma controlada (Bergan, 1995). Otros autores también han descrito la capacidad de la azitromicina para inhibir la liberación de exotoxinas bacterianas implicadas en graves infecciones sistémicas (Mizukane et al., 1994). En relación con la farmacocinética y farmacodinámica de la azitromicina, es de destacar su larga vida media (40 horas) y su buena distribución por los diferentes órganos y tejidos del organismo (Mensa et al., 2011). Por lo tanto, debido a su potente sinergia con péptidos antimicrobianos, su buena actividad frente a *biofilms* de *P. aeruginosa* y sus atractivas propiedades farmacocinéticas, se seleccionó la azitromicina para los estudios de potenciación antibiótica *in vivo* en un modelo de sepsis murino.

Para los ensayos *in vivo* de potenciación, inicialmente se decidió usar el compuesto P5-12, ya que había resultado ser el mejor permeabilizante P5 y había mostrado una potente sinergia con la azitromicina. Sin embargo, un experimento piloto realizado en el modelo murino de infección por *P. aeruginosa* Ps4 demostró que, incluso a bajas dosis (0,2 mg/ratón), el péptido P5-12 por sí mismo aceleraba la muerte de los animales. Este resultado concordaba con la significativa toxicidad determinada *in vitro* para este péptido (CI₅₀ de 75,33 µg/mL). Además, los análisis realizados en el programa de predicción de estructuras MPE_x (*Membrane Protein Explorer*) revelaron

que este péptido poseía un dominio hidrofóbico amplio y un momento hidrofóbico elevado, lo que predecía una buena interacción con membranas eucarióticas (Dathe and Wieprecht, 1999).

Como alternativa a P5-12 para los ensayos en el modelo de sepsis, se decidió usar el mejor permeabilizante P4, el compuesto P4-1, que se había mostrado completamente inocuo en los experimentos de toxicidad *in vitro*. Un experimento control demostró que el péptido por sí mismo (0,2 mg/ratón) no aceleraba la muerte de los animales y no confería protección a los ratones frente a la infección. Tampoco la azitromicina por sí sola fue capaz de proteger a los animales, aunque el tratamiento con este antibiótico se correlacionó con una tendencia a la reducción de la bacteriemia. Estos resultados eran los previsible en unos agentes con baja actividad frente a la cepa usada en estos experimentos ($CMI_{P4-1} = 128 \mu\text{g/mL}$; $CMI_{\text{azitromicina}} = 64 \mu\text{g/mL}$). En todo caso, la falta de actividad de los componentes de la combinación por separado era el comportamiento deseable para poder evaluar la capacidad potenciadora del péptido sobre la azitromicina.

Nuestros resultados indican que el nivel de potenciación de P4-1 sobre la azitromicina no es suficiente para conferir una protección significativa a los animales frente a la infección por Ps4. No obstante, los animales que recibieron el tratamiento combinado mostraron una clara tendencia hacia una mayor supervivencia que los animales no tratados ($p < 0,086$) o los tratados con los componentes de la combinación por separado. Esta tendencia se correlacionó con un ligero, aunque no significativo, descenso de la bacteriemia en los animales que recibieron la terapia experimental péptido-azitromicina. Sin embargo, el tratamiento combinado fue incapaz de reducir los niveles de TNF α , a pesar de que el péptido P4-1 había demostrado una alta capacidad *in vitro* para inhibir la liberación de esta citoquina. Probablemente, la cantidad de péptido inoculado en los animales no fuera suficiente para neutralizar el LPS liberado durante la infección. En conjunto, estos resultados sugieren que la terapia experimental podría optimizarse y llegar a ser terapéuticamente eficaz. Para ello, sería necesario profundizar en la farmacocinética, farmacodinámica y estabilidad del tratamiento combinado - fundamentalmente del componente peptídico- para optimizar el número de dosis, el intervalo entre dosis, la concentración de cada antimicrobiano y la vía de administración.

Optimización de la actividad permeabilizante de los péptidos mediante análisis QSAR

La optimización de la actividad antimicrobiana de las secuencias peptídicas mediante análisis QSAR basado en descriptores fisicoquímicos ha sido ampliamente empleada en los últimos años (Cherkasov et al., 2009; Frecer et al., 2004; Karakoc et al., 2006). No obstante, la aplicación de estos sistemas a la mejora específica de la actividad permeabilizante no se ha desarrollado todavía (Sánchez-Gómez et al., 2011). Como se comentó en la Introducción, los descriptores fisicoquímicos más robustos son aquellos basados en estructuras tridimensionales generadas, por ejemplo, mediante resonancia magnética nuclear. Dado que no siempre se dispone de estas estructuras, a menudo se recurre al uso de la modelización de péptidos por homología. No obstante, la principal desventaja de estos sistemas de modelización radica en que pequeños cambios en la secuencia pueden afectar de manera importante a la estructura de la molécula (Jenssen et al., 2007). Además, la conformación de los péptidos cambia cuando estos compuestos se insertan en la envoltura bacteriana, a menos que posean una estructura cíclica o estabilizada por puentes disulfuro.

La ventaja más importante de la estrategia PEDES (*Peptide Descriptors from Sequence*) sobre la modelización de péptidos por homología es que genera descriptores totalmente independientes de la estructura del compuesto y basados únicamente en la secuencia aminoacídica de los péptidos. Como se ha demostrado en este estudio, los descriptores PEDES, empleados conjuntamente con el análisis PLS (*Partial Least Square*), son una herramienta útil para la predicción de la actividad permeabilizante de péptidos antimicrobianos. Aunque en nuestro estudio hemos empleado la novobiocina como antibiótico modelo para el análisis QSAR, nuestros resultados demuestran que esta estrategia proporciona péptidos que potencian la acción de otros antibióticos, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos (apartado anterior, así como (Sánchez-Gómez et al., 2008; Sánchez-Gómez et al., 2011)). No obstante, sería posible realizar estudios QSAR orientados a la potenciación de una batería más amplia de antibióticos. Teóricamente, estos estudios podrían generar compuestos específicos optimizados para la potenciación de un antibiótico concreto.

Nuestros resultados indican que el análisis QSAR empleado no es capaz de predecir con fiabilidad la capacidad permeabilizante de péptidos derivados de lactoferricina, pues no se encontró correlación entre las CIFs predichas y las experimentales en las generaciones P4 y P5. Por el contrario, la misma metodología sí mostró una buena precisión para predecir las CIFs de la generación P2 (Sánchez-Gómez et al., 2011). El análisis empleado parece ser particularmente inapropiado para la predicción de la actividad permeabilizante de péptidos con buena capacidad bactericida (bajas CMIs). Este fue el caso, por ejemplo, de los péptidos P4-8 y P4-9, que resultaron tener una reducida actividad permeabilizante en contra de las predicciones del análisis QSAR. En cambio, la metodología empleada parece ser capaz de predecir fiablemente si un péptido poseerá una baja capacidad permeabilizante, lo que podría resultar útil para descartar a los compuestos menos prometedores.

Los errores cuantitativos que el análisis QSAR comete en sus predicciones de actividad permeabilizante demuestran que los factores que gobiernan la interacción de los péptidos con envolturas bacterianas son muy complejos y que existen parámetros que aún escapan a un diseño racional. Además, la interacción de los péptidos con el medio de cultivo empleado –un parámetro no contemplado en el análisis- podría dificultar aún más una adecuada predicción de la actividad biológica. No obstante, como demuestra el test estadístico de correlación realizado, (aunque con diferencias no significativas), en el 31-40 % de los casos, las predicciones sobre actividad permeabilizante de nuestro análisis QSAR fueron acertadas. Por tanto, aunque la metodología empleada es susceptible de mejora, podría seguir proporcionando péptidos con actividad potenciadora de antibióticos mejorada, sobre todo una vez que se integren las conclusiones estructura-actividad obtenidas con las generaciones P4 y P5.

Características fisicoquímicas que gobiernan la actividad de los péptidos P4 y P5

Como se ha señalado previamente, las características fisicoquímicas y estructurales de los péptidos juegan un papel esencial en su interacción con membranas de procariontes (cargadas negativamente) o de eucariotes (neutras). Así, el éxito de un buen péptido permeabilizante bacteriano depende de su baja citotoxicidad y de multitud de factores fisicoquímicos que deben estar bien equilibrados. Primeramente, es importante destacar la poca variedad de aminoácidos que presentan las secuencias de la

generación P4 (cuatro de carácter hidrofóbico: prolina, triptófano, isoleucina y fenilalanina; y uno básico, arginina), salvo el péptido P4-16 que contiene además una glutamina y una valina, y el P4-12 que contiene una asparragina. Por tanto, dada la homogeneidad de su composición, las diferencias de actividad entre estos compuestos radican básicamente en la ubicación y proporción de cada aminoácido, lo que a su vez determina la conformación tridimensional del péptido. En relación con la composición, los mejores permeabilizantes de la generación P2 (P2-15, P2-27, P2-29, P2-30 y P2-33) se componen también de los cinco aminoácidos descritos anteriormente. Esta observación sugiere que, la presencia de esos cinco aminoácidos podría facilitar una buena interacción con la envoltura bacteriana y la posterior permeabilización.

Por el contrario, la presencia de ciertos aminoácidos podría provocar una disminución de la actividad permeabilizante. Este hecho se observó en péptidos de la segunda generación, como P2-17, P2-18, P2-19, P2-20 y P2-21 y P2-35, que contienen residuos glutamina y asparragina en su secuencia y mostraron una reducida actividad permeabilizante (Sánchez-Gómez et al., 2011). No obstante, para confirmar esta hipótesis habría que realizar estudios con péptidos que contengan esos residuos en diferentes posiciones de la secuencia y observar cómo varía su actividad permeabilizante.

Por otra parte, en la generación P4 se puede observar un patrón molecular y estructural común en los péptidos con mejor actividad permeabilizante y baja toxicidad *in vitro*. Los mejores permeabilizantes (P4-1, P4-2 y P4-5) tienen la misma longitud (10 aminoácidos) el mismo número de triptófanos (2), el mismo número de residuos hidrofóbicos y básicos (5), la misma proporción de residuos hidrofóbicos y básicos (50 %), un momento hidrofóbico bajo y un ángulo hidrofóbico no mayor de 200 °. Además, los tres compuestos contienen cinco argininas (R) separadas en dos *clusters*, un grupo de tres en el extremo amino (P4-2 y P4-5) o carboxilo (P4-1) y otro grupo de dos en el centro de la secuencia. Este patrón secuencial puede permitir la formación de una α -hélice, una estructura que adoptan algunos péptidos antimicrobianos en su interacción con membranas. De hecho, como se comentó anteriormente el péptido P2-33, que posee una secuencia muy similar a varios de los péptidos P4 y P5, forma una estructura en α -hélice cuando se asocia a micelas que simulan membranas biológicas (Zorko et al., 2009). Además, el análisis de los péptidos con baja CIF mediante el programa

informático *MPEx* (*Membrane Protein Explorer*), reveló que estos pueden adoptar estructuras en α -hélice similares a las de otros péptidos antimicrobianos como magainina, melitina, cecropina, etc... (Dathe and Wieprecht, 1999).

Asumiendo que los mejores potenciadores de la novobiocina puedan adoptar una estructura en α -hélice, al menos parcialmente, hay varias propiedades que podrían explicar su capacidad permeabilizante. Por un lado, el elevado porcentaje de aminoácidos básicos (argininas) hace que estos compuestos contengan una carga catiónica importante que previsiblemente ayudará a que se acumulen en altas concentraciones, mediante uniones electrostáticas, en la superficie de las membranas cargadas negativamente. Asimismo, se ha descrito que la disposición tridimensional y el dominio hidrofóbico localizado pero no muy expandido (ángulo de dominio hidrofóbico Ψ no muy alto) junto con una hidrofobicidad intrínseca moderada aumentan la afinidad de los péptidos hacia los lípidos de membrana, y por tanto, la eficiencia de la permeabilización (Dathe et al., 1996; Dathe and Wieprecht, 1999). Los mejores permeabilizantes P4 comparten todas estas características. Asimismo, se sabe que aquellos péptidos con mucha carga catiónica, pero sin dominio hidrofóbico y con una hidrofobicidad intrínseca moderada se acumulan en grandes cantidades en la superficie bacteriana, pero tienen una baja eficiencia de permeabilización (Dathe et al., 1996; Dathe and Wieprecht, 1999).

Por otro lado, se ha descrito que los péptidos con un bajo valor de momento hidrofóbico no interactúan correctamente con membranas neutras, lo que reduce su toxicidad sobre células eucariotas (Wieprecht et al., 1997). Esta es con gran probabilidad la causa de la baja citotoxicidad de los mejores permeabilizantes P4. Algo similar ocurre con los mejores permeabilizantes de la generación P2 (P2-15 y P2-27), que tampoco presentaron citotoxicidad. La menor actividad permeabilizante de los compuestos P2 respecto a los péptidos P4 y P5 puede ser debida a la menor cantidad de residuos básicos de los primeros, lo que puede reducir su concentración sobre la superficie bacteriana. Por el contrario, el péptido más citotóxico de la cuarta generación, P4-18 (FWIRIWRIWRR-NH₂), presenta un dominio hidrofóbico muy amplio ($\Psi = 240^\circ$) y un momento hidrofóbico relativamente alto (10,62) que hacen que probablemente interaccione y desorganice eficazmente las membranas neutras, como confirman los resultados de hemólisis (DH₅₀ de 29-47 $\mu\text{g/mL}$). Por otro lado, la

reducida carga catiónica de este compuesto (4 residuos catiónicos de 11 residuos totales; un 36 %) parece jugar un papel importante en la disminución de su afinidad hacia membranas con carga negativa y puede explicar su baja capacidad permeabilizante. Un hecho similar ocurre probablemente con el péptido P4-11 (FWRWRWRF-NH₂), al igual que sucede también para la δ -hemolisina de *S. aureus* (Dathe and Wieprecht, 1999).

Respecto a la relación entre la estructura y propiedades fisicoquímicas de los péptidos y su capacidad de unión al LPS, no se ha determinado un patrón definido. Teóricamente, al igual que sucede con la afinidad por las membranas con carga negativa, la presencia de suficientes residuos básicos en un dominio localizado debería incrementar la afinidad de los péptidos por el LPS. No obstante, estos factores (carga y ángulo de dominio hidrofóbico) no afectaron de manera significativa a la capacidad de los péptidos para unirse al LPS e inhibir la liberación de TNF α . Por el contrario, se detectó una correlación positiva entre esta capacidad inhibitoria y el tamaño (número de aminoácidos) del péptido, siendo mejores inhibidores los péptidos más grandes. Además, el ensayo en el que se empleó un ratio de LPS-péptido de 1-100, reveló que un mayor número de residuos hidrofóbicos en la secuencia podría jugar un papel importante en la mejora de la interacción con el LPS. De hecho, nuestros resultados muestran que los mejores permeabilizantes (P4-1, P4-2 y P4-5) y los mejores bactericidas (P4-8 y P4-9) son los compuestos que disminuyen más la liberación de TNF α inducida por LPS. Esta observación coincide con lo publicado por Molhoek y colaboradores, que describieron una correlación directa entre la capacidad del péptido LL-37 de modular las respuestas dependientes de TLR4 y la presencia de residuos hidrofóbicos y catiónicos en su secuencia (Molhoek et al., 2009). Es probable que la complementación de estos resultados *in vitro* con estudios en modelos animales donde se pudieran medir la capacidad de los péptidos para inhibir la producción de varias citoquinas proinflamatorias, como TNF α (Andra et al., 2005; Sánchez-Gómez et al., 2008), IL-6, IL-8 o IL-1, ayudara a detectar o seleccionar aquellos péptidos potencialmente activos frente al choque endotóxico.

No obstante, no se puede descartar que la interacción entre los péptidos y la endotoxina ocurra de distinta manera cuando ésta se encuentra en forma libre que cuando se encuentra estructuralmente formando parte de la membrana externa. Esto no

es de extrañar, dado que el LPS libre forma complejos agregados multilamelares en soluciones acuosas y su actividad endotóxica depende de la conformación tridimensional de estos agregados (Kowalski et al., 2010). En numerosos experimentos, se ha demostrado que la capacidad de un péptido para neutralizar la liberación de TNF α dependiente de LPS depende de que ese péptido induzca un cambio de conformación en los agregados de LPS (Kaconis et al., 2011; Kowalski et al., 2010). Además, se ha observado que en muchas ocasiones el aumento de la afinidad de los péptidos por el LPS libre fruto de un incremento de cargas positivas en la molécula disminuye la eficiencia de permeabilización de los péptidos sobre células enteras (Dathe and Wieprecht, 1999). En apoyo de esto, aunque los péptidos P4-16 o P5-6 son los compuestos que mayor número de cargas positivas (+8 y +9, respectivamente) presentan en su secuencia, su capacidad permeabilizante es menor que la de otros péptidos con menor carga, como P4-1 (+6) y P5-12 (+6).

Asimismo, parece ser que la afinidad por el LPS no es el parámetro más importante para que un péptido pueda permeabilizar la envoltura celular. Así, Chapple y colaboradores (Chapple et al., 2004) empleando péptidos derivados de la lactoferrina humana han descrito que tras el contacto con la membrana externa, la permeabilización de la envoltura requiere una agregación de los péptidos entre sí, para la que no es necesaria la interacción con el LPS. Por lo tanto, la capacidad de los péptidos para permeabilizar la envoltura bacteriana no tiene necesariamente que depender de los mismos factores fisicoquímicos que la interacción entre el péptido y el LPS libre.

En resumen, los resultados obtenidos con los péptidos P4, indican que ciertos parámetros estructurales, tales como la carga, helicidad, momento hidrofóbico, hidrofobicidad y tamaño del dominio hidrofóbico juegan un papel clave en la interacción de nuestros péptidos con membranas procariotas y eucariotas. La actividad hemolítica podría reducirse mediante la disminución de la anfipaticidad de la molécula (menor momento hidrofóbico), el tamaño del dominio hidrofóbico y la hidrofobicidad intrínseca, mientras que un aumento de la carga catiónica y un dominio hidrofóbico moderado podrían aumentar la actividad frente a envolturas o componentes de la envoltura bacteriana. Nuestros datos confirman que el correcto equilibrio entre todas estas variables es crítico para asegurar una buena actividad biológica y una adecuada

especificidad, en concordancia por lo descrito por otros autores (Dathe and Wieprecht, 1999).

En general los péptidos P5 son más grandes que los de la generación anterior (una media de 10,3 aminoácidos frente a 9,6 de la generación anterior), contienen una hidrofobicidad intrínseca superior (-1,75 frente a -1,3) y contienen una proporción mayor de residuos básicos e hidrofóbicos (anexo 3A y 3B). Mediante los modelos de correlación estadística se estudió la existencia de: i) asociación entre propiedades o actividades biológicas; ii) asociación entre la estructura fisicoquímica (descriptores constitucionales) del péptido y sus actividades biológicas. Este simple análisis permitió detectar asociaciones relevantes que podrían ayudar a predecir el comportamiento de futuras generaciones de péptidos.

En relación con la actividad biológica, nuestros resultados finalmente demostraron una asociación negativa entre la CMI y la CIF mínima. Una asociación de este tipo ya había sido descrita por Koo y colaboradores (Koo et al., 2001) en péptidos antimicrobianos no derivados de la lactoferricina y con actividad sobre *S. aureus*. Este resultado sugiere que las características fisicoquímicas y estructurales de los compuestos con valores de CIF mínima bajos implican condiciones incompatibles con una buena capacidad antimicrobiana. Esto queda patente en el hecho de que ninguno de los péptidos que destaca como permeabilizante (P2-15, P2-27, P2-29, P4-1, P4-2, P5-12 y P5-20), posea buena CMI (<16 µg/mL frente a *P. aeruginosa*) y que ninguno de los mejores antimicrobianos (P5-6, P5-7, P5-10, P4-8, P4-9 y P4-18) muestre una capacidad permeabilizante significativa. Por ello, se puede concluir que la probabilidad de sintetizar un péptido que combine una buena capacidad antibacteriana frente a *P. aeruginosa* (CMI < 4-8 µg/mL) con una elevada capacidad potenciadora de antibióticos (CCMI > 32-256) es probablemente muy baja. En concordancia con esta conclusión, muchos autores destacan la baja asociación que existe entre la capacidad potenciadora de antibióticos y la actividad bactericida de numerosos compuestos de características fisicoquímicas muy distintas (Sánchez-Gómez et al., 2008; Savage, 2001; Scott et al., 1999), incluyendo también péptidos híbridos cecropina-melitina (CEMA) (Piers et al., 1994) y péptidos derivados de PMB, como la PMBN (Vaara and Vaara, 1983).

En relación con los parámetros fisicoquímicos que gobiernan la actividad de los péptidos P5, un resultado interesante fue la existencia de correlación entre la densidad de residuos hidrofóbicos de la secuencia y la CMI y CIF mínima de los péptidos. Es de destacar que el análisis de la generación P4 no reveló resultados significativos en este sentido, pero sí se detectaron al integrar conjuntamente los resultados de las generaciones P4 y P5. Así, el número de residuos hidrofóbicos muestra una correlación inversamente proporcional con la CMI (menor CMI, mayor densidad hidrofóbica), y directamente proporcional con la CIF (menor CIF, menor densidad hidrofóbica). Este resultado confirma la hipótesis de trabajos como el de Li y colaboradores (Li et al., 1999). Estos autores demuestran que la adición de cadenas hidrofóbicas a compuestos derivados del ácido cólico aumenta su capacidad antimicrobiana, pero a la vez da lugar a que los compuestos pierdan su actividad permeabilizante. Resultados similares obtuvieron Savage y colaboradores con antibióticos esteroideos (Savage et al., 2002) y Zhang y colaboradores con péptidos derivados de CP26 (Zhang et al., 1999b). Para explicar estos resultados, estos autores postulan que el mecanismo que causa la actividad antimicrobiana se convierte en tan agresivo que no admite modulación y por tanto el compuesto inhibe, incluso mata, pero no permeabiliza. Esta hipótesis podría explicar el hecho de que la PMB (un péptido covalentemente unido a un ácido graso de marcado carácter hidrofóbico) sea un potente agente bactericida y un mal permeabilizante, mientras que su derivado no acilado (la PMBN) tenga exactamente las propiedades opuestas.

Otras observaciones realizadas en nuestro trabajo refuerzan las conclusiones anteriores. Este es el caso de P4-8 (PFWRIRIRRWIRR-NH₂) y P4-9 (PFWRIRIRRWRR-NH₂), dos péptidos similares a P2-33 (PFWRIRIRR-NH₂) en los que prevalece la actividad antibacteriana sobre la permeabilizante debido probablemente a un aumento de la densidad hidrofóbica en el extremo carboxilo. Además, los dos péptidos P4 poseen mayor carga positiva que P2-33 por adición de dos argininas. Es de destacar el caso de los péptidos P2-25 (FWRRWIRR-NH₂) y P5-17 (FWRRIWRR-NH₂). Éste último se compone básicamente de la secuencia completa de P2-25, pero con un intercambio de la isoleucina y el triptófano en posiciones 5 y 6, respectivamente. Dicho intercambio mejora la capacidad permeabilizante de P5-17 con respecto a su compuesto parental (menores CIF mínimas) en cualquiera de las

condiciones evaluadas. Este caso es más difícil de interpretar, pues el contenido de aminoácidos en ambos péptidos es idéntico. Los motivos que explican la reducción de CIFs en P5-17 pueden tener que ver con cambios estructurales, como la estabilidad y la potencia del dominio hidrofóbico (Sahalan and Dixon, 2008; Vaara and Viljanen, 1985). No obstante, sería necesario realizar estudios fisicoquímicos más detallados, por ejemplo mediante RMN, para confirmar estas conclusiones.

Nuestros resultados indican que, además de la composición de los péptidos, también su conformación (por ejemplo, su capacidad para formar de α -hélices), la disposición tridimensional de los residuos y las interacciones intra-moleculares podrían jugar un papel esencial en la actividad potenciadora de antibióticos y en la capacidad antimicrobiana. Estas observaciones implican una posible limitación de los descriptores PEDES, que como se ha señalado anteriormente, se basan únicamente en la composición de los péptidos.

Mecanismo de acción de los péptidos P4 y P5

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo y discutidos en el apartado anterior podemos sugerir un modelo de mecanismo de interacción de nuestros péptidos con la envoltura bacteriana. Varios grupos de investigación han estudiado la acción de péptidos como la PMB y sus derivados sobre bicapas lipídicas artificiales que imitan a la membrana bacteriana. Por ejemplo, en algunos estudios se han empleado como modelos de membrana, bicapas compuestas por LPS y fosfatidilglicerol (POPG) (Clausell et al., 2003), dos moléculas con carga eléctrica negativa. Estos estudios muestran que el mecanismo bactericida de PMB requiere la formación de las denominadas “interacciones vesícula-vesícula” entre la membrana externa e interna, es decir, un intercambio molecular entre los componentes de ambas bicapas lipídicas. Este fenómeno de mezcla provoca la inestabilidad osmótica que precede a la muerte celular (Oh et al., 1998; Zhang et al., 2000). Asimismo, se ha descrito que tanto la PMB como su derivado no acilado PMBN son capaces de insertarse en membranas compuestas por LPS, mientras que sólo la PMB (la única molécula bactericida de las dos) es capaz de hacerlo en aquellas formadas por POPG (Clausell et al., 2007). Esto sugiere que la unión y la inserción de los péptidos a la membrana externa no es suficiente para

producir un efecto bactericida, sino que éste depende de la interacción entre el péptido y la membrana interna (Yeaman and Yount, 2003).

Por otra parte, parece claro que el carácter puramente permeabilizante y bacteriostático de la PMBN se debe a su reducida capacidad para interactuar con la membrana interna, una vez que lo ha hecho con la membrana externa. A su vez, esta incapacidad se ha achacado (Clausell et al., 2007) a la pérdida del grupo acilo (el dominio hidrofóbico “menor” de la PMBN), junto con el menor número de cargas positivas de esta molécula (+4 frente a +5 de la PMB). Parece ser que el proceso de incorporación de un péptido a la membrana interna está dirigido por las interacciones hidrofóbicas (“interacciones vesícula-vesícula”) entre los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana interna y las secciones hidrofóbicas del péptido. Esto explicaría por qué la PMBN, al carecer de la cadena hidrofóbica de la PMB no interactúa con la membrana interna como su compuesto parental y sólo promueve un aumento de permeabilidad (Clausell et al., 2007).

La información publicada por Zorko y colaboradores (Zorko et al., 2009) sobre la estructura de P2-33 y nuestros propios resultados indican que los péptidos P4 y P5 pueden adquirir una conformación en α -hélice cuando interactúan con membranas. Esta conformación permite la generación de regiones hidrofóbicas y básicas separadas y localizadas en dominios más o menos bien definidos. Aunque se ha descrito que la inserción tanto de P2-33 como de la PMB ocurriría de manera perpendicular a la membrana bacteriana (Clausell et al., 2007; Zorko et al., 2009) (Figura 5C-izquierda de la Introducción), la presencia de la larga cadena hidrofóbica lineal en la PMB explica probablemente la superior actividad bactericida de este compuesto. De acuerdo con este modelo, los dominios hidrofóbicos de P2-33 (y por extensión las de los péptidos P4 y P5) suplirían en parte la ausencia de una cadena acilo como la de la PMB, pero no en un grado suficiente como para generar una actividad antimicrobiana cercana a la de este agente.

Los mejores antimicrobianos presentados en este trabajo contienen una carga bastante alta (+6), junto con un dominio hidrofóbico potente, por lo que es probable que sean capaces de insertarse en la membrana interna bacteriana, produciendo un desequilibrio osmótico y la muerte. Por el contrario, los mejores permeabilizantes,

muestran un número de cargas positivas algo inferior y poseen dominios hidrofóbicos estables, pero más débiles que los de los péptidos con bajas CMIs. Este hecho debería permitirles una interacción con los fosfolípidos de la bicapa lipídica, sin que apenas existiera acción antimicrobiana.

Para profundizar en el mecanismo de acción de nuestros péptidos y en su actividad permeabilizante frente a bacterias gramnegativas sería necesario realizar estudios de interacción en modelos que simulan membranas bacterianas. Algunos de estos modelos permiten reconstruir en parte la disposición de la envoltura de gramnegativos, pues constan de monocapas de LPS (simulando la membrana externa) y de POPG (simulando la membrana interna). En este tipo de ensayos, que han sido utilizados para caracterizar los mecanismos de acción de compuestos antimicrobianos (Andra et al., 2004; Andra et al., 2007; Andra et al., 2008; Clausell et al., 2003; Clausell et al., 2007; Kaconis et al., 2011; Kowalski et al., 2010), la permeabilización se traduce en cambios de conductancia.

Consideraciones metodológicas de los ensayos *in vitro*

Los ensayos de susceptibilidad mediante la técnica *checkerboard* se llevaron a cabo en dos medios de cultivo (MHA y MHNA) que diferían notablemente en su contenido en cationes divalentes. Nuestros resultados demuestran que en muchos casos los péptidos que presentaban actividad permeabilizante en el medio con bajo contenido en Ca^{2+} y Mg^{2+} (MHNA) retenían esa propiedad en presencia de niveles más elevados de cationes divalentes (medio MHA). Por el contrario, el uso de MHA permite un cribado de actividad antimicrobiana y permeabilizante más exigente, pero no detecta todos los compuestos potencialmente interesantes y es más sensible a la interferencia que determinados antibióticos sufren en presencia de cationes divalentes (Amsterdam, 2011). Por ello, para aumentar el umbral de sensibilidad del método *checkerboard*, puede ser recomendable la realización de un primer cribado de los péptidos en medio MHNA. No obstante, el uso de medio MHA es recomendable para la selección de candidatos previa a un estudio *in vivo*, dado que el plasma y el líquido intersticial tienen una concentración de cationes divalentes similar a la del medio MHA (en torno a 10 mg/L y 25 mg/L, respectivamente (Guyton and Hall, 2006)). Estas observaciones

coinciden con lo descrito anteriormente por Sánchez Gómez y colaboradores para los péptidos P1 y P2 (Sánchez-Gómez et al., 2008).

Dado que el método *checkerboard* clasificó correctamente a los péptidos P4 por su actividad permeabilizante y sus resultados fueron confirmados por los de las curvas de letalidad, nuestro estudio indica que el *checkerboard* es un método fiable y puede emplearse como técnica de cribado. En general, para la medida de la actividad sinérgica de dos antimicrobianos, el método *checkerboard* es la técnica más utilizada, debido a su menor coste y a la posibilidad de adaptación para el cribado de un elevado número de muestras (Eliopoulos and Moellering, Jr., 2011). No obstante, esta técnica no proporciona información sobre la actividad bactericida de una combinación, sino sólo de su capacidad bacteriostática. Esto limita la aplicabilidad de este método, pues para el tratamiento de ciertas infecciones (endocarditis, meningitis, osteomielitis, etc...), se necesita demostrar que una determinada combinación es bactericida. Además, los ensayos *checkerboard* ofrecen una información muy limitada, pues sólo permiten evaluar el estado de la población microbiana tras 18-24 h del inicio de la incubación sin que pueda conocerse fácilmente qué ocurre en el periodo anterior. Finalmente, el índice CIF calculado mediante la técnica *checkerboard* debe usarse con precaución, pues asume, de forma incorrecta, que los antimicrobianos presentan curvas dosis-respuesta lineales.

Por el contrario, las curvas de letalidad (*killing curves* en la literatura en lengua inglesa) informan sobre la actividad bactericida de la combinación en estudio y sobre la cinética de muerte de la población microbiana. Además, la monitorización de la actividad bactericida, en especial durante las horas iniciales de la incubación, permite estudiar la velocidad a la que una combinación actúa. Por ello, este método es superior al de *checkerboard* y es el más recomendable para caracterizar la actividad sinérgica de compuestos antimicrobianos. No obstante, si el número de moléculas en estudio es elevado, puede ser conveniente hacer un cribado inicial de los compuestos mediante el método *checkerboard* y realizar después la técnica de curvas de letalidad con los candidatos seleccionados para confirmar los resultados.

Por otro lado, para cuantificar la unión de los péptidos al LPS se empleó el ensayo conocido como Bodipy-cadaverina (BC). Esta técnica mide la capacidad de una

molécula para unirse al LPS y desplazar a un compuesto fluorescente (la BC) previamente ligado al LPS (Moore and Hancock, 1986; Wood et al., 2004). Parece ser que la BC es superior a la dansilcadaverina o la PMB dansilada, ya que permite observar un aumento de fluorescencia, que no queda enmascarado por otros grupos aromáticos, como sí ocurre con los compuestos alternativos mencionados. Además, la BC tiene menor afinidad por el LPS que la PMB dansilada, lo que permite mejorar la sensibilidad del ensayo y su capacidad discriminativa. Como prueba de ello, la técnica empleada en este trabajo fue capaz de discriminar entre la afinidad por el LPS de la PMB y la de su derivado PMBN, demostrando que el primer compuesto tiene más afinidad por el LPS que el segundo, como Wood y colaboradores habían descrito anteriormente (Wood et al., 2004).

Mientras que el método BC mide la afinidad de los péptidos por el LPS de manera directa, los ensayos de inhibición de la liberación de TNF α inducido por LPS, informan de manera indirecta sobre dicha afinidad. En estos ensayos se emplearon células mononucleares humanas (CMNh), que reconocen y se unen al LPS, liberando citoquinas proinflamatorias, como el TNF α (Nau and Eiffert, 2002). En investigaciones previas y empleando compuestos P2 y P3, nuestro grupo ha demostrado que la actividad antiendotóxica de los péptidos en este tipo de ensayos es consecuencia de su capacidad para unirse a los agregados de LPS e inducir un cambio en su conformación tridimensional. Concretamente, este cambio aumenta el tamaño de los agregados de LPS y genera una transición desde la fase unilamelar y cúbica (propia del LPS puro y muy endotóxica) a una fase multilamelar (carente de endotoxicidad) (Brandenburg et al., 2010).

Por otra parte, en nuestro trabajo, se detectó que la incubación del LPS con algunos de los péptidos, no sólo no reducía la capacidad del LPS para inducir TNF α , sino que la aumentaba. Dado que se demostró que los péptidos por sí solos carecían de capacidad inductora de TNF α , la citada observación sugiere que la combinación LPS-péptido genera un complejo de mayor capacidad endotóxica que el propio LPS. Este fenómeno podría tener varias causas. Primeramente, el péptido podría facilitar o reforzar la interacción del LPS con el receptor TLR4/MD-2 de CMNh. Otra posibilidad es que el péptido interactúe con el LPS y promueva bien una mayor solubilización (Munford and Hall, 1979), o bien una transición en los agregados a una fase más

endotóxica que la del LPS puro. Este último fenómeno ha sido demostrado mediante el empleo de agentes catiónicos distintos a péptidos y con afinidad por el LPS, como la trietilamina (Garidel et al., 2005). Finalmente, algunos autores han descrito que algunos péptidos antimicrobianos como LL-37 tienen capacidad de unión al receptor CD-14 y alteran y modifican las respuestas transcripcionales de los macrófagos, como las vías de producción de quimioquinas, citoquinas y receptores relacionados con la respuesta inmunológica (Scott et al., 2002; Scott and Hancock, 2000).

En general, los péptidos que mostraron mayor afinidad por el LPS en el ensayo BC, como el P4-6, no fueron capaces de bloquear significativamente la liberación de TNF α en CMNh. Esta falta de correlación en los resultados puede deberse a varios motivos. En primer lugar, es posible que los péptidos se unan al LPS con gran afinidad, pero que no sean capaces de bloquear la región endotóxica de la molécula (lípidos A), como se describió anteriormente (David, 2001). En segundo lugar, a pesar de que los péptidos se puedan unir a la porción endotóxica del LPS, podrían no ser capaces de impedir la interacción de éste con el receptor TLR4/MD-2, y por lo tanto, la cascada de señalización celular que origina la producción de TNF α . En tercer lugar, no se puede descartar que la biodisponibilidad de al menos algunos péptidos en medio específico para líneas celulares (RPMI suplementado con suero fetal bovino) se viese reducida por la potencial unión del péptido a algún componente del medio. Por último, los péptidos con baja afinidad en el ensayo BC y buena capacidad inhibidora de TNF α podrían tener una capacidad inmunomoduladora, independiente de su interacción con el LPS, que promoviera la activación o inhibición de determinadas cascadas de la respuesta celular, reduciendo así los niveles de TNF α . Este fenómeno se ha descrito en el péptido LL37, que es capaz de inhibir genes (NF κ B-1, TNFAIP2) implicados en la expresión de estímulos proinflamatorios a través de la cascada de señalización NF κ B (Mookherjee et al., 2006).

Aunque la técnica de la inhibición del TNF α inducido por LPS aporta información indirecta sobre la afinidad de los péptidos por la endotoxina, posee varias características que la hacen superior al método BC en estudios como el nuestro. Por un lado, la técnica indirecta permite medir la capacidad antiendotóxica de los péptidos, que es el parámetro con más relevancia para los posteriores estudios *in vivo*. Además, el hecho de que se empleen células mononucleares sanguíneas acerca este ensayo *in vitro*

a las condiciones *in vivo*, pues este tipo celular es uno de los encargados de detectar y responder al LPS en el organismo. Finalmente, esta técnica emplea células humanas que se obtienen a partir de la sangre de voluntarios sanos poco tiempo antes de realizar los ensayos, lo que probablemente aumente el grado de fiabilidad del método. A pesar de todo lo anterior y por las citadas limitaciones del método de la inhibición de TNF α , los resultados de esta técnica deben ser confirmados posteriormente en modelos animales de sepsis, que siguen siendo indispensables para evaluar la eficacia de agentes potencialmente destinados a terapias antiendotóxicas en el ser humano. Por ello, aunque algunos de los compuestos desarrollados en este estudio poseen propiedades antiendotóxicas muy prometedoras (por ejemplo los péptidos P4-1, P4-2, P4-5, P4-8, P4-9, P4-11 y P4-19), es necesario realizar estudios *in vivo* para confirmar estos resultados.

Este trabajo ha desarrollado compuestos con baja toxicidad sobre células humanas y potente actividad potenciadora de varias clases de antibióticos de uso clínico. No obstante, este estudio presenta algunas limitaciones que será necesario abordar en futuros experimentos. Primero, no se ha demostrado que los péptidos retengan su capacidad permeabilizante y antiendotóxica en presencia de una concentración de iones equivalente a la del medio interno humano. De hecho, es bien conocido que algunos péptidos que son activos a baja fuerza iónica pierden, al menos parcialmente, esa actividad cuando se exponen a condiciones fisiológicamente más relevantes (por ejemplo, concentraciones de iones sodio por encima de 100 mM) (Bowdish et al., 2005). Además, tampoco se ha medido hasta qué punto nuestros péptidos son estables en presencia de proteasas humanas o retienen su actividad cuando se exponen a suero. Se sabe que la sensibilidad a estos dos factores puede limitar notablemente la actividad biológica *in vivo* de los péptidos antimicrobianos.

Por otra parte, algunos trabajos demuestran el rápido aclaramiento de algunos péptidos antimicrobianos en estudios *in vivo*, como la colistina o viomicina (dos péptidos cíclicos) que muestran una vida media de 2-3 horas (Mensa et al., 2011; Reed et al., 2001). Otros péptidos antimicrobianos presentan vidas medias incluso más cortas, del orden de unos pocos minutos (Brouwer et al., 2008). No obstante, dado que los péptidos P2 y P3 han demostrado poseer una buena actividad antiendotóxica y potenciadora de antibióticos *in vivo* (Brandenburg et al., 2010; Sánchez-Gómez et al.,

2011), se espera que, a pesar de las posibles limitaciones citadas, alguno de los péptidos desarrollados pueda demostrar su eficacia en modelos animales de infección y/o de endotoxemia. La baja toxicidad celular y actividad hemolítica de nuestros péptidos debería permitir el empleo de una mayor concentración o de una disminución del tiempo interdosis manteniendo así unas concentraciones terapéuticas adecuadas.

Efecto postantibiótico

El efecto postantibiótico (PAE) ha sido objeto de numerosos estudios debido a su gran interés clínico, ya que -como se comentó en la Introducción- la posesión de PAE puede influir notablemente en la actividad terapéutica de un antimicrobiano y por tanto en los regímenes de dosis empleados (Craig and Gudmundsson, 1996). La persistencia del efecto antimicrobiano, en conjunción con una buena capacidad bactericida, han sido definidos como los parámetros más importantes para establecer el plan de administración de una terapia antibiótica (Andes and Craig, 1998). Como ya se ha mencionado, la utilización de un antimicrobiano con prolongado PAE permite espaciar sus administraciones sin riesgo adicional. Los microorganismos inicialmente supervivientes a la exposición al agente mantienen durante cierto tiempo una tasa de crecimiento inferior a la habitual y además son relativamente insensibles al antimicrobiano. Este fenómeno permite retrasar la siguiente administración hasta un momento en el que la población bacteriana haya vuelto a las condiciones de crecimiento normales y haya recuperado su sensibilidad al antimicrobiano.

El objetivo principal de este estudio fue demostrar si algún péptido P4 era capaz de producir PAE en la cepa clínica *P. aeruginosa* 4158 Ps4. Si esto fuese así, se podrían reducir las dosis necesarias de la terapia combinada sin afectar a la eficacia del tratamiento. Debido a que el PAE ocurre a concentraciones superiores a la CMI de un antimicrobiano, se estudió este efecto en los péptidos P4 de menor CMI (P4-8, P4-9 y P4-18). Nuestros resultados demuestran que sólo P4-9 fue capaz de producir un PAE significativo de entre 1,3 y 1,4 horas, dependiendo del método de determinación empleado. Este hecho puede ser debido a las características estructurales de P4-9, ya que además de ser un péptido muy catiónico (posee 2 cargas positivas más que P4-18), presenta un dominio hidrofóbico disperso y potente (superior a P4-8), lo que podría ayudarle a desestabilizar la bicapa lipídica. Sin embargo, estas conclusiones son

preliminares, pues no se conocen las relaciones entre la estructura y la actividad PAE de los péptidos antimicrobianos.

El PAE de péptidos catiónicos no ha sido prácticamente estudiado, debido probablemente a que estos agentes suelen ser bactericidas a su CMI y su mecanismo de acción (la desorganización de la envoltura) produce consecuencias irreparables en una población bacteriana sensible. La envoltura es sin duda la estructura más importante para la supervivencia bacteriana, pues es responsable de la homeostasis, del equilibrio osmótico y del funcionamiento de la mayoría de procesos celulares. Es posible que la elección del agente antimicrobiano y las condiciones empleadas en nuestros ensayos hayan favorecido la detección de PAE en P4-9. Por un lado, es importante destacar que P4-9 tiene una CMB mucho más elevada que su CMI (128 $\mu\text{g/mL}$ frente a 16 $\mu\text{g/mL}$) por lo que, a las condiciones de incubación (32 $\mu\text{g/mL}$), el péptido no es necesariamente bactericida, si bien se detectó una significativa reducción de la viabilidad en el cultivo tratado respecto al no tratado. En apoyo de esta hipótesis, se ha descrito que la colistina, un antimicrobiano muy parecido a la PMB, y bactericida a su CMI (Tabla 1.3), no provoca PAE frente a *P. aeruginosa* en las mismas condiciones en las que se llevó a cabo nuestro estudio (Li et al., 2001), mientras que en nuestros ensayos detectamos un PAE de tan solo 0,1 h para la PMB. Además, es probable que la reducción del tiempo de exposición al péptido (1 hora en nuestro ensayo vs. 2 h en otros protocolos) evite que se produzcan alteraciones demasiado drásticas desde el punto de vista de la viabilidad bacteriana.

Es de destacar que P4-9 posee un PAE similar o incluso superior al descrito, en condiciones experimentales comparables a las de nuestro estudio, para antibióticos convencionales como gentamicina o ciprofloxacino (Domínguez et al., 2001). En otras condiciones de estudio, se han determinado PAEs de 2,2 horas para la gentamicina, 2,4 horas para ciprofloxacino y 1,5 horas para imipenem, aunque estos ensayos se realizaron empleando concentraciones cuatro o cinco veces superiores a las respectivas CMIs de estos compuestos (Craig and Gudmundsson, 1996).

Como también hemos observado en este estudio, se ha descrito que el PAE de un antimicrobiano es dependiente del método de cuantificación (Craig and Gudmundsson, 1996; MacKenzie et al., 1994). La técnica de referencia para el estudio del PAE es el

recuento de viables, un método considerado como el más fiable, pues permite conocer el impacto del agente en estudio en la viabilidad de la población microbiana y cómo ésta se recupera numéricamente en el tiempo. No obstante, esta metodología ha sido criticada por muchos autores, puesto que asume que la relación entre el número de células viables y el de unidades formadoras de colonias (UFC) es igual a uno, lo que con frecuencia no es cierto. De hecho, muchos bacilos gramnegativos pueden producir filamentos formados por 20 o más células cuando son expuestos a los antibióticos, en especial a β -lactámicos y, en menor medida, a quinolonas. Cuando el antibiótico se elimina del medio, estas agrupaciones celulares se separan y aumentan aparentemente el tamaño de la población (Lorian et al., 1989). En consecuencia, un recuento de viables posterior a este fenómeno puede proporcionar resultados paradójicos (como PAEs negativos), pues se observa que el cultivo tratado crece en apariencia más rápido que el cultivo control sin tratar. Además, muchos autores creen que este método sobreestima el PAE, puesto que al extraer, transferir y sembrar las muestras desde el medio líquido a un nuevo medio de cultivo sólido para el recuento de viables, las bacterias dañadas por el antibiótico pueden perder su viabilidad (Craig and Gudmundsson, 1996).

Como procedimiento alternativo al recuento de viables, se ha descrito que el método turbidimétrico basado en el uso del sistema semiautomático Bioscreen C permite también calcular el PAE de antimicrobianos (Lowdin et al., 1993). La eficacia de este método para el cálculo de PAEs de antibióticos convencionales había sido ya señalada por Domínguez y colaboradores (Domínguez et al., 2001), que no encontraron diferencias significativas entre el método turbidimétrico y el procedimiento de referencia (el recuento de viables). Nuestros resultados permiten extender estas conclusiones a péptidos antimicrobianos, pues también nosotros hemos detectado una buena concordancia entre los dos métodos para el cálculo del PAE de P4-9. Esta buena correspondencia entre los resultados de ambos ensayos también se observó cuando se evaluó un antibiótico control de PAE conocido (la gentamicina). Los ensayos de PAE con este antibiótico se hicieron con la cepa de control de calidad de antibióticos *P. aeruginosa* ATCC 27853, obteniéndose en la técnica turbidimétrica resultados similares a los descritos para el recuento de viables (resultados no mostrados).

Por otra parte, la técnica turbidimétrica ofrece numerosas ventajas sobre el método de recuento de viables. Por un lado, el empleo de un sistema semiautomático

simplifica el trabajo y hace que los ensayos sean menos laboriosos. Además, esta técnica permite el análisis de un elevado número de muestras, lo que la hace muy útil para el cribado de compuestos en condiciones experimentales distintas. Finalmente, el hecho de que empleando este método hayamos obtenido resultados de PAE para antibióticos convencionales, como gentamicina o ciprofloxacino (0,75 h y 1,5 h en *P. aeruginosa* Ps4, respectivamente), muy similares a los publicados por otros grupos (0,8 h y 1,2 h en *P. aeruginosa* ATCC 27853, respectivamente (Domínguez et al., 2001)), sugiere que la técnica es reproducible. Una observación similar a la anterior se realizó en *P. aeruginosa* con el péptido antimicrobiano PMB, en el que se detectó un PAE muy reducido (0,1 h), confirmando las observaciones de otros autores (Li et al., 2001).

A pesar de los numerosos estudios realizados sobre péptidos catiónicos derivados de la lactoferrina humana (Andra et al., 2005; Sánchez-Gómez et al., 2008), apenas hay estudios que hayan demostrado el PAE de estos compuestos. Haukland y colaboradores descubrieron que algunos derivados de la lactoferrina bovina tenían PAEs frente a *E. coli* y *S. aureus* (Haukland and Vorland, 2000; Haukland and Vorland, 2001). Por otro lado, tampoco se ha investigado la base biológica de este efecto en péptidos antimicrobianos. Al igual que se ha postulado para la colistina (Li et al., 2001; Plachouras et al., 2007) o la melitina (Han et al., 2009), nuestra hipótesis es que el PAE detectado en P4-9 puede tener como base biológica una severa alteración de la envoltura de *P. aeruginosa* 4158 Ps4. Esta alteración persistiría durante un periodo de tiempo, durante el que la bacteria emplearía parte de su energía y metabolismo (con síntesis *de novo* de componentes) en la reparación de su envoltura. Esto explicaría el aumento en el tiempo de generación observado tras el tratamiento con P4-9. Los experimentos de microscopía de fluorescencia y AFM (apartado siguiente) apoyan esta hipótesis.

Permeabilidad asociada al efecto postantibiótico (PAEP)

La capacidad de algunos péptidos antimicrobianos para sensibilizar a las bacterias a ciertos antibióticos es un hecho bien conocido desde hace décadas (Hancock, 1997a; Vaara and Porro, 1996; Vaara and Viljanen, 1985; Viljanen and Vaara, 1984). Sin embargo, hasta este trabajo no se había demostrado que dicha propiedad puede persistir durante varias horas después de la eliminación del péptido. Asimismo, no nos consta que ningún trabajo haya demostrado antes la existencia de sinergia entre un

péptido y un antibiótico (o incluso entre dos antibióticos) cuando los dos compuestos no están presentes de manera simultánea en el ensayo.

La identificación del PAEP tiene importantes implicaciones terapéuticas para un agente que fuera a administrarse conjuntamente con un antibiótico. De hecho, si uno de los dos componentes de una combinación de antimicrobianos causara PAEP se podría esperar que no fuera necesaria la presencia simultánea de los dos componentes para asegurar la eficacia del tratamiento. Esto es especialmente relevante en el caso de los péptidos antimicrobianos, pues como se mencionó anteriormente, estos compuestos poseen una vida media *in vivo* significativamente menor que la de otros antibióticos. Por tanto, la posesión de PAEP en un péptido compensaría su reducida vida media, pues un antibiótico co-administrado podría ejercer su acción en ausencia del agente potenciador.

Aunque el fenómeno del PAEP es novedoso en la literatura científica, se han publicado numerosos estudios centrados en cuantificar parámetros similares como el efecto sub-CMI (*Sub-MIC effect* (SME)) o el efecto postantibiótico sub-CMI (*Postantibiotic Sub-MIC effect* (PA-SME)) (Cars and Odenholt-Tornqvist, 1993; Fuentes et al., 1998; Licata et al., 1997; Odenholt, 2001; Odenholt et al., 2003; Odenholt-Tornqvist et al., 1991; Odenholt-Tornqvist et al., 1992). Todos estos trabajos se basan en realizar una segunda exposición al mismo antibiótico a concentraciones subinhibitorias tras haber realizado un pre-tratamiento con ese antibiótico a concentraciones superiores a su CMI durante un corto periodo de tiempo, observándose una sensibilización de la bacteria o un retraso adicional en su crecimiento. Otro efecto frecuentemente estudiado es el PALE (*Postantibiotic Leucocyte Enhancement*), un fenómeno caracterizado por una mayor susceptibilidad bacteriana a la fagocitosis o a la muerte intracelular en leucocitos cuando los microorganismos se encuentran en la fase postantibiótica (Craig and Gudmundsson, 1996). Finalmente, otros estudios han analizado el PAE producido por la combinación de dos o varios antibióticos, pero nunca utilizando una metodología secuencial (Craig and Gudmundsson, 1996).

Tomados en conjunto, nuestros experimentos demuestran que el PAEP es producto de una alteración en la envoltura producida por el péptido y que este efecto persiste coincidiendo con el tiempo necesario para que la bacteria repare ese daño

estructural. De acuerdo con esta hipótesis, la envoltura sería permeable a otros compuestos durante el tiempo de reparación. A su vez el mencionado daño estructural explicaría la existencia de PAE, como se postuló en el apartado anterior.

Hay varias líneas de argumentación que apoyan nuestra hipótesis. Así, el PAEP parece un fenómeno específico de aquellos antimicrobianos que provocan un daño en la envoltura, como los péptidos catiónicos. Por el contrario, el hecho de que un antimicrobiano posea PAE, no implica necesariamente que provoque PAEP. Así, nuestros resultados demuestran que, ni siquiera los antibióticos para los que hemos detectado los valores de PAE más altos, como el ciprofloxacino (1,5 h), poseen PAEP en combinación con la novobiocina. Algunos autores han descrito que la gentamicina puede penetrar en la célula permeabilizando la envoltura, de una manera similar a como lo hacen los péptidos antimicrobianos (Vaara, 1992). Sin embargo, nuestros resultados indican que la posible alteración en la envoltura provocada por la gentamicina no es suficiente para causar PAEP, aun cuando este antibiótico posee un marcado PAE (0,75 h). Sería necesario realizar experimentos más detallados para demostrar que la gentamicina produce efectivamente alteraciones estructurales en la envoltura bacteriana. Por el contrario, el péptido antimicrobiano para el que se ha determinado el valor de PAE más bajo (PMB; PAE= 0,1 h), provoca un potente PAEP que persiste al menos 2 h. Precisamente, las severas alteraciones provocadas por la PMB en la envoltura de gramnegativos son la manifestación ultraestructural más patente de la interacción de este péptido con la membrana externa bacteriana (Martínez de Tejada et al., 1995).

En concordancia con la hipótesis formulada para explicar el PAEP, hemos demostrado que la duración de este efecto (siempre menos de 3 h) es una propiedad característica del péptido antimicrobiano y es independiente del antibiótico empleado en el estudio. Por el contrario, cada antimicrobiano aprovecha con diferente eficacia el periodo PAEP causando distintos retrasos temporales, que hemos definido como S-PAEPs. Como hemos demostrado, el valor de este último parámetro depende, no sólo del tipo de antimicrobiano usado, sino también de los mecanismos de resistencia a ese determinado antibiótico que la cepa empleada posea. Además, la progresiva reducción de S-PAEP conforme transcurre el tiempo entre la eliminación del péptido y la adición del antibiótico está en buena correlación con nuestra hipótesis, pues éste sería

precisamente el fenómeno previsible en un proceso de reparación gradual de la envoltura celular como el que hemos postulado.

Por otro lado, los resultados obtenidos mediante microscopía de fluorescencia son una demostración directa de que la envoltura de *P. aeruginosa* tratada con P4-9 está permeabilizada, sin que ello resulte en una pérdida total de viabilidad. Como se ha comentado anteriormente, esta última observación era de esperar, dado que la concentración de P4-9 empleada en estos ensayos era muy inferior a la CMB del péptido. Aún así, este resultado no sería concluyente sin los recuentos de viables, que mostraron un aumento progresivo de la población bacteriana tras la eliminación de P4-9, evidenciando que efectivamente la población bacteriana contenía un porcentaje muy significativo de organismos viables. Además, nuestros resultados con la PMB indican que no parece necesario que un péptido sea bacteriostático para tener PAEP. En efecto, la práctica totalidad de las células tratadas con PMB a dos veces su CMI presentan un color rojo intenso, indicativo de la pérdida de viabilidad bacteriana. Esta observación es coherente con el hecho de que la PMB sea bactericida a su CMI y concuerda con los bajos valores de PAE obtenidos para este agente (0,1 h). No obstante, la reducción de la viabilidad de la población bacteriana sometida a este tratamiento no fue del 100 %, como demostraron los recuentos de viables realizados en muestras control procesadas en paralelo (resultados no mostrados). Por tanto, dado que la PMB provocó PAEPs muy significativos, parece claro que en las muestras tratadas con este agente deben existir células que, con una envoltura celular dañada, conserven su viabilidad. La existencia de esta población celular, que debido probablemente a la baja sensibilidad de la técnica de fluorescencia no se detecta como de color amarillo, explicaría la capacidad de la PMB para causar PAEPs.

Los cambios estructurales y ultraestructurales que se producen en las bacterias sensibles a péptidos antimicrobianos tras su exposición a estos agentes han sido visualizados y caracterizados mediante microscopía, tanto electrónica (Craig and Gudmundsson, 1996; Epanand et al., 2005; Martínez de Tejada et al., 1995), como de fuerza atómica (AFM) (Turnidge et al., 1994). Mediante el uso de AFM, hemos podido obtener evidencia experimental directa de los cambios que ocurren en la envoltura de *P. aeruginosa* 4158 Ps4 tras una exposición a P4-9 o a PMB. Nuestros resultados confirman que la PMB provoca alteraciones muy severas en la envoltura de *P.*

aeruginosa. Estas alteraciones se manifiestan como una heterogeneidad en la superficie bacteriana, en la que se observan profundas depresiones y evaginaciones de entre 10 y 15 nm de diferencia de nivel. Otros autores ya describieron alteraciones similares mediante AFM, tanto en membranas de lípidos artificiales tratadas con protegina 1 (Capone et al., 2010) como con péptidos sintéticos derivados de la lactoferrina bovina frente a *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* (Liu et al., 2011). Asimismo, hemos demostrado que la exposición de *P. aeruginosa* a P4-9 produce alteraciones similares a las observadas en células tratadas con PMB, aunque de menor magnitud (diferencias de nivel de 5-10 nm entre “picos” y “valles”). Estas diferencias probablemente reflejen la intensidad del daño producido por cada uno de los agentes.

Por otro lado, mediante AFM hemos podido caracterizar la superficie de células de *P. aeruginosa* que, tras el tratamiento y posterior eliminación de P4-9, habían sido cultivadas en medio libre de péptido. Nuestros resultados demuestran que las bacterias que se cultivaron durante 1 h en ausencia de péptido poseen una envoltura mucho menos rugosa que la de las células observadas a tiempo 0. Concretamente, en las primeras, el AFM reveló la ausencia del perfil en sierra observado en las bacterias recién tratadas con P4-9, y en su lugar, sólo se apreció una leve ondulación de 1-2 nm de diferencia de nivel. Este hecho indica con toda probabilidad que durante la primera hora de crecimiento las bacterias dañadas por el péptido, pero que han permanecido viables durante el tratamiento, llevan a cabo un proceso de reparación de las lesiones de su envoltura. En apoyo de esta hipótesis, la técnica AFM fue incapaz de poner de manifiesto diferencias entre la envoltura de las bacterias cultivadas dos horas en ausencia de P4-9 y la de sus iguales no tratadas con el péptido. Esto indica que el proceso de reparación ha seguido progresando entre la primera y la segunda hora de crecimiento. No obstante, los ensayos S-PAEP demuestran que la envoltura de las bacterias es aún permeable a los antibióticos tras dos horas de la retirada del péptido y que debe pasar 1 h más para que esta estructura recupere completamente su integridad.

Cabría la posibilidad de que aquellas células con apariencia normal tras dos horas de crecimiento sin péptido pudieran provenir de bacterias que no hubieran estado en contacto con P4-9, bien porque hubieran quedado protegidas (por agregación, por ejemplo) o por una disponibilidad insuficiente del péptido en el ensayo. Esto es teóricamente posible, pero muy improbable, dada la buena homogeneidad observada

mediante AFM en la población tratada con P4-9 en cada uno de los intervalos de tiempo muestreados. Además, la intensa reducción de la viabilidad observada en los recuentos demuestra la efectividad del tratamiento con P4-9 y hace difícil creer que hayan quedado células sin interactuar con el péptido. Finalmente, dado que el tiempo de generación de *P. aeruginosa* en el medio de cultivo empleado es 27,1 minutos, no es fácilmente concebible cómo una población minoritaria de células no dañadas podría proliferar tan rápido y llegar a constituir la mayoría de la población bacteriana en el intervalo de tiempo en estudio. No obstante, en futuros experimentos de AFM sería interesante realizar un muestreo más amplio para poder demostrar la representatividad de cada una de las fases, así como realizar una cuantificación de las células alteradas (AFM) respecto al número total de células (microscopía de fluorescencia) en cada una de las fases del estudio.

Por otro lado, se ha descrito que las lesiones generadas por la PMB en algunos gramnegativos como *E. coli* pueden convertir a la bacteria en sensible a proteínas con actividad hidrolítica sobre el peptidoglicano, como la lisozima (Martínez de Tejada et al., 1995). El hecho de que P4-9 no induzca una sensibilización similar sobre *P. aeruginosa* (ausencia de actividad lítica y de S-PAEP de la lisozima; resultados no mostrados), sugiere que la alteración producida por el péptido no es de suficiente magnitud para exponer el peptidoglicano a la lisozima. Dado que, como nuestros resultados demuestran, *P. aeruginosa* es más resistente a P4-9 (CMB de 128 µg/mL) que *E. coli* (CMB de 16 µg/mL; Capítulo 1 de Resultados), es probable que la envoltura del primer microorganismo sea también más resistente que la del segundo a P4-9. No obstante, para confirmar esta hipótesis sería interesante caracterizar la alteración producida por P4-9 en *P. aeruginosa* mediante experimentos de microscopía electrónica (TEM, SEM) empleando *E. coli* como control.

Por otra parte, como se explicó en la Introducción, algunos autores postulan que el PAE es consecuencia del tiempo que dura la interacción entre el antibiótico (el péptido en nuestro caso) y su diana molecular. Aunque en nuestros experimentos realizamos tres lavados sucesivos para eliminar el péptido, no se puede descartar que éste hubiera podido permanecer asociado a las células y, más concretamente, ligado a la envoltura. De hecho, la formación y persistencia de poros en la envoltura celular parecen ser dependientes de la presencia del agente permeabilizante (Dawson and Liu,

2008). Por otro lado, algunos trabajos indican que el PAE producido por algunos antimicrobianos está asociado a su persistencia limitada en el sitio de acción, como parece suceder con los antibióticos que se unen a la subunidad menor del ribosoma (eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina) (Craig and Gudmundsson, 1996). Para investigar esta hipótesis y entender mejor el mecanismo del PAE de P4-9, sería necesario realizar ensayos con el péptido marcado con un fluorocromo (cloruro de dansilo o FITC, por ejemplo). Alternativamente, se podría recurrir a técnicas de microscopía confocal empleando anticuerpos anti-P4-9 marcados con un fluorocromo o bien a ensayos de *western blot* con células bacterianas enteras tratadas con el péptido, de manera que se pudiera observar la presencia, dinámica y ubicación del péptido durante la fase PAE.

Nuestros resultados indican que el PAEP causado por el péptido P4-9 puede ser aprovechado por antibióticos a concentración subinhibitoria para neutralizar, en parte, los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*. Este hecho se demostró en primer lugar con la cepa LC1-6, que sobreexpresa la bomba MexAB-OprM, un sistema capaz de expulsar antibióticos como la novobiocina al exterior de la célula. De hecho, la CMI de la novobiocina sobre LC1-6 es al menos ocho veces superior a la de la cepa parental, PAO1, que no sobreexpresa dicho sistema (Sánchez-Gómez, 2008). Dado que P4-9 causó S-PAEP_{nov} sobre LC1-6 comparables a los de PAO1, se puede deducir que el tratamiento con el péptido desbarata eficazmente la acción del sistema de expulsión MexAB-OprM. Esta observación sugiere que, ni siquiera una sobreexpresión de la bomba es capaz de expulsar la novobiocina, que probablemente se acumule de forma masiva en el periplasma bacteriano tras la acción del péptido. Esto no es de extrañar, dado que se ha descrito que las bombas de expulsión dependen para su funcionamiento de la integridad de la envoltura celular (Nikaido, 2003). Un fenómeno similar a éste fue descrito por Sánchez-Gómez y colaboradores empleando también la cepa LC1-6 en sinergia con novobiocina, aunque en ese trabajo el antibiótico se añadió en presencia de péptido (Sánchez-Gómez, 2008).

Finalmente, nuestros resultados demuestran que además de la novobiocina, hay otros antibióticos que pueden sensibilizar a *P. aeruginosa* durante el tiempo que dura el PAEP provocado por P4-9. Los antibióticos seleccionados para estos ensayos (eritromicina, fosfomicina y ceftazidima) difieren notablemente en su hidrofobicidad,

mecanismo de acción, vía de entrada en la célula y tamaño. Aunque la hidrofobicidad de la novobiocina y de la eritromicina son similares (logPartición octanol-agua (logP) de 2,45 y 3,06, respectivamente), el primer agente fue capaz de causar S-PAEPs más potentes que el segundo. Este hecho quizá se deba a que la novobiocina, dado su menor tamaño (MW: 612 Da), penetre mejor que la eritromicina (MW: 1092 Da) en la célula. Otra posibilidad es que la célula sufra un mayor daño por la acción de la novobiocina, cuyo blanco es una proteína implicada en la replicación del ADN (ADN-girasa), que por la eritromicina, un agente que interfiere con la función ribosomal.

Se ha descrito que los antibióticos más hidrofílicos no suelen verse afectados por cambios estructurales en la membrana externa, ya que su vía de entrada en la célula son las porinas y ciertos transportadores específicos, que soportan mejor dichos cambios (Denyer and Maillard, 2002). De hecho, en el presente estudio y en otros previos (Sánchez-Gómez et al., 2011), nuestro grupo demostró que los péptidos derivados de la lactoferricina potencian mejor a la novobiocina y a otros agentes hidrofóbicos que a antibióticos hidrofílicos. Los resultados de este trabajo revelan que el PAEP causado por P4-9 puede ser aprovechado eficazmente también por antibióticos hidrofílicos, como la fosfomicina y los β -lactámicos. Así, la polaridad de la fosfomicina (logP de -1,4) no impidió a este antibiótico causar S-PAEPs incluso superiores a los de la eritromicina sobre células de Ps4. Es de destacar que la entrada de fosfomicina al interior de la célula se produce a través de un transportador transmembrana dependiente de glucosa-6-fosfato. Nuestros resultados sugieren que el pequeño tamaño de la fosfomicina (MW: 138,1 Da) podría facilitar el acceso de este agente al interior de la célula por vías adicionales producidas por la acción del péptido y distintas de su vía normal de entrada. Para investigar esta hipótesis habría que repetir los experimentos de PAEP con fosfomicina empleando mutantes carentes de dicho transportador o bien en presencia de agentes que bloqueen la acción de este sistema de transporte.

Sin duda, uno de los resultados más inesperados de entre los obtenidos en este trabajo fue la detección de la potente capacidad de la ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación, para aprovechar el PAEP provocado por P4-9 en Ps4. Este resultado es especialmente relevante, pues la ceftazidima es un antibiótico de amplio uso clínico frente a *P. aeruginosa*. De entre los antibióticos usados, la ceftazidima fue el que causó los S-PAEPs más largos. De hecho, cuando se emplearon células de Ps4 que se habían

tratado con el péptido recientemente (menos de 2 h antes de la adición del antibiótico), no fue posible determinar el valor del S-PAEP, pues éste superó la duración total del ensayo. Sin embargo, este fenómeno no sucedió cuando se empleó cefalotina, una cefalosporina de primera generación frente a la que *P. aeruginosa* presenta –como otros muchos gramnegativos– resistencia intrínseca. Esta observación sugiere que la sensibilización a cefalosporinas es un fenómeno restringido a aquellas cefalosporinas que presentan cierta actividad anti-pseudomónica.

La potente actividad de la ceftazidima frente a Ps4 fue inesperada, pues se asume que este antibiótico, como la mayoría de β -lactámicos, penetra en la célula a través de las porinas (Denyer and Maillard, 2002), y se esperaba que esta vía se alterase poco tras la acción de P4-9. Además, como hemos demostrado en este trabajo, Ps4 expresa una β -lactamasa AmpC desreprimida, es decir, una enzima que se expresa de manera constitutiva y que tiene gran capacidad para hidrolizar cefalosporinas. Para confirmar las observaciones hechas con Ps4, se empleó una cepa de constitución genética conocida, el triple mutante PA Δ AD Δ Dh2 Δ Dh3 que sobreexpresa AmpC de manera establemente desreprimida. Aunque la ceftazidima también inhibió muy significativamente al triple mutante, éste se mostró más resistente al antibiótico que Ps4, lo que probablemente guarde relación con los niveles relativos de expresión de AmpC en ambas cepas.

Aunque no tenemos una explicación definitiva, se pueden formular varias hipótesis sobre la causa de la potente sensibilización de Ps4 a la ceftazidima. Por un lado, la concentración de ceftazidima empleada en los ensayos de sensibilización fue una de las más altas en relación a su CMI. En general, en estos ensayos se empleó para todos los antibióticos la concentración más alta de entre las que no provocaban retraso sobre un cultivo control sin tratar con el péptido, con objeto de poder facilitar la observación de S-PAEP. Sin embargo, esto complica la comparación entre los S-PAEP, dado que la dilución empleada puede variar para cada antibiótico. De hecho, los ensayos con ceftazidima se realizaron usando 16 μ g/mL, es decir, sólo 1/4 de la CMI de este compuesto sobre la cepa Ps4. Con el resto de antibióticos se emplearon concentraciones 8 veces inferiores a la CMI del antibiótico, salvo para la cefalotina, de la que se usó 1/2 de su CMI. Es de destacar que la cefalotina, a diferencia de la ceftazidima, mostró una

actividad antimicrobiana muy modesta sobre la cepa Ps4 ($CMI_{\text{cefalotina}} = 1024 \mu\text{g/mL}$ vs. $CMI_{\text{ceftazidima}} = 64 \mu\text{g/mL}$).

Sin embargo, la mencionada explicación no parece ser suficiente para aclarar la magnitud del fenómeno observado, pues cuando se repitieron los ensayos con ceftazidima empleando 1/16 de su CMI, este compuesto siguió siendo comparativamente el que causó S-PAEPs más potentes (Tabla 3.1). Por ello, pensamos que debe haber otros mecanismos que refuercen la acción inhibitoria de ceftazidima frente a *P. aeruginosa*, sobre todo teniendo en cuenta la producción de cefalosporinasa en las cepas empleadas. Dado que la ceftazidima no es muy hidrofílica ($\log P$ de -1,6), quizá pueda penetrar en la célula por alguna vía independiente de porinas, como hemos postulado previamente para la fosfomicina. Este mecanismo podría ser responsable del rápido efecto letal de la ceftazidima observado en Ps4, a pesar de la expresión constitutiva de AmpC, pues sería previsible una saturación de la enzima. En apoyo de esta hipótesis, mientras que en otras bacterias como *Klebsiella pneumoniae* se ha descrito que la ceftazidima penetra en la célula a través de la porina OmpK35 (Domenech-Sanchez et al., 2003), aún no se ha identificado un mecanismo de entrada equivalente en *P. aeruginosa*. No obstante, habría que demostrar la existencia de este hipotético mecanismo, para lo cual se podría estudiar si la CMI a este antibiótico es mayor en alguno de los mutantes deficientes en porinas disponibles. Asimismo, para estudiar si el fenómeno observado es específico de la ceftazidima, es necesario investigar si otras cefalosporinas de tercera generación, como por ejemplo la cefotaxima, cefoperazona o ceftriaxona, generan S-PAEPs tan potentes como la ceftazidima en *P. aeruginosa*.

Finalmente, nuestros resultados indican que se deben interpretar con precaución los valores de S-PAEP de un antibiótico obtenidos en una cepa muy sensible a ese compuesto. Un claro ejemplo es el débil S-PAEP de la ceftazidima que se detectó en la cepa de referencia PAO1. Este resultado se debe probablemente a la baja concentración de ceftazidima que hubo que emplear ($0,5 \mu\text{g/mL}$) para asegurar que el antibiótico no tuviera una acción inhibitoria por sí mismo. Una observación similar se realizó con la gentamicina. En cambio, los resultados obtenidos con ceftazidima en *P. aeruginosa* 4158 Ps4 y el mutante PA Δ ADDh2Dh3 son probablemente concluyentes, dado que ambas cepas tienen la misma CMI a ceftazidima.

Consideraciones metodológicas sobre PAEP

La identificación de PAEP, un fenómeno no descrito anteriormente, nos obligó a diseñar protocolos y parámetros específicos para su cuantificación. Concretamente, se pusieron a punto dos métodos, uno basado en el recuento de viables y otro en el sistema Bioscreen C descrito anteriormente para el cálculo del PAE (Lowdin et al., 1993). En ambos métodos, se consideró el momento de la adición del antibiótico como punto de inicio del efecto, pero el S-PAEP se calculó de forma distinta según la técnica empleada. Así en el ensayo de recuento de viables, el S-PAEP se definió como el tiempo que necesitó el cultivo para recuperar el número de viables que tenía en el momento de la exposición al antibiótico. En cambio, en la técnica basada en Bioscreen C, el S-PAEP se definió como el retraso del cultivo tratado con el antibiótico en relación con el no tratado para alcanzar un determinado valor de absorbancia (A_{50} ; Material y Métodos).

A diferencia del PAE, la cuantificación del S-PAEP mediante recuento de viables y turbidimetría no proporcionó un valor similar (Figura 6-C en sección Material y Métodos), probablemente debido a que el método turbidimétrico pasa por alto el tiempo en el que desciende la viabilidad del cultivo tras la adición del antibiótico. No parece apropiado descontar ese intervalo en el cálculo del S-PAEP mediante recuento de viables, pues su duración varía dependiendo del tiempo transcurrido entre la eliminación del péptido y la adición del antibiótico, es decir, del tiempo que el cultivo ha estado creciendo en ausencia del péptido. Este mismo hecho indica que el cálculo mediante recuento de viables ofrece una información más completa del fenómeno PAEP. Además, esta información es más gráfica e intuitiva que en el caso de la técnica turbidimétrica, pues en los ensayos de recuento de viables, el tamaño de la concavidad (Figura 6-A en sección Material y Métodos) informa de la magnitud del daño celular.

Una posible manera de corregir el S-PAEP obtenido mediante la técnica de recuento de viables en relación con un cultivo control no tratado con el antibiótico sería definir este parámetro como la diferencia entre el tiempo requerido por el cultivo tratado con antibiótico para aumentar 1 log (10 veces) la población justamente después de la adición del antibiótico y el tiempo requerido por el cultivo no tratado con el antibiótico para aumentar la población en la misma magnitud. Esta posibilidad obligaría a hacer

lecturas 10-12 horas después de la adición del antibiótico debido al intervalo de letalidad observado, lo que implicaría experimentos de 16-20 horas de duración. Por este motivo, esta posibilidad se descartó para el cálculo del S-PAEP.

Sin embargo, como se comentó para el cálculo del PAE, la técnica turbidimétrica adaptada a la determinación del PAEP, tiene la ventaja de ser menos laboriosa y de permitir el análisis de un elevado número de muestras. Esto hace que este método sea muy útil para el cribado de compuestos en condiciones experimentales distintas. Nuestros resultados indican que este cribado debería ir seguido de un estudio PAEP mediante recuento de viables para caracterizar en más detalle la acción de los compuestos seleccionados.

Conclusión y perspectivas futuras

El presente estudio es el primero que demuestra que la actividad bactericida de los antibióticos puede ser potenciada por péptidos antimicrobianos, tanto si éstos están presentes a concentraciones subinhibitorias, como si –habiendo actuado a concentraciones por encima de su CMI- los péptidos no están ya presentes. Este doble mecanismo de acción de los péptidos podría tener aplicación terapéutica, pues las dos actividades mencionadas son teóricamente compatibles *in vivo*. De hecho, la concentración de cualquier fármaco en un organismo varía en el tiempo y suele ser distinta en cada compartimento interno. Por ello, durante el tratamiento con una terapia combinada péptido-antibiótico es de esperar que, mientras en algunas zonas sólo se alcancen concentraciones subinhibitorias del péptido, en otras el péptido actúe por encima de su CMI. Nuestros resultados sugieren que, en ambas situaciones y siempre que haya antibiótico disponible, podría existir sinergia péptido-antibiótico. De hecho, es probable que la combinación de estas dos actividades pueda explicar la eficacia de la potenciación de antibióticos demostrada en modelos animales de sepsis (Ofek et al., 1994; Sánchez-Gómez et al., 2011).

En el contexto actual de expansión de la resistencia antibiótica y de la grave limitación de opciones terapéuticas frente a algunos patógenos multiresistentes, los fenómenos de sensibilización antibiótica identificados en el presente trabajo pueden tener importantes implicaciones clínicas. Es de destacar que, como este trabajo reveló, P4-9 añadido a concentraciones subinhibitorias no actuó en sinergia con la novobiocina

(CIF > 0,5; capítulo 1 de Resultados). No obstante, las células tratadas con este péptido por encima de su CMI se convirtieron temporalmente en sensibles, no sólo a novobiocina, sino a una amplia variedad de antibióticos de uso clínico y pertenecientes a distintas clases, como cefalotina, fosfomicina, eritromicina, rifampicina, ceftazidima, ciprofloxacino, etc... Si estas observaciones *in vitro* se tradujeran en tratamientos eficaces, muchas opciones terapéuticas hoy en desuso por la alta prevalencia de resistencias podrían volver a emplearse.

No obstante, para confirmar estas prometedoras observaciones sería necesario demostrar la presencia *in vivo* de un fenómeno de “sinergia secuencial” como el identificado *in vitro* en este trabajo. Para ello, se podría usar un modelo animal de bacteriemia y administrar a los animales primero el péptido y, una vez que la presencia del péptido fuera indetectable en el animal, tratar con el antibiótico. Otros grupos experimentales podrían recibir el antibiótico con un mayor espaciamiento en relación con la administración del péptido.

En relación con el PAE producido por P4-9, sería interesante realizar experimentos de PALE para determinar la sensibilidad de *P. aeruginosa* en fase post-antibiótica a los leucocitos humanos. Además, se podrían realizar estudios de PAE con P4-9 *in vivo* empleando alguno de los modelos murinos más utilizados, como el de infección en muslo o neumonía, (Craig and Gudmundsson, 1996). En cuanto al PAEP, se podría investigar si P4-9 puede aprovechar el PAEP causado por sí mismo para sensibilizar a *P. aeruginosa* a la acción de una menor concentración de péptido, es decir investigar la existencia de S_{P4-9} -PAEP tras el tratamiento con P4-9. Además, se podría estudiar si un péptido puede sensibilizar la bacteria a un péptido distinto, por ejemplo investigando si existe S_{P4-9} -PAEP tras el tratamiento con PMB o S_{PMB} -PAEP tras el tratamiento con P4-9. Por último, tras los prometedores resultados obtenidos en los ensayos PAEP con ceftazidima y P4-9 *in vitro*, se planea realizar un estudio de eficacia *in vivo* de esta combinación frente a *P. aeruginosa* Ps4 en el modelo animal de bacteriemia descrito en este trabajo.

Nuestros resultados sugieren que la capacidad de provocar PAEP no se restringe a los péptidos en los que este efecto se ha descrito aquí (P4-9 y PMB), sino que muy probablemente sea compartida por otros muchos agentes antimicrobianos con actividad

perturbadora de la envoltura bacteriana. Todas estas observaciones podrían simplificar el desarrollo de nuevos agentes con actividad PAEP mejorada y facilitar la aplicación clínica de este fenómeno.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La aplicación de un análisis de estructura actividad (QSAR) basado en descriptores *Peptide Descriptors from Sequence* (PEDES) y en la metodología *Partial Least Squares* (PLS) proporcionó en dos veces sucesivas péptidos derivados de la lactoferricina con actividad permeabilizante mejorada sobre la envoltura celular de una cepa clínica multiresistente de *Pseudomonas aeruginosa*. No obstante, este método no fue capaz de predecir con precisión los valores de actividad permeabilizante de los péptidos.
2. Los mejores péptidos desarrollados en este trabajo:
 - a. carecen de actividad citotóxica y hemolítica.
 - b. actúan *in vitro* en sinergia con antibióticos no sólo hidrofóbicos, como la novobiocina y la azitromicina, sino también más hidrofílicos, como la doxiciclina y el β -lactámico cefotaxima.
 - c. forman combinaciones rápidamente letales en combinación con la novobiocina y mantienen la actividad sinérgica con este antibiótico incluso durante 24 h.
 - d. superan en algunos parámetros la capacidad permeabilizante del compuesto de referencia, el nonapéptido de polimixina B.
 - e. presentan, en general, un mecanismo de acción bacteriostático con CMI's mejores que la polimixina B sobre bacterias grampositivas, pero peores que este compuesto frente a microorganismos gramnegativos.
 - f. se unen al lipopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa* con una afinidad inferior a la de la polimixina B, pero inhiben la producción de TNF α inducido por lipopolisacárido en células mononucleares humanas con una eficacia similar a la de este compuesto de referencia.
3. En general, los mejores antimicrobianos coinciden con los péptidos de mayor capacidad antiendotóxica y esta propiedad la presentan los compuestos de mayor tamaño, carga positiva neta y número de residuos hidrofóbicos. Por el contrario, una buena capacidad permeabilizante se asocia con péptidos más cortos, con menos residuos de triptófano, un momento hidrofóbico moderado y un ángulo de dominio hidrofóbico no mayor de 200 °.

4. La actividad antimicrobiana se correlaciona negativamente con la capacidad potenciadora de novobiocina, lo que sugiere que ambas actividades tienen bases estructurales distintas.
5. El método del tablero (*checkerboard*) es una técnica fiable y puede emplearse como técnica de cribado para el cálculo de la actividad sinérgica entre péptidos antimicrobianos y antibióticos. No obstante, conviene complementar este método con el de las curvas de letalidad (*killing curves*), que proporciona información más precisa y completa.
6. Aunque el tratamiento combinado P4-1-azitromicina redujo en 10 veces la concentración de bacterias en sangre en un modelo murino de infección por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente, el nivel de potenciación del péptido *in vivo* no fue suficiente para proteger significativamente a los animales, si bien estos mostraron una clara tendencia hacia una mayor supervivencia que los animales no tratados ($p < 0,086$).
7. Empleando una cepa clínica multiresistente de *Pseudomonas aeruginosa*, se ha identificado un péptido (P4-9) capaz de producir un efecto postantibiótico de una magnitud similar a la descrita para los antibióticos convencionales con efecto postantibiótico más potente.
8. Un cultivo bacteriano tratado con P4-9 a dos veces su CMI y cultivado posteriormente en ausencia del péptido, es sensible a concentraciones subinhibitorias de varias clases de antibióticos de uso clínico al menos durante dos horas. Este fenómeno, que no se había descrito hasta este trabajo, se ha denominado “Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico” (o en inglés, *Post-Antibiotic Effect associated Permeabilization* (PAEP)) y parece ser exclusivo de agentes cuyo mecanismo de acción implica una desorganización de la envoltura celular bacteriana.
9. Durante el periodo de Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico, los antibióticos causan sobre los cultivos retrasos temporales de duración variable, que hemos definido como “Sensibilización durante el periodo de Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico” (*Sensitization during Post Antibiotic Effect associated Permeabilization* (S-PAEP)).
10. Con toda probabilidad, la Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico es producto de una alteración en la envoltura bacteriana causada por péptidos antimicrobianos que producen Efecto Postantibiótico y su persistencia en el tiempo coincide con el tiempo necesario para que la bacteria repare ese daño estructural.

11. El método turbidimétrico basado en el sistema Bioscreen C y empleado en este trabajo ha demostrado su utilidad y eficacia para el cálculo del Efecto Postantibiótico y de la Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico de péptidos antimicrobianos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. 2007.

Abe,K., Nozaki,A., Tamura,K., Ikeda,M., Naka,K., Dansako,H., Hoshino,H.O., Tanaka,K., and Kato,N. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-hepatitis C virus peptide enhance antiviral activity in cultured human hepatocytes. *Microbiol. Immunol.* 2007;51(1):117-125.

Adao,R., Nazmi,K., Bolscher,J.G., and Bastos,M. C- and N-truncated antimicrobial peptides from LFampin. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2011;3(1):60-69.

Altman,H., Steinberg,D., Porat,Y., Mor,A., Fridman,D., Friedman,M., and Bachrach,G. In vitro assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;58(1):198-201.

Altoparlak,U., Erol,S., Akcay,M.N., Celebi,F., and Kadanali,A. The time-related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. *Burns* 2004;30(7):660-664.

Amsterdam,D. Susceptibility Testing of Antimicrobials in Liquid Media. 2011;(2):pp. 52-111.

Andes,D. and Craig,W.A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of outpatient intravenous antimicrobial therapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1998;12(4):849-60, vi.

Andra,J., Goldmann,T., Ernst,C.M., Peschel,A., and Gutschmann,T. Multiple peptide resistance factor (MprF)-mediated Resistance of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial peptides coincides with a modulated peptide interaction with artificial membranes comprising lysyl-phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem* 2011;286(21):18692-18700.

Andra,J., Howe,J., Garidel,P., Rossle,M., Richter,W., Leiva-Leon,J., Moriyón,I., Bartels,R., Gutschmann,T., and Brandenburg,K. Mechanism of interaction of optimized *Limulus*-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *Biochem. J.* 2007;406(2):297-307.

Andra,J., Jakovkin,I., Grotzinger,J., Hecht,O., Krasnosdembskaya,A.D., Goldmann,T., Gutschmann,T., and Leippe,M. Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin. *Biochem. J.* 2008;410(1):113-122.

Andra,J., Lamata,M., Martínez-de Tejada,G., Bartels,R., Koch,M.H., and Brandenburg,K. Cyclic antimicrobial peptides based on *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor for neutralization of lipopolysaccharide. *Biochem. Pharmacol.* 2004;68(7):1297-1307.

Andra,J., Lohner,K., Blondelle,S.E., Jerala,R., Moriyón,I., Koch,M.H., Garidel,P., and Brandenburg,K. Enhancement of endotoxin neutralization by coupling of a C12-alkyl chain to a lactoferricin-derived peptide. *Biochem. J.* 2005;385(Pt 1):135-143.

- Angus,D.C. Drotrecogin alfa (activated) ... a sad final fizzle to a roller-coaster party. *Crit Care* 2012;16(1):107.
- Annane,D., Bellissant,E., and Cavaillon,J.M. Septic shock. *Lancet* 2005;365(9453):63-78.
- Barmada,S., Kohlhepp,S., Leggett,J., Dworkin,R., and Gilbert,D. Correlation of tobramycin-induced inhibition of protein synthesis with postantibiotic effect in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37(12):2678-2683.
- Baumann,U., King,M., App,E.M., Tai,S., Konig,A., Fischer,J.J., Zimmermann,T., Sextro,W., and von der,H.H. Long term azithromycin therapy in cystic fibrosis patients: a study on drug levels and sputum properties. *Can. Respir. J.* 2004;11(2):151-155.
- Beljaars,L., van der Strate,B.W., Bakker,H.I., Reker-Smit,C., van Loenen-Weemaes,A.M., Wiegman,F.C., Harmsen,M.C., Molema,G., and Meijer,D.K. Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 2004;63(3):197-208.
- Bellamy,W., Takase,M., Yamauchi,K., Wakabayashi,H., Kawase,K., and Tomita,M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1992;1121(1-2):130-136.
- Bellm,L., Lehrer,R.I., and Ganz,T. Protegrins: new antibiotics of mammalian origin. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2000;9(8):1731-1742.
- Ben Haj,K.A., Moissenet,D., Vu,T.H., and Khedher,M. [Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 2011;69(4):393-403.
- Bengoechea,J.A. and Skurnik,M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol. Microbiol.* 2000;37(1):67-80.
- Bergan, T. Pharmacokinetics of newer macrolides. 1995.
- Bernard,G.R., Vincent,J.L., Laterre,P.F., LaRosa,S.P., Dhainaut,J.F., Lopez-Rodriguez,A., Steingrub,J.S., Garber,G.E., Helterbrand,J.D., Ely,E.W., and Fisher,C.J., Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2001;344(10):699-709.
- Bhat,R., Marx,A., Galanos,C., and Conrad,R.S. Structural studies of lipid A from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: occurrence of 4-amino-4-deoxyarabinose. *J. Bacteriol.* 1990;172(12):6631-6636.
- Bouza,E., Garcia-Garrote,F., Cercenado,E., Marín,M., Díaz,M.S., Sanchez,R., I, and Vindel,A. [*Pseudomonas aeruginosa*: a multicenter study in 136 hospitals in Spain]. *Rev. Esp. Quimioter.* 2003;16(1):41-52.
- Bowdish,D.M., Davidson,D.J., Lau,Y.E., Lee,K., Scott,M.G., and Hancock,R.E. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2005;77(4):451-459.

- Brandenburg,K., Howe,J., Sánchez-Gómez,S., Garidel,P., Rossle,M., Andra,J., Jerala,R., Zweytek,D., Lohner,K., Rappolt,M., Blondelle,S.E., Moriyón,I., and Martínez-de Tejada,G. Effective Antimicrobial and Anti-Endotoxin Activity of Cationic Peptides Based on Lactoferricin: A Biophysical and Microbiological Study. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 2010;9:9-22.
- Brogden,K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 2005;3(3):238-250.
- Brouwer,C.P., Wulferink,M., and Welling,M.M. The pharmacology of radiolabeled cationic antimicrobial peptides. *J. Pharm. Sci.* 2008;97(5):1633-1651.
- Campos,M.A., Vargas,M.A., Regueiro,V., Llompart,C.M., Alberti,S., and Bengoechea,J.A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 2004;72(12):7107-7114.
- Capone,R., Mustata,M., Jang,H., Arce,F.T., Nussinov,R., and Lal,R. Antimicrobial protegrin-1 forms ion channels: molecular dynamic simulation, atomic force microscopy, and electrical conductance studies. *Biophys. J.* 2010;98(11):2644-2652.
- Caroff,M., Aussel,L., Zarrouk,H., Martin,A., Richards,J.C., Therisod,H., Perry,M.B., and Karibian,D. Structural variability and originality of the *Bordetella* endotoxins. *J. Endotoxin. Res.* 2001;7(1):63-68.
- Cars,O. and Odenholt-Tornqvist,I. The post-antibiotic sub-MIC effect *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1993;31 Suppl D:159-166.
- Cazzola,M., Sanduzzi,A., and Matera,M.G. Novelties in the field of antimicrobial compounds for the treatment of lower respiratory tract infections. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2003;16(3):131-145.
- Cederlund,A., Gudmundsson,G.H., and Agerberth,B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.* 2011;278(20):3942-3951.
- Chan,C., Burrows,L.L., and Deber,C.M. Helix induction in antimicrobial peptides by alginate in biofilms. *J. Biol. Chem.* 2004;279(37):38749-38754.
- Chan,C., Burrows,L.L., and Deber,C.M. Alginate as an auxiliary bacterial membrane: binding of membrane-active peptides by polysaccharides. *J. Pept. Res.* 2005;65(3):343-351.
- Chan,D.I., Prenner,E.J., and Vogel,H.J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 2006;1758(9):1184-1202.
- Chapple,D.S., Hussain,R., Joannou,C.L., Hancock,R.E., Odell,E., Evans,R.W., and Siligardi,G. Structure and association of human lactoferrin peptides with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(6):2190-2198.
- Chen,J., Falla,T.J., Liu,H., Hurst,M.A., Fujii,C.A., Mosca,D.A., Embree,J.R., Loury,D.J., Radcliff,P.A., Cheng,C.C., Gu,L., and Fiddes,J.C. Development of protegrins

for the treatment and prevention of oral mucositis: structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Biopolymers* 2000;55(1):88-98.

Cheong,H.S., Kang,C.I., Wi,Y.M., Ko,K.S., Chung,D.R., Lee,N.Y., Song,J.H., and Peck,K.R. Inappropriate initial antimicrobial therapy as a risk factor for mortality in patients with community-onset *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008;27(12):1219-1225.

Cherkasov,A., Hilpert,K., Jenssen,H., Fjell,C.D., Waldbrook,M., Mullaly,S.C., Volkmer,R., and Hancock,R.E. Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs. *ACS Chem Biol.* 2009;4(1):65-74.

Chopra,I. Molecular mechanisms involved in the transport of antibiotics into bacteria. *Parasitology* 1988;96 Suppl:S25-S44.

Church,D., Elsayed,S., Reid,O., Winston,B., and Lindsay,R. Burn wound infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006;19(2):403-434.

Clausell,A., Garcia-Subirats,M., Pujol,M., Busquets,M.A., Rabanal,F., and Cajal,Y. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. *J. Phys. Chem B* 2007;111(3):551-563.

Clausell,A., Pujol,M., Alsina,M.A., and Cajal,Y. Influence of polymyxins on the structural dynamics of *Escherichia coli* lipid membranes. *Talanta* 2003;60(2-3):225-234.

Collins,L.V., Kristian,S.A., Weidenmaier,C., Faigle,M., Van Kessel,K.P., Van Strijp,J.A., Gotz,F., Neumeister,B., and Peschel,A. Staphylococcus aureus strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J. Infect. Dis.* 2002;186(2):214-219.

Conejo,M.C., Martínez-Martínez,L., Garcia,I., Picabea,L., and Pascual,A. Effect of siliconized latex urinary catheters on the activity of carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa* strains with defined mutations in ampC, oprD, and genes coding for efflux systems. *Int. J. Antimicrob Agents* 2003;22(2):122-127.

Cooperstock,M.S. Inactivation of endotoxin by polymyxin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1974;6(4):422-425.

Craig,C.P. and Connelly,S. Effect of intensive care unit nosocomial pneumonia on duration of stay and mortality. *Am. J. Infect. Control* 1984;12(4):233-238.

Craig,W.A. and Gudmundsson,S. Postantibiotic Effect. 1996;4(8):pp. 296-329.

Craig,W.A. Once-daily versus multiple-daily dosing of aminoglycosides. *J. Chemother.* 1995;7 Suppl 2:47-52.

Craig,W.A., Redington,J., and Ebert,S.C. Pharmacodynamics of amikacin in vitro and in mouse thigh and lung infections. *J. Antimicrob Chemother* 1991;27 Suppl C:29-40.

- Dathe,M., Nikolenko,H., Meyer,J., Beyermann,M., and Bienert,M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. FEBS Lett. 2001;501(2-3):146-150.
- Dathe,M., Schumann,M., Wieprecht,T., Winkler,A., Beyermann,M., Krause,E., Matsuzaki,K., Murase,O., and Bienert,M. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. Biochemistry 1996;35(38):12612-12622.
- Dathe,M. and Wieprecht,T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. Biochim. Biophys. Acta 1999;1462(1-2):71-87.
- David,S.A. Towards a rational development of anti-endotoxin agents: novel approaches to sequestration of bacterial endotoxins with small molecules. J. Mol. Recognit. 2001;14(6):370-387.
- Dawson,R.M. and Liu,C.Q. Properties and applications of antimicrobial peptides in biodefense against biological warfare threat agents. Crit Rev. Microbiol. 2008;34(2):89-107.
- De Gracia,J., Alvarez,A., Mata,F., Guarner,L., Vendrell,M., Gadtner,S., and Cobos,N. [Cystic fibrosis in adults: study of 111 patients]. Med. Clin. (Barc.) 2002;119(16):605-609.
- Delcour,A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochim. Biophys. Acta 2009;1794(5):808-816.
- Dempsey,C.E. The actions of melittin on membranes. Biochim. Biophys. Acta 1990;1031(2):143-161.
- Denyer,S.P. and Maillard,J.Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. J. Appl. Microbiol. 2002;92 Suppl:35S-45S.
- Devasia, G, Venkatachalam, G, Mohammadreza, N, Nikhil, J, and Pramoj, S. Antimicrobial peptides. 2012.
- Devine,D.A. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. Mol. Immunol. 2003;40(7):431-443.
- Dial,E.J., Hall,L.R., Serna,H., Romero,J.J., Fox,J.G., and Lichtenberger,L.M. Antibiotic properties of bovine lactoferrin on *Helicobacter pylori*. Dig. Dis. Sci. 1998;43(12):2750-2756.
- Díaz-Aparicio,E., Aragón,V., Marín,C., Alonso,B., Font,M., Moreno,E., Pérez-Ortiz,S., Blasco,J.M., Díaz,R., and Moriyón,I. Comparative analysis of *Brucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. J. Clin. Microbiol. 1993;31(12):3136-3141.
- Dixon,R.E. Effect of infections on hospital care. Ann. Intern. Med. 1978;89(5 Pt 2 Suppl):749-753.

Docke,W.D., Randow,F., Syrbe,U., Krausch,D., Asadullah,K., Reinke,P., Volk,H.D., and Kox,W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat. Med.* 1997;3(6):678-681.

Domenech-Sanchez,A., Martinez-Martinez,L., Hernandez-Alles,S., del Carmen,C.M., Pascual,A., Tomas,J.M., Alberti,S., and Benedi,V.J. Role of Klebsiella pneumoniae OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(10):3332-3335.

Domingues,M.M., Lopes,S.C., Santos,N.C., Quintas,A., and Castanho,M.A. Fold-unfold transitions in the selectivity and mechanism of action of the N-terminal fragment of the bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI(21)). *Biophys. J.* 2009;96(3):987-996.

Domínguez,M.C., De la Rosa,M., and Borobio,M.V. Application of a spectrophotometric method for the determination of post-antibiotic effect and comparison with viable counts in agar. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001;47(4):391-398.

Eagle,H., Fleischman,R., and Musselman,A.D. The bactericidal action of penicillin in vivo: the participation of the host, and the slow recovery of the surviving organisms. *Ann. Intern. Med.* 1950;33(3):544-571.

Easton,D.M., Nijnik,A., Mayer,M.L., and Hancock,R.E. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends Biotechnol.* 2009;27(10):582-590.

Eliassen,L.T., Berge,G., Sveinbjornsson,B., Svendsen,J.S., Vorland,L.H., and Rekdal,O. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. *Anticancer Res.* 2002;22(5):2703-2710.

Eliassen,L.T., Haug,B.E., Berge,G., and Rekdal,O. Enhanced antitumour activity of 15-residue bovine lactoferricin derivatives containing bulky aromatic amino acids and lipophilic N-terminal modifications. *J. Pept. Sci.* 2003;9(8):510-517.

Eliopoulos,G.M. and Moellering,R.C., Jr. *Antimicrobial Combinations.* 2011;(9):pp. 330-396.

Emerson,J., Rosenfeld,M., McNamara,S., Ramsey,B., and Gibson,R.L. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2002;34(2):91-100.

Epand,R.F., Schmitt,M.A., Gellman,S.H., Sen,A., Auger,M., Hughes,D.W., and Epand,R.M. Bacterial species selective toxicity of two isomeric alpha/beta-peptides: role of membrane lipids. *Mol. Membr. Biol.* 2005;22(6):457-469.

Ernst,R.K., Hajjar,A.M., Tsai,J.H., Moskowitz,S.M., Wilson,C.B., and Miller,S.I. *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. *J. Endotoxin. Res.* 2003;9(6):395-400.

Ernst,R.K., Moskowitz,S.M., Emerson,J.C., Kraig,G.M., Adams,K.N., Harvey,M.D., Ramsey,B., Speert,D.P., Burns,J.L., and Miller,S.I. Unique lipid a modifications in

- Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 2007;196(7):1088-1092.
- Falagas,M.E. and Kasiakou,S.K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin. Infect. Dis. 2005;40(9):1333-1341.
- Farra,A., Islam,S., Stralfors,A., Sorberg,M., and Wretlind,B. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. Int. J. Antimicrob. Agents 2008;31(5):427-433.
- Feazel,L.M., Baumgartner,L.K., Peterson,K.L., Frank,D.N., Harris,J.K., and Pace,N.R. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 2009;106(38):16393-16399.
- Fernández,L., Gooderham,W.J., Bains,M., McPhee,J.B., Wiegand,I., and Hancock,R.E. Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. Antimicrob. Agents Chemother. 2010;54(8):3372-3382.
- Fjell,C.D., Jenssen,H., Hilpert,K., Cheung,W.A., Pante,N., Hancock,R.E., and Cherkasov,A. Identification of novel antibacterial peptides by chemoinformatics and machine learning. J. Med. Chem 2009;52(7):2006-2015.
- Fluckinger,M., Haas,H., Merschak,P., Glasgow,B.J., and Redl,B. Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores. Antimicrob. Agents Chemother. 2004;48(9):3367-3372.
- Fluit,A.C., Verhoef,J., and Schmitz,F.J. Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1998. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2001;20(9):617-625.
- Fraser,A., Paul,M., Almanasreh,N., Tacconelli,E., Frank,U., Cauda,R., Borok,S., Cohen,M., Andreassen,S., Nielsen,A.D., and Leibovici,L. Benefit of appropriate empirical antibiotic treatment: thirty-day mortality and duration of hospital stay. Am. J. Med. 2006;119(11):970-976.
- Freceer,V., Ho,B., and Ding,J.L. De novo design of potent antimicrobial peptides. Antimicrob Agents Chemother 2004;48(9):3349-3357.
- Friguet,B., Chaffotte,A.F., Djavadi-Ohanian,L., and Goldberg,M.E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Immunol. Methods 1985;77(2):305-319.
- Fuentes,F., Izquierdo,J., Martin,M.M., Gomez-Lus,M.L., and Prieto,J. Postantibiotic and sub-MIC effects of azithromycin and isepamicin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 1998;42(2):414-418.

Fujihara,M., Muroi,M., Tanamoto,K., Suzuki,T., Azuma,H., and Ikeda,H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol. Ther.* 2003;100(2):171-194.

Fung,H.B., Chang,J.Y., and Kuczynski,S. A practical guide to the treatment of complicated skin and soft tissue infections. *Drugs* 2003;63(14):1459-1480.

Galanos,C., Luderitz,O., Rietschel,E.T., Westphal,O., Brade,H., Brade,L., Freudenberg,M., Schade,U., Imoto,M., Yoshimura,H., and . Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.* 1985;148(1):1-5.

Gales,A.C., Jones,R.N., and Sader,H.S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin. Microbiol. Infect.* 2006;12(4):315-321.

Gales,A.C., Jones,R.N., and Sader,H.S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(9):2070-2074.

Garidel,P., Rappolt,M., Schromm,A.B., Howe,J., Lohner,K., Andra,J., Koch,M.H., and Brandenburg,K. 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):122-131.

Gaynes,R. and Edwards,J.R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.* 2005;41(6):848-854.

Georgopapadakou,N.H. and Liu,F.Y. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1980;18(1):148-157.

Gerber,A.U. and Craig,W.A. Growth kinetics of respiratory pathogens after short exposures to ampicillin and erythromycin in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 1981;8 Suppl C:81-91.

Giamarellos-Bourboulis,E.J., Kentepozidis,N., Antonopoulou,A., Plachouras,D., Tsaganos,T., and Giamarellou,H. Postantibiotic effect of antimicrobial combinations on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2005;51(2):113-117.

Gifford,J.L., Hunter,H.N., and Vogel,H.J. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol. Life Sci.* 2005;62(22):2588-2598.

Gioannini,T.L., Teghanemt,A., Zhang,D., Coussens,N.P., Dockstader,W., Ramaswamy,S., and Weiss,J.P. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2004;101(12):4186-4191.

- Glew,R.H. and Pavuk,R.A. Early synergistic interactions between amikacin and six beta-lactam antibiotics against multiply resistant members of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984;26(3):378-381.
- González-Chavez,S.A., Arevalo-Gallegos,S., and Rascon-Cruz,Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009;33(4):301-308.
- Gooderham,W.J., Gellatly,S.L., Sanschagrín,F., McPhee,J.B., Bains,M., Cosseau,C., Levesque,R.C., and Hancock,R.E. The sensor kinase PhoQ mediates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2009;155(Pt 3):699-711.
- Gooderham,W.J. and Hancock,R.E. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009;33(2):279-294.
- Gordon,Y.J., Romanowski,E.G., and McDermott,A.M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.* 2005;30(7):505-515.
- Gottfredsson,M., Erlendsdóttir,H., Gudmundsson,A., and Gudmundsson,S. Different patterns of bacterial DNA synthesis during postantibiotic effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39(6):1314-1319.
- Gottfredsson,M., Erlendsdóttir,H., Kolka,R., Gudmundsson,A., and Gudmundsson,S. Ultrastructural alterations of bacteria during the postantibiotic effect. *Chemotherapy* 1993;39(3):153-162.
- Gough,M., Hancock,R.E., and Kelly,N.M. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect. Immun.* 1996;64(12):4922-4927.
- Graybill,J.R., Marshall,L.W., Charache,P., Wallace,C.K., and Melvin,V.B. Nosocomial pneumonia. A continuing major problem. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1973;108(5):1130-1140.
- Gutsmann,T., Razquin-Olazarán,I., Kowalski,I., Kaconis,Y., Howe,J., Bartels,R., Hornef,M., Schurholz,T., Rossle,M., Sánchez-Gómez,S., Moriyón,I., Martínez-de Tejada,G., and Brandenburg,K. New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(9):3817-3824.
- Guyton,A.C. and Hall,J.E. Los compartimentos del líquido corporal: líquidos extracelular e intracelular; líquido intersticial y edema. 2006;(25):pp. 291-306.
- Han,S., Yeo,J., Baek,H., Lin,S.M., Meyer,S., and Molan,P. Postantibiotic effect of purified melittin from honeybee (*Apis mellifera*) venom against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2009;11(9):796-804.
- Hancock,R.E. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli. *J. Med. Microbiol.* 1997a;46(1):1-3.
- Hancock,R.E. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* 1997b;5(1):37-42.

- Hancock,R.E. and Speert,D.P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist. Updat. 2000;3(4):247-255.
- Harris,F., Dennison,S.R., and Phoenix,D.A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. Curr. Protein Pept. Sci. 2009;10(6):585-606.
- Hasegawa,K., Motosuchi,W., Tanaka,S., and Dosako,S. Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 1994;47(2):73-85.
- Hatchette,T.F., Gupta,R., and Marrie,T.J. Pseudomonas aeruginosa community-acquired pneumonia in previously healthy adults: case report and review of the literature. Clin. Infect. Dis. 2000;31(6):1349-1356.
- Haug,B.E. and Svendsen,J.S. The role of tryptophan in the antibacterial activity of a 15-residue bovine lactoferricin peptide. J. Pept. Sci. 2001;7(4):190-196.
- Haukland, H. H. and Vorland, L. H. Negative Postantibiotic Effect of Lactoferricin B Derivatives on *Staphylococcus aureus*. Abstr Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother 2000;40:230.
- Haukland,H.H. and Vorland,L.H. Post-antibiotic effect of the antimicrobial peptide lactoferricin on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 2001;48(4):569-571.
- Hoffmann,N., Lee,B., Hentzer,M., Rasmussen,T.B., Song,Z., Johansen,H.K., Givskov,M., and Hoiby,N. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cfr(-/-) mice. Antimicrob Agents Chemother 2007;51(10):3677-3687.
- Holst,O. Chemical structure of the core region of lipopolysaccharide. 1999;pp. 115-154.
- Holst,O., Muller-Loennies,S., Lindner,B., and Brade,H. Chemical structure of the lipid A of *Escherichia coli* J-5. Eur. J. Biochem. 1993;214(3):695-701.
- Hwang,P.M., Zhou,N., Shan,X., Arrowsmith,C.H., and Vogel,H.J. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. Biochemistry 1998;37(12):4288-4298.
- Ichimiya,T., Takeoka,K., Hiramatsu,K., Hirai,K., Yamasaki,T., and Nasu,M. The influence of azithromycin on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. Chemotherapy 1996;42(3):186-191.
- Iwanaga,S., Kawabata,S., and Muta,T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. J. Biochem. 1998;123(1):1-15.
- Jacobs,M.R., Bajaksouzian,S., and Appelbaum,P.C. Telithromycin post-antibiotic and post-antibiotic sub-MIC effects for 10 Gram-positive cocci. J. Antimicrob. Chemother. 2003;52(5):809-812.
- Jacoby,G.A. AmpC beta-lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 2009, 22(1):161:82, Table.

Japelj, B. PEDES Reference Manual. 2005.

Japelj,B., Pristovsek,P., Majerle,A., and Jerala,R. Structural origin of endotoxin neutralization and antimicrobial activity of a lactoferrin-based peptide. *J. Biol. Chem* 2005;280(17):16955-16961.

Japelj,B., Zorko,M., Majerle,A., Pristovsek,P., Sanchez-Gomez,S., Martínez de Tejada,G., Moriyon,I., Blondelle,S.E., Brandenburg,K., Andra,J., Lohner,K., and Jerala,R. The acyl group as the central element of the structural organization of antimicrobial lipopeptide. *J. Am. Chem Soc.* 2007;129(5):1022-1023.

Jenssen,H., Lejon,T., Hilpert,K., Fjell,C.D., Cherkasov,A., and Hancock,R.E. Evaluating different descriptors for model design of antimicrobial peptides with enhanced activity toward *P. aeruginosa*. *Chem Biol. Drug Des* 2007;70(2):134-142.

Jin,T., Bokarewa,M., Foster,T., Mitchell,J., Higgins,J., and Tarkowski,A. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J. Immunol.* 2004;172(2):1169-1176.

Juan,C., Moyá,B., Pérez,J.L., and Oliver,A. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(5):1780-1787.

Kaconis,Y., Kowalski,I., Howe,J., Brauser,A., Richter,W., Razquin-Olazarán,I., Inigo-Pestana,M., Garidel,P., Rossle,M., Martínez-de Tejada,G., Gutschmann,T., and Brandenburg,K. Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides. *Biophys. J.* 2011;100(11):2652-2661.

Kang,C.I., Kim,S.H., Park,W.B., Lee,K.D., Kim,H.B., Kim,E.C., Oh,M.D., and Choe,K.W. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(2):760-766.

Karakoc,E., Sahinalp,S.C., and Cherkasov,A. Comparative QSAR- and fragments distribution analysis of drugs, druglikes, metabolic substances, and antimicrobial compounds. *J. Chem Inf. Model.* 2006;46(5):2167-2182.

Katritzky, A. R. V. Lobanov and M. Karelson. CODESSA Reference Manual. 1996.

Kirikae,T., Kirikae,F., Saito,S., Tominaga,K., Tamura,H., Uemura,Y., Yokochi,T., and Nakano,M. Biological characterization of endotoxins released from antibiotic-treated *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(5):1015-1021.

Kiska,D.L. and Gilligan,P.H. *Pseudomonas*. 1999;7:pp. 517-525.

Klevens,R.M., Edwards,J.R., Richards,C.L., Jr., Horan,T.C., Gaynes,R.P., Pollock,D.A., and Cardo,D.M. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep.* 2007;122(2):160-166.

- Kobayashi,O., Ota,M., Watanabe,H., and Kobayashi,H. [Actions of macrolide antibiotics on alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*]. Jpn. J. Antibiot. 1997;50 Suppl A:95-101.
- Koo,S.P., Bayer,A.S., and Yeaman,M.R. Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides. Infect. Immun. 2001;69(8):4916-4922.
- Kowalski,I., Kaconis,Y., Andra,J., Razquin-Olazarán,I., Gutschmann,T., Martínez-de Tejada,G., and Brandenburg,K. Physicochemical and biological characterization of anti-endotoxin peptides and their influence on lipid properties. Protein Pept. Lett. 2010;17(11):1328-1333.
- Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227(5259):680-685.
- Lam,C., Hildebrandt,J., Schutze,E., and Wenzel,A.F. Membrane-disorganizing property of polymyxin B nonapeptide. J. Antimicrob. Chemother. 1986;18(1):9-15.
- Landman,D., Georgescu,C., Martin,D.A., and Quale,J. Polymyxins revisited. Clin. Microbiol. Rev. 2008;21(3):449-465.
- Lazarev,V.N. and Govorun,V.M. Antimicrobial Peptides and their Use in Medicine. Applied Biochemistry and Microbiology 2010;46:803-814.
- Leid,J.G., Willson,C.J., Shirliff,M.E., Hassett,D.J., Parsek,M.R., and Jeffers,A.K. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. J. Immunol. 2005;175(11):7512-7518.
- Lepper,P.M., Held,T.K., Schneider,E.M., Bolke,E., Gerlach,H., and Trautmann,M. Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. Intensive Care Med. 2002;28(7):824-833.
- Levin,M., Quint,P.A., Goldstein,B., Barton,P., Bradley,J.S., Shemie,S.D., Yeh,T., Kim,S.S., Cafaro,D.P., Scannon,P.J., and Giroir,B.P. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomised trial. rBPI21 Meningococcal Sepsis Study Group. Lancet 2000;356(9234):961-967.
- Lewis,P.A. The Epidemiology of Cystic Fibrosis. 1996;pp. 1-13.
- Li,C., Lewis,M.R., Gilbert,A.B., Noel,M.D., Scoville,D.H., Allman,G.W., and Savage,P.B. Antimicrobial activities of amine- and guanidine-functionalized cholic acid derivatives. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(6):1347-1349.
- Li,J., Turnidge,J., Milne,R., Nation,R.L., and Coulthard,K. *In vitro* pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. Antimicrob. Agents Chemother. 2001;45(3):781-785.

- Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003;52(4):572-575.
- Licata, L., Smith, C.E., Goldschmidt, R.M., Barrett, J.F., and Frosco, M. Comparison of the postantibiotic and postantibiotic sub-MIC effects of levofloxacin and ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997;41(5):950-955.
- Lin, Q.P., Zhou, L.F., Li, N.N., Chen, Y.Q., Li, B.C., Cai, Y.F., and Zhang, S.Q. Lipopolysaccharide neutralization by the antibacterial peptide CM4. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;596(1-3):160-165.
- Liu, Y., Han, F., Xie, Y., and Wang, Y. Comparative antimicrobial activity and mechanism of action of bovine lactoferricin-derived synthetic peptides. *Biometals* 2011.
- Livnah, O., Bayer, E.A., Wilchek, M., and Sussman, J.L. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1993;90(11):5076-5080.
- Lorian, V., Ernst, J., and Amaral, L. The post-antibiotic effect defined by bacterial morphology. *J. Antimicrob Chemother* 1989;23(4):485-491.
- Lowdin, E., Odenholt-Tornqvist, I., Bengtsson, S., and Cars, O. A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37(10):2200-2205.
- Macfarlane, E.L., Kwasnicka, A., and Hancock, R.E. Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-phoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* 2000;146 (Pt 10):2543-2554.
- Macfarlane, E.L., Kwasnicka, A., Ochs, M.M., and Hancock, R.E. PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol. Microbiol.* 1999;34(2):305-316.
- MacKenzie, F.M., Gould, I.M., Chapman, D.G., and Jason, D. Comparison of methodologies used in assessing the postantibiotic effect. *J. Antimicrob Chemother* 1994;34(2):223-230.
- Mackin, W.M. Neuprex XOMA Corp. *IDrugs.* 1998;1(6):715-723.
- Mangoni, M.L. and Shai, Y. Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification. *Biochim. Biophys. Acta* 2009;1788(8):1610-1619.
- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., and Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 2003;348(16):1546-1554.
- Martínez de Tejada, G., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., and Moriyon, I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect. Immun.* 1995;63(8):3054-3061.

- Mathai,D., Jones,R.N., and Pfaller,M.A. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2001;40(3):129-136.
- McDonald,P.J., Craig,W.A., and Kunin,C.M. Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.* 1977;135(2):217-223.
- McPhee,J.B., Bains,M., Winsor,G., Lewenza,S., Kwasnicka,A., Brazas,M.D., Brinkman,F.S., and Hancock,R.E. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2006;188(11):3995-4006.
- McPhee,J.B., Lewenza,S., and Hancock,R.E. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 2003;50(1):205-217.
- Mensa,J., Gatell,J.M., García-Sánchez,J.E., Letang,E., López-Suñé,E., and Marco,F. *Guía de Terapéutica Antimicrobiana.* 2011;21:pp. 1-714.
- Merril,C.R., Switzer,R.C., and Van Keuren,M.L. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1979;76(9):4335-4339.
- Micek,S.T., Lloyd,A.E., Ritchie,D.J., Reichley,R.M., Fraser,V.J., and Kollef,M.H. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49(4):1306-1311.
- Michalopoulos,A., Falagas,M.E., Karatza,D.C., Alexandropoulou,P., Papadakis,E., Gregorakos,L., Chalevelakis,G., and Pappas,G. Epidemiologic, clinical characteristics, and risk factors for adverse outcome in multiresistant gram-negative primary bacteremia of critically ill patients. *Am. J. Infect. Control* 2011;39(5):396-400.
- Mitsuzawa,H., Nishitani,C., Hyakushima,N., Shimizu,T., Sano,H., Matsushima,N., Fukase,K., and Kuroki,Y. Recombinant soluble forms of extracellular TLR4 domain and MD-2 inhibit lipopolysaccharide binding on cell surface and dampen lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. *J. Immunol.* 2006;177(11):8133-8139.
- Mizukane,R., Hirakata,Y., Kaku,M., Ishii,Y., Furuya,N., Ishida,K., Koga,H., Kohno,S., and Yamaguchi,K. Comparative in vitro exoenzyme-suppressing activities of azithromycin and other macrolide antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(3):528-533.
- Moet,G.J., Jones,R.N., Biedenbach,D.J., Stilwell,M.G., and Fritsche,T.R. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007;57(1):7-13.

- Molhoek,E.M., den Hertog,A.L., de Vries,A.M., Nazmi,K., Veerman,E.C., Hartgers,F.C., Yazdanbakhsh,M., Bikker,F.J., and van der Kleij,D. Structure-function relationship of the human antimicrobial peptide LL-37 and LL-37 fragments in the modulation of TLR responses. *Biol. Chem* 2009;390(4):295-303.
- Mookherjee,N., Brown,K.L., Bowdish,D.M., Doria,S., Falsafi,R., Hokamp,K., Roche,F.M., Mu,R., Doho,G.H., Pisticic,J., Powers,J.P., Bryan,J., Brinkman,F.S., and Hancock,R.E. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J. Immunol.* 2006;176(4):2455-2464.
- Moore,R.A., Chan,L., and Hancock,R.E. Evidence for two distinct mechanisms of resistance to polymyxin B in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984;26(4):539-545.
- Moore,R.A. and Hancock,R.E. Involvement of outer membrane of *Pseudomonas cepacia* in aminoglycoside and polymyxin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986;30(6):923-926.
- Moriishi,K., Inoue,S., Koura,M., and Amano,F. Inhibition of listeriolysin O-induced hemolysis by bovine lactoferrin. *Biol. Pharm. Bull.* 1999;22(11):1167-1172.
- Morlon-Guyot,J., Mere,J., Bonhoure,A., and Beaumelle,B. Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication. *Infect. Immun.* 2009;77(7):3090-3099.
- Moyá,B., Dotsch,A., Juan,C., Blazquez,J., Zamorano,L., Haussler,S., and Oliver,A. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS. Pathog.* 2009;5(3):e1000353.
- Mulet,X., Macia,M.D., Mena,A., Juan,C., Perez,J.L., and Oliver,A. Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: bactericidal activity and selection of nfxB mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(4):1552-1560.
- Munford,R.S. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. *Annu. Rev. Pathol.* 2006;1:467-496.
- Munford,R.S. and Hall,C.L. Radioimmunoassay for Gram-negative bacterial lipopolysaccharide O antigens: influence of antigen solubility. *Infect. Immun.* 1979;26(1):42-48.
- Murray,P.R. *Microbiología Clínica.* 2006;5:pp. 1-974.
- Nagai,Y., Akashi,S., Nagafuku,M., Ogata,M., Iwakura,Y., Akira,S., Kitamura,T., Kosugi,A., Kimoto,M., and Miyake,K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 2002;3(7):667-672.
- Nakamura,M., Shimizu,Y., Sato,Y., Miyazaki,Y., Satoh,T., Mizuno,M., Kato,Y., Hosaka,Y., and Furusako,S. Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, M62812, suppresses endothelial cell and leukocyte activation and prevents lethal septic shock in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;569(3):237-243.

Nau,R. and 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(1):95-110.

Nguyen,L.T., Haney,E.F., and Vogel,H.J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 2011;29(9):464-472.

Nicas,T.I. and Hancock,R.E. Alteration of susceptibility to EDTA, polymyxin B and gentamicin in *Pseudomonas aeruginosa* by divalent cation regulation of outer membrane protein H1. *J. Gen. Microbiol.* 1983;129(2):509-517.

Nikaido,H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 1994;264(5157):382-388.

Nikaido,H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003;67(4):593-656.

Nikaido,H. and Vaara,M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 1985;49(1):1-32.

Nizet,V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2006;8(1):11-26.

NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am. J. Infect. Control* 2004;32(8):470-485.

O'Neill,L.A. and Bowie,A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7(5):353-364.

Obritsch,M.D., Fish,D.N., MacLaren,R., and Jung,R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy* 2005;25(10):1353-1364.

Ochoa,T.J., Brown,E.L., Guion,C.E., Chen,J.Z., McMahon,R.J., and Cleary,T.G. Effect of lactoferrin on enteroaggregative *E. coli* (EAEC). *Biochem. Cell Biol.* 2006;84(3):369-376.

Ochoa,T.J. and Cleary,T.G. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie* 2009;91(1):30-34.

Odenholt,I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2001;17(1):1-8.

Odenholt,I., Lowdin,E., and Cars,O. Postantibiotic, postantibiotic sub-MIC, and subinhibitory effects of PGE-9509924, ciprofloxacin, and levofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47(10):3352-3356.

Odenholt-Tornqvist,I., Lowdin,E., and Cars,O. Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of beta-lactam antibiotics in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991;35(9):1834-1839.

Odenholt-Tornqvist,I., Lowdin,E., and Cars,O. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloracin, and amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992;36(9):1852-1858.

Odenholt-Tornqvist,I., Lowdin,E., and Cars,O. Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of roxithromycin, clarithromycin, and azithromycin on respiratory tract pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995;39(1):221-226.

Ofek,I., Cohen,S., Rahmani,R., Kabha,K., Tamarkin,D., Herzig,Y., and Rubinstein,E. Antibacterial synergism of polymyxin B nonapeptide and hydrophobic antibiotics in experimental gram-negative infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994;38(2):374-377.

Oh,J.T., Van Dyk,T.K., Cajal,Y., Dhurjati,P.S., Sasser,M., and Jain,M.K. Osmotic stress in viable *Escherichia coli* as the basis for the antibiotic response by polymyxin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;246(3):619-623.

Okorochenkova,S.A., Zheltukhina,G.A., and Nebol'sinb,V.E. Antimicrobial Peptides: the Mode of Action and Perspectives of Practical Application. *Biomedical Chemistry* 2011;5:95-102.

Orsi,N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals* 2004;17(3):189-196.

Oudhoff,M.J., Bolscher,J.G., Nazmi,K., Kalay,H., van 't,H.W., Amerongen,A.V., and Veerman,E.C. Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. *FASEB J.* 2008;22(11):3805-3812.

Pamp,S.J., Gjermansen,M., Johansen,H.K., and Tolker-Nielsen,T. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Mol. Microbiol.* 2008;68(1):223-240.

Papo,N., Oren,Z., Pag,U., Sahl,H.G., and Shai,Y. The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *J. Biol. Chem.* 2002;277(37):33913-33921.

Parker,R.F. and Marsh,H.C. The action of penicillin on *Staphylococcus*. *J. Bacteriol.* 1946;51:181-186.

Parseghian,M.H. and Luhrs,K.A. Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity. *Biochem. Cell Biol.* 2006;84(4):589-604.

Pasupuleti,M., Roupe,M., Rydengard,V., Surewicz,K., Surewicz,W.K., Chalupka,A., Malmsten,M., Sorensen,O.E., and Schmidtchen,A. Antimicrobial activity of human prion protein is mediated by its N-terminal region. *PLoS. One.* 2009;4(10):e7358.

Pasupuleti,M., Schmidtchen,A., and Malmsten,M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit Rev. Biotechnol.* 2011.

- Peschel,A., Otto,M., Jack,R.W., Kalbacher,H., Jung,G., and Gotz,F. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem* 1999;274(13):8405-8410.
- Peschel,A. and Sahl,H.G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006;4(7):529-536.
- Pier,G.B., Coleman,F., Grout,M., Franklin,M., and Ohman,D.E. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect. Immun.* 2001;69(3):1895-1901.
- Pier,G.B., Markham,R.B., and Eardley,D. Correlation of the biologic responses of C3H/HEJ mice to endotoxin with the chemical and structural properties of the lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J. Immunol.* 1981;127(1):184-191.
- Piers,K.L., Brown,M.H., and Hancock,R.E. Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994;38(10):2311-2316.
- Piers,K.L. and Hancock,R.E. The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 1994;12(6):951-958.
- Plachouras,D., Giamarellos-Bourboulis,E.J., Kentepozidis,N., Baziaka,F., Karagianni,V., and Giamarellou,H. In vitro postantibiotic effect of colistin on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007;57(4):419-422.
- Poole,K., Heinrichs,D.E., and Neshat,S. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* 1993;10(3):529-544.
- Powers,J.P. and Hancock,R.E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 2003;24(11):1681-1691.
- Purcell, W. P. Bass G. E. Clayton J. M. *Strategy of Drug Design: A Guide to Biological Activity.* 1973.
- Quinton,P.M. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology. (Bethesda.)* 2007;22:212-225.
- Ramamoorthy,A., Thennarasu,S., Tan,A., Gottipati,K., Sreekumar,S., Heyl,D.L., An,F.Y., and Shelburne,C.E. Deletion of all cysteines in tachyplesin I abolishes hemolytic activity and retains antimicrobial activity and lipopolysaccharide selective binding. *Biochemistry* 2006;45(20):6529-6540.
- Rangel-Frausto,M.S., Pittet,D., Hwang,T., Woolson,R.F., and Wenzel,R.P. The dynamics of disease progression in sepsis: Markov modeling describing the natural history and the likely impact of effective antisepsis agents. *Clin. Infect. Dis.* 1998;27(1):185-190.

- Reed,M.D., Stern,R.C., O'Riordan,M.A., and Blumer,J.L. The pharmacokinetics of colistin in patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Pharmacol.* 2001;41(6):645-654.
- Reinhart,K. and Karzai,W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S121-S125.
- Renneberg,J. and Walder,M. A mouse model for simultaneous pharmacokinetic and efficacy studies of antibiotics at sites of infection. *J. Antimicrob Chemother* 1988;22(1):51-60.
- Riedl,S., Zweytick,D., and Lohner,K. Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chem Phys. Lipids* 2011;164(8):766-781.
- Rodríguez-Esparragón,F., Gonzalez,M.M., Gonzalez,L.Z., Sabatelli,F.J., and Tejedor Junco,M.T. Aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the Canary Islands. *Zentralbl. Bakteriolog.* 2000;289(8):817-826.
- Rosenfeld,Y., Papo,N., and Shai,Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J. Biol. Chem.* 2006;281(3):1636-1643.
- Rosenfeld,Y. and Shai,Y. Endotoxin: Historical Perspective. 1999;pp. 1-30.
- Rosenfeld,Y. and Shai,Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochim. Biophys. Acta* 2006;1758(9):1513-1522.
- Sahalan,A.Z. and Dixon,R.A. Role of the cell envelope in the antibacterial activities of polymyxin B and polymyxin B nonapeptide against *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2008;31(3):224-227.
- Saiman,L., Mehar,F., Niu,W.W., Neu,H.C., Shaw,K.J., Miller,G., and Prince,A. Antibiotic susceptibility of multiply resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis, including candidates for transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 1996;23(3):532-537.
- Samuelsen,O., Haukland,H.H., Ulvatne,H., and Vorland,L.H. Anti-complement effects of lactoferrin-derived peptides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2004;41(2):141-148.
- Sánchez-Gómez, S. Potenciación de antibióticos mediante péptidos catiónicos permeabilizantes: aplicación al desarrollo de terapias frente a la sepsis debida a *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente. 2008.
- Sánchez-Gómez,S., Japelj,B., Jerala,R., Moriyón,I., Fernández-Alonso,M., Leiva,J., Blondelle,S.E., Andra,J., Brandenburg,K., Lohner,K., and Martínez-de Tejada,G. Structural features governing the activity of lactoferricin derived peptides that act in synergy with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011.
- Sánchez-Gómez,S., Lamata,M., Leiva,J., Blondelle,S.E., Jerala,R., Andra,J., Brandenburg,K., Lohner,K., Moriyón,I., and Martínez-de Tejada,G. Comparative

analysis of selected methods for the assessment of antimicrobial and membrane-permeabilizing activity: a case study for lactoferricin derived peptides. *BMC Microbiol.* 2008;8:196.

Sande,M.A., Korzeniowski,O.M., Allegro,G.M., Brennan,R.O., Zak,O., and Scheld,W.M. Intermittent or continuous therapy of experimental meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* in rabbits: preliminary observations on the postantibiotic effect in vivo. *Rev. Infect. Dis.* 1981;3(1):98-109.

Savage,P.B. Multidrug-resistant bacteria: overcoming antibiotic permeability barriers of gram-negative bacteria. *Ann. Med.* 2001;33(3):167-171.

Savage,P.B., Li,C., Taotafa,U., Ding,B., and Guan,Q. Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002;217(1):1-7.

Sawyer,J.G., Martin,N.L., and Hancock,R.E. Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 1988;56(3):693-698.

Schroder,J.M. and Harder,J. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 2006;63(4):469-486.

Scott,M.G., Davidson,D.J., Gold,M.R., Bowdish,D., and Hancock,R.E. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol.* 2002;169(7):3883-3891.

Scott,M.G. and Hancock,R.E. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev. Immunol.* 2000;20(5):407-431.

Scott,M.G., Yan,H., and Hancock,R.E. Biological properties of structurally related alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 1999;67(4):2005-2009.

Seganti,L., Di Biase,A.M., Marchetti,M., Pietrantonio,A., Tinari,A., and Superti,F. Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses. *Biometals* 2004;17(3):295-299.

Senyurek,I., Paulmann,M., Sinnberg,T., Kalbacher,H., Deeg,M., Gutschmann,T., Hermes,M., Kohler,T., Gotz,F., Wolz,C., Peschel,A., and Schitteck,B. Dermcidin-derived peptides show a different mode of action than the cathelicidin LL-37 against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(6):2499-2509.

Shi,J., Ross,C.R., Chengappa,M.M., Sylte,M.J., McVey,D.S., and Blecha,F. Antibacterial activity of a synthetic peptide (PR-26) derived from PR-39, a proline-arginine-rich neutrophil antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40(1):115-121.

Shimazu,R., Akashi,S., Ogata,H., Nagai,Y., Fukudome,K., Miyake,K., and Kimoto,M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 1999;189(11):1777-1782.

Shoji,H. Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin). *Ther. Apher. Dial.* 2003;7(1):108-114.

- Siciliano,R., Rega,B., Marchetti,M., Seganti,L., Antonini,G., and Valenti,P. Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of herpes simplex virus type 1 infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;264(1):19-23.
- Singh,P.K. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *Biometals* 2004;17(3):267-270.
- Skiada,A., Markogiannakis,A., Plachouras,D., and Daikos,G.L. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011;37(3):187-193.
- Slack,M.P. and Nichols,W.W. The penetration of antibiotics through sodium alginate and through the exopolysaccharide of a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 1981;2(8245):502-503.
- Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales. 21º Estudio. 2010;2-188.
- Soehnlein,O. Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J. Mol. Med. (Berl)* 2009;87(12):1157-1164.
- Strateva,T. and Yordanov,D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* 2009;58(Pt 9):1133-1148.
- Stratton,C.W. Mechanisms of Action for Antimicrobial Agents: General Principles and Mechanisms for Selected Classes of Antibiotics. 1996;4(13):pp. 579-603.
- Strom,M.B., Haug,B.E., Rekdal,O., Skar,M.L., Stensen,W., and Svendsen,J.S. Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. *Biochem. Cell Biol.* 2002;80(1):65-74.
- Suárez,C., Pena,C., Gavalda,L., Tubau,F., Manzur,A., Domínguez,M.A., Pujol,M., Gudiol,F., and Ariza,J. Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Int. J. Infect. Dis.* 2010;14 Suppl 3:e73-e78.
- Tam,V.H., Chang,K.T., Abdelraouf,K., Brioso,C.G., Ameka,M., McCaskey,L.A., Weston,J.S., Caeiro,J.P., and Garey,K.W. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(3):1160-1164.
- Tam,V.H., Chang,K.T., LaRocco,M.T., Schilling,A.N., McCauley,S.K., Poole,K., and Garey,K.W. Prevalence, mechanisms, and risk factors of carbapenem resistance in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007;58(3):309-314.
- Tang,M. and Hong,M. Structure and mechanism of beta-hairpin antimicrobial peptides in lipid bilayers from solid-state NMR spectroscopy. *Mol. Biosyst.* 2009;5(4):317-322.
- Toney,J.H. Isegaran (IntraBiotics pharmaceuticals). *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2002;3(2):225-228.

- Tossi,A., Sandri,L., and Giangaspero,A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2000;55(1):4-30.
- Tsai,C.M. and Frasch,C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1982;119(1):115-119.
- Tsai,W.C., Hershenson,M.B., Zhou,Y., and Sajjan,U. Azithromycin increases survival and reduces lung inflammation in cystic fibrosis mice. *Inflamm. Res.* 2009;58(8):491-501.
- Turnidge,J.D., Gudmundsson,S., Vogelmann,B., and Craig,W.A. The postantibiotic effect of antifungal agents against common pathogenic yeasts. *J. Antimicrob Chemother* 1994;34(1):83-92.
- Tzeng,Y.L., Ambrose,K.D., Zughayer,S., Zhou,X., Miller,Y.K., Shafer,W.M., and Stephens,D.S. Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 2005;187(15):5387-5396.
- Ulvatne,H., Samuelsen,O., Haukland,H.H., Kramer,M., and Vorland,L.H. Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004;237(2):377-384.
- Vaara,M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 1992;56(3):395-411.
- Vaara,M. Lipopolysaccharide and permeability of the bacterial outer membrane. 1999;pp. 31-38.
- Vaara,M. and Porro,M. Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996;40(8):1801-1805.
- Vaara,M. and Vaara,T. Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;24(1):107-113.
- Vaara,M. and Viljanen,P. Binding of polymyxin B nonapeptide to gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985;27(4):548-554.
- Veesenmeyer,J.L., Hauser,A.R., Lisboa,T., and Rello,J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med.* 2009;37(5):1777-1786.
- Velasco,M., Díaz-Guerra,M.J., Díaz-Achirica,P., Andreu,D., Rivas,L., and Bosca,L. Macrophage triggering with cecropin A and melittin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase expression. *J. Immunol.* 1997;158(9):4437-4443.
- Viani,R.M., Gutteberg,T.J., Lathey,J.L., and Spector,S.A. Lactoferrin inhibits HIV-1 replication in vitro and exhibits synergy when combined with zidovudine. *AIDS* 1999;13(10):1273-1274.
- Vila,J. and Marco,F. [Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2010;28(10):726-736.

- Viljanen,P. and Vaara,M. Susceptibility of gram-negative bacteria to polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984;25(6):701-705.
- Vorland,L.H., Osbakk,S.A., Perstolen,T., Ulvatne,H., Rekdal,O., Svendsen,J.S., and Gutteberg,T.J. Interference of the antimicrobial peptide lactoferricin B with the action of various antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Scand. J. Infect. Dis.* 1999a;31(2):173-177.
- Vorland,L.H., Ulvatne,H., Rekdal,O., and Svendsen,J.S. Initial binding sites of antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scand. J. Infect. Dis.* 1999b;31(5):467-473.
- Vranes,J. Effect of subminimal inhibitory concentrations of azithromycin on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to polystyrene. *J. Chemother* 2000;12(4):280-285.
- Warren,L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem* 1959;234(8):1971-1975.
- Westphal,O. and Jann,K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem* 1965;83-96.
- Wieprecht,T., Dathe,M., Krause,E., Beyermann,M., Maloy,W.L., MacDonald,D.L., and Bienert,M. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *FEBS Lett.* 1997;417(1):135-140.
- Wiesner,J. and Vilcinskas,A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence.* 2010;1(5):440-464.
- Winfield,M.D., Latifi,T., and Groisman,E.A. Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.* 2005;280(15):14765-14772.
- Wisplinghoff,H., Bischoff,T., Tallent,S.M., Seifert,H., Wenzel,R.P., and Edmond,M.B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 2004;39(3):309-317.
- Wood,C.A., Norton,D.R., Kohlhepp,S.J., Kohnen,P.W., Porter,G.A., Houghton,D.C., Brummett,R.E., Bennett,W.M., and Gilbert,D.N. The influence of tobramycin dosage regimens on nephrotoxicity, ototoxicity, and antibacterial efficacy in a rat model of subcutaneous abscess. *J. Infect. Dis.* 1988;158(1):13-22.
- Wood,S.J., Miller,K.A., and David,S.A. Anti-endotoxin agents. 1. Development of a fluorescent probe displacement method optimized for the rapid identification of lipopolysaccharide-binding agents. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 2004;7(3):239-249.
- Wright,S.D., Ramos,R.A., Tobias,P.S., Ulevitch,R.J., and Mathison,J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249(4975):1431-1433.

Yang,D., Chen,Q., Hoover,D.M., Staley,P., Tucker,K.D., Lubkowski,J., and Oppenheim,J.J. Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J. Leukoc. Biol.* 2003;74(3):448-455.

Yeaman,M.R. and Yount,N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 2003;55(1):27-55.

Yeung,A.T., Gellatly,S.L., and Hancock,R.E. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell Mol. Life Sci.* 2011;68(13):2161-2176.

Zasloff,M., Martin,B., and Chen,H.C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1988;85(3):910-913.

Zhang,G.H., Mann,D.M., and Tsai,C.M. Neutralization of endotoxin *in vitro* and *in vivo* by a human lactoferrin-derived peptide. *Infect. Immun.* 1999a;67(3):1353-1358.

Zhang,L., Benz,R., and Hancock,R.E. Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides. *Biochemistry* 1999b;38(25):8102-8111.

Zhang,L., Dhillon,P., Yan,H., Farmer,S., and Hancock,R.E. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44(12):3317-3321.

Zorko,M., Japelj,B., Hafner-Bratkovic,I., and Jerala,R. Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide. *Biochim. Biophys. Acta* 2009;1788(2):314-323.

Zweytick,D., Deutsch,G., Andra,J., Blondelle,S.E., Vollmer,E., Jerala,R., and Lohner,K. Studies on lactoferricin-derived *Escherichia coli* membrane-active peptides reveal differences in the mechanism of N-acylated versus nonacylated peptides. *J. Biol. Chem.* 2011;286(24):21266-21276.

ANEXO 1

Anexo1A: Péptidos de 1^a generación: secuencias

Péptidos		Secuencias	
LF11		F Q W Q R N I R K V R	-NH ₂
C12LF11	lauril	F Q W Q R N I R K V R	-NH ₂
P1-1		F W Q R N I R K V R	-NH ₂
P1-2		F W Q R I R K V R	-NH ₂
P1-3		F W R N I R K V R	-NH ₂
P1-4		F W Q R N I R V R	-NH ₂
P1-5		F W Q R N I K V R	-NH ₂
P1-6		F W R I R K V R	-NH ₂
P1-7		F W Q R N I R K V R R	-NH ₂
P1-8		F W Q R N I R K V K K	-NH ₂
P1-9		F W Q R N I R K V R R R	-NH ₂
P1-10		F W Q R N I R K V K K K	-NH ₂
P1-11		F W Q R N I R K V R R R R	-NH ₂
P1-12		F W Q R N I R K V R R R I	-NH ₂
P1-13		F W Q R N I R K V K K K K	-NH ₂
P1-14		F W Q R N I R K V K K K I	-NH ₂
P1-15		F W Q R R I R K V R R	-NH ₂
P1-16		F W Q R K I R K V K K	-NH ₂
P1-17	R F	W Q R N I R K V R R	-NH ₂
P1-18	K	W Q R N I R K V R R	-NH ₂
P1-19	R	W Q R N I R K V R R	-NH ₂
P1-20	RR	W Q R N I R K V R R	-NH ₂
P1-21	R F	W Q R N I R K Y R	-NH ₂
P1-22	R F R	W Q R N I R K Y R R	-NH ₂
P1-23	R	W Q R N I R K Y R R	-NH ₂
P1-24	RR	W Q R N I R K Y R R	-NH ₂
P1-25	c F	W Q R N I R K V R	c -NH ₂
P1-26	C F	W Q R N I R K V C R	-NH ₂
P1-27	C	W Q R N I R K C R	-NH ₂
P1-28	c F	W Q R N I R K V R	c -NH ₂
P1-29	F	W Q R N I R K I R	-NH ₂
P1-30	F	W Q R N I R K L R	-NH ₂
P1-31	F	W Q R N I R K W R	-NH ₂
P1-32	F	W Q R N I R K Y R	-NH ₂
P1-33	F	W Q R N I R K F R	-NH ₂
P1-34	F	Y Q R N I R K V R	-NH ₂

Anexo1B: Péptidos de 1^a generación: secuencias

Péptidos	Secuencias	
P1-35	F F Q R N I R K V R	-NH ₂
P1-36	F W Q R N I R I R R	-NH ₂
P1-37	F W Q R N W R K V R	-NH ₂
P1-38	F W Q R N F R K V R	-NH ₂
P1-39	F W Q R N Y R K V R	-NH ₂
P1-40	F W Q R N I F K V R	-NH ₂
P1-41	F W Q R N I Y K V R	-NH ₂
P1-42	F A W Q R N I R K V R	-NH ₂
P1-43	F I W Q R N I R K V R	-NH ₂
P1-44	F L W Q R N I R K V R	-NH ₂
P1-45	F V W A R N I R K V R	-NH ₂
P1-46	F W A R N I R K V R	-NH ₂
P1-47	F W I R N I R K V R	-NH ₂
P1-48	F W L R N I R K V R	-NH ₂
P1-49	F W V R N I R K V R	-NH ₂
P1-50	F W P R N I R K V R	-NH ₂
P1-51	F W Q R P I R K V R	-NH ₂
P1-52	F W Q R G I R K V R	-NH ₂
P1-53	F W Q S N I R K V R	-NH ₂
P1-54	F W Q R N I S K V R	-NH ₂
P1-55	F W Q R N I R S V R	-NH ₂
P1-56	F W Q R N I R K V S	-NH ₂
MAR7	K R F S F K K C	-NH ₂
P1-58	K R F S F K K	-NH ₂
P1-59	K R F Q F K K	-NH ₂
P1-60	K R F C F K K	-NH ₂
P1-61	K R F S F K K c	-NH ₂
P1-62	K R F K F K K	-NH ₂
P1-63	K R W S W K K	-NH ₂
P1-64	F R F S F K K	-NH ₂
P1-65	K R F L F K K	-NH ₂
P1-66	K R Y S Y K K	-NH ₂
P1-67	K K F S F K K	-NH ₂
P1-68	K K F S F R K	-NH ₂
P1-69	K R F F K K	-NH ₂
P1-70	R F S F K	-NH ₂

Anexo1C: Péptidos de 2^a generación: secuencias

Péptidos	Secuencias
P2-1	F W Q R N I R I R R -NH ₂
P2-2	L W Q R N I R I R R -NH ₂
P2-3	I W Q R N I R I R R -NH ₂
P2-4	F F W Q R N I R I R R -NH ₂
P2-5	F W Q R N W R I R R -NH ₂
P2-6	F W Q R N I R W R R -NH ₂
P2-7	F W Q R N I R F R R -NH ₂
P2-8	F W Q R N W R W R R -NH ₂
P2-9	F W Q R N W R F R R -NH ₂
P2-10	F W R N I R I R R -NH ₂
P2-11	F W R N I R I R R -NH ₂
P2-12	F W G R N I R I R R -NH ₂
P2-13	F W Q R I R I R R -NH ₂
P2-14	F W Q R N L R L R R -NH ₂
P2-15	F W R I R I R R -NH ₂
P2-16	F W R N I R I W R R -NH ₂
P2-17	F W Q R N W I R R -NH ₂
P2-18	R F W Q R N I R I R R -NH ₂
P2-19	R W Q R N I R I R R -NH ₂
P2-20	F W Q R N I R F V R -NH ₂
P2-21	F W Q R N I W R R -NH ₂
P2-22	F W R R N F W R R -NH ₂
P2-23	F W R W R R -NH ₂
P2-24	F W R R W R R -NH ₂
P2-25	F W R R W I R R -NH ₂
P2-26	F W R G W R I R R -NH ₂
P2-27	F W R R F W R R -NH ₂
P2-28	F W R W R W R -NH ₂
P2-29	F W R I W R W R -NH ₂
P2-30	F W R W R I W R -NH ₂
P2-31	F W R I W R I W R -NH ₂
P2-32	F I W R W R W R -NH ₂
P2-33	P F W R I R I R R -NH ₂
P2-34	F W Q R R I R I R R -NH ₂

Anexo1D: Péptidos de 2^a generación: secuencias

Péptidos	Secuencias
P2-35	F Q W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-36	Fmoc- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-37	Fmoc- F W R N I R I R R -NH ₂
LP2-38	Fmoc- F W Q R I R I R R -NH ₂
LP2-39	Lauril- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-40	Decanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-41	Octanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-42	exanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-43	2-Metilhexanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-44	2-Etilhexanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-45	2-Propilpentanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-46	2-Butiloctanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-47	2,2-dimetilbutanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-48	2-metilpentanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-49	3-metilpentanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-50	4-metilpentanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-51	6-metiloctanoil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
LP2-52	Benzil- F W Q R N I R I R R -NH ₂
Derivados de MARCKS	
P2-53	R R F S F R R -NH ₂
P2-54	R R F R F R R -NH ₂
P2-55	R R F W F R R -NH ₂

Anexo1E: Péptidos de 4^a generación: secuencias

Péptidos	Secuencias
P4-1	P F W R R F W R R R -NH ₂
P4-2	R R R W F R R W F I -NH ₂
P4-3	P F W R R R F I W R R R -NH ₂
P4-4	P F I W R R R R -NH ₂
P4-5	R R R I W R R W F I -NH ₂
P4-6	P F W R I I R R R -NH ₂
P4-7	P F W I I R R R R -NH ₂
P4-8	P F W R I R I R R W I R R -NH ₂
P4-9	P F W R I R I R R W W R R -NH ₂
P4-10	F W R R I I F W R R -NH ₂
P4-11	F W R W R W R W F -NH ₂
P4-12	R R F W N F W R R -NH ₂
P4-13	R W R W R -NH ₂
P4-14	W W R W R W R -NH ₂
P4-15	W R W W R W -NH ₂
P4-16	F W Q R R I R R V R R I R R -NH ₂
P4-17	F W I R I W R I W R -NH ₂
P4-18	F W I R I W R I W R R -NH ₂
P4-19	F W I W W I R I R R -NH ₂
P4-20	W W I R I W W -NH ₂

Anexo1F: Péptidos de 5^a generación: secuencias

Péptidos	Secuencias													
P5-1	F	W	I	R	I	W	R	I	W	R	R	W	-NH ₂	
P5-2	F	W	R	I	W	R	W	R	R	-NH ₂				
P5-3	W	R	R	W	R	R	W	R	R	W	R	R	-NH ₂	
P5-4	F	W	R	I	W	R	W	R	R	R	-NH ₂			
P5-5	F	W	R	R	N	F	W	R	R	N	I	R	R	-NH ₂
P5-6	W	R	R	W	R	R	R	W	R	R	W	R	R	-NH ₂
P5-7	F	P	W	R	R	W	I	R	R	W	N	R	R	-NH ₂
P5-8	P	F	W	R	I	R	W	R	R	-NH ₂				
P5-9	F	W	R	W	R	R	W	I	R	R	-NH ₂			
P5-10	F	W	R	R	F	W	R	R	V	W	R	R	-NH ₂	
P5-11	P	F	W	R	R	W	R	R	-NH ₂					
P5-12	W	F	R	R	I	W	R	R	I	R	R	-NH ₂		
P5-13	F	W	R	W	R	R	V	I	R	R	-NH ₂			
P5-14	P	I	W	R	R	W	N	R	R	-NH ₂				
P5-15	P	F	W	R	I	W	R	R	-NH ₂					
P5-16	F	W	R	R	W	I	R	R	W	I	R	R	-NH ₂	
P5-17	F	W	R	R	I	W	R	R	-NH ₂					
P5-18	P	F	W	R	I	V	R	R	-NH ₂					
P5-19	R	R	P	F	W	R	R	P	F	W	R	R	-NH ₂	
P5-20	W	R	R	W	I	R	R	W	I	R	R	-NH ₂		
P5-21	P	W	R	R	W	I	R	R	W	I	R	R	-NH ₂	
P5-22	P	I	W	R	R	W	I	R	R	-NH ₂				
P5-23	P	I	W	R	R	W	I	R	K	-NH ₂				
P5-24	P	W	R	R	W	I	R	R	-NH ₂					

ANEXO 2

Anexo 2: Definiciones de los descriptores de los péptidos utilizados en los análisis QSAR

Tipo de descriptor	Abeviatura	Definición
Constitucionales ¹	longitud	número de aminoácidos del péptido
	PM	Peso molecular del péptido
	n°_basicos	número de residuos básicos
	n°_aromáticos	número de residuos aromáticos
	n°_hidrofóbicos	número de residuos hidrofóbicos
	n°_W	número de residuos triptófano
	n°_basicos/longitud	número de residuos básicos dividido por la longitud del péptido (densidad lineal de residuos básicos en la secuencia)
	%res_basicos	porcentaje de residuos básicos
	%res_basicos+hidrofóbicos	porcentaje de la suma de residuos básicos e hidrofóbicos
	suma_aromáticos+básicos	suma de los residuos aromáticos y básicos
	He	Hidrofobicidad de acuerdo con la escala Eisenberg (Eisenberg y col., 1984)
	Hk	Hidrofobicidad de acuerdo con la escala Kyte-Doolittle (Kyte y col., 1982)
	Dependiente de la secuencia ²	max_dis_W
max_dis_básicos		máxima distancia entre residuos básicos en la secuencia
max_dis_aromáticos		máxima distancia entre residuos aromáticos en la secuencia
max_dis_hidrofóbicos		máxima distancia entre residuos hidrofóbicos en la secuencia
momh(100deg)		momento hidrofóbico (μ) a un ángulo de 100 °
momh(160deg)		momento hidrofóbico (μ) a un ángulo de 160 °
momh(180deg)		momento hidrofóbico (μ) a un ángulo de 180 °
max_carg_med_2sec		máxima carga media de 2-residuos secuenciales
max_carg_med_3sec		máxima carga media de 3-residuos secuenciales
max_carg_med_4sec		máxima carga media de 4-residuos secuenciales
n°_clust_2res-aromáticos		número de <i>clusters</i> 2-aromáticos
n°_clust_2res-hidrofóbicos		número de <i>clusters</i> 2-hidrofóbicos
n°_clust_2res-polares		número de <i>clusters</i> 2-polares
n°_clust_2res-básicos		número de <i>clusters</i> 2-básicos
max_carg_bás_clust		máxima carga del <i>cluster</i> básico
dist_med_bas_clust	distancia media del <i>cluster</i> básico	
dist_med_hidr_clust	distancia media del <i>cluster</i> hidrofóbico	

¹ Descriptores constitucionales que dependen fundamentalmente de la composición de aminoácidos del péptido.

² Descriptores que dependen de la geometría y topología de la secuencia.

ANEXO 3

Anexo 3A- Propiedades fisicoquímicas de los péptidos de la generación P4

Péptido	Secuencia de aminoácidos															Propiedades fisicoquímicas																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	PM (Da)	n° Aa	n° W	n° res. Hb.	% res. Hb.	n° res. Bas.	% Dens. Bas	GRAVY	/μ/													
P4-1	P	F	W	R	R	F	W	R	R	R	-NH ₂						1562,8	10	2	5	50%	5	50%	-2,03	7,27												
P4-2	R	R	R	W	F	R	R	W	F	I	-NH ₂						1578,8	10	2	5	50%	5	50%	-1,42	6,01												
P4-3	P	F	W	R	R	R	F	I	W	R	R	R	-NH ₂													1832,2	12	2	6	50%	6	50%	-1,69	3,34			
P4-4	P	F	I	W	R	R	R	R	-NH ₂							1186,4	8	1	4	50%	4	50%	-1,65	1,40													
P4-5	R	R	R	I	W	R	R	W	F	I	-NH ₂						1544,8	10	2	5	50%	5	50%	-1,25	5,83												
P4-6	P	F	W	R	I	I	R	R	R	-NH ₂						1299,5	9	1	5	56%	4	44%	-0,97	6,22													
P4-7	P	F	W	I	I	R	R	R	R	-NH ₂						1299,5	9	1	5	56%	4	44%	-0,97	0,71													
P4-8	P	F	W	R	I	R	I	R	R	W	I	R	R	-NH ₂													1911,3	13	2	7	54%	6	46%	-1,09	7,15		
P4-9	P	F	W	R	I	R	I	R	R	W	W	R	R	-NH ₂														1984,3	13	3	7	54%	6	46%	-1,50	7,50	
P4-10	F	W	R	R	I	I	F	W	R	R	-NH ₂						1525,8	10	2	5	60%	4	40%	-0,52	5,04												
P4-11	F	W	R	W	R	W	R	W	F	-NH ₂						1525,7	9	4	5	56%	3	44%	-1,28	5,58													
P4-12	R	R	F	W	N	F	W	R	R	-NH ₂						1423,6	9	2	4	44%	4	56%	-1,97	9,68													
P4-13	R	W	R	W	R	-NH ₂										859	5	2	2	40%	3	60%	-3,09	0,87													
P4-14	W	W	R	W	R	W	R	-NH ₂								1231,4	7	4	4	57%	3	43%	-2,44	3,54													
P4-15	W	R	W	W	R	W	-NH ₂									1075,2	6	4	4	67%	2	33%	-2,10	4,39													
P4-16	F	W	Q	R	R	I	R	R	V	R	R	I	R	R	-NH ₂														2054,4	14	1	5	36%	8	64%	-1,74	8,42
P4-17	F	W	I	R	I	W	R	I	W	R	-NH ₂						1531,5	10	3	7	70%	3	30%	0,01	8,99												
P4-18	F	W	I	R	I	W	R	I	W	R	R	-NH ₂						1688	11	3	7	64%	4	36%	-0,40	10,62											
P4-19	F	W	I	W	W	I	R	I	R	R	-NH ₂						1531,8	10	3	7	70%	3	30%	0,01	5,69												
P4-20	W	W	I	R	I	W	W	-NH ₂								1145,3	7	4	6	86%	1	14%	0,13	4,04													
Valores promedio generación P4																	1489,6	9,6	2,4	5	56%	4,15	44%	-1,30	5,61												

PM: Peso molecular; n° Aa: número de aminoácidos; n° W: n° de triptófanos en la secuencia; n° Res Hb.: número de residuos hidrofóbicos; % Res Hb.: porcentaje de residuos hidrofóbicos en la secuencia. N° res. Bas: n° de residuos básicos en la secuencia; % Dens. Bas.: porcentaje de residuos básicos en la secuencia; GRAVY: *Grand Average Hydropathy* (índice de hidrofobicidad de la secuencia). /μ/: momento hidrofóbico (medida cuantitativa de la anfipaticidad).

Anexo 3B- Propiedades fisicoquímicas de los péptidos de la generación P5

Péptido	Secuencia de aminoácidos															Propiedades fisicoquímicas								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	PM (Da)	n° Aa	n° W	n° res. Hb.	% res. Hb.	n° res. Bas.	% Dens. Bas.	GRAVY	/μ/
P5-1	F	W	I	R	I	W	R	I	W	R	R	W	-NH ₂			1874,2	12	4	8	67%	4	33%	-0,042	11,9
P5-2	F	W	R	I	W	R	W	R	R	-NH ₂					1461,7	9	3	5	56%	4	44%	-1,489	3,7	
P5-3	W	R	R	W	R	R	W	R	R	W	R	R	-NH ₂		2012,3	12	4	4	33%	4	33%	-3,3	7,39	
P5-4	F	W	R	I	W	R	W	R	R	R	-NH ₂				1617,9	10	3	5	50%	5	50%	-1,79	5,45	
P5-5	F	W	R	R	N	F	W	R	R	N	I	R	R	-NH ₂	1963,2	13	2	5	38%	6	46%	-1,977	3,01	
P5-6	W	R	R	W	R	R	R	W	R	R	W	R	R	-NH ₂	2168,5	13	4	4	31%	9	69%	-3,392	13,86	
P5-7	F	P	W	R	R	W	I	R	R	W	N	R	R	-NH ₂	1985,3	13	3	6	46%	6	46%	-2,115	10,07	
P5-8	P	F	W	R	I	R	W	R	R	-NH ₂					1372,6	9	2	4	56%	4	44%	-1,567	4,21	
P5-9	F	W	R	W	R	R	W	I	R	R	-NH ₂				1617,9	10	3	5	50%	5	50%	-1,79	7,8	
P5-10	F	W	R	R	F	W	R	R	V	W	R	R	-NH ₂		1907,2	12	3	6	50%	6	50%	-1,658	10,9	
P5-11	P	F	W	R	R	W	R	R	-NH ₂						1259,4	8	2	4	50%	4	50%	-2,325	8,62	
P5-12	W	F	R	R	I	W	R	R	I	R	R	-NH ₂			1701	11	2	5	45%	6	55%	-1,545	11,61	
P5-13	F	W	R	W	R	R	V	I	R	R	-NH ₂				1503,2	10	2	5	50%	5	50%	-1,28	7,57	
P5-14	P	I	W	R	R	W	N	R	R	-NH ₂					1339,5	9	2	4	44%	4	44%	-2,267	7,97	
P5-15	P	F	W	R	I	W	R	R	-NH ₂						1216,4	8	2	5	62,5%	3	37,5%	-1,2	8,34	
P5-16	F	W	R	R	W	I	R	R	W	I	R	R	-NH ₂		1887,2	12	3	6	50%	6	50%	-1,492	11,74	
P5-17	F	W	R	R	I	W	R	R	-NH ₂						1275,5	8	2	4	50%	4	50%	-1,562	8,52	
P5-18	P	F	W	R	I	V	R	R	-NH ₂						1129,3	8	1	5	62,5%	3	37,5%	-0,562	6,77	
P5-19	R	R	P	F	W	R	R	P	F	W	R	R	-NH ₂		1816,1	12	2	6	50%	6	50%	-2,2	1,53	
P5-20	W	R	R	W	I	R	R	W	I	R	R	-NH ₂			1740,1	11	3	5	45%	6	55%	-1,882	11,96	
P5-21	P	W	R	R	W	I	R	R	W	I	R	R	-NH ₂		1837,2	12	3	6	50%	6	50%	-1,858	11,99	
P5-22	P	I	W	R	R	W	I	R	R	-NH ₂					1338,6	9	2	5	56%	4	44%	-1,378	8,77	
P5-23	P	I	W	R	R	W	I	R	K	-NH ₂					1310,6	9	2	5	56%	3	33%	-1,311	8,99	
P5-24	P	W	R	R	W	I	R	R	-NH ₂						1225,4	8	2	4	50%	4	50%	-2,112	8,5	
Valores promedio generación P5															1606,7	10,3	2,5	5	50%	4,68	47%	-1,75	8,38	

PM: Peso molecular; n° Aa: número de aminoácidos; n° W: n° de triptófanos en la secuencia; n° Res Hb.: número de residuos hidrofóbicos; % Res Hb.: porcentaje de residuos hidrofóbicos en la secuencia. Dens. Bas: Densidad básica (n° de residuos básicos en la secuencia); % Dens. Bas.: porcentaje de residuos básicos en la secuencia; GRAVY: *Grand Average Hydrophaty* (índice de hidrofobicidad de la secuencia). /μ/: momento hidrofóbico (medida cuantitativa de la anfipaticidad de la molécula).

ANEXO 4

Anexo 4A: Actividad permeabilizante de los péptidos de la 4ª generación frente a *Pseudomonas aeruginosa* Ps4 en medio MHA/MHNA

Peptido	Secuencia	CMI ¹ Péptido (µg/mL)	CMI de novobiocina a la concentración de péptido indicada (µg/mL)					CIF ² min	CCMI ³
			0	6,25	12,5	25	50		
			P4-1	P F W R R F W R R R -NH ₂	512/128	512/1024	128/32		
P4-2	R R R W F R R W F I -NH ₂	128/16	1024/1024	512/4	16/nc ⁴	8/nc	8/nc	0,11/0,39	128/256 (6,25)
P4-3	P F W R R R F I W R R R -NH ₂	1024/256	1024/1024	1024/1024	1024/64	1024/32	64/4	0,11/0,11	16/256
P4-4	P F I W R R R R -NH ₂	2048/1024	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/256	>0,50/0,27	1/2
P4-5	R R R I W R R W F I -NH ₂	256/32	512/512	512/16	512/4	16/2	2/nc	0,13/0,22	256/0
P4-6	P F W R I I R R R -NH ₂	2048/1024	1024/1024	1024/1024	1024/128	1024/32	1024/16	>0,5/0,06	1/64
P4-7	P F W I I R R R R -NH ₂	512/128	512/1024	1024/1024	1024/128	1024/32	32/8	0,16/0,22	16/128
P4-8	P F W R I R I R R W I R R -NH ₂	16/8	1024/1024	512/1024	nc/nc	nc/nc	nc/nc	>0,5/>0,5	2 (6,25)/1 (6,25)
P4-9	P F W R I R I R R W W R R -NH ₂	16/8	1024/1024	1024/1024	8/1024	nc/nc	nc/nc	>0,5/>0,5	128 (12,5)/1 (12,5)
P4-10	F W R R I I F W R R -NH ₂	128/128	512/1024	512/1024	512/2	512/1	2/1	0,39/0,1	256/1024
P4-11	F W R W R W R W F -NH ₂	256/64	512/1024	512/1024	512/1024	512/1024	512/nc	>0,5/>0,5	1/1 (25)
P4-12	R R F W N F W R R -NH ₂	1024/256	1024/512	512/64	128/16	64/8	32/8	0,22/0,08	32/64
P4-13	R W R W R -NH ₂	2048/1024	1024/512	1024/512	512/512	512/512	256/256	0,27/0,30	4/2
P4-14	W W R W R W R -NH ₂	512/512	1024/1024	1024/1024	1024/32	1024/16	32/8	0,13/0,13	32/128
P4-15	W R W W R W -NH ₂	512/128	1024/1024	1024/1024	1024/16	1024/4	8/2	0,11/0,13	128/512
P4-16	F W Q R R I R R V R R I R R -NH	1024/512	1024/1024	1024/1024	1024/128	1024/64	64/16	0,11/0,11	16/64
P4-17	F W I R I W R I W R -NH ₂	128/32	512/1024	512/1024	512/1024	512/nc	nc/nc	>0,5/>0,5	1 (25)/1 (12,5)
P4-18	F W I R I W R I W R R -NH ₂	32/32	512/1024	512/1024	512/1024	512/1024	nc/nc	>0,5/>0,5	2 (25)/1 (25)
P4-19	F W I W W I R I R R -NH ₂	1024/1024	512/1024	512/1024	512/1024	512/1024	512/1024	>0,5/>0,5	1/1
P4-20	W W I R I W W -NH ₂	1024/1024	512/1024	512/1024	512/1024	512/1024	512/1024	>0,5/>0,5	1/1

¹ Concentración mínima inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en caldo MHA/MHNA

² Índice mínimo de concentración inhibitoria fraccionada

³ Cociente de CMI (determinado igual que en 1) en ausencia y presencia de 50 µg/mL de péptido. Las CCMI's calculadas a otra concentración diferente, ésta se indica entre paréntesis.

⁴ No crecimiento del control tratado sólo con péptido, es decir, el crecimiento bacteriano fue inhibido sólo por el péptido a la concentración indicada.

Anexo 4B: Actividad permeabilizante de los péptidos de la 5ª generación frente a *Pseudomonas aeruginosa* Ps4 en medio MHA/MHNA

Péptidos	Secuencia	CMI ¹ Péptido (µg/mL)	CMI de la novobiocina a la concentración de péptido indicada (µg/mL)					CIF ² mín	CCMI ³
			0	6,25	12,5	25	50		
			P5-1	F W I R I W R I W R R W NH ₂	128/64	512/1024	512/1024		
P5-2	F W R I W R W R R NH ₂	64/16	1024/1024	1024/64	1024/nc	32/nc	nc/nc	0,42/0,45	32(25)/16(6,25)
P5-3	W R R W R R W R R W R R NH ₂	64/16	1024/1024	1024/32	128/nc	16/nc	nc/nc	0,32/0,42	64(25)/32(6,25)
P5-4	F W R I W R W R R R NH ₂	512/32	1024/512	1024/8	1024/4	32/nc	8/nc	0,08/0,21	128/128(12,5)
P5-5	F W R R N F W R R N I R R NH ₂	1024/256	1024/1024	1024/1024	1024/64	1024/64	64/32	0,11/0,11	16/32
P5-6	W R R W R R R W R R W R R NH ₂	16/8	1024/1024	1024/128	nc/nc	nc/nc	nc/nc	>0,5/>0,5	1/8(6,25)
P5-7	F P W R R W I R R W N R R NH ₂	64/8	1024/1024	1024/8	1024/nc	8/nc	nc/nc	0,40/>0,5	128(25)/128(6,25)
P5-8	P F W R I R W R R NH ₂	1024/256	1024/512	1024/64	1024/32	128/8	32/8	0,08/0,11	32/64
P5-9	F W R W R R W I R R NH ₂	1024/64	1024/512	1024/8	1024/8	1024/2	16/nc	0,06/0,11	64/256(25)
P5-10	F W R R F W R R V W R R NH ₂	32/8	1024/1024	1024/8	1024/nc	nc/nc	nc/nc	>0,5/>0,5	1/128(6,25)
P5-11	P F W R R W R R NH ₂	1024/1024	512/1024	1024/256	1024/128	1024/64	128/32	0,30/0,08	4/32
P5-12	W F R R I W R R I R R NH ₂	128/32	1024/512	128/4	8/2	2/nc	nc/nc	0,11/0,11	512(25)/256(12,5)
P5-13	F W R W R R V I R R NH ₂	1024/512	1024/1024	1024/128	1024/32	1024/32	1024/16	>0,5/0,06	1/16
P5-14	P I W R R W N R R NH ₂	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/1024	>0,5/>0,5	1/1
P5-15	P F W R I W R R NH ₂	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/16	1024/8	>0,5/0,04	1/128
P5-16	F W R R W I R R W I R R NH ₂	16/4	1024/1024	1024/nc	nc/nc	nc/nc	nc/nc	>1,00/>1,00	1/1
P5-17	F W R R I W R R NH ₂	1024/1024	1024/512	1024/32	1024/16	64/8	32/4	0,08/0,04	32/128
P5-18	P F W R I V R R NH ₂	1024/1024	512/1024	512/1024	512/1024	512/256	1024/128	>0,5/0,17	1/8
P5-19	R R P F W R R P F W R R NH ₂	1024/128	512/1024	512/1024	512/32	512/32	64/8	0,17/0,13	8/128
P5-20	W R R W I R R W I R R NH ₂	128/8	512/512	512/2	16/nc	2/nc	1/nc	0,13/0,40	512/256(6,25)
P5-21	P W R R W I R R W I R R NH ₂	32/8	512/1024	512/4	32/nc	1/nc	nc/nc	0,45/>0,5	512(25)/256(6,25)
P5-22	P I W R R W I R R NH ₂	1024/512	1024/1024	1024/1024	1024/256	1024/128	1024/32	>0,5/0,13	1/32
P5-23	P I W R R W I R K NH ₂	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/256	1024/64	1024/32	>0,5/0,08	1/32
P5-24	P W R R W I R R NH ₂	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/256	1024/256	1024/128	>0,5/0,17	1/8

¹Concentración mínima inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en caldo Mueller-Hinton con cationes ajustados/no ajustados.

²Índice mínimo de concentración inhibitoria fraccionada

³Cociente de CMI (determinado igual que en 1) en ausencia y presencia de 50 µg/mL de péptido. Las CCMI calculadas a otra concentración diferente, ésta se indica entre paréntesis.

⁴No crecimiento del control tratado sólo con péptido, es decir, el crecimiento bacteriano fue inhibido sólo por el péptido a la concentración indicada.

APÉNDICE I

New Antiseptic Peptides To Protect against Endotoxin-Mediated Shock[∇]

Thomas Gutschmann,¹ Iosu Razquin-Olazarán,² Ina Kowalski,¹ Yani Kaconis,¹
Jörg Howe,¹ Rainer Bartels,¹ Mathias Hornef,³ Tobias Schürholz,⁴
Manfred Rössle,⁵ Susana Sanchez-Gómez,² Ignacio Moriyon,²
Guillermo Martinez de Tejada,² and Klaus Brandenburg^{1*}

Forschungszentrum Borstel, Division of Biophysics, Parkallee 10, D-23845 Borstel, Germany¹; University of Navarra, Department of Microbiology, Irunlarrea 1, E-31008 Pamplona, Spain²; Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, D-30625 Hanover, Germany³; Universitätsklinikum Aachen, Pauwelsstr. 30, D-52074 Aachen, Germany⁴; and European Molecular Biology Laboratory, Outstation Hamburg, Notkestr. 52, D-22603 Hamburg, Germany⁵

Received 20 April 2010/Returned for modification 7 June 2010/Accepted 15 June 2010

Systemic bacterial infections are associated with high mortality. The access of bacteria or constituents thereof to systemic circulation induces the massive release of immunomodulatory mediators, ultimately causing tissue hypoperfusion and multiple-organ failure despite adequate antibiotic treatment. Lipid A, the “endotoxic principle” of bacterial lipopolysaccharide (LPS), is one of the major bacterial immunostimuli. Here we demonstrate the biological efficacy of rationally designed new synthetic antilipopolysaccharide peptides (SALPs) based on the *Limulus* anti-LPS factor for systemic application. We show efficient inhibition of LPS-induced cytokine release and protection from lethal septic shock *in vivo*, whereas cytotoxicity was not observed under physiologically relevant conditions and concentrations. The molecular mechanism of LPS neutralization was elucidated by biophysical techniques. The lipid A part of LPS is converted from its “endotoxic conformation,” the cubic aggregate structure, into an inactive multilamellar structure, and the binding affinity of the peptide to LPS exceeds those of known LPS-binding proteins, such as LPS-binding protein (LBP). Our results thus delineate a novel therapeutic strategy for the clinical management of patients with septic shock.

The life-threatening clinical consequences of sepsis and septic shock arise from recognition of microbial immunostimulatory molecules by the hosts' professional immune cells and the release of hemodynamically active mediators. The most potent immunostimulatory constituents are part of the microbial cell envelope, such as lipopolysaccharide (LPS) or lipoproteins. They are released continuously due to cell growth and division and massively liberated as a consequence of the attack of the immune system. In the case of Gram-negative bacteria, the most potent factor is LPS, which, therefore, is also called an endotoxin. LPS concentrations in blood serum as low as 1 ng/ml are able to cause sepsis. Septic shock resulting from bacterial infection remains a frequent cause of death, particularly in intensive care units, with more than 200,000 people dying each year in the United States alone. Death by septic shock can happen despite appropriate broad-range antibiotic treatment, which may kill bacteria but is not only incapable of neutralizing immunostimulatory LPS but also may promote its release into circulation (11).

The response of mammalian cells to LPS is initiated by its interaction with serum proteins such as lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and specific receptors and/or binding proteins of immune cells such as soluble CD14 (sCD14) and membrane-bound CD14 (mCD14), which finally leads to cell activation through the Toll-like receptor 4 (TLR4)–MD-2

pathway (31). The hydrophobic moiety of LPS, lipid A, anchoring LPS to the bacterial outer membrane, constitutes the “endotoxic principle” of LPS (24). Enterobacterial lipid A consists of a diglucosamine backbone phosphorylated at positions 1 and 4', to which six acyl chains are linked at positions 2,3 and 2',3'. The physicochemical properties of LPS suggest that cationic amphiphilic agents could effectively neutralize its lipid A moiety. A number of studies have used natural proteins, peptides, or modified variants thereof to neutralize LPS and, thus, to protect it from endotoxin-mediated immunostimulation (1, 10), and in some cases, a significant protection from LPS-induced lethality *in vivo* was observed (10, 19). However, these approaches required very high peptide/LPS molar ratios, precluding their use in humans due to the intrinsic cytotoxicity of the peptides at these concentrations.

We have designed a completely new class of peptides—synthetic anti-LPS peptides (SALPs). SALPs were originally based on the LPS-binding domain of the *Limulus* anti-LPS factor (LALF) (2) but were substantially changed in length and primary sequence for optimal binding to the lipid A portion of LPS. Here, we report that these peptides are highly efficient in neutralization of LPS and blockage of its immunopathological consequences *in vitro* and *in vivo*. Our preclinical study reveals that these SALPs combine excellent selectivity for LPS, with high neutralizing activity *in vitro* and potent protection to septic shock using the murine model *in vivo*. We also demonstrate very low cytotoxicity under physiological conditions, making these SALPs promising candidates for their application as therapeutic agents for the prevention and treatment of septic shock. The molecular interaction mechanism between

* Corresponding author. Mailing address: Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, D-23845 Borstel, Germany. Phone: 49-4537-188235. Fax: 49-4537-188632. E-mail: kbranden@fz-borstel.de.

[∇] Published ahead of print on 6 July 2010.

SALPs and LPS was studied using various biophysical approaches.

MATERIALS AND METHODS

Lipids. Lipopolysaccharides from the rough mutants Re and Ra from *Salmonella enterica* serovar Minnesota (R595 and R60, respectively) were extracted by the phenol-chloroform/petrol ether method (13) from bacteria grown at 37°C, purified, and lyophilized. Results from all the standard assays performed on the purified LPS (analysis of the amount of glucosamine, total and organic phosphate, and the distribution of the fatty acid residues) were in good agreement with the chemical properties expected for the LPS chemotypes, whose molecular structures have already been solved (23). S-lipopolysaccharides of *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 for mouse testing were obtained from the aqueous phase of a water-phenol extract and purified by treatment with chaotropic agents and detergents, according to published procedures (14, 17).

Preparation of endotoxin aggregates. LPS was solubilized in the appropriate buffer (lipid concentration of 1 to 10 mM, depending on the applied technique), extensively vortexed, sonicated for 30 min in a water bath, and subjected to several temperature cycles between 20 and 60°C. Finally, the lipid suspension was incubated at 4°C for at least 12 h before use.

Peptide synthesis. The peptides were 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. The peptidyl resin was deprotected and cleaved with a mixture of 90% trifluoroacetic acid (TFA), 5% anisole, 2% thioanisole, and 3% dithiothreitol for 90 min at room temperature. After cleavage, the suspension was filtered through a syringe filter into ice-cold diethyl ether. The precipitated peptides were separated by centrifugation and repeatedly washed with cold ether. The final purification was done by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC). Purity levels of up to 98% were achieved by using an Aqua C₁₈ column (Phenomenex) in combination with dedicated gradients of acetonitrile in 0.1% TFA, checked by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectroscopy and RP-HPLC at 214 nm. The sequences of the peptides were submitted in an international patent, which was published in October 2009 by the European Patent Office (patent 2108 372 A1).

Isothermal titration calorimetry (ITC). Microcalorimetric experiments of peptide binding to LPS were performed on a MSC isothermal titration calorimeter (MicroCal Inc., Northampton, MA) at 40°C. Briefly, after thorough degassing of the samples, peptide (1 to 4 mM in 20 mM HEPES, pH 7.0) was titrated to an LPS suspension (0.05 mM in 20 mM HEPES, pH 7.0). The enthalpy change during each injection was measured by the instrument, and the area underneath each injection peak was integrated (Origin; MicroCal) and plotted against the molar ratio of the concentrations of peptide to LPS. Titration of the pure peptide into HEPES buffer resulted in a negligible endothermic reaction due to dilution, which was subtracted from the plotted curves. The experiments were done at least twice.

Small-angle X-ray scattering (SAXS) with synchrotron radiation. X-ray scattering measurements of mixtures of lipid A with Pep19-2.5 were performed at the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) outstation at the Hamburg synchrotron radiation facility HASYLAB using the double-focusing monochromator-mirror camera X33 (16). Diffraction patterns in the range of the scattering vector $0.001 < s < 0.08 \text{ \AA}^{-1}$ (where $s = 2 \sin \theta / \lambda$, 2θ is the scattering angle, and λ is the wavelength, which was 1.5 Å) were recorded at 20, 40, and 60°C, with exposure times of 1 min using an image plate detector with online readout (mar345; Marresearch, Norderstedt, Germany) (26). The s axis was calibrated with Ag-behenate, which has a periodicity of 58.4 Å. The diffraction patterns were evaluated as described previously (6), assigning the spacing ratios of the main scattering maxima to defined three-dimensional structures. The lamellar and cubic structures are most relevant here and are characterized by the following features. (i) Lamellar structures: the reflections are grouped in equidistant ratios, i.e., 1, 1/2, 1/3, 1/4, etc. of the lamellar repeat distance d_l . (ii) Cubic structures: the different space groups of these nonlamellar three-dimensional structures differ in the ratio of their spacings. The relationship between reciprocal spacing $s_{hkl} = 1/d_{hkl}$ and lattice constant a is $s_{hkl} = [(h^2 + k^2 + l^2)/a]^2$ (hkl = Miller indices of the corresponding set of plane).

Stimulation of human MNC by LPS. Mononuclear cells (MNC) were isolated from heparinized blood samples obtained from healthy donors as described previously (15). The cells were resuspended in medium (RPMI 1640), and their number was equilibrated at 5×10^6 cells/ml. For stimulation, 200 μ l MNC ($1 \times$

10^6 cells) was transferred into each well of a 96-well culture plate. LPS Ra (from *S. Minnesota* strain R60) and the LPS/peptide ratio mixtures were preincubated for 30 min at 37°C and added to the cultures at 20 μ l per well. The cultures were incubated for 4 h at 37°C with 5% CO₂. Supernatants were collected after centrifugation of the culture plates for 10 min at $400 \times g$ and stored at -20°C until immunological determination of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), carried out with a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a monoclonal antibody against TNF (clone 6b; Intex AG, Switzerland) and described previously in detail (15).

Cytotoxicity assays and hemolysis. Cytotoxicity was assayed by using the chip-based Bionas system with four different cell types. These include human hepatoma cells (HepG2), human colon adenocarcinoma cells (LS-174T), human acute lymphocytic leukemic cells (Jurkat), and human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC), provided by Cell Line Services (Piscataway, NJ) and ProBioGen (Berlin, Germany). The cells were seeded on chips, with a density of 200,000 cells/chip for HepG2 and LS-174T, 300,000 cells/chip for Jurkat, and 2 million cells/chip for PBMC.

Red blood cells (RBCs) were obtained from citrated human blood by centrifugation (1,500 $\times g$, 10 min), washed three times with isotonic 20 mM phosphate-NaCl buffer (pH 7.4), and suspended in the same buffer at a concentration equivalent to 5% of the normal hematocrit. Forty-microliter aliquots of this RBC suspension were added to 0.96 ml of peptide dilutions prepared in the same isotonic phosphate solution, incubated at 37°C for 30 min, and centrifuged (1,500 $\times g$, 10 min). The supernatants were analyzed spectrophotometrically (with absorbance at 543 nm) for hemoglobin, and results were expressed as the percentage released with respect to sonicated controls (100% release) or controls processed without peptides (0% release) (21).

Assays for antibacterial activities. The antibacterial activity of the peptides was determined by microdilution susceptibility assays performed in standard Mueller-Hinton (MH) broth. Susceptibility testing was performed following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS) (20). Briefly, serial 2-fold dilutions of the peptides were made in MH broth and dispensed into 96-well U-bottom polystyrene microtiter plates. Bacterial cells grown for 18 to 20 h on agar plates were suspended in saline, and the turbidity was adjusted to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.04 (1×10^7 CFU/ml, approximately). A 100-fold dilution of this suspension prepared in MH broth was mixed 1:1 with 100 μ l of each of the corresponding peptide dilutions. Plates were incubated at 37°C without shaking for 18 to 20 h, and the MIC was determined visually.

Animal model of endotoxicity. As a compound for eliciting endotoxic shock, LPS from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 or from *S. Minnesota* strain R60 was used.

Female C57/BL6 mice weighing 14 to 16 g (6 weeks old) were purchased from Harlan Spain (Harlan Interfauna Iberica S.A., Barcelona, Spain) and randomly distributed in experimental groups ($n = 8$). Endotoxic shock was induced in the animals by coinoculation of LPS and galactosamine by following the method of Galanos et al. (12). Specifically, each animal received an intraperitoneal injection containing a mixture of 25 ng of LPS from *S. Minnesota* R60 (or 150 ng when using *P. aeruginosa* LPS) and 18 mg of galactosamine resuspended in 200 μ l of endotoxin-free saline.

Immediately after LPS administration, animals were intraperitoneally inoculated with 12.5 or 1.25 μ g (150 μ g in the case of animals receiving *P. aeruginosa* LPS) of the test peptide resuspended in 150 μ l of pyrogen-free saline. To facilitate the therapeutic action of the peptide, mice so treated were gently massaged at the site of inoculation for a few seconds. Animal mortality was monitored at 6 h and 24 h postinoculation and at daily intervals for 7 days.

In each independent experiment, a group of animals received 150 μ l of pyrogen-free saline containing 12.5 μ g of polymyxin B (PMB), a lipopeptide with well-known antiendotoxic properties, whereas another group was left untreated.

The results of animal mortality at all experimental time points were globally analyzed using Kaplan-Meier survival analysis (SPSS 15.0). When the survival plots were parallel, data were compared by the log rank test, whereas for those plots that intersected, the Breslow-Gehan-Wilcoxon test was applied. P values were always obtained by comparing data from the same experiment (mortality in treated versus untreated groups).

All the animal protocols used in this study were approved by the University of Navarra Animal Research Committee (protocol 035/05).

RESULTS

Design of the SALP. The sequences of the Pep19 series based on the *Limulus* anti-LPS factor, presented in Fig. 1A,

A	Pep19-1:	GCKKFRRLKWKYKGFVFWCG	2750
	Pep19-2:	GCKKYRRFRWKFVKGFVFWCG	2814
	Pep19-4:	GKKYRRFRWKFVKGFVFWFG	2750
	Pep19-5:	GKKYRRFRWKFVKGRVFWCG	2608
	Pep19-6:	GCKKFRFRFKLKCKQKLWLWCG	2656
	Pep19-7:	GKKYRRFRWKFVKGFVFWFG	2638
	Pep19-8:	GRRYKKFRWKFVKGRVFWFG	2636
	Pep19-10:	GRRYKKFKWRFRGRVFWFG	2664
	Pep19-11:	GCRRWKKFRWRYRGKFWFWCG	2909
	Pep19-12:	GCRRFKKFKWRVRYRGRVFWCFG	3145
B	Pep19-2.2:	GCKKYRRFRWKFVKGFVFWF	2654
	Pep19-2.3:	GCKKYRRFRWKFVKGFVFWCFG	2962
	Pep19-2.4:	GCRRYKKFKWRFRGRVFWCFG	3018
	Pep19-2.5:	GCKKYRRFRWKFVKGFVFWCG	2711
	Pep19-2.5KO	KFGKWRFGKYRVCWKFRGWK	2711

FIG. 1. Amino acid sequence of Pep19-derived peptides. (A) Sequences of the basic peptides Pep19-1 to Pep19-12 and their molecular weights (MW). (B) Sequences of the Pep19-2 series. Amino acids: G, glycine; C, cysteine; Q, glutamine; Y, tyrosine; R, arginine; K, lysine; F, phenylalanine; W, tryptophan; L, leucine. The colors illustrate the main physicochemical characteristics, as follows: green, polar; yellow, hydrophobic; blue, basic (positively charged).

were designed according to the following physicochemical criteria. (i) The compounds require amphiphilic characters, i.e., they must contain sufficiently high numbers of polar and positively charged (basic) amino acids and corresponding hydrophobic residues. (ii) The number of basic (positively charged) amino acids must be sufficiently high to bind to the negatively charged moieties of the LPS backbone. For this, 7 or 8 arginine (R) or lysine (K) residues were selected. The hydrophilic cationic part of the peptides was localized mainly near the N-

terminal residue, and the hydrophobic moiety was localized mainly near the C-terminal end. The number of the hydrophobic residues, consisting essentially of tryptophan (W) and phenylalanine (F), was 6 or 7. (iii) The length of the peptide should be optimized to account for the length and character of the lipid A moiety in such a way that the hydrophobic moiety of the peptide readily intercalates into the hydrocarbon chains of lipid A and the cationic moiety intercalates into the backbone-adjacent oligosaccharide moiety of LPS. A medium length of 19 amino acids was assumed to represent an optimum, but a maximum number of 23 amino acids was allowed. (iv) On the basis of the best sequences, as judged by their ability to inhibit cytokine production in human mononuclear cells (see below), new peptide variants were synthesized. To this end, the sequence of compound Pep19-2 was used as a template, giving rise to further peptides Pep19-2.2 to Pep19-2.5 (Fig. 1B).

Antibacterial activity. The antibacterial activity of the peptides was assessed on strains of various clinically relevant bacteria (Table 1). The data clearly show extreme differences in their MICs depending sensitively on the amino acid sequences. The SALPs showed activity not only against Gram-negative bacteria but also against Gram-positive bacteria. The comparison shows that the GC motif at the N-terminal end and the CG motif at the C-terminal end seem to be rather disadvantageous, since compounds lacking the glycine moieties were more active. Furthermore, peptides partially lacking that motif, such as Pep19-8, had increased potency against 2 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, with MIC values around 8 $\mu\text{g/ml}$.

Inhibition of cytokine production in human mononuclear cells. The LPS-induced production of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) by human mononuclear cells at three LPS concentrations (100, 10, and 1 ng/ml) and its inhibition by some selected peptides (Pep19-2 and Pep19-8) at different LPS/peptide weight ratios are plotted in Fig. 2A. Both peptides inhibit the LPS-induced TNF- α secretion to different degrees, showing for Pep19-2 the highest efficacy by far at a Pep19-2/LPS concentration ratio ([Pep19-2]/[LPS] ratio) of 100:1 weight percent (corresponding to a molar ratio of 65:1). Similar results were found for Pep19-1 (data not shown). In contrast to these compounds, Pep19-8 was much less active in the inhibi-

TABLE 1. MICs of peptides on indicated bacterial strains

Peptide	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a								
	<i>Bordetella bronchiseptica</i> CUN 11844-99	<i>P. aeruginosa</i> CUN 4158-02	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MRSA ATCC 43300	MRSA CUN 3792-99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CUN 3998-00	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606
Pep19-1	4	256	256	64	32	64	1,024	512	64
Pep19-2	32	256	128	128	128	128	1,024	512	64
Pep19-4	4	16	16	16	16	16	16	32	16
Pep19-5	4	32	16	16	16	16	16	64	16
Pep19-6	16	256	256	1,024	1,024	64	32	1,024	64
Pep19-7	8	32	8	1,024	1,024	16	16	64	16
Pep19-8	128	32	16	16	8	8	8	32	16
Pep19-10	16	ND	ND	64	32	ND	ND	ND	ND
Pep19-11	32	128	128	128	64	32	64	64	64
Pep19-12	32	128	128	64	64	32	64	64	64
Pep19-2.2	64	128	64	64	64	32	64	128	64

^a CUN, Clinica Universidad de Navarra (University Hospital of Navarra); MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; ND, not done.

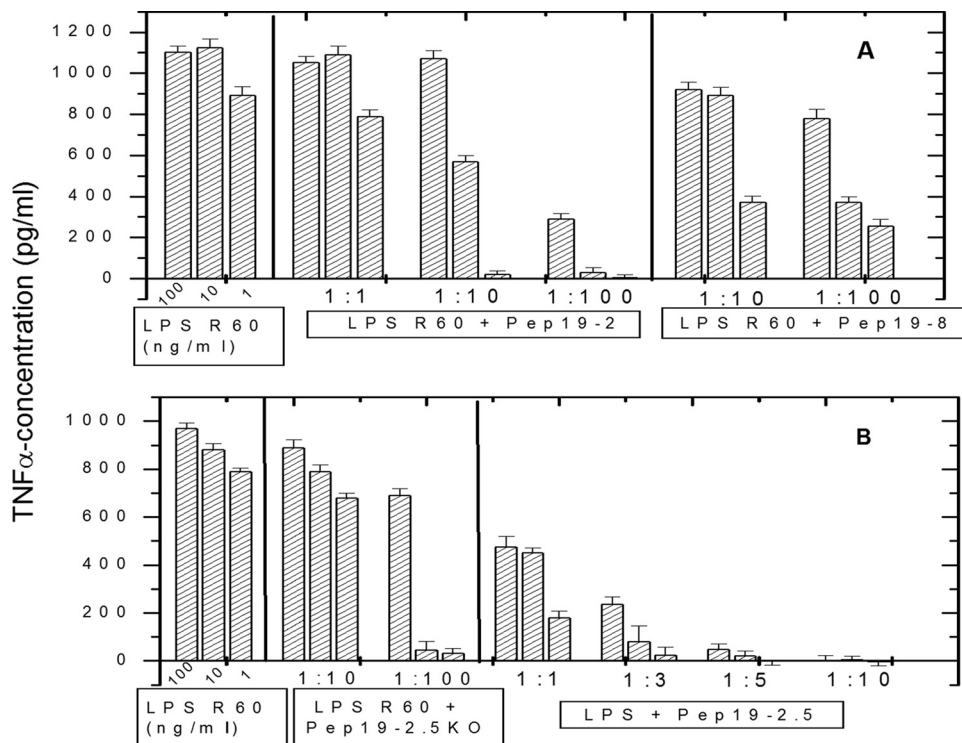


FIG. 2. Inhibitory effect on LPS-induced cytokine release. LPS R60-induced secretion of TNF- α by human mononuclear cells and the inhibitory effect in the presence of the peptides Pep19-2 and Pep19-8 (A) and Pep19-2.5 and Pep19-2.5KO (Pep19-2.5 control) (B). The peptides were added at the indicated weight ratios of the concentrations of LPS to peptide.

tion of the LPS response (Fig. 2A), and a similar observation was made for Pep19-5 (data not shown).

On the basis of these and other results on the inhibition of the cytokine production, peptides containing variations of the amino acid sequences were designed using Pep19-2, in particular, as a template, as shown in Fig. 1B. Data from the inhibition assay are presented in Fig. 2B, showing the extreme activity of Pep19-2.5 to inhibit the production of TNF- α induced by LPS at all investigated concentrations. Already at a [Pep19-2.5]/[LPS] ratio of 3:1 weight (corresponding to a molar ratio of 1.9:1), there is nearly complete inhibition. This was similarly true for Pep19-2.2 (data not shown). Comparative measurements with polymyxin B (PMB), the gold standard of antimicrobial peptides, showed that PMB causes some inhibition of the cytokine secretion at a [PMB]/[LPS] ratio of 10:1 weight (corresponding to a molar ratio of 3:1) but no inhibition at lower peptide concentrations. This means that the best peptides of the Pep19 series significantly outperform the LPS-neutralizing activity of the gold standard.

A variant of Pep19-2.5, with its same amino acid composition but in a completely random sequence, called Pep19-2.5KO was shown to still exert some inhibition but considerably lower than that of the parent peptide (Fig. 2A).

Animal model of endotoxicity. To investigate whether the *in vitro* data could be extended to an *in vivo* model of endotoxicity, we evaluated the ability of various peptides to protect mice against a lethal septic shock induced by the intraperitoneal injection of LPS. Initially, *Pseudomonas aeruginosa* LPS was used, harboring an endotoxic activity that is known to be

lower than that of *Salmonella* (see Materials and Methods). As shown in Fig. 3A, the *in vivo* results, performed at a [peptide]/[LPS] ratio of 1,000:1 weight (corresponding to a molar ratio of approximately 600:1) were in good agreement with the *in vitro* data, since the peptides with less inhibitory activity (Pep19-5 and Pep19-8) did not confer protection against LPS-induced shock, whereas highly active compounds such as Pep19-2, Pep19-12, and Pep19-2.2 protected the animals as efficiently as polymyxin B.

In addition, the ability of the peptides to neutralize LPS of enhanced endotoxicity was examined. Pep19-2.2 and Pep19-2.5 were selected, and the experimental setting was repeated using LPS from *S. enterica* serovar Minnesota R60. As shown in Fig. 3B, administration of Pep19-2.5 conferred a significant level of protection, similar to that of polymyxin B, whereas Pep19-2.2 was slightly less protective. Interestingly, animals receiving Pep19-2.5 at doses 1 order of magnitude lower (2.5 μ g, i.e., a ratio of 1:50 weight percent, with respect to LPS) than the previous one were fully protected during the first 48 h after inoculation, although the therapeutic effect decreased slightly at later time points.

Cytotoxicity and hemolysis. To test possible side effects of the peptides in physiologically relevant cells, several parameters, including respiration rate, acidification, and impedance, were monitored kinetically in a chip-based system (Bionas) at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 μ g/ml. In Fig. 4A, data for the respiration rates are shown for Jurkat cells, which clearly give evidence that no damaging effect can be observed at concentrations of up to 10 μ g/ml. At 100 μ g/ml Pep19-2.5,

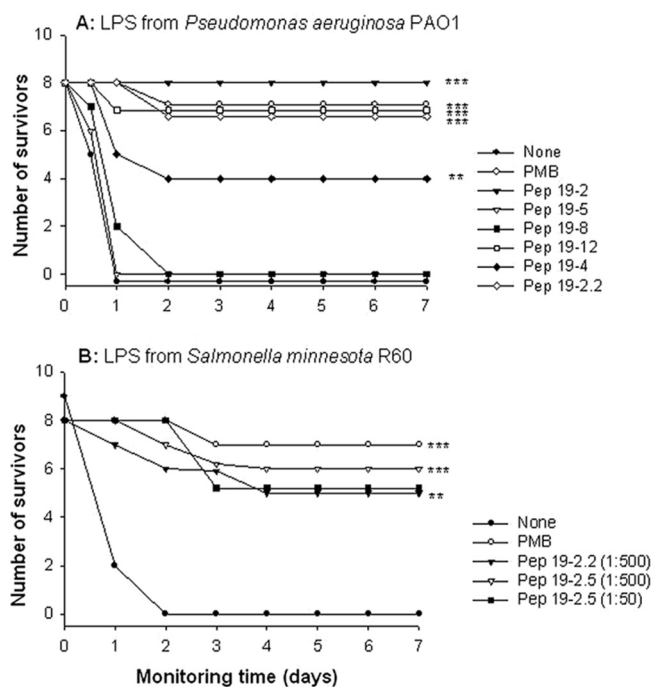


FIG. 3. Protective effect in an *in vivo* endotoxin exposure model. (A) Protection against lethal septic shock caused by injection of *Pseudomonas aeruginosa* LPS. On day 0, a group of C57BL/6 mice ($n = 8$) was inoculated intraperitoneally with a mixture of 18 mg galactosamine and 150 ng LPS isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Immediately afterward, animals received 150 μg of the test peptide or 150 μg of polymyxin B at a different site of the peritoneum. Animal mortality was monitored at daily intervals for 7 days. Statistical differences were analyzed by the Kaplan-Meier survival test (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$). (B) *S. Minnesota* LPS. On day 0, a group of C57BL/6 mice ($n = 8$) was inoculated intraperitoneally with a mixture of 18 mg galactosamine and 25 ng LPS from *S. Minnesota* R60. Immediately afterward, animals received either 12.5 μg or 1.25 μg (1:500 and 1:50 weight ratios, with respect to LPS) of the test peptide or polymyxin B at a different site of the peritoneum. Animal mortality was monitored at daily intervals for 7 days. Statistical differences were analyzed by the Kaplan-Meier survival test (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$).

however, the cells are irreversibly damaged. These observations were found to be true for all 4 different cellular systems, namely, human hepatoma cells (HepG2), human colon adenocarcinoma cells (LS-174T), human acute lymphocytic leukemic cells (Jurkat), and human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC). Similar results were also found for HeLa and HaCaT cells using conventional test systems such as the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) test (data not shown).

Using the red blood cell hemolysis assay for selected peptides, no essential damage was observed at peptide concentrations of up to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ca. 10 μM) (Fig. 4B).

Binding experiments. To understand the mechanisms of binding, high-sensitivity isothermal titration calorimetry (ITC) was applied by repeated titration of the peptide solution into the LPS dispersion. The experiments show a strong exothermic reaction due to Coulomb attraction between Pep19-2.5 and LPS R60 (peaks downward), which runs into saturation already at a [Pep19-2.5]/[LPS] ratio of 0.3 (Fig. 5). This means that

already 3 molecules of the peptide, corresponding to 24 positive charges, are sufficient to neutralize 10 LPS molecules (40 negative charges). Due to the amphiphilic character of the peptide, saturation takes place before charge compensation.

Supramolecular aggregate structure by SAXS. It is known that the bioactive aggregate structure of LPS or lipid A is cubic (7). The influence of Pep19-2.5 on the aggregation properties of lipid A was tested, because the scattering patterns of this endotoxin species with its short sugar chain provide the best resolution. In Fig. 6, the data are shown for pure lipid A (panel A) and in the presence of a small amount of Pep19-2.5 (panel B; [lipid A]/[Pep19-2.5] molar ratio of 7:1). Lipid A alone expresses a complex spectrum with cubic symmetry, because the reflections at 8.18, 5.29, and 4.06 nm obey the relations $a_Q/\sqrt{2}$, $a_Q/\sqrt{5}$, and $a_Q/\sqrt{8}$, respectively, with a cubic periodicity of a_Q equaling 11.6 ± 0.2 nm. In the presence of the peptide, there is a complete conversion of the spectrum with the appearance of one strong peak at 5.07 nm, corresponding to the lamellar repeat characteristic of lipid A with multilamellar structure (7).

DISCUSSION

We have designed and synthesized cationic amphiphilic peptides (synthetic antilipopolsaccharide peptides [SALPs]) which are able to neutralize bacterial endotoxins effectively in an *in vitro* system—human mononuclear cells—as well as *in vivo* in a murine animal model of endotoxicity. The best peptides inhibit the production of TNF- α in human mononuclear cells already at a slightly excess weight percent or molar ratio of the concentrations of peptide to LPS (Fig. 2A and B), making them suitable candidates for antiseptic agents. This was clearly demonstrated by employing the animal model of Gram-negative sepsis, exhibiting considerable protection against endotoxic shock (Fig. 3) even at a relatively low peptide dose. Regarding the latter result, one has to take into account that in the therapeutic situation, the peptide would be administered several times and not only once.

At the same time, neither hemolytic nor cytotoxic effects in human hepatoma cells, human colon adenocarcinoma cells, human acute lymphocytic leukemic cells (Fig. 4A), and human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC) or in human red blood cells (Fig. 4B) was observed for doses of up to 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. For an assessment of these data in relation to the situation found in human septic patients with endotoxemia, it has to be considered that under these conditions, blood serum levels of 1 ng/ml of LPS are observed (5). Both the *in vitro* and *in vivo* test systems indicate that an excess [peptide]/[LPS] ratio of 100:1 weight percent is enough to inactivate LPS effectively. This corresponds to a patient dose of 100 ng/ml, which is far below any cytotoxicity relevant concentration. According to the cytotoxicity data, even a 10-fold-higher dose should not be a problem, making these peptides potentially suitable candidates for use with critical care unit patients. It is known that severe sepsis or septic shock may arise from infections due to Gram-negative bacteria in approximately 50% of all septic patients (30). Therapy with conventional antibiotics may even worsen this outcome, since many antimicrobial agents kill bacteria with subsequent release of LPS but do not inactivate LPS (11). Thus, a possible therapeutic strategy would be the use of

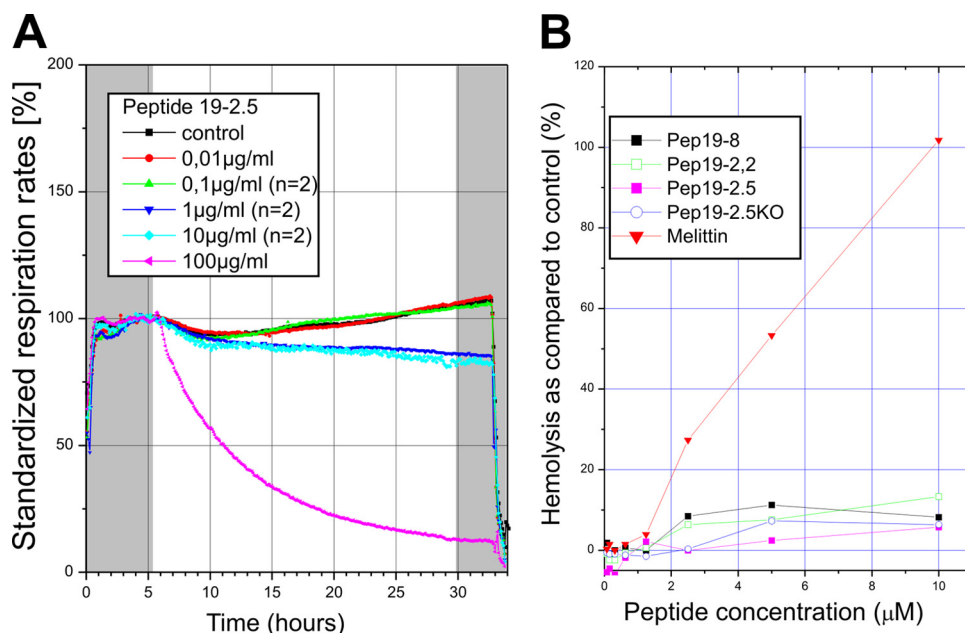


FIG. 4. Characterization of peptide-associated cytotoxicity. (A) Respiration rates of Jurkat cells over 32 h at different concentrations of peptide Pep19-2.5 in a chip-based cellular system. The first and last 5 h (gray regions) correspond to the lag and regeneration phases, respectively. (B) Red blood cell hemolysis of selected peptides compared to that of melittin from bee venom (synthetic).

the peptides presented here, since these have nonnegligible antibacterial activity levels (examples given in Table 1). In case the antimicrobial action of these compounds was not sufficient for clinical purposes, a therapeutic approach should involve the combination of peptides and antibiotics.

In Table 1 and Fig. 2A, in particular for Pep19-2 and Pep19-8, it becomes clear that the presented peptides differ in

their ability to neutralize LPS in isolated forms and as constituents of Gram-negative bacteria. Pep19-2 is highly active against free LPS but has very low activity against bacteria, whereas the situation for Pep19-8 is the opposite. Therefore, the specific arrangement of the amino acids plays a decisive role, since both peptides have 8 cationic amino acids (R and L) and 7 hydrophobic amino acids (F and W) at similar chain positions. For strong anti-LPS activity, apparently the cysteine

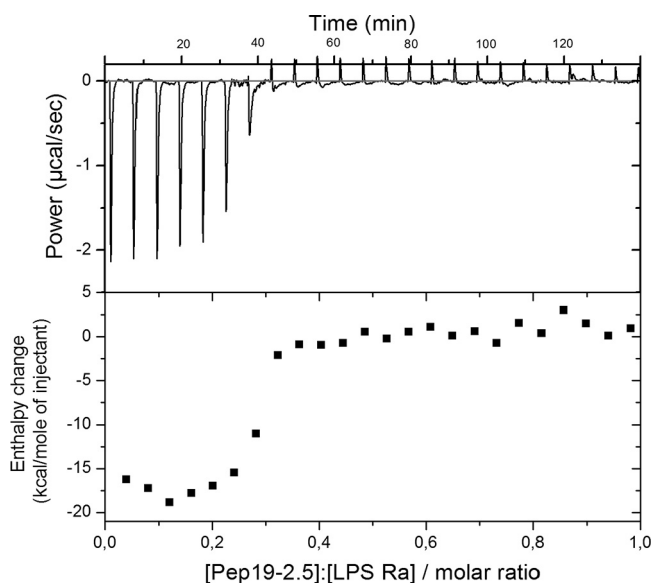


FIG. 5. Enthalpy of the peptide-LPS binding. Isothermal calorimetric titration of a 1 mM Pep19-2.5 solution into a 0.05 mM LPS Ra dispersion (from *S. Minnesota* R60). Every 5 min, 5 μl of the peptide was titrated to the LPS dispersion, and the heat reaction was recorded. A downward peak corresponds to an exothermic reaction, and an upward peak corresponds to an endothermic reaction.

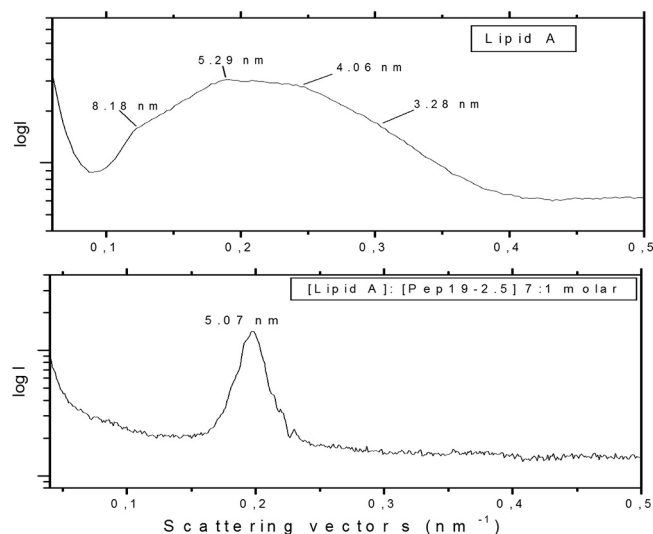


FIG. 6. Effect of Pep19-2.5 on the supramolecular lipid A aggregate structure. Synchrotron radiation small-angle X-ray scattering patterns of lipid A (top) and the [lipid A]/[Pep19-2.5] ratio of 7:1 M/M (bottom). The logarithm of the scattering intensity is plotted versus the scattering vector s ($s = 1/d$, with d being the spacings of the reflections).

in position 2 at the N-terminal end is essential, whereas this residue is irrelevant for high antimicrobial activity of all peptides (Pep19-4, -5, and -8) (Table 1). The selectivity of the peptides to inactivate LPS could be due to the distinct geometry of LPS, either in free form within a cubic aggregate structure (8) or as a constituent of the outer membrane leaflet. For these different conformations, the structural prerequisites of the peptides to neutralize LPS differ.

Differences between antimicrobial and anti-LPS activities have also been described for peptides with K_6L_9 sequences (28). Those authors emphasize that peptides with high endotoxin neutralizing activity levels are able to disaggregate the LPS multimers, deduced using fluorescence dequenching and electron microscopy (EM) with negative staining (27). In previous work on various peptides derived from the *Limulus* anti-LPS factor (2), human granulysin-derived peptides (9), human lactoferricin (4), and porcine NK2 (3), however, we found that LPS neutralization is accompanied with a high increase in endotoxin aggregation, leading to multilamellar structures (Fig. 6), as also shown by freeze-fracture EM (2). Freeze-fracture EM is more adequate than EM with negative staining, with the latter changing the morphology of LPS due to the change in water content, as demonstrated by Risco and co-workers (25). Also, differences in the LPS preparation used (Rosenfeld et al. used the LPS S form from *E. coli* O111:B4 [29]) cannot account for distinct aggregation properties, since the peptides investigated here are equally efficient at inhibiting the cytokine production induced by LPS from several rough and smooth bacterial strains (LPS Re, LPS Rc, and LPS Ra, all from *S. enterica* serovar Minnesota; LPS S form from *Salmonella abortusequi*; LPS S form from *E. coli* 08:K27; and LPS from *Chromobacterium violaceum*) (data not shown).

The decrease in LPS bioactivity with the increased size of LPS aggregates can be explained by the fact that the binding sites for mammalian proteins such as LBP, CD14, and others are hidden in multilamellar aggregates rather than in cubic aggregates. The change of LPS structure into a multilamellar structure induced by the peptides found here (Fig. 6), which has been shown to be connected with large increases in aggregate sizes (2), is a necessary prerequisite for LPS inactivation. In particular, the conversion of the lipid A aggregate into a multilamellar arrangement already at a [lipid A]/[Pep19-2.5] molar ratio of 7:1 shows that the degree of multilamellarization can be correlated directly with the inhibition property in the biological system. SAXS data with less-efficient peptides show that the lipid A aggregate structures are multilamellarized only at a much higher peptide concentration (data not shown).

A second factor is the high binding affinity of LPS to SALPs, which must be higher than that of the LBP-LPS binding. In Fig. 5, it becomes clear that there is an extremely strong Coulomb interaction between the positive charges of the peptide and the negative charges of LPS connected with an incorporation of the peptides into the LPS bilayer, with a saturation taking place already at a [Pep19-2.5]/[LPS] ratio of 3:10 M/M.

In recent years, LPS-neutralizing antimicrobial peptides have been in the focus of sepsis research (18–22, 28). In most cases, however, the applied excess concentration ratio of peptide to LPS, necessary for sufficiently high LPS inactivation, was in the range of 1,000, or even higher, thus being insuffi-

ciently selective for LPS with respect to cytotoxic effects against physiological mammalian cells.

The presented data are clearly indicative of the potential ability of the peptides to act as antiseptic therapeutics. Further experiments are in progress using a mouse model of sepsis caused by bacterial infection, i.e., one based on inoculation of Gram-negative bacterial cells rather than isolated LPS and testing the action of the peptides in the absence and presence of conventional antibiotics. Preliminary results show a significant increase of survival only when peptide Pep19-2.5 is administered in combination with an antibiotic (amikacin) (our unpublished data). Delayed addition of the peptide after LPS administration is also in the focus of our interest. Initial testing with the same model of endotoxemia used in the present report still shows a considerable increase in mouse survival when the peptide Pep19-2.5 was added intraperitoneally after 0.5 to 2 h of the LPS challenge. Furthermore, use of other animal models of sepsis such as cecal ligation and puncture is presently ongoing and give evidence that Pep19-2.5 alone is able to significantly increase mouse survival (our unpublished data). These data will be the focus of a follow-up study.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the German Ministry (Ministerium für Bildung und Forschung) BMBF for financial help in the frame of a preclinical study, "Therapy of Infectious Diseases with Special Regards to Bacterial Sepsis" (project 01GU0824). G.M.D.T. was funded by grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo (grant FIS-PI050768) and from the Proyectos de Investigación, Universidad de Navarra (grant PIUNA-2008-11), Spain. I.R.-O. is the recipient of a predoctoral fellowship from the Department of Education of Gobierno de Navarra (Spain).

REFERENCES

- Andrä, J., T. Gutschmann, P. Garidel, and K. Brandenburg. 2006. Mechanisms of endotoxin neutralization by synthetic cationic compounds. *J. Endotoxin Res.* **12**:261–277.
- Andrä, J., J. Howe, P. Garidel, M. Rossle, W. Richter, J. Leiva-Leon, I. Moriyon, R. Bartels, T. Gutschmann, and K. Brandenburg. 2007. Mechanism of interaction of optimized *Limulus*-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *Biochem. J.* **406**:297–307.
- Andrä, J., M. H. J. Koch, R. Bartels, and K. Brandenburg. 2004. Biophysical characterization of endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1593–1599.
- Andrä, J., K. Lohner, S. E. Blondelle, R. Jerala, I. Moriyon, M. H. Koch, P. Garidel, and K. Brandenburg. 2005. Enhancement of endotoxin neutralization by coupling of a C12-alkyl chain to a lactoferricin-derived peptide. *Biochem. J.* **385**:135–143.
- Bone, R. C. 1991. The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med.* **115**:457–469.
- Brandenburg, K., S. S. Funari, M. H. J. Koch, and U. Seydel. 1999. Investigation into the acyl chain packing of endotoxins and phospholipids under near physiological conditions by WAXS and FTIR spectroscopy. *J. Struct. Biol.* **128**:175–186.
- Brandenburg, K., M. H. J. Koch, and U. Seydel. 1990. Phase diagram of lipid A from *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli* rough mutant lipopolysaccharide. *J. Struct. Biol.* **105**:11–21.
- Brandenburg, K., and A. Wiese. 2004. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Curr. Top. Med. Chem.* **4**:1127–1146.
- Chen, X., J. Howe, J. Andrá, M. Rössle, W. Richter, A. P. da Silva, A. M. Krensky, C. Clayberger, and K. Brandenburg. 2007. Biophysical analysis of the interaction of granulysin-derived peptides with enterobacterial endotoxins. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**:2421–2431.
- Dankesreiter, S., A. Hoess, J. Schneider-Mergener, H. Wagner, and T. Mietke. 2000. Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF- α production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock. *J. Immunol.* **164**:4804–4811.
- Evans, M. E., and M. Pollack. 1993. Effect of antibiotic class and concentration on the release of lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **167**:1336–1343.

12. Galanos, C., M. A. Freudenberg, and W. Reutter. 1979. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:5939–5943.
13. Galanos, C., O. Lüderitz, and O. Westphal. 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* **9**:245–249.
14. Hirschfeld, M., Y. Ma, J. H. Weis, S. N. Vogel, and J. J. Weis. 2000. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **165**:618–622.
15. Jürgens, G., M. Müller, M. H. J. Koch, and K. Brandenburg. 2001. Interaction of hemoglobin with enterobacterial lipopolysaccharide and lipid A: physicochemical characterization and biological activity. *Eur. J. Biochem.* **268**:4233–4242.
16. Koch, M. H. J., and J. Bordas. 1983. X-ray diffraction and scattering on disordered systems using synchrotron radiation. *Nucl. Instrum. Methods* **208**:461–469.
17. Leong, D., R. Diaz, K. Milner, J. Rudbach, and J. B. Wilson. 1970. Some structural and biological properties of *Brucella* endotoxin. *Infect. Immun.* **1**:174–182.
18. Mookherjee, N., L. M. Rehaume, and R. E. Hancock. 2007. Cathelicidins and functional analogues as antiseptic molecules. *Expert Opin. Ther. Targets* **11**:993–1004.
19. Motzkus, D., S. Schulz-Maronde, A. Heitland, A. Schulz, W. G. Forssmann, M. Jubner, and E. Maronde. 2006. The novel beta-defensin DEFB123 prevents lipopolysaccharide-mediated effects in vitro and in vivo. *FASEB J.* **20**:1701–1702.
20. NCCLS/CLSI. 2007. Standards 7. NCCLS/CLSI, Wayne, PA.
21. Ohtani, Y., T. Irie, K. Uekama, K. Kukunaja, and J. Pitha. 1989. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **186**:17–22.
22. Okuda, D., S. Yomogida, H. Tamura, and I. Nagaoka. 2006. Determination of the antibacterial and lipopolysaccharide-neutralizing regions of guinea pig neutrophil cathelicidin peptide CAP11. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2602–2607.
23. Rietschel, E. T., H. Brade, O. Holst, L. Brade, S. Müller-Loennies, U. Mamat, U. Zähringer, F. Beckmann, U. Seydel, K. Brandenburg, A. J. Ulmer, T. Mattern, H. Heine, J. Schletter, S. Hauschildt, H. Loppnow, U. Schönbeck, H.-D. Flad, U. F. Schade, F. Di Padova, S. Kusumoto, and R. R. Schumann. 1996. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **216**:39–81.
24. Rietschel, E. T., H. W. Wollenweber, H. Brade, U. Zähringer, B. Lindner, U. Seydel, H. Bradaczek, G. Barnickel, H. Labischinski, and P. Giesbrecht. 1980. Structure and conformation of the lipid A component of lipopolysaccharides, p. 187–218. *In* E. T. Rietschel (ed.), *Handbook of endotoxin*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
25. Risco, C., J. L. Carrascosa, and M. A. Bosch. 1993. Visualization of lipopolysaccharide aggregates by freeze-fracture and negative staining. *J. Electron Microsc.* **42**:202–204.
26. Roessle, M., R. Klaering, U. Ristau, B. Robrahn, D. Jahn, T. Gehrman, P. Konarev, A. Round, S. Fiedler, C. Hermes, and D. Svergun. 2007. Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *J. Appl. Crystallogr.* **40**:190–194.
27. Rosenfeld, Y., N. Papo, and Y. Shai. 2006. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J. Biol. Chem.* **281**:1636–1643.
28. Rosenfeld, Y., H. G. Sahl, and Y. Shai. 2008. Parameters involved in antimicrobial and endotoxin detoxification activities of antimicrobial peptides. *Biochemistry* **47**:6468–6478.
29. Rosenfeld, Y., and Y. Shai. 2006. Lipopolysaccharide (endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**:1513–1522.
30. Sundaresan, R., and J. N. Sheagren. 1995. Current understanding and treatment of sepsis. *Infect. Med.* **12**:261–268, 274.
31. Tapping, R. I., and P. S. Tobias. 1997. Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *J. Biol. Chem.* **272**:23157–23164.

Physicochemical and Biological Characterization of Anti-Endotoxin Peptides and their Influence on Lipid Properties

Ina Kowalski¹, Yani Kaconis¹, Jörg Andrä¹, Iosu Razquin-Olazarán², Thomas Gutschmann², Guillermo Martinez de Tejada² and Klaus Brandenburg^{1,*}

¹Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, D-23845 Borstel, Germany;

²Universidad de Navarra, Dep. de Microbiología, 31008 Pamplona, Spain

Abstract: We have synthesized a series of short peptides (17 to 20 amino acids), originally derived from *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor LALF, which were primarily designed to act as antimicrobial agents as well as neutralizers of bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS). Here, two selected peptides, a 17- and a 19-mer, were characterized physicochemically and in biological test systems. The secondary structure of the peptides indicates essentially a β -sheet including antiparallel strands, the latter being reduced when the peptides bind to LPS. A very strong exothermic binding due to attractive Coulomb interactions governs the LPS-peptide reaction, which additionally leads to a fluidization of the acyl chains of LPS. A comparison of the interaction of the peptide with negatively charged phosphatidylserine shows in contrast a rigidification of the acyl chains of the lipid. Finally, the biological assays reveal a diverging behaviour of the two peptides, with higher antibacterial activity of the 17-mer, but a much higher activity of the 19-mer in its ability to inhibit the LPS-induced cytokine production in human mononuclear cells.

INTRODUCTION

In the last decade there was an increasing interest in the development of synthetic antimicrobial peptides (AMPs) for the fight against bacterial infections. This includes the ability of AMPs to kill whole bacteria [1] as well as to neutralize their isolated pathogenicity factors such as bacterial endotoxins (lipopolysaccharide, LPS) [2]. This dual potency, however, is not necessarily equally expressed, which should have to do with the different geometry of LPS in the outer membrane of Gram-negative bacteria, as planar monolayer, and as isolated aggregates, adopting a cubic aggregate structure for LPS from enterobacterial origin [3]. The latter LPS have been shown to trigger a wide immunological response based on release of various cell mediators such as interleukins and tumor-necrosis-factor- α when released from the bacteria [4]. At sufficiently high concentration of LPS, these proinflammatory compounds lead to an overwhelming self-poisoning reaction of the body, the septic shock syndrome.

In the last years, various groups have characterized and tested a variety of natural AMPs which in some cases showed also quite good LPS-neutralizing activity [2],[5-7].

One main approach of our group to construct AMPs was based on the amino acid sequence of LPS-binding proteins such as human lactoferrin [5], NK-lysin from pigs [8] and its human homologue granulysin [9], and the *Limulus*-anti-LPS factor (LALF) [10]. For the latter compound, the peptide

based on the complete LPS-binding domain in a cyclized form, cLALF22, was taken as template for constructing even better peptides, called anti-endotoxin peptides (AEP), which finally led to a library of peptides. From these, some selected AEPs were investigated to understand their binding mechanism with bacterial LPS as well as with phospholipids (phosphatidylserine) of eukaryotic origin. We observed a strong binding affinity of the AEP to LPS, explaining their antiseptic activity, but also a pronounced binding to negatively charged phospholipids.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of Anti-Endotoxin Peptides (AEP)

Peptides were synthesized with an amidated C-terminus by the solid-phase peptide synthesis technique in an automatic peptide synthesizer (model 433 A; 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. The peptidyl-resin was deprotected and cleaved with a mixture of 90 % trifluoroacetic acid (TFA), 5 % anisole, 2 % thioanisole, and 3 % dithiothreitol for 90 min at room temperature. After cleavage, the suspension was filtered through a syringe filter into ice-cold diethylether. The precipitated peptides were separated by centrifugation and repeatedly washed with cold ether. The final purification was done by RP-HPLC. Purity levels up to 98% were achieved using an Aqua-C18 column (Phenomenex) in combination with dedicated gradients of acetonitrile in 0.1 % TFA, checked by Maldi-TOF mass spectroscopy and RP-HPLC at 214 nm.

The amino acid sequences of the two investigated peptides (patent pending) are as follows

*Address correspondence to this author at the Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Parkallee 10, D-23845 Borstel, Germany; Tel: +4537-(0)188235; Fax: +4537-(0)188632; E-mail: kbranden@fz-borstel.de

Name	Sequence	Molecular weight
Pep17-1	KKFRRLKWKYKGKFWFW	2432
Pep19-2:	GCKKYRRFRWFKGKFWFWCG	2814

Lipids

L α -dimyristoylphosphatidylserine (DMPS) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) and used without further purification. Lipopolysaccharides (LPS) from rough mutant Re and Ra from *Salmonella minnesota* (strains R595 and R60, respectively) were extracted by the phenol/chloroform/petrol ether method [11] from bacteria grown at 37 °C, purified, and lyophilized. Results of all the standard assays performed on purified LPS (analysis of the amount of glucosamine, total and organic phosphate, and the distribution of the fatty acid residues) were in good agreement with the chemical properties expected for these LPS chemotypes [12]. Free lipid A was isolated from LPS R595 by acid hydrolysis as described [13].

Preparation of Lipid Aggregates

Phospholipids or LPS were solubilized in 20 mM HEPES buffer (lipid concentration 1 nM to 10 mM, depending on the applied technique), extensively vortexed, sonicated for 30 min in a water bath at 60 °C, and subjected to several temperature cycles between 20 and 60 °C. Finally, the lipid suspensions were incubated for at least 12 h at 4 °C before use.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Microcalorimetric experiments of peptide binding to LPS were performed on a MSC isothermal titration calorimeter (Microcal Inc., Northampton, MA, USA) at different temperatures as described previously [14]. Briefly, after thorough degassing of the samples, the peptide (1 mM in 20 mM HEPES, pH 7.0) was titrated to an LPS suspension (0.05 mM in 20 mM HEPES, pH 7.0). The enthalpy change during each injection was measured by determining the area underneath each injection peak (Origin software, Microcal), and plotted against the [peptide]:[LPS] molar ratio. Titration of the pure peptide into HEPES buffer resulted in a negligible endothermic reaction due to dilution, which was subtracted from the plotted curves. The experiments were done at least twice.

FTIR Spectroscopy

Infrared spectroscopic measurements were performed on an IFS-55 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany). Samples, dissolved in 20 mM HEPES buffer, pH 7.0, were placed in a CaF₂ cuvette with a 12.5 μ m teflon spacer in the case of phase transition measurements or were spread on a Ge attenuated reflection (ATR) plate for secondary structure analysis (see below). For phase transition measurements, temperature-scans were performed automatically between 10 and 70 °C with a heating-rate of 0.6 °C/min. Every 3 °C, 200 interferograms were accumulated, apodized, Fourier-transformed, and converted to absorbance spectra. The band parameters (peak position, band width, and intensity) can be evaluated from the original spectra, if necessary after subtraction of the strong water bands. For phase transition measurements, the symmetric stretching vibrational band of

the methylene groups ν_s (CH₂) in the range 2850 to 2853 cm⁻¹, for the determination of the secondary structure of the peptides, the amide I (mainly ν (C=O) stretching) band were evaluated.

Antibacterial Activity

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the peptides were determined by the broth microdilution test in Mueller-Hinton medium according to Clinical Laboratory Standards Institute guidelines as already described [15]. The MIC was defined as the lowest peptide concentration, at which no bacterial growth was measurable. [16].

Stimulation of Human Mononuclear Cells by LPS

Mononuclear cells (MNC) were isolated from heparinized blood of healthy donors as described previously [17]. The cells were resuspended in medium (RPMI 1640) and their number was equilibrated at 5x10⁶ cells/ml. For stimulation, 200 μ l MNC (1x10⁶ cells) were transferred into each well of a 96-well culture plate. LPS Ra (from *S. minnesota* strain R60) and the LPS:peptide mixtures were preincubated for 30 min at 37 °C, and added to the cultures at 20 μ l per well. The cultures were incubated for 4 h at 37 °C under 5 % CO₂. Supernatants were collected after centrifugation of the culture plates for 10 min at 400xg, and analyzed for TNF α by a Sandwich ELISA using a monoclonal antibody against TNF (clone 6b from Intex AG, Switzerland) as described earlier in detail [17].

RESULTS

Secondary Structures of AEP

The secondary structure of peptide Pep19-2 alone and in the presence of lipids can be determined with FTIR spectroscopy by analyzing the amide I vibrational band in the spectral range 1700 to 1600 cm⁻¹, resulting mainly from the stretching vibration of the C=O groups [18]. As shown in Fig. (1) pure Pep19-2 (top) has two band components at 1673 and 1627 cm⁻¹, which corresponds essentially to a β -sheet structure. The high intensity of the 1673 cm⁻¹ band is indicative that besides turns also intermolecular aggregation (antiparallel sheet) may exist. In the presence of LPS R595 (middle) and lipid A (bottom), the intensity of the higher wavenumber component clearly decreases, which is indicative that the binding of the peptide to the endotoxin structures leads to its refolding due to the strong attraction between the two components.

Binding of AEPs to LPS

The binding process of LPS R595 and Pep19-2 was nearer characterized by isothermal titration calorimetry Fig. (2) at three different temperatures 27 °C (top), 37 °C (middle), and 45 °C (bottom), by titrating the peptide every 5 min to the LPS dispersion. As can be seen in Fig. (2) (top), the titration at 27 °C leads at the first three titrations to a calorimetric exotherm (peaks downwards), which converts into an endothermic reaction during the next titrations finally running into saturation at [Pep19-2]:[LPS R595] = 0.5 M/M. The endothermic process disappears in the titrations at 37 °C (middle) and 45 °C (bottom), rather the exothermic proc-

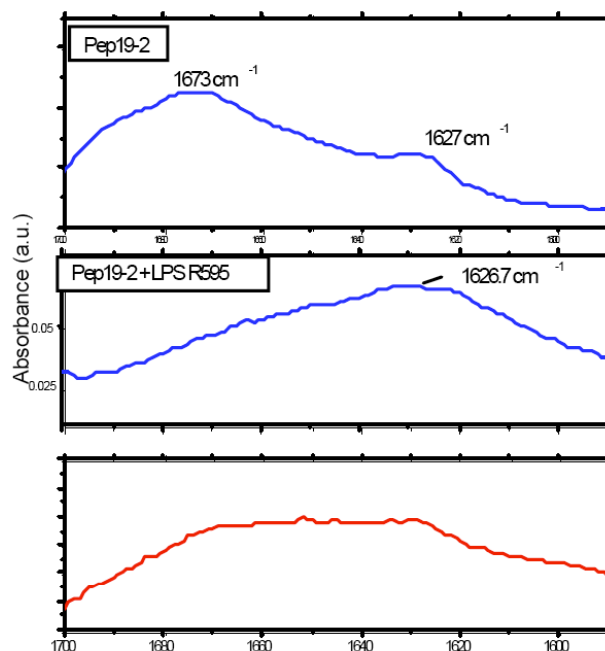


Fig. (1). Infrared spectra in the range 1700 - 1590 cm^{-1} of the amide I vibration (mainly C=O stretching vibration) of Pep19-2 alone (top) and in the presence of an equimolar content of LPS R595 (middle) and free lipid A (bottom).

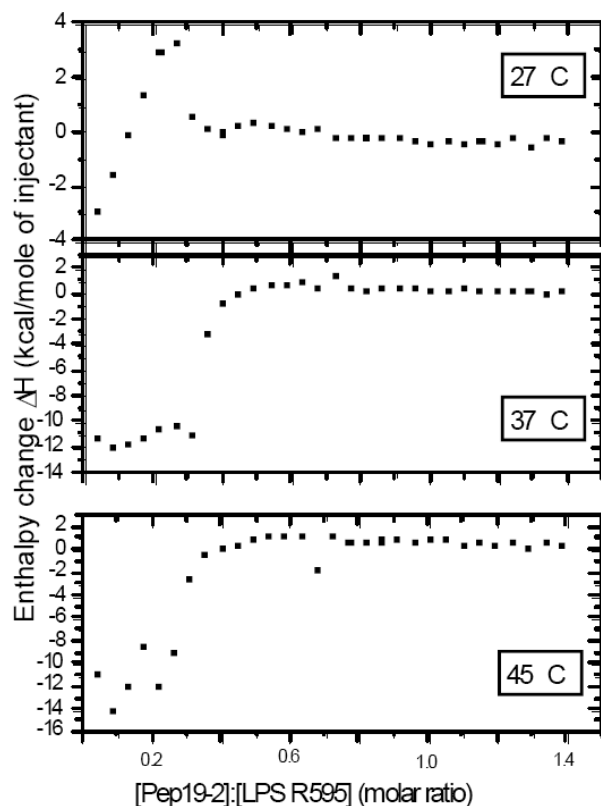


Fig. (2). Isothermal calorimetric titration of a 0.05 mM LPS dispersion with a 1 mM Pep19-2 solution at three temperatures 27 °C (top), 37 °C (middle), and 45 °C (bottom). For this, every 5 min 5 μl of the peptide was added to the LPS dispersion, and the resulting heat output was monitored. The titration of the peptide into pure buffer gave no significant signal.

esses become much more dominant, with maximum values of the enthalpy change ΔH of 12 (B) or even 14 (C) kcal/mole. At the same time, the titrations at the two temperatures exhibit 'classical' S-shaped saturation curves, with saturation values lying around $[\text{Pep19-2}]:[\text{LPS R595}] = 0.5$ M/M as found also above for the titration at 27 °C.

Influence of AEPs on the Phase Behaviour of LPS

The influence of peptides on the gel to liquid crystalline phase behaviour of LPS R595 was studied by evaluating the symmetric stretching vibrational band $\nu_s(\text{CH}_2)$ in the range 2850 to 2853 cm^{-1} Fig. (3). Besides Pep19-2, also a shortened analogue Pep17-1 was investigated. Both peptides slightly change the wavenumber values, both causing a small fluidization of LPS with a decrease of the phase transition temperature T_m . To test whether a similar change of the phase behaviour can also be observed for an LPS with longer sugar chain, the phase transition behaviour was monitored for LPS R60 Fig. (4). The figure clearly shows that there is a considerable increase in the wavenumber values in particular in the gel phase of the hydrocarbon chains, i.e., below T_m . For the highest peptide concentration, the phase transition of LPS R60 even disappears, for Pep17-1 as well as for Pep19-2.

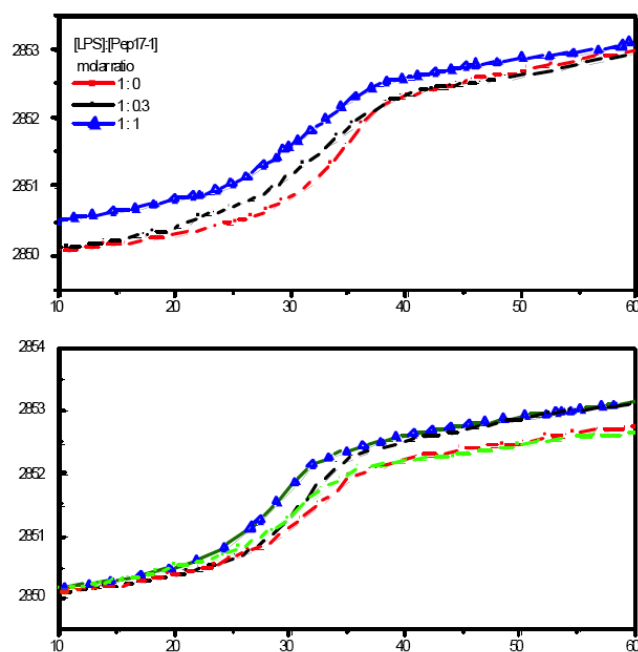


Fig. (3). Gel to crystalline phase transition behaviour of LPS R595 with different concentrations of Pep17-1 (A) and Pep19-2 (B) as monitored by the peak position of the symmetric stretching vibrational band of the methylene groups.

To test whether similar mechanisms take place not only for the negatively charged LPS from bacterial origin, but also for the negatively charged phospholipid phosphatidylserine (PS), which is characteristic for eukaryotic cells, the influence of Pep19-2 on the phase behaviour of the synthetic compound dimyristoyl-PS was studied Fig. (5). The data are clearly indicative of a quite different mechanism, as the wavenumbers strongly decrease which is characteristic for a strong rigidification of the lipid bilayers.

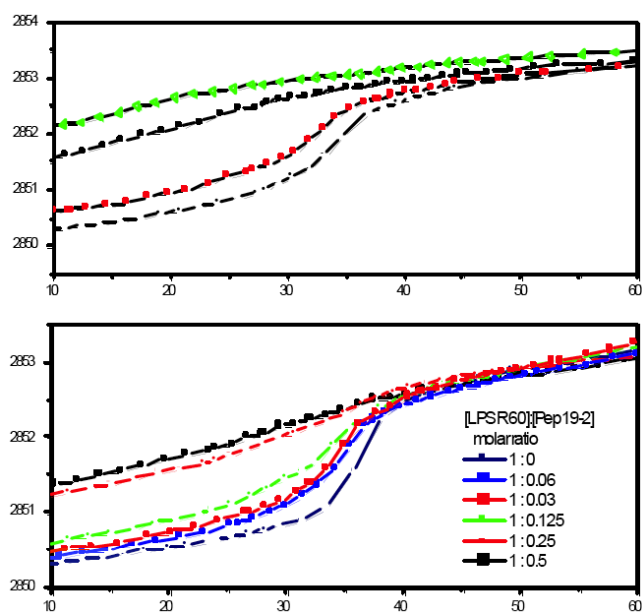


Fig. (4). Gel to crystalline phase transition behaviour of LPS R60 with different concentrations of Pep17-1 (A) and Pep19-2 (B) as monitored by the peak position of the symmetric stretching vibrational band of the methylene groups.

Antibacterial Activity of AEPs

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the two peptides was determined on strains of two Gram-negative pathogens, *Bordetella bronchiseptica* and *Escherichia coli*, and the Gram-positive *Staphylococcus aureus* strain. As shown in Table 1, the overall antibacterial activity of peptide Pep17-1 was significant, whereas the activity of Pep19-2 was rather weak.

Inhibition of LPS-Induced Cytokine Production

Finally, the ability of the two peptides Pep17-1 and Pep19-2 to inhibit the LPS-induced production of tumor-necrosis-factor- α (TNF α) in human mononuclear cells was monitored at three different LPS concentrations (100, 10, and 1 ng/ml) and two [peptide]:[LPS] ratios (10:1 and 100:1 weight%). As deduced from Fig. (6) there is a strong inhibition observed for Pep19-2 to inhibit the cytokine production, in particular at the highest peptide concentration, whereas this ability is much less expressed by Pep17-1.

DISCUSSION

In the current investigation, two selected compounds from a peptide library, originally based on the LPS-binding region of the *Limulus* anti-LPS-factor LALF [19], were stud-

ied with respect to their binding affinity to bacterial endotoxins and to the phospholipid DMPS. The analysis of the secondary structures Fig. (1) shows the existence of mainly β -sheet structures, also comprising intermolecular peptide aggregates. The expression of the latter decreases when LPS R595 or free lipid A are added, which apparently results from a refolding of the peptide, probably due to its intercalation into the hydrophobic part of the endotoxins. Such intercalation can actually be observed by applying fluorescence resonance energy transfer spectroscopy (data not shown), and is in accordance to previous data with cyclic peptides also based on the LPS-binding domain of LALF [2],[10].

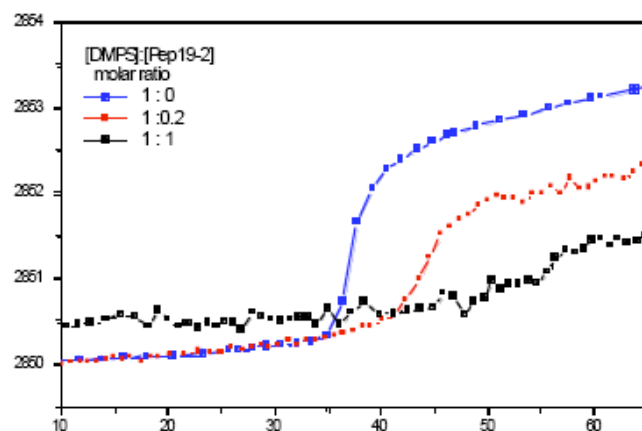


Fig. (5). Gel to crystalline phase transition behaviour of dimyristoylphosphatidylserine (DMPS) with different concentrations of Pep19-2 as monitored by the peak position of the symmetric stretching vibrational band of the methylene groups.

The evaluation of the ITC data Fig. (2) reveals a very high binding affinity of Pep19-2 to LPS R595, with a saturation at [Pep19-2]:[LPS] = 0.5, which corresponds to charge compensation, since 8 positively charged amino acids (K and R) of one peptide molecule are neutralized by 2 LPS molecules, each possessing 4 negative charges (phosphates and carboxylates). This is in accordance with observations previously published [20] for the LPS:polymyxin B (PMB) interaction, which also comes into saturation when the negative charges of LPS are saturated. An interesting finding is that at 27 °C the ITC data first exhibit also an endothermic reaction, which vanishes at 37 and 45 °C Fig. (2) middle, bottom). It has been previously shown that for the LPS:PMB binding two interaction mechanisms occur, one entropic and one enthalpic in nature [21]: The former one, an endothermic process, results from the destruction of the ordered water layer in the LPS backbone which is strongly expressed in the gel phase of LPS, i.e., below 30 to 35 °C (see Fig. (2)

Table 1 Minimum Inhibitory Concentration of Peptides Pep19-2 and Pep17-1 on Selected Bacterial Strains Expressed in μ g/ml

	<i>Bordetella bronchiseptica</i> CUN 11844-99	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Pep19-2	32	128	128
Pep17-1	4	32	16

whereas the latter, exothermic in nature, is due to the Coulomb attraction between the positive charges of the peptide and the negative ones of LPS, which becomes dominant at temperatures above T_m . As found for the LPS:PMB interaction, also here the driving force for the binding is the attraction between the different charges, on which the entropic term is superimposed.

The analysis of the gel to liquid crystalline phase behaviour of the hydrocarbon chains of LPS Figs. (3, 4) indicates a fluidizing effect of the peptides, which is, surprisingly, for both peptides only slightly expressed in the case of LPS R595, but strongly for LPS R60. This differs for PMB, which has been shown to lead for all LPS and lipid A preparations to strong fluidization in FTIR as well as in differential scanning calorimetric investigations [20, 21],[22]. From the comparison of the data for LPS R595 and LPS R60, one might deduce that the interaction of the peptide is much weaker for the former, which, however, can be ruled out from the ITC data in Fig. (2).

The interaction of Pep19-2 with DMPS, which is characteristic lipid from eukaryotic origin interestingly shows a behaviour being in clear contrast to that of LPS, namely a drastic rigidification of the lipid takes place rather than a fluidization Fig. (5). Since a similar Coulomb interaction between the peptide and DMPS should take place and also an intercalation of the peptide into the hydrophobic moiety, the reason for this remains unclear. It might be speculated that the different aggregate structures of LPS and DMPS play a role, the former having a cubic structure [3], whereas the latter should be (multi)lamellar [23]. When adding the peptide, the LPS aggregate should be converted into a multilamellar one as observed for various different AMPs [2, 24], while the DMPS is *a priori* multilamellar which does not change in the presence of the peptide.

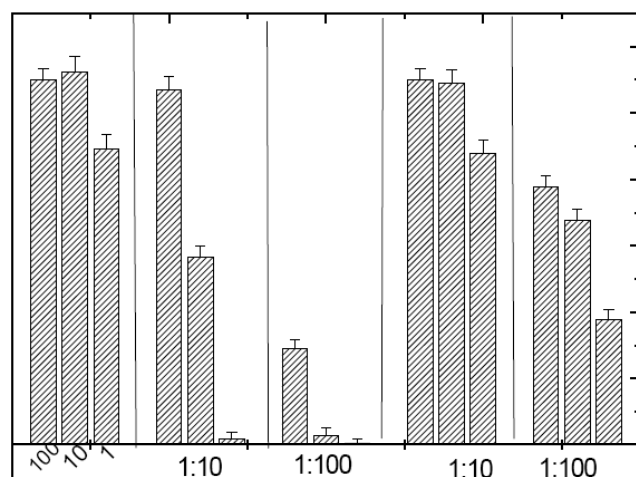


Fig. (6). Secretion of tumor-necrosis-factor- α in human mononuclear cells induced by LPS 60 alone at three different concentrations and in the presence of two concentrations of Pep17-1 and Pep19-2.

The data of the biological experiments shows that the ability to act antimicrobially or to inhibit the LPS-induced cytokine secretion is sensitively dependent on the peptide

structures. Both peptides have the same number of basic amino acids (8, R or K), the same number (7) of hydrophobic amino acids, and a similar distribution, but differ in the N- and C-terminal regions by the GC motif. This again emphasizes the importance of the exact amino acid sequence, which must fit with respect to their physicochemical behaviour and their length.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted the German ministry BMBF (project 01GU0824) for financial support. G.M.T. was funded by Proyectos de Investigación Universidad de Navarra (PIUNA-2008-11) Spain. I.R.O. was granted a predoctoral fellowship from the Department of Education of Gobierno de Navarra (Spain). J.A. was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, project AN 301/5-1.

ABBREVIATIONS

LPS = Lipopolysaccharide,
LALF = *Limulus* anti-LPS factor
AEP = Anti-endotoxin peptides

REFERENCES

- [1] Ganz, T.; Lehrer R.I. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.*, **1998**, *10*, 41-44.
- [2] Andrä, J.; Lamata, M.; Martinez deTejada, G.; Bartels R.; Koch, M.H.J.; Brandenburg, K. Cyclic antimicrobial peptides based on *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor for neutralization of lipopolysaccharide. *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, *68*, 1297-1307.
- [3] Brandenburg, K.; Wiese, A. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2004**, *4*, 1127-1146.
- [4] Rietschel, E.T.; Brade, H.; Holst, O.; Brade, L.; Müller-Loennies, S.; Mamat, U.; Zähringer, U.; Beckmann, F.; Seydel, U.; Brandenburg, K.; Ulmer, A.J.; Mattern, T.; Heine, H.; Schletter, J.; Hauschildt, S.; Loppnow, H.; Schönbeck, U.; Flad, H.-D.; Schade, U.F.; Di Padova, F.; Kusumoto, S.; Schumann, R.R. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **1996**, *216*, 39-81.
- [5] Andrä, J.; Lohner, K.; Blondelle, S.E.; Jerala, R.; Moriyon, I.; Koch, M.H.; Garidel, P.; Brandenburg, K. Enhancement of endotoxin neutralization by coupling of a C12-alkyl chain to a lactoferricin-derived peptide. *Biochem. J.*, **2005**, *385*, 135-143.
- [6] Bosshart, H.; Heinzelmann, M. Human neutrophil-derived CAP37 inhibits lipopolysaccharide-induced activation in murine peritoneal macrophages. *Immunol. Lett.*, **2004**, *94*, 175-182.
- [7] Rosenfeld, Y.; Sahl, H.G.; Shai, Y. Parameters involved in antimicrobial and endotoxin detoxification activities of antimicrobial peptides. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 6468-6478.
- [8] Andrä, J.; Monreal, D.; Martinez deTejada, G.; Olak, C.; Brezesinski, G.; Gomez, S.S.; Goldmann, T.; Bartels, R.; Brandenburg, K.; Moriyon, I. Rationale for the design of shortened derivatives of the NK-lysin-derived antimicrobial peptide NK-2 with improved activity against Gram-negative pathogens. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 14719-14728.
- [9] Chen, X.; Howe, J.; Andrä, J.; Rössle, M.; Richter, W.; da Silva, A.P.; Krensky, A.M.; Clayberger, C.; Brandenburg, K. Biophysical analysis of the interaction of granulysin-derived peptides with enterobacterial endotoxins. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1768*, 2421-2431.
- [10] Andrä, J.; Howe, J.; Garidel, P.; Rössle, M.; Richter, W.; Leiva-Leon, J.; Moriyon, I.; Bartels, R.; Gutsmann, T.; Brandenburg, K. Mechanism of interaction of optimized *Limulus*-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *Biochem. J.*, **2007**, *406*, 297-307.

- [11] Galanos, C.; Lüderitz, O.; Westphal, O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.*, 1969, **9**, 245-249.
- [12] Rietschel, E.Th.; Brade, L.; Lindner, B.; Zähringer, U., In *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*, Vol. I: *Molecular Biochemistry and Cellular Biology*, Morrison and Ryan. Eds. CRC Press: Boca Raton, 1992; pp. 3-41
- [13] Zähringer, U.; Salvetzki, R.; Ulmer, A.J.; Rietschel, E.Th. Isolation, chemical analysis and biological investigations of natural lipid A and lipid A-antagonists. *J. Endotoxin Res.*, 1996, **3** (Suppl. 1), pp. 33-33.
- [14] Nakamura, T.; Tokunaga, F.; Morita, T.; Iwanaga, S. Interaction between lipopolysaccharide and intracellular serine protease zymogen, factor C, from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes. *J. Biochem.*, 1988, **103**, 370-374.
- [15] Sanchez-Gomez, S.; Lamata, M.; Leiva, J.; Blondelle, S.E.; Jerala, R.; Andrä, J.; Brandenburg, K.; Lohner, K.; Moriyon, I.; Martinez-de-Tejada, G. Comparative analysis of selected methods for the assessment of antimicrobial and membrane-permeabilizing activity: a case study for lactoferricin derived peptides. *BMC Microbiol.*, 2008, **8**, 196
- [16] National Committee for Clinical Laboratory Standard (2003) Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Sixth edition. M7-A6. 2010.
- [17] Brandenburg, K.; Jürgens, G.; Andrä, J.; Lindner, B.; Koch, M.H.J.; Blume, A.; Garidel, P. Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur. J. Biochem.*, 2002, **269**, 5972-5981.
- [18] Brandenburg, K.; Seydel, U., In *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Volume 5*, Chalmers and Griffiths. Eds. Wiley and Sons; Chichester 2002; pp. 3481-3507
- [19] Andrä, J.; Garidel, P.; Majerle, A.; Jerala, R.; Ridge, R.; Paus, E.; Novitsky, T.; Koch, M.H.J.; Brandenburg, K. Biophysical characterization of the interaction of *Limulus* polyphemus endotoxin neutralizing protein with lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 2004, **271**, 2037-2046.
- [20] Brandenburg, K.; Moriyon, I.; Arraiza, M.D.; Lehwerk-Yvetot, G.; Koch, M.H.J.; Seydel, U. Biophysical investigations into the interaction of lipopolysaccharide with polymyxins. *Thermochim. Acta*, 2002, **382**, 189-198.
- [21] Brandenburg, K.; David, A.; Howe, J.; Koch, M.H.; Andrä, J.; Garidel, P. Temperature dependence of the binding of endotoxins to the polycationic peptides polymyxin B and its nonapeptide. *Biophys. J.*, 2005, **88**, 1845-1858.
- [22] Brandenburg, K.; Arraiza, M.D.; Lehwerk-Yvetot, G.; Moriyon, I.; Zähringer, U. The interaction of rough and smooth form lipopolysaccharides with polymyxins as studied by titration calorimetry. *Thermochim. Acta*, 2002, **394**, 53-61.
- [23] Silvius, J.R. Thermotropic phase transitions of pure lipid in model membranes and their modification by membrane proteins. *Lipid-protein Interact.*, 1982, **2**, 239-281.
- [24] Andrä, J.; Koch, M.H.J.; Bartels, R.; Brandenburg, K. Biophysical characterization of endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 1593-1599.
- [25] Brandenburg, K.; Garidel, P.; Fukuoka, S.; Howe, J.; Koch, M.H.J.; Gutschmann, T.; Andrä, J. Molecular basis for endotoxin neutralization by amphiphatic peptides derived from the α -helical cationic core-region of NK-lysin. *Biophys. Chem.*, 2010, (in press)

Biophysical Mechanisms of Endotoxin Neutralization by Cationic Amphiphilic Peptides

Yani Kaconis,[†] Ina Kowalski,[†] Jörg Howe,[†] Annemarie Brauser,[†] Walter Richter,[‡] Iosu Razquin-Olazarán,[§] Melania Iñigo-Pestaña,[§] Patrick Garidel,^{¶||} Manfred Rössle,^{**} Guillermo Martinez de Tejada,[§] Thomas Gutschmann,[†] and Klaus Brandenburg^{†*}

[†]Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, Borstel, Germany; [‡]Elektronenmikroskopisches Zentrum, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany; [§]Department of Microbiology, University of Navarra, Pamplona, Spain; [¶]Physikalische Chemie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Halle, Germany; ^{||}University of Kaiserslautern, Institut für Physikalische Chemie, Kaiserslautern, Germany; and ^{**}European Molecular Biology Laboratory, Outstation Hamburg, Hamburg, Germany

ABSTRACT Bacterial endotoxins (lipopolysaccharides (LPS)) are strong elicitors of the human immune system by interacting with serum and membrane proteins such as lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 with high specificity. At LPS concentrations as low as 0.3 ng/ml, such interactions may lead to severe pathophysiological effects, including sepsis and septic shock. One approach to inhibit an uncontrolled inflammatory reaction is the use of appropriate polycationic and amphiphilic antimicrobial peptides, here called synthetic anti-LPS peptides (SALPs). We designed various SALP structures and investigated their ability to inhibit LPS-induced cytokine secretion *in vitro*, their protective effect in a mouse model of sepsis, and their cytotoxicity in physiological human cells. Using a variety of biophysical techniques, we investigated selected SALPs with considerable differences in their biological responses to characterize and understand the mechanism of LPS inactivation by SALPs. Our investigations show that neutralization of LPS by peptides is associated with a fluidization of the LPS acyl chains, a strong exothermic Coulomb interaction between the two compounds, and a drastic change of the LPS aggregate type from cubic into multilamellar, with an increase in the aggregate sizes, inhibiting the binding of LBP and other mammalian proteins to the endotoxin. At the same time, peptide binding to phospholipids of human origin (e.g., phosphatidylcholine) does not cause essential structural changes, such as changes in membrane fluidity and bilayer structure. The absence of cytotoxicity is explained by the high specificity of the interaction of the peptides with LPS.

INTRODUCTION

Bacteria and their pathogenicity factors pose a severe health problem worldwide because of the increasing occurrence of resistance as well as the demographic development of populations, which is leading to higher numbers of immunocompromised people and thus a greater incidence of severe infections, such as septic shock (1). Despite the availability of powerful antibiotics, life-threatening bacterial infections are still a major cause of death due to the inability of the applied therapeutics to not only kill the bacteria but also to neutralize their pathogenicity factors, such as endotoxins (lipopolysaccharides (LPSs)) and lipoproteins (LPs), two of the main toxins of Gram-negative and -positive bacteria, respectively (2). Furthermore, severe septic diseases are a very frequent complication of primary viral infections such as the Spanish flu and the recent swine flu of the H1N1 serotype (3). Consequently, most lethal cases result from the bacterial rather than the viral infection.

Clearly, there is a pressing need for new antimicrobial drugs that can neutralize bacterial products such as LPS and LP. A promising strategy is the use of antimicrobial peptides (AMPs), originally based on LPS-binding domains of defense proteins such as lactoferrin (4), NK-lysin (5), and *Limulus* anti-LPS factor (6). Treatments based on the use of such peptides

have been successfully used in animal models of endotoxin-induced septic shock (7). However, no breakthrough regarding the development of a therapeutic commercialized drug has been made, mainly due to the high therapeutic concentrations of AMPs needed to neutralize endotoxins effectively, which inevitably causes severe side effects (8).

To circumvent these restrictions, we developed what we believe is a novel strategy by synthesizing a new class of peptides, called synthetic anti-LPS peptides (SALPs), which are designed to strongly bind to the lipid A part of LPS. The binding constants of these compounds exceed those of mammalian LPS-binding proteins such as lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14. The design of this peptide class was based on previously published details regarding the conformation and physicochemical characteristics of lipid A and LPS (9). In this way, we constructed amphiphilic cationic SALPs with lengths optimized for LPS neutralization, i.e., with a number of amino acid (AA) residues ranging from 19 to 23 (10). In a mouse model of lethal sepsis, these peptides were able to neutralize bacterial endotoxins even at very low concentrations and protect the animals considerably from endotoxic shock. At the same time, their toxicity levels for mammalian cells were far higher than the concentrations used in human therapeutics.

To further investigate these favorable properties, we performed a comprehensive biophysical study of peptide binding to endotoxin to elucidate the mode of action, in

Submitted January 15, 2011, and accepted for publication April 6, 2011.

*Correspondence: kbranden@fz-borstel.de

Editor: Heiko H. Heerklotz.

© 2011 by the Biophysical Society
0006-3495/11/06/0001/10 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2011.04.041

particular the extreme selectivity for endotoxin necessary to avoid detrimental side effects in human cells. The results we obtained using a variety of techniques are indicative of unique interaction mechanisms, which are discussed further below in the light of literature data.

MATERIALS AND METHODS

Lipids

LPS from the rough mutant Ra from *Salmonella minnesota* (strain R60) was extracted by the phenol/chloroform/petrol ether method from bacteria grown at 37°C, purified, and lyophilized (11). The results obtained by standard assays on the purified LPS (i.e., analyses of the amount of glucosamine, total and organic phosphate, and distribution of the fatty acid residues) were in good agreement with the chemical properties expected for the LPS chemotypes, whose molecular structure has already been solved. S-form LPS from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 for mouse testing was obtained from the aqueous phase of a water-phenol extract and purified by treatment with chaotropic agents and detergents according to published procedures (12). Cholesterol and the phospholipids phosphatidylcholine (PC) from egg yolk, dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), and sphingomyelin (SM, 18:1) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

Preparation of LPS or phospholipid aggregates

The LPS and phospholipids were solubilized in the appropriate buffer (lipid concentrations between 1 nM and 10 mM, depending on the applied technique), extensively vortexed, sonicated for 30 min in a water bath, and subjected to several temperature cycles between 20°C and 60°C. Finally, the lipid suspension was incubated at 4°C for at least 12 h before use.

Fourier-transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry

The measurements of the gel-to-liquid crystalline phase transitions of the acyl chains of LPS are described in the [Supporting Material](#) (13–16).

Isothermal titration calorimetry

Microcalorimetric measurements of peptide binding to endotoxins were performed on a MCS isothermal titration calorimeter (Microcal, Freiburg, Germany) at 37°C as previously described (17). LPS R60 (0.05 mM, prepared as described above) were dispensed into the microcalorimetric cell (volume: 1.3 ml), and the peptide solutions (2 mM) were loaded into the syringe compartment (volume: 100 μ l). After temperature equilibration, the peptides were titrated in 3 μ l portions every 5 min into the lipid-containing cell under constant stirring, and the heat of interaction after each injection measured by the isothermal titration calorimetry (ITC) instrument was plotted versus time. The binding constant of the LPS-peptide interaction was determined by fitting the binding curve with a sigmoidal function and applying common thermodynamic analysis, i.e., using $\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S$ (where ΔG is the Gibbs energy, T is the temperature, ΔS is the entropy change, and ΔH is the measured enthalpy change). Furthermore, the binding constant k_b can be taken from $\Delta G = -R \times T \times \ln k_b$, where R = gas constant. It should be noted that k_b is the reciprocal of the equilibrium dissociation constant k_d ($k_b = 1/k_d$).

X-ray diffraction

X-ray diffraction measurements of LPS R60 peptide mixtures were performed at the European Molecular Biology Laboratory outstation at the Hamburg

synchrotron radiation facility (HASYLAB) using the double-focusing monochromator-mirror camera X33 (18). Diffraction patterns in the range of the scattering vector $0.01 < s < 0.0$ nm⁻¹ ($s = 2 \sin \theta/\lambda$, 2θ scattering angle, and wavelength $\lambda = 0.15$ nm) were recorded at 20°C, 40°C, and 60°C with exposure times of 1 min using an image plate detector with online readout (MAR345; MarResearch, Norderstedt/Germany) (19). The s axis was calibrated with Ag-Behenate, which has a periodicity of 5.84 nm. We evaluated the diffraction patterns as described previously (20) by assigning the spacing ratios of the main scattering maxima to defined three-dimensional structures. For this study, the lamellar and cubic structures were the most relevant.

Freeze-fracture electron microscopy

For freeze-fracturing, LPS and the LPS/peptide samples, copper sandwich profiles, and instruments for manipulation were incubated at room temperature or at 40°C. A small amount of the sample was sandwiched between two copper profiles as used for the double-replica technique and frozen by plunging the sandwiches immediately into liquified ethane/propane-mixture cooled in liquid nitrogen. Fracturing and replication were performed at -150°C in a BAF 400T freeze-fracture device (BAL-TEC, Liechtenstein) equipped with electron guns and a film sheet thickness monitor. In a first step 2 nm of Pt(C) were evaporated under an angle of 35°, followed by perpendicular evaporation of C for a second replica layer of 20 nm thickness. The replicas were placed on copper grids, cleaned with a chloroform-methanol mixture, and examined in an EM 901 electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy

The ability of the peptides to intercalate into phospholipid liposomes or LPS R60 aggregates, as investigated by fluorescence resonance energy transfer (FRET), is described in the [Supporting Material](#).

Determination of the ζ -potential

We used a Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Hertsching, Germany) to determine the ζ -potentials of endotoxin aggregates from the electrophoretic mobility by laser-Doppler anemometry at a scattering angle of 90° as described previously (21). The ζ -potential was calculated according to the Helmholtz-Smoluchowski equation from the mobility of the aggregates in a driving electric field of 19.2 Vcm⁻¹. LPS aggregates (0.05 mM) and peptide stock solutions (1 mM) were prepared in 20 mM Hepes, which yielded the most reproducible results.

Stimulation of human mononuclear cells by LPS

Mononuclear cells (MNCs) were isolated from heparinized blood of healthy donors as described previously (10). The cells were resuspended in medium (RPMI 1640) and their number was equilibrated at 5×10^6 cells/ml. For stimulation, 200 μ l MNC (1×10^6 cells) were transferred into each well of a 96-well culture plate. LPS Ra and LPS/peptide mixtures were preincubated for 30 min at 37°C, and then added to the cultures at 20 μ l per well. The cultures were incubated for 4 h at 37°C under 5% CO₂. Supernatants were collected after centrifugation of the culture plates for 10 min at $400 \times g$ and stored at -20°C until immunological determination of tumor necrosis factor α (TNF α), carried out in a Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody against TNF (clone 6b; Intex AG, Switzerland).

Animal model of endotoxicity

LPSs from *P. aeruginosa* PAO1 or *S. minnesota* R60 (see above for details of preparation) were used to induce endotoxic shock.

Female C57/BL6 mice (6 weeks old, 14–16 g) were purchased from Harlan Spain (Harlan Interfauna Iberica S.A., Barcelona, Spain) and randomly distributed in experimental groups ($n = 8$). Endotoxic shock was induced in the animals by co-inoculation of LPS and galactosamine following the method of Galanos et al. (22).

Specifically, each animal received an intraperitoneal injection containing a mixture of 25 ng of LPS of *S. minnesota* R60 (150 ng in the case of the less-endotoxic LPS of *P. aeruginosa* PA01) and 18 mg of galactosamine resuspended in 200 μ l of endotoxin-free saline. Immediately after LPS administration, the animals were inoculated at a different site of the peritoneum, with the test peptide resuspended in 150 μ l of pyrogen-free saline at a LPS/peptide ratio of 1:500. To facilitate the therapeutic action of the peptide, the mice were gently massaged at the site of inoculation for a few seconds. Animal mortality was monitored at least every 24 h for 7 days.

In each independent experiment, a group of animals received a dose of polymyxin B (PMB) identical to that used for the peptide, whereas another group was left untreated.

Results regarding animal mortality at all experimental time points 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. The p -values were obtained by comparing data from the same experiment (i.e., mortality in the treated versus the untreated group). All of the animal protocols used in this study were approved by the Animal Research Committee of the University of Navarra (protocol No. 069-09).

Cytotoxicity

The techniques used to detect cytotoxic effects are described in the Supporting Material.

RESULTS

In a first step, the effectivity of selected peptides (amino acid sequence; see Table 1) to neutralize endotoxin in vitro and in a mouse model of sepsis is described.

Inhibition of the LPS-induced stimulation of cytokines in MNCs

We investigated the ability of LPS to induce TNF α secretion in human MNCs at 100, 10, and 1 ng/ml LPS concentrations, and the results show a high cytokine production with a slight decrease at the lowest LPS concentration (Fig. 1 A). In all cases, the addition of the peptides Pep19-2.5, Pep19-2.5KO, Pep19-4, and Pep19-8 leads to a decreased secretion of TNF α , but at completely different concentrations. Pep19-2.5 inhibits cytokine production at an extremely low concentration, whereas at the lowest LPS

concentration (1 ng/ml), there is almost no measurable TNF α secretion. Of interest, for Pep19-2.5KO, which has the same amino acids as Pep19-2.5 but in a random sequence, there is still effective inhibition at a [Pep]/[LPS] 100:1 excess concentration ratio. The other two compounds also differ in their ability to neutralize LPS; in particular, compound Pep19-8 has only a weak cytokine inhibitory ability, and a strong excess on a weight scale (100:1) is necessary to induce some inhibition (Fig. 1 B, right-hand bars).

Animal model of endotoxicity

To ascertain whether three selected peptides (Pep19-2.5, Pep19-4, and Pep19-8) could neutralize LPS in vivo, we used a mouse model of acute septic shock and measured the ability of the compounds to increase animal survival (Fig. 2, A and B). To induce septic shock, we first used LPS from *P. aeruginosa*, whose endotoxic activity is known

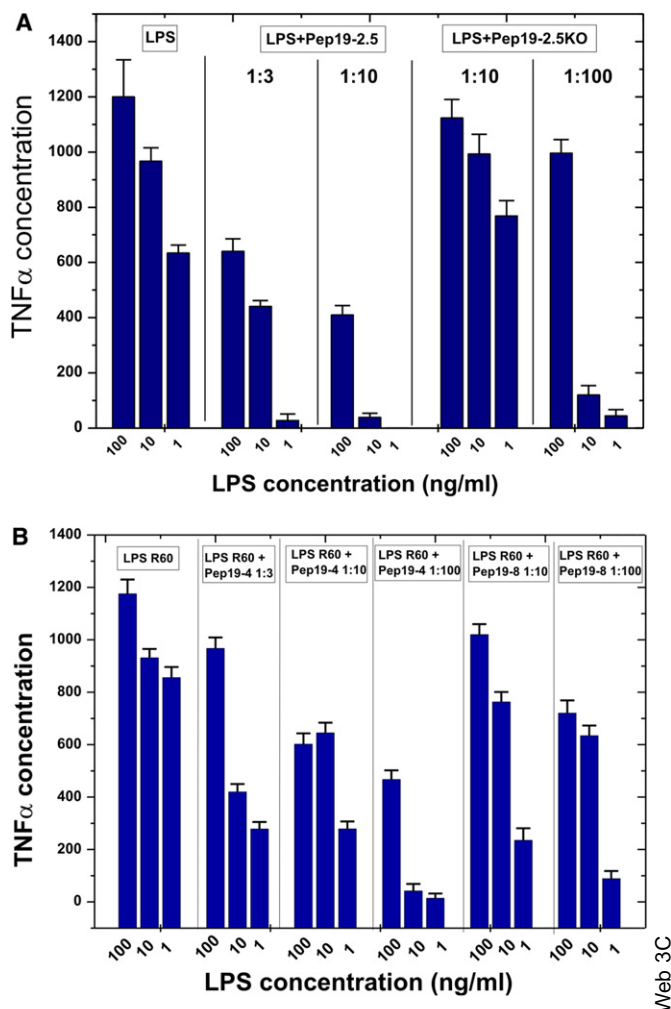


FIGURE 1 Inhibition of the LPS-induced inflammation reaction in vitro. LPS R60-induced production of TNF α of human MNCs and inhibition by Pep19-2.5 and Pep19-2.5KO (A), and Pep19-4 and Pep19-8 (B) at different weight ratios.

TABLE 1 Sequences and molecular weights of the investigated peptides

Peptide	Sequence	Molecular Weight
Pep19-2.5	GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG	2711
Pep19-2.5KO	KfGKwRfGKYRfCwKfRGwK	2711
Pep19-4	GKKYRRfRwKFKGK wfwfG	2750
Pep19-8	GRRYKKfRwKFKGRwfwfG	2636

AA identification: Bold corresponds to basic, lower case to hydrophobic, and italic to polar character.

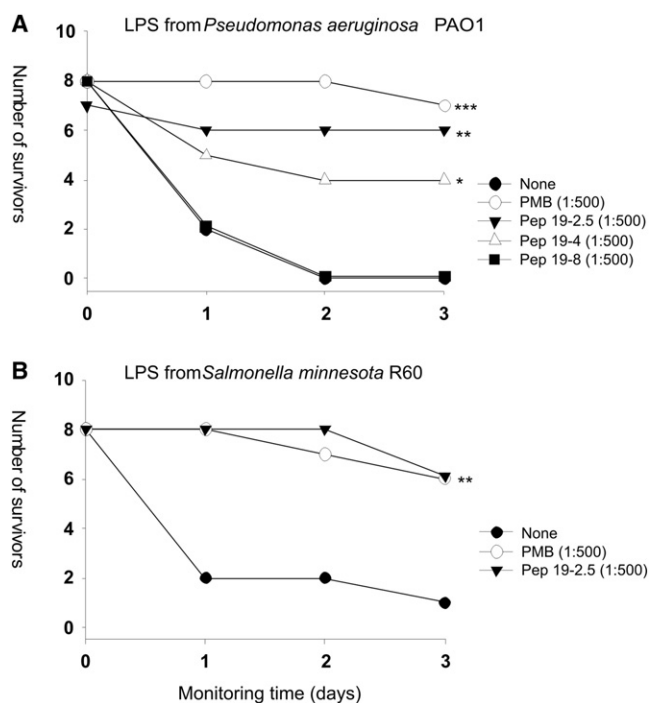


FIGURE 2 Protection against lethal septic shock caused by injection of LPS. On day 0, a group of C57/BL6 mice ($n = \leq 7$) were inoculated intraperitoneally with a mixture of 18 mg of galactosamine and either (A) 150 ng of LPS from *P. aeruginosa* PAO1 or (B) 25 ng of LPS from *S. minnesota* R60. Immediately afterward, the animals received at a different site of the peritoneum either 150 μg (A) or 12.5 μg (B) of the test peptide. Duplicate groups of LPS-challenged animals received an amount of PMB identical to that of the peptide or were left untreated. Animal mortality was monitored at daily intervals for 3 days. Statistical differences were analyzed by means of the Kaplan-Meier survival test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$).

to be lower than that of *Salmonella* (see [Materials and Methods](#)). As shown in [Fig. 2 A](#), whereas Pep19-2.5 protected the animals very efficiently, Pep19-8 showed no anti-endotoxic activity in this model. Of interest, Pep19-4, which displayed an intermediate level of inhibitory activity in the cytokine assay ([Fig. 1 A](#)), showed an antiendotoxic activity halfway between those of Pep19-2.5 and Pep19-8.

To determine whether the peptides could neutralize an LPS of enhanced endotoxicity, we used LPS from *S. enterica* serovar Minnesota R60 and tested the most potent compound, Pep19-2.5, in the same animal model. As shown in [Fig. 2 B](#), administration of Pep19-2.5 conferred a high level of protection, which was indistinguishable from that of PMB.

Below, we characterize the physical parameters that are prerequisites for effective LPS neutralization by the peptides.

Aggregate structure of LPS

The biologically active aggregate structure of LPS was previously shown to have three-dimensional cubic symmetry (23).

To determine the aggregate structure of LPS R60 in the presence of the peptides Pep19-2.5, Pep19-2.5KO, and Pep19-8, we applied synchrotron radiation small-angle x-ray scattering (SAXS). The scattering patterns presented in [Fig. 3](#) for [LPS]/[peptide] 3:1 molar ratios for Pep19-2.5 show (A) two strong reflections corresponding to the bilayer repeat and the second order, according to previous data for LPS R60 (18). These are even more intensely expressed at 60°C with the appearance of the third and fourth order ([Fig. 3, bottom](#)). In contrast, the data for Pep19-2.5 KO ([Fig. 3 B, middle](#)) and Pep19-8 ([Fig. 3 B, bottom](#)) are not indicative of a multilamellar structure; rather, they show that a different cubic or mixed aggregate structure is adopted. (For example, the scattering maxima shown in [Fig. 5 B, bottom](#), could be assigned to $8.85 \text{ nm} = a_Q/\sqrt{2}$, $5.52 \text{ nm} = a_Q/\sqrt{5}$, and $4.54 \text{ nm} = a_Q/\sqrt{8}$ of a cubic periodicity $a_Q = 12.5 \pm 0.3 \text{ nm}$.) However, the number of reflections is too low to obtain an unequivocal assignment. For example, we completely exclude the possibility that the reflections in the diagram in [Fig. 3 B \(bottom\)](#) correspond to the two orders of two lamellar spacings. In each case, the most important information is that the ability of the peptide to inhibit the cytokine protection in both *in vitro* and *in vivo* assays ([Figs. 1 and 2](#)) directly corresponds to its ability to convert LPS into a multilamellar aggregate. Thus, further measurements show that the conversion of the basic cubic aggregate structure of LPS R60 into a multilamellar form takes place for Pep19-2.5KO and Pep19-8 at a much higher peptide concentration, i.e., at a molar excess of the peptide (data not shown).

The morphologies of the pure LPS samples and the mixtures with peptide Pep19-2.5 investigated with freeze-fracture electron microscopy are shown in [Fig. 4](#). LPS alone exhibits ribbon-like structures with lengths up to a few hundred μm (see *inset*), thicknesses of 14–20 nm, and variable widths (A). In the presence of LPS (B), these separated structures change completely into large and densely packed multilamellar aggregates, with many multilamellar stackings corresponding to the multiple lamellae found in the x-ray experiment.

Neutralization of the LPS headgroup charges

We next sought to investigate the ability of a given peptide to neutralize the negative surface charges of an LPS sample. To that end, we applied isothermal titration calorimetry (ITC) and electrophoretic mobility determination to determine the ζ -potential. ITC has been shown to be a sensitive and direct means of determining the strength of a binding complex (13). The ITC data for the three selected peptides are given in [Fig. 5 A](#). All single titrations (for example, representation of the power versus time in the diagram at the top of the figure) indicate negative values corresponding to a strong exotherm of the binding of the peptides to LPS, which disappear at different concentrations for the three peptides. The presentation of the integrals of these exotherms (diagrams

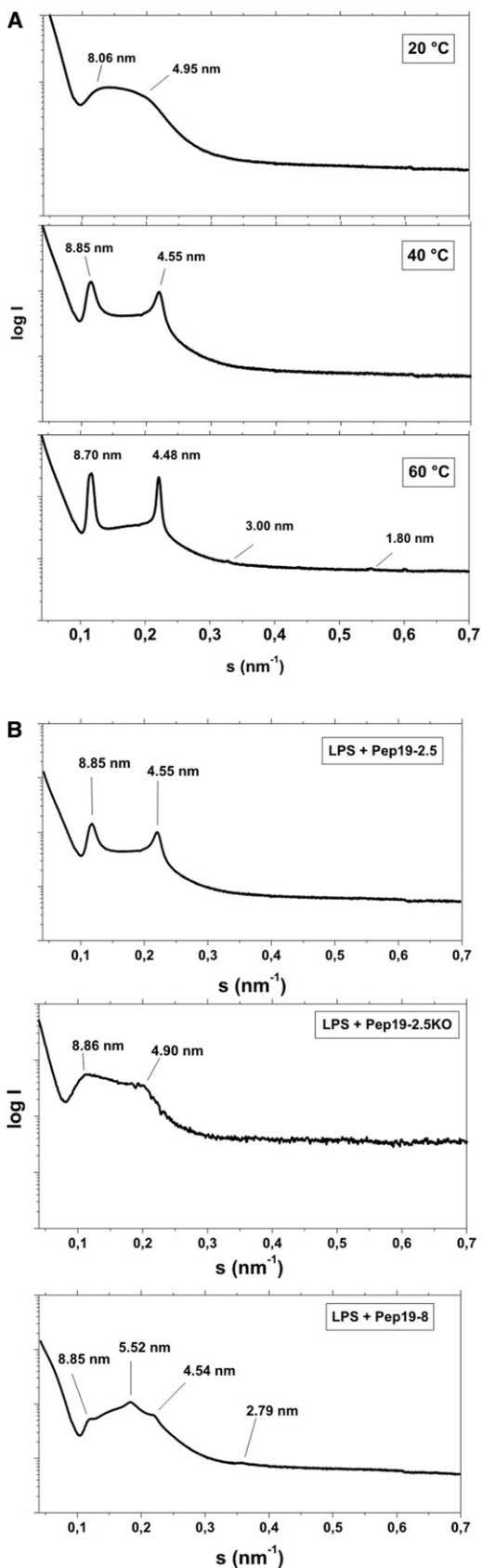


FIGURE 3 Supramolecular aggregate structure of LPS. SAXS was performed using synchrotron radiation of LPS R60 in the presence of Pep19-2.5 at (A) three temperatures and (B) at 40°C in the presence of Pep19-2.5 (top), Pep19-2.5KO (middle), or Pep19-8 (bottom). All samples were prepared at [LPS]/[Pep] 3:1 weight %. The logarithm of the scattering intensity $\log I$ is plotted versus the scattering vector s ($= 1/d$, d = lattice spacings).

at the bottom of the figure) shows a transition into binding saturation at different peptide/LPS ratios. Whereas the Pep19-2.5/LPS system is already in saturation at molar ratios < 0.4 , for the other peptides this value is ≥ 1.1 . Therefore, the binding affinity of Pep19-2.5 is much higher than those for the other peptides. A more precise ITC experiment was performed with the latter peptide (Fig. 5 B). The evaluation of such curves from five independent experiments,

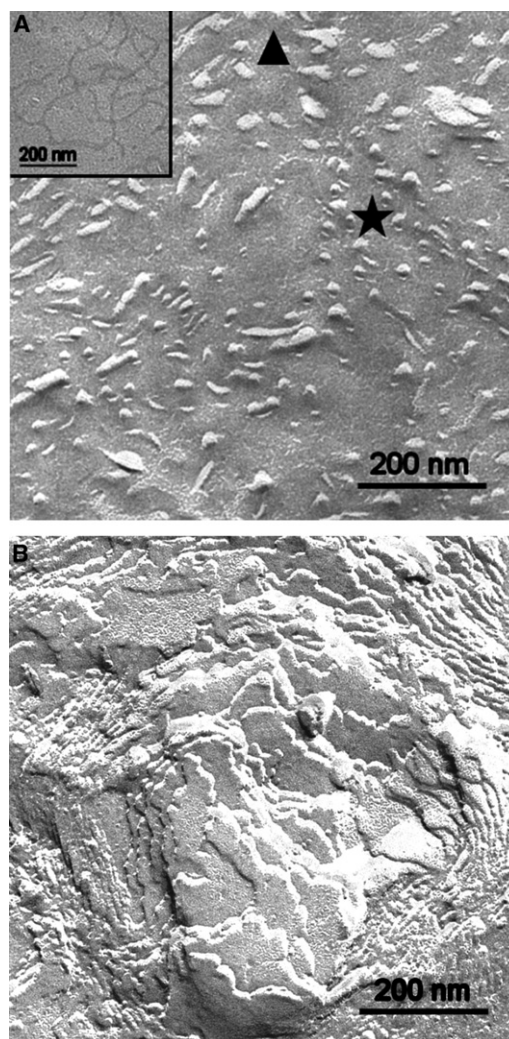


FIGURE 4 Morphology of LPS aggregates. Freeze-fracture micrographs of LPS R60 and LPS/peptide mixtures. (A) LPS alone shows aggregates of ribbon-like structures appearing more or less cross fractured (area marked by *star*) or tangentially fractured (area marked by *triangle*). The extension of the ribbons is more clearly visible in the case of adsorbed ribbons (*inset*). (B) After addition of Pep19-2.5, multilamellar aggregates are visible.

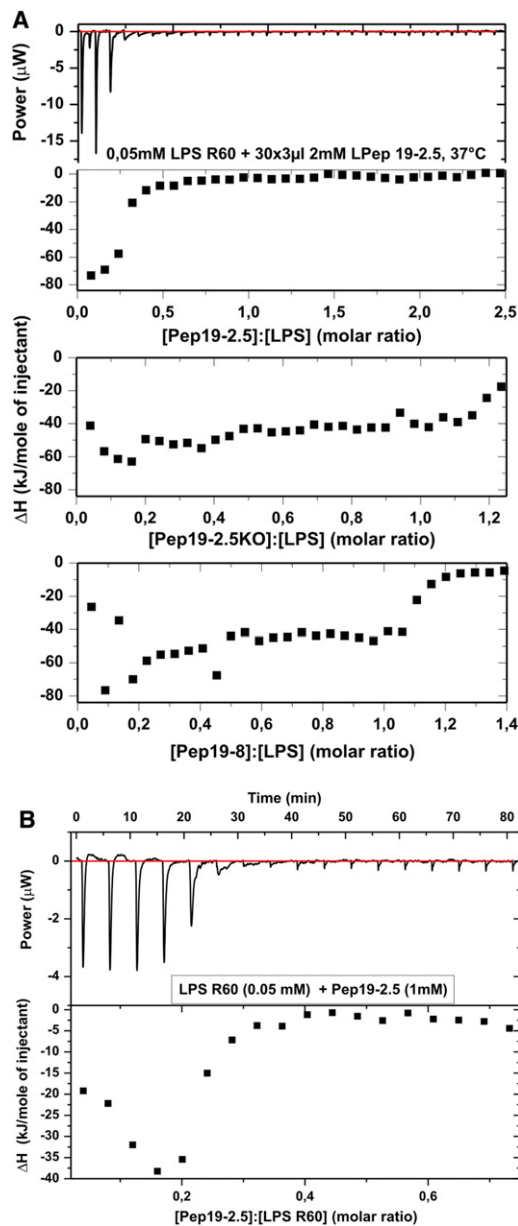


FIGURE 5 (A) Binding saturation of peptides. ITC of mixtures of LPS R60 with Pep19-2.5 (top), Pep19-2.5KO (middle), and Pep19-8 (bottom) at 37°C. For the LPS dispersion (0.05 mM), 5 µl of the peptide solution (2 mM) was titrated every 5 min, and the calorimetric signal was recorded. (B) Binding saturation of peptides. ITC of mixtures of LPS R60 with Pep19-2.5 (LPS concentration: 0.05 mM; Pep19-2.5 concentration: 2 mM). The measurements were done at 37°C.

using a sigmoidal saturation curve as shown in Fig. 5 B, gave a binding constant of $k = (2.8 \pm 3.0) \times 10^{-8}$ /Mol.

We determined the ζ -potential of the LPS/peptide mixtures by measuring their electrophoretic mobilities. A comparison of Pep19-2.5 with Pep19-8 (Fig. 6) shows that the ζ -potential, starting from negative values due to the negative lipid A backbone charges, does not end at zero potential. Instead, it adopts clearly positive values, i.e., addi-

tional binding occurs beyond pure charge compensation. Of interest, the less-active Pep19-8 reaches a positive ζ -potential at significantly lower LPS/peptide ratios than the highly active Pep19-2.5. Thus, in addition to purely electrostatic interactions, hydrophobic interactions between the lipid and the peptides have to be considered.

Peptide incorporation into phospholipid and LPS membranes

We investigated the ability of the peptides Pep19-2.5, Pep19-2.5KO, and Pep19-8 to intercalate into phospholipid membranes from PC, phosphatidylserine (PS), and LPS by applying FRET (Fig. S3, A–C).

LPS inactivation in the *Limulus* test

In the *Limulus amoebocyte lysate* test, which is a very sensitive test for endotoxin contamination, the recognition structure for LPS is the diglucosamine 4'-phosphate backbone region (24). The data in Fig. 7 show a complete inhibition of endotoxic activity (in endotoxin units (EUs)) at all concentrations of LPS (10, 1, and 0.1 ng/ml) and an [LPS]/[Pep19-2.5] weight ratio of 1:1. Thus, binding of the peptide to the 4'-phosphate should take place very effectively.

Influence of peptides on a membrane mimetic bilayer

We investigated the influence of the peptide 19-2.5 on the mimetic of the immune cell membrane as described above by applying SAXS (Fig. 8). As can be seen in the figure, this mixed lipid system exhibits a bilayer periodicity of 5.05 nm with a shoulder at 4.65 nm and an additional reflection at 7.46 nm (top). The latter reflection may reflect three-dimensional phase separation of SM (see Discussion). The first two values may correspond to different periodicities

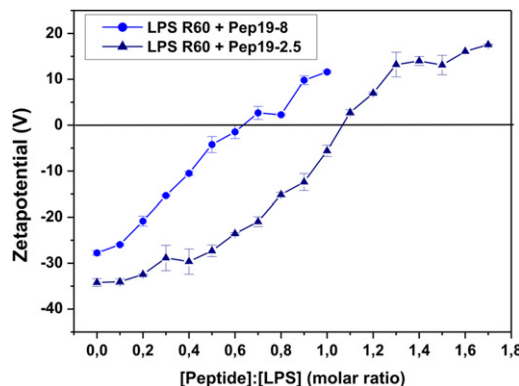


FIGURE 6 Compensation of LPS backbone charges. The ζ -potential of LPS R60 aggregates depends on different concentrations of Pep19-8 and Pep19-2.5, as determined by their electrophoretic mobility with Laser-Doppler anemometry.

Web 3C

Web 3C

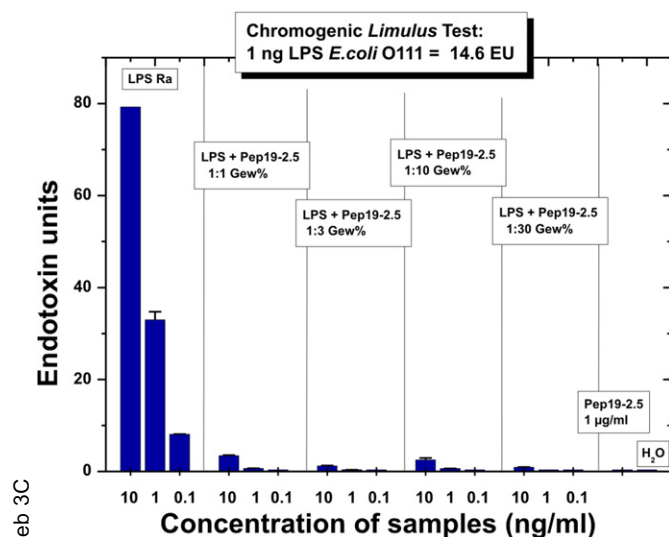


FIGURE 7 Biological activity in the *Limulus* test system. The activities (in EUs) of LPS R60 and LPS/Pep19-2.5 mixtures in the *Limulus* amoebocyte lysate test at three different LPS concentrations and LPS/Pep ratios of 1:1–1:30 weight % are shown. As the standard in this test, the LPS S-form from *E. coli* O111 is used; 1 ng of LPS corresponds to 14.6 EUs.

due to the domain structures of this lipid mixture. Upon addition of Pep19-2.5 (*middle, bottom*), the main periodicity hardly changes, whereas the values corresponding to the domains change, i.e., the domain structure changes.

Cytotoxicity of the peptides

The cytotoxic effects of the peptides are described in the [Supporting Material](#).

DISCUSSION

Our aim in this systematic study of the mechanisms of interaction of selected SALPs with LPS (endotoxin) and with eukaryotic membrane systems was to characterize both the neutralization mechanisms of LPS and the selectivity of these processes in different membrane systems. The data clearly show that the selected SALPs differ strongly in their ability to suppress the cytokine response in human MNCs (Fig. 1), and to confer protection in the animal model of sepsis (Fig. 2). We analyzed various physical parameters to find out whether they are determinants of the inactivation process of LPS.

A comparison of the data for the gel-to-liquid crystalline phase behavior reveals that the Pep19-2.5 peptide with the highest inhibitory activity results in only a slight fluidization of the acyl chains (Fig. S1 A), whereas the Pep19-8 peptide with much lower inhibitory activity shows a stronger fluidization (Fig. S1 B). It was previously shown that the gold standard of AMPs, PMB, leads to a strong acyl chain fluidization of LPS (25). However, its nonapeptide, PMBN, behaved nearly identically to PMB, although this compound

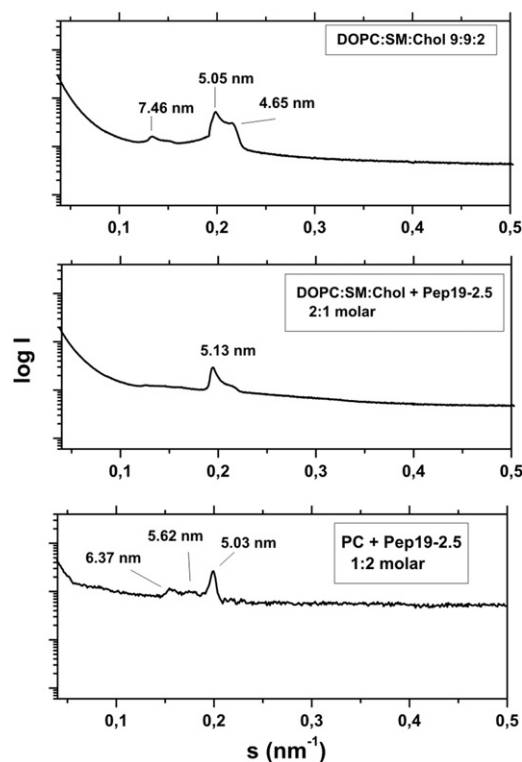


FIGURE 8 Aggregate structure of a mimetic of the mammalian phospholipids membrane. SAXS was performed using synchrotron radiation of DOPC/SM/Cho mixtures 9:9:2 molar in the presence of Pep19-2.5 at three molar ratios 1:0 (*top*), 2:1 (*middle*), and 1:2 (*bottom*) at 40°C. The logarithm of the scattering intensity $\log I$ is plotted versus the scattering vector s ($= 1/d$, d = lattice spacings).

exhibits no or only low antimicrobial activity (26). Therefore, the parameter fluidization of the acyl chains of the lipid A moiety of LPS by itself does not correlate with the capacity of a peptide to block the stimulation capacity of LPS. This is also in accord with a previous study of the inhibiting effect of human lactoferrin on LPS-induced cell stimulation, which showed that the binding of LF to LPS leads to acyl-chain rigidification (4).

Various studies have emphasized the importance of the aggregate structure of endotoxins for the expression of biological activity. In one study, cubic aggregate structures were assigned to their bioactive structure, whereas the inhibition induced by AMPs converted these into a multilamellar assembly (23). The diffraction patterns seen here do not give strong evidence for cubic phases, which may reflect the fact that it was our aim to realize near-physiological conditions, i.e., a water content >95%, whereas cubic phases for LPS are well expressed at 70–85% water content (18). However, the most important finding is that the extent of multilamellarization directly correlates with the biological efficiency of the single peptides (Figs. 1, 2, and 3 B), as evidenced by the fact that compound Pep19-8, which has the lowest inhibition capacity, maintained the original aggregate structure more strongly than the more-active compounds.

This behavior is directly connected with the drastic increase in the size of the aggregate structures (Fig. 4), with small ribbon-like structures changing into large, agglomerated, three-dimensional patches in which expanded multilamellar stackings are found in correspondence to the SAXS data.

The literature contains only limited data regarding changes in LPS aggregate structures and sizes due to the action of peptides. Rosenfeld et al. (27,28) studied the inhibiting effects of different peptides on the stimulating capacity of S-form LPS and concluded that peptide binding to LPS is accompanied by a dissociation of the LPS aggregates. They based their conclusions on the results of FITC-labeled LPS and fluorescence dequenching experiments, in which an increase of the fluorescence intensity was interpreted as resulting from a disaggregation process. It is known, however, that other effects, such as an increase of the LPS acyl-chain fluidity, may also be connected to an increase in fluorescence intensity (K. Brandenburg, unpublished results), and that in both cases, the binding of LPS to LBP, as well as to BPI, lead to a fluorescence increase due to dequenching, although the former protein should result in a disaggregation, and the latter in a complexation, i.e., an increase in aggregation (29). Furthermore, using negative-staining electron microscopy, Rosenfeld et al. found a decrease in aggregate size. This can be understood in the light of the fact that the aggregational behavior of LPS is extremely dependent on the water content, leading to completely different phases when water is removed from the dispersions, i.e., the inherent cubic aggregates of enterobacterial lipid A and LPS would convert into multilamellar complexes at $\sim \leq 50\%$ water content (30,31). Another possibility would be a different mechanism as described by Rosenfeld et al., because these authors used S-form LPS, which has a rather high heterogeneity. The aggregate structure of this complex mixture is not known in detail; therefore, other mechanisms may be involved. To resolve these differences, we plan to conduct experiments with LPS S-form from *Escherichia coli*, which is similar to the S-form LPS used by Rosenfeld et al. We will perform electron microscopic analyses using special cryotechniques, including cryo-transmission electron microscopy and freeze-fracturing (32).

The ITC data are important for an interpretation of the peptide-induced inhibition of the cell stimulation by LPS. The strong exothermic reaction of the LPS peptide interaction, found for all peptides due to Coulomb interaction between the positive charges of the peptides and the negative backbone charges of LPS, is already in saturation at $[\text{Pep19-2.5}]/[\text{LPS}] = 0.3$, i.e., three peptide molecules per 10 LPS molecules already lead to charge saturation. In contrast, for the much less effective compounds Pep19-2.5KO and Pep19-8, saturation is reached at $[\text{Pep}]/[\text{LPS}]$ molar ratios of >1 (Fig. 5). The strong inhibitory capacity of Pep19-2.5 can be explained by the high binding constant (estimated as $k = 2.8 \times 10^{-8}$ /Mol from Fig. 5) of the

peptide to LPS putatively exceeding that for the human LPS-binding proteins LBP and CD14, which are responsible for the initial steps of cell activation. It should be mentioned that such binding constants of LPS with LBP and CD14 have been reported to lie in the range of 10^{-8} to 10^{-9} /Mol (33,34). These data were obtained by using FITC-labeled or ^3H -metabolically labeled LPS from *S. minnesota* R595. Since binding constants measured with other techniques, which afford the use of labels, frequently differ strongly from values reported with ITC, comparative measurements should be done. We will address this question in a separate investigation.

An important inactivation step is the competitive interaction of the peptide with human binding proteins such as LBP and CD14. However, this may not be the only step that is important for understanding LPS neutralization. The FRET data indicate an intercalation of the peptides not only into LPS aggregates (Fig. S3 C), which is in accord with the above-discussed data, but also into normal PC (or DOPC/SM/Chol mixtures) and PS liposomal membranes (Fig. S3, A and B). Together with the observation that the neutralization ability of Pep19-2.5 is still present when it is administered up to 3 h after LPS addition (data not shown), and the reported data that LPS by itself is transported into target membranes by the action of LBP (35), a second step in LPS neutralization is the interaction of LPS and peptides within the membranes of immune cells. The details and mechanisms of this interaction will be presented in a separate study.

It was previously shown that the potential binding sites in LPS, the phosphates, differ by their conformation, with the 1-phosphate looking into the aqueous environment of the LPS layer, and the 4'-phosphate sticking into the hydrophobic/interface region (36). In similarity to what was recently reported for cyclic peptides based on the *Limulus*-anti LPS factor (20), we found that the 1-phosphate is the first point of binding of the peptide (IR fingerprint region; Supporting Material). This is in excellent agreement with the data from the *Limulus* assay (Fig. 7), which unequivocally indicate a complete blocking of the reaction at LPS/Pep19-2.5 1:1 weight %. It was previously reported that the presence of an acylated diglucosamine 4'-phosphate headgroup of LPS/lipid A is a prerequisite for *Limulus* activity (24).

For therapeutic use, the question of the specificity of the SALP, or, in pharmacological terms, the therapeutic index, is of utmost importance. This corresponds to the ratio of the dose at which side effects occur to the therapeutic dose. Here, the in vitro data of the cytotoxicity and hemolysis (Fig. S4, A and B) are indicative of the beginning of adverse effects at concentrations of 30–50 $\mu\text{g/ml}$, whereas the therapeutic dose (Fig. 2) is ~ 1 $\mu\text{g/ml}$. In support of these findings are the SAXS experiments of the interaction of Pep19-2.5 with a mimetic of an immune cell membrane (DOPC/SM/Chol 9:9:2 molar ratio). Various authors have

investigated such membrane models with variations in the single components (37–39). In the light of their data, it can be concluded that the SM exhibits a three-dimensional phase separation, which can be deduced from the extra reflection at 7.46 nm in Fig. 8 (top). This reflection disappears in the presence of the peptide, which apparently is a result of the membrane incorporation as described above. Of most importance, however, is the observation that the basic structure and hence its integrity are maintained, in accordance with the determination of cytotoxic effects.

A previous study in mice showed that a considerable degree of protection occurs at [Pep19-2.5]/[LPS] 50:1 weight % (10), shifting the therapeutic index to even higher values. Although these are preclinical data, obtained in galactosamine-sensitized mice, the application of this peptide to humans should render similar results. Humans can experience severe septic syndromes at LPS concentrations of <0.5 ng/ml in blood (40). The therapeutic dose of the peptide should be in the range of 100:1–1000:1 with respect to LPS, i.e., it should not exceed 1 μ g/ml, in similarity to the situation in the animal model.

SUPPORTING MATERIAL

Additional text and four figures are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(11\)00517-0](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(11)00517-0).

We thank Nina Hahlbrock and Christine Hamann for performing the infrared and FRET spectroscopic measurements, respectively.

This study was supported by the Ministerium für Bildung und Forschung (project No. 01GU0824). G.M.T. received grants from the Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS-PI050768) and Proyectos de Investigación Universidad de Navarra (PIUNA-2008-11).

REFERENCES

- Rietschel, E. Th., T. Kirikae, ..., Di Padova. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8:217–225.
- Rietschel, E. T., H. Brade, ..., R. R. Schumann. 1996. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 216:39–81.
- Springer, J., M. Safley, ..., R. R. McGoey. 2010. Histopathological findings in fatal novel H1N1: an autopsy case series from September–November 2009 in New Orleans, LA. *J. LA. State Med. Soc.* 162:88–91.
- Brandenburg, K., G. Jürgens, ..., M. H. Koch. 2001. Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin. *Biol. Chem.* 382:1215–1225.
- Andrä, J., M. H. J. Koch, ..., K. Brandenburg. 2004. Biophysical characterization of endotoxin inactivation by NK-2, an antimicrobial peptide derived from mammalian NK-lysin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1593–1599.
- Andrä, J., P. Garidel, ..., K. Brandenburg. 2004. Biophysical characterization of the interaction of *Limulus polyphemus* endotoxin neutralizing protein with lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 271:2037–2046.
- Dankesreiter, S., A. Hoess, ..., T. Miethke. 2000. Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF- α production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin-mediated toxic shock. *J. Immunol.* 164:4804–4811.
- Garidel, P., and K. Brandenburg. 2009. Current understanding of polymyxin B application in bacteraemia/sepsis therapy prevention: clinical, pharmaceutical, structural and mechanistic aspects. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* 8:367–385.
- Brandenburg, K., A. B. Schromm, and T. Gutschmann. 2010. Endotoxins: relationship between structure, function, and activity. *Subcell. Biochem.* 53:53–67.
- Gutschmann, T., I. Razquin-Olazarán, ..., K. Brandenburg. 2010. New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:3817–3824.
- Galanos, C., O. Lüderitz, and O. Westphal. 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9:245–249.
- Hirschfeld, M., Y. Ma, ..., J. J. Weis. 2000. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 165:618–622.
- Garidel, P., M. Rappolt, ..., K. Brandenburg. 2005. Divalent cations affect chain mobility and aggregate structure of lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* reflected in a decrease of its biological activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1715:122–131.
- Schromm, A. B., K. Brandenburg, ..., U. Seydel. 1996. Lipopolysaccharide-binding protein mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Lett.* 399:267–271.
- Brandenburg, K., I. Moriyon, ..., U. Seydel. 2002. Biophysical investigations into the interaction of lipopolysaccharide with polymyxins. *Thermochim. Acta.* 382:189–198.
- Brandenburg, K., S. Kusumoto, and U. Seydel. 1997. Conformational studies of synthetic lipid A analogues and partial structures by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1329:183–201.
- Howe, J., J. Andrä, ..., K. Brandenburg. 2007. Thermodynamic analysis of the lipopolysaccharide-dependent resistance of gram-negative bacteria against polymyxin B. *Biophys. J.* 92:2796–2805.
- Seydel, U., M. H. J. Koch, and K. Brandenburg. 1993. Structural polymorphisms of rough mutant lipopolysaccharides Rd to Ra from *Salmonella minnesota*. *J. Struct. Biol.* 110:232–243.
- Roessle, M., R. Klaering, ..., D. Svergun. 2007. Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *J. Appl. Cryst.* 40:190–194.
- Andrä, J., J. Howe, ..., K. Brandenburg. 2007. Mechanism of interaction of optimized *Limulus*-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *Biochem. J.* 406:297–307.
- Andrä, J., M. Lamata, ..., K. Brandenburg. 2004. Cyclic antimicrobial peptides based on *Limulus* anti-lipopolysaccharide factor for neutralization of lipopolysaccharide. *Biochem. Pharmacol.* 68:1297–1307.
- Galanos, C., M. A. Freudenberg, and W. Reutter. 1979. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:5939–5943.
- Brandenburg, K., and A. Wiese. 2004. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity. *Curr. Top. Med. Chem.* 4:1127–1146.
- Gutschmann, T., J. Howe, ..., K. Brandenburg. 2010. Structural prerequisites for endotoxic activity in the *Limulus* test as compared to cytokine production in mononuclear cells. *Innate Immun.* 16:39–47.
- Vaara, M., and T. Vaara. 1983. Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24:107–113.
- Andrä, J., T. Gutschmann, ..., K. Brandenburg. 2006. Mechanisms of endotoxin neutralization by synthetic cationic compounds. *J. Endotoxin Res.* 12:261–277.
- Rosenfeld, Y., H. G. Sahl, and Y. Shai. 2008. Parameters involved in antimicrobial and endotoxin detoxification activities of antimicrobial peptides. *Biochemistry.* 47:6468–6478.
- Rosenfeld, Y., N. Papo, and Y. Shai. 2006. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J. Biol. Chem.* 281:1636–1643.

29. Tobias, P. S., K. Soldau, ..., J. Weiss. 1997. Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. *J. Biol. Chem.* 272:18682–18685.
30. Brandenburg, K., M. H. J. Koch, and U. Seydel. 1992. Phase diagram of deep rough mutant lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* R595. *J. Struct. Biol.* 108:93–106.
31. Brandenburg, K., M. H. J. Koch, and U. Seydel. 1990. Phase diagram of lipid A from *Salmonella minnesota* and *Escherichia coli* rough mutant lipopolysaccharide. *J. Struct. Biol.* 105:11–21.
32. Richter, W., V. Vogel, ..., K. Brandenburg. 2010. Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin. *Innate. Immun.*, Aug 3 [Epub ahead of print].
33. Tobias, P. S., J. Gegner, ..., R. J. Ulevitch. 1994. LPS binding protein and CD14 in the LPS dependent activation of cells. *Prog. Clin. Biol. Res.* 388:31–39.
34. Tobias, P. S., K. Soldau, ..., R. J. Ulevitch. 1995. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J. Biol. Chem.* 270:10482–10488.
35. Kirkland, T. N., F. Finley, ..., P. S. Tobias. 1993. Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14. *J. Biol. Chem.* 268:24818–24823.
36. Seydel, U., M. Oikawa, ..., K. Brandenburg. 2000. Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur. J. Biochem.* 267:3032–3039.
37. Calhoun, W. I., and G. G. Shipley. 1979. Sphingomyelin—lecithin bilayers and their interaction with cholesterol. *Biochemistry.* 18:1717–1722.
38. Untrach, S. H., and G. G. Shipley. 1977. Molecular interactions between lecithin and sphingomyelin. Temperature- and composition-dependent phase separation. *J. Biol. Chem.* 252:4449–4457.
39. Gandhavadi, M., D. Allende, ..., T. J. McIntosh. 2002. Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophys. J.* 82:1469–1482.
40. Opal, S. M., P. J. Scannon, ..., J. H. Lemke. 1999. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J. Infect. Dis.* 180:1584–1589.

Supplemental file:

Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides

Synthesis of the peptides

The peptides were synthesized with an amidated C-terminus by the solid-phase peptide synthesis technique in an automatic peptide synthesizer (model 433 A; Applied Biosystems) on Fmoc-Rink amide resin according to the 0.1mmol FastMoc synthesis protocol of the manufacturer, including the removal of the N-terminal Fmoc-group. The peptidyl-resin was deprotected and cleaved with a mixture of 90 % trifluoroacetic acid (TFA), 5 % anisole, 2 % thioanisole, and 3 % dithiothreitol for 90 min at room temperature. After cleavage the suspension was filtered through a syringe filter into ice-cold diethylether. The precipitated peptides were separated by centrifugation and repeatedly washed with cold ether. The final purification was done by RP-HPLC. Purity levels up to 98% were achieved using an Aqua-C18 column (Phenomenex) in combination with dedicated gradients of acetonitrile in 0.1 % TFA, checked by Maldi-TOF mass spectroscopy and RP-HPLC at 214 nm. The sequences of the peptides was submitted as International Patent (published in October 2009 by the European Patent Office, 2108 372 A1).

Fourier-transform infrared spectroscopy

The infrared spectroscopic measurements were performed on an IFS-55 spectrometer (Bruker). Samples, dissolved in 20 mM Hepes buffer, pH 7.0, were placed in a CaF₂ cuvette with a 12.5 μm teflon spacer. Temperature-scans were performed automatically between 10 and 70°C with a heating-rate of 0.6 °C/min. Every 3°C, 50 interferograms were accumulated, apodized, Fourier transformed, and converted to absorbance spectra.

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC measurements were performed with a VP-DSC calorimeter (MicroCal, Inc., Northampton, MA, USA) at a heating and cooling rate of 1 °C·min⁻¹. The DSC

samples were prepared by dispersing a known ratio of LPS to peptide in 10 mM PBS buffer at pH 7.4. The samples were hydrated in the liquid crystalline phase by vortexing. The measurements were performed in the temperature interval from 5 °C to 95 °C. Five consecutive heating and cooling scans checked the reproducibility of the DSC experiments of each sample (13). The accuracy of the DSC experiments was ± 0.1 °C for the main phase transition temperatures and ± 1 kJ·mol⁻¹ for the main phase transition enthalpy. The DSC data were analysed using the Origin software. The phase transition enthalpy was obtained by integrating the area under the heat capacity curve.

Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy (FRET)

The ability of the peptides to intercalate into phospholipid liposomes or into LPS R60 aggregates was investigated as described earlier (14). Briefly, phospholipid liposomes from phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), or LPS R60 were doubly labelled with the fluorescent phospholipid dyes N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4yl)-phosphatidyl ethanolamine (NBD-PE) and N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)-phosphatidylethanolamine (Rh-PE) (Molecular Probes). Intercalation of unlabeled molecules into the doubly labeled liposomes leads to probe dilution and with that to a lower FRET efficiency: the emission intensity of the donor I_D increases and that of the acceptor I_A decreases (for clarity, only the quotient of the donor and acceptor emission intensity is shown here).

In all experiments, the peptides (100 μ l of 100 μ M) were added to doubly labelled PS phospholipid liposomes or LPS R60 (900 μ l of 10 μ M) 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.

Alamar blue Assay

To specify the vitality of eukaryotic cells and detect toxic effects of chemicals and other substances on the cell membrane, the Alamar blue (Invitrogen) agent was used. It is also known as resazurin (7-Hydroxy-3-H-phenoxazin-3-one-10-oxide), a blue dye used as an oxidation-reduction indicator for cell viability. First, the cells were treated for a period of time with different concentrations of test substances. Subsequently the blue colored Resazurin was added. In the presence of living cells, the Resazurin is reduced to the pink fluorescent compound resorufin. Via photometric

measuring (OD at 620 nm), the metabolic activity was monitored in a microtiter plate reader. Each independent experiment was performed in triplicate.

Hemolysis Assay

The activity of the peptides to lyse freshly isolated human erythrocytes was determined in PBS, pH 7.4 at 37 °C. Dilutions were prepared in duplicate in a round bottom microtiterplate. For that, 20 µl erythrocytes (5×10^8 cells/ml) was incubated with 80 µl of a peptide sample at 37 °C for 30 min in a humidified box. The hemolytic activity after incubation was measured by transferring the supernatants into another empty microtiter plate. This plate was read on a microtiter plate reader at 405 nm. Hemolytic activity was expressed as percentage of released hemoglobin with respect to water controls (100 % release) or controls processed without peptides (0 % release).

Results

Gel to liquid crystalline phase transition of the acyl chains

It was shown that effective antibacterial peptides such as polymyxin B cause a strong fluidization of the acyl chains of LPS (15).

The phase transition behavior of the acyl chains of the lipid A part of LPS R60 was monitored by applying FTIR and DSC (Figs. S1,S2). In Fig. S1, the peak position of the symmetric stretching vibrational band of the methylene groups of the hydrocarbon chains is plotted versus temperature for LPS R60 at different concentrations of Pep19-2.5 (A) and 19-8 (B). As can be seen, for LPS a phase transition from the ordered gel phase into an unordered liquid crystalline phase is found at $T_c = 35$ °C, and the addition of the peptides to LPS leads to an increase in the wavenumber values in particular in the gel phase corresponding to a fluidization of the acyl chains. Interestingly, this is much stronger for the biologically less active Pep19-8. In the DSC experiment (file Fig. S2A), however, for both peptides the transition disappears completely at sufficiently high peptide concentrations which can be deduced in particular from the vanishing of the phase transition enthalpy (exemplarily shown in Fig. S2B for Pep19-2.5).

Peptide incorporation into phospholipid and LPS membranes

The ability of the peptides Pep19-2.5, Pep19-2.5KO, and Pep19-8 to intercalate into phospholipid membranes from phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), and into LPS was determined by applying fluorescence resonance energy spectroscopy (FRET) (see Figs. S3A-C). The results for the incorporation into PC shows nearly equal capacity for all three peptides (A), whereas a succession from Pep19-2.5KO to Pep19-2.5, and Pep19-8 is observed for PS (B). However, the FRET signal of the latter is much higher than that for PC. For LPS, all three peptides intercalate nearly with the same amplitude (C). Thus, these data show a clear membrane activity of the peptides with a predominance for negatively charged (PS, LPS) compounds.

The incorporation of the peptides was also studied with a mimetic of a human immune cell membrane, DOPC, sphingomyelin, and cholesterol in a molar ratio of 9:9:2. The data were very similar as found for the pure PC membrane (Fig. S3A) except the fact that the measuring curves were much more noisy.

Infrared fingerprint spectral region

To determine the influence of the Pep19-2.5 on the phosphate groups of LPS, infrared spectra of the fingerprint spectral region 1320 to 1180 cm^{-1} of LPS were evaluated. The spectra in the absence of the peptide show the appearance of two band components at 1255-1260 and 1220 cm^{-1} corresponding to the weakly hydrated 4'-phosphate and highly hydrated 1-phosphate, respectively (16). In the presence of the peptide both bands are changed, due to the binding of the peptide (not shown). In particular, there is a strong decrease of the band intensity of the band at 1260 cm^{-1} which indicates that this phosphate group is immobilized via e.g. the formation of a hydrogen bond interaction with the peptide.

Cytotoxicity

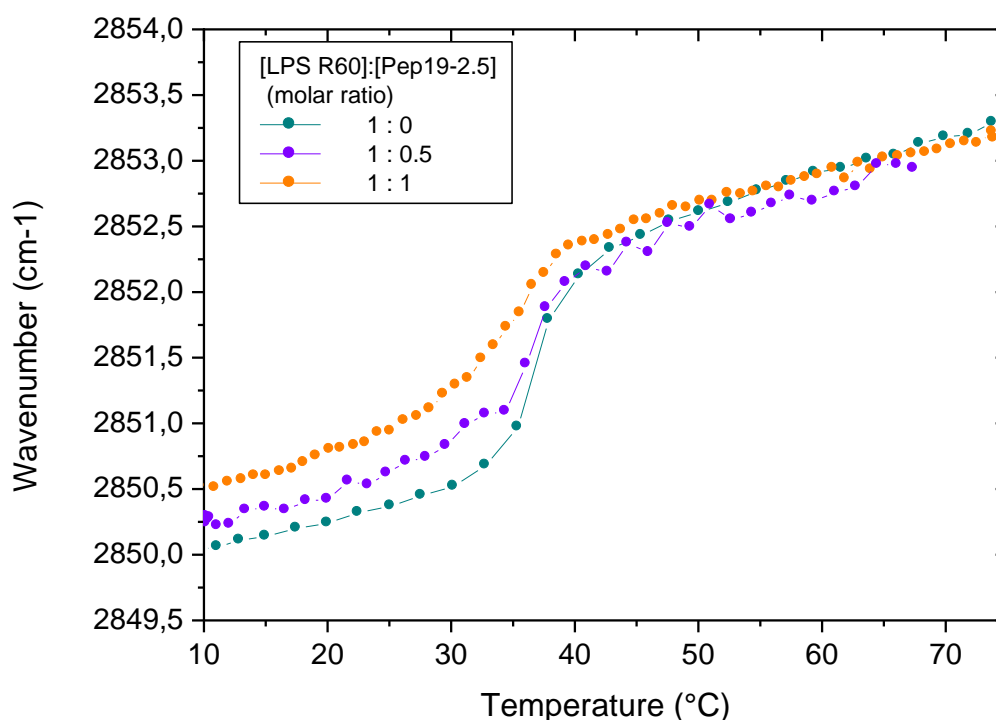
For the use of peptide as antiseptic agents, cytotoxic effects have to be carefully excluded. For this, two different test systems were investigated, human macrophages and red blood cells (RBC). Furthermore, beside the peptides described above further peptides with some modifications in the amino acid sequence were also monitored.

The results of these experiments are shown in Fig.S4A for macrophages using the Alamar blue test, and for red blood cells in Fig. S4B by using the efflux of haemoglobin. The measurements indicate for the macrophages that some cytotoxic effects start in the concentration range above 30 $\mu\text{g/ml}$, except for peptides Pep19-4 and Pep19-2.5OH (Fig. S4B), and of course the control peptide melittin. For RBC, the peptide induce a slight increase in lysis up to approximately 50 $\mu\text{g/ml}$, and then a stronger increase.

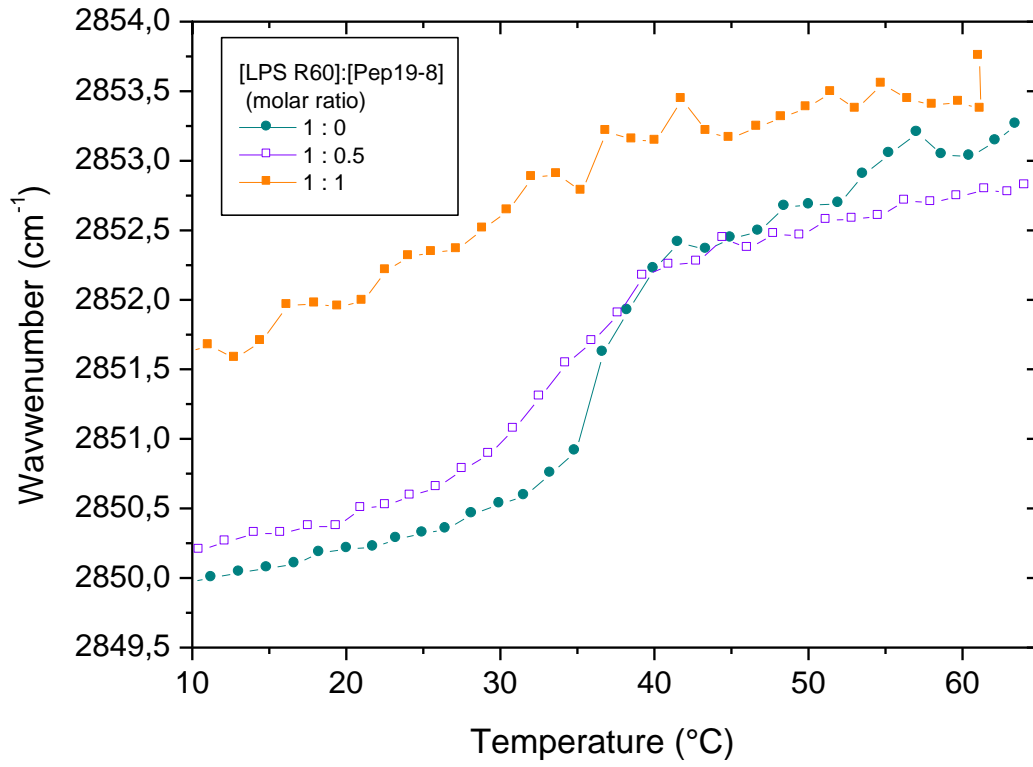
Figures and legends:

FigureS1: Gel to liquid crystalline phase transition behaviour of LPS R60 by Fourier-transform infrared spectroscopy.

The peak position of the symmetric stretching vibrational band of the methylene groups is plotted versus temperature for LPS R60 in the presence of Pep19-2.5 (A) and Pep19-8 (B).



FigS1A



FigS1B

FigureS2: Gel to liquid crystalline phase transition behaviour of LPS R60 by differential scanning calorimetry.

(A) DSC heating-scan of LPS:Pep19-2.5 mixtures at various concentration ratios.

(B) Phase transition enthalpies and temperatures in dependence on time.

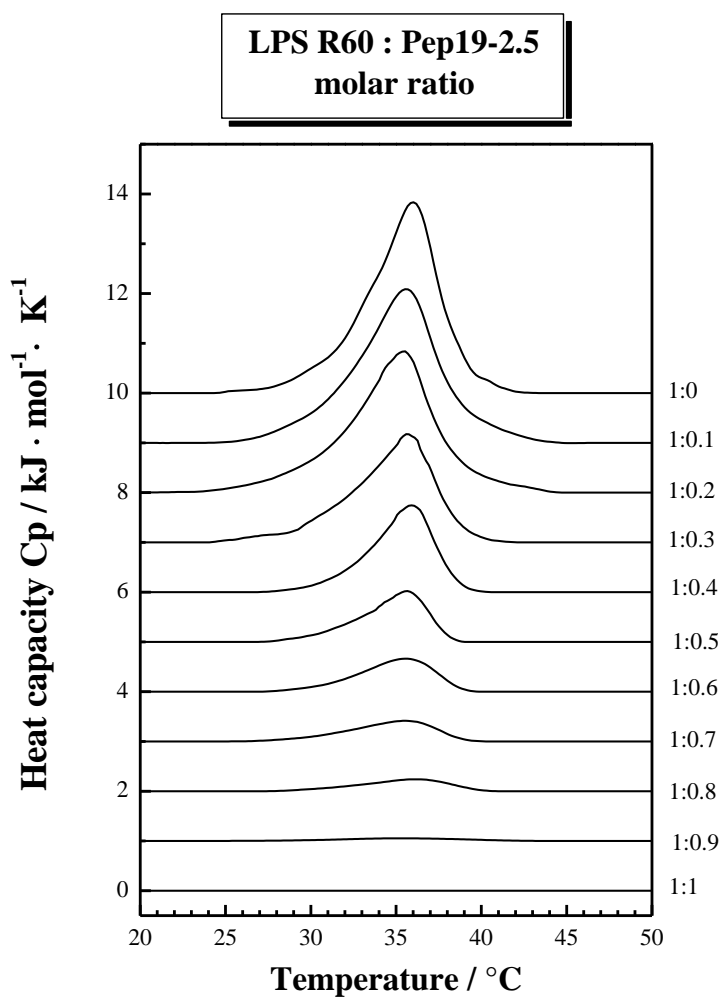


Fig. S2A

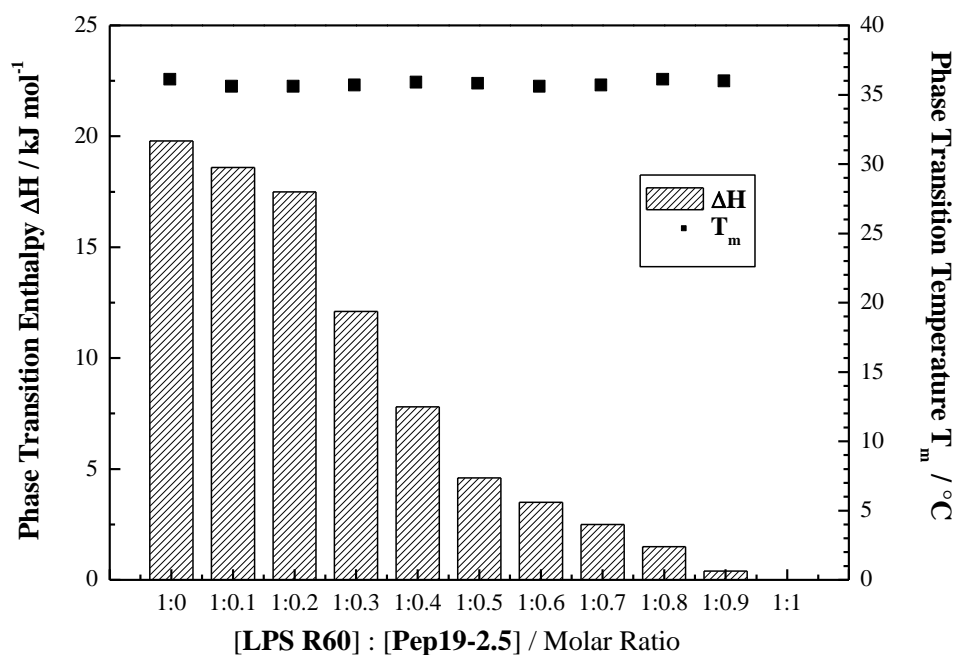


Fig. S2B

Peptide incorporation into phospholipid and LPS membranes

FigureS3: Intercalation of peptides into different lipid systems.

Incorporation of the peptides Pep19-2.5, Pep19-2.5KO, and Pep19-8 into liposomes made from phosphatidylcholine (A), phosphatidylserine (B), and into LPS R60 aggregates (C). The FRET signal (ratio of the donor NBD-PE to the acceptor RhoPE intensity) is plotted versus time.

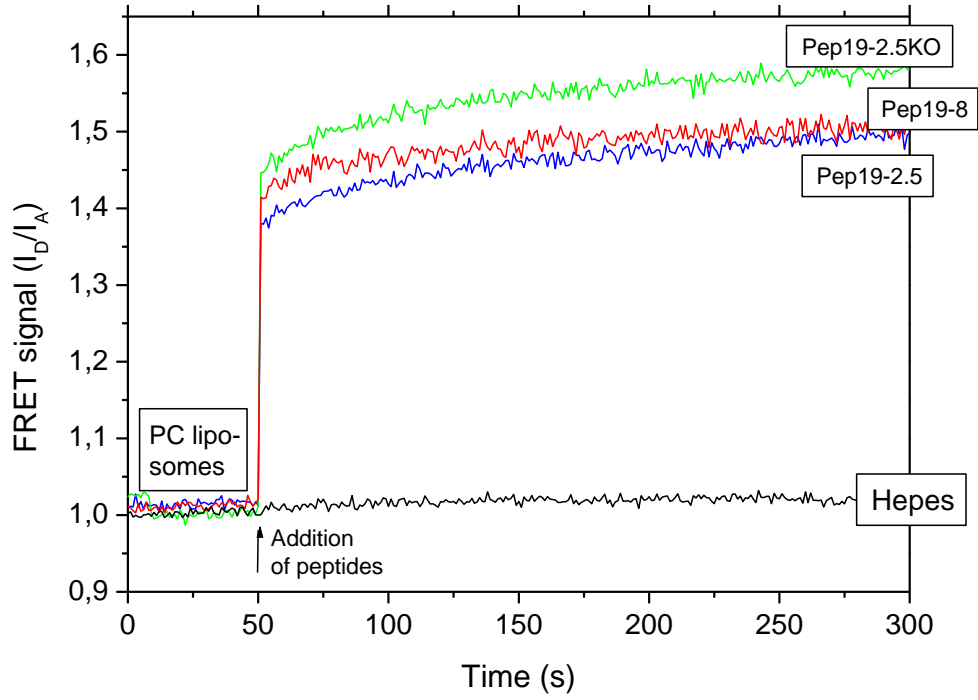


Fig. S3A

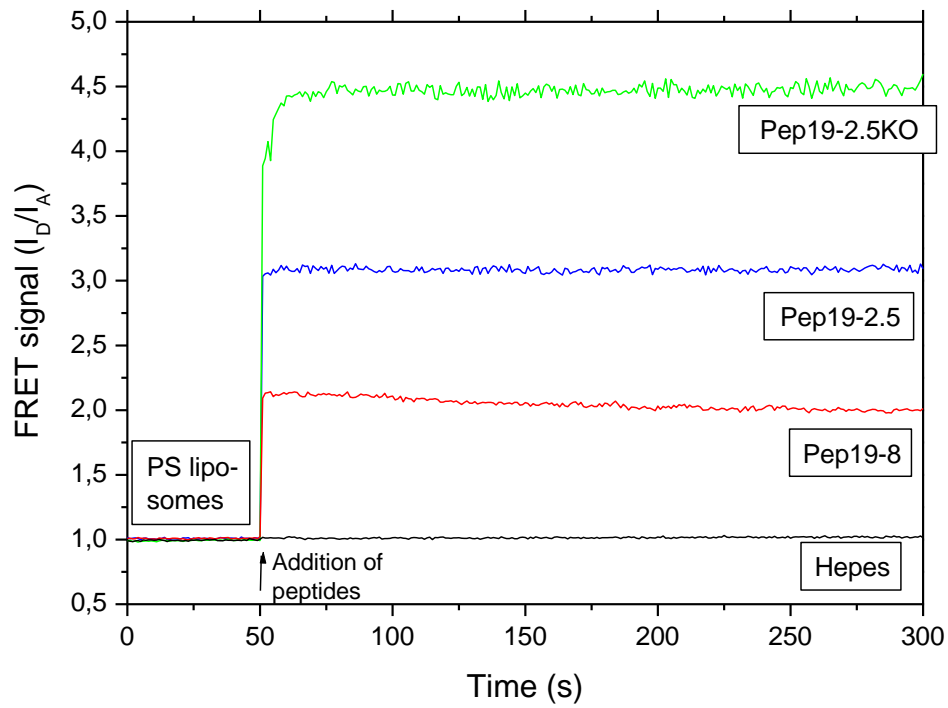


Fig. S3B

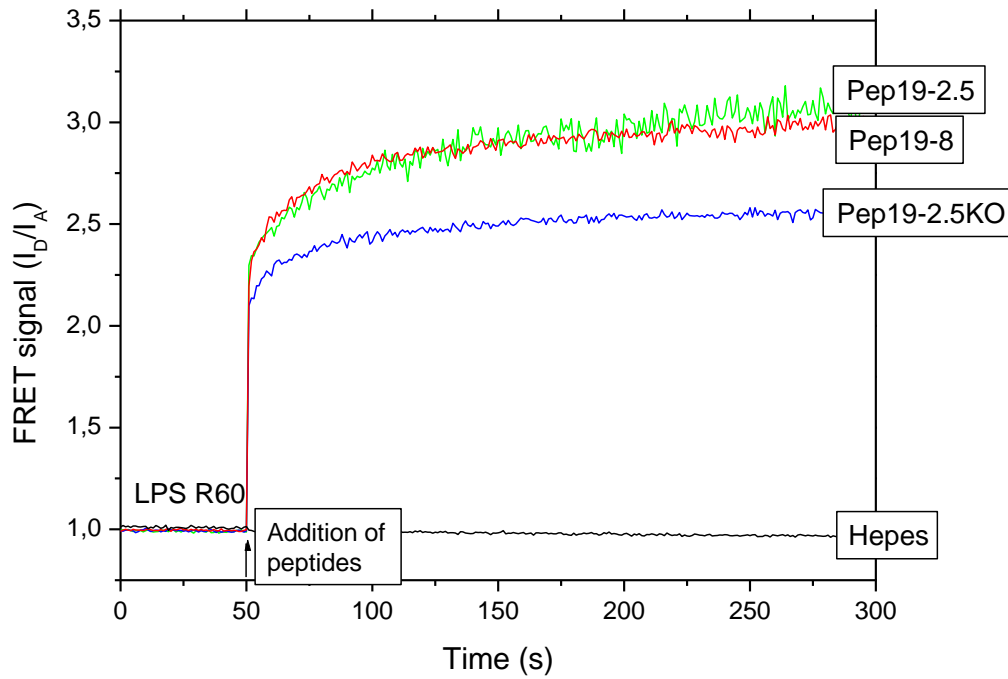


Fig. S3C

Figure S4A: Characterization of peptide-associated cytotoxicity.

(A) Metabolic activity of human macrophages at different concentrations of peptide Pep19-2.5, Pep19-2.5KO, Pep19-8, and the reference compounds polymyxin B (PMB) and bee venom melittin. (B) Red blood cell haemolysis of the same selected peptides as compared to PMB and melittin.

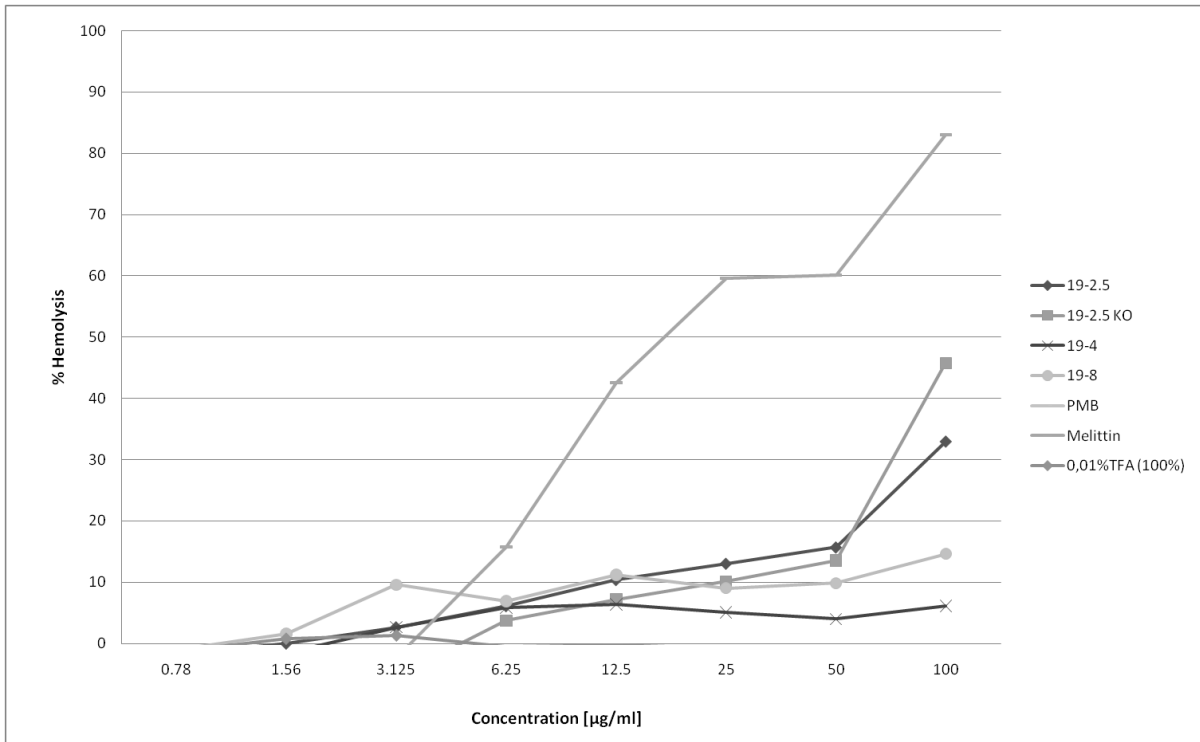


Fig. S4A

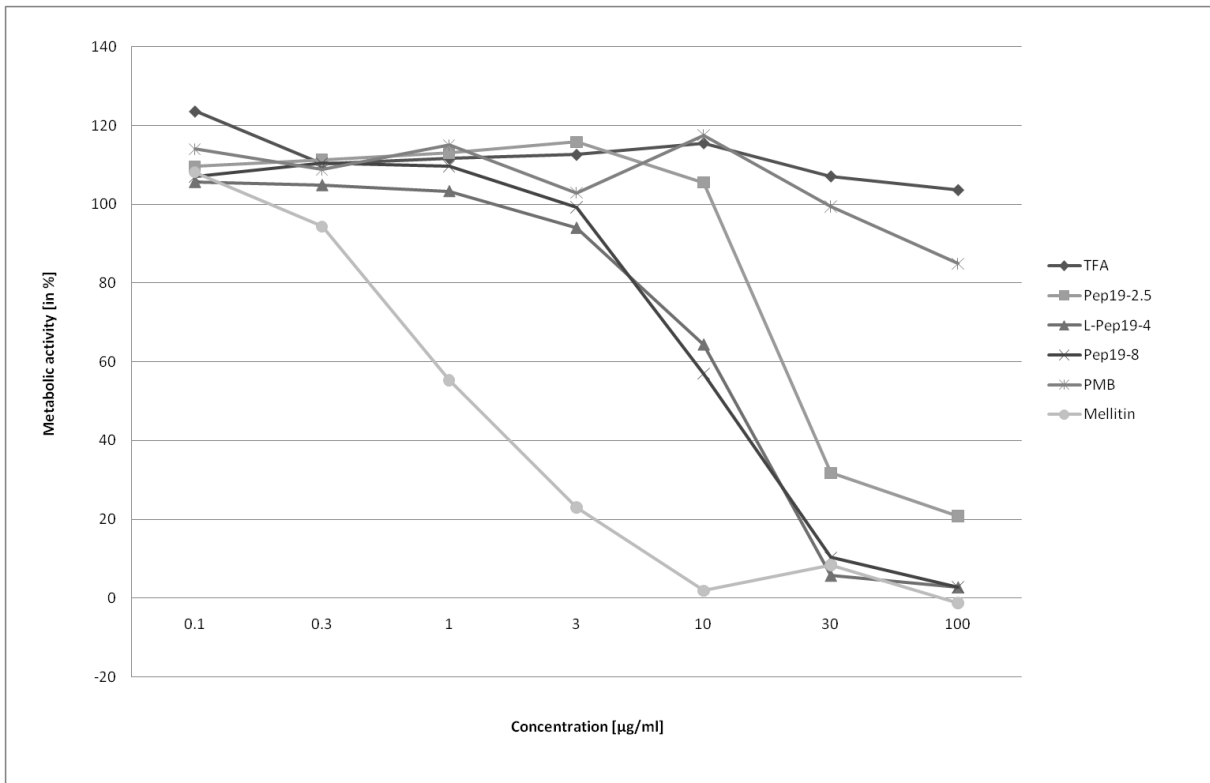


Fig.S4B