



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

Potenciación de antibióticos, inhibidores de betalactamasas y bombas de expulsión mediante péptidos antimicrobianos en bacterias gramnegativas multiresistentes

Raquel Ferrer Espada



Universidad de Navarra
Facultad de Ciencias

Potenciación de antibióticos, inhibidores de betalactamasas y bombas de expulsión mediante péptidos antimicrobianos en bacterias gramnegativas multiresistentes.

Memoria presentada por D^a Raquel Ferrer Espada para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra

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

Pamplona, 21 de Marzo de 2016

Dr. Guillermo Martínez de Tejada de Garaizábal

Dra. Susana Sánchez Gómez

"The only place where success comes before work is in the dictionary"

Vidal Sassoon

A mis padres,

A mis hermanos y

A Andrés

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas e instituciones que con su apoyo y dedicación han hecho posible este trabajo de investigación. Tengo la certeza de que sin su ayuda, esta tesis doctoral no hubiera sido posible. Tenéis todo mi cariño.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la **Universidad de Navarra** estos 10 años cruciales en mi vida. Dicen que los años en la Universidad son los mejores y los que más rápido pasan, igual por eso los he intentado alargar al máximo.

Muchas gracias a la **Asociación de Amigos de la Universidad** y al **Gobierno Vasco** por la ayuda económica para realizar esta tesis y la estancia en Bozeman (Montana).

A mis directores de tesis, el **Dr. Guillermo Martínez de Tejada** y la **Dra. Susana Sánchez** por su criterio, dedicación y consejos a la hora de dirigir esta tesis. **Guillermo**, muchas gracias por permitirme formar parte del departamento de Microbiología y Parasitología y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en él. **Susana**, muchas gracias por ser tan cercana y estar disponible aún en la distancia. He aprendido muchísimo de los dos, laboral y humanamente.

A los imprescindibles del departamento. **Rosario**, déjame que calcule, hace 39.500 cigarrillos que nos conocemos, 34.000 desde que nuestras vidas se cruzaron aquel maravilloso 20 de mayo de 2011 por azar y tengo que decirte que eres de lo mejor del departamento. No es fácil ver pasar a gente nueva cada 4 años, lo fácil sería ser egoísta y no dedicar tanto tiempo y cariño a esta relación con fecha de caducidad, sin embargo, tu eres generosa y lo haces. Cada vez. Además, qué decir de tu trabajo en el departamento, hemos sudado tinta china y de calamar durante tu reciente baja. Para mí, seguir un protocolo y una receta de cocina son actividades que se parecen mucho, por eso creo que tu roscón de reyes es la prueba palpable de lo buena que eres en tu trabajo. **Alberto**, eres otro crack del departamento y al margen de lo que has supuesto para mi a nivel profesional, que ha sido mucho, quiero agradecerte los consejos que me has dado cuando me has visto preocupada. Siempre has dado en el clavo. Eres el MacGiver del departamento y el as del reciclaje y no se si eres consciente pero hasta tus rapapolvos nos resultan entrañables. **María**, muchas gracias por estar siempre dispuesta a ayudar, por hacernos tan entretenidos los cafés, enseñarnos a comer uvas, a apreciar una buena morberina® y en definitiva, por estar solo a un paseillo de distancia de 8.30 am a 14.00 pm y a un email/post-it de distancia de 14.00 pm en adelante. **Begoña**, hemos compartido prácticas y, este último año,

Agradecimientos

lista de lectura. Creo que a través de ambas he llegado a conocerte un poco más. Muchas gracias porque, aunque no nos damos cuenta, el orden en el laboratorio es muy necesario y difícil de mantener. En la lectura me has tomado la delantera, espero ahora tener tiempo para leer los últimos libros que me has estado recomendando con tanta efusividad.

Muchas gracias a los profesores del departamento, al **Dr. Ignacio Moriyón**, la **Dra. Maite Iriarte**, el **Dr. Ignacio López Goñi**, el **Dr. Carlos Gamazo**, el **Dr. Paul Nguewa** y la **Dra. Raquel Conde** porque siempre habéis mostrado interés en cómo me encontraba y estos últimos meses en cómo iba con la escritura. Al **Dr. Ignacio López Goñi** muchas gracias porque hace 9 años, cuando aún eras decano de la facultad de ciencias regalaste el libro de "más grandes que el amor" a todos los alumnos que empezaban la carrera de Biología. Entre ellos se encontraba mi hermano, que directamente me lo dio a mí. Ese libro y la asignatura que impartes junto a la **Dra. Maite Iriarte** en segundo de carrera fueron mi primer contacto con la microbiología y los que han determinado que me quiera dedicar a este mundo apasionante. A la **Dra. Raquel Conde**, Raquel *sénior* para los amigos, muchas gracias por resolver mis dudas sobre el LPS.

Quiero dar también las gracias a mi compañero de grupo **Sergio** por todas las horas que hemos compartido en el animalario y por la ayuda que me has prestado con los últimos experimentos. Te quedas al mando del equipo GMT y el CDC reactor, estoy segura de que la corona no se te va a hacer pesada.

Muchas gracias al grupo *Brucella*, ese bacilo gramnegativo intracelular facultativo. A la **Dra. Amaia Zúñiga**, por los esfuerzos que haces para coordinar el Bioscreen, parece mentira que en dos años hayamos pasado por la fase del cartoncito, la fase de las goteras, la fase de los 3000 ° C, la fase de las bombillas y la fase de los picos. Muchas gracias también por acompañarme a los eventos del corte inglés, aquí tienes una lectora fija cuando abras tu blog de moda. A **Estrella**, mi vecina de mesa desde hace ¿tres años, cuatro años?, gracias por ser el cariño en persona y regalarnos a todos tus abrazos. Sabes que gracias a ti y a QQCCMH no volveré a ver los colacaos con los mismos ojos. Seguiremos en contacto para comentar Carlos. A **Miriam Salvador**, muchas gracias por los buenos ratos que hemos tenido en la 1, por escuchar cadena 100 conmigo y reírnos con Raphael y su gran noche, la fea de Fito, la gorda de Coti y el cumpleaños del día y nuestros intentos por que nos cogiesen el teléfono, me parece que nuestra relación ha estado marcada por la música y la radio y eso mola. A **Leticia**, muchas gracias por todos los momentos que hemos compartido fuera del laboratorio, el desfile de Baluarte y el congreso de Logroño. Gracias también

por alegrarnos los días con tus famosas Leticiadas, el día que desapareciste sin dejar rastro fue épico. A **Lara**, muchas gracias por los buenos ratos, me acuerdo especialmente de cuando nos perdimos con mi coche yendo a una de las excursiones del departamento, en ese momento lo pasé fatal, pero ahora se ha convertido en una anécdota genial de por qué no hay que fiarse del google maps. A **Bea**, la nueva incorporación del grupo, muchísima suerte en esta etapa que comienzas, no sabes la suerte que tienes de haber caído en este departamento, lo vas a disfrutar un montón y me das cierta envidia.

Muchas gracias al grupo de Leishmania. A la **Dra. Celia Fernández** por todo lo que nos reímos con los programas de cuatro y las historias que nos cuentas de tus gatos y de Olivia. A **Miriam Algarabel**, por el tiempo que hemos pasado fuera del laboratorio, por los concursos de pintxos y los ratitos en los distintos pisos. Por último, mucha suerte a **PPPña** con el máster y con el proyecto.

Muchas gracias al grupo de *Shigella*, a **Marijo** por todos los fines de semana trabajando que hemos compartido, por todo lo que me he reído haciéndonos las importantes por CH y los eventos en el corte inglés. A **Matías** muchas gracias por la excursión a Hossegor y el concurso de pintxos. Mucha suerte a **Yadira** con la nueva etapa que empiezas, seguro que es brillante.

Muchas gracias también a todos los que ya se han ido, a **Naiara, Leyre, Yoli, María Pardo**. Al **Dr. Iosu Rázquin** o 105U, muchas gracias por hacerme más entretenidas las horas en la campana con esas sinergias a 4 manos uno haciendo diluciones y el otro preparando inóculo. A la **Dra. Juliana de Souza** muchas gracias por los buenos ratos, por jugar a la bolsa conmigo y descubrirme que *O cacahuete é un microorganismo muito pequeno*. A la **Dra. Ana Camacho**, mi vecina de la derecha, muchas gracias porque siempre he podido contar contigo como cómplice de mi titulitis y eventitis. Loewe, Acosta, Microbios&co., Bobbi Brown. Gracias por esos momentos gagagaga, esas pilladas embarazosas de: holaaaaaa... y esos ataques de risa cuando empezamos a silbar una canción a la vez. Sabes que tenemos pendiente Balenciaga y Nimes. Al **Dr. Pedro Soler** muchas gracias por hacerme siempre caso cuando quería hacer un parón para descansar. Estos años han sido mucho más entretenidos porque has estado tu, dentro y fuera del laboratorio, antes y después de que acabases la tesis. Gracias por presentarme a Christopher, el artista de la familia y el operador de telefónica, tu capacidad para imitar voces e *a un otro nivel*. Sabes que la canción de Euphoriiiiiaaaa!!! Va a estar irremediabilmente asociada a ti. Me alegro de que tengamos proyectos en común aún en la era postdoc.

Agradecimientos

Al equipo de microbiología de los alimentos del CIFA, muchas gracias por toda la ayuda que me habéis prestado en estos años. Muchas gracias a la **Dra. Anabel Vitas** y al **Dr. David González**, tú y **Susana** sois mis referentes en docencia y en pasión por la profesión. A la **Dra. Elena Ojer**, tienes mi admiración eterna por haber sido capaz de compatibilizar la tesis con dos niños pequeños, estoy convencida de que la clave ha sido una organización exquisita y un marido de diez. A **María Diez** muchas gracias por tener siempre una palabra amable e interesarte por mi tesis.

Muchas gracias también a todo el equipo de la CUN, especialmente al **Dr. Leiva**, al **Dr. José Luis del Pozo**, a la **Dra. Mirian Fernández**, a la **Dra. Melania Íñigo**, al **Dr. César Bustos**, a **Marisol Escolano**, a **Ana Zapata**, a **Miguel Ángel Casares** a **Marcelo Fernández** y a **Leticia Armendáriz** por que todos en algún momento dado me habéis echado un cable y por todo lo que me habéis enseñado en las prácticas.

*To all the international students that have worked in this lab throughtout the years, **Marianne, Sabrina, Hendrick, Amy, Conor, Connor, Parastoo, Gaby, Mammar, Ferial, Daisy, Marie, Katya and Betty**, it's been a pleasure working with you.*

Muchas gracias a los **alumnos internos, TFGs y RTPs**, porque aunque no os dais cuenta contribuís al buen ambiente de este departamento. Quiero recordar especialmente a **Roberto** con el que me inicié en el mundo de los *biofilms* y del CDC reactor, muchas gracias por los consejos para tramitar la estancia y el alojamiento en Montana.

Al equipo del *Center for Biofilm Engineering* de Bozeman (Montana), **Analí, Fede, Luisa, Muneeb, Shinya, Chiachi, Andrea, Dan, Erika y Rosa**, gracias por acogerme a mi llegada a Montana e integrarme en el grupo de las *Athletic girls*. **Professor Phil Steward, Betsey, Breana y Amanda**, gracias por enseñarme todo el funcionamiento del laboratorio y mostrar interés por mi trabajo.

Muchas gracias a mis amigos de Pamplona, **Carmen, Tony, María y Manué**, muchas gracias por esos concursos de pintxos y viajes a Logroño que me han ayudado a desconectar en más de una ocasión. Tenemos que hacer más para que por fin podamos probar las famosas aceitunas maceradas. **Manu**, ese efecto de Llera esta tardando demasiado esta vez, a ver cuando te mandan a trabajar para el norte que te echamos de menos. **Macarena** sabes que tengo que agradecerte una cosa en particular, creo que a eso puedes añadir el año que pasaste aquí haciendo el máster,

disfruté muchísimo de esas tardes de sofá y charlas. **Carmen**, muchas gracias por demostrarme que las cosas que merecen la pena requieren grandes esfuerzos.

A **Andrés**, muchas gracias por hacerme un poquito más feliz cada día, por ser infinitamente paciente conmigo, por perdonarme todos mis defectos y por escucharme cuando el agobio me ha podido. Estoy súper orgullosa de ti y voy a echar mucho de menos no verte 8 horas al día.

Finalmente, muchas gracias a mi **familia**. Esta tesis ha salido adelante en muchas ocasiones gracias al tiempo que no os he dedicado a vosotros. Gracias a mis padres por el esfuerzo que han hecho para darme esta educación, a mis hermanos Rubén y Laura y a mis abuelos.

Gracias, en definitiva, a todos, por ayudarme a escribir un libro que ha requerido cuatro años de documentación.

ABREVIATURAS

AFB: Ácido fenilborónico

AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico

ANEPID: *Antimicrobial endotoxin neutralizing peptides to combat infectious diseases*

ASTM: *American Standards for testing materials*

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATM: Aztreonam

ATP: Adenosín trifosfato

AZM: Azitromicina

BLEA: β -lactamasa de espectro ampliado

BLEE: β -lactamasa de espectro extendido

CAZ: Ceftazidima

CBR: *CDC Biofilm Reactor*

CCMI: Cociente de CMI

CDC: *Center for Disease Control*

cDNA: DNA complementario

CECT: Colección española de cultivos tipo

CLA: Ácido clavulánico

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMB: Concentración mínima bactericida

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CRO: Ceftriaxona

CTX: Cefotaxima

CUN: Clínica Universidad de Navarra

CV: Cristal violeta

Dab: Ácido diaminobutírico

DAP: Daptomicina

DEPC: Dietil-pirocarbonato

DH50: Dosis hemolítica 50

DH80: Dosis hemolítica 80

DL: Dosis letal

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DO: Densidad óptica

DOc: Densidad óptica de corte

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ELWD: *Extra Long Working Distance*
EPI: Inhibidor de bombas de expulsión activa
FEP: Cefepime
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
GAIN: *Generating Antibiotic Incentives Now*
HEPES: Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico
IC50: Concentración inhibitoria 50
IC80: Concentración inhibitoria 80
ICIF: Índice de concentración inhibitoria fraccionada
IDR: *Innate defense regulator*
LB: Luria-Bertani
LPS: Lipopolisacárido
LVX: Levofloxacino
MATE: *Multidrug and Toxic compound Extrusion family*
MFS: *Major Facilitator Superfamily*
MHCA: Mueller-Hinton con cationes ajustados
MHNA: Mueller-Hinton sin ajuste de cationes divalentes
MRSA: *methicillin resistant S. aureus*
MTT: 4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro
NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine
NPN: N-fenil-1-naftilamida
OCT: *Optimal Cutting Temperature compound*
PAβN: Phe-Arg-β-naphthylamide
PB: *Buffer* fosfato
PBPs: *Penicillin-binding-proteins*
PBS: *Buffer* fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PIP: Piperacilina
PMB: Polimixina B
PMBN: Polimixina B Nonapéptido
PME: Polimixina E, colistina
PMEN: Polimixina E Nonapéptido
PRAN: Plan Nacional Resistencia Antibióticos
proC: Pirrolina-5-carboxilato reductasa
QRDR: *Quinolone resistance-determining region*

QSAR: Relación estructura química-actividad

RL: Reducción logarítmica

RNA: Ácido ribonucleico

RND: *Resistance-nodulation-cell division*

RPM: Revoluciones por minuto

RTqPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

TAZ: Tazobactam

TRITC: Isotiocianato de tetrametil-rodamina

TSA: *Trypticase Soy Agar*

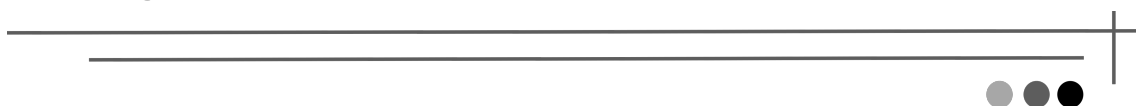
TSB: *Trypticase Soy Broth*

UFC: Unidades formadoras de colonias

VA: Vancomicina

VRSA: *Vancomycin resistant S. aureus*

ÍNDICE



	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	5
1. El problema de la resistencia antimicrobiana.....	7
2. Bacilos gramnegativos: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i>	8
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.1.1. Características generales y patogenicidad.....	8
2.1.2. Tratamiento de elección.....	9
2.1.3. Resistencia antibiótica.....	10
2.2. Enterobacterias.....	11
2.2.1. Características generales y patogenicidad.....	11
2.2.2. Tratamiento de elección.....	12
2.2.3. Resistencia antibiótica.....	13
3. Cocos grampositivos: <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.1. Características generales y patogenicidad.....	15
3.2. Tratamiento de elección.....	16
3.3. Resistencia antibiótica.....	16
4. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.....	17
4.1. Baja permeabilidad.....	18
4.2. Bombas de expulsión activa.....	19
4.3. Enzimas modificantes.....	21
4.4. Modificaciones de la diana antibiótica.....	24
5. <i>Biofilms</i> bacterianos.....	25
5.1. Estrategias frente a los <i>biofilms</i>	28
5.1.1. Soluciones de sellado antibiótico.....	29
6. Péptidos antimicrobianos.....	31
6.1. Distribución.....	31
6.2. Lactoferrina y lactoferricina.....	32
6.3. Mecanismo de acción antibacteriano.....	33
6.4. Mecanismos de resistencia a los péptidos antimicrobianos.....	34
6.5. Polimixinas.....	35

6.5.1. Colistina y PMB	35
6.5.2. Nonapéptidos de Polimixina (PMBN y PMEN).....	36
7. Inhibidores y combinaciones antimicrobianas	36
7.1. Inhibidores de β -lactamasas	37
7.1.1. Inhibidores de BLEEs.....	37
7.1.2. Inhibidores de AmpC.....	38
7.1.3. Nuevos inhibidores.....	39
7.2. Combinaciones β -lactámico/inhibidores de β -lactamasas	39
7.3. Inhibidores de bombas de expulsión activa	41
7.3.1. PA β N y NMP	42
7.4. Combinaciones de antibióticos con inhibidores de bombas de expulsión	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODOS	49
1. Cepas y condiciones de crecimiento	51
2. Antibióticos, inhibidores de enzimas y de bombas de expulsión.....	52
3. Péptidos antimicrobianos	52
4. Evaluación de la toxicidad de los péptidos antimicrobianos.....	53
4.1. Capacidad hemolítica	53
4.2. Capacidad citotóxica	54
5. Caracterización de las cepas	55
5.1. Detección fenotípica de la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs)	55
5.2. Detección genotípica de la expresión de <i>ampC</i> y <i>mexB</i>	56
5.2.1. Extracción del RNA	56
5.2.2. Retrotranscripción del RNA.....	57
5.2.3. Cuantificación mediante RTqPCR.....	57
5.3. Capacidad formadora de <i>biofilm</i>	59
6. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana en células planctónicas.....	60
6.1. Determinación de CMI y CMB	60
6.2. Estudios de sinergia.....	60
6.2.1. Cuantificación de sinergia en combinaciones de dos antimicrobianos: Método de <i>checkerboard</i>	60
6.2.2. Cuantificación de la capacidad permeabilizante de los péptidos antimicrobianos	62
6.2.3. Cuantificación de sinergia en combinaciones de tres antimicrobianos	62

6.3. Estudio de la cinética inhibitoria de las combinaciones mediante Bioscreen C....	64
6.4. Curvas de letalidad	64
7. Ensayos de fluorimetría con N-fenil-1-naftilamina (NPN).....	65
8. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana de <i>biofilms</i> bacterianos	66
8.1. En condiciones estáticas	66
8.1.1. Cálculo de la destrucción y la desinfección.....	66
8.1.1.1. Cálculo de la desinfección	66
8.1.1.2. Cálculo de la destrucción.....	66
8.1.2. Cálculo de la inhibición.....	67
8.2. En condiciones de flujo turbulento mediante reactor CDC	67
8.2.1. Diseño del sistema	67
8.2.2. Desarrollo del <i>biofilm</i>	69
8.2.3. Exposición a los antimicrobianos	69
8.2.4. Procesamiento de los discos.....	70
8.2.4.1. Recuentos.....	70
8.2.4.2. Microscopía	71
8.2.4.2.1. Microscopía de fluorescencia.....	71
8.2.4.2.2. Criosecciones.....	71
8.2.4.2.3. Microscopía láser confocal.....	72
RESULTADOS	73
1. Caracterización de la actividad antimicrobiana y permeabilizante de péptidos derivados de la lactoferricina humana	75
1.1. Construcción de la librería peptídica y caracterización de la actividad permeabilizante	75
1.2. Actividad antimicrobiana	78
1.3. Actividad hemolítica y citotoxicidad de los péptidos	80
2. Potenciación de inhibidores de β -lactamasas mediante péptidos antimicrobianos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con AmpC desreprimida.	83
2.1. Selección de cepas.....	83
2.2. Cribado de combinaciones sobre la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Δ D	86
2.3. Confirmación de la eficacia de la terapia sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4	92

2.4. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 sometido a potenciación de inhibidores de β -lactamasas.....	94
2.5. Cinética de muerte de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 sometida a potenciación de inhibidores de β -lactamasas.....	97
2.6. Interacción de la sonda NPN con células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 sometidas a potenciación de inhibidores de β -lactamasas.....	98
2.7. Evaluación de la potenciación de inhibidores de β -lactamasas en la cepa resistente a colistina <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN Ps74	99
2.8. Evaluación de la potenciación de inhibidores de β -lactamasas sobre <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivados en microplaca.....	100
2.9. Evaluación de la potenciación de inhibidores de β -lactamasas sobre <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivados en CDC reactor	104
3. Potenciación de inhibidores de β -lactamasas mediante péptidos antimicrobianos en <i>Enterobacterias</i> productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	111
3.1. Selección de cepas de enterobacterias productoras de BLEE.....	111
3.2. Evaluación de la potenciación de inhibidores de β -lactamasas sobre enterobacterias productoras de BLEE.....	114
3.3. Cinética de crecimiento de enterobacterias productoras de BLEE sometidas a potenciación de inhibidores de β -lactamasas.....	117
3.4. Evaluación de la potenciación de inhibidores de β -lactamasas sobre <i>biofilms</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> cultivado en CDC reactor	119
4. Potenciación de inhibidores de bombas de expulsión activa mediante péptidos antimicrobianos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con sobreexpresión de la bomba MexAB-OprM.....	121
4.1. Selección de antibióticos y cepas.....	121
4.2. Cribado de combinaciones sobre el mutante <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LC1-6. .	124
4.3. Confirmación de la eficacia de la terapia sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4	127
4.4. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 sometido a potenciación de inhibidores de bombas de expulsión.....	128
4.5. Evaluación de la potenciación de inhibidores de bombas de expulsión sobre <i>biofilm</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 cultivado en CDC reactor	129

5. Desarrollo de combinaciones de amplio espectro basadas en la potenciación de antibióticos mediante péptidos antimicrobianos	130
5.1. Selección de antibióticos y de cepas bacterianas	130
5.2. Evaluación de la potenciación de antibióticos sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y MRSA por la acción de péptidos antimicrobianos.	131
5.3. Cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 en presencia de combinaciones de PMBN y antibióticos	133
5.4. Evaluación de la potenciación de antibióticos sobre <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivados en el reactor CDC	136
DISCUSIÓN	141
1. Sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con hiperexpresión constitutiva de AmpC a una combinación de un β -lactámico sustrato de esa enzima y un inhibidor de esa β -lactamasa, siendo dicha combinación inactiva en ausencia de permeabilizante	141
2. Sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con hiperexpresión constitutiva de AmpC a una combinación de un β -lactámico sustrato de esa enzima y un inhibidor de betalactamasas de una clase distinta de la C.....	146
3. Sensibilizar a cepas productoras de BLEE a una combinación de un β -lactámico sustrato de esa enzima y un inhibidor de esa β -lactamasa, siendo dicha combinación inactiva en ausencia de permeabilizante	147
4. Sensibilizar a cepas con hiperexpresión de bombas de expulsión a una combinación de un antibiótico sustrato de ese mecanismo y un inhibidor de esa bomba, siendo la combinación inactiva en ausencia de permeabilizante	149
5. Sensibilizar a bacterias gramnegativas a antibióticos empleados frente a grampositivos.....	151
CONCLUSIONS	155
BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXO	179
APÉNDICE	183

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Los diez microorganismos aislados con más frecuencia en pacientes con neumonía relacionada con ventilación mecánica en unidades de cuidados intensivos de España en 2014.9

Tabla 2: Los diez microorganismos más frecuentemente aislados en infecciones urinarias relacionadas con sonda uretral en las unidades de cuidados intensivos de España en 2014.11

Tabla 3: Los diez microorganismos más frecuentemente aislados en bacteriemias adquiridas en unidades de cuidados intensivos de los países de la Unión Europea en 2012.....12

Tabla 4: Clasificación combinada de las β -lactamasas.22

Tabla 5: Características de algunas terapias de sellado antibiótico clasificadas según la etiología de la infección.30

Tabla 6: Características relevantes de las cepas empleadas.....51

Tabla 7: Secuencia de los péptidos empleados y del péptido parental LF11.....53

Tabla 8: Secuencias y características relevantes de los cebadores empleados.....58

Tabla 9: Interpretación de los resultados obtenidos en la técnica RTqPCR.....59

Tabla 10: Clasificación de las cepas según su capacidad de adherencia.....60

Tabla 11: Actividad potenciadora de novobiocina de péptidos derivados de la lactoferricina humana P2 y del nonapéptido de polimixina B en *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4.....76

Tabla 12: Actividad potenciadora de novobiocina de péptidos derivados de la lactoferricina humana P4 y P5 en *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4.....78

Tabla 13: Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida de la polimixina B y de péptidos antimicrobianos derivados de la lactoferricina humana frente a patógenos humanos con características estructurales y patogénicas diversas.....80

Tabla 14: Actividad hemolítica y citotóxica de los péptidos derivados de la lactoferricina humana sobre eritrocitos y fibroblastos humanos.....82

Tabla 15: Antibiograma de aislamientos clínicos y de cepas de laboratorio de constitución genética conocida de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
Tabla 16: Clasificación de la capacidad formadora de <i>biofilm</i> de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en estudio.....	85
Tabla 17: Capacidad de PMBN para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAΔD a combinaciones de β-lactámicos e inhibidores de β-lactamasas.	87
Tabla 18: Capacidad de PMBN para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAΔD a combinaciones de piperacilina e inhibidores de β-lactamasas.....	88
Tabla 19: Capacidad de PMBN para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAΔD a combinaciones de ceftazidima e inhibidores de β-lactamasas.....	89
Tabla 20: Capacidad del nonapéptido de la colistina (PMEN) para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAΔD a combinaciones de ceftazidima e inhibidores de β-lactamasas.	90
Tabla 21: Capacidad de péptidos derivados de lactoferricina humana para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAΔD a combinaciones de ceftazidima y aztreonam.....	91
Tabla 22: Capacidad de péptidos derivados de lactoferricina humana para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAΔD a combinaciones de ceftazidima y ácido fenilborónico.	91
Tabla 23: Capacidad de PMBN o PMEN para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 a combinaciones de ceftazidima e inhibidores de β-lactamasas.	93
Tabla 24: Capacidad de péptidos derivados de la lactoferricina humana para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 a combinaciones de ceftazidima y de ácido fenilborónico.....	94
Tabla 25: Capacidad de péptidos derivados de la lactoferricina humana para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 a combinaciones de ceftazidima y aztreonam.....	94
Tabla 26: Capacidad de PMBN para sensibilizar a una cepa resistente a colistina, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN Ps74, a combinaciones de ceftazidima y de inhibidores de β-lactamasas.....	100

Tabla 27: Capacidad de los compuestos en estudio para destruir, desinfectar e inhibir el <i>biofilm</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 cultivado en condiciones estáticas en microplaca.	101
Tabla 28: Capacidad de destrucción, desinfección e inhibición de una combinación ceftazidima-aztreonam-PMBN a concentraciones crecientes sobre <i>biofilm</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 cultivado en condiciones estáticas en microplaca.	102
Tabla 29: Capacidad de destrucción, desinfección e inhibición de una combinación ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN a concentraciones crecientes sobre <i>biofilm</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 cultivado en condiciones estáticas en microplaca.	103
Tabla 30: Capacidad de inhibición de <i>biofilm</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 de péptidos derivados de la lactoferricina humana ensayados a concentraciones por debajo de su CMI planctónica.	104
Tabla 31: Clasificación de la capacidad formadora de <i>biofilm</i> de las cepas de <i>Escherichia coli</i> o <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de BLEE mediante el test en microplaca.	113
Tabla 32: Antibiograma de los aislamientos clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Escherichia coli</i> productores de BLEE seleccionados para este estudio.	114
Tabla 33: Capacidad de PMBN para sensibilizar a la cepa productora de BLEE, <i>Escherichia coli</i> CUN E20, a combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas.	116
Tabla 34: Capacidad de PMBN para sensibilizar a la cepa productora de BLEE, <i>Klebsiella pneumoniae</i> CUN K2, a combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas.	116
Tabla 35: Antibiograma de un aislamiento clínico y de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de constitución genética conocida.	122
Tabla 36: Clasificación de la capacidad formadora de <i>biofilm</i> de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de este estudio.	124
Tabla 37: Capacidad de PMBN para sensibilizar a <i>P. aeruginosa</i> LC1-6, a combinaciones de antibióticos sustrato de MexAB-OprM e inhibidores de sistemas de expulsión (NMP o PA β N).	126

Tabla 38: Capacidad de PMBN para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4, a combinaciones de antibióticos sustrato de MexAB-OprM y al inhibidor del sistema de expulsión PA β N.....	127
Tabla 39: Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas empleadas en este estudio, un aislamiento clínico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y dos cepas resistentes a meticilina de <i>Staphylococcus aureus</i>	131
Tabla 40: Capacidad de PMBN o de PMEN para sensibilizar a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 a distintas clases de antibióticos.	132
Tabla 41: Capacidad de PMBN para sensibilizar a <i>Escherichia coli</i> CUN E20 y <i>Klebsiella pneumoniae</i> CUN K2 a distintas clases de antibióticos.....	132
Tabla 42: Evaluación de la actividad sinérgica de la colistina en combinación con varios antibióticos sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4.	132
Tabla 43: Evaluación de la actividad sinérgica de PMBN en combinación con distintas clases de antibióticos frente a dos cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de aislamiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenems en 2014 en Europa.10

Figura 2: Evolución del porcentaje de aislamientos de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación en Europa a lo largo de 4 años.14

Figura 3: Porcentajes de aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación en Europa en 2014.15

Figura 4: Porcentajes de aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) en Europa en 2014.17

Figura 5: Principales mecanismos de resistencia empleados por las bacterias para neutralizar la acción de los antimicrobianos.18

Figura 6: Infecciones más comunes relacionadas con *biofilms* en el ser humano.26

Figura 7: Estrategias frente a los *biofilms*.29

Figura 8: Algoritmo de decisión terapéutica para bacteriemias asociadas a catéter.
.....31

Figura 9: Modelos de poros que los péptidos antimicrobianos pueden hipotéticamente formar en membranas bacterianas.34

Figura 10: Estructura molecular de PMB, PMBN, colistina (PME) y PMEN.35

Figura 11: Posibles mecanismos de acción de los inhibidores de β -lactamasas de clase A.38

Figura 12: Configuración esquemática de la técnica de “checkerboard” en dos dimensiones. Las concentraciones de cada antimicrobiano disminuyen en la dirección de la flecha.61

Figura 13: Esquema de la disposición de los componentes en estudio en la técnica de “checkerboard” en tres dimensiones. Las concentraciones de cada antimicrobiano disminuyen en la dirección de la flecha.63

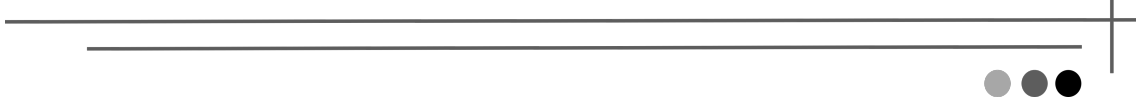
Figura 14: Esquema del *Center for Disease Control (CDC) biofilm reactor (CBR)*.
.....68

Figura 15: Esquema del *Center for Disease Control (CDC) biofilm reactor (CBR)* para el cultivo de *biofilms*.69

Figura 16: Ensayo de doble difusión en agar.	84
Figura 17: Expresión relativa del gen <i>ampC</i> en las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en estudio respecto de los niveles medidos en la cepa de referencia PAO1.....	85
Figura 18: Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (Bioscreen) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 sometido a potenciación de inhibidores de β -lactamasas.	96
Figura 19: Cinética de muerte de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 sometido a potenciación de inhibidores de β -lactamasas.....	97
Figura 20: Cinética de incorporación a la membrana de la sonda 1- <i>N</i> -phenylnaphthylamine en células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 sometidas a potenciación de inhibidores de β -lactamasas.....	99
Figura 21: Examen microscópico de <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 no expuestos a agentes antimicrobianos teñido con Syto 9 y yoduro de propidio.	105
Figura 22: Actividad bactericida en medio MHCA de combinaciones de antimicrobianos sobre <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 cultivados en el reactor CDC en condiciones de flujo turbulento.....	106
Figura 23: Evaluación mediante microscopía confocal de la actividad bactericida del tratamiento ceftazidima/ácido fenil borónico/PMBN a 50 veces su CMI planctónica sobre <i>biofilm</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 cultivado en reactor CDC en condiciones de flujo turbulento.	107
Figura 24: Actividad bactericida en <i>buffer</i> fosfato de combinaciones de antimicrobianos sobre <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 cultivados en el reactor CDC en condiciones de flujo turbulento.....	108
Figura 25: Actividad bactericida en <i>buffer</i> fosfato durante 72 h de los lipopéptidos colistina y PMB sobre <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 cultivados en el reactor CDC en condiciones de flujo turbulento.	110
Figura 26: Crecimiento de las cepas clínicas <i>Escherichia coli</i> CUN E20 y <i>Klebsiella pneumoniae</i> CUN K2 en las placas selectivas para bacterias BLEE positivas, test de sinergia de doble disco y test de disco combinado.	112
Figura 27: Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (Bioscreen) de dos enterobacterias productoras de BLEE sometidas a potenciación de inhibidores de β -lactamasas.	118

Figura 28: Actividad bactericida en <i>buffer</i> fosfato durante 72 h de combinaciones de antimicrobianos sobre <i>biofilms</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> CUN K2 cultivados en el reactor CDC en condiciones de flujo turbulento.	120
Figura 29: Expresión relativa del gen <i>mexB</i> en las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en estudio respecto de los niveles medidos en la cepa de referencia PAO1.	123
Figura 30: Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (Bioscreen) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 sometida a potenciación de un inhibidor de la bomba de expulsión MexAB-OprM.	128
Figura 31: Actividad bactericida en <i>buffer</i> fosfato durante 72 h de combinaciones de antimicrobianos sobre <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 cultivados en el reactor CDC bajo condiciones de flujo turbulento.	129
Figura 32: Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (Bioscreen) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 en presencia de combinaciones de antimicrobianos.	135
Figura 33: Actividad bactericida en <i>buffer</i> fosfato durante 72 h de combinaciones de antimicrobianos sobre <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4 cultivados en el reactor CDC en condiciones de flujo turbulento.	137

ABSTRACT



Resistance to antibiotics poses a “major global threat” to public health according to World Health Organization. The increasing emergence of bacterial clones insensitive to these drugs greatly limits the therapeutic options for infectious diseases and highlights the urgent need to develop novel treatments effective against these organisms. In the present work, we demonstrated that subinhibitory concentrations of certain antimicrobial peptides can neutralize several antibiotic resistance mechanisms expressed by Gram-negative multi-drug resistant pathogens such as *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* (“ESKAPE” pathogens) and *Escherichia coli*. This enhancement of antibiotic activity resulted in the sensitization of these organisms to several antibiotic classes.

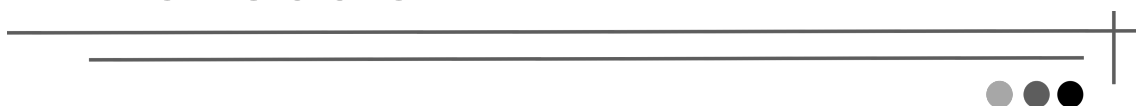
We hypothesized that antimicrobial peptides could potentiate the activity of inhibitors of either β -lactamases or antibiotic efflux pump systems and sensitize bacteria to antibiotics substrate of those resistance mechanisms. To test this hypothesis we measured the ability of peptides to synergize with those antibiotics in the presence of selected inhibitors of those systems. As peptides, we used the nonapeptides of polymyxin B and polymyxin E (PMBN and PMEN), as well as a peptide library derived from human lactoferricin with improved bacterial permeabilizing activity and very low toxicity towards human cells. To characterize the antimicrobial efficiency of the combinations, we used an array of techniques including conventional MIC/MBC testing, checkerboard analysis, growth kinetics, killing curves, and anti-biofilm activity against biofilms measured by confocal microscopy and viable counts on biofilms grown under static (on microplates) and dynamic (in a CDC-reactor) flow regimes. Using planktonic cultures, we demonstrated that, PMBN was able to greatly enhance the activity of several (i) β -lactamase inhibitors in a β -lactamase AmpC overproducing *P. aeruginosa* strain (potentiating the activity of amoxicillin, ampicillin, ticarcillin, piperacillin and ceftazidime), (ii) β -lactamase inhibitors in ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains (sensitizing them to ampicillin, amoxicillin, ticarcillin and piperacillin) and (iii) efflux pump inhibitors in a MexAB-OprM pump *P. aeruginosa* overproducing strain (enhancing the activity of aztreonam, ceftazidime, doxycycline, levofloxacin, piperacillin and azithromycin). In addition, all the triple combinations selected were able to cause a 10-100 million fold reduction in the viability of biofilm forming cells.

Finally, we showed that these antimicrobial peptides can potentiate not only resistance mechanism inhibitors (β -lactamases and efflux pumps), but they can also enhance the activity of several antibiotics that specifically target Gram-positive bacteria (i.e. vancomycin), sensitizing *P. aeruginosa*, *E. coli* and *K. pneumoniae* to them. This

Abstract

strategy allows the use of these combinations as empirical therapy with a broad spectrum of activity.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. El problema de la resistencia a los antimicrobianos

La creciente proliferación de patógenos resistentes a los antimicrobianos constituye uno de los problemas sanitarios más graves al que se enfrenta la humanidad. La Organización Mundial de la Salud ha definido a las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos como la mayor amenaza en el siglo XXI a los logros de la medicina moderna (World Health Organization 2014). Las bacterias resistentes reducen dramáticamente las posibilidades de tratar enfermedades infecciosas, lo que conlleva un aumento de la mortalidad, del riesgo de complicaciones severas y del tiempo de ingreso hospitalario. Sólo en Europa, este tipo de microorganismos causa cada año 400.000 infecciones y 25.000 muertes, dos tercios de ellas debidas a bacterias gramnegativas (European Centre for Disease Prevention and Control 2014). Se ha estimado que la morbi-mortalidad causada por bacterias resistentes a los antibióticos supone un aumento de los costes sanitarios de 1500 millones de euros anuales en los países europeos (European Centre for Disease Prevention and Control 2014).

Mientras que las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias grampositivas, como *Staphylococcus aureus*, se han ampliado considerablemente en los últimos años, hay una urgente necesidad de desarrollar nuevos fármacos eficaces frente a patógenos gramnegativos. En particular, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, y varias especies de enterobacterias, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* o *Enterobacter spp.* están rápidamente desarrollando resistencia a casi todos los antimicrobianos disponibles en la actualidad (Livermore 2012). Aunque se han introducido recientemente algunos antibióticos con nuevos mecanismos de acción, como linezolid y daptomicina, es de destacar que estos compuestos químicos (oxazolidinonas y lipopéptidos) se identificaron en 1978 y 1987, respectivamente (Silver 2011; Bettiol and Harbarth 2015). Por desgracia, el espectro de acción de estos antibióticos se restringe a patógenos grampositivos.

En los últimos años se han puesto en marcha iniciativas encaminadas a fomentar el desarrollo de nuevos antibióticos. Así, el congreso de los Estados Unidos aprobó en 2011 el acta *Generating Antibiotic Incentives Now* (GAIN), mientras que las autoridades europeas han creado la iniciativa *Combating Bacterial Resistance in Europe*, dentro del programa *New Drugs 4 Bad Bugs* (Buynak 2013). Estos programas conceden importantes ventajas e incentivos económicos a las empresas que se implican en el desarrollo y comercialización de nuevos antimicrobianos. También en

España se ha puesto recientemente en marcha el Plan Nacional Resistencia Antibióticos (PRAN), un programa que coordina la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios y que cuenta con la colaboración de seis ministerios (Sanidad, Agricultura, Economía, Interior, Defensa y Educación) y todas las comunidades autónomas. Este plan tiene las siguientes líneas estratégicas: vigilar el consumo y resistencia a los antibióticos, controlar la diseminación de los microorganismos resistentes, impulsar medidas de prevención y tratamiento, establecer cuáles son las prioridades en materia de investigación, formar a los profesionales sanitarios y sensibilizar a la población.

2. Bacilos gramnegativos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*.

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1. Características generales y patogenicidad

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo no fermentador de la lactosa que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Esta especie bacteriana es aerobia, móvil y ubicua en los ambientes húmedos, por lo que se encuentra en la tierra y en el agua.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista de plantas, animales y humanos y es uno de los principales agentes causantes de infecciones en pacientes hospitalizados (Starkey and Rahme 2009). Las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria según su localización se clasifican en un 17% urinarias, un 26% quirúrgicas, un 20% respiratorias y un 14% bacteriemias y asociadas a catéter (Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene 2015). Entre las infecciones más frecuentes que provoca este microorganismo se encuentran la neumonía relacionada con la asistencia sanitaria, (incluyendo neumonía asociada a ventilación), así como infecciones del tracto urinario y bacteriemias (Tablas 1, 2 y 3). Además, *P. aeruginosa* también puede causar infecciones de la piel como foliculitis y otitis externa en pacientes inmunocompetentes. Finalmente, este patógeno es, junto con *Staphylococcus aureus*, el microorganismo que se aísla con más frecuencia de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística (Pompilio et al. 2012). En estos pacientes, *P. aeruginosa* coloniza de manera crónica el árbol traqueobronquial y causa complicaciones severas como neumonías. Se ha demostrado que la capacidad de *P. aeruginosa* para formar *biofilms* (ver apartado 5) en la mucosa respiratoria es esencial en la fisiopatología de la fibrosis quística (Pompilio et al. 2012).

Debido a su ubicuidad, a su enorme versatilidad metabólica y a su tolerancia

intrínseca a muchos detergentes, desinfectantes y compuestos antimicrobianos, *Pseudomonas aeruginosa* es muy difícil de controlar en el ambiente hospitalario. Se ha descrito que esta bacteria se encuentra habitualmente en unidades de quemados, de donde es prácticamente imposible de erradicar mediante los procedimientos de control convencionales (European Centre for Disease Prevention and Control 2014).

Tabla 1.- Los diez microorganismos aislados con más frecuencia en pacientes con neumonía relacionada con ventilación mecánica en unidades de cuidados intensivos de España en 2014. Datos de (Envin Helics 2015).

Microorganismo	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21,20
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,40
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,80
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6,60
<i>Escherichia coli</i>	6,00
<i>Haemophilus influenzae</i>	6,00
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4,60
<i>Enterobacter cloacae</i>	4,40
<i>Serratia marcescens</i>	4,00
<i>Proteus mirabilis</i>	2,60

2.1.2. Tratamiento de elección

Entre los tratamientos de primera línea para las infecciones causadas por *P. aeruginosa* destacan los basados en β -lactámicos (sobre todo, ceftazidima, cefepima, aztreonam y piperacilina/tazobactam), incluyendo a los carbapenems (imipenem, meropenem o doripenem). Además, *P. aeruginosa* puede ser susceptible a fosfomicina, fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina) y al péptido antimicrobiano colistina, también llamado polimixina E (Mensa et al. 2014) (ver apartado 6). Los aislamientos de *P. aeruginosa* son con frecuencia multiresistentes, es decir, resistentes a todos los agentes de dos o más clases de antibióticos definidos como β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas según la fundación de fibrosis quística de Estados Unidos (Saiman 2007). Esta característica exige ajustar el tratamiento al antibiograma, si éste está disponible.

Durante los últimos 10 años, la colistina ha destacado como uno de los antibióticos de último recurso para tratar infecciones severas causadas por *P. aeruginosa* multiresistente y en la mayoría de los casos como el único fármaco eficaz (Fariñas and Martínez-Martínez 2013; Rolain and Olaitan 2015). También se ha descrito que la terapia de combinación puede ser necesaria para tratar *P. aeruginosa* multiresistente y algunos autores han comprobado la eficacia de combinaciones como

polimixinas/carbapenems (Bergen et al. 2011; Zusman et al. 2013) y colistina/rifampicina (Timurkaynak et al. 2006). Recientemente, se ha aprobado el uso de la combinación ceftolozano/tazobactam. Esta combinación ha demostrado una destacada actividad frente a *P. aeruginosa* multiresistente (Bush 2015).

2.1.3. Resistencia antibiótica

El aislamiento de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a uno o varios antibióticos empleados en terapia anti-pseudomónica es común en Europa. En el último informe del ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control 2015) la mayor parte de los países informan de porcentajes de resistencia por encima del 10% en todos los grupos de antimicrobianos que están bajo vigilancia. Es especialmente preocupante el aumento de resistencia a carbapenems, que se ha descrito en un 18,3% de los aislamientos (Figura 1). Además, la resistencia combinada al menos a tres grupos de antimicrobianos aparece en un 14,9% de los aislamientos, mientras que ese mismo dato para los cinco grupos principales es de un 5,5% (European Centre for Disease Prevention and Control 2015).

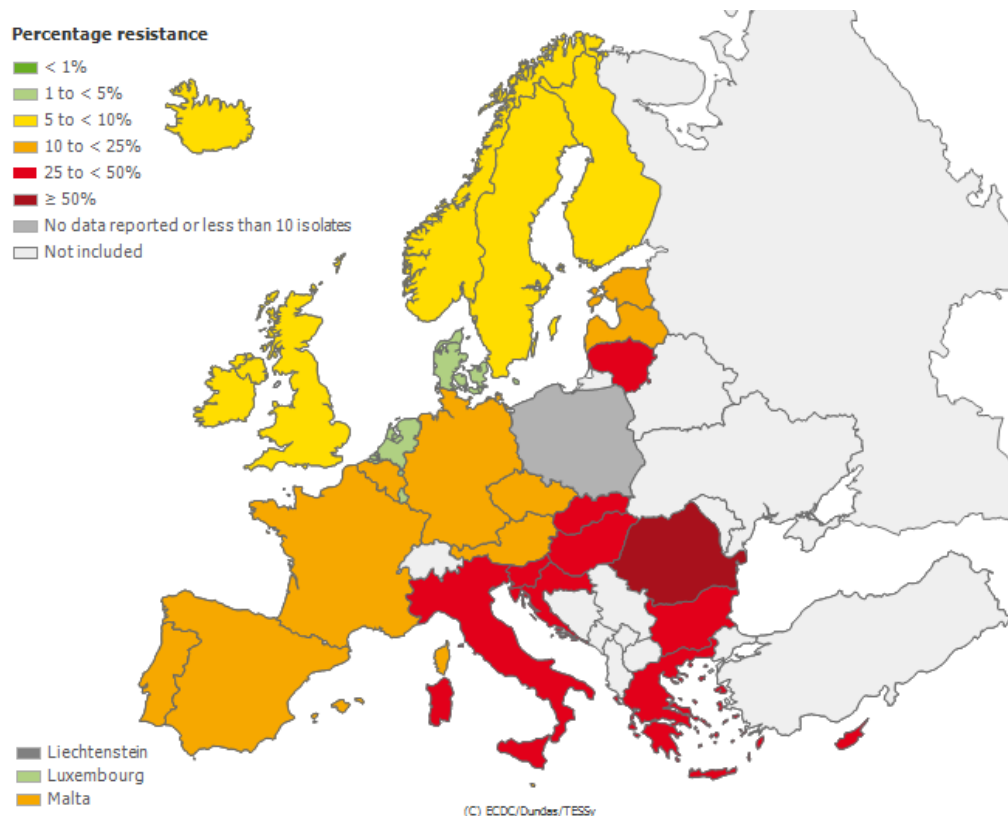


Figura 1.- Porcentaje de aislamiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenems en 2014 en Europa (Datos del ECDC).

2.2. Enterobacterias

2.2.1. Características generales y patogenicidad

Las enterobacterias son bacilos gramnegativos, móviles, anaerobios facultativos que carecen de citocromo C (oxidasa negativos) y tienen unos requerimientos nutricionales sencillos.

Escherichia coli es la bacteria gramnegativa que se aísla con mayor frecuencia de los hemocultivos de pacientes de cualquier edad. De hecho, esta bacteria es una de las principales causas de bacteriemias en Europa e infecciones del tracto urinario en España, tanto relacionadas con la asistencia sanitaria, como adquiridas en la comunidad (Tabla 2). Además, *E. coli* está frecuentemente implicada en infecciones post-quirúrgicas, peritonitis espontánea e infecciones de piel y tejidos blandos de etiología polimicrobiana. Finalmente, este microorganismo puede causar meningitis en neonatos y es uno de los principales agentes responsables de infecciones de origen alimentario en el mundo entero (European Centre for Disease Prevention and Control 2014; World Health Organization 2014).

Tabla 2.- Los diez microorganismos más frecuentemente aislados en infecciones urinarias relacionadas con sonda uretral en las unidades de cuidados intensivos de España en 2014. Datos de (Envin Helics 2015).

Microorganismo	%
<i>Escherichia coli</i>	29,30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,56
<i>Candida albicans</i>	9,82
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,77
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,42
<i>Enterococcus faecium</i>	5,26
<i>Proteus mirabilis</i>	3,86
<i>Candida glabrata</i>	3,16
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,93
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,40

Otra enterobacteria, *Klebsiella pneumoniae*, forma parte de la microbiota normal del intestino humano y de otros vertebrados, pero en individuos hospitalizados también se puede aislar de la piel, la orofaringe y las vías respiratorias altas. Esta bacteria puede causar infección invasiva severa que, a menudo, cursa con una infección intraabdominal o respiratoria. Además, *K. pneumoniae* es responsable de infecciones oportunistas en individuos inmunodeprimidos, como recién nacidos, pacientes con cáncer o diabetes, alcohólicos y pacientes hospitalizados con dispositivos permanentes de soporte vital. Las infecciones más frecuentes se dan en los tractos urinario y respiratorio y es común que este microorganismo provoque bacteriemia y

brotes nosocomiales (European Centre for Disease Prevention and Control 2014). De hecho, *K. pneumoniae* es el patógeno gramnegativo aislado con mayor frecuencia en bacteriemias y destaca entre los gramnegativos como el agente causante más habitual de bacteriemias adquiridas en unidades de cuidados intensivos de España (Tabla 3).

Tabla 3.- Los diez microorganismos más frecuentemente aislados en bacteriemias de origen desconocido y asociadas a catéter en unidades de cuidados intensivos de España en 2014. Datos de (Envin Helics 2015).

Microorganismo	%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25,85
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,73
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	7,73
<i>Enterococcus faecalis</i>	7,49
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,52
<i>Enterococcus faecium</i>	4,35
<i>Staphylococcus otros</i>	4,11
<i>Candida albicans</i>	3,62
<i>Candida parapsilopsis</i>	3,38
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3,14

La capacidad de *E. coli* y de *K. pneumoniae* para colonizar dispositivos médicos, como catéteres urinarios e intravenosos, depende en buena medida de su habilidad para adherirse a estas superficies inertes (mediada por adhesinas) y formar *biofilms* (ver apartado 5) (Stahlhut et al. 2012).

2.2.2. Tratamiento de elección

Entre los tratamientos de elección para las infecciones por *E. coli*, destacan las cefalosporinas de 2ª o 3ª generación, aztreonam, o la asociación de una penicilina con un inhibidor de β -lactamasas. En caso de enteritis o infección del tracto urinario se puede emplear cotrimoxazol o bien una fluoroquinolona (ciprofloxacino o levofloxacino), aunque cerca de un 25% de las cepas son resistentes a estos antibióticos. La infección del tracto urinario puede tratarse también con una cefalosporina oral, o bien con fosfomicina/trometamol o nitrofurantoína. En los últimos años han proliferado de forma exponencial las cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Estas cepas son resistentes a gran número de β -lactámicos, pero pueden ser susceptibles a carbapenems, así como a tigeciclina o colistina o a combinaciones de betalactamasa/inhibidor de betalactamasa (Rodríguez-Baño 2015). En caso de infección del tracto urinario provocada por una cepa de *E. coli* productora de BLEE, se puede administrar fosfomicina. Los β -lactámicos suelen actuar sinérgicamente con los aminoglucósidos, por lo que esta combinación puede ser eficaz en caso de infección grave (Mensa et al. 2014). Sin embargo, es frecuente que la

transmisión de genes codificantes de BLEE entre enterobacterias vaya asociada con la transferencia de genes que confieren resistencia a otros grupos de antimicrobianos, como fluoroquinolonas y aminoglucósidos.

Los tratamientos de elección para las infecciones causadas por *K. pneumoniae* son las fluoroquinolonas o bien las cefalosporinas de 3ª generación, aunque cerca de un 10% de las cepas han adquirido resistencia a estos segundos compuestos por producción de BLEE. El tratamiento de cepas productoras de BLEE o de la β -lactamasa AmpC puede estar basado en un carbapenem o en tigeciclina, aunque hay cepas resistentes a carbapenems por producción de carbapenemasas de clase A (KPC), clase B (metalo- β -lactamasas como VIM, IMI, NDM) o clase C (OXA). En casos de bacteriemia por cepas productoras de carbapenemasas, se recurre a colistina combinada con tigeciclina e imipenem (Mensa et al. 2014).

2.2.3. Resistencia antibiótica

Según el ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control 2015), más de la mitad de los aislamientos de *E. coli*, y más de un tercio en el caso de *K. pneumoniae*, fueron resistentes en 2014 al menos a una de las clases de antibióticos que están bajo vigilancia. En *E. coli* la resistencia a aminopenicilinas y fluoroquinolonas fue la más común. Además, el porcentaje de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (Figura 2), aumentó significativamente en Europa de 2010 a 2014, y un fenómeno similar se apreció en el caso de fluoroquinolonas y aminoglucósidos. La resistencia a carbapenems en *E. coli* sigue siendo bastante inusual en Europa.

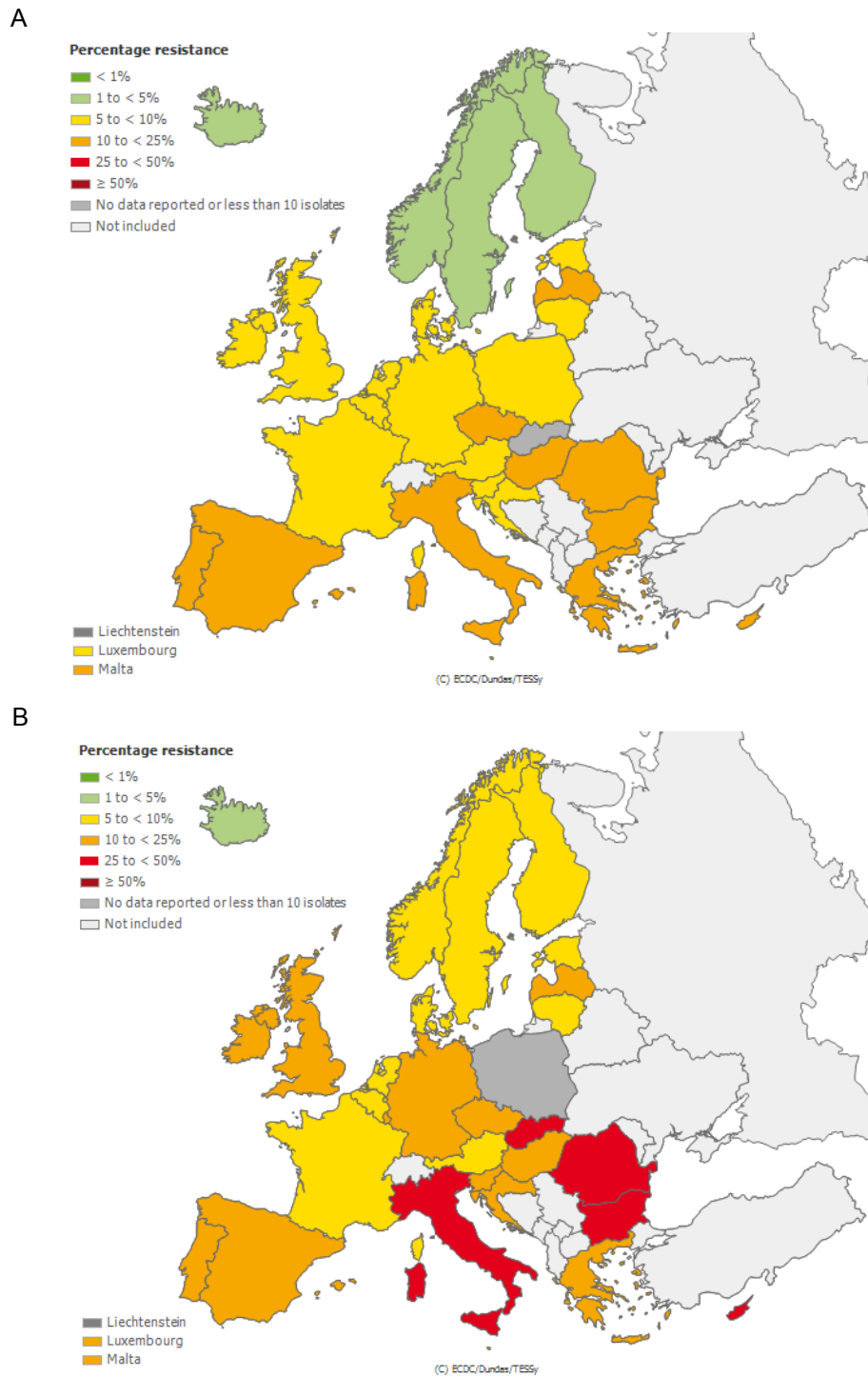


Figura 2.- Evolución del porcentaje de aislamientos de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación en Europa a lo largo de 4 años (Datos del ECDC). (A) 2010. (B) 2014.

En *K. pneumoniae*, por otro lado, el fenotipo de resistencia más habitual fue una resistencia combinada a tres grupos antimicrobianos claves: las fluoroquinolonas, las cefalosporinas de tercera generación (Figura 3) y los aminoglucósidos. Además, se apreció un gradiente de resistencia de norte a sureste para la mayor parte de los grupos de antimicrobianos con menores porcentajes de resistencia en los países del norte y mayores porcentajes en la parte este y sur de Europa. Así, la mayor frecuencia

de aislamiento de cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenems se registró en Grecia, Italia y Rumanía.

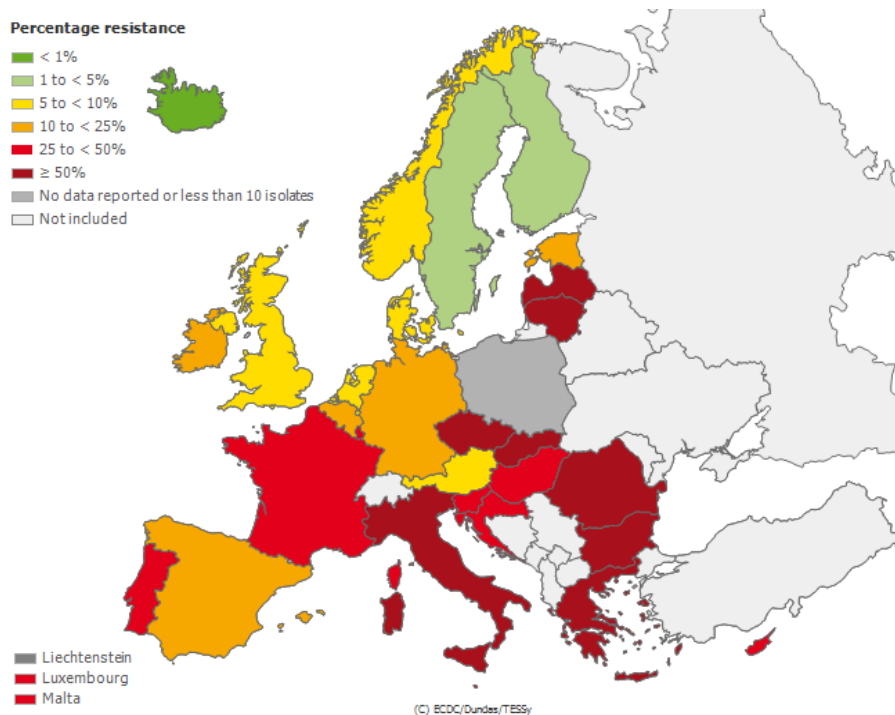


Figura 3.- Porcentajes de aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación en Europa en 2014 (European Centre for Disease Prevention and Control 2015).

3. Cocos grampositivos: *Staphylococcus aureus*

3.1. Características generales y patogenicidad

Staphylococcus aureus es una bacteria grampositiva, anaerobia facultativa productora de catalasa y coagulasa. Este microorganismo, que no es móvil ni esporulado, coloniza la piel y la región anterior de las fosas nasales de aproximadamente el 30% de los individuos sanos, a los que puede causar infecciones severas de manera oportunista. La proliferación de cepas resistentes a meticilina de esta bacteria (*methicillin resistant S. aureus*, MRSA), ha sido responsable del tipo de infección nosocomial más frecuente en todo el mundo de entre las provocadas por microorganismos resistentes a los antimicrobianos. Desde hace algunos años, este microorganismo ha aparecido, además, como una causa de infecciones adquiridas en la comunidad en pacientes sin los factores de riesgo establecidos para la infección por dichos patógenos (Cercenado and Ruiz de Gopegui 2008).

S. aureus puede causar una gran variedad de patologías, pero principalmente es responsable de infecciones de la piel, de tejidos blandos, osteoarticulares, endocarditis y de bacteriemias (Tabla 3). La gran capacidad productora de toxinas de

esta bacteria explica su frecuente implicación en intoxicaciones alimentarias, o en graves patologías como el síndrome del shock tóxico (World Health Organization 2014). Finalmente, *S. aureus* es una de las causas más frecuente de infecciones asociadas con el uso de dispositivos médicos permanentes (Otto 2008) y es el principal agente etiológico de infecciones en heridas quirúrgicas. En la patogénesis juega un papel importante la gran capacidad de los estafilococos para colonizar la piel y para adherirse a todo tipo de superficies mediante la formación de *biofilms*.

3.2. Tratamiento de elección

Aunque hay variaciones según el tipo de infección, el tratamiento de elección de cualquier infección estafilocócica de gravedad moderada o severa producida por una cepa sensible a meticilina y con una concentración mínima inhibitoria (CMI) a vancomicina $< 1,5 \mu\text{g/mL}$, se basa en la administración de cloxacilina intravenosa (Holmes et al. 2011). En el caso de bacteriemia, si hay riesgo de sepsis grave o shock séptico o la (CMI) de vancomicina es $\geq 1,5 \mu\text{g/mL}$, hay que considerar el empleo de asociaciones potencialmente sinérgicas, como cloxacilina con daptomicina. Otras alternativas en el caso de infecciones por cepas sensibles a meticilina pueden consistir en la prescripción de una cefalosporina de 1ª generación, o bien de asociaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas como amoxicilina/ácido clavulánico o piperacilina/tazobactam. Finalmente, existen otros antibióticos potencialmente activos, como clindamicina, levofloxacino, moxifloxacino, doxiciclina, minociclina y los carbapenems (Mensa et al. 2014).

En neumonía, meningitis y endoftalmitis producidas por cepas resistentes a meticilina, el tratamiento de elección es vancomicina, mientras que las infecciones asociadas a prótesis articular deben tratarse con asociaciones que incluyan rifampicina y un segundo antibiótico elegido en función del antibiograma (fluoroquinolona, daptomicina o linezolid). La infección cutánea localizada (impétigo) puede remitir con la aplicación tópica de mupirocina, retapamulina, bacitracina o ácido fusídico. Otros antimicrobianos potencialmente eficaces para el tratamiento de infecciones por cepas resistentes a meticilina son vancomicina, teicoplanina, tigeciclina, cotrimoxazol, ceftarolina o la asociación de imipenem con fosfomicina (Mensa et al. 2014).

3.3. Resistencia antibiótica

La incidencia de aislamientos de MRSA en los países de Europa presenta una gran variabilidad, con porcentajes que oscilan entre 0,9% y 56,0% (Figura 4). Sin embargo, como en el caso de otros patógenos resistentes, se aprecian de nuevo porcentajes de incidencia de MRSA más altos en el sur y sureste del continente. La

resistencia media en los países de Europa se situó en un 18% en 2013 y se observa una significativa tendencia hacia la reducción de incidencia de MRSA en los últimos años (desde 18,6% en 2011 a 17,4% en 2014; (European Centre for Disease Prevention and Control 2015).

La aparición de cepas de *S. aureus* que combinan el fenotipo MRSA con la resistencia a vancomicina (VRSA) se produjo hace ya más de una década (Chang et al. 2003). Por fortuna, daptomicina sigue siendo activa en este tipo de cepas (Baltz et al. 2005) y la incidencia de cepas resistentes a daptomicina es todavía muy baja (Baltz 2009).

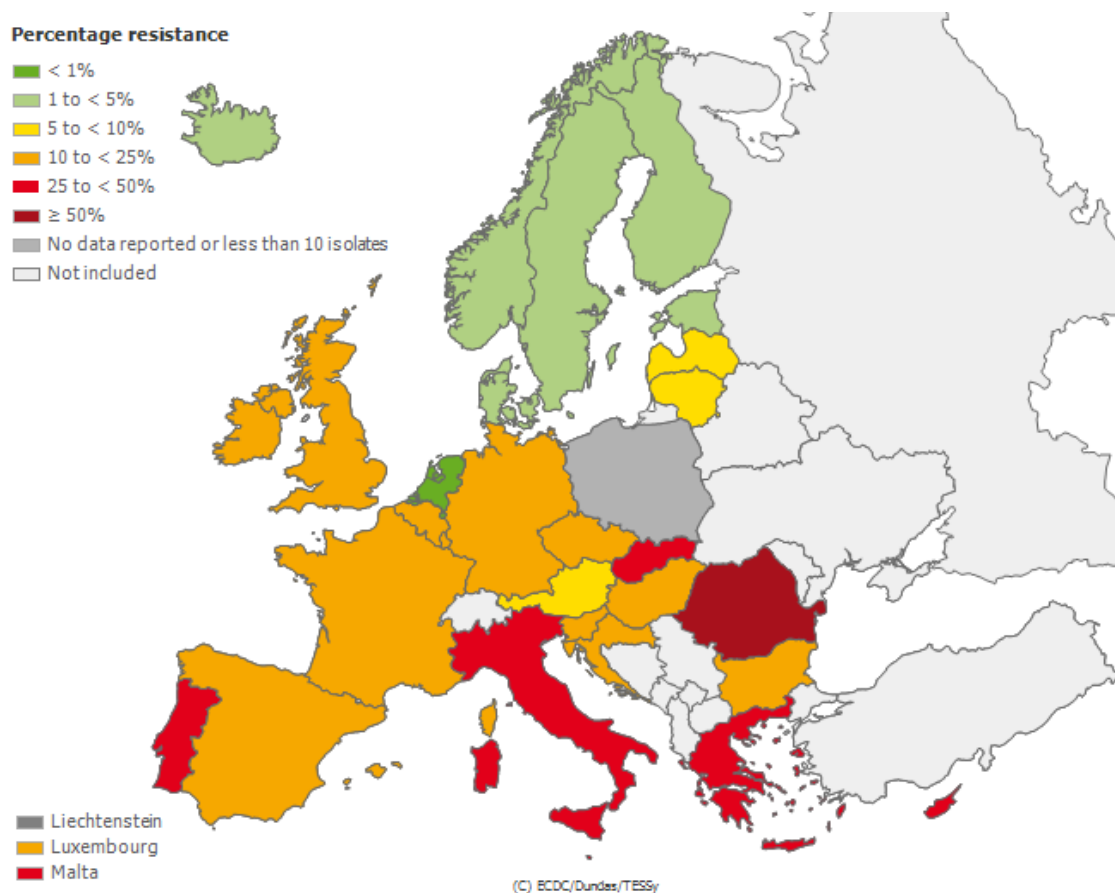


Figura 4.- Porcentajes de aislamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) en Europa en 2014 (European Centre for Disease Prevention and Control 2015).

4. Mecanismos de resistencia de las bacterias a los antimicrobianos

Se han descrito cuatro mecanismos generales de resistencia: (i) baja permeabilidad, (ii) bombas de expulsión activa, (iii) enzimas modificantes y (iv) modificación de la diana antibiótica (Figura 5).

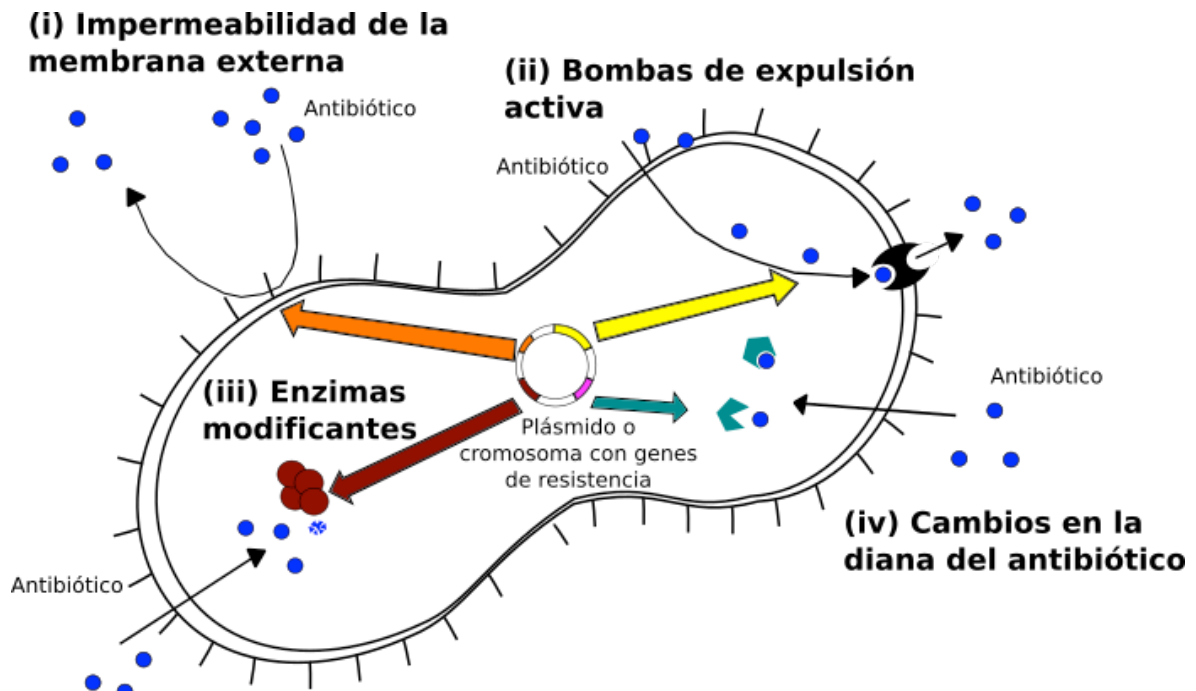


Figura 5.- Principales mecanismos de resistencia empleados por las bacterias para neutralizar la acción de los antimicrobianos

4.1. Baja permeabilidad

La envoltura celular de las bacterias gramnegativas se estructura en dos membranas, una interna y otra externa, separadas por un espacio periplásmico en donde se sitúa una delgada capa de peptidoglicano. La membrana externa bacteriana constituye una eficaz barrera selectiva de permeabilidad que protege a la célula de la acción deletérea de muchos compuestos químicos, incluyendo los agentes antimicrobianos (Nikaido 2003). La impermeabilidad intrínseca de esta estructura puede aumentar por la adquisición de ciertas mutaciones en sus constituyentes, como por ejemplo mutaciones que restringen aún más el paso de solutos por las porinas. Además, otros mecanismos de resistencia, como las bombas de expulsión (ver más adelante), trabajan coordinadamente con la membrana externa para reducir al máximo la concentración intracelular de un determinado compuesto tóxico.

Buena parte de la impermeabilidad de la membrana externa se debe a las propiedades de un glicolípido anfipático llamado lipopolisacárido (LPS), que recubre la cara más superficial de esta membrana. El LPS consta de una porción muy hidrofóbica, el lípido A, que se inserta en la membrana y una porción polisacárida altamente polar constituida por el núcleo y la cadena O. A pH fisiológico, el LPS se encuentra cargado negativamente debido a los grupos fosfato presentes en el lípido A y los grupos fosfato y carboxilo del núcleo. Para neutralizar esta carga negativa y proporcionar estabilidad a la membrana externa, las cargas negativas están

parcialmente neutralizadas mediante uniones electrostáticas a cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) (Sánchez-Gómez et al. 2011). La presencia de esta elevada carga eléctrica hace que la superficie bacteriana sea muy polar y dificulte la difusión de los antibióticos al interior de la bicapa lipídica, especialmente los hidrofóbicos.

Por otra parte, la elevada hidrofobicidad del lípido A impide también la entrada por difusión de antimicrobianos hidrofílicos a la célula. Teóricamente, este tipo de moléculas podrían penetrar a través de las porinas, un tipo de proteína integral que atraviesa la membrana externa formando canales hidrofílicos. De hecho, se sabe que algunos antibióticos hidrofílicos pequeños como β -lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol y fluoroquinolonas acceden a través de porinas al interior de la célula. No obstante, las bacterias también pueden hacerse resistentes a estos compuestos adquiriendo mutaciones que reducen o eliminan la expresión de dichas porinas. Así, la pérdida de la porina OprD de *P. aeruginosa* implica la adquisición de impermeabilidad a imipenem y por tanto la resistencia a la acción de este carbapenem (Trias and Nikaido 1990; Delcour 2009). Un fenómeno similar ocurre cuando *K. pneumoniae* deja de producir sus dos porinas principales, OmpK35 y/o OmpK36 (Stein et al. 2015). Por último, *E. coli* puede adquirir resistencia a antibióticos β -lactámicos al perder las porinas OmpC y OmpF (Fernández and Hancock 2012).

Aunque las bacterias grampositivas carecen de membrana externa, su envoltura celular también actúa como una eficaz barrera selectiva de permeabilidad. De hecho, la eficacia de esta barrera obliga a que la captación de muchos solutos que son esenciales requiera gasto de energía en forma de ATP o bien una disipación parcial del gradiente de protones. Los aminoglucósidos se aprovechan de estos sistemas de transporte para penetrar en la célula y, concretamente, la captación de estos antibióticos por los estreptococos depende de la hidrólisis de ATP por la enzima foF1-ATPasa (Taber et al. 1987; Ramirez and Tolmasky 2010). En concordancia con este hecho, uno de los mecanismos de resistencia de *S. aureus* a los aminoglucósidos consiste en la inactivación por mutación del gen *atp*, que sintetiza la enzima FoF1-ATPasa (Aslangul et al. 2006). En este mismo contexto, algunas bacterias con ciertas modificaciones en la cadena transportadora de electrones, como muchas anaerobias, generan un bajo potencial transmembrana y tienden a ser resistentes a los aminoglucósidos (Bryan and Van Den Elzen 1977; Aslangul et al. 2006).

4.2. Bombas de expulsión activa

Las bombas de expulsión activa o de flujo (*efflux pumps*) son sistemas compuestos por varias proteínas situadas en la envoltura celular que trabajan

conjuntamente para bombear al exterior de la célula sustancias perjudiciales. En las bacterias, estos sistemas tienen la capacidad de captar y expulsar, entre otras moléculas, antibióticos. En gramnegativos, la eficacia de este mecanismo de resistencia depende estrechamente de la integridad de la membrana externa y de su capacidad para actuar como una barrera de permeabilidad.

En *P. aeruginosa* predominan los sistemas pertenecientes a la familia RND (*resistance-nodulation-cell division*), un tipo de bombas que adquiere su energía de la entrada de protones a la célula a favor de gradiente. En la cepa tipo PAO1 se han identificado y caracterizado 12 bombas RND diferentes, aunque sólo una minoría parece estar implicada en la resistencia a antibióticos. Las bombas tipo RND constan de tres componentes: un transportador situado en la membrana interna de la bacteria, otra proteína con estructura de porina situada en la membrana externa que actúa como canal de expulsión, y una proteína de fusión a membrana 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, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM(OprA), aunque también pueden aparecer otras como MexJK-OprM, MexHI-OpmD, y MexVW-OprM (Zavascki et al. 2010).

MexAB-OprM fue la primera bomba RND caracterizada en *P. aeruginosa*. Se expresa de manera constitutiva en la bacteria y exhibe una capacidad increíblemente amplia para captar y expulsar antibióticos que son muy diferentes estructuralmente: β -lactámicos, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, trimetoprim, sulfamidas y cloranfenicol (Van Bambeke et al. 2006). MexXY-OprM(OprA) es capaz de transportar aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, tigeciclinas y cefalosporinas zwitterionicas (Li et al. 1995). Su contribución a la resistencia natural de la bacteria está restringida a aquellos agentes capaces de inducir la expresión de *mexXY(oprA)* porque el componente OprM se produce de manera constitutiva (Masuda et al. 2000a; Hocquet et al. 2003). La delección de algunos genes regulatorios de estos sistemas, como *mexR*, *mexZ*, *nalB*, *nalD* y *nalC* desreprimen constitutivamente estos sistemas y con frecuencia inducen su sobreexpresión, lo que se traduce en un aumento de la resistencia a sus antibióticos sustrato. Otros sistemas de bombas RND de *P. aeruginosa*, como MexCD-OprJ y MexEF-OprN, no se expresan constitutivamente, aunque pueden ser inducidos.

El principal sistema de expulsión de antibióticos de enterobacterias, incluyendo a *E. coli* y *K. pneumoniae*, es AcrAB-TolC, que pertenece también a la familia RND. La bomba AcrAB-TolC está implicada en la resistencia de estas bacterias a la mayor

parte de los antibióticos β -lactámicos, así como a novobiocina, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclinas y fluoroquinolonas (Fernández and Hancock 2012). *E. coli* también dispone de otras bombas como MdfA y AepA de la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*), YdhE de la familia MATE (*Multidrug and Toxic compound Extrusion family*) y AcrEF y OqxAB de la familia RND. Por su parte, *K. pneumoniae* posee otras bombas como KmrA y KdeA de la familia MFS (Fernández and Hancock 2012).

En las bacterias grampositivas, las bombas de expulsión activa son la primera línea de defensa frente a compuestos tóxicos. En *S. aureus* se han identificado varias de estas bombas, como NorA, NorB, NorC, SdrM y MdeA de la familia MFS y MepA de la familia MATE (Costa et al. 2015). NorA es la bomba de expulsión activa más estudiada en *S. aureus*. El gen cromosómico que codifica para esta bomba se identificó por primera vez en 1986 en un aislamiento resistente a las fluoroquinolonas en un hospital japonés (Ubukata et al. 1989). NorA es una proteína de 388 aminoácidos con 12 segmentos transmembrana. Esta bomba puede expulsar una gran cantidad de compuestos química y estructuralmente diferentes entre sí, como fluoroquinolonas, bromuro de etidio o compuestos de amonio cuaternario (Kaatz et al. 1993). *norA* tiene un significativo nivel basal de expresión, lo que proporciona a la célula cierta resistencia natural a estos compuestos. Cuando este gen muta de manera constitutiva o se induce, *S. aureus* aumenta su resistencia a las fluoroquinolonas (Kaatz and Seo 1997; 2004).

4.3. Enzimas modificantes

Las enzimas modificantes son un mecanismo de resistencia basado en la inactivación del antibiótico una vez que éste ha penetrado en la bacteria. La inactivación puede llevarse a cabo mediante hidrólisis, como en el caso de las β -lactamasas, o por modificación química, como las enzimas que modifican a los aminoglucósidos (Ramirez and Tolmasky 2010).

La primera β -lactamasa fue aislada de *E. coli* hace 75 años -antes incluso de la aplicación clínica de la penicilina-, y fue correctamente descrita como una penicilinasas por E. P. Abraham y E. Chain. Inicialmente, se pensó que esta enzima no comprometería el uso de la penicilina, pues este antibiótico se empleaba principalmente para el tratamiento de infecciones estafilocócicas y estreptocócicas. Sin embargo, cuatro años más tarde, Kirby aisló esta enzima de *S. aureus*, lo que presagió el grave problema que hoy suponen estas enzimas para la terapia antimicrobiana (Drawz and Bonomo 2010). Actualmente, se han identificado más de 1000 β -

Introducción

lactamasas distintas.

Las β -lactamasas siguen dos clasificaciones diferentes, la de Ambler (Ambler 1980) descrita en 1980 y que atiende a su estructura y la de Bush-Jacoby-Medeiros de 1995 que las clasifica con base en su grupo funcional (Bush et al. 1995) (Tabla 4).

Tabla 4.- Clasificación combinada de las β -lactamasas (Ambler 1980; Bush et al. 1995).

Grupo funcional de Bush-Jacoby-Medeiros	Clase molecular de Ambler	Características
Grupo 1	C	Cefalosporinas cromosómicas y plasmídicas Resistentes a β -lactámicos (excepto carbapenems) No inhibidas por ácido clavulánico Engloba a las cefalosporinas de tipo AmpC
Grupo 2	A y D	Penicilinasas, cefalosporinasas, oxacilinasas y carbapenemasas Codificación plasmídica (mayoría) Inhibidas por el ácido clavulánico
2a		Penicilinasas
2b		β -lactamasas de amplio espectro (BLEA) Penicilinasas y cefalosporinasas
2be		β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) Inactivan cefalosporinas de 3ª generación y monobactams
2br		β -lactamasas de tipo IRT (Inhibidor resistente TEM) Resistentes a inhibidores como ácido clavulánico y sulbactam pero no al tazobactam
2c		β -lactamasas que hidrolizan carbenicilinas
2d		β -lactamasas con acción frente a cloxacilinas Inhibidas escasamente por ácido clavulánico Incluyen algunas BLEEs tipo OXA
2e		Cefalosporinas que hidrolizan monobactams (aztreonamasas)
2f		Carbapenemasas con serina en su centro activo
Grupo 3	B	Metallo- β -lactamasas (zinc en su sitio activo) Inhibidas por agentes quelantes como el EDTA Codificación cromosómica o plasmídica No inhibidas por ácido clavulánico Resistentes a carbapenems y β -lactámicos No hidrolizan monobactams
Grupo 4	No clasificada	Penicilinasas de codificación cromosómica No inhibidas por ácido clavulánico

La enzima modificante más importante y mejor estudiada de *P. aeruginosa* es la enzima cromosómica inducible de clase C, AmpC (Tabla 4). Esta enzima se localiza en el espacio periplásmico y es activa frente a penicilinas y monobactams, pero destaca por su capacidad para hidrolizar cefalosporinas. En condiciones normales, esta enzima 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 entre 100 y 1000 veces en presencia de antibióticos inductores, como la cefoxitina o el imipenem (Jacoby 2009), aunque esta sobreexpresión es reversible y cesa al retirar el agente inductor. Además, la producción de AmpC también puede verse incrementada debido a mutaciones cromosómicas en genes que codifican proteínas reguladoras de la producción de esta β -lactamasa. Este es el caso de los genes reguladores *ampD*, que codifica una N-acetil-anhidromuramil-L-alanina-amidasa citosólica involucrada en el reciclaje del peptidoglucano y de *ampR*, que codifica un regulador transcripcional tipo LysR (Moya et al. 2009). La inactivación de *ampD* o de *ampR* provoca 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 carbapenems y de las cefalosporinas de 4^a y 5^a generación (Gutkind et al. 2013).

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 de manera eficiente los antibióticos más eficaces para el tratamiento de infecciones producidas por cepas multiresistentes de *P. aeruginosa*, los carbapenems (imipenem y meropenem, entre otros). La mortalidad asociada a la bacteriemia producida por cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems 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 de los grupos $-\text{OH}$ o $-\text{NH}_2$ del núcleo del 2-deoxistreptamina o de las fracciones glucídicas del antibiótico, disminuyen su afinidad por la diana, la subunidad ribosómica 30S (Ramirez and Tolmasky 2010).

En el caso de *E. coli* y *K. pneumoniae*, las enzimas modificantes de mayor importancia y más estudiadas son las β -lactamasas de espectro extendido o BLEEs (Falagas and Karageorgopoulos 2009). Las BLEEs son enzimas de codificación plasmídica que pueden hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a y 4^a generación y monobactams. Una característica distintiva de este tipo de β -lactamasas es que son inhibidas por compuestos como el ácido clavulánico, sulbactam y

tazobactam. En la actualidad, el término BLEE engloba a más de 200 enzimas diferentes que se clasifican según su secuencia de aminoácidos en 6 grupos, TEM (1-223), SHV (1-193), CTX-M (1-172), OXA, K1 y Minor BLEEs. El grupo CTX-M es el que se aísla con mayor frecuencia de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* (Falagas and Karageorgopoulos 2009; Brolund 2014).

Por su parte, las bacterias grampositivas también poseen este tipo de enzimas modificantes. En la década de los 40, las infecciones por *S. aureus* se trataban con β -lactámicos de primera generación (penicilinas), cuya diana molecular son las PBPs (*penicillin-binding-proteins*), transpeptidasas claves en la síntesis de la pared bacteriana (Gonzales et al. 2015). En 1942 se identificaron las primeras cepas penicilina-resistentes en algunos hospitales y pocos años después, en 1950, se constató que un 50% de todos los aislamientos eran resistentes a estos antibióticos. En la mayoría de los casos la enzima responsable de la hidrólisis de la penicilina es la β -lactamasa PC1, de clase A, codificada por el gen *blaZ* (Herzberg 1991). La expresión de esta β -lactamasa no es constitutiva, sino que se induce cuando la bacteria se expone a β -lactámicos (Cohen and Sweeney 1968) y el mecanismo de inducción depende de la actividad del sistema regulatorio BlaR-BlaI-BlaZ (Fuda et al. 2005)

4.4. Modificaciones de la diana antibiótica

Otros mecanismos que pueden actuar una vez que el antimicrobiano ha entrado en la célula bacteriana son los basados en la alteración de la diana celular del antibiótico. La modificación de la secuencia diana impide total o parcialmente la unión del antibiótico a su lugar de acción. Este es el mecanismo más importante de entre los implicados en la resistencia de las enterobacterias, *P. aeruginosa* y *S. aureus* a quinolonas y fluoroquinolonas. En cepas sensibles a quinolonas, estos antibióticos se unen a dos enzimas esenciales para la replicación del ADN, la ADN girasa y la topoisomerasa IV, e impiden su correcto funcionamiento. Sin embargo, la aparición de ciertas mutaciones en los genes codificantes de estas enzimas (*gyrA* y *parC*) disminuye marcadamente la afinidad de las quinolonas por los productos de estos genes y convierte a las cepas portadoras de dichas mutaciones en resistentes a quinolonas (Lister et al. 2009; Navarro et al. 2011; Poole 2011; Sánchez-Gómez et al. 2011; Kim and Hooper 2014).

La aparición de cepas productoras de β -lactamasas en *S. aureus* en la década de los 40, impulsó el desarrollo de penicilinas de segunda generación, como la meticilina, resistentes a las β -lactamasas. Para que los antibióticos β -lactámicos sean eficaces

debe existir una interacción de alta afinidad entre el antimicrobiano y su diana intracelular, la enzima PBP bacteriana (Mulligan et al. 1993). En 1959 se informó del aislamiento de las primeras cepas MRSA. El estudio de estas cepas reveló que habían adquirido por transmisión horizontal una colección de genes altamente regulados que producía resistencia inducible a los β -lactámicos. Uno de esos genes, *mecA*, codifica para PBP2a (Murakami and Tomasz 1989), una transpeptidasa con baja afinidad por β -lactámicos que, por tanto, puede entrecruzar la pared celular en presencia de estos antibióticos cuando otras PBPs están inhibidas (Gonzales et al. 2015).

En 2002 se describió en EEUU el primer aislamiento de *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) (Sievert et al. 2008), y se demostró que esta cepa había adquirido los genes de resistencia por transmisión horizontal a partir de cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes a la vancomicina. El mecanismo de acción de la vancomicina se basa en la alta afinidad del antibiótico por el residuo D-alanina-D-alanina del lípido II de la pared celular. En las cepas resistentes a glicopéptidos, el lípido II está modificado y suele presentar una fracción D-alanina-D-lactato que tiene mucha menor afinidad por el antibiótico (Handwerger and Skoble 1995; Gardete and Tomasz 2014; Brown and Dawson 2015).

5. *Biofilms* bacterianos

Los *biofilms* microbianos son agregados celulares formados por una o varias especies de microorganismos que producen una matriz extracelular que les permite adherirse entre sí y colonizar superficies (Davey and O'Toole 2000; Mah and O'Toole 2001; Lebeaux et al. 2014). La matriz extracelular está constituida fundamentalmente por un exopolisacárido, aunque también contiene proteínas y ácidos nucleicos. La formación de *biofilms* aumenta las posibilidades de supervivencia de una comunidad bacteriana, pues permite captar nutrientes con más facilidad que en estado planctónico y proporciona protección frente a factores físico-químicos adversos, incluida la desecación (Le Magrex-Debar et al. 2000; Teitzel and Parsek 2003). Por este motivo, estas estructuras son la forma predominante de vida microbiana en la naturaleza. Además, la capacidad de formar *biofilms* supone un mecanismo de patogenicidad que facilita la colonización de los tejidos o dispositivos. De hecho, se estima que hasta dos tercios de las infecciones en el ser humano pueden deberse a microorganismos que forman *biofilms in vivo* (Lewis 2001).

En el ser humano, los *biofilms* son particularmente prevalentes en infecciones del tracto urinario (*E. coli*, *Proteus* y otros patógenos), infecciones de dispositivos médicos (*S. aureus* y otros grampositivos) y en patologías no asociadas a biodispositivos. Por

ejemplo, la formación de biocapas bacterianas explica muchas infecciones crónicas, como la otitis media, sinusitis, periodontitis, gingivitis, endocarditis y neumonía asociada a bronquiectasias, entre otras. (Figura 6) (La Fuente-Núñez et al. 2013). Entre las patologías más graves asociadas con la formación de estas estructuras se encuentran la endocarditis, las infecciones de dispositivos médicos provocadas por *S. aureus*, y la fibrosis quística causada por *P. aeruginosa* (Lewis 2001). Aunque hay *biofilms* formados por una sola especie (*P. aeruginosa* en los últimos estadios de la fibrosis quística), otros pueden estar formados por más de 500 taxones diferentes, como las biocapas de la placa dental (Mah and O'Toole 2001).

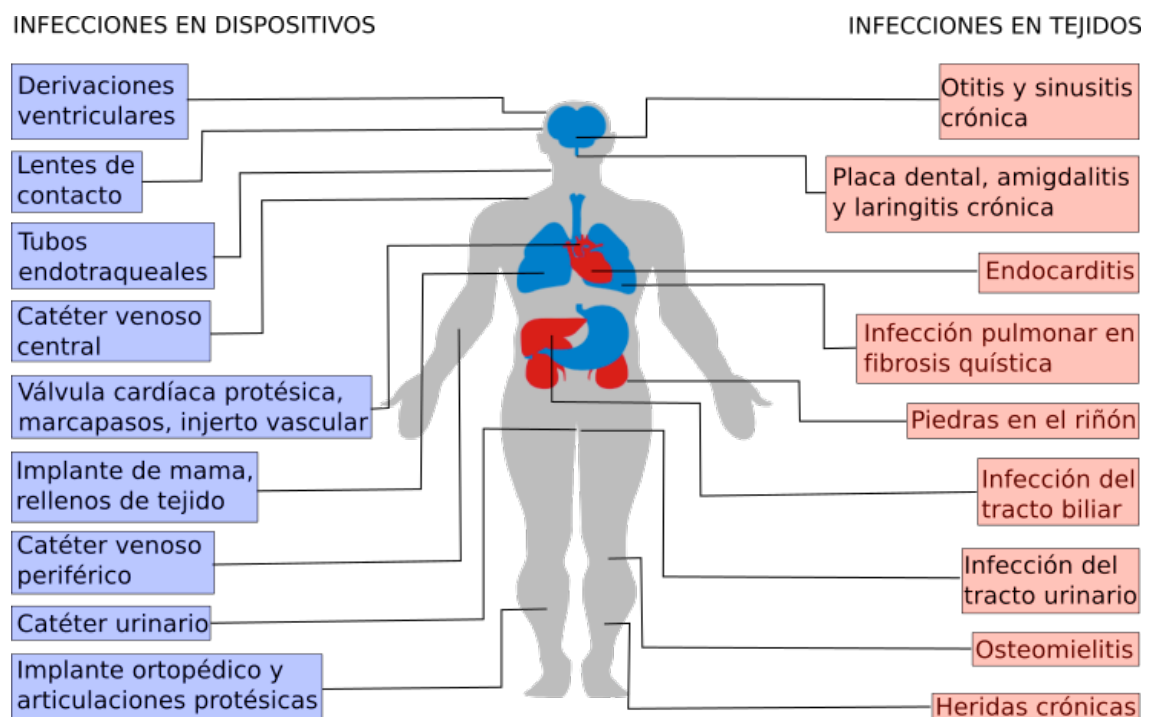


Figura 6.- Infecciones más comunes relacionadas con *biofilms* en el ser humano. Adaptado de (Lebeaux et al. 2014).

Los *biofilms* se establecen en cinco fases consecutivas y bien diferenciadas a nivel fisiológico: i, la adhesión de las células planctónicas a la superficie de manera reversible; ii, la adhesión irreversible; iii, la proliferación y formación de una microcolonia; iv, la maduración; v, la dispersión de bacterias libres desprendidas de la biocapa (Figura 7) (Costerton et al. 1999; Lebeaux et al. 2014).

Dentro del *biofilm*, las células están protegidas frente a los mecanismos efectores de la respuesta inmune innata y adaptativa, pero también frente a sustancias nocivas, incluyendo antimicrobianos que tienen dificultades para penetrar al interior (Nichols et al. 1988). De hecho, el principal problema que plantea el tratamiento de infecciones por microorganismos productores de biocapas es que sus células son mucho más resistentes, entre 10 y 1000 veces, que las células en estado planctónico (La Fuente-

Núñez et al. 2014). Este hecho aumenta las posibilidades de infecciones crónicas y/o recurrentes (Lebeaux et al. 2014).

Se ha descrito que la resistencia de los *biofilms* a las agresiones, tanto físicas como químicas, es producto de una combinación de factores que incluyen la dificultad del antibiótico para difundir a través del exopolisacárido (Stewart 2002), la tolerancia al antibiótico, la expresión de mecanismos específicos y la presencia de células persistentes (*persisters*) (Lebeaux et al. 2014). Parece ser que la dificultad de algunos antibióticos para difundir a través de la biocapa, se debe principalmente a la carga negativa de los polímeros que forman la matriz del *biofilm* (Stewart 2002). La lenta difusión del antimicrobiano a través de la biocapa tiene consecuencias negativas para la selección de clones resistentes, si se alcanzan concentraciones subinhibitorias dentro de la matriz del *biofilm*.

Por otro lado, la aparición de tolerancia al antimicrobiano se puede explicar por el microambiente alterado propio del *biofilm* (bajas concentraciones de oxígeno, pH ácido y acumulación de productos de desecho) que promueve una gran heterogeneidad metabólica en las bacterias que forman estas estructuras (Stewart 2002). Por ejemplo, la baja concentración de oxígeno del interior del *biofilm* reduce la efectividad de tobramicina y ciprofloxacino (Rijnders et al. 2005). En relación con la expresión de mecanismos específicos en el *biofilm*, algunos estudios en *P. aeruginosa* y *E. coli* sugieren que la actividad de las bombas de expulsión activa podría estar detrás de la elevada resistencia de los *biofilms* a los antibióticos sustrato de dichos sistemas (Lebeaux et al. 2014).

Además, los *biofilms* poseen una subpoblación de bacterias tolerantes conocidas con el nombre de células persistentes (*persisters*), que no tienen metabolismo activo y no se multiplican. Aunque su prevalencia es baja, menos del 1% de la población bacteriana, su tolerancia antibiótica a un gran número de antibióticos permite su supervivencia (Wood et al. 2013). Una vez finalizado el tratamiento antibiótico y si las condiciones ambientales lo permiten, la mayoría de estas células se reactivan, se multiplican y vuelven a reconstruir el *biofilm*. Sin embargo, algunas de las células supervivientes quedan a su vez en forma de *persisters*, preparadas para resistir nuevas agresiones. La diferencia entre *persisters* y células resistentes es que el primer tipo celular no adquiere resistencia al antibiótico empleado, sino que muestra el mismo perfil de susceptibilidad que las no *persisters* (Chen et al. 2011; Lebeaux et al. 2014).

5.1. Estrategias frente a los *biofilms*

Se han descrito varias estrategias cuyo objetivo es evitar la formación de *biofilms* o bien eliminar las biocapas ya formadas. Entre las medidas profilácticas se recomienda no sólo extremar las medidas de asepsia durante la implantación de los dispositivos médicos, sino también reducir al máximo el número de dispositivos implantados y el tiempo que éstos permanecen en el paciente (Meddings et al. 2010). En todos los casos, se aconseja administrar a los pacientes una profilaxis antibiótica sistémica minutos antes de la implantación del dispositivo (Zimmerli 2006; Baddour et al. 2010). Otra estrategia implica revestir la superficie de los dispositivos implantables con soluciones antibióticas (Hetrick and Schoenfisch 2006). En la actualidad se han comercializado dos catéteres intravasculares recubiertos con combinaciones de antimicrobianos: minociclina/rifampicina y chlorhexidina/sulfadiazina de plata. Finalmente, otras estrategias preventivas incluyen la vacunación (Nanra et al. 2009), la interferencia con la comunicación entre las bacterias inhibiendo el *quorum sensing*, el desarrollo de superficies que evitan o minimizan la adhesión microbiana y el empleo de microorganismos avirulentos que impidan el asentamiento de patógenos formadores de *biofilm* (Klemm et al. 2007).

En relación con las terapias contra los *biofilms* ya formados, se han descrito métodos mecánicos para la eliminación de la infección como la exposición a campos eléctricos (Del Pozo et al. 2008; 2009b; 2009c), la retirada del dispositivo (Mermel et al. 2009) o del tejido (Habib et al. 2009) fuente de la infección. Otros autores han intentado optimizar los regímenes antibióticos frente a los microorganismos formadores de *biofilms*, seleccionando los compuestos más activos y mejorando su dosificación para aumentar las opciones de erradicar la infección (Stewart et al. 2009; Del Pozo et al. 2012; Corvec et al. 2013). Otras estrategias se basan en la inducción de la dispersión (Singh et al. 2002), la erradicación de bacterias persistentes (Morones-Ramirez et al. 2013) y la utilización de bacteriófagos (Figura 7) (Del Pozo et al. 2007; Donlan 2011). Finalmente, la última estrategia hace uso de soluciones de “sellado antibiótico” (*antibiotic lock therapy*) para eliminar *biofilm* formados sobre catéteres de larga duración. Esta estrategia consiste en la aplicación de soluciones antibióticas altamente concentradas (100x a 1000x CMI) en el lumen de los catéteres venosos centrales (Figura 7).

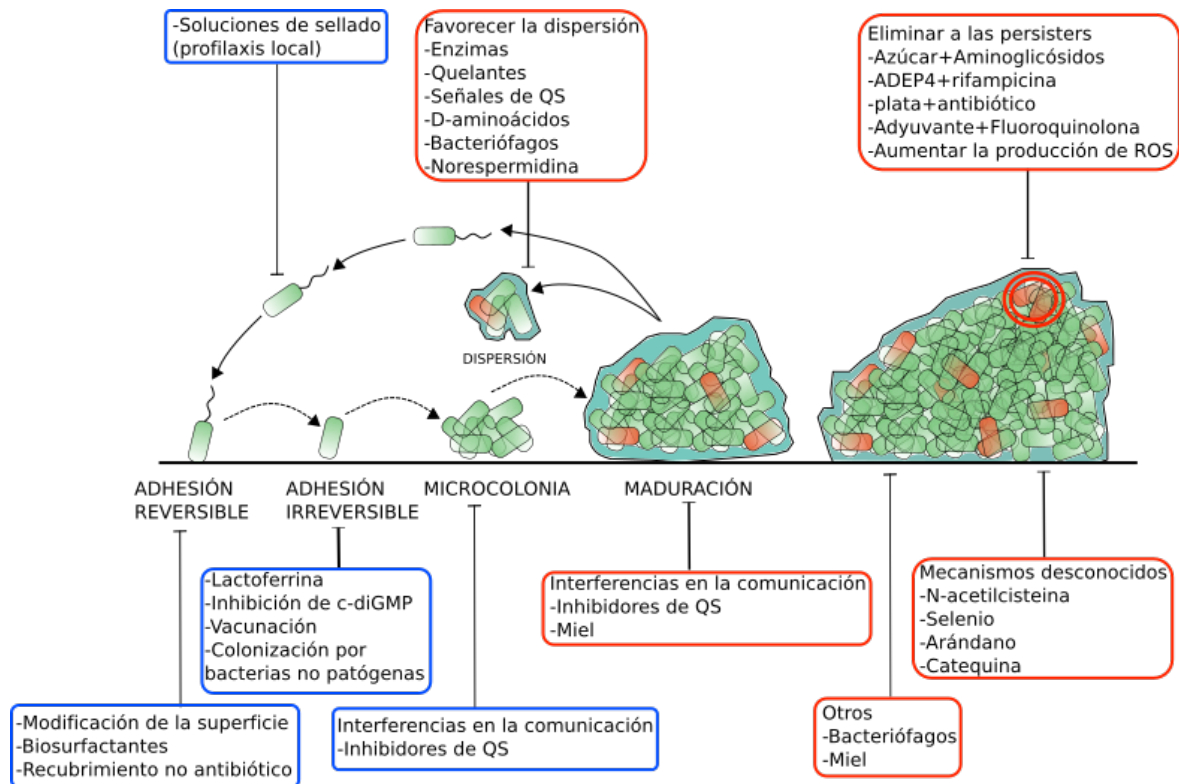


Figura 7.- Estrategias frente a los *biofilms*. Los cuadros con línea azul y roja contienen estrategias encaminadas a inhibir la formación de *biofilms* o eliminar las biocapas ya formadas, respectivamente. Se señalan en color rojo las bacterias *persisters*. QS *quorum-sensing*. Adaptado de (Lebeaux et al. 2014)

5.1.1. Soluciones de sellado antibiótico

Los catéteres venosos centrales se utilizan con distintos propósitos: hemodiálisis, nutrición parenteral o la administración de quimioterapia u otros tratamientos. Se ha estimado que los pacientes que llevan estos dispositivos pueden sufrir uno o dos episodios de bacteriemias asociadas a catéter por cada 1000 días de uso (Dudeck et al. 2013). Estos episodios son la causa de la retirada temprana de estos dispositivos en el 25% de los pacientes. La terapia de sellado antibiótico consiste en la exposición de los *biofilm* intraluminales de los catéteres (como los catéteres venosos centrales) a altas concentraciones de un agente antimicrobiano durante el tiempo necesario para conseguir su esterilización. Generalmente, se emplean concentraciones entre 100 o 1000 veces mayores que la CMI planctónica del microorganismo que se desea eliminar (Tabla 5). (Justo and Bookstaver 2014).

Introducción

Tabla 5.- Características de algunas terapias de sellado antibiótico clasificadas según la etiología de la infección. Adaptado de (Fernández-Hidalgo and Almirante 2014).

Etiología	Antimicrobiano	Concentración	Heparina
Coco/bacilo grampositivo	Vancomicina	2000 mg/L	20 UI/mL
	Vancomicina	2000 mg/L	100 UI/mL
	Vancomicina	2500 mg/L	2500 UI/mL
	Vancomicina	2500 mg/L	5000 UI/mL
	Teicoplanina	10000 mg/L	100 UI/mL
	Cefazolina	5000 mg/L	2500 UI/mL
	Cefazolina	5000 mg/L	5000 UI/mL
	Daptomicina	5000 mg/L	100 UI/mL (5000 UI/mL en diálisis)
	Etanol	70%	
Bacilo gramnegativo	Amikacina	2000 mg/L	20 UI/mL
	Gentamicina	2000 mg/L	20 UI/mL
	Ceftazidima	5000 mg/L	2500 UI/mL
	Ciprofloxacino	2000 mg/L	20 UI/mL
	Levofloxacino	5000 mg/L	
	Etanol	70%	
Infecciones mixtas	Vancomicina + ciprofloxacino	1000 mg/L 1000 mg/L	20 UI/mL
	Vancomicina + ceftazidima	2500 mg/L 2500 mg/L	2500 UI/mL
	Etanol	70%	

La terapia del sellado antibiótico se desarrolló en los años 80 como tratamiento alternativo a la retirada de catéter en pacientes con bacteriemias asociadas a catéter en los que dicha retirada constituía un grave riesgo (Messing et al. 1988). Entre sus ventajas destacan la posibilidad de evitar la retirada del dispositivo, eludir los efectos adversos que supondría un tratamiento antimicrobiano sistémico, permitir la administración local de concentraciones muy altas de fármaco que no serían viables por otras rutas, generar un coste beneficio favorable frente a la retirada quirúrgica del catéter y, finalmente, el hecho de que esta terapia pueda administrarse ambulatoriamente. Los inconvenientes del sellado antibiótico incluyen la posibilidad de oclusión de la vía, especialmente si la solución no incorpora un anticoagulante, el riesgo de exposición del paciente a concentraciones sistémicas de antibióticos o anticoagulantes innecesarias, el posible retraso en la curación de la infección y el riesgo de complicaciones sistémicas severas si el tratamiento conservador falla (Fernández-Hidalgo and Almirante 2014; Justo and Bookstaver 2014).

Según datos españoles y estadounidenses, las bacteriemias asociadas a catéter están principalmente causadas por estafilococos coagulasa negativos 43-74%. Además, *S. aureus* puede estar implicado en un 16% de los casos, mientras que los bacilos gramnegativos y las infecciones polimicrobianas son responsables de entre un 10-20% y 7-16%, respectivamente, de estas bacteriemias (Poole et al. 2004; Fortun et al. 2006). Según sea la etiología de la infección, se recomiendan distintas estrategias de sellado antibiótico que se resumen en la Figura 8.

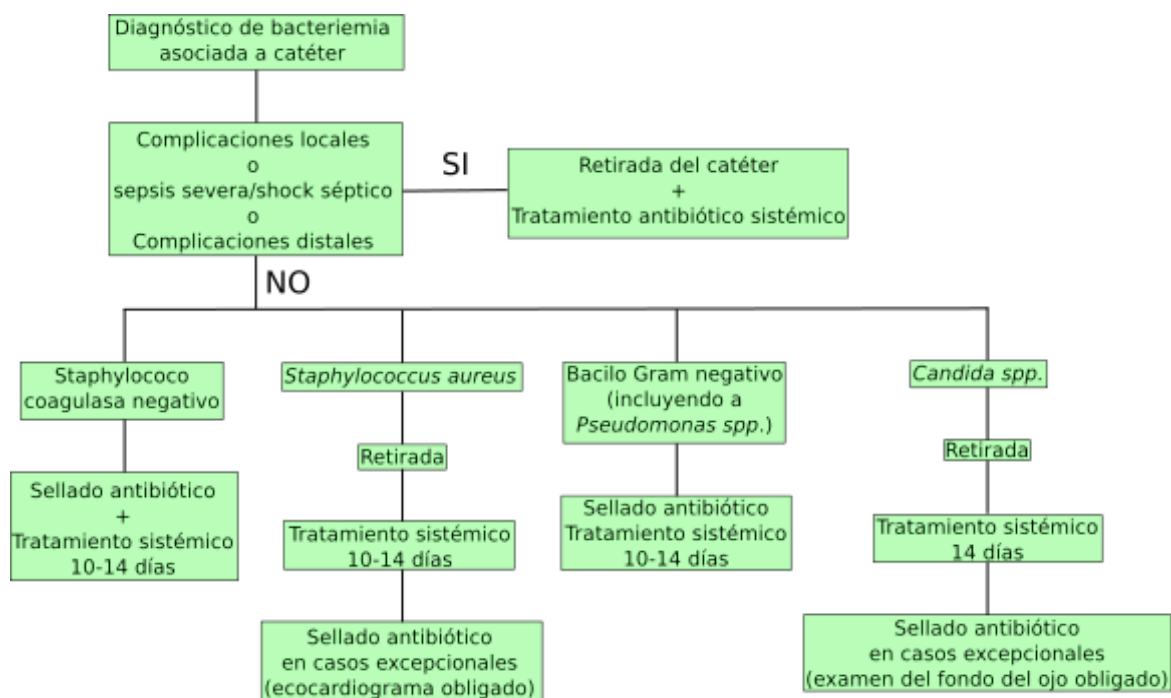


Figura 8.- Algoritmo de decisión terapéutica para bacteriemias asociadas a catéter. Adaptado de (Fernández-Hidalgo and Almirante 2014).

En la mayoría de los estudios, se ha descrito que la eficacia de este método es superior al 80%, cuando los microorganismos implicados son *Staphylococcus coagulasa negativos*. En todos los casos, se recomienda complementar el sellado con un tratamiento antibiótico sistémico (Fernández-Hidalgo and Almirante 2014).

6. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son moléculas pequeñas (12-100 aminoácidos), con carga neta positiva y naturaleza anfipática. Estas moléculas se pueden clasificar según varios criterios: la composición de aminoácidos, la hidrofobicidad, la proporción de residuos básicos e hidrofóbicos y el número y localización de los puentes disulfuro. De acuerdo con su estructura secundaria, los péptidos antimicrobianos se pueden clasificar en cinco grupos diferentes: i) α -hélice ii) β -lámina iii) mezcla de α -hélice y β -lámina iv) sin estructura secundaria o irregular v) macrocíclicos.

6.1. Distribución

Los péptidos antimicrobianos son un componente muy importante en la primera línea de defensa del huésped frente a las infecciones y constituyen un mecanismo de inmunidad innata que se ha conservado a lo largo de la evolución (Kang et al. 2012). Así, se han aislado péptidos antimicrobianos 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) (Zasloff 2002). La expresión de estos péptidos puede ser constitutiva (α -defensina) o inducible (β -defensina) por componentes microbianos o estímulos inflamatorios, incluyendo las citoquinas proinflamatorias, bacterias enteras o ciertos componentes bacterianos como el LPS (Yount and Yeaman 2012).

En organismos superiores, los péptidos antimicrobianos son secretados con frecuencia por las células epiteliales que recubren el tracto respiratorio, gastrointestinal o genitourinario. De hecho, muchos péptidos de este tipo han sido descubiertos en tejido epitelial de plantas, insectos y mamíferos. Sin embargo, es en células circulantes del sistema inmunitario donde se han identificado 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, como polyphemusin I (Fjell et al. 2012), en los gránulos de los hemocitos y los libera a la hemolinfa tras la estimulación de componentes bacterianos como el LPS.

Además de jugar un importante papel efector en la inmunidad innata, los péptidos antimicrobianos también pueden participar en funciones inmunomodulatorias. Este es el caso de las defensinas y catelicidinas, que además de actividad antimicrobiana directa, poseen funciones quimiotácticas sobre células del sistema inmunológico (Yount and Yeaman 2012). 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. A estos compuestos se les denomina “reguladores de la defensa innata” (*innate defense regulator*, IDR) (Easton et al. 2009).

6.2. Lactoferrina y lactoferricina

Uno de los compuestos antimicrobianos más abundantes en el sistema inmune innato humano es la lactoferrina, también conocida como lactotransferrina. Esta glicoproteína globular de 80 kDa pertenece a la familia de las transferrinas y fue inicialmente purificada a partir de la leche, aunque también está presente en otros fluidos corporales como lágrimas, saliva y sudor (Ammons and Copié 2013). La lactoferrina es producida también por los neutrófilos circulantes y por varios tipos de células, incluyendo algunas células acinares. Su región funcional más importante es un péptido de 45 aminoácidos, denominado lactoferricina, que se encuentra en el extremo N-terminal y que se obtiene por hidrólisis ácida. La lactoferricina 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.

La lactoferrina posee una amplia variedad de funciones, que incluyen actividad antimicrobiana frente a bacterias, virus, hongos y parásitos, actividad inmunomoduladora por inhibición de la vía clásica del complemento (Siqueiros-Cendón et al. 2014), antiendotóxica, permeabilizante (Brouwer et al. 2011; Sánchez-Gómez et al. 2011), actividad frente a los *biofilm* (Wakabayashi et al. 2009; Xu et al. 2010; Ammons and Copié 2013; Sánchez-Gómez et al. 2015), enzimática y antitumoral (Gifford et al. 2005). Además, la lactoferrina es capaz de secuestrar el hierro del medio interno del huésped, lo que dificulta el crecimiento, la actividad metabólica y la liberación de factores de virulencia microbianos (O'May et al. 2009). Debido a su marcado carácter catiónico y a su anfipaticidad, la lactoferrina 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, la lactoferrina posee actividad anti-endotóxica y puede producir una alteración y desorganización de la envoltura bacteriana que provoca la muerte por efecto directo o indirecto (permeabilizando la membrana bacteriana a otros compuestos) (Brouwer et al. 2011). También se ha descrito que la lactoferrina puede translocarse al interior de la bacteria e inhibir la síntesis de ADN, ARN o proteínas.

6.3. Mecanismo de acción antibacteriano

El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos es generalmente bactericida, ya que a concentraciones inhibitorias estos compuestos son capaces de insertarse en la membrana bacteriana formando poros y promoviendo la desorganización de esta estructura (Figura 9). Previamente, la elevada carga positiva de los péptidos les permite unirse a componentes aniónicos muy conservados presentes en la envoltura bacteriana, como el LPS y los ácidos teicoicos. Algunos péptidos antimicrobianos también se unen a dianas intracelulares e inhiben procesos biológicos esenciales, como la síntesis de ADN, ARN, proteínas o peptidoglicano. A concentraciones subinhibitorias, estos compuestos pueden permeabilizar la envoltura celular bacteriana a muchas sustancias, incluyendo antibióticos de distintas clases (Kwa et al. 2008; Landman et al. 2008).

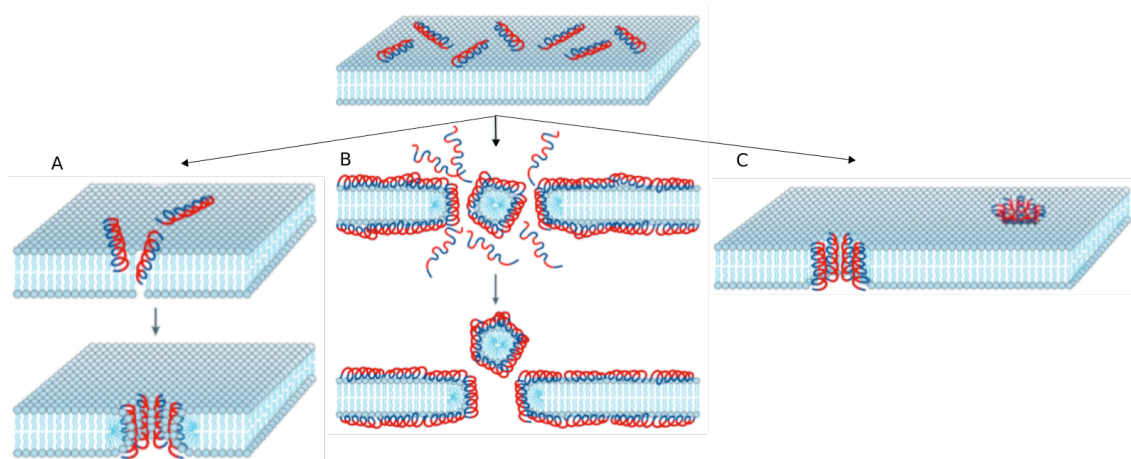


Figura 9.- Modelos de poros que los péptidos antimicrobianos pueden hipotéticamente formar en membranas bacterianas. A) Poro toroidal; B) Tipo alfombra; C) Barril sin fondo. Adaptado de (Brogden 2005).

6.4. Mecanismos de resistencia a los péptidos antimicrobianos

El principal mecanismo de resistencia de las bacterias a los péptidos antimicrobianos implica modificaciones que disminuyen la carga negativa neta de los componentes de la envoltura con los que interactúan estos agentes. En el caso de gramnegativos la molécula que sufre las modificaciones más profundas es el LPS. Estas alteraciones incluyen la adición de ácidos grasos al lípido A, fosfoetanolamina al núcleo, 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa al núcleo y lípido A, así como acetilaciones de la cadena O e hidroxilaciones de ácidos grasos. Otros mecanismos de resistencia se basan en la modificación de la producción de ciertas proteínas de membrana, la activación de transportadores y bombas de expulsión activa (Bengoechea and Skurnik 2000) y la producción de enzimas proteolíticas. (Gunn 2001). Así, se ha descrito que *Yersinia enterocolitica*, altera la producción de proteínas de membrana externa para resistir la acción de los péptidos antimicrobianos (Brogden 2005) y que produce un sistema de expulsión activa de péptidos antimicrobianos formado por las proteínas RosA y RosB (Bengoechea and Skurnik 2000). Recientemente se ha identificado un gen de resistencia a colistina plasmídico en *E. coli* (Hasman et al. 2015; Liu et al. 2015; Rolain and Olaitan 2015; Webb et al. 2015; Du et al. 2016; Quesada et al. 2016), lo que hace posible la transmisión horizontal de este tipo de resistencias.

En el caso de los grampositivos, se ha demostrado que *S. aureus* aumenta su resistencia a péptidos antimicrobianos al esterificar los grupos fosfato de los ácidos teicoicos con D-alanina, lo que se traduce en una marcada disminución de la carga negativa en su envoltura celular (Brogden 2005).

6.5. Polimixinas

Las polimixinas son un tipo de antibióticos peptídicos cíclicos cargados positivamente que se identificaron por primera vez en los años 40 del siglo pasado y se comenzaron a usar en terapia clínica unas dos décadas después. Estas moléculas están estructuralmente organizadas en un anillo de siete aminoácidos con una cadena lateral de tres aminoácidos que se une covalentemente a un ácido graso (Kwa et al. 2008). Aunque se han descrito cinco tipos de polimixinas diferentes (polimixinas A, B, C, D, E), sólo dos de ellas, polimixina B (PMB) y polimixina E (PME o colistina), se han usado en terapia antimicrobiana. La PMB difiere de la PME en un único cambio de aminoácido (D-fenilalanina en vez de D-leucina) (Landman et al. 2008) (Figura 10). Esta clase de antibióticos tienen una potente actividad bactericida frente a gramnegativos, pero no suelen ser activas frente a grampositivos. Su uso ha estado limitado desde el principio por informes de nefro y neurotoxicidad. Sin embargo, debido al incremento en la prevalencia de bacterias gramnegativas multiresistentes, las polimixinas se están utilizando de nuevo como terapia de último recurso (Landman et al. 2008). A diferencia de la PME, que se emplea en terapia sistémica, la PMB se administra por vía tópica principalmente debido a su mayor toxicidad.

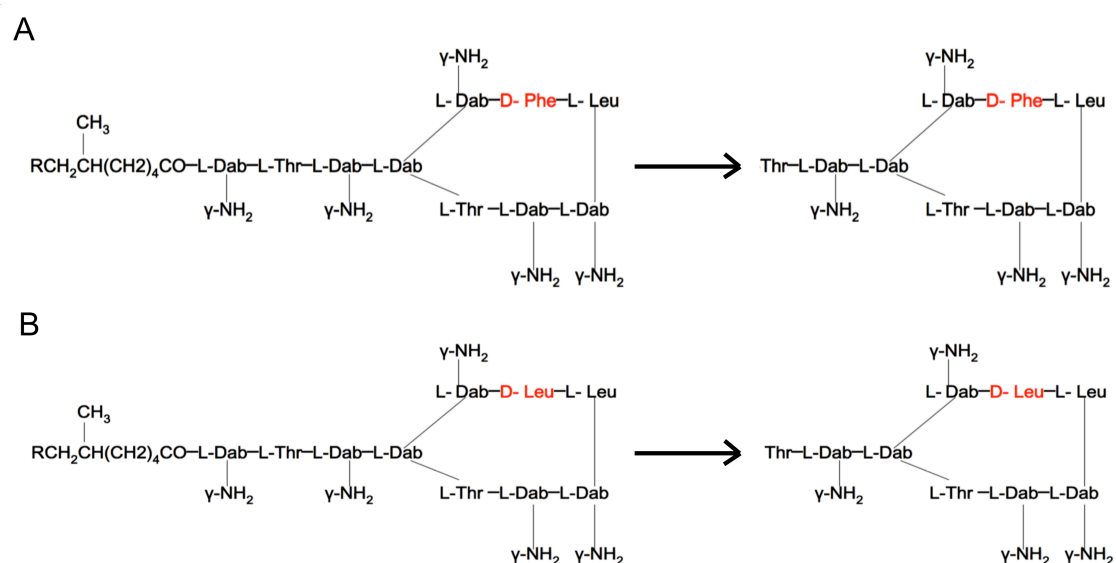


Figura 10.- Estructura molecular de A) PMB y PMBN y B) colistina (PME) y PMEN. Adaptado de (Kwa et al. 2008).

6.5.1. Colistina y PMB

Para su administración clínica, la PMB se formula como una sal de sulfato y es la polimixina más potente, pero también la más tóxica. No obstante, este compuesto requiere dosis más bajas que otras polimixinas para ser eficaz, lo que compensa dicha toxicidad (Kwa et al. 2008). La experiencia clínica con PMB intravenosa es limitada y

en alguna ocasión se administra por infusión lenta para evitar efectos toxicológicos agudos.

La PME o colistina se desarrolló en la década de los sesenta como una polimixina de menor toxicidad. A día de hoy existen dos presentaciones diferentes, el sulfato de colistina, que se utiliza únicamente para terapia tópica y el colistimetato sódico, una prodroga inactiva que se hidroliza *in vivo* e *in vitro* para formar la molécula activa colistina. Esta preparación es menos tóxica y se utiliza por vía parenteral (Kwa et al. 2008; Landman et al. 2008). Las DL₅₀s (dosis letales 50) agudas de PME y PMB en ratones son 8 y 9 mg/kg respectivamente (Tsubery et al. 2005).

Estas dos polimixinas se han utilizado ampliamente para tratar infecciones de oído, oftalmológicas, de la piel y para el control de infecciones nosocomiales causadas por patógenos multiresistentes o bacterias gramnegativas sensibles sólo a polimixinas (Kwa et al. 2008).

6.5.2. Nonapéptidos de polimixina (PMBN y PMEN)

El nonapéptido de la polimixina B (PMBN) y el nonapéptido de la polimixina E (PMEN) son los péptidos que se generan cuando se digiere la PMB o a la PME, respectivamente, con papaína de tal forma que la molécula pierde el ácido graso y el aminoácido inmediatamente adyacente al ácido graso (Chihara et al. 1973). Estos péptidos tienen una capacidad antimicrobiana marcadamente inferior a la de sus moléculas parentales, pero retienen su capacidad de permeabilizar la membrana externa de las bacterias gramnegativas (Viljanen and Vaara 1984; Vaara and Viljanen 1985; Brown and Dawson 2015). En contraposición, la toxicidad de las polimixinas es mucho mayor que la de sus derivados deacilados. Así, se ha descrito que las DL₅₀s aguda de PMBN y PMEN en ratones son de 43 mg/kg y 90 mg/kg, respectivamente, un orden de magnitud superior a la de los compuestos parentales (Tsubery et al. 2005).

7. Inhibidores y combinaciones antimicrobianas

La combinación de antimicrobianos generalmente se emplea para aprovechar diferentes mecanismos de acción y/o perfiles de toxicidad. Este tipo de combinaciones son útiles para (i) tratar empíricamente infecciones que amenazan la vida del paciente, (ii) tratar infecciones polimicrobianas, (iii) prevenir la aparición de resistencias, y (iv) aprovechar la sinergia. Sus desventajas son (i) aumento del coste (ii) aumento del riesgo de efectos secundarios (iii) antagonismo y (iv) superinfección (Rybak and McGrath 1996). En terapia antimicrobiana se utilizan combinaciones formadas por dos o más antibióticos, o bien los antibióticos se administran conjuntamente con ciertos

inhibidores enzimáticos.

7.1. Inhibidores de β -lactamasas

Una estrategia eficaz para combatir la resistencia debida a β -lactamasas es la utilización de agentes que se combinan con el centro activo de la enzima y la inactivan. Estos agentes pueden actuar de dos formas. Por una parte, los inhibidores pueden ser sustratos que se unan a la enzima con alta afinidad, pero de manera desfavorable a la hidrólisis (acil-enzimas). Alternativamente, se puede tratar de inhibidores que se unan de manera irreversible a la enzima e impidan su funcionamiento (Bush 1988). Un ejemplo del primer tipo de mecanismo son las cefalosporinas de amplio espectro, los monobactams o los carbapenems, que forman acil-enzimas y adoptan conformaciones catalíticamente incompetentes que son débilmente hidrolizadas. Por otro lado, los inhibidores suicidas irreversibles, pueden inactivar la β -lactamasa permanentemente a través de una reacción química secundaria que ocurre en el mismo centro catalítico de la molécula (Drawz and Bonomo 2010).

7.1.1. Inhibidores de BLEEs

El ácido clavulánico, aislado en 1970 de *Streptomyces clavuligerus*, es el primer inhibidor de β -lactamasas que se introdujo en terapia clínica (Reading and Cole 1977). La sal del ácido clavulánico carecía prácticamente de actividad antimicrobiana por sí misma, sin embargo, cuando se combinó con amoxicilina, el clavulanato disminuyó significativamente la CMI del antibiótico frente a *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *E. coli* (Brown 1986).

El sulbactam y el tazobactam son inhibidores de β -lactamasas que fueron desarrollados posteriormente, en 1978 y 1980, por la industria farmacéutica como compuestos sintéticos (English et al. 1978; Fisher et al. 1980). Estos dos inhibidores, junto con el ácido clavulánico, son estructuralmente similares a la penicilina y son eficaces frente a muchas β -lactamasas de la clase A, aunque son menos activos frente a las enzimas de clase B, C y D (Drawz and Bonomo 2010). Se ha descrito que los inhibidores de β -lactamasas de clase A tienen un mecanismo de acción complejo que puede implicar varios fenómenos: i) un cambio reversible que genera una enzima transitoriamente inhibida, un tautómero (E-T), ii) la inactivación permanente al unirse covalentemente a la enzima (E-I*) o iii) una regeneración de la forma activa de la enzima después de ser hidrolizados (E+P) (Figura 11) (Drawz and Bonomo 2010).

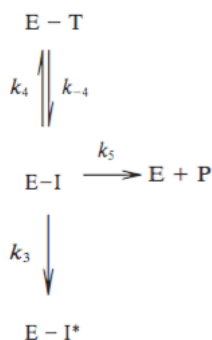


Figura 11.- Posibles mecanismos de acción de los inhibidores de β -lactamasas de clase A. Adaptado de (Drawz and Bonomo 2010). E: enzima, P: producto, I: inhibidor y T: tautómero de la enzima transitoriamente inactivada.

7.1.2. Inhibidores de AmpC

Entre los compuestos con actividad inhibitoria de la β -lactamasa AmpC, destaca el β -lactámico oxacilina, que además posee actividad antibiótica resistente a β -lactamasas, excepto las de clase D (Bush et al. 1995; Jacoby 2009; Drawz and Bonomo 2010). Otro compuesto de este tipo es el aztreonam, un monobactam que resiste la hidrólisis de las β -lactamasas de clase B (Fariñas and Martínez-Martínez 2013; Shlaes 2013) e inhibe a la enzima AmpC (Drawz and Bonomo 2010). Aztreonam presenta una alta afinidad por las PBPs de un gran número de bacterias gramnegativas aerobias incluyendo a *P. aeruginosa*. Este compuesto es capaz de acilar e inactivar de manera estable las β -lactamasas de clase C (Sykes et al. 1982).

En los años 70 se describió que los compuestos del ácido borónico formaban uniones covalentes reversibles con las serinproteasas e inhibían a estas enzimas formando intermediarios inactivos. Más tarde se demostró que los ácidos borónicos (que carecen de motivo β -lactámico), podían inhibir de forma reversible las β -lactamasas de clase A (Kiener and Waley 1978) y de clase C (Beesley et al. 1983). A diferencia de la mayoría de los inhibidores de β -lactamasas, que son moléculas β -lactámicas sensibles a altas concentraciones de la enzima, los ácidos borónicos fueron los primeros inhibidores completamente inertes descritos (Beesley et al. 1983). Los compuestos del ácido borónico pueden difundir a través de la membrana externa (Crompton et al. 1988), y al no tener relación estructural con los β -lactámicos, no aumentan la frecuencia de bacterias resistentes a estos antibióticos (Weston et al. 1998).

Los derivados del ácido borónico se han mejorado de manera gradual para imitar la estructura de los sustratos naturales de las β -lactamasas. A partir de esas modificaciones se han desarrollado glicilboratos, ácidos sulfonamido borónicos y el boronato cíclico RPX7009. Este último compuesto está en fase I de desarrollo tanto

como monoterapia como combinado con biapenem (Buynak 2013; Drawz et al. 2014) o en fase III con meropenem para infecciones urinarias e infecciones intra-abdominales complejas causadas por gramnegativos (Shlaes 2013) (ver más adelante).

7.1.3. Nuevos inhibidores

Recientemente, se ha desarrollado un nuevo inhibidor de β -lactamasas denominado avibactam. Este compuesto es estructuralmente un diazabiciclooctano que tiene relación estructural con los β -lactámicos y posee un grupo carbonilo electrofílico (Chen et al. 2013; Shlaes 2013). Comparado con el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, este inhibidor es activo a menor concentración (IC₅₀% de 3 frente a 170 nM) y presenta menores tasas de reactivación para las β -lactamasas de clase A y C y similares IC₅₀% frente a BLEEs. Cuando se une a la enzima, forma una unión estable con el residuo de serina del sitio activo que hace que la β -lactamasa se acile y se inactive (Drawz et al. 2014). MK-7655 es también un diazabiciclooctano (Chen et al. 2013) y, como avibactam, tiene un espectro de acción más amplio que los inhibidores de β -lactamasas clásicos. Inhibe a β -lactamasas de clase A y C, incluyendo a las carbapenemasas. MK-7655 ha completado la fase I de un ensayo clínico en combinación con imipenem y clisatatina y ahora está en fase II para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario e infecciones intra-abdominales complejas (Buynak 2013; Drawz et al. 2014).

7.2. Combinaciones β -lactámico/inhibidores de β -lactamasas

Actualmente, las cinco combinaciones β -lactámico/inhibidor de β -lactamasas más utilizadas en terapia antimicrobiana son: amoxicilina/ácido clavulánico, ticarcilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam y cefoperazona/sulbactam (Drawz and Bonomo 2010). La combinación amoxicilina/ácido clavulánico fue la primera que se aprobó para su uso en la práctica clínica, en 1981 en el Reino Unido y en 1984 en EEUU. Desde entonces sigue siendo la única combinación disponible por vía oral. La administración oral la convierte en una buena opción para pacientes ambulatorios a los que se prescribe principalmente para tratar infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad. En Europa también está disponible la versión intravenosa de esta combinación, que se utiliza principalmente para tratar bacteriemias por *E. coli* BLEE (Livermore et al. 2008; Rodríguez-Baño et al. 2008).

Cuando se introdujo en 1985, ticarcilina/ácido clavulánico fue la primera combinación β -lactámico/inhibidor de β -lactamasas disponible para administración parenteral. Se ha descrito que el ácido clavulánico puede inducir la expresión de la β -

lactamasa AmpC cromosómica en muchas enterobacterias, por lo que este inhibidor puede tener efectos antagonistas combinado con un β -lactámico (Kitzis et al. 1989; Lister et al. 1999). Por este motivo, Livermore y Nikaido propusieron combinar el ácido clavulánico con una cefalosporina, un antibiótico que es mucho más estable frente a AmpC (Nikaido et al. 1990; Livermore et al. 2008).

Ampicilina/sulbactam se empezó a comercializar en 1987. Su amplio espectro la convirtió en la terapia ideal para infecciones polimicrobianas tales como infecciones abdominales, cirugías ginecológicas, neumonía por aspiración, abscesos odontológicos y pie diabético. Como el sulbactam no se absorbe bien oralmente se debe administrar por vía parenteral. Sin embargo, la combinación ampicilina/sulbactam intravenosa se tolera muy bien y carece prácticamente de efectos secundarios (Akova 2008). Desgraciadamente, la resistencia de *E. coli* a esta combinación está aumentando (Kaye et al. 2000).

La combinación de piperacilina con tazobactam comenzó a estar disponible en Estados Unidos en 1993. Piperacilina es una penicilina de amplio espectro que es activa frente a muchos aerobios y anaerobios grampositivos y gramnegativos (Gin et al. 2007). Este antibiótico sin combinar es eficaz frente a *P. aeruginosa*, neumococos, estreptococos, anaerobios y *Enterococcus faecalis* y esta actividad se mantiene cuando se combina con tazobactam. Aunque la adición de tazobactam no aumenta siempre la susceptibilidad de las cepas que expresan la β -lactamasa AmpC, sí protege al antibiótico de aquellas que expresan BLEEs (Drawz and Bonomo 2010). Además, tazobactam inhibe la secreción renal de piperacilina, lo que aumenta los niveles en sangre del antibiótico y facilita la acción antimicrobiana de esta combinación (Shlaes 2013).

La combinación cefoperazona/sulbactam se introdujo en terapia clínica en el año 1986 y se utiliza en algunos países europeos, Japón e India, pero no está disponible en EEUU (Drawz and Bonomo 2010). Cefoperazona es una cefalosporina de tercera generación eficaz frente a bacterias aerobias y anaerobias gramnegativas, además es una de las pocas cefalosporinas que tiene actividad frente a *P. aeruginosa*. La combinación de sulbactam con este antibiótico lo protege de la acción de las β -lactamasas (Williams 1997).

En diciembre de 2014 se aprobó en Estados Unidos la combinación ceftolozano/tazobactam y actualmente se está estudiando su aprobación en Europa (Bettioli and Harbarth 2015). La cefalosporina antipseudomónica ceftolozano combinada con tazobactam se emplea para tratar infecciones causadas por

microorganismos gramnegativos, especialmente aquellas causadas por *P. aeruginosa*. La cefalosporina por sí misma no se ve afectada por la sobreexpresión de MexAB-OprM o la delección de OprD, pero es susceptible a la producción de BLEEs, de KPC o a la hiperexpresión de AmpC (Shlaes 2013). La combinación con tazobactam soluciona el problema de las BLEEs o de AmpC, pero el inhibidor no es capaz de neutralizar a las KPCs (Buynak 2013). El tratamiento ceftolozano/tazobactam está indicado para infecciones del tracto urinario e infecciones intra-abdominales complejas. Además, la combinación está en ensayos de fase III para neumonías hospitalarias y asociadas a ventilación y en fase I para su uso pediátrico (Bettioli and Harbarth 2015).

La combinación ceftazidima/avibactam se aprobó en EEUU en febrero de 2015 para el tratamiento de las infecciones por gramnegativos, incluso las causadas por *P. aeruginosa* multiresistente, cepas BLEE y KPC. Asimismo, esta combinación suplementada con metronidazol se ha aprobado para infecciones intra-abdominales complejas e infecciones urinarias en pacientes sin opciones terapéuticas alternativas. Finalmente, ceftazidima/avibactam está en fase III para neumonías hospitalarias y asociadas a ventilación e infecciones intra-abdominales complejas (Bettioli and Harbarth 2015).

Por último, la combinación meropenem/RPX7009 se encuentra en fase III para infecciones del tracto urinario e infecciones intra-abdominales complejas causadas por gramnegativos, incluso aquellas provocadas por enterobacterias resistentes a carbapenems y KPCs (identifiers: NCT02168946 and NCT02166476) (Bettioli and Harbarth 2015). El nuevo inhibidor de β -lactamasas de amplio espectro RPX7009 es activo, no sólo frente a β -lactamasas de clase A, incluyendo a las carbapenemasas tipo KPC, sino también frente a enzimas de clase C (Shlaes 2013). Esta molécula es un borato cíclico derivado del ácido borónico (Buynak 2013).

7.3. Inhibidores de bombas de expulsión activa

La producción de bombas de expulsión por parte de las bacterias, sobre todo cuando existe una hiperexpresión, es probablemente el mecanismo de resistencia más difícil de combatir, pues la práctica totalidad de los antibióticos son sustrato de algún sistema de expulsión. La aplicación con éxito de inhibidores de β -lactamasas, ha estimulado la identificación y desarrollo de inhibidores de bombas de expulsión activa. Teóricamente, estas moléculas podrían devolver la eficacia a antibióticos sustrato de las bombas e incluso ampliar notablemente el espectro de acción de moléculas que, en ausencia de un inhibidor, son eficazmente neutralizadas por estos sistemas (Li et

al. 2015). Finalmente, se ha descrito que la formación de, al menos algunos tipos de *biofilms* bacterianos, depende de la funcionalidad de las bombas de expulsión activa, ya que la inactivación de estos sistemas impide el correcto desarrollo de las biocapas (Kvist et al. 2008).

7.3.1. PA β N y NMP

Los primeros inhibidores experimentales de sistemas de expulsión activa de grampositivos se desarrollaron tras la identificación de los antibióticos sustrato de la bomba NorA de *S. aureus*, que resultaron ser fluoroquinolonas y ciertas moléculas catiónicas. Este hecho sugirió a los investigadores que podrían diseñarse moléculas estructuralmente relacionadas con esos sustratos que actuaran como inhibidores de NorA, como así ocurrió. El caso de las bombas de gramnegativos era mucho más complejo, porque estos sistemas tienen un espectro de sustratos mucho más amplio y pueden expulsar compuestos con poca relación estructural. La identificación del primer inhibidor de bombas de expulsión de gramnegativos en 2001, la molécula PA β N (*L-Phe-L-Arg- β -naphthylamide dihydrochloride*), supuso un hito (Lomovskaya et al. 2001; Li et al. 2015), ya que muchos investigadores pensaban que no se podrían desarrollar compuestos que neutralizasen este tipo de sistemas.

PA β N es un inhibidor de amplio espectro capaz de inhabilitar las tres bombas RND más importantes de *P. aeruginosa*, MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN (Lomovskaya et al. 2001), así como el sistema de expulsión principal de *E. coli* y *K. pneumoniae*, AcrAB-TolC (Schweizer 2012; Li et al. 2015). Como consecuencia de su acción inhibitoria, PA β N restaura la actividad de las fluoroquinolonas, cloranfenicol, macrólidos, oxazolidinonas y rifampicinas, pero no la de β -lactámicos o aminoglucósidos (Schweizer 2012). Como esta molécula es, a su vez, un sustrato del sistema de expulsión, parece que su acción inhibitoria es resultado de la competencia por el proceso de transporte.

Una importante ventaja que conlleva el uso de estos inhibidores, y que se detectó con PA β N, es que en su presencia desciende dramáticamente la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a los antibióticos. Además, se ha descrito que, a altas concentraciones, PA β N es capaz de permeabilizar también a la célula bacteriana. Por desgracia, la elevada carga positiva de esta molécula facilita su acumulación en los tejidos y puede producir daño renal, por lo que en 2006 se abandonó el desarrollo de este inhibidor (Lomovskaya and Bostian 2006).

El segundo inhibidor más usado en este campo de investigación es NMP (*1-(1-naphthylmethyl)-piperazine*), descubierto en 2004 por Bohner y Kern (Bohnert and

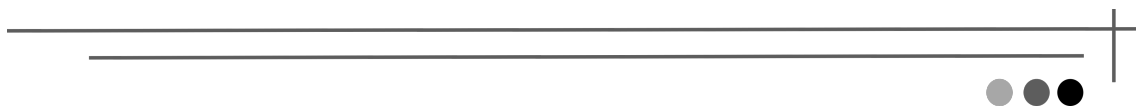
Kern 2005). NMP inhibe con menor potencia que PA β N las bombas de expulsión (Schumacher et al. 2006) y se ha descrito que es un posible agonista de la serotonina, por lo que parece improbable que este inhibidor pueda encontrar aplicación en terapia clínica.

A pesar de que su mecanismo de inhibición no se conoce bien, parece ser que ambos compuestos se unen a un punto clave del bolsillo proximal del transportador, el *loop-G*, e interfieren con el movimiento del sustrato del bolsillo proximal al distal, un proceso esencial en el mecanismo de transporte del antibiótico (Li et al. 2015).

7.4. Combinaciones de antibióticos con inhibidores de bombas de expulsión

En la actualidad, la estrategia basada en la combinación de un antibiótico y un inhibidor de bombas de expulsión continúa siendo experimental y se halla lejos de alcanzar uso clínico. En 2004 la empresa *Mpex Pharmaceuticals, Inc.* anunció el comienzo de un ensayo clínico de fase Ib para estudiar un fármaco aplicado como aerosol en pacientes con fibrosis quística por *Pseudomonas*. La molécula candidata era MP-601,205 (Fox 2006; Lomovskaya and Bostian 2006; Tegos et al. 2011) un inhibidor de bombas que podría incrementar la eficacia de antibióticos en el tratamiento de fibrosis quística, neumonías adquiridas en el ámbito hospitalario y ciertas enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (Schweizer 2012). Esta ha sido la primera y única vez que un inhibidor de bombas de expulsión se ha evaluado en humanos. En la fase II se pretendía combinar este inhibidor con la fluoroquinolona ciprofloxacino. A día de hoy parece ser que el desarrollo de este inhibidor se ha interrumpido.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dado que los péptidos antimicrobianos desestabilizan y permeabilizan la envoltura bacteriana, nuestra hipótesis es que estos agentes podrían facilitar la penetración al interior de la célula de inhibidores de β -lactamasas e inhibidores de bombas de flujo, lo que podría ocasionar una neutralización de dos importantes mecanismos de resistencia antibiótica. Si dicho fenómeno ocurre, sería de esperar que el uso combinado a concentraciones subinhibitorias del péptido, del inhibidor y del antibiótico sustrato de estos mecanismos de resistencia, incrementa el efecto que tiene cada uno por separado.

Empleando un mecanismo de potenciación similar, los péptidos antimicrobianos podrían convertir a aquellos antibióticos que suelen ser eficaces sólo frente a grampositivos multiresistentes en compuestos activos también sobre bacterias gramnegativas multiresistentes. De ser así, el tratamiento combinado resultante podría emplearse teóricamente como terapia empírica universal, pues sería eficaz frente a grampositivos y gramnegativos.

Nuestro objetivo general es investigar la eficacia de un nuevo enfoque experimental basado en el uso combinado de inhibidores de β -lactamasas o de bombas de expulsión activa, antibióticos y péptidos permeabilizantes sobre bacterias tanto en fase planctónica como formando *biofilm*.

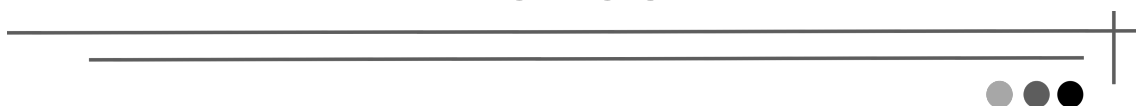
Se consideraron los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar los compuestos de la librería peptídica con mayor actividad permeabilizante sobre un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* productor de *biofilms* y con menor toxicidad sobre células humanas.
2. Determinar la capacidad de los péptidos antimicrobianos seleccionados para actuar en sinergia con antibióticos β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas sobre *Pseudomonas aeruginosa* productoras de β -lactamasas AmpC en estado planctónico y en *biofilm*.
3. Cuantificar la actividad sinérgica de los péptidos antimicrobianos seleccionados en combinación con antibióticos β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas sobre *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido en estado planctónico y en *biofilm*.
4. Estudiar si los péptidos seleccionados son capaces de potenciar la acción de inhibidores del sistema de expulsión de antibióticos MexAB-OprM y de neutralizar la

resistencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que sobreexpresen MexAB-OprM en estado planctónico y en *biofilm*.

5. Investigar si los péptidos seleccionados pueden potenciar la actividad de vancomicina, daptomicina y levofloxacino frente a *Pseudomonas aeruginosa* o a *Staphylococcus aureus* multiresistentes.

MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas empleadas se muestran en la Tabla 6. Las bacterias se cultivaron en el medio Luria-Bertani (LB; Laboratorios Conda/Pronadisa, Madrid) o en el medio *Trypticase Soy Broth* (TSB; BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia) sin suplementar o suplementado con 15 g/ L de agar bacteriológico (Laboratorios Conda/Pronadisa) a 37 °C. La susceptibilidad bacteriana a los antimicrobianos, se determinó empleando el medio de cultivo Mueller-Hinton con cationes ajustados (MHCA; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EEUU) o excepcionalmente –cuando se cita expresamente- sin ajuste de cationes divalentes (MHNA; Difco Laboratories). Los cultivos líquidos que requerían agitación se incubaron en un agitador orbital Aquatron (Infors HT, Bottmingen, Suiza) a 150 rpm. Para su conservación a largo plazo, las cepas se mantuvieron a -80°C en viales con un 10% de leche descremada estéril.

Tabla 6.- Características relevantes de las cepas empleadas.

Cepa	Características relevantes	Fuente ¹ o Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1 CECT 4122	Tipo salvaje.
	PAAD	Mutante derivado de PAO1 con mutación en <i>ampD</i> que provoca una sobreexpresión de la betalactamasa AmpC.
	CUN 4158-02 Ps4	Aislamiento clínico de esputo.
	CUN Ps74	Aislamiento clínico de esputo.
	LC1-6	Mutante derivado de PAO1 con mutación en <i>nalB</i> que provoca una sobreexpresión de la bomba de flujo MexAB-OprM.
	K1119	Mutante derivado de PAO1 con delección en la bomba de flujo MexAB-OprM.
<i>Escherichia coli</i>	25922	Cepa control de la calidad antibiótica.
	CUN E20	Aislamiento clínico de un hisopo uretral que expresa betalactamasas de espectro extendido.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CUN K2	Aislamiento clínico de un hisopo perianal que expresa betalactamasas de espectro extendido.
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Cepa control de la calidad antibiótica.
	43300	Cepa meticilina resistente.
	CUN 3792	Aislamiento clínico meticilina resistente.
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	CUN 11844-99	Aislamiento clínico de lavado broncoalveolar.

¹ CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, ATCC: *American Type Culture Collection*, CUN: Clínica Universidad de Navarra.

P. aeruginosa CUN 4158-02 Ps4 es una cepa clínica aislada de una muestra de esputo en 2002 y cuyos mecanismos de resistencia fueron previamente caracterizados (Sánchez-Gómez 2008). Es una cepa multiresistente sensible a colistina que sobreexpresa la bomba MexAB-OprM, posee la porina *oprD* y tiene mutaciones en las regiones QRDR (*quinolone resistance-determining region*) de los genes codificantes de la ADN girasa II (*gyrA*). Por otro lado, *P. aeruginosa* CUN Ps74, también es una cepa clínica caracterizada con anterioridad en la tesis de Susana

Sánchez-Gómez y posee varios mecanismos de resistencia (Sánchez-Gómez 2008). *P. aeruginosa* CUN Ps74 es una cepa resistente a la colistina que sobreexpresa las bombas MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM. Además carece de la porina oprD y de enzimas carbapenemasas.

2. Antibióticos, inhibidores de enzimas y de bombas de expulsión

Las soluciones antibióticas se prepararon teniendo en cuenta su pureza y se guardaron a -20°C, según las recomendaciones del fabricante, a una concentración de entre 100 y 200 veces su concentración de trabajo.

Se utilizaron representantes de los siguientes grupos de antibióticos (i) β -lactámicos: piperacilina sal sódica (PIP), amoxicilina, ampicilina sal sódica, ceftazidima hidrato (CAZ) y ticarcilina sal disódica, (ii) quinolonas: levofloxacino (LVX), (iii) tetraciclinas: doxiciclina hiclato, (iv) glicopéptidos: vancomicina hidrocloreto (VA), (v) macrólidos: azitromicina (AZM) (Zitromax®, Pfizer, Viena, Austria) (vi) lipopéptidos: daptomicina (DAP) (Cubicin®, Novartis Europharm Limited, Horsham, Reino Unido) y (vii) aminocumarinas: Novobiocina sal de sodio (todos ellos adquiridos de Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EEUU salvo que se haya indicado lo contrario).

Se emplearon inhibidores de (i) AmpC: oxacilina sal sódica monohidrato, ácido fenilborónico (AFB) y aztreonam (ATM), (ii) de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs): clavulanato potásico (CLA), tazobactam sal sódica (TAZ) y sulbactam y (iii) de bombas de expulsión activa (EPs: *efflux pump inhibitors*): 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) y L-Phe-L-Arg- β -naphthylamide dihidrocloreto (PA β N). Todos los inhibidores se adquirieron en Sigma-Aldrich.

3. Péptidos antimicrobianos

Las secuencias de los péptidos empleados se muestra en la Tabla 7. Los péptidos de las generaciones P4 y P5, de entre 8 y 13 aminoácidos, fueron suministrados por *PolyPeptide Laboratories* (Estrasburgo, Francia) con una pureza mayor del 95 % y con un grupo amida en vez del carboxilo terminal. Los compuestos se diseñaron en colaboración con los Drs. Roman Jerala y Bostjan Japelj del *National Institute of Chemistry*, Ljubljana, Eslovenia. El compuesto parental de estos péptidos es LF11, un péptido de 11 aminoácidos derivado del dominio de unión al lipopolisacárido de la lactoferrina humana (Andrä et al. 2005).

Como compuestos modelo de actividad bactericida y permeabilizante, se emplearon el lipopéptido polimixina B (PMB, Sigma-Aldrich) y su derivado no acilado polimixina B nonapéptido (PMBN, Sigma-Aldrich). PMB y PMBN poseen una estructura cíclica rica en ácido diaminobutírico (Dab) y sus secuencias son metil-

octanoil (MOA)-Dab-Thr-Dab-cyclo[Dab-Dab-D-Phe-Leu-Dab-Dab-Thr] y H-Thr-Dab-cyclo[Dab-Dab-D-Phe-Leu-Dab-Dab-Thr] respectivamente.

También se utilizó el péptido polimixina E nonapéptido (PMEN) (*Polypeptide Laboratories*). Este compuesto es el derivado no acilado de la colistina o polimixina E (PME; Sigma-Aldrich). PMEN es un péptido cíclico que posee la siguiente secuencia H-Thr-Dab-cyclo[Dab-Dab-D-Leu-Leu-Dab-Dab-Thr].

Los péptidos se resuspendieron en agua ultrapura estéril a una concentración de 10 mg/mL y se conservaron a -20°C.

Tabla 7.- Secuencia de los péptidos empleados y del péptido parental LF11.

Péptidos	Secuencias													
LF11	F	Q	W	Q	R	N	I	R	K	V	R	-NH ₂		
P4-1	P	F	W	R	R	F	W	R	R	R	-NH ₂			
P4-5	R	R	R	I	W	R	R	W	F	I	-NH ₂			
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					

4. Evaluación de la toxicidad de los péptidos antimicrobianos

4.1. Capacidad hemolítica

Para cuantificar la capacidad hemolítica de la librería peptídica que teníamos disponible, primero se obtuvo la fracción celular de la sangre de un voluntario sano (4 mL) mediante centrifugación a 1500 x g durante 5 min (Allegra TM X12R, Beckman-Coulter, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona). El sobrenadante de esta centrifugación se eliminó por decantación y el sedimento se lavó tres veces añadiendo 2 mL de *buffer*

fosfato salino (PBS) (Gibco; Nueva York, EEUU) cada vez y centrifugando en las mismas condiciones.

En una placa de 96 pocillos con fondo en "U" (TPP, Trasadingen, Suiza) se realizaron diluciones dobles seriadas de los péptidos (500-15,6 µg/mL) y se añadieron los eritrocitos a una concentración del 0,4 % de la original. También se realizaron controles positivos y negativos de hemólisis añadiendo, en lugar de los péptidos, Tritón-X 100 al 10 % (Sigma-Aldrich) y PBS, respectivamente. Tras una incubación de 30 min a 37 °C, la placa se centrifugó a 1500 x g durante 10 min (Allegra TM X12R Beckman-Coulter) para sedimentar los eritrocitos. Las medidas de absorbancia de los sobrenadantes se realizaron en placas de poliestireno desechables (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia) en un espectrofotómetro (Thermo Multiskan Ex; Thermo Scientific; Madrid) a 540 nm. La capacidad hemolítica de los péptidos se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \left(\frac{\text{Absorbancia péptido} - \text{Absorbancia control negativo}}{\text{Absorbancia control positivo}} \right) \times 100$$

Se estableció un 30 % de lisis como el nivel mínimo para considerar un resultado de hemólisis como positivo.

4.2. Capacidad citotóxica

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo empleando la línea celular de fibroblastos humanos T175. Las células se cultivaron a 37 °C en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Gibco) complementado con antibióticos, antifúngicos y suero fetal bovino inactivado (Gibco) al 10% hasta que alcanzaron una confluencia del 80-90% en el fondo del matraz de cultivo (Corning, Nueva York, EEUU). A continuación, las células se despegaron del matraz mediante tratamiento con tripsina y se depositaron en los pocillos de una placa de micro-titulación a razón de 20.000 células/pocillo. Tras incubar la placa toda la noche a 37 °C y en atmósfera de 5% CO₂, las células se expusieron a concentraciones crecientes de los péptidos en estudio y se reanudó la incubación en las mismas condiciones durante 24 h. Además, se realizaron controles positivos y negativos de citotoxicidad añadiendo a los pocillos 20 µL de DMSO (Dimetil sulfóxido; Panreac; Castellar del Vallès, Barcelona) o PBS, respectivamente, en vez de los péptidos. Una vez retirados los tratamientos, las células se lavaron con PBS y se añadió a todos los pocillos 200 µL de una solución al 0,5 mg/mL de bromuro de 4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich) en DMEM complementado y la placa se incubó durante 4 h a 37 °C en

atmósfera de 5% CO₂. El formazán producido como consecuencia de la oxidación del MTT por las células supervivientes se extrajo con DMSO y se cuantificó en un espectrofotómetro (Thermo Multiskan Ex) a 540 nm.

El porcentaje de supervivencia se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Supervivencia} = \left(\frac{\text{Absorbancia tratado} - \text{Absorbancia blanco}}{\text{Absorbancia control negativo} - \text{Absorbancia blanco}} \right) \times 100$$

5. Caracterización de las cepas

5.1. Detección fenotípica de la presencia de β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs)

Se emplearon tres métodos fenotípicos para detectar la producción de BLEEs: el cultivo en medio cromogénico y selectivo chromID ESBL (BioMerieux), el test de sinergia de doble disco y el test de disco combinado (Calvo et al. 2011).

El medio colorimétrico y selectivo chromID ESBL permite el cribado de enterobacterias productoras de BLEEs, resistentes a la cefpodoxima que posee el medio y la identificación preliminar de las mismas de acuerdo con el siguiente criterio:

- *Escherichia coli*: coloración rosa a granate por colonias productoras de β-glucuronidasa.
- *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*: coloración de verde azulada a marrón verdosa por colonias productoras de β-glucosidasa.
- *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*: coloración marrón clara u oscura por producción de desaminasa.

El test de sinergia de doble disco se realizó en placas de Mueller Hinton inoculadas en superficie con una suspensión del organismo en estudio (*P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4, *P. aeruginosa* PAΔD, *K. pneumoniae* CUN K2 o *E. coli* CUN E20) ajustada a una turbidez de 0,5 en la escala de Mc Farland. Los discos contenían las siguientes cantidades de antibióticos: ceftazidima (CAZ, 30 μg), ceftriaxona (CRO, 30 μg), cefotaxima (CTX, 30 μg), aztreonam (ATM, 30 μg). Como inhibidor de BLEE se empleó un disco que contenía 30 μg de amoxicilina/clavulánico (AMC). Tras colocar los discos, las placas se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. La detección de un aumento de diámetro del halo de inhibición hacia el disco del inhibidor, se interpretó como resultado positivo.

El test de disco combinado se realizó en placas de Mueller Hinton inoculadas en superficie con una suspensión del organismo en estudio (*K. pneumoniae* CUN K2 o *E.*

coli CUN E20) ajustada a una turbidez de 0,5 en la escala de Mc Farland. Este test está basado también en la capacidad del ácido clavulánico de inhibir las β -lactamasas. Consiste en medir los halos de inhibición generados alrededor de un disco de cefalosporina y compararlos con el halo de inhibición generados alrededor de un disco de cefalosporina combinada con ácido clavulánico. Se emplearon discos con ceftazidima (CAZ, 30 μ g), ceftazidima/ ácido clavulánico (CAZ/CLA, 30/10 μ g), cefotaxima (CTX, 30 μ g), cefotaxima/ ácido clavulánico (CTX/CLA, 30/10 μ g), cefepime (FEP, 30 μ g), cefepime/ácido clavulánico (FEP/CLA, 30/10 μ g). Un diámetro de los halos de las cefalosporinas combinadas con ácido clavulánico superior en 5 mm a los obtenidos con la cefalosporina sola indica que se trata de una cepa productora de BLEE.

5.2. Detección genotípica de la expresión de *ampC* y *mexB*

5.2.1. Extracción del RNA

Para la extracción del RNA se inoculó una colonia de cada cepa en estudio en 10 mL de medio LB y este se incubó toda la noche a 37°C en agitación a 150 rpm. A continuación, se hizo una dilución 1:100 en este mismo caldo y la nueva suspensión se incubó en las mismas condiciones hasta que se alcanzó la fase exponencial de crecimiento $DO_{595nm}=0,6-0,8$, aproximadamente en 4 h y 30 min. Tras centrifugar 3 mL del cultivo durante 10 min a 11.000 x *g*. (centrífuga Hermle Labortechnik Z-160M; Wehingen, Alemania), el sedimento obtenido se resuspendió en 250 μ L de agua que contenía 0.1% de dietil-pirocarbonato (DEPC). Empleando el mismo disolvente, la nueva suspensión se ajustó a $DO_{600nm}=0,17$, lo que equivale aproximadamente a 10^9 UFC/mL. Dos mL de esta suspensión se centrifugaron a 11.000 x *g* durante 5 min a 4 °C y el sedimento obtenido se resuspendió en 300 μ l de *buffer* TE (100 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA pH 8) y se trató con lisozima (400 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) durante 3-5 min a temperatura ambiente y con proteinasa K (60 μ g/mL; Merck, Quebec, Canada) durante 1 hora a 37 °C.

Posteriormente, se extrajo el RNA mediante el kit RNeasy Mini (Quiagen, Barcelona) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se trató con DNasas (kit DNA-free, Ambion, Austin, Estados Unidos) para eliminar las posibles trazas de DNA que pudieran contaminar el RNA, de manera que al retrotranscribirlo el único DNA complementario obtenido fuera el que provenía del RNA. La extracción del RNA se realizó como mínimo por triplicado, y los extractos se conservaron a -80 °C hasta su retrotranscripción. Para verificar que el tratamiento con DNasas había sido eficaz, se empleó el extracto de RNA como patrón para amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el gen constitutivo *rpsL*, que codifica para la

proteína ribosomal S12 de *Pseudomonas aeruginosa*. El resultado negativo de esta amplificación confirmó la ausencia de contaminación por DNA. En orden cronológico, las condiciones de esta reacción de PCR fueron las siguientes: un ciclo de 5 min a 94 °C, treinta ciclos de 35 s a 94 °C, 45 s a 58 °C y 45 s a 72 °C, y un ciclo final de 7 min a 72 °C (termociclador Applied Biosystems 2720; Thermo Scientific; Madrid). Los cebadores que se emplearon para esta reacción y para las posteriores de RTqPCR se recogen en la Tabla 8.

5.2.2. Retrotranscripción del RNA

La cantidad de RNA presente en cada muestra se cuantificó con el equipo Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Estados Unidos) y las reacciones de retrotranscripción se realizaron con el kit SuperScript III, (Invitrogen; Thermo Scientific) empleando 0,8 µg de RNA. Para ello, se prepararon dos mezclas distintas con un volumen final de 10 µL cada una. La primera de ellas contenía 0,8 µg de RNA, 50 ng de random hexamers y 1 µL de dNTPs (10 mM de concentración final) y se incubó a 65°C durante 5 min en un termobloque (Thermomixer Confort; Eppendorf; San Sebastian de los Reyes, Madrid) y se mantuvo en hielo 1 minuto. La segunda contenía 2 µL de *buffer* 10x, 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de DTT 0,1M, 1 µL de RNasa OUT (Invitrogen) y 1 µL de transcriptasa inversa. Los dos cócteles se mezclaron y la solución resultante se incubó a las siguientes temperaturas: 10 min a 25 °C, 50 min a 50 °C y 5 min a 85 °C. Para finalizar, se añadió 1 µL de RNasa y se incubó a 37 °C durante 20 min.

Se confirmó que la retrotranscripción había sido correcta realizando una PCR para la detección del gen constitutivo *rpsL* (Tabla 8).

El DNA complementario (cDNA) obtenido ya libre de RNA se almacenó a -20°C hasta su amplificación.

5.2.3. Cuantificación mediante RTqPCR

Se cuantificaron los cDNAs de los genes *mexB* y *ampC* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RTqPCR) usando el preparado comercial SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). La mezcla de reacción contenía los siguientes componentes: 1X SYBR Green PCR Master Mix, 0,2 µM del cebador *Forward* y 0,2 µM del cebador *Reverse* (Tabla 8), 2 µL de cDNA y agua libre de DNA y RNA (Invitrogen) en cantidad suficiente para proporcionar un volumen final de 20 µl por cada reacción. Para amplificar el gen *mexB* se emplearon los oligonucleótidos *mexB-F* y *mexB-R* (Mc Cay et al. 2010), mientras que para amplificar el gen *ampC* se diseñaron cebadores que hibridaban con regiones conservadas de las secuencias de *ampC* recogidas en

GenBank y procedentes de aislamientos clínicos (ampC-F y ampCR) (Tabla 8). Para corregir errores en la cuantificación debidos a diferencias en la cantidad de RNA empleado y poder comparar los resultados obtenidos entre las distintas cepas, se empleó como control interno de la reacción el gen de referencia *proC* (pirrolina-5-carboxilato reductasa), que se amplificó empleando los cebadores proC-F y proC-R (Tabla 8).

Tabla 8.- Secuencias y características relevantes de los cebadores empleados.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Amplicón (pb)	Uso
proC-F	CAGGCCGGGCAGTTGCTGTC	188	Normalizar la cantidad de RNA inicial empleado.
proC-R	GGTCAGGCGCGAGGCTGTCT		
ampC-F	GGCGACATGACAGGGCCT	296	Cuantificar la expresión del gen <i>ampC</i> .
ampC-R	TCCAGGCCGCTGAGGATGGC		
mexB-F	TTGATAAGGCCCATTTTCGCGT	310	Cuantificar la expresión del gen <i>mexB</i> .
mexB-R	TCTGCTGCTCGATCACCTGGA		
rpsL-F	CTCGGCACTGCGTAAGGTAT	372	Controlar la (i) acción de la DNAsa y (ii) la retrotranscripción
rpsL-R	CTTCGAACGACCCTGCTTAC		

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: un ciclo de 10 min a 95°C, y cuarenta ciclos de 15 s a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. La expresión de los genes se cuantificó aplicando las siguientes fórmulas:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{cp} - \Delta CT_{cr} = (CT_{gp} - CT_{gc})_{cp} - (CT_{gp} - CT_{gc})_{cr}$$

$$FC = RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Donde “cp” es la cepa problema (los distintos aislamientos clínicos), “cr” la cepa de referencia (PAO1), “gp” el gen problema cuya expresión se está estudiando, “gc” el gen constitutivo (*proC*) y “CT” el primer ciclo de la RTqPCR en el que se detectó el producto amplificado. Así, CT fue inversamente proporcional a la cantidad de RNA de partida. FC (*fold change*) fue el número de veces que aumentó la expresión en estudio respecto al control interno o gen *housekeeping*.

De esta manera, se calculó la relación de la expresión entre el gen en estudio y el gen constitutivo y, a su vez, la expresión relativa de cada gen con respecto a la expresión del mismo gen en la cepa control PAO1. Los criterios establecidos para determinar la sobreexpresión de MexB e hiperproducción de AmpC se especifican en la Tabla 9, de acuerdo con lo descrito por otros autores (Cabot et al. 2011).

Tabla 9.- Interpretación de los resultados obtenidos en la técnica RTqPCR comparando los niveles de expresión entre el RNA de las cepas en estudio y la cepa de referencia PAO1.

Interpretación	<i>ampC</i>	<i>mexB</i>
Sobreexpresión	≥ 10	≥ 3
Dudoso	5-10	2-3
No sobreexpresión	< 5	< 2

5.3. Capacidad formadora de *biofilm*

Se caracterizó la capacidad formadora de *biofilm* de todas las cepas del presente estudio. A partir de cultivos frescos en placas de TSA, se inocularon una o dos colonias en un tubo de tipo Falcon con 10 mL de TSB y se incubaron toda la noche a 37 °C en un baño con agitación a 150 rpm (Aquatron, Infors HT; Bottmingen, Suiza). Los inóculos se ajustaron a una $DO_{600\text{ nm}}=0,085$ que se corresponde con 5×10^7 UFC/mL, aproximadamente, y se diluyeron 1:100 en TSB. A continuación, se dispensaron 100 µL de esta suspensión en los pocillos de una microplaca (Thermo Fisher Scientific) y se incluyó un control negativo de crecimiento (solo medio). Las placas de 96 pocillos se incubaron durante 24 h a 37 °C, en una atmósfera saturada de vapor de agua. A continuación se hicieron 4 lavados con 150 µL de solución salina (0,9 % de NaCl en agua) y las placas se secaron durante 2 h a 60 °C (secador Giralt SA 207A). Pasado ese tiempo, se tiñeron los pocillos con 150 µL de Cristal Violeta (CV) (Panreac) al 0,5% (2 g CV y 0,8 g oxalato amónico en 20 mL etOH y 380 mL de agua) durante 5 min. Finalmente, se volvió a lavar 4 veces con 200 µL de solución y se disolvió el CV con 200 µL de etanol al 70% (Oppac, Noain, Navarra). La densidad óptica se midió en un lector de placas a 595 nm (Thermo Multiskan Ex) y se expresó como DO (Tabla 10).

Con los datos de densidad óptica del control negativo, se calculó una densidad óptica de corte (DOc) aplicando la siguiente fórmula:

$$DOc = 3 \times \text{Desviación estándar del control negativo} + DO_{\text{media del control negativo}}$$

La comparación de este valor con los valores de densidad óptica problema (DO) permitió clasificar a las distintas cepas en cuatro categorías (Stepanović et al. 2004) de acuerdo a su nivel de adherencia, como se indica en la Tabla 10. Los resultados son la media de tres experimentos independientes en los que se estudió la capacidad de formar *biofilm* de cada cepa en, al menos, 6 pocillos.

Tabla 10.- Clasificación de las cepas según su capacidad de adherencia.

Puntos de corte	Capacidad de adherencia
$DO \leq DOc^1$	No adherente
$DOc \leq DO \leq 2 \times DOc$	Adherente Débil
$2 \times DOc \leq DO \leq 4 \times DOc$	Adherente Moderado
$4 \times DOc \leq DO$	Adherente Fuerte

¹: Densidad óptica de corte.

6. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana en células planctónicas

6.1. Determinación de CMI y CMB

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos se determinó según el método de microdilución en caldo y de acuerdo con las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI 2011). Para ello, se empleó el medio de cultivo MHCA y el protocolo previamente descrito (Sánchez-Gómez et al. 2008). En los experimentos de susceptibilidad en los que se empleaba el lipopéptido daptomicina, el medio de cultivo MHCA se suplementó con 25 µg/mL CaCl₂ (Panreac).

Se realizaron diluciones dobles seriadas de los antimicrobianos (512-1 µg/mL; 100 µl) en placas de 96 pocillos con fondo en "U" (TPP). Estas diluciones se mezclaron con un inóculo de las diferentes cepas (100 µl). Para preparar el inóculo bacteriano, primero se obtuvieron células frescas a partir de una placa de TSA cultivada durante 18 h. Con estas células, se preparó una suspensión que se ajustó con solución salina a una densidad óptica de 0,04 a 600 nm, equivalente a 5×10^7 UFC/mL, aproximadamente. Finalmente, esta suspensión se diluyó 1:100 en MHCA y 100 µL de ella se añadieron a cada uno de los pocillos. Las placas se incubaron durante 18-24 h a 37 °C y posteriormente se procedió a realizar la lectura visual de los resultados. También se realizaron controles de crecimiento (inóculo sin antibiótico) y de esterilidad (medio sin inóculo) en la placa. La CMI se definió como la concentración más baja de antimicrobiano que impedía la aparición de turbidez en los pocillos. Tras determinar las CMIs, las placas se agitaron y se sembró 20 µl de aquellos pocillos donde no se observó crecimiento en placas de TSA. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C y la CMB se definió como la mínima concentración de antimicrobiano que eliminaba al 99,9% del inóculo original.

6.2. Estudios de sinergia

6.2.1. Cuantificación de sinergia en combinaciones de dos antimicrobianos: Método de *checkerboard*

Para determinar la existencia de actividad sinérgica entre dos compuestos antimicrobianos, se empleó la técnica del tablero o *checkerboard test* en placas con

fondo “U” (TPP) de 96 pocillos y empleando los medios de cultivo MHCA o MHNA. En el ensayo se combinaron diversas concentraciones de varios antimicrobianos y se evaluó la capacidad de las combinaciones para inhibir el crecimiento de la cepa bacteriana en estudio, *Escherichia coli* CUN E20, *Klebsiella pneumoniae* CUN K2, *P. aeruginosa* PAΔD, CUN 4158-02 Ps4 o LC1-6 y *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300 o MRSA CUN 3792. Para ello, se prepararon diluciones dobles seriadas subinhibitorias de los dos antimicrobianos en estudio, de manera que la concentración de uno de ellos disminuía verticalmente (de arriba a abajo) y la del otro lo hacía horizontalmente (de izquierda a derecha) (Figura 12).

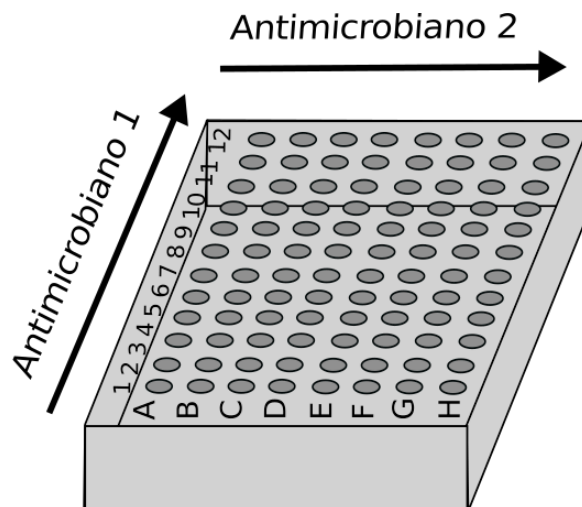


Figura 12.- Configuración esquemática de la técnica de “checkerboard” en dos dimensiones. Las concentraciones de cada antimicrobiano disminuyen en la dirección de la flecha.

Para cuantificar la actividad sinérgica de los dos compuestos combinados se empleó el parámetro siguiente:

- Índice de concentración inhibitoria fraccionada (ICIF): Este índice relaciona la CMI del antimicrobiano 1 con la del antimicrobiano 2 solos y en combinación mediante la siguiente fórmula:

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

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 ICIF la dilución inmediatamente superior a la más alta.

La mayoría de autores (Pompilio et al. 2012; Bugli et al. 2013) consideran ICIFs inferiores o iguales a 0,5 o cocientes de CMIs (ver apartado siguiente) mayores de 4 como indicativos de sinergia, mientras que las combinaciones con valores de ICIF

entre 0,5 y 4, se consideran aditivas o indiferentes, y las mayores de 4 como antagonistas.

6.2.2. Cuantificación de la capacidad permeabilizante de los péptidos antimicrobianos

Para evaluar la capacidad permeabilizante de los péptidos antimicrobianos, se empleó la técnica descrita en el apartado anterior, combinando los péptidos (50-1,56 µg/mL; pocillos verticales) con el antibiótico novobiocina (512-1 µg/mL; pocillos horizontales). Debido a su hidrofobicidad, este antibiótico es incapaz de penetrar a través de la envoltura celular de las bacterias gramnegativas -y por tanto alcanzar su diana intracelular- a no ser que esta estructura esté permeabilizada. Como organismo modelo para estos estudios, se eligió la cepa de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4.

Para cuantificar la actividad sinérgica de los péptidos, además del ICIF:

$$ICIF = \left(\frac{CMI \text{ novobiocina en la combinación}}{CMI \text{ novobiocina}} \right) + \left(\frac{CMI \text{ péptido en la combinación}}{CMI \text{ péptido}} \right)$$

Se empleó el cociente de CMIs (CCMI), que se definió como el cociente entre la CMI de la novobiocina sola y la CMI de la novobiocina en presencia de una determinada concentración del péptido.

$$CCMI = \left(\frac{CMI \text{ novobiocina}}{CMI \text{ novobiocina} + \text{péptido}} \right)$$

Al determinar las veces que se reduce la CMI de la novobiocina en presencia del péptido, este parámetro permite cuantificar la capacidad del péptido para potenciar la actividad de dicho antibiótico.

6.2.3. Cuantificación de sinergia en combinaciones de tres antimicrobianos

Para cuantificar la sinergia entre tres antimicrobianos se realizó la misma técnica detallada en el apartado 6.2, empleando una concentración constante de uno de los tres componentes en cada placa. La contribución a la sinergia del tercer componente se dedujo de la comparación entre los pocillos con los tres componentes y los controles que sólo tenían dos de los tres antimicrobianos. Estos ensayos se realizaron empleando las siguientes cepas: *Escherichia coli* CUN E20, *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 y *P. aeruginosa* PAΔD, CUN 4158-02 Ps4 o LC1-6 (Stein et al. 2015).

En el caso de las combinaciones Antibiótico/Inhibidor de β-lactamasas/Péptido, se realizaron diluciones dobles seriadas horizontales del antibiótico, diluciones dobles

seriadas verticales del péptido y se empleó una única concentración del inhibidor por cada placa (Figura 13A).

En el caso de las combinaciones Antibiótico/Inhibidor de bombas de expulsión activa/Péptido, se realizaron diluciones dobles seriadas horizontales del antibiótico, diluciones dobles seriadas verticales del inhibidor de bombas de expulsión activa y se empleó una única concentración del péptido por cada placa (Figura 13B).

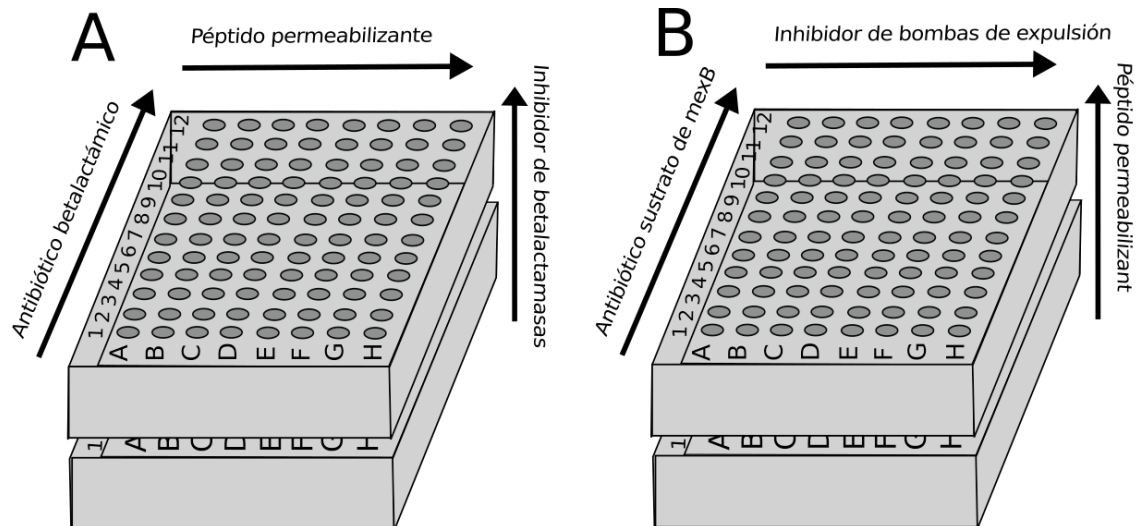


Figura 13.- Esquema de la disposición de los componentes en estudio en la técnica de "checkerboard" en tres dimensiones. Las concentraciones de cada antimicrobiano disminuyen en la dirección de la flecha.

Las placas incorporaban también los controles relevantes a cada experimento, incluyendo los siguientes: la CMI del antibiótico con el péptido, la CMI del antibiótico solo, la CMI del péptido solo, la CMI del antibiótico y el inhibidor y controles de crecimiento del inóculo y de esterilidad de los componentes. Este ensayo se realizó en el medio de cultivo MHCA.

La actividad sinérgica de las combinaciones triples se calculó añadiendo una fracción adicional a la formula que se describió en el apartado 6.2 (Berenbaum 1978):

$$ICIF = \left(\frac{CMI\ A\ en\ combinación}{CMI\ A} \right) + \left(\frac{CMI\ B\ en\ combinación}{CMI\ B} \right) + \left(\frac{CMI\ C\ en\ combinación}{CMI\ C} \right)$$

A = antimicrobiano 1, B = antimicrobiano 2, C = antimicrobiano 3.

En este caso, también se clasificaron las combinaciones como sinérgicas ($ICIF \leq 0,5$) o antagonistas ($ICIF > 4$) de acuerdo con lo descrito por otros autores (Berenbaum 1978).

6.3. Estudio de la cinética inhibitoria de las combinaciones mediante Bioscreen C

Este estudio se realizó empleando un aparato (Bioscreen C, Labssystem, Helsinki, Finlandia) que mide de manera automática la turbidez de los cultivos a intervalos constantes de tiempo. Para ello, una colonia del organismo en estudio (*Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4, *Escherichia coli* CUN E20 o *Klebsiella pneumoniae* CUN K2) procedente de un cultivo fresco, se inoculó en 10 mL de TSB, y la suspensión se incubó en un baño a 37°C y 150 rpm (Aquatron, Infors HT). Después de 18-20 h, el cultivo se ajustó a una $DO_{600nm}=0,040$ en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y $DO_{600nm}=0,085$ en el de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, lo que corresponde en todos los casos a 5×10^7 UFC/mL, aproximadamente. A continuación, el inóculo se diluyó 1:200 en MHCA y en presencia de los diferentes tratamientos evaluados (combinaciones triples, dobles o cada antimicrobiano por separado) y se depositaron por triplicado 200 μ L de la suspensión diluida en cada pocillo de una placa de tipo Bioscreen (100 pocillos; Thermo Fisher Scientific; Barcelona). En cada una de las placas se realizó además un control de esterilidad y un control de crecimiento.

Las placas se incubaron en agitación durante 48 h a 37 °C, y el aparato se programó para que midiera la densidad óptica de todos los pocillos cada 15 min. Cada experimento se repitió tres veces de manera independiente y los resultados obtenidos se analizaron con el programa Prism. Para ello, primero se obtuvo la media de las áreas bajo la curva de cada triplicado a las 45 h del comienzo del cultivo y el resultado obtenido se analizó estadísticamente mediante el test no paramétrico de U de Mann Whitney complementado con el de Kruskal Wallis para las comparaciones dos a dos.

6.4. Curvas de letalidad

Una colonia procedente de un cultivo fresco se inoculó en un tubo tipo Falcon que contenía 10 mL de TSB y la suspensión se incubó toda la noche a 37°C en agitación orbital a 150 rpm (Aquatron, Infors HT). Al día siguiente, se empleó el inóculo procedente de este caldo, 100 μ L, para iniciar un cultivo en un nuevo tubo Falcon con 10 mL de medio MHCA en las mismas condiciones descritas anteriormente. Esta vez, la incubación se prolongó durante 2-3 h, hasta que el cultivo alcanzó la fase de crecimiento logarítmico $DO_{600}=0,4-0,5$. Mientras tanto, se atemperaron a 37 °C 4 tubos de vidrio de 20 mL de capacidad y con 10 mL de MHCA cada uno.

A partir de este último cultivo, se ajustó la suspensión bacteriana a una $DO_{600}=0,085$ (equivalente a 5×10^7 UFC/mL, aproximadamente) y se inoculó un volumen de 50 μ L de esta última suspensión en cada uno de los cuatro tubos de vidrio

(dilución 1:200). A continuación, se añadió el antimicrobiano en estudio a la concentración necesaria para obtener o bien su CMI, o bien 2x CMI o 4x CMI. Finalmente, también se incluyó un cultivo idéntico al anterior pero sin antimicrobiano.

Para el recuento de viables, se tomaron muestras de cada tubo a diferentes tiempos tras el comienzo de la incubación: 0, 15, 30, 45, 60, 120, 240 y 360 min. A continuación, se obtuvieron diluciones sucesivas por duplicado en solución salina y una alícuota de éstas se sembró sobre placas de TSA. Tras incubar las placas a 37 °C durante 18-24 h, se procedió a calcular el \log_{10} UFC/mL. Cada ensayo se repitió dos veces de manera independiente.

7. Ensayos de fluorimetría con N-fenil-1-naftilamina (NPN)

Estos ensayos se realizaron empleando un método ya descrito (Helander and Mattila-Sandholm 2000; Sánchez-Gómez et al. 2008). Concretamente, se obtuvo un cultivo fresco de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 en medio LB como se indicó en el apartado 5.2.1. A continuación, se inició un nuevo cultivo añadiendo 100 μ L del cultivo anterior a un tubo que contenía 10 mL de medio LB fresco. El tubo se incubó en un baño a 37 °C con agitación (200 r.p.m) y el cultivo se monitorizó hasta que alcanzó la fase de crecimiento logarítmico ($DO_{630}=0,5 \pm 0,02$). Tras centrifugar el cultivo durante 10 min a 1000 x g y a 26 °C (Allegra TM X12R Beckman-Coulter), se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 5 mL de una solución 5 mmol/L de ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico (HEPES; sal sódica; pH 7,2; Sigma-Aldrich) previamente atemperada a 37 °C. La suspensión obtenida se estabilizó durante 10 min a 37 °C y se añadió a los pocillos de microplacas de color negro (Thermo Scientific) a razón de 100 μ L por pocillo. Finalmente, se añadió a cada pocillo 100 μ L del antimicrobiano previamente diluido en HEPES y atemperado a 37 °C. Tras añadir la NPN (concentración final de 10 μ M), la fluorescencia se midió en el fluorímetro BMG Labtechnologies FLUOstar Galaxy a intervalos de 90 s empleando una longitud de onda de excitación y de emisión de 340 y 410 nm, respectivamente, y una anchura de ventana de 2,5 nm.

Como controles, se prepararon pocillos que permitían medir la fluorescencia de cada uno de los componentes de la mezcla por separado (HEPES, suspensión bacteriana y antimicrobiano), tanto en ausencia como en presencia de NPN. Todas las medidas se realizaron por cuadruplicado en cinco experimentos independientes. Los resultados se mostraron en una gráfica como la fluorescencia relativa a lo largo del tiempo.

8. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana de *biofilms* bacterianos

8.1. En condiciones estáticas

8.1.1. Cálculo de la destrucción y la desinfección

La actividad frente a los microorganismos en *biofilm* de los tratamientos en estudio se determinó mediante un método de cribado rápido desarrollado por otros autores (Pitts et al. 2003). Para ello, se cultivó durante una noche un caldo de TSB inoculado con *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 a 37°C. A continuación y empleando TSB, se preparó una suspensión ajustada a una $D.O_{600nm} = 0,085$, equivalente a 5×10^7 ufc/mL, aproximadamente. Esta suspensión se diluyó 1:100 en TSB y se distribuyó en microplacas de poliestireno (100 µL/pocillo) (Fisher Scientific), que se incubaron a 37°C. Tras 24 h de incubación, se eliminó el medio y los pocillos se lavaron 4 veces con 150 µL de solución salina. Finalmente, los pocillos se llenaron (150 µL/pocillo) con alícuotas de los agentes en estudio previamente ajustados con MHCA a la concentración deseada, y la placa se incubó durante 24 h a 37 °C.

8.1.1.1. Cálculo de la desinfección

Para cuantificar la actividad bactericida (actividad de desinfección) de los tratamientos, los pocillos se lavaron 4 veces con 200 µL de solución salina y después se llenaron con 200 µL de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) (Sigma-Aldrich) (Andrä et al. 2007) ajustado a 50 µg/mL en MHCA. La incubación se prolongó durante 2 h y media a 37 °C. Como medida de la viabilidad celular, se utilizó la conversión del MTT a sal de tetrazolio, un proceso proporcional a la actividad respiratoria bacteriana en el *biofilm*. Para cuantificar dicha actividad, se disolvió la sal de tetrazolio en 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) (Panreac) y se leyó la intensidad colorimétrica obtenida en un espectrofotómetro de placas a 540 nm (Thermo Multiskan Ex).

8.1.1.2. Cálculo de la destrucción

La eliminación de *biofilm* debida a la acción de los tratamientos se cuantificó midiendo la cantidad de colorante cristal violeta (CV) (Panreac), (O'Toole and Kolter 1998; Pitts et al. 2003) que se asociaba a la biomasa de los pocillos. Para ello, primero las placas se lavaron 4 veces con 200 µL de solución salina y se secaron en una estufa a 60 °C durante 2 h (Giralt SA 207A). A continuación, los pocillos se llenaron con 200 µL de CV al 0,5% y se incubaron durante 5 min. Tras retirar el exceso de tinción, el *biofilm* teñido se lavó 4 veces con 250 µL de solución salina. Por último, el CV asociado al *biofilm* se disolvió en 200 µL de etanol al 70% (Oppac) y se cuantificó espectrofotométricamente a 595 nm.

8.1.2. Cálculo de la inhibición

El cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 en microplacas se realizó como en el apartado 8.1.1, salvo que en este caso la suspensión ajustada a $D.O._{600nm} = 0,085$ se diluyó 1:50 en MHCA y se distribuyó en microplacas de poliestireno (100 μ L/pocillo) (Fisher Scientific).

Para estudiar la capacidad de inhibir *biofilms* de los tratamientos en estudio, éstos se diluyeron en 100 μ L de MHCA y se mezclaron con la suspensión bacteriana previamente preparada. Las placas de poliestireno se incubaron a 37 °C durante 24 h y luego se lavaron 4 veces con 250 μ L de solución salina. A continuación, las placas se secaron en una estufa a 60 °C durante 2 h (Giralt SA 207A) y la biomasa adherida a los pocillos se tiñó con 200 μ L de CV al 0,5% (Panreac) durante 5 min. Tras retirar el exceso de tinción, los pocillos se lavaron 4 veces con 250 μ L de solución salina. Por último, el CV asociado al *biofilm* se disolvió en 200 μ L de etanol al 70% y se cuantificó espectrofotométricamente a 595 nm.

Los porcentajes de desinfección (MTT) de destrucción (CV) y de inhibición (CV) del *biofilm*, se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{(C - B) - (T - B)}{(C - B)} \times 100$$

Donde C corresponde a la absorbancia de pocillos con *biofilm*, pero sin tratamiento; T es la absorbancia leída en los pocillos con el *biofilm* tratado y B la absorbancia medida en el pocillo blanco (sin *biofilm*, ni tratamiento).

Todos los tratamientos se aplicaron a un mínimo de 12 pocillos y los resultados se repitieron en tres experimentos independientes.

8.2. En condiciones de flujo turbulento mediante reactor CDC

8.2.1. Diseño del sistema

El *Center for Disease Control (CDC) Biofilm Reactor (CBR)* está constituido por un recipiente de cristal con tres aberturas, una para la entrada de medio de cultivo, otra para la salida del mismo y una tercera para la entrada de aire estéril a través de un filtro (Figura 14). El volumen medio del reactor se mantuvo en 350 mL por el recambio constante de medio de cultivo. La superficie donde se generó el *biofilm* consistió en tres discos de policarbonato (para los recuentos) o borosilicato (microscopía) extraíbles, cada uno de 1,27 cm de diámetro y 0,3 cm de ancho colocados sobre 8 rodillos fijos en el interior del CBR. Una barra imantada en el centro del CBR acoplada a un agitador magnético (VMR) proporcionó la agitación.

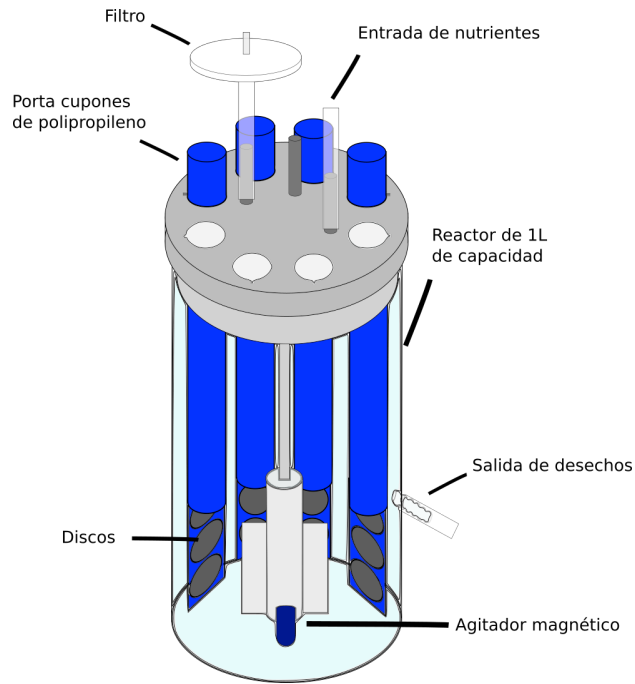


Figura 14.- Esquema del *Center for Disease Control (CDC) biofilm reactor (CBR)*.

El CBR se mantuvo en un incubador (Giralt SA 207A) a 37°C durante todo el experimento. Como medio de cultivo se empleó TSB (3 g/L), que se bombeaba al interior del reactor mediante una bomba peristáltica (Easy-load masterflex modelo 7518-00 o Heidolph pumpdrive 5001) a un flujo de 11,67 mL/min. El medio de cultivo procedía de un bidón autoclavable (Nalgene; Thermo Fisher) que contenía 20 L de TSB estéril. Tras pasar por el reactor, el medio de cultivo residual se transfirió a otro bidón autoclavable (Nalgene) con la misma capacidad. Todo el sistema se interconectó mediante tubos de silicona autoclavables (Masterflex® o PharMed BPT; Cole-Palmer, IL, Vernon Hills, EEUU) y en el sistema se incluyó una válvula que impedía el posible reflujó de medio de cultivo contaminado hacia la fuente de nutrientes (Figura 15).

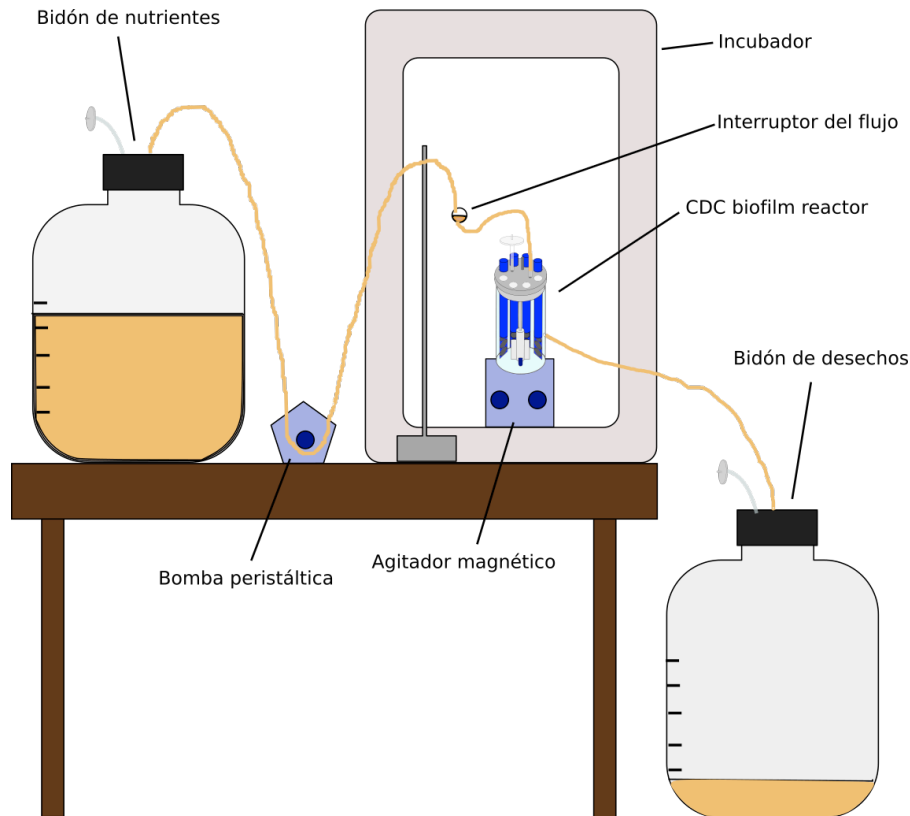


Figura 15.- Esquema del Center for Disease Control (CDC) biofilm reactor (CBR) para el cultivo de *biofilms*.

8.2.2. Desarrollo del *biofilm*

El experimento se llevó a cabo según el método estándar de la *American Standards for Testing Materials* (ASTM E2562-12). Concretamente, a partir de un cultivo fresco en TSA se tomaron 1 o 2 colonias de la cepa en estudio utilizando un asa de siembra estéril y se inocularon en un tubo con 10 mL de TSB (30 g/L). El tubo se incubó toda la noche a 37 °C y con agitación (150 rpm; Aquatron, Infors HT). Al día siguiente, se transfirió asépticamente 1 mL del cultivo a la cámara del reactor, que previamente se había llenado con 400 mL de TSB (30 g/L). El reactor se incubó a 37 °C durante 24 h ajustando la agitación a 125 rpm. El inóculo inicial se diluyó, y se hizo un recuento de viables en placas de TSA para poder calcular la cantidad de células inoculadas en el reactor ($\text{LOG}_{10}(\text{UFC}/\text{mL})$) mediante la siguiente fórmula.

Tras incubar el reactor durante 24 h a 37 °C en condiciones estáticas, se estableció un flujo continuo de 11,67 mL/min de medio fresco (TSB 3 g/L) durante 24 h adicionales.

8.2.3. Exposición a los antimicrobianos

Transcurridas las 24 h de incubación, se detuvo el flujo, se extrajeron los discos y se eliminaron las posibles bacterias planctónicas adheridas a ellos vertiendo

lentamente sobre su superficie 1 mL de *buffer* fosfato (PB) (625 μ M KH_2PO_4 , 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pH 7,2). A continuación, los discos se introdujeron en los pocillos de una placa de poliestireno de 12 pocillos (Falcon, Nueva York, EEUU) con su cara interna hacia arriba y se sumergieron en un volumen de 1,75 mL en el que se había disuelto el tratamiento en estudio. Los tratamientos se aplicaron durante diferentes tiempos y en distintos medios: 1, 4 y 24 h en MHCA y 24 h y 72 h en PB. En los tratamientos en los que se empleaba el lipopéptido daptomicina, el medio de cultivo MHCA se suplementó con 25 μ g/mL CaCl_2 y el medio PB con 50 μ g/mL CaCl_2 . Los tratamientos se renovaron cada 24 h en aquellos experimentos que superaban ese tiempo de exposición.

8.2.4. Procesamiento de los discos

8.2.4.1. Recuentos

Una vez transcurrido el tiempo del tratamiento, se lavaron los discos de policarbonato con 2 mL de PB para eliminar las posibles células planctónicas adheridas y restos de tratamiento. La superficie inferior del disco –la que había estado en contacto directo con el plástico durante el tratamiento– se descartó, dado que la interacción disco-plástico podría interferir con la eficacia del tratamiento. El *biofilm* adherido a la superficie superior del disco se despegó raspando con un palillo de madera estéril en tres direcciones, y el material desprendido se transfirió a un vial estéril con 10 mL de PB. Para disgregar al máximo el *biofilm*, la muestra se homogeneizó a 20.500 rpm en un Ultraturrax T25 digital (IKA®-Werke GmbH & Co. KG Germany) o sonicando durante 5 min (Fungilab US1'6; Sant Feliu de Llobregat, Barcelona). Finalmente, se realizaron diluciones sucesivas del homogeneizado (hasta 10^{-7} o 10^{-9}) y una alícuota de cada una se sembró por duplicado en placas de TSA que se incubaron toda la noche a 37 °C.

Al día siguiente se contaron las colonias y se calculó el Log_{10} UFC/cm² y la reducción logarítmica (RL).

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

Los experimentos se realizaron por duplicado en ensayos independientes. Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa Prism mediante un ANOVA de un criterio con contrastes de Tukey para comparar los tratamientos entre sí.

8.2.4.2. Microscopía

8.2.4.2.1. Microscopía de fluorescencia

Para observar el *biofilm* desarrollado en los discos del CBR mediante microscopía de fluorescencia, se preparó una solución de tñido que contenía 3 μL de cada uno de los colorantes del kit de viabilidad bacteriano LIVE/DEAD BacLight (Life technologies, Carlsbad, California, EEUU) disueltos en 1 mL de agua destilada filtrada. En este kit las bacterias son tratadas con dos moléculas fluorescentes distintas (SYTO 9 y yoduro de propidio). Aunque ambos fluorocromos se intercalan en el DNA, los dos compuestos se diferencian en su capacidad para difundir a través de la membrana bacteriana. SYTO 9 es una molécula capaz de difundir a través de la membrana intacta, unirse al DNA y tñir la bacteria de color verde. Por el contrario, el yoduro de propidio sólo es capaz de entrar en la célula a través de una membrana dañada y, una vez que lo hace, colorea la bacteria de rojo.

Los discos de borosilicato se tñieron con 250 μL de esta solución durante 20 min y una vez lavados con agua destilada filtrada, su superficie se examinó con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800 (Chiyoda, Tokio, Japón) empleando el filtro de isotiocianato de fluoresceína (FITC) y una λ de excitación y emisión de 499 nm y 519 nm, respectivamente, para ver las bacterias vivas coloreadas con Syto 9. Para visualizar bacterias muertas tñidas por el yoduro de propidio la superficie del disco se visualizó con el mismo microscopio pero utilizando un filtro para isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC) con una λ de excitación y emisión de 552 nm y 578 nm, respectivamente. Para estos experimentos, se empleó un objetivo de inmersión en agua de 60X ELWD (Extra Long Working Distance).

8.2.4.2.2. Criosecciones

Para estudiar las características estructurales de los *biofilms* se utilizó el método de criosecciones, que requiere un procesamiento mínimo de las muestras. Las criosecciones preservan las características estructurales del *biofilm*, su superficie irregular, las protusiones locales y una interfaz con el sustrato bien definida. Además, el método no requiere deshidratar la muestra ni necesita de una fijación prolongada.

Para ello, los *biofilms* cultivados en los discos de borosilicato del CDC reactor, se tñieron con la misma solución de tñido que en el apartado 8.2.4.2.1 durante 20 min y, tras un lavado en agua destilada filtrada, se crio-embebieron en un medio comercial para tejidos, el *Optimal Cutting Temperature compound* (OCT). A continuación, con unas cuchillas de acero, se procedió a desprenderlos con suavidad del sustrato y se confirmó examinando el disco mediante un microscopio de fluorescencia que todo

había sido transferido a la muestra congelada. Se dio la vuelta a la muestra y se añadió OCT de tal forma que la segunda capa envolviese a la primera y evitase que ambas se desprendiesen al utilizar el criostato. Se cortaron secciones de 5 μm de grosor con un criostato Leica CM1850 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Alemania) y se observaron mediante microscopía de fluorescencia con un filtro FITC y otro TRITC.

8.2.4.2.3. Microscopía láser confocal

Para un estudio más detallado de la acción de las combinaciones sobre los *biofilms*, se realizaron estudios mediante microscopía láser confocal. Esta técnica permite estudiar secciones internas del *biofilm* y determinar la capacidad de penetración de un determinado tratamiento dentro del *biofilm*. Para ello, tras 24 h de incubación en el CDC reactor, los *biofilms* adheridos a los discos se expusieron a los tratamientos en estudio durante dos tiempos distintos de incubación (4 o 24 h) y en dos medios diferentes (PB o MHCA). A continuación, los discos de borosilicato se tiñeron con la misma solución de tinte que en el apartado 8.2.4.2.1 durante 20 min y, tras un lavado en agua destilada filtrada, su superficie se visualizó en un microscopio láser confocal Leica TCS-SP5 con un objetivo de 1,5x y otro de inmersión en agua de 63X y las imágenes se analizaron mediante el software Imaris® (Bitplane; Zurich, Suiza).

RESULTADOS



1. Caracterización de la actividad antimicrobiana y permeabilizante de péptidos derivados de la lactoferrina humana

1.1. Construcción de la librería peptídica y caracterización de la actividad permeabilizante

Para investigar la hipótesis de trabajo, se necesitaba disponer de péptidos con la mayor capacidad permeabilizante y la menor citotoxicidad posibles. Además, se deseaba que estos compuestos tuvieran el espectro de actividad antimicrobiana más amplio posible. Los péptidos evaluados en el presente trabajo provienen de una librería peptídica (n=204) obtenida tras cuatro etapas diferentes de optimización. La primera etapa comprendió péptidos denominados de “primera generación” (péptidos P1; n=71). Estos compuestos derivan del péptido LF-11 (FQWQRNIRKVR-NH₂), cuya secuencia es homóloga al dominio de unión al lipopolisacárido de una proteína humana del sistema inmunitario innato llamada lactoferrina. Con el objetivo de mejorar la actividad antimicrobiana y neutralizante de endotoxina de esta generación, se sintetizaron los péptidos de “segunda generación” (péptidos P2; n=55) y de “tercera generación” (péptidos P3; n=58) (Sánchez-Gómez 2008). Estas tres generaciones se desarrollaron 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) y están actualmente protegidos por la patente europea EP 2 078 529 A1.

En la Tabla 11 se muestran los péptidos de la generación P2 con mayor actividad permeabilizante. La capacidad permeabilizante de estos compuestos se cuantificó mediante la técnica del tablero o “checkerboard”, que mide la actividad sinérgica del compuesto cuando se combina con el antibiótico novobiocina. Debido a su hidrofobicidad, este antibiótico es incapaz por sí mismo de atravesar la envoltura bacteriana y de alcanzar su diana intracelular. Sin embargo, si la novobiocina se combina con un agente permeabilizante, éste alterará la envoltura y el antibiótico penetrará y podrá ejercer su acción.

Los ensayos anteriores permitieron calcular el índice de concentración inhibitoria fraccionada (ICIF) de cada combinación, que es inversamente proporcional a la actividad sinérgica del péptido en presencia de novobiocina. La mayoría de autores consideran ICIFs inferiores o iguales a 0,5 como indicativos de sinergia, mientras que las combinaciones con valores de ICIF entre 0,5 y 4, se consideran aditivas o indiferentes, y las mayores de 4 como antagonistas. También se obtuvo el cociente de

CMI (CCMI), definido como el cociente entre la CMI de la novobiocina sola y la CMI de la novobiocina en presencia de una determinada concentración del péptido. La mayoría de autores consideran a los cocientes de CMI mayores de 4 como indicativos de sinergia. De los derivados de lactoferrina, los péptidos P2-15 y P2-29 fueron los que mostraron mejor actividad sinérgica con novobiocina, aunque en términos de ICIF dicha actividad se quedó un orden de magnitud por debajo de la del compuesto permeabilizante de referencia, el nonapéptido de polimixina B (PMBN).

Tabla 11.- Capacidad de péptidos derivados de la lactoferrina humana y del nonapéptido de polimixina B (PMBN; péptido modelo) para potenciar la actividad de la novobiocina a concentraciones subinhibitorias frente a *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 en medio MHCA (valores a la izquierda) o en medio MHNA (valores a la derecha).

Péptidos	CMI ¹ Péptido (µg/mL)	CMI de la novobiocina a la concentración de péptido indicada (µg/mL)					ICIF 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)
P2-27	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	256/1024 (25)

¹: Concentración Mínima Inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en medio MHCA/MHNA. ²:Índice Mínimo de Concentración Inhibitoria Fraccionada en medio MHCA/MHNA. ³: Cociente de CMI en ausencia y presencia de 50 µg/mL de péptido en medio MHCA/MHNA. En los casos en que el cociente de CMI se calculó a una concentración de péptido diferente a esta, dicha concentración se indica entre paréntesis. ⁴: no crecimiento del control tratado sólo con péptido, porque éste ya es inhibitorio a esa concentración.

Como la generación P3 demostró ser menos permeabilizante que la P2, la optimización de la actividad permeabilizante de los péptidos se llevó a cabo a partir de los compuestos P1 y P2. Estos estudios se realizaron en colaboración con los Drs. Roman Jerala y Bostjan Japelj del *National Institute of Chemistry*, Ljubljana, Eslovenia. Para ello, primero se desarrolló un modelo cuantitativo de relación estructura química-actividad (QSAR) basado en un tipo de descriptores dependientes de la secuencia de aminoácidos llamados PEDES (*peptide descriptors from sequence*). Para evaluar la eficacia predictiva de la metodología empleada, se diseñaron dos nuevos grupos de compuestos denominados péptidos de cuarta generación (péptidos P4; n=20) y de quinta generación (P5; n=24) (Razquin-Olazarán 2012).

En la Tabla 12 se puede apreciar que cuando los ensayos se realizaron en medio MHNA, 19 de los 26 péptidos de la librería formaron combinaciones sinérgicas con la novobiocina a alguna de las concentraciones empleadas (índice CIF menor o igual a 0,5). Además, en cuatro de los péptidos que no actuaron en sinergia se detectó un efecto aditivo (valores de ICIF entre 0,5 y 1; resultados no mostrados) con la novobiocina. En general, los cocientes de CMI (CCMI) guardaron una buena correlación con los resultados de los índices CIF. Algunos de los péptidos igualaron o mejoraron los CCMI del agente permeabilizante de referencia, la PMBN (CCMI= 64). Este fue el caso de P5-4, P5-7, P5-10, P5-15, P5-17 y P5-19 (CCMI= 128), P4-5, P5-9,

P5-12, P5-20 y P5-21 (CCMI= 256) y P4-1 (CCMI= 512). Sin embargo, en términos de ICIF, la actividad permeabilizante de PMBN y PMEN superó ampliamente la del mejor derivado de lactoferricina.

Para evaluar la eficacia en condiciones más estrictas se empleó el medio MHCA, un medio de cultivo suplementado con los cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} , que estabilizan la membrana externa bacteriana. En estas condiciones, sólo los agentes más potentes mantienen su capacidad permeabilizante. Como se muestra en la Tabla 12, en el medio MHCA sólo 6 de los 19 péptidos que eran permeabilizantes en MHNA dejaron de formar combinaciones sinérgicas con la novobiocina, dos que no eran sinérgicos en MHNA lo fueron en MHCA (P5-7, P5-21), mientras el resto mantuvo la actividad permeabilizante, incluso en esas condiciones (P4-1, P4-5, P5-2, P5-3, P5-4, P5-5, P5-8, P5-9, P5-11, P5-12, P5-17, P5-19, P5-20). La PMBN en MHCA no presentó actividad inhibitoria, sino sólo permeabilizante, por lo que los valores de ICIF obtenidos para este péptido en MHCA fueron mejores que en MHNA.

Tabla 12.- Capacidad de los péptidos para potenciar la actividad de la novobiocina a concentraciones subinhibitorias frente a *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 en medio MHCA (valores a la izquierda) o en medio MHNA (valores a la derecha).

Péptidos	CMI ¹ Péptido (µg/mL)	CMI de la novobiocina a la concentración de péptido indicada (µg/mL)					ICIF 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)
PMEN	1024/nd ⁵	>512/nd	256/nd	≤1/nd	2/nd	4/nd	0,013/nd	256/nd
P4-1	512/128	512/1024	128/32	64/16	16/8	16/2	0,08/0,08	32/512
P4-5	256/32	512/512	512/16	512/4	16/2	2/nc	0,13/0,22	256/256 (25)
P5-1	128/64	512/1024	512/1024	512/1024	512/1024	512/nc	>0,5/>0,5	1/1
P5-2	64/16	1024/1024	1024/64	1024/nc	32/nc	nc/nc	0,42/0,45	32(25)/16(6,25)
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)
P5-5	1024/256	1024/1024	1024/1024	1024/64	1024/64	64/32	0,11/0,11	16/32
P5-6	16/8	1024/1024	1024/128	nc/nc	nc/nc	nc/nc	>0,5/>0,5	1(6,25)/8(6,25)
P5-7	64/8	1024/1024	1024/8	1024/nc	8/nc	nc/nc	0,40/>0,5	128(25)/128(6,25)
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)
P5-10	32/8	1024/1024	1024/8	1024/nc	nc/nc	nc/nc	>0,5/>0,5	1(12,25)/128(6,25)
P5-11	1024/1024	512/1024	1024/256	1024/128	1024/64	128/32	0,30/0,08	4/32
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	>0,5/0,06	1/16
P5-14	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/1024	>0,5/>0,5	1/1
P5-15	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/16	1024/8	>0,5/0,04	1/128
P5-16	16/4	1024/1024	1024/nc	nc/nc	nc/nc	nc/nc	>1,0/>1,0	1(6,25)/nc
P5-17	1024/1024	1024/512	1024/32	1024/16	64/8	32/4	0,08/0,04	32/128
P5-18	1024/1024	512/1024	512/1024	512/1024	512/256	1024/128	>0,5/0,17	1/8
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/>0,5	512(25)/256(6,25)
P5-22	1024/512	1024/1024	1024/1024	1024/256	1024/128	1024/32	>0,5/0,13	1/32
P5-23	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/256	1024/64	1024/32	>0,5/0,08	1/32
P5-24	1024/1024	1024/1024	1024/1024	1024/256	1024/256	1024/128	>0,5/0,17	1/8

¹: Concentración Mínima Inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en medio MHCA/MHNA. ²: Índice Mínimo de Concentración Inhibitoria Fraccionada en medio MHCA/MHNA. ³: Cociente de CMIs en ausencia y presencia de 50 µg/mL (u otra concentración, entre paréntesis) de péptido en medio MHCA/MHNA. ⁴: no crecimiento del control tratado sólo con péptido, es decir, el péptido antimicrobiano se encuentra por encima de su CMI. ⁵: no determinado.

1.2. Actividad antimicrobiana

Para estudiar el espectro de acción de la librería peptídica del presente estudio, se determinó por duplicado la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los péptidos sobre las cepas clínicas *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 y *Bordetella bronchiseptica* CUN 11844-09 y las cepas de laboratorio *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 empleando la técnica de microdilución en caldo en medio MHCA.

Como se resume en la Tabla 13, las cepas mostraron perfiles de susceptibilidad a los péptidos muy diferentes. El aislamiento clínico de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 mostró una resistencia mayor que las otras cepas a casi todos los péptidos siendo más sensible a P5-6, P5-10, P5-16 y P5-21. En el otro extremo, *Bordetella*

bronchiseptica CUN 11844-99 fue el microorganismo más sensible a la práctica totalidad de los péptidos. Por otro lado, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 mostraron una sensibilidad intermedia. De hecho, algunos de los péptidos inhibieron con eficacia a ambas bacterias con valores de CMI menores o iguales a 8 µg/mL (P5-2, P5-4 y P5-12), destacando el péptido P5-4 con una CMI frente a *E. coli* menor o igual a 1 µg/mL. La coincidencia de CMI y CMB en algunos péptidos indica que actúan como bactericidas a su CMI. Aunque los péptidos de esta generación se diseñaron para permeabilizar la envoltura celular de gramnegativos, algunos compuestos mostraron una buena actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, como en el caso de P5-16 (CMI de 4 µg/mL). Para estos ensayos se empleó como compuesto de referencia la polimixina B (PMB), debido a la prácticamente nula actividad antimicrobiana de PMBN.

Tabla 13.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB) de la polimixina B (PMB; péptido modelo) y de péptidos antimicrobianos derivados de la lactoferrina humana frente a patógenos humanos con características estructurales y patogénicas diversas.

Péptidos	CMI ¹ (CMB ²) µg/ml			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN ³ 4158-02 Ps4	<i>Escherichia coli</i> ATCC ⁴ 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bordetella bronchiseptica</i> CUN 11844-99
PMB	1 (1)	0,5 (0,5)	32 (32)	2 (2)
P4-1	512 (512)	64 (512)	16 (128)	4 (8)
P4-5	256 (>512)	32 (32)	32 (32)	8 (8)
P5-1	256 (512)	16 (16)	8 (32)	8 (32)
P5-2	64 (128)	4 (8)	8 (16)	2 (16)
P5-3	64 (128)	8 (16)	16 (32)	4 (16)
P5-4	512 (>512)	≤1 (2)	8 (64)	4 (32)
P5-5	>512	32 (128)	32 (64)	16 (256)
P5-6	16	8 (16)	>512	2 (16)
P5-7	64 (128)	16 (32)	16 (16)	2 (32)
P5-8	>512	32 (32)	64 (128)	4 (16)
P5-9	512 (>512)	16 (128)	32 (64)	2 (8)
P5-10	32 (128)	16 (32)	8 (32)	2 (8)
P5-11	>512	64 (128)	128 (256)	32 (512)
P5-12	64 (>512)	8 (128)	8 (32)	≤1 (8)
P5-13	>512	32 (256)	64 (128)	4 (256)
P5-14	>512	256 (512)	>512	256 (>512)
P5-15	>512	64 (256)	128 (256)	8 (512)
P5-16	16 (32)	16 (16)	4 (256)	2 (4)
P5-17	>512	64 (256)	256 (512)	4 (128)
P5-18	>512	512 (512)	>512 (>512)	128 (>512)
P5-19	>512	32 (128)	64 (64)	4 (64)
P5-20	64 (256)	16 (32)	32 (64)	≤1 (4)
P5-21	32 (64)	16 (16)	8 (32)	2 (4)
P5-22	>512	64 (256)	512 (>512)	8 (512)
P5-23	>512	128 (512)	>512	16 (256)
P5-24	>512	128 (512)	512 (>512)	64 (256)

¹: Concentración Mínima Inhibitoria determinada en medio MHCA por el procedimiento de microdilución. ²: Concentración Mínima Bactericida. ³: Clínica Universidad de Navarra. ⁴: American Type Culture Collection.

1.3. Actividad hemolítica y citotoxicidad de los péptidos

Con objeto de seleccionar los péptidos que combinaran la mejor actividad permeabilizante con la menor toxicidad sobre células humanas, primero se investigó si alguno de los compuestos poseía actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos. Para ello, los hematíes se incubaron durante 30 min o 24 h con los péptidos a concentraciones comprendidas entre 250 y 15,6 µg/mL.

A los 30 min de exposición, los péptidos P5-1, P5-10 y P5-16 resultaron hemolíticos y a las 24 h también los péptidos P5-2, P5-4, P5-7, P5-20 y P5-21 (Tabla 14). Estos compuestos se descartaron para los estudios posteriores.

A continuación, empleando un cultivo celular de fibroblastos humanos, se determinó la capacidad citotóxica de los péptidos que habían mostrado mejor actividad permeabilizante (Tabla 14). Para ello, se expusieron los fibroblastos a concentraciones crecientes de los péptidos durante 24 h. Estos ensayos revelaron que los péptidos P5-4, P5-7, P5-12, P5-20 y P5-21 eran citotóxicos a alguna de las concentraciones evaluadas.

A la vista de estos resultados, se seleccionaron para los estudios posteriores los péptidos P4-1, P4-5, P5-3, P5-5, P5-8, P5-9, P5-11, P5-17 y P5-19, ya que además de ser permeabilizantes, no mostraron toxicidad sobre eritrocitos o fibroblastos humanos. También se seleccionó el péptido P5-12, por su capacidad sinérgica con la novobiocina ($ICIF_{MHCA}=0,11$) y porque era citotóxico para fibroblastos humanos sólo a concentraciones 10 veces superiores a la necesaria para permeabilizar la membrana bacteriana.

Tabla 14.- Actividad hemolítica y citotóxica de los péptidos derivados de la lactoferrina humana sobre eritrocitos y fibroblastos humanos.

Péptido	Eritrocitos humanos				Fibroblastos humanos	
	30 min		24 h		24 h	
	DH50 ¹	DH80 ²	DH50	DH80	IC50 ³	IC80 ⁴
Melitina ⁵	4,92	7,87	5,24	11,37	5,48	6,75
P4-1	>200	>200	>200	>200	>200	>200
P4-5	>200	>200	>200	>200	>200	>200
P5-1	7,73	23,16	7,57	32,31	nd ⁶	nd
P5-2	>250	>250	96,24	157,89	>200	>200
P5-3	>250	>250	>250	>250	>200	>200
P5-4	>250	>250	200,02	>250	115,25	207,029
P5-5	>250	>250	>250	>250	>200	>200
P5-6	>250	>250	>250	>250	nd	nd
P5-7	>250	>250	146,44	>250	123,31	195,05
P5-8	>250	>250	>250	>250	>200	>200
P5-9	>250	>250	253,35	>250	>200	>200
P5-10	188,72	>250	39,91	60,46	nd	nd
P5-11	>250	>250	>250	>250	>200	>200
P5-12	>250	>250	>250	>250	75,33	98,58
P5-13	>250	>250	>250	>250	nd	nd
P5-14	>250	>250	>250	>250	nd	nd
P5-15	>250	>250	>250	>250	nd	nd
P5-16	112,74	243,17	27,38	71,85	nd	nd
P5-17	>250	>250	>250	>250	>200	>200
P5-18	>250	>250	>250	>250	nd	nd
P5-19	>250	>250	>250	>250	>200	>200
P5-20	>250	>250	206,67	>250	40,99	62,46
P5-21	>250	>250	100,35	228,20	84,37	136,2
P5-22	>250	>250	>250	>250	nd	nd
P5-23	>250	>250	>250	>250	nd	nd
P5-24	>250	>250	>250	>250	nd	nd

¹: Dosis hemolítica (µg/mL) a la cual se lisan el 50 % de los eritrocitos (se consideró el 100 % de hemólisis la actividad medida tras la adición del detergente Tritón X-100). ²: Dosis hemolítica (µg/mL) a la cual se lisan el 80 % de los eritrocitos. ³: Concentración inhibitoria (µg/mL) a la cual se inhibe el metabolismo celular del 50 % de las células (se consideró el 100 % de supervivencia la absorbancia del control negativo menos la absorbancia del blanco). ⁴: Concentración inhibitoria (µg/mL) a la cual se inhibe el metabolismo celular del 80 % de las células. ⁵: Se empleó Melitina como péptido control de máxima toxicidad celular y actividad hemolítica. ⁶: No determinado. En negrita se indican las concentraciones a la que los péptidos son tóxicos para un 50 u 80% de las células.

2. Potenciación de inhibidores de β -lactamasas mediante péptidos antimicrobianos en *Pseudomonas aeruginosa* con AmpC desreprimida.

2.1. Selección de cepas

Para poder evaluar si la resistencia a los inhibidores de β -lactamasas podría ser neutralizada por la acción permeabilizante de un péptido antimicrobiano, primero se necesitaba identificar una cepa de *P. aeruginosa* que expresase de manera desreprimida esta enzima hidrolítica. Para ello, se caracterizaron aislamientos clínicos que poseían un fenotipo que sugería la presencia de este mecanismo. En primer lugar, se determinó por duplicado el perfil de susceptibilidad de estas cepas a varios antibióticos β -lactámicos (amoxicilina, ampicilina, ticarcilina, piperacilina y ceftazidima), péptidos antimicrobianos (colistina, PMB y PMBN), inhibidores de AmpC (ácido fenilborónico, aztreonam y oxacilina) e inhibidores de BLEEs (sulbactam, tazobactam y ácido clavulánico). Además, como controles en este estudio se incluyeron la cepa salvaje *P. aeruginosa* PAO1 y un mutante derivado de ella, cepa PA Δ D, con una delección en *ampD*, que le confiere un fenotipo de parcial desrepresión de AmpC (Juan et al. 2006). Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15.- Antibiograma de aislamientos clínicos y de cepas de laboratorio de constitución genética conocida de *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimicrobianos			CMI ¹ (μ g/mL)			
			PAO1	PA Δ D	CUN 4158-02 Ps4	CUN Ps74
β -lactámicos	Penicilinas	Amoxicilina	2048	>512	>512	nd ²
		Ampicilina	1024	>512	>512	nd
		Ticarcilina	16 (S ³)	64 (S)	256 (R ⁴)	nd
		Piperacilina	4 (S)	128 (R)	256 (R)	nd
	Cefalosporinas	Ceftazidima	2 (S)	16 (I ⁵)	64 (R)	8 (S)
Péptidos antimicrobianos	Colistina		1 (S)	2 (S)	1 (S)	32 (R)
	PMBN ⁶		>512	>512	>512	512
	Polimixina B		1 (S)	nd	1 (S)	nd
Inhibidores	AmpC	Ácido Fenilborónico	>512	>512	>512	>512
		Aztreonam	4 (S)	8 (S)	16 (I)	32 (R)
		Oxacilina	>512	>512	>512	nd
	BLEE ⁷	Sulbactam	>512	>512	>512	nd
		Tazobactam	nd	>512	nd	nd
		Ác. clavulánico	128	128	256	nd

¹: Concentración mínima inhibitoria. ²: no determinado. ³: Sensible según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). ⁴: Resistente según el CLSI. ⁵: Intermedio según el CLSI. ⁶: Nonapéptido de la polimixina B. ⁷: B-lactamasas de espectro extendido.

Las dos cepas clínicas fueron insensibles a inhibidores de AmpC, un fenotipo que se observó también en la cepa salvaje. Por otra parte y en comparación con el mutante PAΔD, el perfil de susceptibilidad del aislamiento CUN 4158-02 Ps4 fue coherente con el de una cepa que expresa una cefalosporinasa AmpC parcialmente desreprimida (Juan et al. 2006). Además, el aislamiento *P. aeruginosa* CUN Ps74 fue el único que se mostró resistente a la colistina.

La posible presencia de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en la cepa clínica *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 podría interferir en la interpretación de los resultados de los ensayos posteriores. Para investigar la presencia de BLEE, se determinó la susceptibilidad de esta cepa a varios antibióticos β-lactámicos (cefotaxima, aztreonam, ceftazidima y ceftriaxona) en presencia de inhibidores de BLEE (ácido clavulánico). Como se muestra en la Figura 16, la sensibilidad de esta cepa a los β-lactámicos (proporcional al diámetro del halo de inhibición) no se deformó en la dirección del disco que contenía el inhibidor de BLEE, lo que sugiere que la cepa no expresa BLEE.

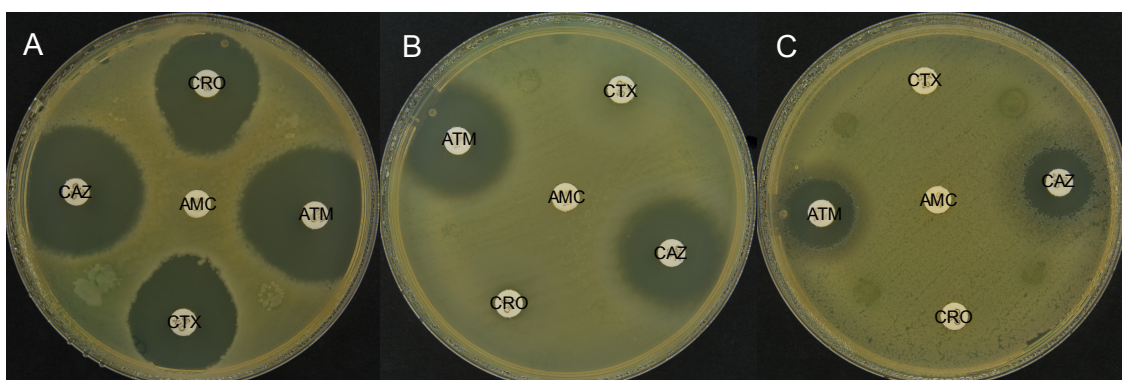


Figura 16.- Ensayo de doble difusión en agar de las cepas A) *Escherichia coli* CUN E20 B) *Pseudomonas aeruginosa* PAΔD y C) *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4. En la imagen A, se puede observar que los halos de inhibición de la bacteria a los antibióticos ceftazidima (CAZ), aztreonam (ATM), ceftriaxona (CRO) y cefotaxima (CTX) aumentan en la dirección del disco del inhibidor de BLEEs amoxicilina/clavulánico (AMC) indicando la presencia de una BLEE mientras que en las imágenes B y C esto no sucede.

Por estos motivos, se seleccionaron para estudios posteriores los aislamientos CUN 4158-02 Ps4 y CUN Ps74 junto con el mutante PAΔD.

Para confirmar las conclusiones del estudio fenotípico, se cuantificó en las cepas seleccionadas y por triplicado, el nivel de expresión del gen *ampC* mediante RT-qPCR. De acuerdo con los criterios establecidos por otros autores (Cabot et al. 2011), se consideró que existía hiperexpresión de *ampC* cuando se detectaba un aumento de al menos 10 veces en los niveles de expresión de este gen respecto a los niveles medidos en la cepa de referencia PAO1. Como se muestra en la Figura 17, se detectó

un fenotipo de hiperexpresión de *ampC* en el mutante PA Δ D y en los dos aislamientos clínicos. No obstante, en estas dos últimas cepas, el nivel de expresión de *ampC* fue significativamente mayor que en el mutante derivado de PAO1.

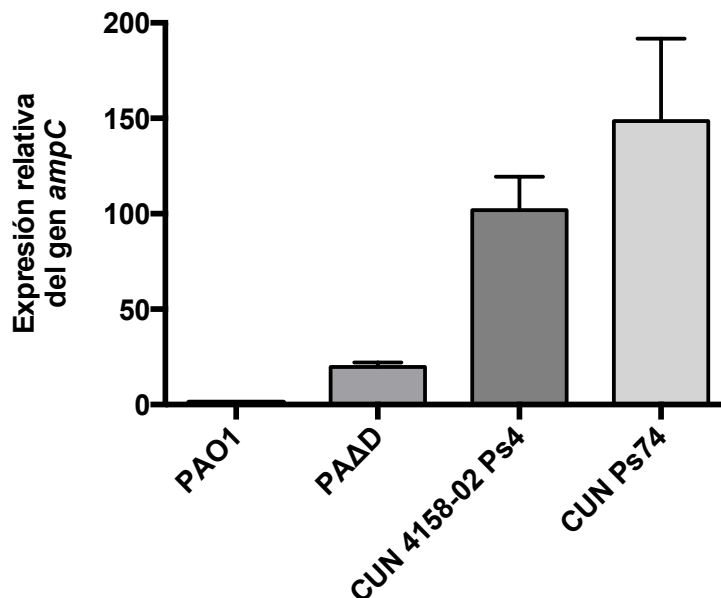


Figura 17.- Expresión relativa del gen *ampC* en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en estudio respecto de los niveles medidos en la cepa de referencia PAO1. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-qPCR en tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Puesto que se deseaba estudiar la validez de la hipótesis de trabajo sobre bacterias formadoras de *biofilm*, era necesario analizar si las cepas seleccionadas poseían esta capacidad. Para ello, las cepas se cultivaron en los pocillos de microplacas de poliestireno y posteriormente la cantidad de *biofilm* adherido a los pocillos se cuantificó mediante tinción con cristal violeta. Cada cepa se clasificó según su adherencia en “fuerte”, “moderada”, “débil” o “no adherente” (Stepanović et al. 2000)(Tabla 16).

Tabla 16.- Clasificación de la capacidad formadora de *biofilm* de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en estudio.

Cepa	Adherencia
PAO1	Moderada
PAO1 Δ D	Débil
CUN 4158-02 Ps4	Fuerte
CUN Ps74	Fuerte

Para clasificar a las cepas se calculó la densidad óptica de corte ($DO_c = 3 \times$ Desviación estándar del control negativo + DO_{media} del control negativo) y se las clasificó según lo descrito (Stepanović et al. 2000) $DO \leq DO_c$ No adherente, $DO_c \leq DO \leq 2 \times DO_c$ Adherente débil, $2 \times DO_c \leq DO \leq 4 \times DO_c$ Adherente Moderado, $4 \times DO_c \leq DO$ Adherente fuerte. Los resultados son la media de tres ensayos independientes realizados en triplicado.

A la vista de estos resultados, se eligió la cepa PA Δ D, un mutante con mecanismos de resistencia bien caracterizados, para llevar a cabo un primer cribado de combinaciones antibiótico/péptido/inhibidor (apartado siguiente) empleando

bacterias en fase planctónica. Además, se seleccionó al aislamiento clínico *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 para poder evaluar las mejores combinaciones sobre cepas formadoras de *biofilm* (apartados 2.8 y 2.9).

2.2. Cribado de combinaciones sobre la cepa *P. aeruginosa* PAΔD

Para evaluar si la resistencia a los inhibidores de β-lactamasas podía ser neutralizada por la acción permeabilizante de un péptido antimicrobiano, se investigó si la CMI de una combinación antibiótico β-lactámico/inhibidor de β-lactamasas se reducía en presencia de un péptido antimicrobiano a concentración subinhibitoria. Estos ensayos se realizaron sobre células planctónicas de *P. aeruginosa* PAΔD y en ellos se empleó primero el nonapéptido de PMB como modelo de péptido permeabilizante.

En total se probaron 12 combinaciones triples PMBN/β-lactámico/inhibidor para poder estudiar la acción conjunta de 5 antibióticos β-lactámicos y 6 inhibidores de β-lactamasas distintos. Concretamente, se probaron 2 aminopenicilinas no activas frente a *P. aeruginosa* (ampicilina y amoxicilina), 2 β-lactámicos antipseudomonas (piperacilina y ticarcilina) y una cefalosporina de tercera generación (ceftazidima). Además, se ensayaron 3 inhibidores de BLEE (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) y 3 inhibidores de AmpC (oxacilina, ácido fenilborónico y aztreonam). Para evaluar la contribución de cada agente en la combinación, se incluyeron controles que contenían sólo dos de los tres componentes.

Como muestra la Tabla 17, la acción permeabilizante de PMBN a 2 μg/mL potenció al menos 32 veces la combinación amoxicilina/ácido clavulánico, pues disminuyó la CMI de este tratamiento doble de >512 μg/mL a 32 μg/mL. La potenciación máxima en el caso de las combinaciones ampicilina/sulbactam y ticarcilina/ácido clavulánico fue de al menos 4 veces en el primer caso (reducción de >512 μg/mL a 256 μg/mL) y de 16 veces en el segundo (reducción de 64 μg/mL a 4 μg/mL). En concordancia con estos resultados, los valores de ICIF_{mínima} obtenidos (0,05 para amoxicilina/ácido clavulánico/PMBN; 0,26, para ampicilina/sulbactam/PMBN; 0,09 para ticarcilina/ácido clavulánico/PMBN) demostraron la existencia de una potente acción sinérgica entre la PMBN y las combinaciones de β-lactámico/inhibidor. En presencia de ticarcilina o de ticarcilina/ácido clavulánico, el efecto potenciador de PMBN fue proporcional a la dosis de péptido utilizada. Por el contrario, cuando se usó amoxicilina/ácido clavulánico o ampicilina/sulbactam se observó un empeoramiento de la capacidad potenciadora de PMBN por encima de 4-8 μg/mL.

Aunque PMBN también actuó en sinergia en alguna de las combinaciones de dos componentes, la acción sinérgica de este compuesto en combinación triple siempre fue de mayor magnitud (Anexo 1). La potenciación de inhibidores de BLEEs en una cepa no productora de BLEE como el mutante PAΔD sugiere que dichos inhibidores también pueden ser eficaces sobre AmpC siempre que alcancen una concentración suficiente en el periplasma bacteriano. Precisamente la acción permeabilizante de PMBN podría permitir que se alcanzaran esas concentraciones.

Tabla 17.- Capacidad de PMBN para sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* PAΔD a combinaciones de β-lactámicos e inhibidores de β-lactamasas.

PMBN ¹ (μg/mL)	CMI ² Amoxicilina ³ (μg/mL) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor			CMI Ampicilina ⁵ (μg/mL) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor			CMI Ticarcilina ⁶ (μg/mL) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor		
			ICIF ⁴			ICIF			ICIF
	0	Ácido clavulánico ⁷ (2 μg/mL)		0	Sulbactam ⁸ (4 μg/mL)		0	Ácido clavulánico (2 μg/mL)	
0	>512	>512		>512	>512		64	64	
1	>512	256	0,27	>512	>512	1,00	64	64	1,02
2	>512	32	0,05	>512	>512	1,01	32	8	0,14
4	>512	128	0,14	>512	256	0,26	16	8	0,14
8	>512	256	0,27	>512	512	0,51	16	4	0,09
16	>512	512	0,53	>512	>512	1,02	8	4	0,09

¹: CMI_{PMBN} >512 μg/mL. ²: Concentración mínima inhibitoria. ³: CMI_{Amoxicilina} >512 μg/mL. ⁴: Índice de concentración inhibitoria fraccionada. ⁵: CMI_{Ampicilina} >512 μg/mL. ⁶: CMI_{Ticarcilina} =64 μg/mL. ⁷: CMI_{Ácido clavulánico} =128 μg/mL. ⁸: CMI_{Sulbactam} >512 μg/mL.

La acción potenciadora de PMBN también se apreció con un β-lactámico que es sustrato débil de AmpC, la piperacilina (Tabla 18). A concentraciones bajas de PMBN (por debajo de 4 μg/mL), este agente sólo potenció al antibiótico, pues la adición del inhibidor a la combinación péptido/piperacilina no mejoró la CMI de esta combinación. Sin embargo, a valores iguales o superiores a 4 μg/mL, se observó una potenciación también dependiente del inhibidor. El resultado global de dicha potenciación fue una disminución de la CMI_{Piperacilina} de 128 μg/mL a 0,5 μg/mL en presencia de tazobactam, o de 128 μg/mL a 0,25 μg/mL en presencia de sulbactam, es decir, 256 y 512 veces respectivamente.

Este efecto potenciador se tradujo en índices CIF aún más bajos que los obtenidos en los experimentos con amoxicilina, ampicilina y ticarcilina (0,01 frente a 0,09). Sin embargo, a diferencia de lo observado con estos antibióticos, PMBN formó combinaciones muy sinérgicas con piperacilina en ausencia de inhibidor (ICIF_{Piperacilina/PMBN}=0,02) (Anexo 1) Aún así, la adición del inhibidor, dio lugar a combinaciones aún más sinérgicas. Por otra parte, el fenómeno de pérdida de capacidad potenciadora de PMBN a alta concentración mencionado en la Tabla 17, se volvió a observar aquí. Como se muestra en la Tabla 18, este fenómeno ocurrió con independencia del tipo de inhibidor a concentraciones de PMBN iguales o superiores a 8 μg/mL.

Por otra parte, en el caso del clavulánico, se observa un empeoramiento de la CMI de la combinación de piperacilina y PMBN al añadir el inhibidor.

Tabla 18.- Capacidad de PMBN para sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* PAΔD a combinaciones de piperacilina e inhibidores de β-lactamasas.

PMBN ¹ (μg/mL)	CMI ² Piperacilina ³ (μg/mL) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor						
	0	Tazobactam ⁴ (4 μg/mL)	ICIF ⁵	Sulbactam ⁶ (4 μg/mL)	ICIF	Ácido clavulánico ⁷ (2 μg/mL)	ICIF
0	128	64		64		128	
1	128	64	0,50	64	0,50	128	1,02
2	8	8	0,07	8	0,07	64	0,52
4	2	0,5	0,01	0,25	0,01	4	0,05
8	4	0,5	0,02	1	0,02	8	0,09
16	4	1	0,03	1	0,03	16	0,16

¹: CMI_{PMBN} >512 μg/mL. ²: Concentración mínima inhibitoria. ³: CMI_{Piperacilina} =128 μg/mL. ⁴: CMI_{Tazobactam} >512 μg/mL. ⁵: Índice de concentración inhibitoria fraccionada. ⁶: CMI_{Sulbactam} >512 μg/mL. ⁷: CMI_{Ácido clavulánico} =128 μg/mL.

PMBN fue también capaz de potenciar una cefalosporina, la ceftazidima (Tabla 19) tanto en ausencia como en presencia de varios inhibidores de β-lactamasas, como oxacilina, ácido fenilborónico o aztreonam. Es de destacar que, en presencia de inhibidores, las CMIs obtenidas fueron las más bajas observadas a lo largo de este capítulo. Así, el péptido disminuyó más de 500 veces la CMI del antibiótico en presencia de ácido fenilborónico o aztreonam, alcanzándose CMIs menores o iguales a 0,03 μg/mL. La sensibilización en presencia de oxacilina fue también significativa, aunque de menor magnitud (50 veces).

Las ICIF obtenidas confirmaron la existencia de una excelente actividad sinérgica con ICIF mínimas de 0,02, 0,01 y 0,13, para las combinaciones con oxacilina, ácido fenilborónico, y aztreonam, respectivamente. La sinergia observada en la mejor combinación doble se quedó lejos de la medida en presencia de inhibidor (ICIF_{ceftazidima/PMBN} =0,13 frente a ICIF_{ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN} =0,01) (Anexo 1). Como en casos anteriores, el empleo de concentraciones iguales o superiores a 8 μg/mL de PMBN disminuyó la capacidad del péptido para potenciar el inhibidor. Mientras que este fenómeno fue patente en el caso de oxacilina y ácido fenilborónico, no se observó ni en presencia de aztreonam (combinación triple ceftazidima/aztreonam/PMBN) ni en ausencia de inhibidor (combinación doble ceftazidima/PMBN).

Tabla 19.- Capacidad de PMBN para sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* PAΔD a combinaciones de ceftazidima e inhibidores de β-lactamasas.

PMBN ¹ (µg/mL)	CMI ² Ceftazidima ³ (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor						
	0	Oxacilina ⁴ (4 µg/mL)	ICIF ⁵	Ácido fenilborónico ⁶ (2 µg/mL)	ICIF	Aztreonam ⁷ (1 µg/mL)	ICIF
0	16	8		2		16	
1	16	16	1,00	2	0,13	16	1,13
2	4	2	0,13	0,06	0,01	≤0,03	0,13
4	4	0,25	0,02	≤0,03	0,01	≤0,03	0,13
8	4	0,25	0,03	0,06	0,01	≤0,03	0,13
16	2	0,5	0,05	0,12	0,03	≤0,03	0,14

¹: CMI_{PMBN} >512 µg/mL. ²: Concentración mínima inhibitoria. ³: CMI_{Ceftazidima} =16 µg/mL. ⁴: CMI_{Oxacilina} >512 µg/mL. ⁵: Índice de concentración inhibitoria fraccionada. ⁶: CMI_{Ácido fenilborónico} >512 µg/mL. ⁷: CMI_{Aztreonam} =8 µg/mL.

A diferencia de la polimixina E (o colistina), el compuesto parental de PMBN, PMB, no se ha autorizado para una aplicación sistémica en terapia antimicrobiana y sólo tiene un uso tópico. Por tanto, de cara a un posible uso sistémico, podría ser interesante demostrar que el nonapéptido de colistina (PMEN) tiene una actividad potenciadora similar a la aquí mostrada para la PMBN. Con esa finalidad, se repitieron algunos de los ensayos anteriores empleando PMEN en vez de PMBN.

Como se muestra en la Tabla 20, en ausencia de inhibidor, PMEN mostró una capacidad potenciadora de ceftazidima mayor que la de PMBN, disminuyendo la CMI unas 267 veces (de 16 µg/mL a 0,06 µg/mL). A bajas concentraciones del agente permeabilizante (2 µg/mL), se observó una contribución negativa del inhibidor a la actividad antimicrobiana global (aumento de la CMI de la combinación triple respecto a la doble). Sin embargo, a concentraciones iguales o superiores a 4 µg/mL, la adición de PMEN permitió obtener CMIs e ICIFs tan bajas como las observadas con PMBN. Estos niveles de potenciación no se alcanzaron en ningún caso eliminando el inhibidor de la combinación (Anexo 1). Además, a diferencia de PMBN, PMEN no perdió su actividad potenciadora de inhibidor a altas concentraciones, aunque dicho fenómeno de “rebote” sí que fue observado en ausencia de inhibidor.

A la vista de la actividad de PMEN para potenciar inhibidores de β-lactamasas, se investigó si su compuesto parental, la colistina, poseía también esta capacidad. Como la colistina es un antibiótico aprobado para uso clínico, el enfoque terapéutico investigado en el presente trabajo, podría encontrar una aplicación más inmediata. Sin embargo, al repetir el ensayo mostrado en la Tabla 15 empleando la colistina como agente permeabilizante (triple combinación ceftazidima/aztreonam/colistina), no se observó sinergia (ICIF mínima=0,87).

Tabla 20.- Capacidad del nonapéptido de la colistina (PMEN) para sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* PAΔD a combinaciones de ceftazidima e inhibidores de β-lactamasas.

PMEN ¹ (µg/mL)	CMI ² Ceftazidima ³ (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor				
	0	Ácido Fenilborónico ⁴ (2 µg/mL)	ICIF ⁵	Aztreonam ⁶ (1 µg/mL)	ICIF
0	16	16		16	
1	16	16	1,00	16	1,13
2	0,25	2	0,13	4	0,38
4	0,06	≤0,03	0,01	≤0,03	0,13
8	0,13	≤0,03	0,01	≤0,03	0,13
16	0,25	≤0,03	0,02	≤0,03	0,14

¹: CMI_{PMEN} >512 µg/mL. ²: Concentración mínima inhibitoria. ³: CMI_{Ceftazidima} =16 µg/mL. ⁴: CMI_{Ácido fenilborónico} >512 µg/mL. ⁵: Índice de concentración inhibitoria fraccionada. ⁶: CMI_{Aztreonam} =8 µg/mL.

Las Tablas 17, 18 y 19 demuestran que todas las combinaciones β-lactámico/inhibidor/PMBN que se probaron frente a *P. aeruginosa* PAΔD, resultaron ser sinérgicas. Para los ensayos posteriores, se seleccionaron las dos combinaciones que habían potenciado más la actividad del inhibidor, es decir, PMBN/ceftazidima/ácido fenilborónico y PMBN/ceftazidima/aztreonam.

Para investigar si los péptidos derivados de la lactoferricina humana anteriormente seleccionados poseían una actividad potenciadora de inhibidor similar a la detectada en PMBN o PMEN, se repitieron algunos de los ensayos mostrados en la Tabla 19 empleando los 10 compuestos mencionados en el apartado 1.3. Cuando se empleó aztreonam como inhibidor (Tabla 21), 8 de los 10 péptidos actuaron en sinergia, aunque las concentraciones de péptido a las que se observó este efecto (≥ 12,5 µg/mL de péptido) fueron mayores que las detectadas en ceftazidima/aztreonam/PMBN (4 o 2 µg/mL de PMBN) o ceftazidima/aztreonam/PMEN (4 µg/mL de PMEN).

Tabla 21.- Capacidad de péptidos derivados de lactoferrina humana para sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* PAΔD a combinaciones de ceftazidima y aztreonam.

Péptido (CMI ¹ µg/mL)	CMI Ceftazidima ² (µg/mL) en presencia de 1 µg/mL de Aztreonam ³ y diferentes concentraciones de péptido (µg/mL)						ICIF min ⁴
	0	1,5	3,125	6,25	12,5	25	
P4-1 (>512)	8	8	4	4	4	2	0,27
P4-5 (128)	8	4	4	4	4	2	0,38
P5-3 (64)	8	4	4	4	2	0,5	0,39
P5-5 (>512)	8	8	8	8	4	4	0,38
P5-8 (256)	8	8	8	4	4	2	0,34
P5-9 (256)	8	8	4	4	4	1	0,28
P5-11 (>512)	8	8	8	8	8	4	0,39
P5-12 (64)	8	4	4	2	1	0,25	0,34
P5-17 (>512)	8	8	8	8	8	8	0,62
P5-19 (512)	8	8	8	8	8	8	0,62

¹: Concentración mínima inhibitoria. ²: CMI_{ceftazidima} =16 µg/mL. ³: CMI_{aztreonam} =8 µg/mL. ⁴: Índice de concentración inhibitoria fraccionada mínima.

Cuando se empleó como inhibidor ácido fenilborónico en vez de aztreonam (Tabla 22), todos los derivados de lactoferrina actuaron en sinergia y algunos compuestos mostraron esta capacidad a concentraciones comparables a las de PMBN o PMEN (6,25 µg/mL de P5-8 frente a 2 µg/mL de PMBN o 4 µg/mL de PMEN). Algunos péptidos, como P4-5, P5-3, P5-5, P5-8, P5-9 y P5-19, fueron capaces de disminuir la CMI de la ceftazidima más de 500 veces (de 16 µg/mL a 0,03 µg/mL) y alcanzaron ICIF muy similares a los de los nonapéptidos (0,02 frente a 0,01, respectivamente).

Tabla 22.- Capacidad de péptidos derivados de lactoferrina humana para sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* PAΔD a combinaciones de ceftazidima y ácido fenilborónico.

Péptido (CMI ¹ µg/mL)	CMI Ceftazidima ² (µg/mL) en presencia de 2 µg/mL de Ácido fenilborónico ³ y diferentes concentraciones de péptido (µg/mL)						ICIF min ⁴
	0	1,5	3,125	6,25	12,5	25	
P4-1 (>512)	4	8	8	8	4	4	0,26
P4-5 (128)	4	4	4	4	≤0,03	≤0,03	0,10
P5-3 (64)	4	8	4	4	≤0,03	≤0,03	0,20
P5-5 (>512)	4	8	8	4	≤0,03	≤0,03	0,02
P5-8 (256)	4	8	4	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,03
P5-9 (256)	4	4	4	≤0,03	≤0,03	≤0,03	0,03
P5-11 (>512)	4	8	8	8	8	4	0,28
P5-12 (64)	4	2	2	2	2	2	0,15
P5-17 (>512)	4	2	2	4	4	2	0,13
P5-19 (512)	4	4	4	4	≤0,03	≤0,03	0,03

¹: Concentración mínima inhibitoria. ²: CMI_{Ceftazidima} = 16 µg/mL. ³: CMI_{Ácido fenilborónico} >512 µg/mL. ⁴: Índice de concentración inhibitoria fraccionada mínima.

2.3. Confirmación de la eficacia de la terapia sobre *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4

Para confirmar la eficacia de la terapia experimental sobre un aislamiento clínico, se repitieron algunos de los ensayos anteriores empleando la cepa *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4. Es de destacar que esta cepa tiene niveles de hiperexpresión de AmpC aún mayores que *P. aeruginosa* PAΔD, como se mostró en la Figura 17. Además, dado que la cepa CUN 4158-02 Ps4 forma *biofilm*, su empleo podría posibilitar los estudios de eficacia de la terapia experimental sobre este tipo de estructuras.

Empleando la misma metodología que en la sección anterior, se probaron las dos combinaciones que habían mostrado más potencia, es decir, péptido/ceftazidima/ácido fenilborónico y péptido/ceftazidima/aztreonam. Como agentes permeabilizantes se emplearon PMBN, PMEN (Tabla 23) o los péptidos seleccionados en el apartado 1.3. (Tablas 24 y 25). En los nuevos experimentos, se demostró que la eficacia potenciadora de PMBN o PMEN sobre células planctónicas de la cepa CUN 4158-02 Ps4 era de similar potencia a la descrita en el mutante PAΔD. De hecho, la acción de los dos péptidos sobre ambas cepas permitió alcanzar valores de CMI menores o iguales a 0,03 µg/mL e ICIF de 0,01 (Tablas 19, 20 y 23). Al igual que ocurrió en la cepa PAΔD (Tabla 19), el uso de aztreonam sobre la cepa CUN 4158-02 Ps4, impidió el fenómeno de “rebote” de la CMI detectado cuando se usó ácido fenilborónico y altas concentraciones de PMBN (combinación ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN; Tabla 23A).

Tabla 23.- Capacidad de PMBN o PMEN para sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 a combinaciones de ceftazidima e inhibidores de β -lactamasas.

A: PMBN

PMBN ¹ ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ² Ceftazidima ³ ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor				
	0	Ácido Fenilborónico ⁴ (2 $\mu\text{g/mL}$)	ICIF ⁵	Aztreonam ⁶ (1 $\mu\text{g/mL}$)	ICIF
0	64	16		>16	
1	>16	16	0,25	>16	0,56
2	>16	8	0,13	>16	0,56
4	4	0,06	0,01	$\leq 0,03$	0,07
8	0,5	0,12	0,01	$\leq 0,03$	0,07
16	8	0,5	0,03	$\leq 0,03$	0,08

B: PMEN

PMEN ⁷ ($\mu\text{g/mL}$)	CMI Ceftazidima ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor				
	0	Ácido Fenilborónico (2 $\mu\text{g/mL}$)	ICIF	Aztreonam (1 $\mu\text{g/mL}$)	ICIF
0	64	16		>16	
1	16	>16	0,50	>16	0,56
2	$\leq 0,125$	>16	0,50	>16	0,56
4	$\leq 0,125$	$\leq 0,03$	0,01	$\leq 0,03$	0,07
8	$\leq 0,125$	$\leq 0,03$	0,01	$\leq 0,03$	0,07
16	2	$\leq 0,03$	0,02	$\leq 0,03$	0,08

¹: CMI_{PMBN} >512 $\mu\text{g/mL}$. ²: Concentración mínima inhibitoria. ³: CMI_{Ceftazidima} =64 $\mu\text{g/mL}$. ⁴: CMI_{Ácido fenilborónico} >512 $\mu\text{g/mL}$.
⁵: Índice de concentración inhibitoria fraccionada. ⁶: CMI_{Aztreonam} =16 $\mu\text{g/mL}$. ⁷: CMI_{PMEN} >512 $\mu\text{g/mL}$.

Los péptidos derivados de la lactoferricina mostraron una eficacia potenciadora sobre la cepa CUN 4158-02 Ps4 muy inferior a la de los nonapéptidos. Así, a diferencia de lo observado en la cepa PA Δ D, ninguno de los 10 péptidos fue capaz de potenciar al ácido fenilborónico cuando se usaron sobre el aislamiento clínico (Tabla 24) y sólo tres de ellos (P4-5, P5-8, P5-9 y P5-19) formaron combinaciones cercanas a la sinergia. Un fenómeno similar se detectó cuando se empleó como inhibidor el aztreonam, aunque es este caso hubo un compuesto (P4-5) que mostró actividad sinérgica sobre la cepa CUN 4158-02 Ps4 (Tabla 25).

Tabla 24.- Capacidad de péptidos derivados de la lactoferricina humana para sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 a combinaciones de ceftazidima y de ácido fenilborónico.

Péptido (CMI ¹ µg/mL)	CMI Ceftazidima ² (µg/mL) en presencia de 2 µg/mL de Ácido fenilborónico ³ y diferentes concentraciones de péptido						ICIF min ⁴
	0	1,5	3,125	6,25	12,5	25	
P4-1 (>512)	16	>16	16	16	16	16	1,01
P4-5 (256)	16	16	16	16	8	8	0,55
P5-3 (128)	16	16	16	16	16	8	0,70
P5-5 (>512)	16	16	16	16	16	16	1,00
P5-8 (>512)	16	16	16	8	8	8	0,51
P5-9 (512)	16	16	16	16	16	8	0,55
P5-11 (>512)	16	16	16	16	16	16	1,00
P5-12 (128)	16	16	16	16	16	16	1,01
P5-17 (>512)	16	>16	16	16	16	16	1,01
P5-19 (512)	16	16	16	16	8	8	0,53

¹: Concentración mínima inhibitoria. ²: CMI_{Ceftazidima} =64 µg/mL. ³: CMI_{Ácido fenilborónico} >512 µg/mL. ⁴: Índice de concentración inhibitoria fraccionada mínima.

Tabla 25.- Capacidad de péptidos derivados de la lactoferricina humana para sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 a combinaciones de ceftazidima y aztreonam.

Péptido (CMI ¹ µg/mL)	CMI Ceftazidima ² (µg/mL) en presencia de 1 µg/mL de Áztreonam ³ y diferentes concentraciones de péptido						ICIF ⁴ min
	0	1,5	3,125	6,25	12,5	25	
P4-1 (>512)	>16	>16	>16	>16	>16	>16	2,06
P4-5 (256)	>16	16	16	16	8	4	0,41
P5-3 (128)	>16	>16	>16	16	16	4	0,51
P5-5 (>512)	>16	>16	>16	>16	>16	16	1,09
P5-8 (>512)	>16	>16	16	16	8	8	0,57
P5-9 (512)	>16	>16	>16	>16	8	8	0,59
P5-11 (>512)	>16	>16	>16	>16	>16	>16	2,06
P5-12 (128)	>16	16	16	16	16	8	0,76
P5-17 (>512)	16	>16	>16	>16	>16	8	0,59
P5-19 (512)	16	>16	16	16	16	8	0,61

¹: Concentración mínima inhibitoria. ²: CMI_{Ceftazidima} =64 µg/mL. ³: CMI_{Aztreonam} =16 µg/mL. ⁴: Índice de concentración inhibitoria fraccionada mínima.

2.4. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 sometido a potenciación de inhibidores de β-lactamasas.

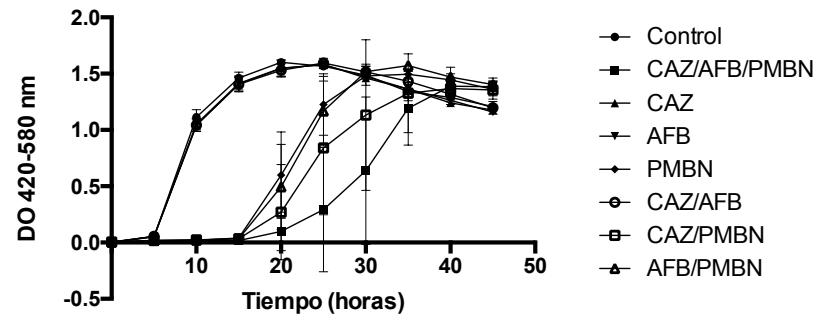
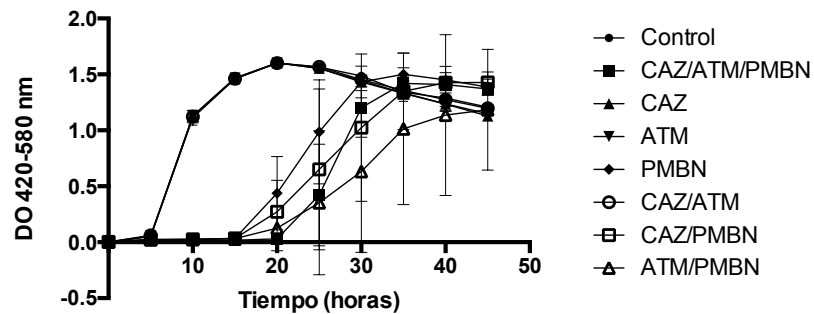
Los resultados mostrados en la Tabla 23A demostraban que PMBN era capaz de potenciar tanto a la ceftazidima como a la combinación de ceftazidima con un inhibidor de β-lactamasas. Sin embargo, los resultados indicaban que en el segundo caso dicha potenciación era marcadamente más eficaz. Para evaluar con mayor nivel de resolución la contribución de cada componente de la combinación al efecto potenciador observado, se realizaron ensayos de cinética de crecimiento en presencia de las combinaciones seleccionadas. Para estos experimentos se empleó un aparato

(Bioscreen C) que mide de manera automática la turbidez de los cultivos a intervalos constantes de tiempo.

Para poder discriminar entre el efecto del agente permeabilizante y el del inhibidor, se seleccionó la concentración más baja de los tres componentes que resultaba inhibitoria sobre la cepa CUN 4158-02 Ps4. De acuerdo con lo mostrado en la Tabla 23A, esa concentración resultó ser la siguiente: ceftazidima (0,06 µg/mL)/ácido fenilborónico (2 µg/mL)/PMBN (4 µg/mL), o bien ceftazidima (0,03 µg/mL)/aztreonam (1 µg/mL)/PMBN (4 µg/mL). Como se observa en la Figura 18A, PMBN por sí mismo (en ausencia de antibiótico y de inhibidor) fue capaz de inhibir totalmente el crecimiento de la cepa CUN 4158-02 Ps4 durante unas 13-14 h. Transcurrido este tiempo y en el caso de aztreonam (Figura 18A; panel izquierdo), el único tratamiento que inhibió eficazmente el crecimiento hasta las 20 h fue la combinación triple PMBN/ceftazidima/aztreonam, mientras que la combinación doble PMBN/aztreonam resultó inhibitoria hasta las 14 h. Después de 20h de cultivo, incluso la combinación triple fue también perdiendo gradualmente su capacidad inhibitoria. No obstante, la determinación del área bajo la curva a las 45 h del comienzo del cultivo (panel izquierdo de la Figura 18B) mostró que estas diferencias de capacidad inhibitoria no eran estadísticamente significativas.

Cuando se sustituyó aztreonam por ácido fenilborónico (Figura 18A; panel derecho), se obtuvieron resultados similares, aunque en este caso se puso de manifiesto la mayor potencia inhibitoria del segundo inhibidor. De hecho, sólo la combinación ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN siguió retrasando el crecimiento bacteriano después de 20 h de cultivo. La eficacia inhibitoria de esta combinación se demostró cuantitativamente mediante la determinación del área bajo la curva. Como se muestra en el panel derecho de la Figura 18B, dicha combinación triple fue la única que resultó significativamente inhibitoria ($p < 0,05$) sobre la cepa CUN 4158-02 Ps4.

A: Cinética de crecimiento



B: Área bajo la curva

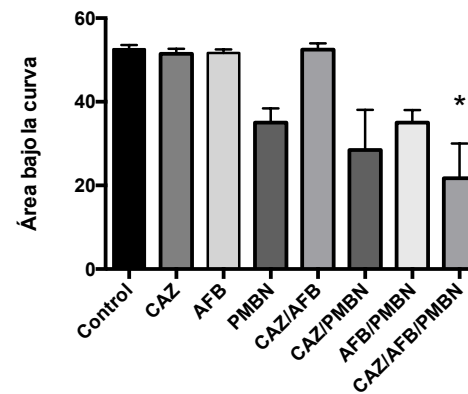
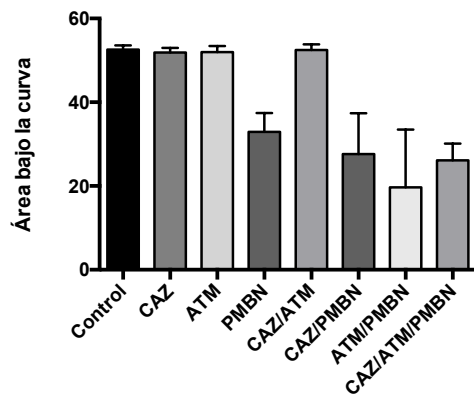


Figura 18.- Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (Bioscreen) de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 sometido a potenciación de inhibidores de β -lactamasas (A) Se muestra el seguimiento en el tiempo de la densidad óptica de cultivos en presencia de aztreonam (ATM; panel izquierdo) o ácido fenilborónico (AFB; panel derecho). El inóculo y el medio de cultivo (MHCA) fueron idénticos a los empleados para la determinación de la CMI. CAZ: ceftazidima (0,03 μ g/mL paneles de la izquierda, 0,06 μ g/mL paneles de la derecha); AFB: ácido fenilborónico (2 μ g/mL); PMBN (4 μ g/mL); ATM: aztreonam (1 μ g/mL). (B) Área bajo la curva determinada a las 45 h del comienzo del cultivo. Se realizaron tres experimentos independientes en los que se incluyeron triplicados. Los resultados se analizaron mediante Kruskal Wallis con comparaciones múltiples. *($p < 0,05$).

2.5. Cinética de muerte de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 sometida a potenciación de inhibidores de β -lactamasas

Los resultados anteriores sugerían que el fenómeno de potenciación de inhibidores de β -lactamasas era debido, más que a una acción bactericida, a una inhibición (retraso) del crecimiento bacteriano. De ser así, el tratamiento podría tener poca eficacia para la eliminación de la viabilidad de *biofilms* maduros. Para estudiar si los tratamientos potenciadores estudiados anteriormente eran inhibitorios o bactericidas se realizaron curvas de letalidad sobre la cepa CUN 4158-02 Ps4. En estos ensayos se empleó la combinación que había mostrado mejor capacidad potenciadora, ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN. Concretamente, se ensayó la triple combinación a las siguientes concentraciones: 1 x CMI (equivalente a 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ceftazidima /2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fenilborónico /4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PMBN), 2 x CMI y 4 x CMI y se recogieron muestras para el recuento de viables a tiempo 0, 15, 30, 45, 60, 120, 240 y 360 min.

Como se muestra en la Figura 19, cuando se usó a su CMI (concentración 1 x CMI), la combinación triple fue capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano durante las 6h de duración del ensayo. Sin embargo, a concentraciones superiores a su CMI, el tratamiento resultó ser bactericida de una manera dependiente de la dosis. Así, la concentración 4 x CMI redujo la viabilidad bacteriana del inóculo inicial aproximadamente 100 veces (de 10^6 a 10^4 UFC/mL) en 6h.

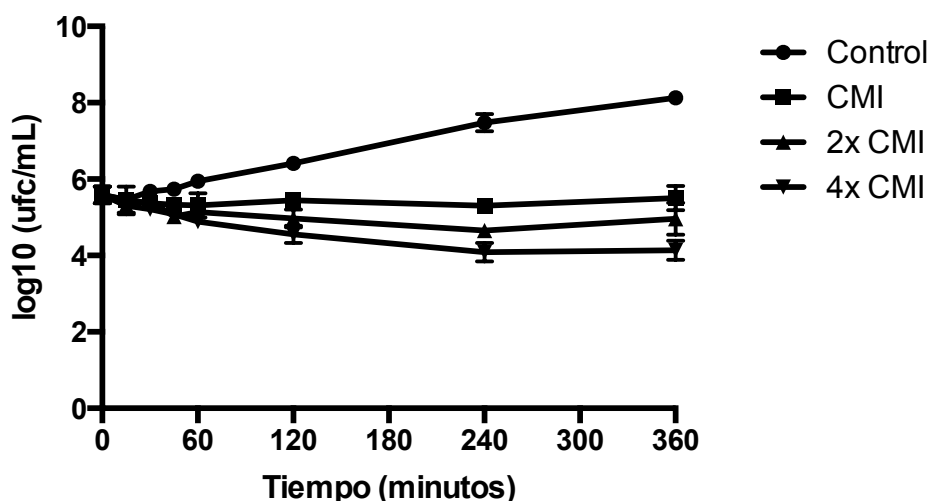


Figura 19.- Cinética de muerte de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 sometido a potenciación de inhibidores de β -lactamasas. El inóculo y el medio de cultivo (MHCA) fueron idénticos a los empleados para la determinación de la CMI. La combinación triple se ensayó a 1 x CMI (equivalente a ceftazidima (0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/ácido fenilborónico (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/PMBN (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)), o bien a 2 x CMI o 4 x CMI y se recogieron muestras para el recuento de viables a tiempo 0, 15, 30, 45, 60, 120, 240 y 360 min.

2.6. Interacción de la sonda NPN con células de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 sometidas a potenciación de inhibidores de β -lactamasas

Para estudiar si era correcta la hipótesis de que la permeabilización de la bacteria por parte del péptido antimicrobiano promueve la entrada de los demás compuestos, se estudió la capacidad permeabilizante de cada uno de los tres agentes y de su combinación. Para ello, se empleó una sonda hidrofóbica fluorescente, N-fenil-1-naftilamida (NPN), que emite fluorescencia sólo en ambientes lipofílicos. De esta manera, si un tratamiento es permeabilizante, la sonda se incorporará a la membrana, donde emitirá fluorescencia y la intensidad de ésta será proporcional a la magnitud de la alteración. Además, la velocidad de incorporación de la sonda a la membrana (cinética de permeabilización) informa de la mayor o menor capacidad permeabilizante del agente empleado. Las lecturas se hicieron a 37°C y adicionando 0,1% glucosa al medio de incubación, lo que en conjunto permitió obtener resultados muy reproducibles. Además, los ensayos se realizaron siempre en los primeros 60 min tras la preparación de las células, pues se observó que la membrana de las bacterias se alteraba en incubaciones más prolongadas.

Cuando se evaluaron mediante esta técnica los componentes de la concentración triple por separado a su CMI (0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ceftazidima /2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido fenilborónico /4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PMBN), se observó que la permeabilidad era dependiente únicamente de PMBN (Figura 20). La fluorescencia que emite NPN en los tratamientos con ácido fenilborónico y ceftazidima no se diferencia de la fluorescencia emitida por la bacteria sin tratar. Además, se comprobó que la combinación de los tres componentes no aumentaba ni la rapidez de incorporación de la sonda a la membrana ni el nivel final de fluorescencia alcanzado.

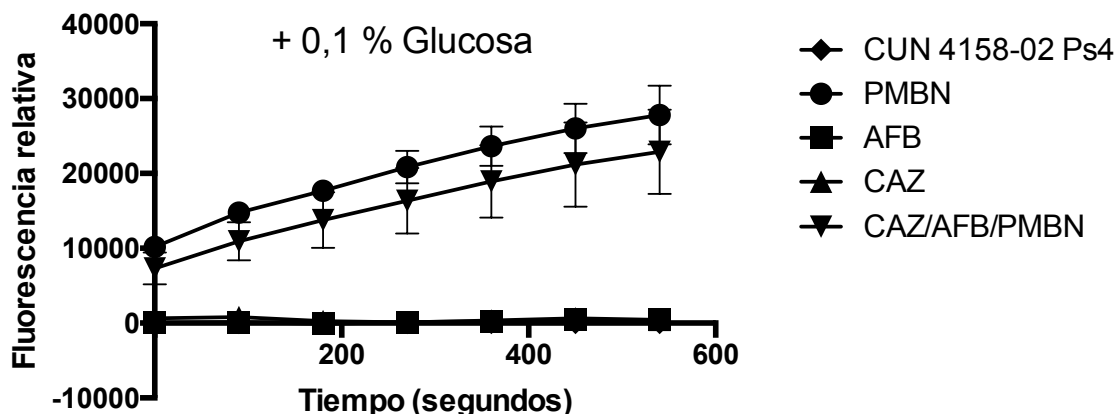


Figura 20.- Cinética de incorporación a la membrana de la sonda 1-N-phenyl-naphthylamine (NPN) en células de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 sometidas a potenciación de inhibidores de β -lactamasas.

Las bacterias en fase exponencial se suspendieron en HEPES pH 7,2 suplementado con 0,1% de glucosa, se expusieron al agente en estudio, y tras la adición de NPN, la fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro a 37 °C. Nonapéptido de la Polimixina B (4 μ g/mL; PMBN), ácido fenilborónico (2 μ g/mL; AFB), ceftazidima (0,06 μ g/mL; CAZ) o combinación de los tres agentes anteriores (CAZ/AFB/PMBN). Todas las medidas se han realizado por cuadruplicado en cinco experimentos independientes.

2.7. Evaluación de la potenciación de inhibidores de β -lactamasas en la cepa resistente a colistina *Pseudomonas aeruginosa* CUN Ps74

Los experimentos del apartado anterior ofrecen una evidencia directa de que la potenciación de inhibidores de β -lactamasas es debida a la acción permeabilizante de PMBN. Una evidencia indirecta de este hecho sería la demostración de que una cepa resistente a péptidos antimicrobianos no fuera sensible a dicho fenómeno de potenciación. Para investigar esta última posibilidad, se repitieron los ensayos anteriores empleando el aislamiento clínico *P. aeruginosa* CUN Ps74, que es resistente a colistina. Concretamente, se probaron las dos combinaciones más potentes, ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN y ceftazidima/aztreonam/PMBN. Como se observa en la Tabla 26, PMBN se mostró incapaz de potenciar a aztreonam y mostró sólo una ligera actividad sinérgica con el inhibidor más potente, el ácido fenilborónico, por debajo de 4 μ g/mL. La pobre potenciación observada en esta cepa contrasta con la eficacia que el tratamiento mostró sobre la cepa CUN 4158-02 Ps4 (Tabla 23A).

Tabla 26.- Capacidad de PMBN para sensibilizar a una cepa resistente a colistina, *Pseudomonas aeruginosa* CUN Ps74, a combinaciones de ceftazidima y de inhibidores de β -lactamasas.

PMBN ¹ ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ² Ceftazidima ³ ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor				
	0	Aztreonam ⁴ (1 $\mu\text{g/mL}$)	ICIF ⁵	Ácido Fenilborónico ⁶ (2 $\mu\text{g/mL}$)	ICIF
0	8	8		4	
1	8	8	1,03	4	0,50
2	16	8	1,04	4	0,51
4	16	8	1,04	4	0,51
8	16	16	2,05	8	1,02
16	16	16	2,06	4	0,53

¹: CMI_{PMBN} =512 $\mu\text{g/mL}$. ²: Concentración mínima inhibitoria. ³: CMI_{Ceftazidima} =8 $\mu\text{g/mL}$. ⁴: CMI_{Aztreonam} =32 $\mu\text{g/mL}$. ⁵: Índice de concentración inhibitoria fraccionada. ⁶: CMI_{Ácido fenilborónico} >512 $\mu\text{g/mL}$.

2.8. Evaluación de la potenciación de inhibidores de β -lactamasas sobre *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* cultivados en microplaca

Como se comentó en la Introducción, la producción de β -lactamasas es uno de los mecanismos que explica la elevada resistencia de los *biofilms* a los antibióticos β -lactámicos. Este mecanismo es todavía más eficaz en cepas formadoras de *biofilm* que hiperexpresan β -lactamasas, como la cepa CUN 4158-02 Ps4. Para evaluar si el tratamiento experimental puesto a punto sobre células en fase planctónica era eficaz también sobre *biofilms*, se seleccionaron las combinaciones más potentes (Ceftazidima/Ácido Fenilborónico/PMBN y Ceftazidima/Aztreonam/PMBN) y se probaron sobre *biofilms* de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4. El primer grupo de ensayos se realizó cultivando las bacterias en condiciones estáticas (sin agitación) en pocillos de microplacas de poliestireno, lo que proporciona *biofilms* de baja densidad. A continuación, se determinaron las dos principales actividades que un antimicrobiano puede poseer frente a *biofilms* ya formados: la actividad eliminadora o de destrucción (“*removal activity*”) y la bactericida o de desinfección (“*disinfection activity*”). La primera de ellas se cuantificó mediante tinción con cristal violeta (CV) de la biomasa adherida a los pocillos, mientras que la segunda se determinó mediante un ensayo de viabilidad (MTT), que mide la tasa de respiración celular. Además, se evaluó la capacidad de los antimicrobianos a concentraciones subinhibitorias para inhibir la formación de *biofilm* mediante CV. En la Tabla 27 se muestra la actividad frente a los *biofilms* de cada compuesto por separado.

Tabla 27.- Capacidad de los compuestos en estudio para destruir, desinfectar e inhibir el *biofilm* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 cultivado en condiciones estáticas en microplaca*.

Antimicrobiano	Concentración (µg/mL)	% Actividad de desinfección (Media ± DE ¹)	% Actividad de destrucción (Media ± DE)	% Actividad de inhibición (Media ± DE)
Sin tratamiento	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
AFB ²	256	37,58 ± 12	0 ± 0	0 ± 0
	128	36,63 ± 16	0 ± 0	0 ± 0
	64	35,69 ± 23	0 ± 0	0 ± 0
	32	23,99 ± 35	0 ± 0	0 ± 0
	16	20,81 ± 13	0 ± 0	6,40 ± 38
	8	5,59 ± 12	0 ± 0	13,17 ± 33
ATM ³	256	9,63 ± 16	34,09 ± 26	na ⁴
	128	9,80 ± 16	25,96 ± 37	na
	64	0 ± 0	13,46 ± 29	na
	32	14,27 ± 42	25,01 ± 47	na
	16	0 ± 0	7,66 ± 29	na
	8	0 ± 0	52,29 ± 18	67,47 ± 17
CAZ ⁵	256	29,06 ± 20	60,01 ± 31	na
	128	20,21 ± 12	79,56 ± 12	na
	64	0 ± 0	65,03 ± 32	na
	32	0 ± 0	62,20 ± 23	37,66 ± 29
	16	0 ± 0	61,05 ± 25	67,93 ± 15
	8	0,34 ± 38	70,69 ± 18	49,42 ± 31
PMBN ⁶	256	0 ± 0	35,11 ± 33	58,12 ± 28
	128	0 ± 0	51,27 ± 29	89,71 ± 8
	64	41,02 ± 27	55,24 ± 29	80,41 ± 8
	32	45,57 ± 10	62,02 ± 18	67,43 ± 17
	16	31,56 ± 17	48,42 ± 25	59,92 ± 17
	8	16,34 ± 26	27,90 ± 37	15,86 ± 32

¹: Desviación estándar. ²: Ácido Fenilborónico; CMI>512 µg/mL. ³: Aztreonam; CMI=16 µg/mL. ⁴: no aplica ⁵: Ceftazidima; CMI= 64 µg/mL. ⁶: Nonapéptido de la Polimixina B; CMI>512 µg/mL.

* Los porcentajes de desinfección (ensayo MTT), de destrucción (ensayo cristal violeta (CV)), e inhibición del *biofilm*

(CV), se calcularon mediante la siguiente fórmula: $\% = \frac{(C - B) - (T - B)}{(C - B)} \times 100$ donde C corresponde a la absorbancia de pocillos con *biofilm*, pero sin tratamiento; T es la absorbancia leída en los pocillos con el *biofilm* tratado y B la absorbancia medida en el pocillo blanco (sin *biofilm*, ni tratamiento).

Aunque se hicieron tres experimentos independientes empleando en cada uno de ellos 12 pocillos por tratamiento, esta metodología se caracterizó por una elevada variabilidad. En relación con la actividad desinfectante, ningún tratamiento superó el 45 % de actividad y sólo se observó correlación dosis-respuesta en el caso de ácido fenilborónico y de PMBN. Sin embargo, este último compuesto perdió su actividad por

encima de cierta concentración (> 64 µg/mL), lo que puede tener relación con el “efecto rebote” observado al emplear PMBN sobre células planctónicas.

Respecto a la actividad destructora, la elevada variabilidad y la ausencia de correlación dosis-respuesta, impidieron extraer conclusiones fiables, salvo la evidente inexistencia de dicha actividad en el caso del ácido fenilborónico. Finalmente, tanto PMBN como aztreonam destacaron por su capacidad de inhibir la formación de *biofilm* con un 89,71% y 67,47%, aunque el dato del segundo compuesto fue más relevante por haberse detectado a baja concentración (8 µg/mL).

Una vez caracterizada la contribución de cada antimicrobiano por separado, se evaluó la capacidad frente a los *biofilms* de la combinación que había resultado más potente en los ensayos previos con células en fase planctónica (ceftazidima/aztreonam/PMBN, o bien ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN). El efecto inhibitorio de cada combinación se estudió a concentraciones subinhibitorias, mientras que los otros dos efectos se cuantificaron a concentraciones progresivamente superiores a la CMI planctónica. Como se observa en la Tabla 28, la combinación ceftazidima/aztreonam/PMBN mostró una nula actividad inhibitoria y desinfectante sobre *biofilm* de CUN 4158-02 Ps4 cultivado en microplaca, y sólo fue capaz de destruir un 16% del *biofilm* cuando se empleó a la máxima concentración (50 veces la CMI planctónica).

Tabla 28.- Capacidad de destrucción, desinfección e inhibición de una combinación ceftazidima/aztreonam/PMBN a concentraciones crecientes sobre *biofilm* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 cultivado en condiciones estáticas en microplaca*.

Número de veces la CMI planctónica ¹	Actividad de destrucción (Media ± DE ²)	Actividad de desinfección (Media ± DE)	Actividad de inhibición (Media ± DE)
0,25x	nd ³	nd	0 ± 0
0,5x	nd	nd	0 ± 0
0,75x	nd	nd	0 ± 0
1x	0 ± 0	0 ± 0	na ⁴
2x	0 ± 0	0 ± 0	na
10x	0 ± 0	0 ± 0	na
50x	16,09 ± 5	0 ± 0	na

¹: CMI planctónica= ceftazidima (0,03 µg/mL) aztreonam (1 µg/mL) PMBN (4 µg/mL). ²: Desviación estándar. ³: no determinado. ⁴: no aplica. *Las actividades frente a los *biofilms* se cuantificaron como se indica en la Tabla 24.

Aunque la combinación ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN fue también incapaz de inhibir la formación de *biofilm* y mostró una actividad desinfectante muy baja o nula, el combinado triple destruyó el *biofilm* de la cepa CUN 4158-02 Ps4 de una forma claramente dependiente de la dosis. Esta actividad destructora se comenzó a detectar a 40 veces la CMI planctónica (29,86 % de destrucción) y mostró su

máxima potencia a la concentración más alta ensayada (200 x CMI; 70,09 %) (Tabla 29).

Tabla 29.- Capacidad de destrucción, desinfección e inhibición de una combinación ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN a concentraciones crecientes sobre *biofilm* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 cultivado en condiciones estáticas en microplaca*.

Número de veces la CMI planctónica ¹	Actividad de destrucción (Media ± DE ²)	Actividad de desinfección (Media ± DE)	Actividad de inhibición (Media ± DE)
0,25x	nd ³	nd	0 ± 0
0,5x	nd	nd	0 ± 0
0,75x	nd	nd	0 ± 0
1x	0 ± 0	0,1 ± 6	na ⁴
2x	0 ± 0	2,22 ± 8	na
10x	0 ± 0	13,12 ± 17	na
20x	0 ± 0	0 ± 0	na
30x	0 ± 0	0 ± 0	na
40x	29,86 ± 9	0 ± 0	na
50x	56,61 ± 4	0 ± 0	na
100x	61,84 ± 8	0 ± 0	na
200x	70,09 ± 16	0 ± 0	na

¹: CMI planctónica= ceftazidima (0,06 µg/mL) ácido fenilborónico (2 µg/mL) PMBN (4 µg/mL). ²: Desviación estándar. ³: no determinado. ⁴: no aplica. *Las actividades frente a los *biofilms* se cuantificaron como se indica en la Tabla 24.

Para estudiar si la actividad de destrucción del *biofilm* observada a altas concentraciones dependía de la presencia simultánea de los tres compuestos, o bien se debía a la acción de uno o dos de ellos, se cuantificó la capacidad destructora de *biofilm* de cada agente por separado y de las combinaciones dobles. Los resultados demostraron que ni las combinaciones dobles, ni los componentes por separado poseían capacidad destructora de *biofilm* (0%).

Aunque nuestros resultados indicaban que los tres componentes de la combinación debían estar presentes para que ésta destruyera el *biofilm*, se estudió si el efecto frente al *biofilm* se mantenía cuando se reducía la concentración de PMBN. Se escogió este agente debido a que era el componente que se añadía a mayor concentración en la combinación. La eficacia destructora de la combinación triple se perdía cuando se empleaban concentraciones de PMBN inferiores a la detectada como necesaria (4 µg/mL) en dicha combinación, aún manteniendo una concentración inalterada del resto de componentes (Resultados no mostrados).

Para investigar si la eficacia destructora de la combinación triple aumentaba al prolongar el tiempo de exposición, se expuso el *biofilm* de la cepa CUN 4158-02 Ps4 al tratamiento durante 48h, en vez de 24h. Los resultados obtenidos demostraron que la

prolongación de la incubación mejoraba muy significativamente la actividad de destrucción (hasta el $90,84 \pm 5 \%$).

Dada la modesta eficacia potenciadora que los péptidos derivados de la lactoferrina mostraron sobre células planctónicas de la cepa CUN 4158-02 Ps4, no se estudió su actividad destructora o desinfectante de *biofilm*. Por el contrario, se decidió investigar si estos compuestos a concentraciones sub-CMI inhibían la formación de *biofilms* de dicha cepa. Como se muestra en la Tabla 30, sólo los péptidos P5-8 y P5-9 mostraron actividad inhibitoria (40% de inhibición, aproximadamente) cuando se ensayaron a 20 y 40 veces por debajo de su CMI planctónica, respectivamente.

Tabla 30.- Capacidad de inhibición de *biofilm* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 de péptidos derivados de la lactoferrina humana ensayados a concentraciones por debajo de su CMI planctónica*.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Actividad de inhibición (Media \pm DE ¹)			
	P4-1 ²	P5-3 ³	P5-8 ⁴	P5-9 ⁵
1,50	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
3,13	0 \pm 0	7,98 \pm 20	4,09 \pm 14	18,28 \pm 16
6,25	0 \pm 0	6,48 \pm 32	8,33 \pm 14	19,23 \pm 19
12,50	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	6,97 \pm 30
25,00	0 \pm 0	0 \pm 0	29,60 \pm 10	42,51 \pm 18
50,00	0 \pm 0	8,36 \pm 33	38,68 \pm 10	41,06 \pm 17

¹: Desviación estándar. ²: CMI_{P4-1} = 512 $\mu\text{g/mL}$. ³: CMI_{P5-3} = 64 $\mu\text{g/mL}$. ⁴: CMI_{P5-8} = 1024 $\mu\text{g/mL}$. ⁵: CMI_{P5-9} = 1024 $\mu\text{g/mL}$. La actividad inhibitoria de *biofilm* se cuantificó como se indica en la Tabla 24

2.9. Evaluación de la potenciación de inhibidores de β -lactamasas sobre *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* cultivados en CDC reactor.

Una vez identificado un tratamiento potenciador capaz de destruir *biofilms* formados en condiciones estáticas, se evaluó dicho tratamiento frente a *biofilms* cultivados en flujo turbulento. Para obtener este tipo de biocapas, se empleó un sistema denominado CDC *biofilm* reactor que permite trabajar en agitación y con un recambio constante de medio de cultivo. En estas condiciones se generan *biofilms* más densos y consistentes que los obtenidos en el modelo de microplaca. Como se detalló en la sección de Material y Métodos, en el CDC reactor, los *biofilms* se forman en discos de policarbonato (para recuentos) o borosilicato (para microscopía) que se extraen y se procesan tras finalizar el crecimiento. Al igual que en los experimentos en microplaca, para estos ensayos se empleó la cepa *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4

La observación microscópica mediante microscopía de fluorescencia de la superficie de los discos cultivados en el reactor durante 24 h con agitación y 24 h con flujo de medio reveló la presencia de una densa capa de células que se teñían de color

verde con el fluorocromo Syto 9 (Figura 21A). Este compuesto, que se intercala en el DNA, tiñe todo tipo de células independientemente de su viabilidad. Las imágenes obtenidas permiten observar que la superficie del *biofilm* no era lisa, sino que presentaba abundante rugosidad y protuberancias que se teñían de un verde más intenso. Además de Syto 9, el *biofilm* se expuso simultáneamente a yoduro de propidio (IP), un fluorocromo de color rojo que sólo penetra en células muertas o con la membrana dañada. Este ensayo puso de manifiesto que la práctica totalidad de las células –que no habían sido tratadas con agentes antimicrobianos– permanecían viables (Figura 21A).

Para determinar el espesor del *biofilm* y caracterizar mejor su estructura bidimensional se recurrió a cortes de secciones congeladas (criosecciones). La observación al microscopio de fluorescencia de los cortes, reveló la morfología característica de los *biofilms* maduros con abundantes formaciones en forma de seta (Figura 21B). Además, el recuento de las células viables obtenidas de los discos mediante procedimientos mecánicos y ultrasonidos, reveló que las biocapas poseían una elevada densidad celular, 8,06 logaritmos/cm² (equivalente a 1×10^8 UFC/ cm²), cuando los discos se cultivaron durante 24h, o bien 11,90 logaritmos/cm² (equivalente a 1×10^{12} UFC/ cm², aproximadamente) cuando el cultivo se prolongaba durante 72 h.

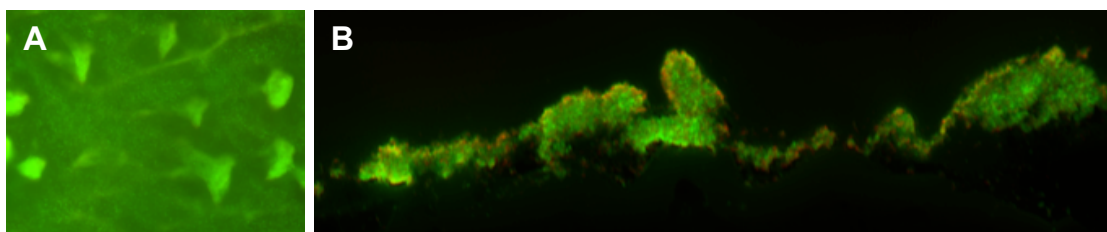


Figura 21.- Examen microscópico de *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 de 48 h no expuestos a agentes antimicrobianos y teñidos con Syto 9 y yoduro de propidio; imagen obtenida mediante (A) microscopía de fluorescencia y (B) criosección y microscopía de fluorescencia a un aumento de 20x.

Los experimentos de exposición de *biofilms* a agentes antimicrobianos se realizaron primero empleando medio MHCA. Para ello, se extrajeron los discos del reactor y se sumergieron en dicho medio de cultivo con varias combinaciones de antimicrobianos durante 4, 24 y 72 h. A continuación, se procedió a hacer un recuento de las bacterias viables y a calcular la reducción logarítmica (\log_{10} ufc/cm²) de la viabilidad de las bacterias. Como se puede observar en la Figura 22, esta metodología proporcionó resultados mucho más reproducibles y una baja variabilidad experimental. Por otro lado, la Figura 22A muestra que cuando los *biofilms* se sometieron a los agentes en exposiciones cortas (4h), sólo el tratamiento control de 50xPMB y el hipoclorito sódico redujeron de forma muy significativa ($p < 0,01$) y altamente

significativa ($p < 0,001$) la viabilidad del *biofilm*.

Posteriormente, se decidió aumentar el tiempo de exposición a los tratamientos a 24 h. Como se muestra en la Figura 22B, en estos experimentos, las dos combinaciones triples (CAZ/ATM/PBN y CAZ/AFB/PMBN) ajustadas a 50 veces su CMI planctónica mostraron una significativa actividad frente al *biofilm* ($p < 0,05$), aunque aún se quedaron lejos de la capacidad bactericida del control positivo (hipoclorito sódico).

A: 4 horas

B: 24 horas

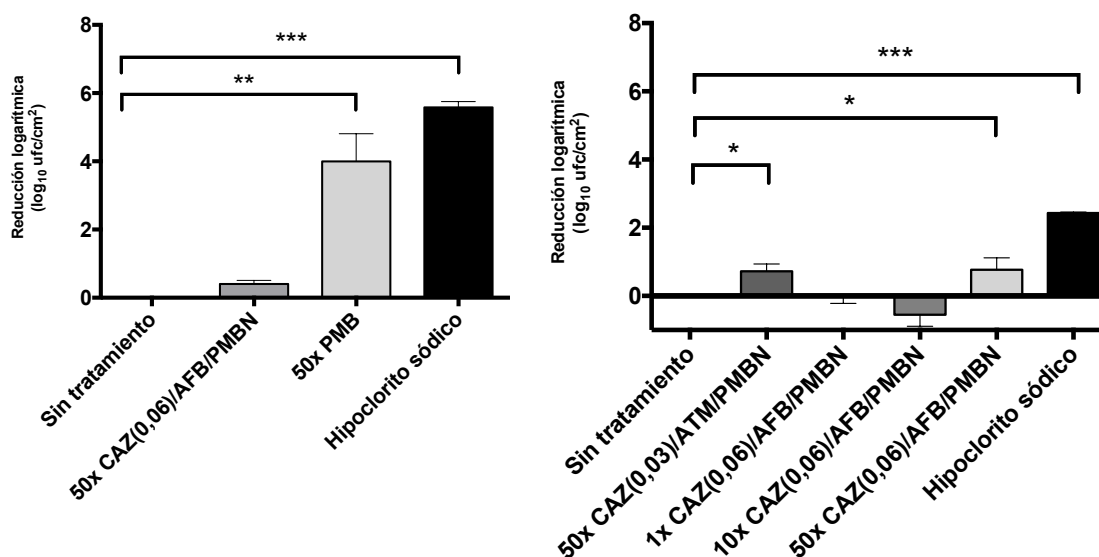


Figura 22.- Actividad bactericida en medio MHCA de combinaciones de antimicrobianos sobre *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 cultivados en el reactor CDC en condiciones de flujo turbulento. Tras el cultivo, los discos con los *biofilms* se extrajeron y se expusieron a los tratamientos indicados a 1, 10 o 50 veces la CMI planctónica durante (A) 4 h o (B) 24 h en medio MHCA. A continuación, las células se despegaron con medios mecánicos y con ultrasonidos y se calculó la reducción logarítmica del número de bacterias viables. Hipoclorito sódico (1000 µg/mL); PMB: Polimixina B (2 µg/mL) CAZ: ceftazidima; ATM: aztreonam (1 µg/mL); PMBN (4 µg/mL); AFB: ácido fenilborónico (2 µg/mL). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de un criterio con contrastes de Tukey y la estadística fue altamente significativa (***; $p < 0,001$), muy significativa (**; $p < 0,01$) y significativa (*; $p < 0,05$).

La capacidad bactericida de las combinaciones también se estudió mediante microscopía láser confocal. Para estos experimentos se tiñó el *biofilm* de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 con un kit comercial (LIVE/DEAD BacLight) que consiste en una mezcla de los fluorocromos SYTO 9 e IP. Como se puede observar en la Figura 23, cuando los discos del CDC reactor se dejaron sin tratar adquirieron color verde, lo que indica que las células están vivas. Por el contrario, los discos duplicados del anterior tratados con hipoclorito, o bien con la combinación 50 x CAZ(0,06 µg/mL)/AFB(2 µg/mL)/PMBN(4 µg/mL) durante 24 h en MHCA, se tiñeron con una

tonalidad roja, poniendo así de manifiesto la actividad bactericida de ambos tratamientos.

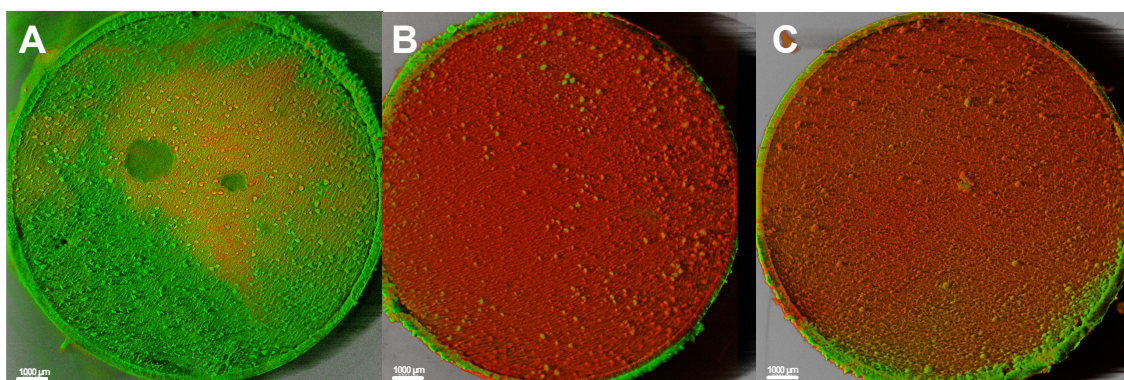


Figura 23.- Evaluación mediante microscopía confocal de la actividad bactericida del tratamiento ceftazidima/ácido fenil borónico/PMBN a 50 veces su CMI planctónica sobre *biofilm* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 de 48 h cultivado en reactor CDC en condiciones de flujo turbulento. Tras el cultivo, los discos con los *biofilms* se extrajeron y se expusieron al tratamiento indicado durante 24 h en medio MHCA. A continuación, la superficie de los discos se tiñó con el kit comercial LIVE/DEAD y se visualizó mediante microscopía confocal a 1,5 aumentos, las barras de escala representan 1000 μm . (A) Control de viabilidad (*biofilm* no tratado), (B) Control de tratamiento bactericida (hipoclorito sódico 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y (C) *biofilm* tratado con la combinación triple.

Los experimentos anteriores mostraron que la potenciación de la inhibición de β -lactamasas tenía una actividad bactericida modesta sobre *biofilm* de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4. Esto podía deberse a que en los ensayos de actividad bactericida se empleó medio de cultivo MHCA, que tiene una considerable fuerza iónica. Para intentar mejorar la capacidad frente al *biofilm* del tratamiento en estudio, se repitieron los ensayos en *buffer* fosfato (PB; 625 μM KH_2PO_4 , 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; pH 7,2). Aunque este *buffer* no refleja las condiciones del medio interno humano, gracias a su biocompatibilidad podría emplearse en ciertas aplicaciones clínicas, por ejemplo como disolvente de soluciones de sellado antibiótico. Como se muestra en la Figura 24A, en las nuevas condiciones el tratamiento CAZ/AFB/PMBN a 50 veces su CMI planctónica igualó la capacidad bactericida del hipoclorito sódico y del antibiótico PMB (resultado no mostrado). Este experimento demostró que la presencia simultánea de los tres componentes de la combinación era indispensable para obtener este nivel de eficacia frente al *biofilm*, ya que los tratamientos dobles se mostraron unas 100 veces menos bactericidas que la combinación triple (resultados no mostrados).

Dado que los tratamientos de sellado antibiótico se prolongan durante varios días (incluso hasta 2 semanas) (Mermel et al. 2009), se decidió estudiar si la eficacia frente al *biofilm* del tratamiento combinado mejoraba al prolongar el tiempo de exposición. Para ello, se seleccionó el tratamiento que mejor resultado había proporcionado, CAZ/AFB/PMBN a 50 veces su CMI planctónica, y se aplicó sobre *biofilm* de la cepa

CUN 4158-02 Ps4 durante 72 h. De la misma manera que se hace en tratamientos de sellado antibiótico, también en este caso la solución empleada se sustituyó diariamente por una solución recién preparada. Como se muestra en la Figura 24B, la combinación CAZ/AFB/PMBN redujo 10^8 veces la viabilidad del *biofilm*, volviendo a igualar la eficacia bactericida del tratamiento control (hipoclorito sódico). En este caso, la presencia del inhibidor no resultó necesaria, pues el tratamiento 50xCAZ/PMBN mostró una eficacia frente al *biofilm* indistinguible de la combinación triple. Es de destacar que un tratamiento estándar empleado en sellado antibiótico (ceftazidima 5000 $\mu\text{g/mL}$) fue incapaz de reducir la viabilidad del *biofilm* en las mismas condiciones. La eliminación del antibiótico o del péptido de la combinación triple (combinaciones AFB/PMBN o AFB/CAZ, respectivamente), causó una reducción de actividad bactericida muy significativa.

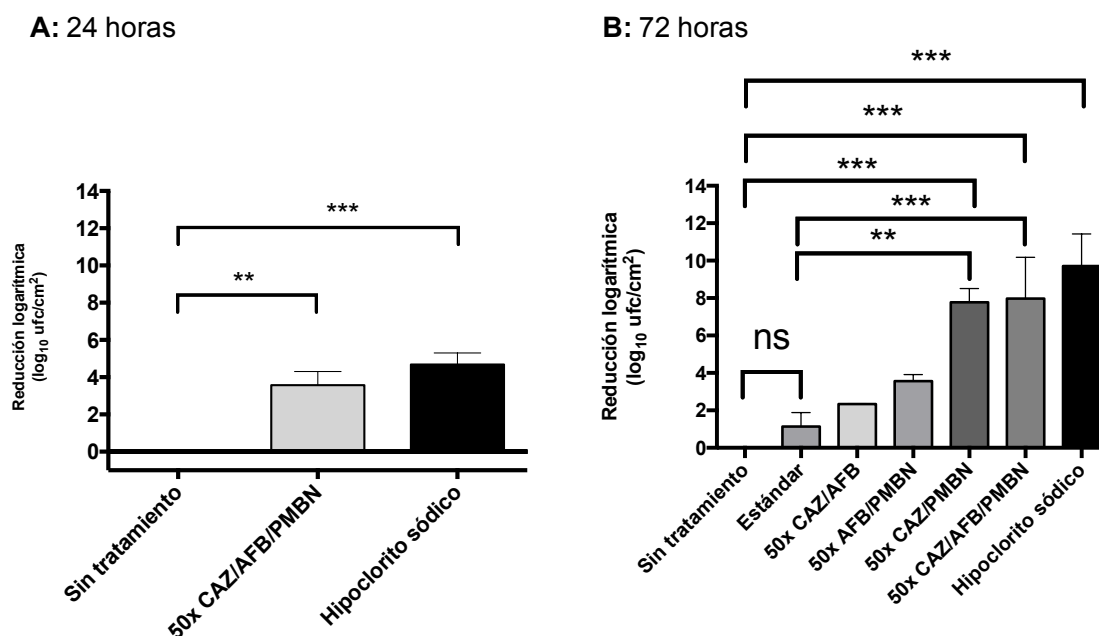


Figura 24.- **Actividad bactericida en *buffer* fosfato de combinaciones de antimicrobianos sobre *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 cultivados en el reactor CDC en condiciones de flujo turbulento.** Tras el cultivo, los discos con los *biofilms* se extrajeron y se expusieron a los tratamientos indicados a 50 veces la CMI planctónica durante (A) 24 h o (B) 72 h en *buffer* fosfato. A continuación, las células se despegaron con medios mecánicos y con ultrasonidos y se calculó la reducción logarítmica del número de bacterias viables. Hipoclorito sódico (1000 $\mu\text{g/mL}$); CAZ: ceftazidima (0,06 $\mu\text{g/mL}$); PMBN (4 $\mu\text{g/mL}$); AFB: ácido fenilborónico (2 $\mu\text{g/mL}$); Estándar: tratamiento común en clínica para *biofilms* de gramnegativos (ceftazidima 5000 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de un criterio con contrastes de Tukey y la estadística fue altamente significativa (***, $p < 0,001$), muy significativa (**, $p < 0,01$), significativa (*; $p < 0,05$) o no significativa (ns; $p > 0,05$).

Como la concentración de ceftazidima presente en la combinación (50x 0,06 $\mu\text{g/mL}$ = 3 $\mu\text{g/mL}$) está muy lejos de las concentraciones que se emplean en clínica como soluciones de sellado antibiótico (5000 $\mu\text{g/mL}$), se estudió si la eficacia frente al

biofilm del tratamiento mejoraba al incrementar la concentración de este componente de la combinación. Concretamente, se ensayaron concentraciones de ceftazidima 500, 5.000 y 50.000 veces la CMI planctónica, manteniendo el resto de componentes de la combinación a la misma concentración. El incremento de la concentración de ceftazidima no se tradujo en una mejora de actividad bactericida en ningún caso (Resultados no mostrados).

Aunque la concentración de PMBN presente en la combinación triple (50 x 4 µg/mL, es decir 200 µg/mL) había resultado necesaria para destruir *biofilms* en microplaca, se decidió estudiar si esta conclusión era aplicable a *biofilms* cultivados con flujo turbulento. La actividad bactericida de la combinación triple fue proporcional a la cantidad de PMBN presente en ella y presentó una tendencia a disminuir cuando se empleaban concentraciones de PMBN inferiores a 200 µg/mL (Resultados no mostrados).

Como se mostró en la Figura 24, el incremento de exposición a los antimicrobianos de 24h a 72h proporcionó una importante mejora de la capacidad bactericida de los tratamientos ensayados. Este hecho podría traducirse en un aumento de la capacidad del ensayo para discriminar la eficacia de distintos tratamientos frente al *biofilm*. Para investigar esta posibilidad, se determinó la capacidad bactericida de los lipopéptidos PMB y colistina, y se comparó con la de un tratamiento estándar empleado en sellado antibiótico frente a gramnegativos (ceftazidima 5000 µg/mL). Como se muestra en la Figura 25, colistina a 50 veces su CMI planctónica mostró una actividad bactericida similar a la de la combinación triple CAZ/AFB/PMBN (Figura 24). Aunque PMB, sobre todo a 100 µg/mL, presentó una tendencia hacia una eficacia frente al *biofilm* mayor que la colistina, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Finalmente, el tratamiento estándar resultó completamente incapaz de reducir la viabilidad del *biofilm* en las condiciones experimentales.

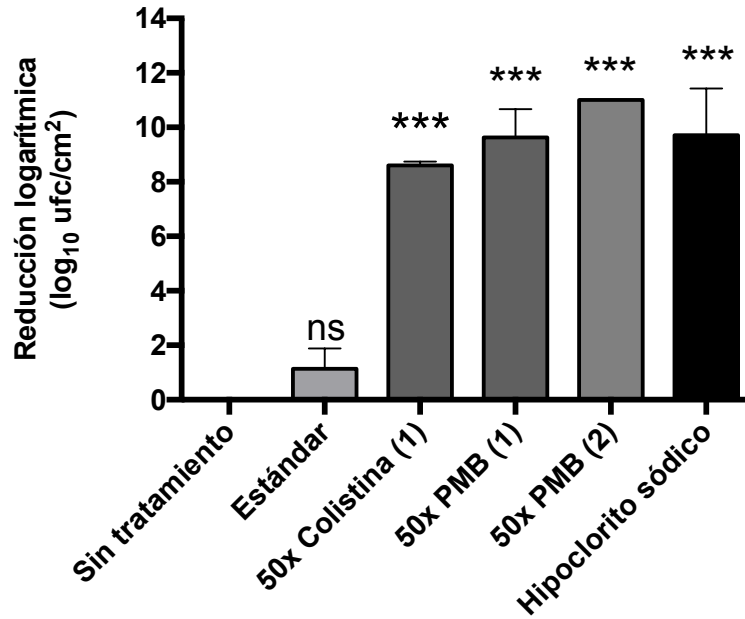


Figura 25.- Actividad bactericida en buffer fosfato durante 72 h de los lipopéptidos colistina y PMB sobre *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 cultivados en el reactor CDC en condiciones de flujo turbulento. Tras el cultivo, los discos con los *biofilms* se extrajeron y se expusieron a colistina y PMB a las concentraciones indicadas (respecto a la CMI planctónica) en buffer fosfato durante 72h. A continuación, las células se despegaron con medios mecánicos y con ultrasonidos y se calculó la reducción logarítmica del número de bacterias viables. Control de eficacia bactericida: hipoclorito sódico (1000 µg/mL); Estándar: tratamiento común en clínica para *biofilms* de gramnegativos (ceftazidima 5000 µg/mL). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de un criterio con contrastes de Tukey y la estadística fue altamente significativa (***; p<0,001), o no significativa (n.s) comparada con el control sin tratar.

3. Potenciación de inhibidores de β -lactamasas mediante péptidos antimicrobianos en *Enterobacterias* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

3.1. Selección de cepas de enterobacterias productoras de BLEE

Los experimentos anteriores demostraron que un agente permeabilizante, como el PMBN, usado a concentraciones subinhibitorias, podía potenciar a inhibidores de la β -lactamasa AmpC y sensibilizar a antibióticos β -lactámicos a una cepa de *P. aeruginosa* que hiperexpresaba esta enzima hidrolítica. La eficacia de dicha sensibilización se demostró tanto en bacterias en fase planctónica como en *biofilms* de *P. aeruginosa*. Nuestra hipótesis era que esta estrategia terapéutica podría aplicarse a microorganismos distintos de *P. aeruginosa* que produjesen otros tipos de β -lactamasas. Dado el enorme impacto sanitario que en los últimos años ha causado la proliferación de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las dificultades que implica su tratamiento, se decidió probar la terapia experimental sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de BLEE.

Como microorganismos modelo para estos estudios, se disponía de 19 cepas de *Escherichia coli* y 6 de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en la Clínica Universidad de Navarra e identificadas como BLEE positivas. Como confirmación de estos análisis, las cepas se cultivaron sobre medio ESBL, que además de ser selectivo para bacterias productoras de BLEE, permite diferenciar entre varios géneros de enterobacterias sobre la base de su distinta actividad enzimática. Como se observa en la Figura 26, todas las cepas crecieron en estas placas y el color de las colonias fue el esperado tanto en el caso de *Klebsiella pneumoniae* (verde azulado; Figura 26A), como para el de *Escherichia coli* (rosado; Figura 26E). El test de sinergia de doble disco y el test de disco combinado confirmaron que las cepas eran efectivamente productoras de BLEE (Figuras 26B, 26C, 26D, 26F, 26G, 26H).

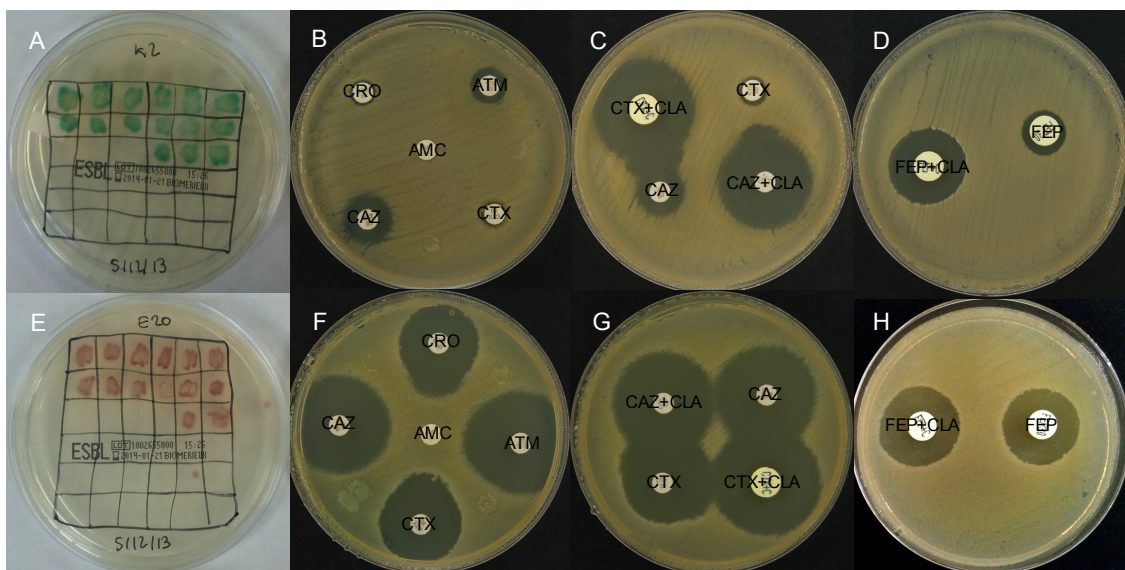


Figura 26.- Crecimiento de las cepas clínicas *Escherichia coli* CUN E20 y *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 en las placas selectivas para bacterias BLEE positivas (A y E), test de sinergia de doble disco (B y F) y test de disco combinado (C, D, G y H). (A) *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 crece con el característico color verde azulado de las bacterias productoras de β -glucosidasa y (E) *Escherichia coli* CUN E20 con el color rosa de las colonias productoras de β -glucuronidasa. (C) y (D) *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 resulta más sensible a la cefalosporina cuando esta está combinada con el ácido clavulánico. (F) *Escherichia coli* CUN E20 aumenta el halo de inhibición hacia el disco del inhibidor. Los antibióticos son ceftazidima (CAZ), aztreonam (ATM), ceftriaxona (CRO), cefepime (FEP), cefotaxima (CTX) y amoxicilina/clavulánico (AMC), algunos discos están combinados con el inhibidor clavulánico (CLA).

Puesto que se deseaba estudiar la eficacia de la terapia también sobre bacterias formadoras de *biofilm*, era necesario analizar si las cepas seleccionadas poseían esta capacidad. Estos ensayos se realizaron en microplaca como se describió anteriormente para *P. aeruginosa*. Como se muestra en la Tabla 31, varias cepas de *Klebsiella pneumoniae* mostraron una significativa capacidad adherente, mientras que en el caso de *Escherichia coli* todas las cepas eran débiles o no adherentes.

Tabla 31.- Clasificación de la capacidad formadora de *biofilm* de las cepas de *Escherichia coli* o *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE mediante el test en microplaca.

<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Cepa	Adherencia	Cepa	Adherencia
CUN ¹ E2	No adherente	CUN K1	Débil
CUN E3	Débil	CUN K2	Moderada
CUN E4	Débil	CUN K3	Moderada
CUN E5	No adherente	CUN K4	Moderada
CUN E6	No adherente	CUN K5	Moderado
CUN E7	Débil	CUN K6	Débil
CUN E8	No adherente		
CUN E9	No adherente		
CUN E10	No adherente		
CUN E11	No adherente		
CUN E12	Débil		
CUN E13	No adherente		
CUN E14	No adherente		
CUN E15	No adherente		
CUN E16	Débil		
CUN E17	No adherente		
CUN E18	Débil		
CUN E19	Débil		
CUN E20	No adherente		

¹: Clínica Universidad de Navarra. Para clasificar a las cepas se calculó la densidad óptica de corte (DOc= 3 x Desviación estándar del control negativo + DO_{media} del control negativo) y se las clasificó según lo descrito (Stepanović et al. 2000) DO ≤ DOc No adherente, DOc ≤ DO ≤ 2x DOc Adherente débil, 2x DOc ≤ DO ≤ 4x DOc Adherente Moderado, 4x DOc ≤ DO Adherente fuerte.

Para los experimentos posteriores, se seleccionó la cepa *Klebsiella pneumoniae* CUN K2, ya que permitiría estudiar la terapia en estudio tanto en células en fase planctónica, como en *biofilms*. Además, se seleccionó la cepa *Escherichia coli* CUN E20, sabiendo que sólo serviría para el primer tipo de ensayos.

Para caracterizar el perfil de susceptibilidad de las cepas seleccionadas, se determinó su CMI a varios antibióticos β-lactámicos (amoxicilina, ampicilina, ticarcilina y piperacilina), péptidos antimicrobianos (PMBN, colistina y PMB), e inhibidores de β-lactamasas (sulbactam, tazobactam y ácido clavulánico). Como se muestra en la Tabla 32, ambas cepas presentaron una resistencia muy elevada a los β-lactámicos ensayados (CLSI 2011), lo que es característico de cepas productoras de BLEE. Por el contrario, los dos aislamientos clínicos se mostraron muy susceptibles a los lipopéptidos antibióticos colistina y PMB (CMI=0,25 µg/mL). Como se ha descrito en otros gramnegativos, la potente actividad antimicrobiana de estos agentes depende de la presencia del grupo acilo, lo que se manifiesta en la pérdida de dicha actividad en el derivado deacilado de PMB, PMBN. Finalmente, ambas cepas presentaron una resistencia similar a los tres inhibidores de BLEEs que se utilizan en terapia

antimicrobiana, mostrándose aún más insensibles a tazobactam que a sulbactam o ácido clavulánico.

Tabla 32.- Antibiograma de los aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productores de BLEE seleccionados para este estudio.

Antimicrobianos			CMI ¹ (µg/mL)	
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
			CUN E20	CUN K2
β-lactámicos	Penicilinas	Amoxicilina	>512 (R ²)	>512 (R)
		Ampicilina	>512 (R)	>512 (R)
		Ticarcilina	>512 (R)	>512 (R)
		Piperacilina	256 (R)	>512 (R)
Péptidos antimicrobianos	PMBN ³		512	>512
		Colistina	0,25	0,25
		PMB ⁴	0,25	0,25
Inhibidores	BLEE ⁵	Sulbactam	64	32
		Tazobactam	256	512
		Ácido clavulánico	32	32

¹: Concentración Mínima Inhibitoria. ²: Resistente según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). ³: Polimixina B Nonapéptido. ⁴: Polimixina B. ⁵: B-lactamasas de espectro extendido.

3.2. Evaluación de la potenciación de inhibidores de β-lactamasas sobre enterobacterias productoras de BLEE

Para evaluar si la resistencia basada en la producción de BLEE podía ser neutralizada por la acción permeabilizante de un péptido antimicrobiano, se investigó si la CMI de una combinación β-lactámico/inhibidor de BLEE se reducía en presencia del péptido antimicrobiano a concentración subinhibitoria. Estos ensayos se realizaron sobre células planctónicas de las enterobacterias productoras de BLEE y en ellos se empleó PMBN como modelo de péptido permeabilizante. Como combinaciones β-lactámico/inhibidor, se seleccionaron cuatro de las más usadas en terapia antimicrobiana frente a gramnegativos: piperacilina/tazobactam, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico y ticarcilina/ácido clavulánico. Dado que los cuatro antibióticos β-lactámicos empleados son sustratos de BLEEs, se esperaba que este experimento permitiera detectar una posible saturación de la enzima hidrolítica debida a la entrada masiva del inhibidor y del β-lactámico al interior de la célula.

Como se muestra en las Tablas 33 y 34, PMBN no actuó en sinergia con ampicilina, amoxicilina y ticarcilina en ausencia de inhibidores de β-lactamasas, y sólo sobre la cepa de *E. coli*, mostró una modesta capacidad potenciadora de piperacilina en ausencia de tazobactam. Este resultado contrasta con la capacidad que mostró PMBN para potenciar a piperacilina, ticarcilina y ceftazidima en los ensayos equivalentes sobre *P. aeruginosa* (Tablas 17, 18, 19, 23A). Otra importante diferencia

observada entre estos dos grupos de experimentos fue la ausencia del “efecto rebote” (pérdida de capacidad potenciadora a alta concentración) de PMBN sobre enterobacterias. Como se mencionó anteriormente, este fenómeno se detectó con frecuencia en los ensayos equivalentes sobre *P. aeruginosa* y aparecía a concentraciones iguales o superiores a 4 µg/mL del péptido.

En todas las combinaciones analizadas y tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae* se observó una significativa potenciación de la actividad antimicrobiana dependiente de la presencia del inhibidor. Además, dicha potenciación guardó una buena correlación con la concentración de PMBN. Esto se tradujo en que se detectó sinergia prácticamente a todas las concentraciones de PMBN empleadas. Por el contrario, los ICIF de las combinaciones dobles (péptido/antibiótico o inhibidor/antibiótico) no fueron indicativos de sinergia, salvo en tres casos de las 24 combinaciones dobles posibles (Anexo 1). El mayor nivel de potenciación se observó en el caso de la piperacilina/tazobactam, cuya MIC disminuyó desde 256 a 1 µg/mL (*E. coli*; 256 veces), o bien desde >512 a 16 µg/mL (*K. pneumoniae*; 64 veces, al menos) en presencia de PMBN.

Tabla 33.- Capacidad de PMBN para sensibilizar a la cepa productora de BLEE, *Escherichia coli* CUN E20, a combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas.

PMBN ¹ ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ² Ampicilina ³ ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor		ICIF ⁴	CMI Amoxicilina ⁵ ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor		ICIF	CMI Ticarcilina ⁶ ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor		ICIF	CMI Piperacilina ⁷ ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor		ICIF
	0	Sulbactam ⁸ (4 $\mu\text{g/mL}$)		0	Ácido clavulánico ⁹ (4 $\mu\text{g/mL}$)		0	Ácido clavulánico (4 $\mu\text{g/mL}$)		0	Tazobactam ¹⁰ (4 $\mu\text{g/mL}$)	
	0	>512	256		>512	128		>512	128		256	32
1	>512	>256	0,63	>512	128	0,25	>512	128	0,25	128	32	0,13
2	>512	256	0,38	>512	64	0,19	>512	128	0,25	64	8	0,04
4	>512	128	0,25	>512	64	0,19	>512	32	0,16	64	4	0,03
8	>512	128	0,26	512	32	0,16	>512	16	0,15	64	2	0,02
16	>512	64	0,20	512	16	0,16	512	8	0,15	64	1	0,03

¹: CMI PMBN >512 $\mu\text{g/mL}$. ²: Concentración mínima inhibitoria. ³: CMI Ampicilina > 512 $\mu\text{g/mL}$. ⁴: Índice de concentración inhibitoria fraccionada. ⁵: CMI Amoxicilina > 512 $\mu\text{g/mL}$. ⁶: CMI Ticarcilina > 512 $\mu\text{g/mL}$. ⁷: CMI Piperacilina = 256 $\mu\text{g/mL}$. ⁸: CMI Sulbactam = 32 $\mu\text{g/mL}$. ⁹: CMI Ácido clavulánico = 32 $\mu\text{g/mL}$. ¹⁰: CMI Tazobactam = 512 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 34.- Capacidad de PMBN para sensibilizar a la cepa productora de BLEE, *Klebsiella pneumoniae* CUN K2, a combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas.

PMBN ¹ ($\mu\text{g/mL}$)	CMI ² Ampicilina ³ ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor		ICIF ⁴	CMI Amoxicilina ⁵ ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor		ICIF	CMI Ticarcilina ⁶ ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor		ICIF	CMI Piperacilina ⁷ ($\mu\text{g/mL}$) en presencia de la cantidad indicada de inhibidor		ICIF
	0	Sulbactam ⁸ (16 $\mu\text{g/mL}$)		0	Ácido clavulánico ⁹ (4 $\mu\text{g/mL}$)		0	Ácido clavulánico (4 $\mu\text{g/mL}$)		0	Tazobactam ¹⁰ (2 $\mu\text{g/mL}$)	
	0	>512	>512		>512	128		>512	512		>512	512
1	>512	512	0,75	>512	64	0,19	>512	64	0,19	>512	512	0,51
2	>512	256	0,50	>512	64	0,19	>512	64	0,19	>512	512	0,51
4	>512	128	0,38	>512	64	0,20	>512	64	0,20	>512	256	0,27
8	>512	64	0,33	>512	32	0,17	>512	32	0,17	>512	256	0,27
16	>512	16	0,30	>512	16	0,17	>512	16	0,17	>512	16	0,05

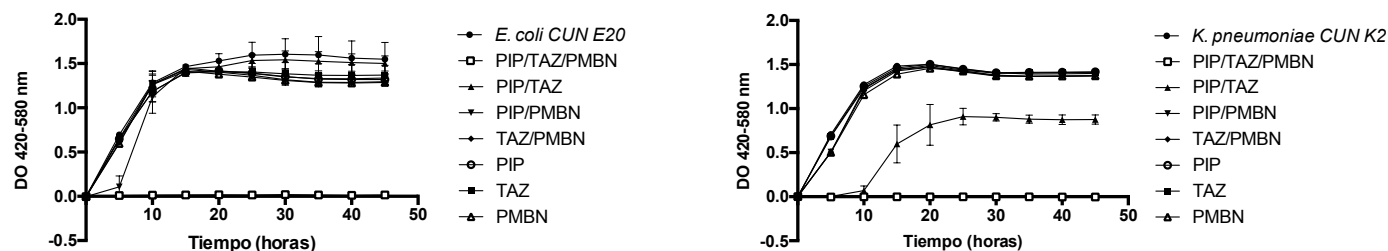
¹: CMI PMBN = 512 $\mu\text{g/mL}$. ²: Concentración mínima inhibitoria. ³: CMI Ampicilina > 512 $\mu\text{g/mL}$. ⁴: Índice de concentración inhibitoria fraccionada. ⁵: CMI Amoxicilina > 512 $\mu\text{g/mL}$. ⁶: CMI Ticarcilina > 512 $\mu\text{g/mL}$. ⁷: CMI Piperacilina > 512 $\mu\text{g/mL}$. ⁸: CMI Sulbactam = 64 $\mu\text{g/mL}$. ⁹: CMI Ácido clavulánico = 32 $\mu\text{g/mL}$. ¹⁰: CMI Tazobactam = 256 $\mu\text{g/mL}$.

3.3. Cinética de crecimiento de enterobacterias productoras de BLEE sometidas a potenciación de inhibidores de β -lactamasas

Dado que la combinación potenciada con más eficacia por PMBN en ambas enterobacterias fue la de piperacilina/tazobactam, se realizaron ensayos de cinética de crecimiento en presencia de esta combinación empleando el Bioscreen C. Para estos experimentos, se seleccionaron las combinaciones con ICIF más baja, que en el caso de *Escherichia coli* CUN E20 resultó ser piperacilina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/tazobactam (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/PMBN (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que para *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 fue piperacilina (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/tazobactam (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/PMBN (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como controles, se incluyeron cultivos de las enterobacterias sin tratar, así como cultivos tratados con los antimicrobianos por separado o con éstos combinados dos a dos a la concentración empleada en la combinación triple.

Como se observa en la Figura 27A, las combinaciones seleccionadas inhibieron completamente el crecimiento de las enterobacterias y dicha inhibición persistió durante todo el tiempo de monitorización (48h). Por el contrario, todas las combinaciones dobles de antimicrobianos ajustadas a la concentración presente en la combinación triple tuvieron un efecto inhibitorio nulo sobre el crecimiento de *E. coli*. Este hecho se puso aún más de manifiesto al calcular el área bajo la curva de crecimiento de cada tratamiento (Figura 27B). En el caso de *K. pneumoniae* CUN K2 sólo la combinación Piperacilina (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/Tazobactam (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/PMBN (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue capaz de inhibir totalmente el crecimiento (Figura 27B). La combinación doble Piperacilina (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)/Tazobactam (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) retrasó el crecimiento de *K. pneumoniae* CUN K2 durante 10 h, sin embargo, el análisis estadístico del área bajo la curva a las 45 horas determinó que ese retraso no era significativo.

A: Cinética de crecimiento



B: Área bajo la curva

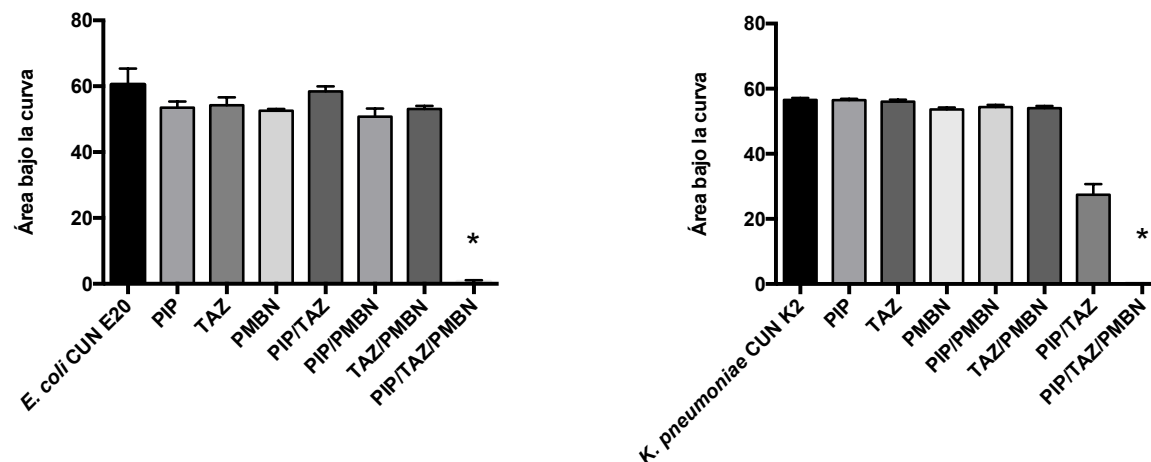


Figura 27.- Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (Bioscreen) de dos enterobacterias productoras de BLEE sometidas a potenciación de inhibidores de β -lactamasas: (A) Se muestra el seguimiento en el tiempo de la densidad óptica de cultivos en presencia de las combinaciones de antimicrobianos indicadas. *Escherichia coli* CUN E20 (figura de la izquierda; PIP: piperacilina (2 μ g/mL); TAZ: tazobactam (4 μ g/mL); PMBN (8 μ g/mL)) o *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 (figura de la derecha; PIP: piperacilina (16 μ g/mL); TAZ: tazobactam (2 μ g/mL); PMBN (16 μ g/mL)). El inóculo y el medio de cultivo (MHCA) fueron idénticos a los empleados para la determinación de la CMI. (B) Área bajo la curva determinada a las 45 h del comienzo del cultivo y estadística del ensayo de turbidimetría en *Escherichia coli* CUN E20 (izquierda) o *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 (derecha). Se realizaron tres experimentos independientes en los que se incluyeron triplicados. Los resultados se analizaron mediante Kruskal Wallis con comparaciones múltiples y la estadística fue muy significativa **($p < 0,01$) o significativa *($p < 0,05$), en comparación con el control de crecimiento de la bacteria.

3.4. Evaluación de la potenciación de inhibidores de β -lactamasas sobre *biofilms* de *Klebsiella pneumoniae* cultivado en CDC reactor

A continuación, se investigó si la demostrada capacidad de PMBN para potenciar a la combinación piperacilina/tazobactam en células planctónicas de *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 mantenía su eficacia sobre *biofilms* de la misma cepa. Dada la elevada variabilidad de la metodología en microplaca, se decidió llevar a cabo estos ensayos en CDC reactor.

Como se muestra en la Figura 28, la cepa de *Klebsiella pneumoniae* empleada en este ensayo formó *biofilms* mucho menos densos (1×10^6 UFC/ cm²) que los de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 (1×10^{12} UFC/ cm²) en las mismas condiciones. Este hecho probablemente disminuyó el poder discriminativo de estos experimentos. Como en ocasiones anteriores, la terapia experimental se ajustó a 50 veces su CMI planctónica (50x (piperacilina (16 μ g/mL)/tazobactam (2 μ g/mL)/PMBN (16 μ g/mL)) y se empleó como solución *buffer* fosfato. Para intentar imitar la metodología empleada en sellado antibiótico, los discos con *biofilm* se trataron durante 72 h, con cambio de medio cada 24 h. Además de los controles empleados en ensayos anteriores con CDC reactor, se incluyó también colistina (PME; 0,25 μ g/mL) y PMB (0,25 μ g/mL), ambos a 50 veces su CMI planctónica.

El único tratamiento que disminuyó la viabilidad de manera estadísticamente significativa fue el control de actividad bactericida (hipoclorito 1000 μ g/mL; 6 logaritmos de reducción logarítmica). No obstante, la terapia triple en estudio piperacilina/tazobactam/PMBN y la combinación doble tazobactam/PMBN (resultados no mostrados) mostraron una buena capacidad bactericida, reduciendo 5 y 4 logaritmos, respectivamente, la viabilidad bacteriana. (Figura 28). Por último, PMB quedó al mismo nivel que la combinación triple, mientras que colistina mostró una actividad frente al *biofilm* inferior.

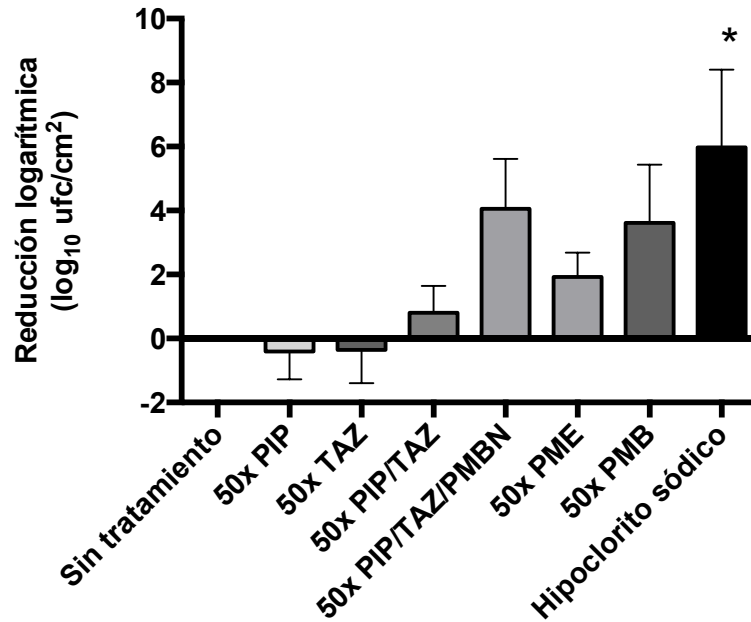


Figura 28.- Actividad bactericida en *buffer* fosfato durante 72 h de combinaciones de antimicrobianos sobre *biofilms* de *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 cultivados en el reactor CDC en condiciones de flujo turbulento. Tras el cultivo, los discos con los *biofilms* se extrajeron y se expusieron a las concentraciones indicadas (respecto a la CMI planctónica) en *buffer* fosfato durante 72h con cambio de medio cada 24h. A continuación, las células se despegaron con medios mecánicos y con ultrasonidos y se calculó la reducción logarítmica del número de bacterias viables PIP: piperacilina (16 µg/mL); TAZ: tazobactam (2 µg/mL); PMBN (16 µg/mL); PME: colistina (0,25 µg/mL); PMB: Polimixina B (0,25 µg/mL). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de un criterio con contrastes de Tukey y las diferencias estadísticas fue significativas (*; p<0,05), comparando con el control no tratado.

4. Potenciación de inhibidores de bombas de expulsión activa mediante péptidos antimicrobianos en *Pseudomonas aeruginosa* con sobreexpresión de la bomba MexAB-OprM.

4.1. Selección de antibióticos y cepas

Para evaluar si la acción permeabilizante de un péptido antimicrobiano puede potenciar la actividad de inhibidores de bombas de expulsión y neutralizar este mecanismo de resistencia, primero se seleccionaron cepas de *P. aeruginosa* con sobreexpresión de bombas de expulsión. Concretamente, como representante de este sistema de expulsión, se eligió la bomba MexAB-OprM, ya que su sobreexpresión confiere a *P. aeruginosa* el espectro de resistencia antibiótica más amplio (Van Bambeke et al. 2006; Poole 2011).

Como aislamiento clínico, se incluyó en este estudio la cepa *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 (Sánchez-Gómez 2008; Sánchez-Gómez et al. 2011), pues su perfil de susceptibilidad antibiótica era compatible con una sobreexpresión de MexAB-OprM. Como controles, se seleccionaron los mutantes LC1-6 (derivado de la cepa salvaje PAO1 con hiperexpresión de *mexAB*) (Conejo et al. 2003) y K1119 (derivado de PAO1 con *mexAB* deletado) (Li et al. 1998). Para caracterizar estas cepas, se determinó la CMI de varios antibióticos que habían sido previamente descritos como sustratos de la bomba MexAB-OprM (Van Bambeke et al. 2006). Estos compuestos fueron los siguientes: (i) penicilinas: piperacilina, amoxicilina, ampicilina y ticarcilina, (ii) cefalosporinas de tercera generación: ceftazidima, (iii) monobactams: aztreonam, (iv) macrólidos: azitromicina y eritromicina, (v) tetraciclinas: doxiciclina, tetraciclina y (vi) quinolonas: ciprofloxacino, levofloxacino y ofloxacino. Además, se investigó la susceptibilidad de estas cepas al péptido permeabilizante PMBN y a dos inhibidores experimentales de bombas de expulsión, 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) y L-Phe-L-Arg- β -naphthylamide dihidrocloruro (PA β N).

Tabla 35.- Antibiograma de un aislamiento clínico y de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de constitución genética conocida.

Antimicrobianos			CMI ¹ (µg/mL)			
			4158-02 Ps4	LC1-6	PAO1	K1119
β-lactámicos	Penicilinas	Piperacilina	256 (R ²)	16 (S ³)	4 (S)	0,125 (S)
		Amoxicilina	>512	>512	>512	>512
		Ampicilina	>512	>512	>512	>512
		Ticarcilina	256 (R)	128 (R)	16 (S)	≤1 (S)
	Cefalosporinas	Ceftazidima	64 (R)	4 (S)	2 (S)	4 (S)
	Monobactames	Aztreonam	16 (I ⁴)	32 (R)	32 (R)	≤1 (S)
Macrólidos		Azitromicina	128	128	128	8
		Eritromicina	256	256	128	32
Tetraciclinas		Doxiciclina	64	64	8	≤1
		Tetraciclina	64	32	8	≤1
Quinolonas		Levofloxacino	16(R)	2 (S)	0,25 (S)	0,12 (S)
		Ofloxacino	16 (R)	4 (I)	1 (S)	0,5 (S)
		Ciprofloxacino	4 (R)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)
Péptidos antimicrobianos		PMBN ⁵	>512	>512	>512	128
Inhibidores	Bombas efflux	NMP ⁶	128	64	128	64
		PAβN ⁷	>512	>512	>512	>512

¹: Concentración mínima inhibitoria. ²: Resistente según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). ³: Sensible según el CLSI. ⁴: Intermedio según el CLSI. ⁵: Nonapéptido de la Polimixina B. ⁶: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine. ⁷: L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide dihidrocloruro.

Como se muestra en la Tabla 35, las cepas de constitución genética conocida se podían ordenar de mayor a menor resistencia a la mayoría de antibióticos de la siguiente manera: LC1-6>PAO1>K1119, lo que es coherente con sus niveles de expresión de MexAB-OprM. Por otra parte, de acuerdo con su perfil de susceptibilidad, la cepa a la que se asemejó más el del aislamiento clínico CUN 4158-02 Ps4 fue el mutante que sobreexpresaba *mexAB*, LC1-6. Finalmente, todas las cepas se mostraron muy resistentes al péptido PMBN y a los inhibidores de bombas de expulsión, en especial al compuesto PAβN. Como representantes de las distintas clases de antibióticos, para los estudios posteriores, se seleccionaron los siguientes compuestos: piperacilina, ceftazidima, aztreonam, azitromicina, doxiciclina y levofloxacino ((Masuda et al. 2000b)).

Para confirmar a nivel molecular la sobreexpresión de *mexAB* en el aislamiento clínico CUN 4158-02 Ps4, se cuantificó en esta cepa la expresión del gen *mexB* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). De acuerdo con los criterios establecidos por otros autores (Cabot et al. 2011), se consideró que existía hiperexpresión de *mexAB* cuando se detectaba un aumento de al menos 3 veces en

los niveles de expresión de este gen respecto a los niveles medidos en la cepa de referencia PAO1. Como se observa en la Figura 29, se confirmó que tanto *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 como LC1-6 hiperexpresaban *mexB*, si bien los niveles de expresión en el mutante eran marcadamente superiores a los del aislamiento clínico.

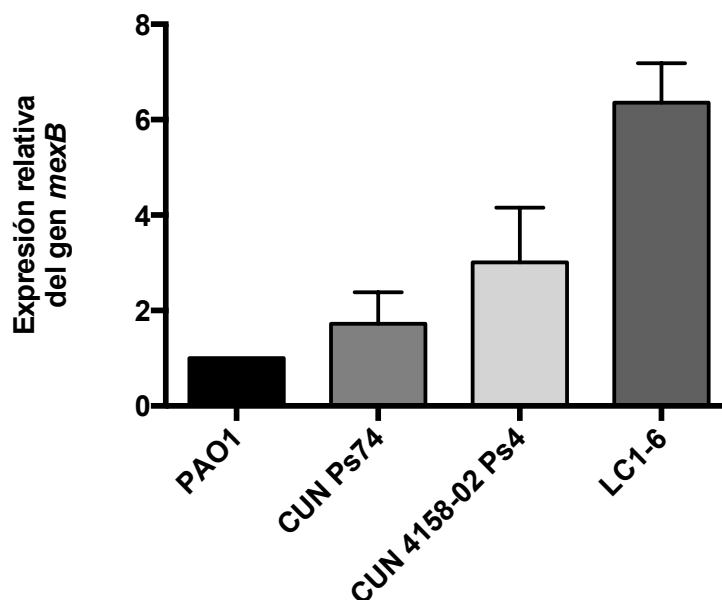


Figura 29.- Expresión relativa del gen *mexB* en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en estudio respecto de los niveles medidos en la cepa de referencia PAO1. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-qPCR en tres experimentos independientes realizados por triplicado

Dado que se deseaba estudiar la eficacia de la potenciación de inhibidores de bombas de expulsión también sobre bacterias formadoras de *biofilm*, era necesario investigar si las cepas seleccionadas poseían esta capacidad. De las dos cepas que hiperexpresaban *mexB*, *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 y LC1-6, sólo la primera de ellas mostró una significativa capacidad adherente (Tabla 36). Por tanto, se seleccionó esta cepa, ya que permitiría estudiar la terapia en estudio tanto en células en fase planctónica, como en *biofilms*. Además, se decidió emplear el mutante *P. aeruginosa* LC1-6 -cuyo único mecanismo adquirido es la sobreexpresión de la bomba MexAB-OprM-, para hacer el cribado inicial de las combinaciones antibiótico/inhibidor/péptido. Se tomó esta decisión también porque, si la estrategia terapéutica funcionaba en el mutante, también debería hacerlo en el aislamiento clínico, puesto que los niveles de expresión de *mexAB* en el primero eran superiores a los del segundo.

Tabla 36.- Clasificación de la capacidad formadora de *biofilm* de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de este estudio.

Cepa	Adherencia
4158-02 Ps4	Fuerte
LC1-6	Débil
K1119	Fuerte
PAO1	Moderada

Para clasificar a las cepas se calculó la densidad óptica de corte ($DO_c = 3 \times$ Desviación estándar del control negativo + DO_{media} del control negativo) y se las clasificó según lo descrito (Stepanović et al. 2000) $DO \leq DO_c$ No adherente, $DO_c \leq DO \leq 2 \times DO_c$ Adherente débil, $2 \times DO_c \leq DO \leq 4 \times DO_c$ Adherente Moderado, $4 \times DO_c \leq DO$ Adherente fuerte.

4.2. Cribado de combinaciones sobre el mutante *Pseudomonas aeruginosa* LC1-6.

Para evaluar si la acción permeabilizante de PMBN puede potenciar a inhibidores de bombas de expulsión y neutralizar la hiperexpresión de MexAB-OprM en el mutante LC1-6, se evaluó la actividad sinérgica del péptido sobre combinaciones de inhibidores (NMP o PA β N) y los antibióticos sustrato de MexAB-OprM seleccionados anteriormente.

Como se observa en la Tabla 37, en ausencia de PMBN, ni siquiera las concentraciones más elevadas de inhibidores fueron capaces de sensibilizar a la cepa LC1-6 a los antibióticos sustrato de MexAB-OprM. La única excepción fue la reducción de 4-8 veces de la CMI del mutante a ceftazidima y doxiciclina en presencia de la concentración más alta del inhibidor PA β N (Tabla 37B). Por el contrario, la adición de tan sólo 1 μ g/mL del agente permeabilizante, bastó para potenciar 1066 veces la combinación doxiciclina/PA β N (de 64 μ g/mL a 0,06 μ g/mL), 266 veces la combinación ceftazidima/PA β N (de 4 μ g/mL a 0,015 μ g/mL), o el mismo número de veces la combinación piperacilina/PA β N (de 16 μ g/mL a 0,06 μ g/mL). Sin embargo, el máximo nivel de potenciación se alcanzó con la combinación azitromicina/PA β N (85.300 veces; de 256 μ g/mL a 0,003 μ g/mL) Tabla 37B. En concordancia con estos datos, los índices CIF mínimos de algunas de estas combinaciones fueron los más bajos observados en el presente trabajo (0,002).

La actividad del inhibidor NMP en combinación con antibióticos también resultó potenciada por el péptido PMBN (Tabla 37A), pero en menor medida que cuando se usó PA β N. Así, la máxima potenciación alcanzada con NMP fue de 2048 veces en el caso de azitromicina (de >256 μ g/mL a 0,25 μ g/mL; ICIF 0,03), siendo la actividad sinérgica muy inferior a ésta en las combinaciones con el resto de antibióticos. El único antibiótico con el que NMP no actuó sinérgicamente fue aztreonam (ICIF=0,5).

De manera similar a la pérdida de actividad que se observó al usar PMBN a alta concentración (“efecto rebote”) en algunos ensayos anteriores, también el inhibidor

PA β N disminuyó su eficacia a concentraciones superiores o iguales a 4-8 μ g/mL en estos experimentos (Tabla 37B). Por el contrario, este fenómeno no se observó al emplear NMP como inhibidor (Tabla 37A).

Tabla 37.- Capacidad de PMBN para sensibilizar al mutante hiperproductor de la bomba MexAB-OprM, *P. aeruginosa* LC1-6, a combinaciones de antibióticos sustrato de MexAB-OprM e inhibidores de sistemas de expulsión (NMP o PAβN).

A: NMP

NMP ¹ (µg/mL)	CMI ² Aztreonam ³ (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN ⁴		ICIF ⁵	CMI Ceftazidima ⁶ (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF	CMI Doxiciclina ⁷ (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF	CMI Levofloxacino ⁸ (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF	CMI Piperacilina ⁹ (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF	CMI Azitromicina ¹⁰ (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF
	0	1 µg/mL		0	1 µg/mL		0	1 µg/mL		0	1 µg/mL		0	1 µg/mL		0	1 µg/mL	
0	32	16		4	4		64	1		2	0,25		16	16		128	1	
1	nd ¹¹	nd	nd	8	2	0,52	64	1	0,03	2	0,25	0,14	16	16	1,02	>256	0,5	0,02
2	16	16	0,53	4	2	0,53	>64	1	0,05	2	0,25	0,16	16	16	1,03	>256	0,25	0,03
4	16	16	0,56	4	2	0,56	64	0,5	0,07	2	0,12	0,12	16	16	1,06	>256	0,25	0,07
8	16	16	0,63	4	1	0,38	32	0,5	0,13	2	0,12	0,19	32	8	0,63	>256	0,5	0,13
16	16	8	0,50	4	0,5	0,38	64	0,5	0,26	2	0,12	0,31	16	4	0,50	>256	1	0,26
32	nd	0,12	0,50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

B: PAβN

PAβN ¹² (µg/mL)	CMI Aztreonam (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF	CMI Ceftazidima (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF	CMI Doxiciclina (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF	CMI Levofloxacino (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF	CMI Piperacilina (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF	CMI Azitromicina (µg/mL) en presencia de la cantidad indicada de PMBN		ICIF
	0	1 µg/mL		0	1 µg/mL		0	1 µg/mL		0	1 µg/mL		0	1 µg/mL		0	1 µg/mL	
0	32	16		4	4		64	1		2	0,25		16	16		128	1	
1	nd	nd	nd	4	0,25	0,064	64	0,12	0,004	2	0,06	0,032	16	4	0,252	256	0,06	0,002
2	16	16	0,50	4	0,015	0,007	64	0,06	0,004	2	0,007	0,006	16	0,06	0,007	256	0,003	0,003
4	16	2	0,07	4	0,015	0,009	64	0,06	0,006	2	0,015	0,012	16	0,5	0,036	256	0,007	0,005
8	16	4	0,13	4	0,12	0,039	64	0,12	0,011	2	0,03	0,024	16	4	0,259	256	0,25	0,011
16	16	4	0,14	1	0,5	0,142	8	0,5	0,024	1	0,06	0,047	16	8	0,517	128	1	0,024
32	nd	2	0,09	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

¹: CMI_{NMP} = 64 µg/mL. ²: Concentración mínima inhibitoria. ³: CMI_{Aztreonam} = 32 µg/mL. ⁴: CMI_{PMBN} > 512 µg/mL. ⁵: Índice de concentración inhibitoria fraccionada. ⁶: CMI_{Ceftazidima} = 4 µg/mL. ⁷: CMI_{Doxiciclina} = 64 µg/mL. ⁸: CMI_{Levofloxacino} = 2 µg/mL. ⁹: CMI_{Piperacilina} = 16 µg/mL. ¹⁰: CMI_{Azitromicina} = 128 µg/mL. ¹¹: no determinado. ¹²: CMI_{PAβN} > 512 µg/mL.

4.3. Confirmación de la eficacia de la terapia sobre *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4

Dado que LC1-6 no formaba *biofilms*, hubo que recurrir a la cepa *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 para confirmar la eficacia de la exposición a estas combinaciones en este tipo de estructuras. Es importante destacar que la presencia de otros mecanismos de resistencia antibiótica en esta cepa -como la hiperproducción de AmpC- podría interferir con los resultados que se presentan. No obstante, sería de esperar que tal interferencia actuase dificultando la eficacia de la terapia más que facilitándola. Para estos estudios sobre el aislamiento clínico, se seleccionaron las combinaciones que habían resultado más potentes sobre LC1-6, es decir, azitromicina/PAβN/PMBN, doxiciclina/PAβN/PMBN, ceftazidima/PAβN/PMBN y piperacilina/PAβN/PMBN.

En ausencia del péptido permeabilizante, se necesitó la concentración más alta de inhibidor (16 µg/mL) para la potenciación de dos de los antibióticos (azitromicina y doxiciclina), aunque este mecanismo no fue capaz de reducir la CMI por debajo de 32 y 4 µg/mL, respectivamente. Por el contrario, la adición de 1 µg/mL de PMBN potenció 512 veces y 128 veces la capacidad antimicrobiana de las combinaciones azitromicina/PAβN (de 128 a 0,25 µg/mL) y doxiciclina/PAβN (de 64 a 0,5 µg/mL), respectivamente. La potenciación obtenida en el caso de los β-lactámicos ceftazidima y piperacilina fue de un rango inferior (sólo de 8 veces en ambos casos), lo que probablemente se debe a la actividad β-lactamasa expresada por la cepa CUN 4158-02 Ps4. Aunque, todas las combinaciones evaluadas resultaron sinérgicas también en esta cepa, los índices ICIF obtenidos fueron un orden de magnitud superiores a los observados en LC1-6 (0,01 frente a 0,002; Tabla 38).

Tabla 38.- Capacidad de PMBN para sensibilizar al aislamiento clínico hiperproductor de la bomba MexAB-OprM, *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4, a combinaciones de antibióticos sustrato de MexAB-OprM y al inhibidor del sistema de expulsión PAβN.

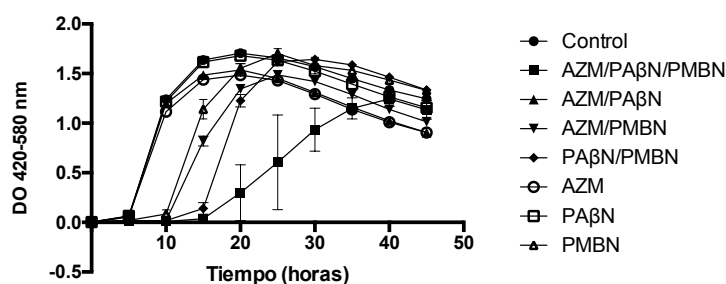
PAβN ¹ (µg/mL)	CMI ² Azitromicina ³ (µg/mL) en presencia o ausencia de otros antimicrobianos			CMI Ceftazidima ⁵ (µg/mL) en presencia o ausencia de otros antimicrobianos			CMI Piperacilina ⁶ (µg/mL) en presencia o ausencia de otros antimicrobianos			CMI Doxiciclina ⁷ (µg/mL) en presencia o ausencia de otros antimicrobianos		
			ICIF ⁴			ICIF			ICIF			ICIF
	0	PMBN ⁸ (1 µg/mL)		0	PMBN (1 µg/mL)		0	PMBN (1 µg/mL)		0	PMBN (1 µg/mL)	
0	128	64		64	32		256	128		64	32	
1	256	64	0,50	64	32	0,50	256	128	0,50	64	16	0,25
2	256	32	0,25	64	32	0,50	256	128	0,50	64	8	0,13
4	128	0,25	0,01	64	8	0,13	256	32	0,13	64	0,5	0,01
8	256	0,25	0,01	64	4	0,07	256	64	0,26	32	1	0,02
16	32	1	0,02	64	16	0,27	256	128	0,52	4	1	0,03

¹: CMI_{PAβN} >512 µg/mL. ²: CMI_{Azitromicina} = 128 µg/mL. ³: Índice de concentración inhibitoria fraccionada. ⁴: CMI_{Ceftazidima} = 64 µg/mL. ⁵: CMI_{Piperacilina} = 256 µg/mL. ⁶: CMI_{PMBN} >512 µg/mL. ⁷: CMI_{Doxiciclina} = 64 µg/mL.

4.4. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 sometido a potenciación de inhibidores de bombas de expulsión

Para discriminar la contribución de cada componente de la combinación al efecto potenciador observado, se realizaron ensayos de cinética de crecimiento en presencia de las combinaciones péptido/antibiótico/inhibidor. Para estos ensayos se seleccionó la combinación que mostró más eficacia en los estudios anteriores, azitromicina (0,25 µg/mL)/ PAβN (4 µg/mL)/PMBN (1 µg/mL). Como se muestra en la Figura 30, la combinación triple fue la única que inhibió completamente el crecimiento de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 hasta las 15 h. La eliminación de cualquier componente de esta combinación se tradujo en una significativa pérdida de la capacidad inhibitoria. En concordancia con esta observación, el cálculo del área bajo la curva reveló que sólo el tratamiento triple azitromicina/PAβN/PMBN inhibió de forma muy significativa (**(p<0,01) el crecimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4.

A: Cinética de crecimiento



B: Área bajo la curva

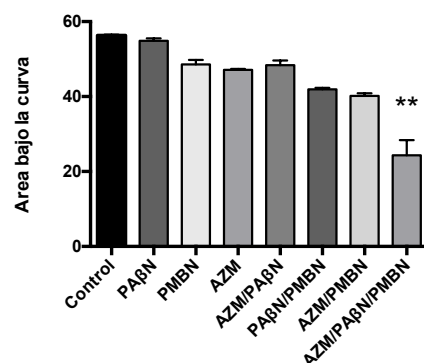


Figura 30.- **Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (Bioscreen) de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 sometida a potenciación de un inhibidor de la bomba de expulsión MexAB-OprM.** (A) Se muestra el seguimiento en el tiempo de la densidad óptica de cultivos en presencia de las combinaciones de antimicrobianos indicadas. El inóculo y el medio de cultivo (MHCA) fueron idénticos a los empleados para la determinación de la CMI. AZM: azitromicina (0,25 µg/mL); PAβN: L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide (4 µg/mL); PMBN (1 µg/mL). (B) Área bajo la curva determinada a las 45 h del comienzo del cultivo y estadística del ensayo de turbidimetría. Se realizaron tres experimentos independientes en los que se incluyeron triplicados. Los resultados se analizaron mediante Kruskal Wallis con comparaciones múltiples y las diferencias estadísticas fueron muy significativas (**; p<0,01) en comparación con el cultivo control no tratado.

4.5. Evaluación de la potenciación de inhibidores de bombas de expulsión sobre *biofilm* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 cultivado en CDC reactor

Como en ocasiones anteriores, la terapia experimental se ajustó a 50 veces su CMI planctónica (50x azitromicina (0,25 µg/mL)/ PAβN (4 µg/mL)/PMBN (1 µg/mL)) en *buffer* fosfato. También en este caso, los discos con *biofilm* de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 se trataron durante 72 h, con cambio de medio cada 24 h. Como se aprecia en la Figura 31, la terapia triple redujo la viabilidad bacteriana 7,5 logaritmos ($p < 0,05$), mientras que el control positivo de actividad bactericida (hipoclorito 1000 µg/mL) mostró una potencia superior. Por otra parte, los ensayos demostraron que la ausencia en la combinación triple de cualquiera de sus componentes disminuyó significativamente su eficacia frente al *biofilm*.

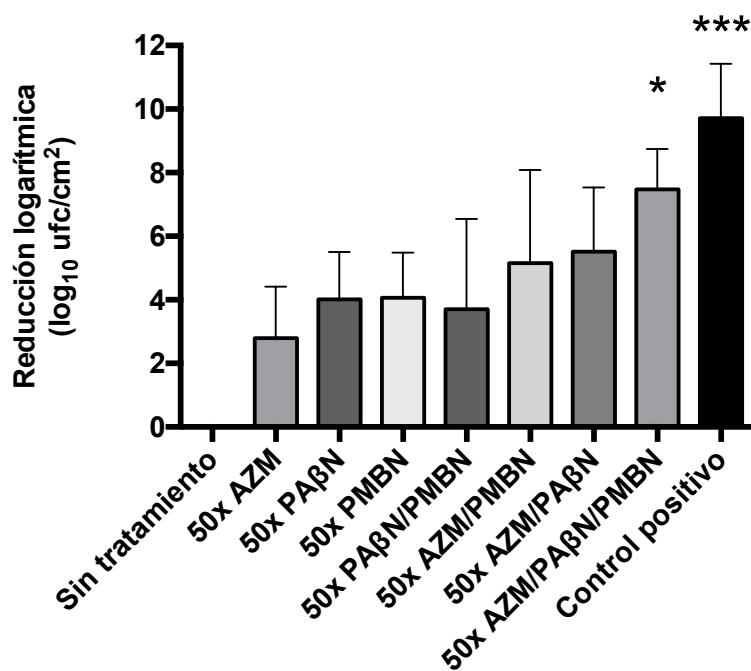


Figura 31.- Actividad bactericida en *buffer* fosfato durante 72 h de combinaciones de antimicrobianos sobre *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 cultivados en el reactor CDC bajo condiciones de flujo turbulento. Tras el cultivo, los discos con los *biofilms* se extrajeron y se expusieron a las concentraciones indicadas (respecto a la CMI planctónica) en *buffer* fosfato durante 72h con cambio de medio cada 24h. A continuación, las células se despegaron con medios mecánicos y con ultrasonidos y se calculó la reducción logarítmica del número de bacterias viables. AZM: azitromicina (0,25 µg/mL); PAβN: L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide (4 µg/mL); PMBN (1 µg/mL). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de un criterio con contrastes de Tukey y las diferencias estadísticas fueron altamente significativas (***) ($p < 0,001$) o significativas (*) ($p < 0,05$) en comparación con el control sin tratar.

5. Desarrollo de combinaciones de amplio espectro basadas en la potenciación de antibióticos mediante péptidos antimicrobianos

5.1. Selección de antibióticos y de cepas bacterianas

Uno de los desafíos más importantes a los que se enfrenta el tratamiento empírico es la elección de un tratamiento adecuado en ausencia de información sobre el microorganismo causante de una determinada infección. A menudo, el pronóstico de la enfermedad depende muchas veces de la correcta elección de esta terapia empírica y de su rápida administración al paciente. En este contexto, una terapia de amplio espectro ideal sería aquella que tuviera eficacia al administrarla no solo sobre patógenos gramnegativos y grampositivos, sino especialmente sobre cepas multiresistentes de ambos tipos bacterianos.

Durante el desarrollo de este trabajo, se observó con frecuencia la capacidad de PMBN para potenciar, no sólo inhibidores de bombas de expulsión y de β -lactamasas, sino de una gran variedad de antibióticos de distintas clases. Por ello, se planteó la posibilidad de poder desarrollar una terapia de amplio espectro eficaz en bacterias multiresistentes basada en la potenciación de vancomicina, daptomicina y levofloxacino mediante péptidos antimicrobianos.

El levofloxacino es un antibiótico de amplio espectro que es fundamentalmente eficaz frente a bacterias gramnegativas como *P. aeruginosa* pero inactivo sobre aproximadamente el 80% de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Daptomicina y vancomicina, por otro lado, son dos de los antibióticos más activos frente a grampositivos, sin embargo, debido a su gran tamaño, no pueden penetrar a través de la envoltura de los gramnegativos y por lo tanto resultan inactivos frente a ellos. Como cepas modelo de gramnegativos y de grampositivos, se seleccionaron los patógenos humanos multiresistentes *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 y dos cepas MRSA, respectivamente.

La Tabla 39 muestra el patrón de susceptibilidad de las cepas en estudio a estos antibióticos. Como se esperaba *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 resultó muy resistente a daptomicina y vancomicina (CMI > 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y sensible a colistina (CMI = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de acuerdo a los puntos de corte establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2011). Además, esta cepa presentó una CMI a levofloxacino de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que la clasifica como resistente. Finalmente y según lo esperado, las cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300 y CUN 3792 se mostraron sensibles a vancomicina y a daptomicina y resistentes a levofloxacino.

Tabla 39.- Perfil de susceptibilidad antibiótica de las cepas empleadas en este estudio, un aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* y dos cepas resistentes a metilicina de *Staphylococcus aureus*.

Antimicrobianos	CMI ¹ (µg/mL)			
	MRSA ATCC 43300	MRSA CUN 3792	<i>P. aeruginosa</i> CUN 4158 Ps4	
Péptidos antimicrobianos	Colistina	nd ²	nd	1 (S ³)
	PMBN ⁴	>512	>512	>512
	PMEN ⁵	nd	nd	>512
Quinolonas	Levofloxacino	>512 (R ⁶)	8 (R)	16 (R)
Lipopéptidos	Daptomicina ⁷	0,5 (S)	1 (S)	>512
Glicopéptidos	Vancomicina	1 (S)	1 (S)	>512

¹: Concentración mínima inhibitoria. ²: no determinado. ³: Sensible según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). ⁴: Nonapéptido de la Polimixina B. ⁵: Nonapéptido de la colistina. ⁶: Resistente según el CLSI. ⁷: En el caso del antibiótico daptomicina, el medio MHCA se suplementó con 25 mg/L de CaCl₂ más.

Como la cepa *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 presentó resistencia a los antibióticos vancomicina, daptomicina y levofloxacino, se seleccionaron estos compuestos para los experimentos de potenciación sobre esta cepa. Además, para los ensayos de sensibilización de grampositivos se seleccionó el levofloxacino.

5.2. Evaluación de la potenciación de antibióticos sobre *Pseudomonas aeruginosa* y MRSA por la acción de péptidos antimicrobianos.

Como se aprecia en la Tabla 40, la adición de PMBN a muy baja concentración (3-6 µg/mL, aproximadamente) potenció 80 veces la actividad de levofloxacino frente a *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4, permitiendo alcanzar una CMI de 0,1 µg/mL. Además, en esta misma cepa y a concentraciones similares, el péptido facilitó la acción de vancomicina y daptomicina, lo que se tradujo en una reducción de la CMI de 128 veces. Este fenómeno también se observó –sólo con vancomicina- cuando se empleó como péptido permeabilizante el derivado deacilado de la colistina (PMEN). En concordancia con estos resultados, en todos los casos se obtuvieron ICIFs muy bajos (≤0,02) indicativos de una eficaz actividad sinérgica. Una vez más, en este experimento se detectó una pérdida de actividad de los dos nonapéptidos (efecto “rebote”) cuando se adicionaron a concentraciones superiores a 3-6 µg/mL.

Tabla 40.- Capacidad de PMBN o de PMEN para sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 a distintas clases de antibióticos.

Péptido	Antibiótico	CMI ¹ del antibiótico a la concentración de péptido indicada (µg/mL)							ICIF ² mín
		0	1,56	3,13	6,25	12,50	25	50	
PMBN ³	Daptomicina ⁴	>512	>512	>512	8	8	16	64	0,01
	Levofloxacino	8	0,5	0,1	0,5	0,5	1	2	0,02
	Vancomicina	>512	>512	8	16	16	32	128	0,01
PMEN ⁵	Vancomicina	>512	>512	4	32	32	32	64	0,01

¹: Concentración mínima inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en medio MHCA. ²: Índice de concentración inhibitoria fraccionada mínima. ³: CMI > 512 µg/mL. ⁴: En el caso del antibiótico daptomicina, el medio MHCA se suplementó con 25 mg/L de CaCl₂. ⁵: CMI > 512 µg/mL.

Este mismo ensayo se realizó en otras dos cepas gramnegativas, *Escherichia coli* CUN E20 y *Klebsiella pneumoniae* CUN K2. Como se recoge en la Tabla 41, la combinación de PMBN con vancomicina fue sinérgica para las dos cepas mientras que el PMBN fue incapaz de potenciar al lipopéptido daptomicina.

Tabla 41.- Capacidad de PMBN para sensibilizar a *Escherichia coli* CUN E20 y *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 a distintas clases de antibióticos.

Cepa	Antibiótico	CMI ¹ del antibiótico a la concentración de PMBN ² indicada (µg/mL)							ICIF ³ mín
		0	1,56	3,13	6,25	12,50	25	50	
<i>E. coli</i> CUN E20	Daptomicina ⁴	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	1,00
	Vancomicina	>512	256	256	128	128	128	64	0,11
<i>K. pneumoniae</i> CUN K2	Daptomicina	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	1,00
	Vancomicina	>512	512	512	256	256	256	256	0,26

¹: Concentración mínima inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en medio MHCA. ²: CMI > 512 µg/mL en las dos cepas. ³: Índice de concentración inhibitoria fraccionada mínima. ⁴: En el caso del antibiótico daptomicina, el medio MHCA se suplementó con 25 mg/L de CaCl₂.

A la vista de la eficaz potenciación obtenida con los nonapéptidos de polimixina sobre una cepa multiresistente de *P. aeruginosa*, se decidió investigar si el antibiótico de uso clínico colistina, del que deriva el PMEN, poseía una acción similar. De ser así, se facilitaría la posible aplicación del fenómeno descrito en este estudio en terapia antimicrobiana. Las concentraciones subinhibitorias empleadas en este ensayo fueron más bajas de lo habitual, dado que la cepa CUN 4158-02 Ps4 era sensible a colistina. Como se muestra en la Tabla 42, la colistina resultó ser completamente incapaz de actuar en sinergia (ICIF > 0,5) con ninguno de los tres antibióticos seleccionados, ni siquiera a concentraciones próximas a la CMI del péptido (1 µg/mL).

Tabla 42.- Evaluación de la actividad sinérgica de la colistina en combinación con varios antibióticos sobre *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4.

Antibiótico	CMI ¹ del antibiótico a la concentración de colistina ² indicada (µg/mL)						ICIF ³ mín
	0	0,03	0,06	0,13	0,25	0,50	
Daptomicina ⁴	>512	>512	>512	>512	>512	>512	1,03
Levofloxacino	16	16	16	16	16	16	1,03
Vancomicina	>512	>512	>512	>512	>512	>512	1,03

¹: Concentración mínima inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en medio MHCA. ²: CMI_{Colistina} = 1 µg/mL. ³: Índice de concentración inhibitoria fraccionada mínima. ⁴: En el caso del antibiótico daptomicina, el medio MHCA se suplementó con 25 mg/L de CaCl₂.

Para investigar si PMBN era capaz de sensibilizar a *Staphylococcus aureus* a levofloxacino, se repitió el experimento mostrado en la Tabla 40 sobre las cepas MRSA ATCC 43300 y MRSA CUN 3792 de este patógeno humano. Como se observa en la Tabla 43, ni siquiera las concentraciones más altas del péptido (50 µg/mL) potenciaron la actividad de levofloxacino frente a estas dos cepas.

Los resultados mostrados en las Tablas 40 y 41 sugieren que una combinación vancomicina/PMBN, podría utilizarse como terapia de amplio espectro frente a gramnegativos y grampositivos. De hecho, los dos antibióticos empleados en estas combinaciones suelen ser eficaces por sí mismos frente a grampositivos, mientras que la presencia de PMBN en la combinación aseguraría la sensibilización de gramnegativos a vancomicina. Sin embargo, para que esta estrategia fuera teóricamente aplicable, quedaba por investigar si la presencia de PMBN interfería de alguna manera en la actividad antibiótica de daptomicina o vancomicina sobre grampositivos. Como se aprecia en la Tabla 43, la adición de PMBN no disminuyó ni aumentó la actividad de daptomicina ni de vancomicina, a pesar de las elevadas concentraciones empleadas del agente permeabilizante.

Tabla 43.- Evaluación de la actividad sinérgica de PMBN en combinación con distintas clases de antibióticos frente a dos cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA.

Cepa	Antibiótico	CMI ¹ del antibiótico a la concentración de PMBN ² indicada (µg/mL)							ICIF ³ mín
		0	1,56	3,13	6,25	12,50	25	50	
MRSA ATCC ⁴ 43300	Vancomicina	1	1	1	2	1	1	1	1,00
	Levofloxacino	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512	1,00
	Daptomicina	0,5	1	1	1	1	1	1	2,00
MRSA CUN ⁵ 3792	Vancomicina	1	1	1	1	1	1	1	1,00
	Levofloxacino	8	4	8	8	8	4	8	0,50
	Daptomicina	1	1	1	2	2	2	2	1,00

¹: Concentración mínima inhibitoria determinada mediante la técnica de microdilución en medio MHCA. ²: CMI_{PMBN} = 512 µg/mL en las dos cepas. ³: Índice de concentración inhibitoria fraccionada mínima. ⁴: American Type Culture Collection. ⁵: Clínica Universidad de Navarra.

5.3. Cinética de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 en presencia de combinaciones de PMBN y antibióticos

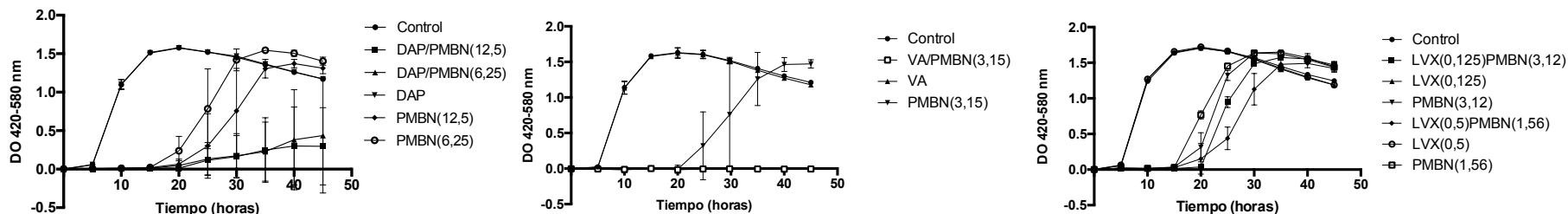
Como se comentó anteriormente, las combinaciones que habían resultado sinérgicas sobre *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 fueron vancomicina/PMBN, daptomicina/PMBN y levofloxacino/PMBN. Para investigar la contribución de los dos componentes de estas combinaciones al efecto potenciador observado, se realizaron ensayos de cinética de crecimiento en presencia de dichas combinaciones y de sus componentes por separado. Como se aprecia en el panel de la izquierda de la Figura 32A, las dos combinaciones dobles que contenían daptomicina (daptomicina (8

$\mu\text{g/mL}$)/PMBN (12,5 $\mu\text{g/mL}$) o daptomicina (8 $\mu\text{g/mL}$)/PMBN (6,25 $\mu\text{g/mL}$) fueron capaces de inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 mejor que ningún otro tratamiento. Cuando se eliminó el antibiótico o el péptido de la combinación, se perdió una buena parte del efecto inhibitorio observado. El cálculo del área bajo la curva demostró que las diferencias entre el tratamiento doble y el que contenía sólo daptomicina eran estadísticamente significativas (Figura 32B).

La combinación doble vancomicina (8 $\mu\text{g/mL}$)/PMBN (3,15 $\mu\text{g/mL}$), inhibió completamente el crecimiento de la cepa CUN 4158-02 Ps4 en comparación con la monoterapia a lo largo de las 45 horas del experimento (Figura 32A). El cálculo del área bajo la curva y el análisis estadístico demostraron que el tratamiento doble inhibía muy significativamente el crecimiento de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 (Figura 32B).

Finalmente, el efecto potenciador de PMBN sobre levofloxacino fue menos apreciable que en el caso de los antibióticos anteriores. De hecho, aunque las combinaciones dobles levofloxacino/PMBN retrasaron el crecimiento en comparación con el control no tratado y una de ellas resultó significativa Figura 32A, este efecto apenas se distinguió del producido por la monoterapia basada sólo en PMBN (Figura 32B)

A: Cinética de crecimiento



B: Área bajo la curva

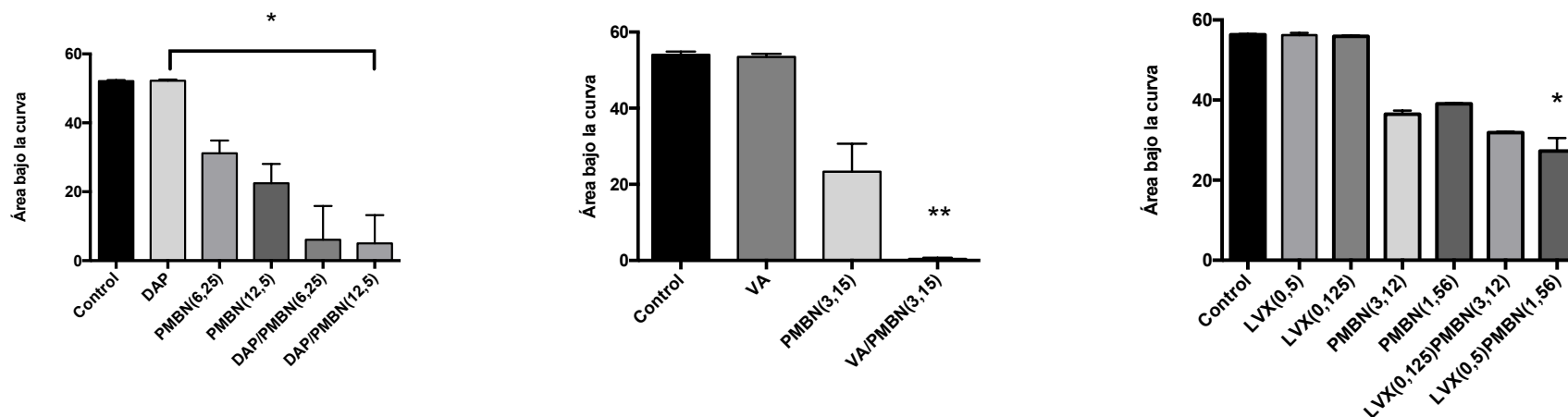


Figura 32.- **Cinética de crecimiento determinada por turbidimetría (Bioscreen) de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 en presencia de combinaciones de antimicrobianos.** (A) Se muestra el seguimiento en el tiempo de la densidad óptica de cultivos en presencia de las combinaciones indicadas a la concentración expresada en $\mu\text{g}/\text{mL}$. El inóculo y el medio de cultivo (MHCA) fueron idénticos a los empleados para la determinación de la CMI, aunque este medio se suplementó con 25 mg/L CaCl_2 en el ensayo con daptomicina. DAP: daptomicina (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$); VA: vancomicina (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$); LEV: levofloxacin. (B) Área bajo la curva determinada a las 45 h del comienzo del cultivo y estadística del ensayo de turbidimetría. Se realizaron tres experimentos independientes en los que se incluyeron triplicados. Los resultados se analizaron mediante Kruskal Wallis con comparaciones múltiples (*; $p < 0,05$).

5.4. Evaluación de la potenciación de antibióticos sobre *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* cultivados en el reactor CDC

La capacidad de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 para formar *biofilm* permitió estudiar si alguna de las combinaciones que habían mostrado eficacia frente a células planctónicas podía destruir *biofilms* bacterianos. Teóricamente, un tratamiento de este tipo podría poseer un amplio espectro de actividad frente a grampositivos y gramnegativos y encontrar aplicación en técnicas de sellado antibiótico.

Como en anteriores ensayos, los discos con *biofilm* de la cepa CUN 4158-02 Ps4, se expusieron a las combinaciones experimentales a 50 veces su CMI planctónica en *buffer* fosfato durante 72 h y con renovación de la solución antibiótica cada 24h. Como se aprecia en la Figura 33, el control positivo (hipoclorito) redujo la viabilidad bacteriana 9,76 logaritmos. Cuando se ensayaron combinaciones que contenían vancomicina (vancomicina (8 µg/mL)/PMBN (3,15 µg/mL)), daptomicina (daptomicina (8 µg/mL)/PMBN (6,25 µg/mL)) o levofloxacino (levofloxacino (0,5 µg/mL)/PMBN (1,56 µg/mL)) la reducción de viabilidad fue muy significativa ($p < 0,01$), alcanzándose una potencia bactericida equivalente a 7,6, 7,18 y 8,3 logaritmos respectivamente. El efecto de estas combinaciones fue similar al control positivo. El antimicrobiano PMBN (6,25 µg/mL) por separado obtuvo una eficacia bactericida significativa de 5,65 logaritmos (Figura 33). Los demás tratamientos no redujeron la viabilidad bacteriana significativamente.

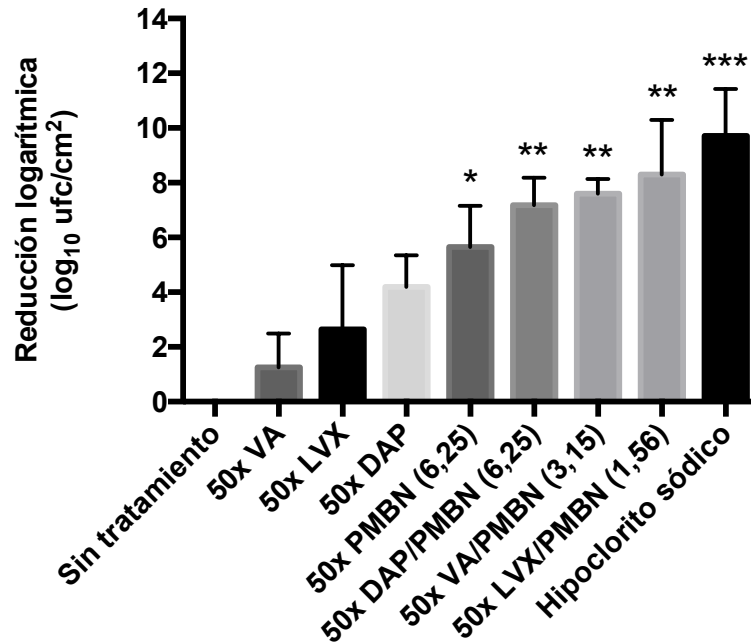


Figura 33.- Actividad bactericida en *buffer* fosfato durante 72 h de combinaciones de antimicrobianos sobre *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 cultivados en el reactor CDC en condiciones de flujo turbulento. Tras el cultivo, los discos con los *biofilms* se extrajeron y se expusieron a los antimicrobianos a las concentraciones indicadas (respecto a la CMI planctónica) en *buffer* fosfato durante 72h. A continuación, las células se despegaron con medios mecánicos y con ultrasonidos y se calculó la reducción logarítmica del número de bacterias viables. VA: vancomicina (8 µg/mL); DAP: daptomicina (8 µg/mL); LVX: levofloxacino (0,5 µg/mL). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de un criterio con contrastes de Tukey y las diferencias estadísticas fueron altamente significativas (***, p<0,001), muy significativas (**; p<0,01) o significativas (*; p<0,05) en comparación con el control sin tratar.

DISCUSIÓN



En el presente trabajo se ha demostrado por primera vez que un agente permeabilizante a concentración subinhibitoria es capaz de:

1. Sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* con hiperexpresión constitutiva de AmpC a una combinación de un betalactámico sustrato de esa enzima y un inhibidor de esa betalactamasa, siendo dicha combinación inactiva en ausencia de permeabilizante.

Es de destacar que el agente permeabilizante a menudo actuó en sinergia con el antibiótico (combinación doble), sin embargo, la capacidad potenciadora del péptido aumentó muy significativamente cuando se añadió el tercer componente (el inhibidor) a la combinación. Esto demuestra que la betalactamasa sigue siendo sensible al inhibidor y sugiere que el mecanismo de sensibilización depende de la inhibición de la enzima como consecuencia de la acción permeabilizante del péptido. De acuerdo con esta hipótesis, en ausencia del péptido, la concentración que el inhibidor alcanza en el periplasma no bastaría para neutralizar completamente la actividad de la betalactamasa. Por el contrario, la adición del péptido posibilitaría la entrada en la célula del inhibidor en cantidades suficientes para impedir la hidrólisis del antibiótico, que podría así ejercer su acción. Por otra parte, es de esperar que la permeabilización inducida por el péptido provoque una acumulación en el periplasma no sólo del inhibidor, sino también del antibiótico. Este fenómeno contribuiría a saturar a la fracción de la betalactamasa que aún retuviera su actividad en presencia del inhibidor. Es notable que este mecanismo de sensibilización haya demostrado ser eficaz frente a una cepa que hiperexpresa AmpC a niveles 100 veces superiores a los de la cepa salvaje PAO1 (Figura 17).

Alternativamente, el fenómeno de sensibilización podría ser consecuencia de una hipotética salida de la betalactamasa hacia el exterior de la célula causada por la acción permeabilizante del péptido. De esta manera, la pérdida de la actividad betalactamasa posibilitaría la acción del antibiótico. Sin embargo, este mecanismo no explicaría la necesidad de la inclusión del inhibidor en la combinación. Además, a la vista del alto peso molecular de AmpC (34 kDa) y la baja concentración de péptido empleada en estos ensayos, no parece posible que el péptido promueva una salida de la betalactamasa hacia el exterior de la célula. Los experimentos con la sonda fluorescente NPN (Figura 20) son coherentes con el mecanismo propuesto, ya que demostraron que sólo el péptido poseía capacidad permeabilizante. Asimismo, la ineficacia de la terapia experimental sobre una cepa de *P. aeruginosa* resistente a colistina refuerza la validez del mecanismo de acción propuesto (Tabla 26). No obstante, para despejar toda duda sobre el mecanismo de sensibilización, sería

necesario obtener una evidencia directa de que el péptido induce una entrada del inhibidor y del antibiótico en el periplasma bacteriano. Estos estudios podrían realizarse marcando radiactivamente estos compuestos y determinando su localización celular en presencia y ausencia del agente permeabilizante.

Es interesante señalar que, también en ausencia de antibióticos, PMBN es capaz de potenciar la actividad de algunos inhibidores de betalactamasas como el sulbactam, ácido fenilborónico y aztreonam (ICIFs en Anexo 1 y resultados no mostrados). Esta actividad se detecta, principalmente, a concentraciones algo más altas de las ensayadas en la combinación triple. El mayor nivel de potenciación se detectó en el caso de aztreonam, un inhibidor de betalactamasas que posee también actividad antibiótica por sí mismo. Concretamente, una concentración de 16 µg/ml de PMBN fue capaz de disminuir la CMI de aztreonam en *P. aeruginosa* PAΔD de 8 µg/ml a 0,5 µg/ml.

Si bien los experimentos con *Bioscreen* demuestran que el compuesto con mayor capacidad inhibitoria por sí mismo es PMBN, es necesario interpretar con prudencia el resultado de estos ensayos. A diferencia de la técnica del tablero (*checkerboard test*), que permitió analizar distintas concentraciones de las combinaciones triples, en el ensayo turbidimétrico se midió una única concentración de los tres componentes. Además, la concentración analizada se seleccionó de entre aquellas que habían resultado ser inhibitorias en un ensayo *checkerboard* previo. Por tanto, es posible que a concentraciones ligeramente inferiores de PMBN a las empleadas, se pueda apreciar una contribución mayor de los otros dos componentes a la acción inhibitoria. No obstante, hay que destacar que incluso en las condiciones citadas, la técnica de *Bioscreen* permitió establecer que los tres componentes de la combinación eran necesarios para inhibir significativamente el crecimiento de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 (Figura 18).

Otros autores han evaluado la eficacia terapéutica de combinaciones de colistina con ampicilina y sulbactam en *Acinetobacter* (Tripodi et al. 2007; Cetin et al. 2013). No obstante, en este trabajo no se determinó la contribución real del inhibidor de betalactamasas a la eficacia global del tratamiento combinado, pues no se incluyeron controles con el betalactámico sólo (sin el inhibidor). Además, en dicho estudio se emplearon concentraciones superiores a la CMI de colistina, mientras que en el presente trabajo los agentes permeabilizantes se usan a concentraciones subinhibitorias. Finalmente, Tripodi y colaboradores no detectaron la existencia de sinergia entre colistina y ampicilina/sulbactam, lo que puede deberse a la ineficacia de colistina como agente permeabilizante. De hecho, en el presente trabajo se ha

demostrado que PME no es capaz de potenciar la acción de antibióticos, incluso cuando este compuesto se usa a concentraciones muy cercanas a su CMI (Tabla 42). Un resultado similar ha sido recientemente constatado por Cetin y colaboradores, que demostraron la ineficacia de PMB para actuar en sinergia con ampicilina/sulbactam o cefoperazona/sulbactam (Cetin et al. 2013). Asimismo, se ha descrito que la combinación piperacilina/tazobactam/indolicidina tiene actividad *in vitro* sinérgica en *E. coli* y en *E. faecalis* y protege frente a la sepsis causada por una infección polimicrobiana (Ghiselli et al. 2008), pero tampoco en este caso se investigó si la presencia del inhibidor de betalactamasas era realmente necesaria para alcanzar la actividad antimicrobiana descrita.

La combinación de antibióticos con péptidos antimicrobianos es una estrategia que otros autores han empleado tanto para eliminar los *biofilms* de *P. aeruginosa* como para inhibir su formación. Así, se ha descrito que doripenem/colistina (Lora-Tamayo et al. 2014), colistina/tobramicina (Herrmann et al. 2010; Pawar et al. 2015) y la combinación del péptido 1018/ciprofloxacino reducen la viabilidad bacteriana en *biofilms* maduros (Reffuveille et al. 2014). Además, otros autores han descrito que los antibióticos (tobramicina, ciprofloxacino y colistina) con los péptidos antimicrobianos (LL-37 o CAMA) (Dosler and Karaaslan 2014) y la combinación de los péptidos PMB y gramicidina (Berditsch et al. 2015) son capaces de inhibir la formación de *biofilm* de *P. aeruginosa*.

Las implicaciones de la estrategia terapéutica descrita en el presente trabajo son importantes, pues queda demostrado que es posible revertir la resistencia de cepas que expresan betalactamasas con el uso combinado de un agente permeabilizante y un inhibidor de la betalactamasa. Además, se ha puesto de manifiesto que esta estrategia experimental es eficaz para la eliminación de *biofilms* maduros, lo que podría encontrar aplicación en el sellado antibiótico de catéteres. Puesto que los betalactámicos actúan sobre células que están dividiéndose activamente, la eficacia frente al *biofilm* de la combinación experimental más potente (ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN) sugiere que los *biofilms* generados en el presente trabajo contienen mayoritariamente células en ese estadio. En concordancia con esta hipótesis, los experimentos de microscopía confocal demuestran que la mayoría de las células de estos *biofilms* son viables. Sería necesaria más experimentación para demostrar que el enfoque experimental desarrollado en este trabajo tiene aplicación sobre *biofilms* en estadios más avanzados de crecimiento, donde puede haber un mayor número de células que no están multiplicándose activamente. También está pendiente estudiar si las combinaciones desarrolladas son o no eficaces para eliminar

la subpoblación de células persistentes (*persisters*) presentes en los *biofilms* maduros (ver Introducción).

La eficacia frente al *biofilm* de la potenciación de inhibidores de betalactamasas quedó especialmente patente al comparar la combinación triple ceftazidima/ácido fenilborónico/PMBN con una solución control que tiene empleo clínico en sellado antibiótico, ceftazidima a 5000 µg/mL (Figura 24) (Fernández-Hidalgo and Almirante 2014). Mientras esta solución apenas disminuyó la viabilidad celular, la combinación triple redujo el número de viables unos 100 millones de veces en las mismas condiciones. Hay que hacer notar que el componente que se halla a mayor concentración en la combinación triple es PMBN (200 µg/mL) y que la monoterapia estándar contiene una cantidad de ceftazidima 1600 veces mayor a la presente en la terapia combinada experimental. La ineficacia del tratamiento basado sólo en ceftazidima puede deberse a la resistencia que la cepa de *P. aeruginosa* empleada en estos ensayos mostró hacia esa cefalosporina (CMI= 64 µg/mL). Es de esperar que este nivel de resistencia –determinado en células planctónicas- sea mucho mayor en las biocapas formadas por esa misma cepa bacteriana, como suele ocurrir en muchos otros casos (Beloin et al. 2014; La Fuente-Núñez et al. 2014). De hecho, en el presente trabajo se demostró que el aumento de la concentración de ceftazidima en la combinación de 50x a 500x, 5.000x y a 50.000x no mejoró la actividad frente al *biofilm* del tratamiento triple.

Es probable que la letalidad mostrada por el tratamiento triple sobre *biofilms* pueda aumentar todavía más prolongando el tiempo de exposición de las biocapas a la terapia combinada. Hay que señalar que el tiempo de exposición más largo empleado en el presente trabajo fue de 72 h, mientras que las soluciones de sellado se aplican de 10 a 14 días (Fernández-Hidalgo and Almirante 2014). Por otra parte, sería necesario estudiar si la terapia experimental mantiene su actividad antimicrobiana en presencia de heparina, un anticoagulante que suele incluirse en las soluciones de sellado (Bookstaver et al. 2013). Para confirmar los resultados del presente trabajo sería necesario llevar a cabo experimentos de eficacia comparativa empleando modelos de sellado antibiótico en animales y/o en condiciones más cercanas al ámbito clínico (Bustos et al. 2015).

El hecho de que una monoterapia basada en PMB o PME a concentración equivalente a la terapia triple (50 veces la CMI) iguale o supere la actividad frente al *biofilm* de esta última, disminuye el atractivo de la combinación experimental para su uso en sellado antibiótico (Figura 25). Parece claro que una monoterapia basada en el uso de una de las dos polimixinas, además de tener una eficacia similar al tratamiento

combinado, sería bastante más económica, dado el mayor coste de los nonapéptidos comparado con sus compuestos parentales. Sin embargo, la literatura parece indicar que el empleo de estos antimicrobianos en monoterapia está desaconsejado porque el espectro de actividad de este hipotético sellado antibiótico se vería limitado a bacterias gramnegativas, quedando el paciente desprotegido frente al crecimiento de grampositivos, que son los patógenos que causan con más frecuencia infecciones asociadas a dispositivos médicos. Este puede ser el motivo por el que las polimixinas sólo se han empleado para sellado antibiótico combinadas con otros antimicrobianos (Justo and Bookstaver 2014), en concreto con vancomicina (Vincentelli et al. 1997) o claritromicina (Ozbek and Mataraci 2013).

En todo caso, el presente trabajo sugiere que la adición de un inhibidor de betalactamasas y de un agente permeabilizante a las soluciones de sellado podría mejorar la actividad frente al *biofilm* de aquellas soluciones que contengan betalactámicos. Otros autores han descrito con anterioridad la combinación de un antibiótico betalactámico con un inhibidor de betalactamasas como posible solución de sellado antibiótico (Anthony and Rubin 1999; Del Pozo et al. 2009a), aunque estos trabajos se centran en describir la estabilidad de la combinación ticarcilina/ácido clavulánico y en notificar dos casos clínicos de bacteriemias relacionadas a catéter, selladas con piperacilina/tazobactam. Fuera del ámbito del sellado antibiótico, se ha descrito un caso clínico de peritonitis por diálisis peritoneal causada por *Acinetobacter baumannii* XDR en el que la paciente fue satisfactoriamente tratada con una combinación antibiótica de ampicilina/sulbactam y PMB intraperitoneal (Fitzpatrick et al. 2012).

En relación con el mecanismo frente al *biofilm* de las combinaciones péptido/antibiótico/inhibidor de betalactamasa, los resultados del presente trabajo no permiten extraer datos concluyentes. Por un lado, los ensayos de cinética de letalidad sobre células planctónicas muestran claramente que las combinaciones triples son bactericidas por encima de su CMI (Figura 19). En apoyo de esta conclusión, los ensayos de microscopía confocal sobre *biofilms* demuestran que el tratamiento experimental induce una marcada reducción de la viabilidad celular (Figura 23). Por el contrario, los experimentos en microplacas sugieren que la combinación triple actúa reduciendo (“despegando”) la biomasa del *biofilm* (Tabla 29). Esto podría deberse a la hipotética capacidad disgregadora de la combinación. En apoyo de este mecanismo, se demostró que la actividad frente al *biofilm* era directamente proporcional a la cantidad de PMBN presente en la combinación y es conocido que este compuesto tiene cierta capacidad detergente debido a su estructura anfipática (Tsubery et al. 2000). También es coherente con esta explicación el hecho de que la actividad frente

al *biofilm* no aumentase al incrementar la concentración de ceftazidima en la combinación. Por desgracia, los experimentos con *biofilms* generados en el CDC reactor y expuestos a la combinación antimicrobiana no arrojan luz sobre el mecanismo de acción, debido a la metodología empleada. De hecho, la notable reducción del número de viables detectada en estos experimentos podría ser causada tanto por una acción bactericida directa de la combinación, como por una disgregación de la biomasa adherida a los discos durante las incubaciones con el tratamiento experimental. Para estudiar si la terapia triple promueve una disgregación del *biofilm*, se podría visualizar mediante microscopía confocal la acción del tratamiento en tiempo real sobre biocapas cultivadas en capilares (Sánchez-Gómez 2008).

2. Sensibilizar a *Pseudomonas aeruginosa* con hiperexpresión constitutiva de AmpC a una combinación de un betalactámico sustrato de esa enzima y un inhibidor de betalactamasas de una clase distinta de la C.

Concretamente, dicha sensibilización se logró empleando inhibidores de betalactamasas de clase A, como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam (Tablas 17 y 18). Es bien conocido que estos tres inhibidores tienen generalmente un efecto muy reducido sobre las betalactamasas de clase C, como AmpC, aunque algunas enzimas de este tipo son inhibidas por el tazobactam o el sulbactam (Bush et al. 1993; Monnaie and Frere 1993; Babini et al. 1998; Akova 2008; Jacoby 2009). De acuerdo con los puntos de corte de susceptibilidad antibiótica establecidos para *Pseudomonas aeruginosa* ($\leq 64/2$ $\mu\text{g/mL}$ ticarcilina/ácido clavulánico, $\leq 64/4$ $\mu\text{g/mL}$ piperacilina/tazobactam, ≤ 64 $\mu\text{g/mL}$ piperacilina; (CLSI 2011)), se logró una sensibilización en presencia de PMBN y de una de las siguientes combinaciones: ticarcilina/ácido clavulánico (4/4 $\mu\text{g/mL}$), piperacilina/tazobactam (0,5/4 $\mu\text{g/mL}$), piperacilina/sulbactam (0,25/4 $\mu\text{g/mL}$), piperacilina/ácido clavulánico (4/2 $\mu\text{g/mL}$).

Las combinaciones con un efecto sinérgico más potente fueron las que contenían PMBN/ piperacilina/ sulbactam (CMI= 0,25 $\mu\text{g/mL}$; ICIF= 0,01) y PMBN/ piperacilina/ tazobactam (CMI= 0,5 $\mu\text{g/mL}$; ICIF= 0,01). Por el contrario, el ácido clavulánico mostró una baja capacidad inhibitoria, incluso en presencia del agente permeabilizante. Esto puede deberse a la poca eficacia que este compuesto muestra para inhibir enzimas de clase C en *P. aeruginosa*. De hecho, se ha descrito que el ácido clavulánico es el inductor más potente de esta clase de betalactamasas (Weber and Sanders 1990), por lo que resulta especialmente relevante que el presente trabajo haya demostrado la capacidad de la combinación piperacilina/ácido clavulánico/PMBN para sensibilizar a esta bacteria. Es muy probable que la buena actividad obtenida con piperacilina se

deba a que este antibiótico no es buen sustrato de la betalactamasa AmpC, si bien la cepa empleada presentaba una alta CMI a piperacilina (128 µg/mL). La eficacia de PMBN para sensibilizar a AmpC a inhibidores de betalactamasas de clase A es coherente con la hipótesis enunciada en el apartado anterior sobre el mecanismo de potenciación. Así, sería de esperar que, aunque la afinidad de las enzimas de clase C por los inhibidores de clase A sea baja (IC_{50} ácido clavulánico >100000 nM, IC_{50} sulbactam = 5600 nM, IC_{50} tazobactam = 8,5 nM para P99, una cefalosporinasa de clase C de *Enterobacter cloacae* (Bush et al. 1993)), la enzima pueda ser inhibida también por estos compuestos si se alcanza una suficiente concentración de los mismos en el periplasma bacteriano.

En los experimentos de este apartado y en los del anterior, se observó con frecuencia un empeoramiento de la capacidad potenciadora de PMBN o PMEN por encima de 4-8 µg/mL. Aunque no se dispone de una explicación definitiva sobre este hecho, se ha descrito que los péptidos antimicrobianos pueden alcanzar concentraciones críticas y formar agregados inactivos en solución, lo que podría dificultar su correcta interacción con la membrana bacteriana y reducir su actividad permeabilizante (Hovakeemian et al. 2015). Es de destacar que este fenómeno no se detectó en ninguna de las enterobacterias utilizadas (ver apartado 3 de la Discusión), sino que fue exclusivo de las cepas de *P. aeruginosa* y que ocurrió tanto en presencia como en ausencia de inhibidor de betalactamasa.

3. Sensibilizar a cepas productoras de BLEE a una combinación de un betalactámico sustrato de esa enzima y un inhibidor de esa betalactamasa, siendo dicha combinación inactiva en ausencia de permeabilizante.

La contribución del inhibidor de BLEE a la eficacia de la combinación triple fue mayor en este caso que en el descrito con la betalactamasa AmpC. De hecho, PMBN no actuó en sinergia con ninguno de los antibióticos empleados (ampicilina, amoxicilina y ticarcilina) en ausencia de inhibidores de BLEE (Tablas 33 y 34), y sólo sobre la cepa de *E. coli*, mostró una modesta capacidad potenciadora de piperacilina en ausencia de tazobactam. La combinación con un efecto sinérgico más potente sobre *E. coli* fue la que contenía PMBN/piperacilina/tazobactam (CMI= 2 µg/mL; ICIF= 0,02). Aunque la citada combinación triple fue también la más activa sobre *K. pneumoniae*, este microorganismo se mostró más resistente a ella (CMI= 16 µg/mL; ICIF= 0,05). Puesto que las BLEEs son también enzimas periplásmicas (Pradel et al. 2009) la potenciación inducida por PMBN podría actuar a través de un mecanismo similar al propuesto para AmpC.

Se desconoce el tipo de BLEEs presente en las cepas empleadas, aunque el patrón de susceptibilidad antibiótica proporciona alguna pista. Así, se ha descrito que tazobactam es más potente que el ácido clavulánico frente a las BLEEs CTX-M y los dos son más potentes que sulbactam inhibiendo BLEEs de tipo TEM y SHV (Falagas and Karageorgopoulos 2009). Este mismo patrón se detectó en la cepa *Escherichia coli* CUN E20, por lo que quizás la BLEE expresada por este microorganismo sea de uno de esos tipos. Por el contrario, en *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 no se encontró un patrón que sugiriese su tipo de BLEE.

Los experimentos de cinética de inhibición con *Bioscreen* en *E. coli* y *K. pneumoniae* demuestran con claridad que la eficacia de la terapia triple depende de la presencia simultánea de los tres componentes de la combinación (Figura 27). La total inhibición de crecimiento alcanzada con el tratamiento combinado tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae* sugiere que esta terapia podría ser también eficaz *in vivo*. De hecho, los experimentos para investigar un posible uso terapéutico de este tratamiento en un modelo animal están en preparación. Otros autores han demostrado que PMBN retiene su capacidad potenciadora de antibióticos *in vivo* en modelos murinos de infección experimental (Ofek et al. 1994; Tsubery et al. 2005). La baja toxicidad de PMBN y PMEN en comparación con sus compuestos parentales, PMB y PME (DL₅₀: 43 y 90 mg/kg-ratón frente a 8 y 9 mg/kg-ratón, respectivamente (Tsubery et al. 2005); (ver Introducción) aumenta las posibilidades de usar estos compuestos sistémicamente. Si los nonapéptidos tuvieran una buena actividad potenciadora *in vivo*, sería probablemente más fácil el desarrollo de terapias basadas en PMEN, dado que la molécula de la que deriva este péptido, la colistina, está aprobada para uso clínico y para administración intravenosa.

El hecho de que en los experimentos sobre *E. coli* y *K. pneumoniae* no se haya detectado pérdida de capacidad potenciadora a alta concentración en la PMBN (“efecto rebote”), es una clara evidencia de que este efecto depende de la interacción del nonapéptido con la envoltura bacteriana. En este contexto, es posible que la envoltura de *P. aeruginosa* se sature de PMBN a menores concentraciones de nonapéptido que la envoltura de las enterobacterias. Esto explicaría que PMBN formase agregados en el caso del primer microorganismo y que no lo hiciese en el caso del segundo, al no alcanzar una concentración crítica en el medio extracelular en su forma no ligada a la envoltura. Sin embargo, esta hipótesis no parece tener un apoyo ultraestructural evidente al comparar las características de la envoltura celular de estos dos tipos de microorganismos. Por una parte, es conocido que la carga negativa neta de la membrana externa de un gramnegativo depende en buena medida del número de

aniones presentes en las moléculas de lipopolisacárido (Nikaido 2003). Por otra parte, es sabido que el LPS de *P. aeruginosa* posee una carga negativa superior al de las enterobacterias (Vinogradov et al. 1999; Bystrova et al. 2004). Por tanto, sería de esperar que las envolturas de enterobacterias pudieran unir menor cantidad de PMBN que las de *P. aeruginosa* y que por tanto la saturación del nonapéptido en la solución se alcanzase en las enterobacterias a menor concentración, lo que contradice la hipótesis propuesta. En cualquier caso, la ausencia de efecto rebote en las enterobacterias hace aún más prometedor el posible uso terapéutico de PMBN para potenciar betalactámicos e inhibidores de betalactamasas en infecciones causadas por este importante grupo microbiano.

Independientemente de su aplicabilidad clínica, el presente trabajo demuestra la importante contribución que el mecanismo basado en producción de betalactamasas tiene en la resistencia antibiótica de los *biofilms*. A esta conclusión se llega de manera indirecta, al observar: i) la ineficacia que un betalactámico como la ceftazidima tiene para eliminar *biofilms* formados por cepas productoras de betalactamasas; y ii) la potente acción frente al *biofilm* que se consigue neutralizando este mecanismo de resistencia por la acción combinada de un agente permeabilizante y un inhibidor de betalactamasas (Figuras 24 y 28). A este respecto existen varias evidencias en la literatura que demuestran que la entrada de antibióticos betalactámicos en un *biofilm* se ve alterada por la presencia de betalactamasas extracelulares (Dibdin et al. 1996) cuyo origen parece ser, al menos en el caso de *P. aeruginosa*, la secreción por parte de las bacterias de la superficie del *biofilm* de vesículas de membrana conteniendo betalactamasas de codificación cromosómica (Ciofu et al. 2000; Bagge et al. 2004). La baja densidad celular de las biocapas formadas por *K. pneumoniae* impidió extraer resultados concluyentes sobre la actividad frente al *biofilm* de la terapia combinada. En futuros ensayos, será necesario usar cepas productoras de BLEE que formen *biofilms* de mayor densidad celular.

4. Sensibilizar a cepas con hiperexpresión de bombas de expulsión a una combinación de un antibiótico sustrato de ese mecanismo y un inhibidor de esa bomba, siendo la combinación inactiva en ausencia de permeabilizante

Concretamente, PMBN se mostró capaz de actuar en sinergia con todas las combinaciones de inhibidores ensayadas y con los cuatro antibióticos seleccionados para estos ensayos (azitromicina, doxiciclina, ceftazidima y piperacilina (Tabla 38, anexo 1)). Las combinaciones que obtuvieron un mejor ICIF_{mínimo} fueron aquellas que incluían al inhibidor PAβN y a los antibióticos piperacilina, ceftazidima, doxiciclina o azitromicina (ICIF_{mínimo} ≤ 0,01) (Tabla 37). Las combinaciones con el inhibidor PAβN

fueron sistemáticamente superiores a las que incluían al inhibidor NMP, lo que se corresponde con lo que otros autores han descrito sobre la potencia inhibitoria relativa de ambos compuestos (Kern et al. 2006; Li et al. 2015).

Se ha descrito que, de manera similar al PMBN, el inhibidor PAβN tiene cierta capacidad de permeabilizar la membrana externa de las bacterias gramnegativas (Lamers et al. 2013). Se desconoce si este hecho puede explicar que PAβN se comporte de manera similar a los péptidos antimicrobianos y a concentraciones críticas forme agregados inactivos en solución que hagan que su actividad empeore, lo que en nuestro caso sucede a concentraciones superiores o iguales a 4-8 µg/mL (Tabla 37B) (Hovakeemian et al. 2015).

Se ha descrito que una de las limitaciones de combinar en *P. aeruginosa*, inhibidores de la bomba de flujo MexAB-OprM con antibióticos betalactámicos es que esta combinación no sería eficaz en cepas con un nivel de expresión de betalactamasas elevado (Lomovskaya et al. 2001). Sin embargo, la cepa *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 además de hiperexpresar la bomba de expulsión activa MexAB-OprM expresa otros mecanismos de resistencia como la betalactamasa AmpC (Figura 17), por lo que resulta relevante que todas las combinaciones, incluso las que incluían a los antibióticos betalactámicos piperacilina y ceftazidima, resultaran sinérgicas (Tabla 38, Anexo 1). El potente efecto antimicrobiano de estas combinaciones se confirmó en los estudios de cinética de inhibición de azitromicina/PAβN/PMBN sobre *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 (Figura 30). No obstante, a diferencia de la inhibición total observada en las combinaciones con inhibidores de BLEE en enterobacterias, la combinación con PAβN causó un considerable retraso en el crecimiento de *P. aeruginosa* pero el cultivo fue finalmente capaz de crecer.

Las bombas de expulsión activa son un mecanismo de resistencia que se encuentra altamente expresado en los *biofilms* bacterianos (Kvist et al. 2008). En concreto, se ha descrito la implicación de la expresión de las bombas de expulsión activa MexAB-OprM y MexCD-OprJ en la resistencia del *biofilm* de *P. aeruginosa* al macrólido azitromicina (Gillis et al. 2005; Kvist et al. 2008; Tegos et al. 2011). Este antibiótico, que tiene poca actividad frente a *P. aeruginosa*, es capaz de interferir con las señales de *quorum sensing* mediadas por *lasI* (Wagner et al. 2005; Hoffmann et al. 2007; Lebeaux et al. 2014). Además, se ha descrito que los inhibidores de bombas de flujo reducen la formación del *biofilm* y combinados con antibióticos son capaces de impedirla completamente (Kvist et al. 2008). En el presente trabajo se ha demostrado que la combinación azitromicina/PAβN/PMBN a cincuenta veces su CMI planctónica

reduce más de 10.000.000 veces la viabilidad de *biofilms* formados por una bacteria hiperproductora de MexAB-OprM, como *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 (Figura 31). Es de destacar, que la concentración de PMBN que se empleó para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 tanto planctónica como en *biofilm* fue 4 veces inferior a la empleada en las combinaciones con ceftazidima e inhibidores de betalactamasas del apartado 1 de la Discusión.

Uno de los principales impedimentos que han encontrado los inhibidores de bombas de expulsión para su uso terapéutico es su significativa toxicidad. La estructura de PA β N se ha modificado para reducir la toxicidad aguda a un nivel tolerable, aunque la presencia de dos grupos catiónicos en la molécula promueve su acumulación en los tejidos, lo que puede producir daño renal. Este hecho llevó en 2006 al abandono del desarrollo de esta serie de inhibidores (Lomovskaya and Bostian 2006). NMP, por su parte, es un probable agonista de la serotonina. La toxicidad de estas moléculas no debería impedir su empleo en soluciones de sellado antibiótico, pues en este tipo de aplicación los antimicrobianos no se encuentran en contacto directo con el paciente. Sin embargo, no nos consta que se haya evaluado el empleo de inhibidores de bombas de expulsión de antibióticos en soluciones de sellado antibiótico.

Las observaciones hechas en el presente trabajo son muy relevantes, pues sugieren que la adición de un inhibidor de bombas y de un agente permeabilizante a las soluciones de sellado podría mejorar la actividad frente al *biofilm* de aquellas soluciones que contengan antibióticos sustrato de las bombas de expulsión. Además, la combinación empleada en el presente trabajo permite reducir drásticamente la concentración del inhibidor y del péptido antimicrobiano necesarias para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*. Finalmente, se espera que el tratamiento combinado sea incluso eficaz frente a bacterias que hiperexpresen bombas de expulsión y betalactamasas, como es el caso de la cepa clínica multiresistente *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4.

5. Sensibilizar a bacterias gramnegativas a vancomicina, daptomicina y levofloxacino.

Concretamente, PMBN revertió la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* 4158-02 Ps4 a daptomicina y vancomicina, mientras que PMEN mostró una capacidad potenciadora de vancomicina similar a la de PMBN en esta misma cepa. No obstante, las CMI alcanzadas en todos los casos (CMI 4-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no fueron tan bajas como en los ensayos previos con combinaciones triples. Los resultados obtenidos sugieren que

esta estrategia podría tener amplio espectro de aplicación sobre gramnegativos, pues la combinación del antibiótico vancomicina con el péptido PMBN –aunque mucho menos potente que en *P. aeruginosa*–, también resultó sinérgica en *Escherichia coli* CUN E20 y *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 (Tabla 41). Lógicamente, una terapia doble basada en un nonapéptido y en vancomicina (o daptomicina) podría ser eficaz también sobre grampositivos sensibles a este segundo componente de la combinación, pues en el presente trabajo se ha demostrado que la presencia del nonapéptido es indiferente para la acción del antibiótico (Tabla 43).

La estrategia basada en sensibilizar a un microorganismo gramnegativo a un antibiótico empleado habitualmente frente a grampositivos, ya ha sido descrita con anterioridad en la bacteria *Acinetobacter baumannii*. Concretamente, las combinaciones probadas con éxito fueron daptomicina/colistina (Phee et al. 2013), vancomicina/colistina (Vidaillac et al. 2012) y teicoplanina/colistina (Wareham et al. 2011). Sin embargo y hasta donde se conoce, es la primera vez que estas combinaciones se describen en *Pseudomonas aeruginosa*, con el péptido antimicrobiano PMBN (un agente permeabilizante, no bactericida) y constatando su eficacia en *biofilms*. De manera similar, no se tiene constancia que se haya descrito con anterioridad una potenciación de vancomicina como la demostrada en este estudio sobre *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con el péptido antimicrobiano PMBN.

PMBN fue también capaz de sensibilizar *Pseudomonas aeruginosa* 4158-02 Ps4 a levofloxacino y de reducir la CMI de este antibiótico hasta 0,1 µg/mL. La capacidad de los péptidos antimicrobianos de sensibilizar a cepas de *P. aeruginosa* resistentes a levofloxacino se ha descrito con anterioridad en otras publicaciones (Li et al. 2014; Ghaffar et al. 2015), sin embargo, es la primera vez que se describe con PMBN y con una sinergia tan potente. Por el contrario, PMBN fue incapaz de potenciar la actividad de levofloxacino sobre grampositivos. Este hecho era previsible, conociendo la baja actividad de las polimixinas sobre las bacterias grampositivas (Yu et al. 2015).

El fenómeno de potenciación descrito en este apartado fue también claramente detectable en los ensayos con *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* 4158-02 Ps4 (Figura 33). El hecho más destacable en relación con la actividad frente al *biofilm* fue la potencia mostrada por varias de las combinaciones, que igualaron la capacidad bactericida del hipoclorito sódico. Hay que señalar que dicha potencia se alcanzó a concentraciones relativamente bajas de los dos componentes de la combinación. Así, bastaron 400 µg/mL de vancomicina y 157 µg/mL de PMBN o 400 µg/mL de daptomicina y 312 µg/mL de PMBN para reducir 100 y 10 millones de veces, respectivamente, la viabilidad de los *biofilms* de *P. aeruginosa*. El caso del

levofloxacino fue aún más notable, pues se obtuvo una reducción de viabilidad de la misma magnitud empleando sólo 25 µg/mL de este antibiótico en la combinación. Estos valores contrastan con las concentraciones utilizadas en soluciones de sellado antibiótico de catéteres cardiovasculares, 5000 µg/mL de daptomicina (Del Pozo et al. 2012), o bien, de 1000 a 83.000 µg/mL de vancomicina (Fernández-Hidalgo and Almirante 2014) o concentraciones entre 2000 µg/mL y 5000 µg/mL de levofloxacino. Se da la paradoja de que daptomicina requiere una significativa concentración de Ca²⁺ para ejercer su papel bactericida y los péptidos antimicrobianos ven reducida su actividad en presencia de cationes divalentes, por lo que aún resulta más relevante la eficacia frente al *biofilm* de la combinación de PMBN con este antibiótico.

Desgraciadamente, las cepas MRSA empleadas en este trabajo mostraron una baja capacidad para formar *biofilms*, lo que impidió evaluar la actividad de la combinación PMBN-vancomicina sobre este patógeno grampositivo. Sin embargo, a la vista de la ausencia total de interferencia entre PMBN y vancomicina observada en células planctónicas, es de esperar que la combinación sea altamente bactericida sobre *biofilms* de *S. aureus*. De ser así, este tratamiento podría tener amplio espectro y ser útil en sellado antibiótico para la eliminación de biocapas mixtas formadas por grampositivos y gramnegativos, o bien como solución de sellado empírica.

Como se ha puesto de manifiesto a lo largo del presente trabajo, los compuestos PMBN y PMEN superan ampliamente la actividad permeabilizante de los mejores péptidos derivados de la lactoferricina. Sin embargo, estos últimos compuestos poseen varias ventajas que hacen atractivo su desarrollo y optimización. Por un lado, casi todos los derivados de la lactoferricina mejoraron la CMI de la PMBN sobre *S. aureus* (CMI= 512 µg/mL). Además, cuando se compararon con el compuesto parental de PMBN (la PMB), 14 de los 26 péptidos lograron CMIs iguales o inferiores a la CMI de la PMB sobre *S. aureus* ATCC 25922 (CMI=32 µg/mL), incluyendo un compuesto con una CMI de 4 µg/mL (P5-16). En concordancia con estos resultados, se sabe que los derivados de la lactoferricina potencian la actividad de antibióticos frente a *S. aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (Sánchez Gómez y Martínez de Tejada, resultados no publicados). Por el contrario, PMBN no tiene capacidad permeabilizante sobre *S. aureus*, como se ha demostrado en el presente trabajo. Esta observación sugiere que sería posible desarrollar una terapia de potenciación de amplio espectro basada en el uso de péptidos derivados de la lactoferricina.

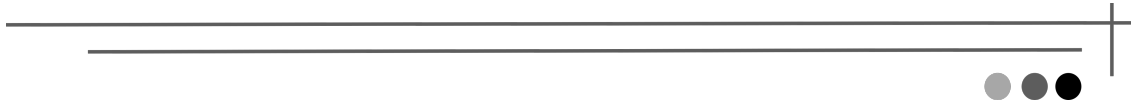
Finalmente, también este trabajo ha puesto de manifiesto la baja toxicidad de los derivados de lactoferricina. Concretamente, de los 16 péptidos antimicrobianos que

eran capaces de permeabilizar a *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4 (Tabla 12), 9 no fueron hemolíticos ni citotóxicos (Tabla 14) y uno, el péptido P5-12 presentó actividad permeabilizante a concentraciones diez veces menores a las que exhibió citotoxicidad. Este hecho sugiere que estos 10 péptidos, poseen una elevada especificidad por la membrana de las células procariotas, tanto gramnegativas como grampositivas.

En el contexto actual de crecimiento de la resistencia antibiótica y de la grave limitación de opciones terapéuticas frente a algunos patógenos multiresistentes, los fenómenos de sensibilización antibiótica por parte de péptidos antimicrobianos en combinación con inhibidores de mecanismos de resistencia pueden tener importantes implicaciones clínicas.

Si se demostrara que una terapia triple como las evaluadas en este trabajo es eficaz y no resulta tóxica en un modelo animal de infección causado por una cepa de *P. aeruginosa* productora de betalactamasas o de bombas de expulsión, se podrían desarrollar un tipo de tratamiento antimicrobiano del que no existe actualmente ningún precedente en sanidad humana. Por otra parte, en relación con la posible aplicación para sellado antibiótico de los tratamientos desarrollados en este trabajo, hay que señalar que una solución de sellado ideal debe poseer las siguientes características: un amplio espectro de actividad que incluya patógenos comunes o diana, habilidad para penetrar o desorganizar *biofilms*, compatibilidad con anticoagulantes, estabilidad prolongada, bajo riesgo de toxicidad y efectos adversos, bajo potencial de resistencia y alta rentabilidad (Justo and Bookstaver 2014). En general, las combinaciones evaluadas en el presente trabajo cumplen la mayoría de estos requisitos. Respecto a la primera característica, las combinaciones CAZ/AFB/PMBN y AZM/PAβN/PMBN son activas frente a bacterias multiresistentes y las combinaciones DAP/PMBN, VAN/PMBN y LEV/PMBN frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. En relación con la segunda, todas las combinaciones probadas redujeron significativamente la viabilidad de las bacterias del *biofilm* de *P. aeruginosa* CUN 4158-02 Ps4. Con respecto a la tercera y la cuarta características, los antibióticos ceftazidima, daptomicina, vancomicina son compatibles y estables durante al menos 24 h, la azitromicina ha demostrado compatibilidad y estabilidad con daptomicina y heparina y se han descrito incompatibilidades del levofloxacino con la heparina que desaconsejan su uso (Bookstaver et al. 2013). Sin embargo, sería necesario estudiar la compatibilidad con los anticoagulantes y la estabilidad de PMBN, AFB y PAβN. Aunque hay que extremar las precauciones, los bajos volúmenes empleados en sellado antibiótico hacen improbable los problemas de toxicidad.

CONCLUSIONS



1. We have identified 9 new antimicrobial peptides derived from human lactoferricin (P4-1, P4-5, P5-3, P5-5, P5-8, P5-9, P5-11, P5-17 and P5-19) with permeabilizing activity on Gram-negative bacteria, even in MHCA broth, and without cytotoxic and hemolytic activity on human fibroblasts and erythrocytes. These peptides exhibit, in general, a bacteriostatic mechanism of action, with better antimicrobial activity than polymyxin B against *Staphylococcus aureus* but with higher MIC values than this compound against Gram-negative bacteria.
2. Most of the mentioned peptides are capable, at subinhibitory concentrations, of sensitizing the AmpC overexpressing strain *Pseudomonas aeruginosa* PAΔD to a β -lactam antibiotic such as ceftazidime in the presence of AmpC inhibitors.
3. PMBN reverts the resistance of that same strain and makes it sensitive to a combination of a β -lactam antibiotic substrate of such enzyme and a β -lactamase inhibitor from a different class than C.
4. PMBN and PMEN antimicrobial peptides used at subinhibitory concentrations potentiate β -lactamase AmpC inhibitors, such as phenylboronic acid or aztreonam, and sensitize a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* that overexpresses constitutively that hydrolytic enzyme (CUN 4158-02 Ps4 strain) to ceftazidime. The selected combination (ceftazidime/ phenylboronic acid/ PMBN) was effective on both planktonic and biofilm forming cells of that strain (at a concentration of 50 times the planktonic MIC), reducing 100 million times the number of viable bacteria.
5. When tested on clinical strains of ESBL producing *Enterobacteriaceae*, such as *E. coli* CUN E20 and *K. pneumoniae* CUN K2, PMBN greatly potentiates the antimicrobial activity of β -lactam antibiotics that are substrates of those β -lactamases (ampicillin, amoxicillin, ticarcillin and piperacillin) in the presence of inhibitors of those enzymes.
6. Subinhibitory concentrations of PMBN sensitize a mutant of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the MexAB-OprM efflux pump (LC1-6 strain), to a combination of an inhibitor of that pump, NMP or PA β N, and an antibiotic substrate of that mechanism, aztreonam, ceftazidime, doxycycline, levofloxacin, piperacillin and azithromycin.
7. The permeabilizing agent PMBN, used at subinhibitory concentrations, can potentiate the efflux pump inhibitor PA β N and sensitize a clinical strain that overexpresses the MexAB-OprM efflux system (CUN 4158-02 Ps4) to several antibiotics substrate of that mechanism, azithromycin, ceftazidime, piperacillin and doxycycline. Moreover, the combination azithromycin/ PA β N/ PMBN at 50

times its planktonic MIC reduced 10.000.000 times the number of viable bacteria in biofilms formed by this strain.

8. The peptide PMBN was the component of the triple combinations that demonstrated the highest antimicrobial activity on its own and the key element to maintain that activity against the biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*.
9. The antimicrobial peptide PMBN at subinhibitory concentrations is capable of reverting the intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* 4158-02 Ps4 to vancomycin and daptomycin and the acquired insensitivity of that organism to levofloxacin. The combination of PMBN and the mentioned antibiotics at a concentration of 50 times the planktonic MIC was effective against biofilms of that strain, and caused a 10 to 100 million fold reduction in viable bacteria. The presence of the nonapeptides does not interfere with the activity of those antibiotics against planktonic Gram-positive bacteria.
10. The combination of the antibiotic vancomycin with the peptide PMBN was also synergistic against Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* CUN E20 and *Klebsiella pneumoniae* CUN K2 in planktonic phase, suggesting that this strategy could have a broad spectrum of application in Gram-negative bacteria.

BIBLIOGRAFÍA



- Akova M. Sulbactam-containing β -lactamase inhibitor combinations. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*. 1980 May 16;289(1036):321–31.
- Ammons MC, Copié V. Mini-review: Lactoferrin: a bioinspired, anti-biofilm therapeutic. *Biofouling*. 2013;29(4):443–55.
- Andrä J, Lohner K, Blondelle SE, Jerala R, Moriyón I, Koch MHJ, et al. Enhancement of endotoxin neutralization by coupling of a C12-alkyl chain to a lactoferricin-derived peptide. *Biochem J*. Portland Press Limited; 2005 Jan 1;385(Pt 1):135–43.
- Andrä J, Monreal D, Martínez de Tejada G, Olak C, Brezesinski G, Sánchez Gomez S, et al. 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 May 18;282(20):14719–28.
- Anthony TU, Rubin LG. Stability of antibiotics used for antibiotic-lock treatment of infections of implantable venous devices (ports). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999 Aug;43(8):2074–6.
- Aslangul E, Massias L, Meulemans A, Chau F, Andremont A, Courvalin P, et al. Acquired gentamicin resistance by permeability impairment in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006 Nov;50(11):3615–21.
- Babini GS, Danel F, Munro SD, Micklesen PA, Livermore DM. Unusual tazobactam-sensitive AmpC beta-lactamase from two *Escherichia coli* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998 Jan;41(1):115–8.
- Baddour LM, Epstein AE, Erickson CC, Knight BP, Levison ME, Lockhart PB, et al. Update on cardiovascular implantable electronic device infections and their management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010. pp. 458–77.
- Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Høiby N. Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 2004 Apr;48(4):1168–74.
- Baltz RH. Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Curr Opin Chem Biol*. 2009 Apr;13(2):144–51.
- Baltz RH, Miao V, Wrigley SK. Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Nat Prod Rep*. 2005 Dec;22(6):717–41.
- Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurin B, et al. The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. *Biochem J*. 1983 Jan 1;209(1):229–33.
- Beloin C, Renard S, Ghigo JM, Lebeaux D. Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Curr Opin Pharmacol*. 2014.

- Bengoechea JA, Skurnik M. Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. *Mol Microbiol*. 2000 Jul;37(1):67–80.
- Berditsch M, Jäger T, Stempel N, Schwartz T, Overhage J, Ulrich AS. Synergistic Effect of Membrane-Active Peptides Polymyxin B and Gramicidin S on Multidrug-Resistant Strains and Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 2015 Sep 1;59(9):5288–96.
- Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis*. 1978 Feb;137(2):122–30.
- Bergen PJ, Tsuji BT, Bulitta JB, Forrest A, Jacob J, Sidjabat HE, et al. Synergistic killing of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at multiple inocula by colistin combined with doripenem in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011 Dec;55(12):5685–95.
- Bettiol E, Harbarth S. Development of new antibiotics: taking off finally? *Swiss Med Wkly*. 2015;145:w14167.
- Bohnert JA, Kern WV. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005 Feb;49(2):849–52.
- Bookstaver PB, Rokas KEE, Norris LB, Edwards JM, Sherertz RJ. Stability and compatibility of antimicrobial lock solutions. *Am J Health Syst Pharm*. 2013 Dec 15;70(24):2185–98.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Micro*. 2005 Mar;3(3):238–50.
- Brolund A. Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. *Infect Ecol Epidemiol*. 2014;4.
- Brouwer CPJM, Rahman M, Welling MM. Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use. *Peptides*. 2011 Sep;32(9):1953–63.
- Brown AG. Clavulanic acid, a novel beta-lactamase inhibitor -a case study in drug discovery and development. *Drug Design and Delivery*. 1986.
- Brown P, Dawson MJ. A Perspective on the Next Generation of Antibacterial Agents Derived by Manipulation of Natural Products. Elsevier; 2015. pp. 135–84.
- Bryan LE, Van Den Elzen HM. Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM); 1977 Aug;12(2):163–77.
- Bugli F, Posteraro B, Papi M, Torelli R, Maiorana A, Paroni Sterbini F, et al. *In vitro* interaction between alginate lyase and amphotericin B against *Aspergillus fumigatus* biofilm determined by different methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013 Mar;57(3):1275–82.

- Bush K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. Clin Microbiol Rev. American Society for Microbiology (ASM); 1988 Jan;1(1):109–23.
- Bush K. A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. Int J Antimicrob Agents. Elsevier; 2015 Nov;46(5):483–93.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology (ASM); 1995 Jun 1;39(6):1211–33.
- Bush K, Macalintal C, Rasmussen BA, Lee VJ, Yang Y. Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology (ASM); 1993 Apr;37(4):851–8.
- Bustos C, Yuste JR, Del Pozo JL. A highly concentrated tigecycline lock solution ensures *in vivo* activity against staphylococcal catheter-related infections. J Antimicrob Chemother. 2015.
- Buynak JD. β -Lactamase inhibitors: a review of the patent literature (2010 - 2013). Expert Opin Ther Pat. 2013 Nov;23(11):1469–81.
- Bystrova OV, Lindner B, Moll H, Kocharova NA, Knirel YA, Zähringer U, et al. Full structure of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 5. Biochemistry Mosc. 2004 Feb;69(2):170–5.
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Maciá MD, Rodríguez C, Moya B, et al. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011 May;55(5):1906–11.
- Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Procedimientos en Microbiología Clínica. 2011 May 5;:1–54.
- Cercenado E, Ruiz de Gopegui E. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2008;26:19–24.
- Cetin ES, Tekeli A, Ozseven AG, Us E, Aridogan BC. Determination of *in vitro* activities of polymyxin B and rifampin in combination with ampicillin/sulbactam or cefoperazone/sulbactam against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by the E-test and checkerboard methods. Jpn J Infect Dis. 2013;66(6):463–8.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med. 2003 Apr 3;348(14):1342–7.
- Chen J, Shang X, Hu F, Lao X, Gao X, Zheng H, et al. β -Lactamase inhibitors: an update. Mini reviews in Medical Chemistry. 2013.

- Chen X, Zhang M, Zhou C, Kallenbach NR, Ren D. Control of bacterial persister cells by Trp/Arg-containing antimicrobial peptides. *Appl Environ Microbiol*. American Society for Microbiology; 2011 Jul;77(14):4878–85.
- Chihara S, Tobita T, Yahata M, Ito A, Koyama Y. Enzymatic degradation of colistin isolation and identification of α -N-acyl α , γ -diaminobutyric acid and colistin nonapeptide. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1973.
- Ciofu O, Beveridge TJ, Kadurugamuwa J, Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Chromosomal β -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2000.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement: CLSI document M100-S21. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Cohen S, Sweeney HM. Constitutive penicillinase formation in *Staphylococcus aureus* owing to a mutation unlinked to the penicillinase plasmid. *J Bacteriol*. 1968.
- Conejo MC, Martínez-Martínez L, García I, Picabea L, 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 Aug;22(2):122–7.
- Corvec S, Tabin UF, Betrisey B, Borens O, Trampuz A. Activities of fosfomicin, tigecycline, colistin, and gentamicin against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a foreign-body infection model. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 2013;57(3):1421–7.
- Costa SS, Viveiros M, Rosato AE, Melo-Cristino J, Couto I. Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*. BioMed Central Ltd; 2015 Oct 24;15(1):232.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999.
- Crompton IE, Cuthbert BK, Lowe G, Waley SG. Beta-lactamase inhibitors. The inhibition of serine beta-lactamases by specific boronic acids. *Biochem J*. 1988 Apr 15;251(2):453–9.
- Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Dec;64(4):847–67.
- Del Pozo JL, Alonso M, Arciola CR, Gonzalez R, Leiva J, Lasa I, et al. Biotechnological war against biofilms. Could phages mean the end of device-related infections? *Int J Artif Organs*. 2007 Sep;30(9):805–12.
- Del Pozo JL, Alonso M, Serrera A, Hernaez S, Aguinaga A, Leiva J. Effectiveness of the antibiotic lock therapy for the treatment of port-related enterococci, Gram-negative, or Gram-positive bacilli bloodstream infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Elsevier; 2009a Feb;63(2):208–12.
- Del Pozo JL, Rodil R, Aguinaga A, Yuste JR, Bustos C, Montero A, et al. Daptomycin lock therapy for grampositive long-term catheter-related bloodstream infections. *The International Journal of Clinical Practice*. 2012.

- Del Pozo JL, Rouse MS, Mandrekar JN, Sampedro MF, Steckelberg JM, Patel R. Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009b Jan;53(1):35–40.
- Del Pozo JL, Rouse MS, Mandrekar JN, Steckelberg JM, Patel R. The electricidal effect: reduction of *Staphylococcus* and *Pseudomonas* biofilms by prolonged exposure to low-intensity electrical current. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009c Jan;53(1):41–5.
- Del Pozo JL, Rouse MS, Patel R. Bioelectric effect and bacterial biofilms. A systematic review. *Int J Artif Organs*. 2008 Sep;31(9):786–95.
- Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1794(5):808–16.
- Dibdin GH, Assinder SJ, Nichols WW, Lambert PA. Mathematical model of beta-lactam penetration into a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* while undergoing simultaneous inactivation by released beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1996 Nov;38(5):757–69.
- Donlan RM. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clin Infect Dis*. 2011 Apr 15;52(8):1038–45.
- Dosler S, Karaaslan E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*. 2014.
- Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Jan;23(1):160–201.
- Drawz SM, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New β -lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(4):1835–46.
- Du H, Chen L, Tang Y, Kreiswirth BN. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Lancet Infect Dis*. Elsevier; 2016;0(0).
- Dudeck MA, Weiner LM, Allen-Bridson K, Malpiedi PJ, Peterson KD, Pollock DA, et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) report, data summary for 2012, Device-associated module. *Am J Infect Control*. Elsevier; 2013 Dec;41(12):1148–66.
- Easton DM, Nijnik A, Mayer ML, Hancock REW. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends in Biotechnology*. 2009 Oct;27(10):582–90.
- English AR, Retsema JA, Girard AE, Lynch JE, Barth WE. CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: initial bacteriological characterization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM); 1978 Sep;14(3):414–9.
- Envin Helics. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva. *Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias*; 2015.

- European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. 2014 Nov 14;;1–211.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. 2015 Nov 16;;1–130.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect.* 2009 Dec;73(4):345–54.
- Fariñas MC, Martínez-Martínez L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.* 2013 Jun;31(6):402–9.
- Fernández L, Hancock REW. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct;25(4):661–81.
- Fernández-Hidalgo N, Almirante B. Antibiotic-lock therapy: a clinical viewpoint. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014 Jan;12(1):117–29.
- Fisher J, Belasco JG, Charnas RL, Khosla S, Knowles JR. beta-Lactamase Inactivation by Mechanism-Based Reagents. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci. The Royal Society;* 1980 May 16;289(1036):309–19.
- Fitzpatrick MA, Esterly JS, Postelnick MJ, Sutton SH. Successful treatment of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* peritoneal dialysis peritonitis with intraperitoneal polymyxin B and ampicillin-sulbactam. *Ann Pharmacother.* SAGE Publications; 2012 Jul;46(7-8):e17–7.
- Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Jan;11(1):37–51.
- Fortun J, Grill F, Martín-Dávila P, Blázquez J, Tato M, Sánchez-Corral J, et al. Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic-lock therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2006 Oct;58(4):816–21.
- Fox JL. The business of developing antibacterials. *Nature Biotechnology.* 2006 Dec;24(12):1521–8.
- Fuda CCS, Fisher JF, Mobashery S. Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Nov;62(22):2617–33.
- Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 2014 Jul;124(7):2836–40.
- Ghaffar KA, Hussein WM, Khalil ZG, Capon RJ, Skwarczynski M, Toth I. Levofloxacin and indolicidin for combination antimicrobial therapy. *Curr Drug Deliv.* Bentham Science Publishers; 2015 Feb 1;12(1):108–114–108–114.
- Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Mocchegiani F, Orlando F, Silvestri C, et al. Efficacy of the bovine antimicrobial peptide indolicidin combined with piperacillin/tazobactam in experimental rat models of polymicrobial peritonitis. *Crit Care Med.* 2008 Jan;36(1):240–5.

- Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Nov;62(22):2588–98.
- Gillis RJ, White KG, Choi K, Wagner VE, Schweizer HP, Iglewski BH. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005 Sep;49(9):3858–67.
- Gin A, Dilay L, Karlowsky JA, Walkty A, Rubinstein E, Zhanel GG. Piperacillin-tazobactam: a beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007 Jun;5(3):365–83.
- Gonzales PR, Pesesky MW, Bouley R, Ballard A, Bidy BA, Suckow MA, et al. Synergistic, collaterally sensitive β -lactam combinations suppress resistance in MRSA. *Nat Chem Biol.* 2015 Nov;11(11):855–61.
- Gunn JS. Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *Journal of Endotoxin Research.* 2001.
- Gutkind GO, Di Conza J, Power P, Radice M. β -lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. *Curr Pharm Des.* 2013;19(2):164–208.
- Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur. Heart J.* 2009. pp. 2369–413.
- Handwerger S, Skoble J. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology (ASM); 1995 Nov;39(11):2446–53.
- Hasman H, Hammerum AM, Hansen F, Hendriksen RS, Olesen B, Agersø Y, et al. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill.* 2015 Dec 10;20(49).
- Helander IM, Mattila-Sandholm T. Fluorometric assessment of Gram-negative bacterial permeabilization. *Journal of Applied Microbiology.* Blackwell Science Ltd; 2000 Feb 1;88(2):213–9.
- Herrmann G, Yang L, Wu H, Song Z, Wang H, Høiby N, et al. Colistin-tobramycin combinations are superior to monotherapy concerning the killing of biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis.* Oxford University Press; 2010 Nov 15;202(10):1585–92.
- Herzberg O. Refined crystal structure of β -lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology.* 1991;217(4):701–19.
- Hetrick EM, Schoenfisch MH. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc Rev.* 2006 Sep;35(9):780–9.

- Hocquet D, Vogne C, Garch El F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, et al. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 2003.
- Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, et al. 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 Cftr(-/-) mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007 Oct;51(10):3677–87.
- Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MVN, et al. Antibiotic choice may not explain poorer outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and high vancomycin minimum inhibitory concentrations. *J Infect Dis*. 2011 Aug 1;204(3):340–7.
- Hovakeemian SG, Liu R, Gellman SH, Heerklotz H. Correlating antimicrobial activity and model membrane leakage induced by nylon-3 polymers and detergents. *Soft Matter*. The Royal Society of Chemistry; 2015 Sep 14;11(34):6840–51.
- Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology; 2009 Jan 1;22(1):161–82.
- Juan C, Moya B, Pérez JL, Oliver A. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006 May;50(5):1780–7.
- Justo JA, Bookstaver PB. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infect Drug Resist*. 2014;7:343–63.
- Kaatz GW, Seo SM. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM); 1997 Dec;41(12):2733–7.
- Kaatz GW, Seo SM. Effect of substrate exposure and other growth condition manipulations on norA expression. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004 Aug;54(2):364–9.
- Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 1993 May 1;37(5):1086–94.
- Kang S, Kim D, Mishig-Ochir T, Lee B. Antimicrobial peptides: Their physicochemical properties and therapeutic application. *Arch Pharm Res*. 2012 Apr 5;35(3):409–13.
- Kaye KS, Harris AD, Gold H, Carmeli Y. Risk factors for recovery of ampicillin-sulbactam-resistant *Escherichia coli* in hospitalized patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000 Apr;44(4):1004–9.
- Kern WV, Steinke P, Schumacher A, Schuster S, Baum Von H, Bohnert JA. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006 Feb;57(2):339–43.
- Kiener PA, Waley SG. Reversible inhibitors of penicillinases. *Biochem J*. Portland Press Ltd; 1978 Jan 1;169(1):197–204.

- Kim ES, Hooper DC. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. *Infect Chemother*. 2014 Dec;46(4):226–38.
- Kitzis MD, Ferré B, Coutrot A, Acar JF, Gutmann L. *In vitro* activity of combinations of beta-lactam antibiotics with beta-lactamase inhibitors against cephalosporinase-producing bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989 Sep;8(9):783–8.
- Klemm P, Hancock V, Schembri MA. Mellowing out: adaptation to commensalism by *Escherichia coli* asymptomatic bacteriuria strain 83972. *Infection and Immunity*. 2007 Aug;75(8):3688–95.
- Kvist M, Hancock V, Klemm P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Dec;74(23):7376–82.
- Kwa AL, Tam VH, Falagas ME. Polymyxins: a review of the current status including recent developments. *Ann Acad Med Singap*. 2008 Oct;37(10):870–83.
- La Fuente-Núñez De C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock REW. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr Opin Microbiol*. 2013 Oct;16(5):580–9.
- La Fuente-Núñez De C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock REW. Broad-Spectrum Anti-biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response. Parsek MR, editor. *PLoS Pathog*. Public Library of Science; 2014 May;10(5):e1004152.
- Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e60666.
- Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins Revisited. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology; 2008 Jul 1;21(3):449–65.
- Le Magrex-Debar E, Lemoine J, Gellé MP, Jacquelin LF, Choisy C. Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging. *Int J Food Microbiol*. 2000 Apr 10;55(1-3):239–43.
- Lebeaux D, Ghigo J, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014 Sep;78(3):510–43.
- Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 2001 Apr;45(4):999–1007.
- Li S, Liu J, Xiang Y, Wang Y, Lee W, Zhang Y. Therapeutic potential of the antimicrobial peptide OH-CATH30 for antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014 Jun;58(6):3144–50.
- Li X, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Apr;28(2):337–418.
- Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM); 1995 Sep;39(9):1948–53.

- Li XZ, Zhang L, Srikumar R, Poole K. Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998 Feb;42(2):399–403.
- Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999 Apr;43(4):882–9.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Oct;22(4):582–610.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2015.
- Livermore DM. Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2012.
- Livermore DM, Hope R, Mushtaq S, Warner M. Orthodox and unorthodox clavulanate combinations against extended-spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14 Suppl 1:189–93.
- Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic -a vision for applied use. *Biochem Pharmacol*. 2006 Mar 30;71(7):910–8.
- Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001 Jan;45(1):105–16.
- Lora-Tamayo J, Murillo O, Bergen PJ, Nation RL, Poudyal A, Luo X, et al. Activity of colistin combined with doripenem at clinically relevant concentrations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro dynamic biofilm model. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Sep;69(9):2434–42.
- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001 Jan;9(1):34–9.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000a Sep;44(9):2242–6.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000b Dec;44(12):3322–7.
- Mc Cay PH, Ocampo-Sosa AA, Fleming GTA. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2010 Jan;156(Pt 1):30–8.

- Meddings J, Rogers MAM, Macy M, Saint S. Systematic review and meta-analysis: reminder systems to reduce catheter-associated urinary tract infections and urinary catheter use in hospitalized patients. *Clin Infect Dis*. 2010 Sep 1;51(5):550–60.
- Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, Lopez-Suñé E, Marco F. *Guía de Terapéutica Antimicrobiana 2014*. Antares. 2014.
- Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, OGrady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009.
- Messing B, Peitra-Cohen S, Debure A, Beliah M, Bernier JJ. Antibiotic-lock technique: a new approach to optimal therapy for catheter-related sepsis in home-parenteral nutrition patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1988 Mar;12(2):185–9.
- Monnaie D, Frere J. Interaction of clavulanate with class C β -lactamases. *FEBS Letters*. Elsevier; 1993;334(3):269–71.
- Morones-Ramirez JR, Winkler JA, Spina CS, Collins JJ. Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. *Sci Transl Med*. American Association for the Advancement of Science; 2013 Jun 19;5(190):190ra81–1.
- Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, et al. Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog*. 2009 Mar;5(3):e1000353.
- Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med*. 1993 Mar;94(3):313–28.
- Murakami K, Tomasz A. Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. American Society for Microbiology (ASM); 1989 Feb;171(2):874–9.
- Nanra JS, Timofeyeva Y, Buitrago SM, Sellman BR, Dilts DA, Fink P, et al. Heterogeneous *in vivo* expression of clumping factor A and capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*: implications for vaccine design. *Vaccine*. 2009 May 26;27(25-26):3276–80.
- Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2011.
- Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM); 1988 Apr;32(4):518–23.
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003.
- Nikaido H, Liu W, Rosenberg EY. Outer membrane permeability and beta-lactamase stability of dipolar ionic cephalosporins containing methoxyimino substituents. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 1990.

- O'May CY, Sanderson K, Roddam LF, Kirov SM, Reid DW. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. *J Med Microbiol*. 2009 Jun;58(Pt 6):765–73.
- O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*. 1998 Oct;30(2):295–304.
- Ofek I, Cohen S, Rahmani R, Kabha K, Tamarkin D, Herzig Y, et al. Antibacterial synergism of polymyxin B nonapeptide and hydrophobic antibiotics in experimental gram-negative infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994 Feb;38(2):374–7.
- Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008;322(Chapter 10):207–28.
- Ozbek B, Mataraci E. *In vitro* effectiveness of colistin, tigecycline and levofloxacin alone and combined with clarithromycin and/or heparin as lock solutions against embedded *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother*. Oxford University Press; 2013 Apr 1;68(4):827–30.
- Pawar V, Komor U, Kasnitz N, Bielecki P, Pils MC, Gocht B, et al. In Vivo Efficacy of Antimicrobials against Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015 Aug;59(8):4974–81.
- Phee L, Hornsey M, Wareham DW. *In vitro* activity of daptomycin in combination with low-dose colistin against a diverse collection of Gram-negative bacterial pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Oct;32(10):1291–4.
- Pitts B, Hamilton MA, Zilver N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods*. 2003 Aug;54(2):269–76.
- Pompilio A, Crocetta V, Scocchi M, Pomponio S, Di Vincenzo V, Mardirossian M, et al. Potential novel therapeutic strategies in cystic fibrosis: antimicrobial and anti-biofilm activity of natural and designed α -helical peptides against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia*. *BMC Microbiology*. BioMed Central Ltd; 2012;12(1):145.
- Poole CV, Carlton D, Bimbo L, Allon M. Treatment of catheter-related bacteraemia with an antibiotic lock protocol: effect of bacterial pathogen. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 May;19(5):1237–44.
- Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbio*. *Frontiers*; 2011;2:65.
- Pradel N, Delmas J, Wu LF, Santini CL, Bonnet R. Sec- and Tat-dependent translocation of beta-lactamases across the *Escherichia coli* inner membrane. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009 Jan;53(1):242–8.
- Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, et al. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Research in Veterinary Science*. 2016 Apr;105:134–5.
- Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010 Dec;13(6):151–71.

- Razquin-Olazarán I. Diseño racional de péptidos derivados de la lactoferrina humana con actividad permeabilizante mejorada y capacidad de producir Permeabilidad Asociada al Efecto Postantibiótico (PAEP). Martínez de Tejada G, editor. Universidad de Navarra; 2012. pp. 1–307.
- Reading C, Cole M. Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology; 1977 May 1;11(5):852–7.
- Reffuveille F, La Fuente-Núñez De C, Mansour S, Hancock REW. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology; 2014 Sep;58(9):5363–71.
- Rijnders BJ, Van Wijngaerden E, Vandecasteele SJ, Stas M, Peetermans WE. Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic lock: randomized, placebo-controlled trial. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005 Jan;55(1):90–4.
- Rodríguez-Baño J. The Times They Are a-Changin': Carbapenems for Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015.
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, De Cueto M, Ríos MJ, et al. Bacteremia Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in the CTX-M Era: A New Clinical Challenge. Clin Infect Dis. 2008.
- Rolain J, Olaitan AO. Plasmid-mediated colistin resistance: the final blow to colistin? Int J Antimicrob Agents. 2015 Dec 12.
- Rybak MJ, McGrath BJ. Combination antimicrobial therapy for bacterial infections. Guidelines for the clinician. Drugs. 1996 Sep;52(3):390–405.
- Saiman L. Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: 'the motion for'. Paediatr Respir Rev. 2007 Sep;8(3):249–55.
- Sánchez-Gómez S. Potenciación de antibióticos mediante péptidos catiónicos permeabilizantes: aplicación al desarrollo de terapias frente a la sepsis debida a *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente. Martínez de Tejada G, editor. Universidad de Navarra; 2008. pp. 1–302.
- Sánchez-Gómez S, Ferrer-Espada R, Stewart PS, Pitts B, Lohner K, Martínez de Tejada G. Antimicrobial activity of synthetic cationic peptides and lipopeptides derived from human lactoferrin against *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cultures and biofilms. BMC Microbiology. 2015;15(1):137.
- Sánchez-Gómez S, Japelj B, Jerala R, Moriyón I, Fernández Alonso M, Leiva J, et al. Structural features governing the activity of lactoferrin-derived peptides that act in synergy with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and *in vivo*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology; 2011 Jan;55(1):218–28.

- Sánchez-Gómez S, Lamata M, Leiva J, Blondelle SE, Jerala R, Andrä J, et al. Comparative analysis of selected methods for the assessment of antimicrobial and membrane-permeabilizing activity: a case study for lactoferricin derived peptides. *BMC Microbiology*. BioMed Central Ltd; 2008;8(1):196.
- Schumacher A, Steinke P, Bohnert JA, Akova M, Jonas D, Kern WV. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Feb;57(2):344–8.
- Schweizer HP. Understanding efflux in Gram-negative bacteria: opportunities for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2012 Jul;7(7):633–42.
- Shlaes DM. New β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations in clinical development. *Ann N Y Acad Sci*. 2013 Jan;1277:105–14.
- Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis*. 2008 Mar 1;46(5):668–74.
- Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev*. 2011.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 2002 May 30;417(6888):552–5.
- Siqueiros-Cendón T, Arévalo-Gallegos S, Iglesias-Figueroa BF, García-Montoya IA, Salazar-Martínez J, Rascón-Cruz Q. Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacol Sin*. 2014 May;35(5):557–66.
- Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Estudio EPINE-EPPS 2015. 2015 Sep 28;:1–36.
- Stahlhut SG, Struve C, Krogfelt KA, Reisner A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Jul;65(2):350–9.
- Starkey M, Rahme LG. Modeling *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis in plant hosts. *Nat Protoc*. 2009;4(2):117–24.
- Stein C, Makarewicz O, Bohnert JA, Pfeifer Y, Kesselmeier M, Hagel S, et al. Three Dimensional Checkerboard Synergy Analysis of Colistin, Meropenem, Tigecycline against Multidrug-Resistant Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0126479.
- Stepanović S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*. 2004;38(5):428–32.
- Stepanović S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000 Apr;40(2):175–9.
- Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002 Jan;292(2):107–13.

- Stewart PS, Davison WM, Steenbergen JN. Daptomycin rapidly penetrates a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009 Aug;53(8):3505–7.
- Suárez C, Peña C, Gavaldà L, Tubau F, Manzur A, Domínguez MA, et al. Influence of carbapenem resistance on mortality and the dynamics of mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Int J Infect Dis*. 2010 Sep;14 Suppl 3:e73–8.
- Sykes RB, Bonner DP, Bush K, Georgopapadakou NH. Azthreonam (SQ 26,776), a synthetic monobactam specifically active against aerobic gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 1982.
- Taber HW, Mueller JP, Miller PF, Arrow AS. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev*. 1987 Dec;51(4):439–57.
- Tegos GP, Haynes M, Strouse JJ, Khan MMT, Bologna CG, Oprea TI, et al. Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. *Curr Pharm Des*. 2011;17(13):1291–302.
- Teitzel GM, Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2003.
- Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Mar;27(3):224–8.
- Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM); 1990 Jan;34(1):52–7.
- Tripodi MF, Durante-Mangoni E, Fortunato R, Utili R, Zarrilli R. Comparative activities of colistin, rifampicin, imipenem and sulbactam/ampicillin alone or in combination against epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing OXA-58 carbapenemases. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007.
- Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Fridkin M. Structure-Function Studies of Polymyxin B Nonapeptide: Implications to Sensitization of Gram-Negative Bacteria#. *J Med Chem*. 2000.
- Tsubery H, Yaakov H, Cohen S, Giterman T, Matityahou A, Fridkin M, et al. Neopeptide antibiotics that function as opsonins and membrane-permeabilizing agents for gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005 Aug;49(8):3122–8.
- Ubukata K, Itoh-Yamashita N, Konno M. Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology (ASM); 1989 Sep;33(9):1535–9.
- Vaara M, Viljanen P. Binding of polymyxin B nonapeptide to gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985 Apr;27(4):548–54.

- Van Bambeke F, Pagès J, Lee VJ. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2006 Jun;1(2):157–75.
- Vidaillac C, Benichou L, Duval RE. *In vitro* synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 2012.
- Viljanen P, Vaara M. Susceptibility of gram-negative bacteria to polymyxin B nonapeptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology (ASM); 1984 Jun;25(6):701–5.
- Vincentelli J, Braguer D, Guillet P, Delorme J, Carles G, Perez R, et al. Formulation of a flush solution of heparin, vancomycin, and colistin for implantable access systems in oncology. *J Oncol Pharm Pract.* SAGE Publications; 1997 Mar 1;3(1):18–23.
- Vinogradov EV, Van Der Drift K, Thomas-Oates JE, Meshkov S, Brade H, Holst O. The structures of the carbohydrate backbones of the lipopolysaccharides from *Escherichia coli* rough mutants F470 (R1 core type) and F576 (R2 core type). *Eur J Biochem.* 1999 May;261(3):629–39.
- Wagner T, Soong G, Sokol S, Saiman L, Prince A. Effects of azithromycin on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Chest.* American College of Chest Physicians; 2005 Aug;128(2):912–9.
- Wakabayashi H, Yamauchi K, Kobayashi T, Yaeshima T, Iwatsuki K, Yoshie H. Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology; 2009 Aug;53(8):3308–16.
- Wareham DW, Gordon NC, Hornsey M. *In vitro* activity of teicoplanin combined with colistin versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2011 May;66(5):1047–51.
- Webb HE, Granier SA, Marault M, Millemann Y, Bakker Den HC, Nightingale KK, et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *The Lancet Infectious Diseases.* 2015.
- Weber DA, Sanders CC. Diverse potential of beta-lactamase inhibitors to induce class I enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* American Society for Microbiology; 1990 Jan 1;34(1):156–8.
- Weston GS, Blázquez J, Baquero F, Shoichet BK. Structure-based enhancement of boronic acid-based inhibitors of AmpC beta-lactamase. *J Med Chem.* 1998 Nov 5;41(23):4577–86.
- Williams JD. beta-Lactamase inhibition and *in vitro* activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone. *Clin Infect Dis.* 1997 Mar;24(3):494–7.
- Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Dec;79(23):7116–21.
- World Health Organization. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. World Health Organization. 2014 Jun 12;:1–256.

- Xu G, Xiong W, Hu Q, Zuo P, Shao B, Lan F, et al. Lactoferrin-derived peptides and Lactoferricin chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*. 2010 Aug 19;109(4):1311–8.
- Yount NY, Yeaman MR. Emerging Themes and Therapeutic Prospects for Anti-Infective Peptides. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012 Feb 10;52(1):337–60.
- Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int*. 2015;2015:679109.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002 Jan 24;415(6870):389–95.
- Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Jan;8(1):71–93.
- Zimmerli W. Prosthetic-joint-associated infections. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2006.
- Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, et al. Systematic Review and Meta-Analysis of In Vitro Synergy of Polymyxins and Carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 2013 Oct 1;57(10):5104–11.

ANEXO



Anexo 1.- Índices de concentración inhibitoria fraccionada de todas las combinaciones dobles y triples que se han ensayado.

Cepa	Antibiótico (CMI µg/mL)	Inhibidor (CMI µg/mL)	Péptido (CMI µg/mL)	ICIF	ICIF	ICIF	ICIF _{mínima}	CMI _{AB/INH/PEP} (µg/mL)
				AB/INH	AB/PEP	INH/PEP	AB/INH/PEP	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAAD	Amoxicilina (>512)	Ácido clavulánico (128)	PMBN (>512)	1,02	1,00	2,00	0,05	32/2/2
	Ampicilina (>512)	Sulbactam (>512)	PMBN (>512)	1,00	1,00	0,50	0,26	256/4/4
	Ticarcilina (64)	Ácido clavulánico (128)	PMBN (>512)	1,01	0,26	1,01	0,09	4/2/8
	Piperacilina (128)	Tazobactam (>512)	PMBN (>512)	1,03	0,02	1,00	0,01	0,5/4/4
	Piperacilina (128)	Sulbactam (>512)	PMBN (>512)	1,00	0,02	0,50	0,01	0,25/4/4
	Piperacilina (128)	Ácido clavulánico (128)	PMBN (>512)	1,02	0,02	1,00	0,05	4/2/4
	Ceftazidima (16)	Oxacilina (>512)	PMBN (>512)	0,50	0,13	1,00	0,02	0,25/4/4
	Ceftazidima (16)	Ácido fenilborónico (>512)	PMBN (>512)	0,13	0,13	0,50	0,01	0,06/2/2
	Ceftazidima (16)	Aztreonam (8)	PMBN (>512)	1,13	0,13	0,50	0,13	≤0,03/1/2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CUN 4158-02 Ps4	Ceftazidima (64)	Ácido fenilborónico (>512)	PMBN (>512)	0,25	0,07	0,50	0,01	0,06/2/4
	Ceftazidima (64)	Aztreonam (16)	PMBN (>512)	0,56	0,07	0,25	0,07	≤0,03/1/4
	Piperacilina (256)	PAβN (>512)	PMBN (>512)	1,00	0,50	1,00	0,13	32/4/1
	Ceftazidima (64)	PAβN (>512)	PMBN (>512)	1,01	0,50	1,01	0,07	4/8/1
	Doxiciclina (64)	PAβN (>512)	PMBN (>512)	1,00	0,50	1,00	0,01	0,5/4/1
	Azitromicina (128)	PAβN (>512)	PMBN (>512)	1,00	0,50	1,00	0,01	0,25/4/1
<i>Escherichia coli</i> CUN E20	Ampicilina (>512)	Sulbactam (64)	PMBN (512)	0,38	1,06	1,02	0,20	64/4/16
	Amoxicilina (>512)	Ácido clavulánico (32)	PMBN (512)	0,63	0,51	2,01	0,16	32/4/8
	Ticarcilina (>512)	Ácido clavulánico (32)	PMBN (512)	0,31	1,01	2,01	0,15	16/4/8
	Piperacilina (256)	Tazobactam (256)	PMBN (512)	0,51	0,51	0,51	0,02	2/4/8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CUN K2	Ampicilina (>512)	Sulbactam (32)	PMBN (>512)	1,25	1,03	1,02	0,30	16/16/16
	Amoxicilina (>512)	Ácido clavulánico (32)	PMBN (>512)	0,25	1,02	1,02	0,17	32/4/8
	Ticarcilina (>512)	Ácido clavulánico (32)	PMBN (>512)	0,63	1,02	1,02	0,17	32/4/8
	Piperacilina (>512)	Tazobactam (512)	PMBN (>512)	2,00	1,03	1,03	0,05	16/2/16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LC1-6	Piperacilina (16)	NMP (64)	PMBN (>512)	1,25	1,00	1,06	0,50	4/16/1
	Ceftazidima (4)	NMP (64)	PMBN (>512)	1,06	1,00	1,03	0,38	1/8/1
	Levofloxacino (2)	NMP (64)	PMBN (>512)	1,06	0,50	1,02	0,12	0,12/4/1
	Doxiciclina (64)	NMP (64)	PMBN (>512)	1,02	0,25	1,00	0,03	1/1/1
	Aztreonam (32)	NMP (64)	PMBN (>512)	0,75	1,00	1,06	0,50	8/16/1
	Azitromicina (128)	NMP (64)	PMBN (>512)	1,02	0,01	1,00	0,02	0,5/1/1
	Aztreonam (32)	PAβN (>512)	PMBN (>512)	0,51	1,00	1,00	0,07	2/4/1
	Ceftazidima (4)	PAβN (>512)	PMBN (>512)	1,00	1,00	1,00	0,007	0,015/2/1
	Piperacilina (16)	PAβN (>512)	PMBN (>512)	1,00	1,00	1,00	0,007	0,06/2/1
	Levofloxacino (2)	PAβN (>512)	PMBN (>512)	1,00	0,50	1,00	0,006	0,007/2/1
	Doxiciclina (64)	PAβN (>512)	PMBN (>512)	1,00	0,25	1,00	0,004	0,12/1/1
	Azitromicina (128)	PAβN (>512)	PMBN (>512)	2,00	0,01	1,00	0,002	0,06/1/1

En negrita se indican aquellas combinaciones cuyo ICIF se clasifica como sinérgico. En rojo se indican aquellas combinaciones triples cuyo ICIF ha sido igual o superior a alguno de los ICIF de las tres combinaciones dobles posibles. Las ICIF dobles se han calculado a las concentraciones de las ICIF_{mínimas} triples.

APÉNDICE



RESEARCH ARTICLE

Open Access



Antimicrobial activity of synthetic cationic peptides and lipopeptides derived from human lactoferricin against *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cultures and biofilms

Susana Sánchez-Gómez^{1,4*}, Raquel Ferrer-Espada¹, Philip S. Stewart², Betsey Pitts², Karl Lohner³ and Guillermo Martínez de Tejada¹

Abstract

Background: Infections by *Pseudomonas aeruginosa* constitute a serious health threat because this pathogen – particularly when it forms biofilms – can acquire resistance to the majority of conventional antibiotics. This study evaluated the antimicrobial activity of synthetic peptides based on LF11, an 11-mer peptide derived from human lactoferricin against *P. aeruginosa* planktonic and biofilm-forming cells. We included in this analysis selected N-acylated derivatives of the peptides to analyze the effect of acylation in antimicrobial activity. To assess the efficacy of compounds against planktonic bacteria, microdilution assays to determine the minimal inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and time-kill studies were conducted. The anti-biofilm activity of the agents was assessed on biofilms grown under static (on microplates) and dynamic (in a CDC-reactor) flow regimes.

Results: The antimicrobial activity of lipopeptides differed from that of non-acylated peptides in their killing mechanisms on planktonic and biofilm-forming cells. Thus, acylation enhanced the bactericidal activity of the parental peptides and resulted in lipopeptides that were uniformly bactericidal at their MIC. In contrast, acylation of the most potent anti-biofilm peptides resulted in compounds with lower anti-biofilm activity. Both peptides and lipopeptides displayed very rapid killing kinetics and all of them required less than 21 min to reduce 1,000 times the viability of planktonic cells when tested at 2 times their MBC. The peptides, LF11-215 (FWRIRIRR) and LF11-227 (FWRRFWRR), displayed the most potent anti-biofilm activity causing a 10,000 fold reduction in cell viability after 1 h of treatment at 10 times their MIC. At that concentration, these two compounds exhibited low cytotoxicity on human cells. In addition to its bactericidal activity, LF11-227 removed more than 50 % of the biofilm mass in independent assays. Peptide LF11-215 and two of the shortest and least hydrophobic lipopeptides, DI-MB-LF11-322 (2,2-dimethylbutanoyl-PFWRIRIRR) and DI-MB-LF11-215, penetrated deep into the biofilm structure and homogeneously killed biofilm-forming bacteria.

Conclusion: We identified peptides derived from human lactoferricin with potent antimicrobial activity against *P. aeruginosa* growing either in planktonic or in biofilm mode. Although further structure-activity relationship analyses are necessary to optimize the anti-biofilm activity of these compounds, the results indicate that lactoferricin derived peptides are promising anti-biofilm agents.

Keywords: Antimicrobial peptides, Lactoferricin, *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm

* Correspondence: ssanchez@bionanoplus.com

¹Department of Microbiology, University of Navarra, Irunlarrea 1, E-31008 Pamplona, Spain

⁴Present address: Susana Sánchez-Gómez, Bionanoplus, 31110 Noain, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Pseudomonas aeruginosa is intrinsically resistant to many antibiotics, such as penicillins, first, second and third generation cephalosporines (except ceftazidime), tetracyclins and rifampicin. Resistance is due to the low permeability of its membrane, the presence of efflux pumps and the production of AmpC, a chromosomal β -lactamase [1]. Furthermore, this pathogen has a notorious ability to acquire additional mechanisms of resistance including those based on efflux pump overexpression, porin loss, alteration of drug target or enzymatic modification of antibiotics. This phenomenon frequently gives rise to clinical isolates displaying a multidrug-resistant phenotype that delays the appropriate antibiotic treatment and leads to therapeutic failure [1, 2].

The ability of *P. aeruginosa* cells to form biofilms during infection greatly facilitates its persistence inside the host and contributes to antibiotic resistance [3]. Biofilm formation first requires bacterial cell attachment to a surface followed by the development of a sessile colony with an extracellular matrix containing exopolysaccharide, proteins and nucleic acids. *P. aeruginosa* can form biofilms both in biotic (e.g. lung tissue in cystic fibrosis patients) and abiotic surfaces (e.g. indwelling medical devices). It is estimated that up to 65 % of bacterial infections are associated with the presence of biofilms [1–3]. In addition, biofilms are extremely resistant to antibiotics and immune system effectors [4, 5]. All these facts, underscore the importance of developing new therapies against biofilms formed by *P. aeruginosa*. Ideally, new drugs should have multiple mechanisms of action and low susceptibility to the development of resistance, compared to conventional antibiotics.

The antibiotic resistance of biofilm-producing bacteria has been attributed to a diversity of factors including the permeability barrier conferred by the exopolysaccharide, the altered chemical microenvironment within the biofilm (i.e. low oxygen concentration, waste product accumulation and acidic pH), the physiological heterogeneity of the bacterial population and the emergence of “persistent” cells [6].

Antimicrobial peptides (AMPs; e.g. nisin, indolicidin, cecropin, magainin, lactoferricin) are produced by a wide variety of organisms as a first line of defense. Their principal mechanism of action involves binding to conserved structural components of the bacterial envelope (e.g. lipopolysaccharide and lipoteichoic acid of Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively) followed by an interaction with the bacterial membrane that can be rapidly lethal. Some AMPs also bind to intracellular targets and inhibit essential biological processes including cell wall formation or DNA, RNA and protein synthesis [7, 8]. This mechanism of action is rapidly bactericidal and decreases the chances of resistance development compared to conventional antibiotics [9, 10].

The heterogeneity of bacteria embedded in the biofilm, a mixture of metabolically active and inactive cells, greatly reduces the efficiency of beta-lactams, which only kill actively dividing cells. In contrast, AMPs are bactericidal independently of the growing state of the target cell, (for a review see [11]) and this increases their appeal as potential anti-biofilm agents.

Lactoferricin is an AMP derived by pepsin digestion of lactoferrin, a multifunctional component of the innate immune system present in milk and other body fluids. Lactoferricin displays antimicrobial activity against a wide variety of microorganisms [12, 13]. Using rational design, we devised a peptide library based on the sequence of LF11, an 11-mer peptide derived from human lactoferricin, and determined the structural features governing the antimicrobial activity of the peptides against planktonic bacteria [14–17]. In the present article, we test the efficacy of these compounds against biofilms formed by *P. aeruginosa* under static and dynamic growth regimes. In these assays, we include acyl-derivatives of the parental compounds to deduce the contribution of the acyl group to the anti-biofilm activity.

Results

Antimicrobial activity on planktonic *P. aeruginosa* cells

To assess the antimicrobial activity of the peptides and lipopeptides against planktonic *P. aeruginosa* susceptibility assays consisting of MIC/MBC determination combined with killing kinetics studies were performed. Compounds displayed a wide range of antimicrobial efficacy (Table 1) with MICs varying from 8 to 128 $\mu\text{g/ml}$. Interestingly, except for two peptides, LF11-215 and LF11-322, the rest of the compounds were bactericidal at their MIC (i.e. MIC = MBC). As judged by MIC value, the least potent antimicrobials were the two acylated derivatives of peptide LF11-227, whereas a non-acylated compound, LF11-324, showed the best MIC.

In order to evaluate the bactericidal activity of the compounds, the kinetics of killing by each agent was measured at the following concentrations: 1, 2 and 4 times its respective planktonic MIC (1X, 2X and 4XMIC). Table 1 shows the time required by each compound to decrease 3 logs the initial inoculum ($T_{3\log}$). These assays revealed the rapid kinetics of killing mediated by most of the compounds. Notably, all peptides and lipopeptides except LF11-324 required less than 40 min at their MBC to reduce 3 log the initial inoculum. At 2 or 4 \times MIC, most of the agents exhibited a very rapid killing, with $T_{3\log}$ lower than 20 min. In accordance with these results, time-kill assays (Fig. 1) demonstrated that acylation resulted in an enhanced bactericidal activity, since compounds killed significantly faster than their parental non-acylated counterparts when all were tested at their respective MBC.

Table 1 Relevant characteristics of peptides and lipopeptides used in this study

Peptides ^a	Sequences	MIC ^b ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ^c ($\mu\text{g/ml}$)	T _{3log} ^d at different concentrations higher their MICs (minutes)			Hydrophobicity ^e ΔG_{woct} (kcal/mol)	
				1X	2X	4X		
LF11-215		FWRIRIRR	64	128	>360	28	10	5,5
O-LF11-215	octanoyl	FWRIRIRR	32	32	17	21	10	3,2
DI-MB-LF11-215	2,2-dimethylbutanoyl	FWRIRIRR	16	16	17	11	10	3,2
6-MO-LF11-215	6-methyloctanoyl	FWRIRIRR	64	64	34	11	10	3,2
LF11-322		PFWRIRIRR	32	64	>360	11	11	5,64
DI-MB-LF11-322	2,2-dimethylbutanoyl	PFWRIRIRR	32	32	12	11	10	3,34
6-MO-LF11-322	6-methyloctanoyl	PFWRIRIRR	64	64	41	39	19	3,34
LF11-324		PFWRIRIRR	8	8	113	13	10	3,93
LF11-227		FWRRFWRR	64	64	13	12	10	3,94
O-LF11-227	octanoyl	FWRRFWRR	128	128	10	10	10	1,64
6-MO-LF11-227	6-methyloctanoyl	FWRRFWRR	128	128	10	10	10	1,64

^a: Peptide derivatives from human lactoferricin (based on residues 21–31), C-termini is amidated in all peptides; ^b: Minimal inhibitory concentration against PAO1 planktonic cells; ^c: Minimal bactericidal concentration against PAO1 planktonic cells; ^d: T_{3log} is defined as the time needed to decrease 3 logs the initial inoculum determined in the killing curves assays. Relevant peptide modifications are shown in bold. ^e: Peptide hydrophobicity is expressed as transfer free energy of peptides from water to n-octanol (ΔG_{woct}) using Wimley-White octanol whole-residue scales [59] taking into account end group contributions, i.e. amidation of the C-termini and where appropriate acylation of N-termini. Latter was approximated by an acetyl group. Calculations were performed using MPEX [60]. Note that this parameter is inversely proportional to hydrophobicity

Compounds with the lowest MBC (e.g. LF11-324) did not correspond to those with the fastest killing kinetics. Paradoxically, agents that killed most rapidly were those lipopeptides that had been found to have the poorest MICs (O-LF11-227, 6-MO-LF11-227).

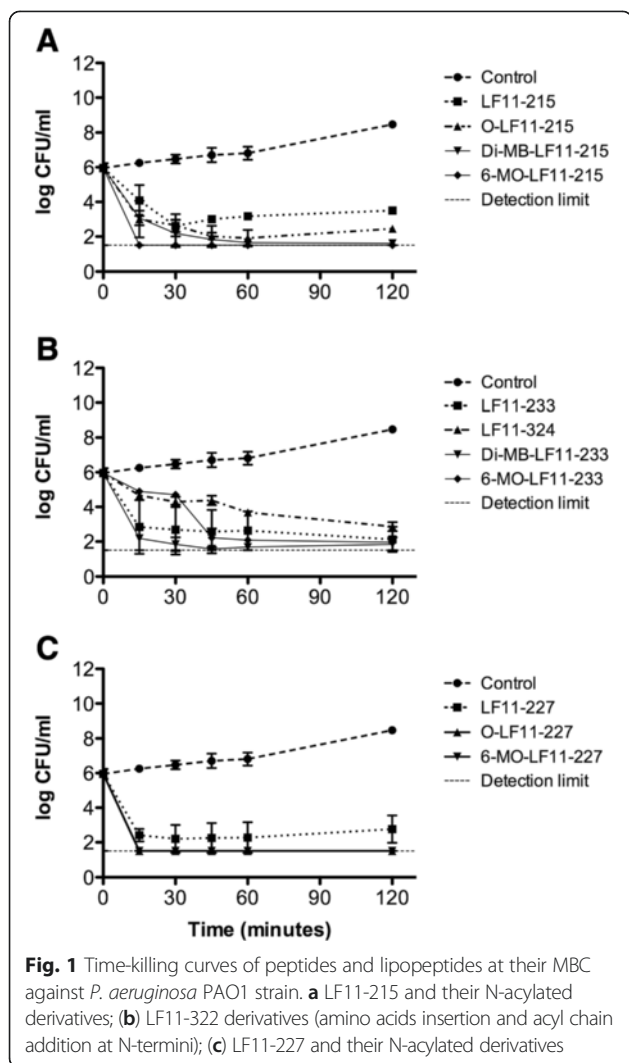
Antimicrobial activity against *P. aeruginosa* biofilms

The anti-biofilm activity of the compounds was determined on biofilms grown under static or dynamic flow regimes. On biofilms grown in microplates (i.e. static conditions), the disinfection and removal activities of the agents at 10XMIC were determined by assays based on respiratory rate (MTT test; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), and biomass quantification (CV test; crystal violet test), respectively. Results of these experiments are summarized in Fig. 2a. Only LF11-227 and DI-MB-LF11-215 showed a removal activity higher than 35 %. Interestingly, two non-acylated compounds, LF11-215 and LF11-227, were found to be the most potent bactericidal agents killing almost 100 % of the biofilm forming bacteria after 24 h of incubation. Other peptides and lipopeptides (LF11-324, DI-MB-LF11-215 and DI-MB-LF11-322) displayed a medium-range disinfection activity, whereas LF11-322 showed no anti-biofilm activity.

The antimicrobial activity of the compounds was also evaluated on *P. aeruginosa* biofilms grown under dynamic flow conditions by fluorescent microscopy. For this purpose, biofilms were grown on coupons in a CDC-reactor until reaching a bacterial density of 7.63 log CFU/cm² and then coupons were incubated during 60 min with 10XMIC of the corresponding compound. Viable cells of

the strain used for these assays emit green fluorescence due to the expression of GFP (green fluorescence protein). To better distinguish between dead and live cells, PI (propidium iodide) was added to the samples. This dye only penetrates inside biofilms when cells are dead or damaged. When this occurs, PI interacts with DNA, and cells emit red fluorescence. Representative fluorescent micrographs of peptide and lipopeptide treated biofilms are shown in Fig. 2b. Despite the disparate methodologies and incubation times used for static and dynamically grown biofilm analysis (24 h vs. 60 min, respectively), several compounds were identified as having potent anti-biofilm activity under both conditions including LF11-215, LF11-324, DI-MB-LF11-322, and LF11-227. Due to the significant removal activity displayed by LF11-227 and DI-MB-LF11-215 (see above), it is possible that the microscopic analysis had underestimated the bactericidal activity of these two agents. The only acylated compounds that rivaled the anti-biofilm activity of LF11-215 and LF11-227 were DI-MB-LF11-322 and DI-MB-LF11-215. Interestingly, those two lipopeptides share the same acyl group (2,2-dimethylbutanoyl). In striking contrast, the parental peptide LF11-322 displayed no anti-biofilm activity compared to their acylated derivatives.

After this preliminary screening, compounds with medium or high-range antimicrobial activity were selected to further characterize their activity against biofilms grown under dynamic conditions in the CDC-reactor. In these assays, mature biofilms were exposed to antimicrobials at different concentrations (1X, 2X and 10XMIC during 60 min or 10XMIC during 10 min) and the bactericidal effect was quantified by viable cell count and by confocal laser scanning microscopy (CLSM).



Viable count analysis, summarized in Fig. 3, showed that the anti-biofilm activity of compounds increases in a concentration-dependent manner. Overall, when tested on biofilms grown under dynamic conditions the antibacterial activity of the compounds was similar to that measured on statically cultured biofilms. LF11-215 and LF11-227 were the most potent peptides, since, when added at 10XMIC, they were able to decrease more than 2 logs (i.e. > 99 %) the cell viability of biofilms in just 10 min. Furthermore, both peptides caused a 10,000 fold reduction in biofilm cell viability after 1 h of treatment at 10XMIC.

Cytotoxicity of the compounds that displayed the best anti-biofilm activity was evaluated. LF-227, LF11-324, LF11-215 and its acyl derivative Di-MB-LF11-215, showed LC₅₀ values higher than the maximum concentration assayed (10 times their MIC). On the contrary the lipopeptide Di-MB-LF11-322 was more cytotoxic (LC₅₀ = 80 µg/ml, nearly 2XMIC value).

Compared to LF11-215 and LF11-227, the rest of the agents reduced viability to a lower extent and displayed a similar anti-biofilm activity regardless of the incubation time. The latter observation may reflect that these agents do not penetrate well inside the biofilm or that they display a rather slow killing mechanism on these structures.

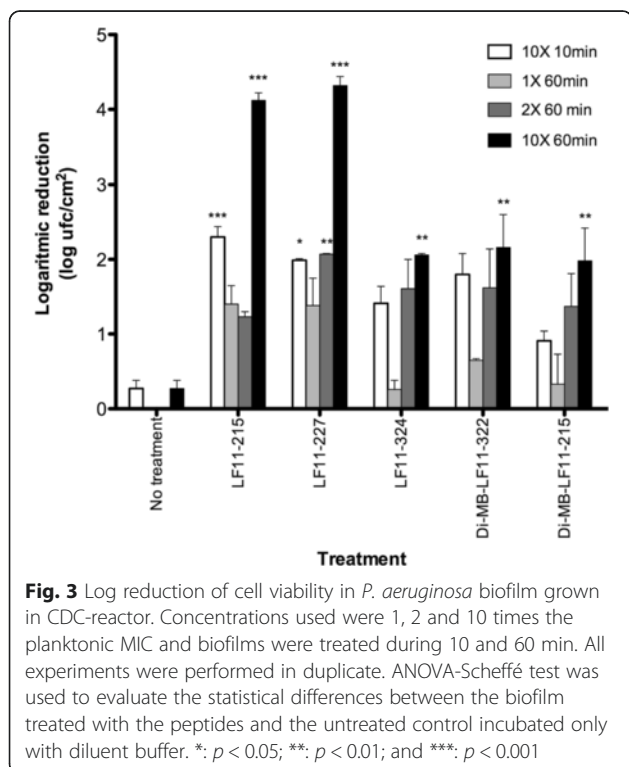
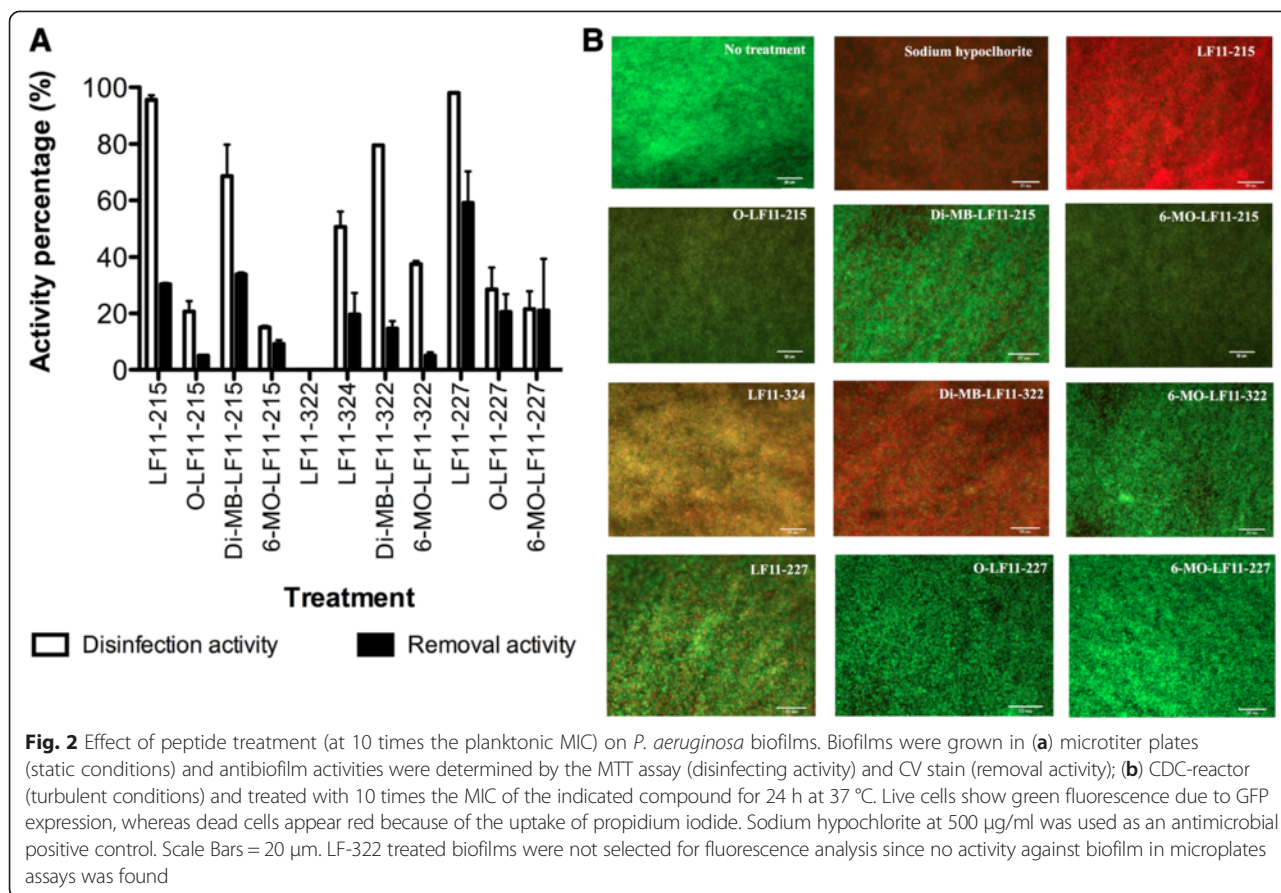
To study these hypotheses, we treated biofilms with the selected compounds at 10XMIC for 60 min and then quantified by CLSM the percentage of viable (green) vs. dead (red) cells in the entire biofilm volume. As shown in Fig. 4, treatment with LF11-215 resulted in a uniform loss of viability in the whole biofilm structure (inner and outer layers; 100 % of red cells). Similar results were found with DI-MB-LF11-322 (99.81 %), although an inner layer of viable cells was detected. Compared to these two compounds, the rest of the peptides and lipopeptides displayed a lower anti-biofilm activity of similar magnitude (around 50 % of mortality). Finally, biofilms treated with LF11-324 and DI-MB-LF11-215 presented yellow cells. This phenomenon could be potentially explained by the existence of a cluster of permeabilized cells with reduced ability to exclude PI.

Discussion

In the present study, we have identified short cationic peptides and lipopeptides derived from human lactoferricin that display rapid antimicrobial activity against *P. aeruginosa* planktonic and biofilm-forming cells. Some compounds penetrated deep into biofilm structures and killed homogeneously even the inner layers of biofilm cells, as revealed by confocal microscopy analysis.

Acylation enhanced the bactericidal activity of the parental peptides and resulted in lipopeptides that were uniformly bactericidal at their MIC. The compound with the best inhibitory activity was peptide LF11-324 (MIC = 8 µg/ml). Interestingly, this antimicrobial activity did not vary when the compound was tested on the multiresistant *P. aeruginosa* clinical isolate PS4 [15]. Our results show that the presence of proline (P¹) at the N-terminus of LF11-322 slightly improves peptide activity (in comparison with LF11-215). Similarly, the addition of another phenylalanine (F²) to LF11-322, greatly improves antimicrobial activity (see compound LF11-324) with an 8-fold increase in MIC (LF11-215 vs. LF11-324). These observations correlate with those of Zorko and collaborators, who analyzed the structure of peptide LF11-322 in lipidic environment [18]. According to these authors, the N-terminal residues P, F and W form an essential part of the peptide hydrophobic cluster, a region that upon insertion into the bacterial membrane determines the peptide ability to perturb the phospholipid bilayer.

The incorporation of an acyl group into the peptide structure resulted in a compound with improved inhibitory activity (MIC) only in the case of DI-MB-LF11-215,



whereas the same acylation had a neutral impact on LF11-322 and LF11-227 activity. Although some authors reported that the N-acylation of LF11 with a lauryl group results in a compound with increased antimicrobial activity [19–21], we cannot extend this conclusion to the acylated derivatives tested here in terms of inhibitory activity. Moreover, N-acylation enhances the binding to lipopolysaccharides of the outer membrane of Gram-negative bacteria to different degrees, which can counteract membrane permeabilization by reducing the effective peptide concentration at the inner membrane ([16, 22]). Another explanation for this discrepancy could be the fact that we used a Gram-negative organism in our assays. Thus, it has been demonstrated ([23]) that although peptide acylation could not improve the antimicrobial efficacy on Gram-negative organisms, it normally enhances this activity against Gram-positive bacteria. In agreement with this observation, we demonstrated that 6-MO-LF11-227 displayed a MIC eight times lower against *S. aureus* compared with its non-acylated counterpart, whereas such acylation did not improve antimicrobial activity against *P. aeruginosa* (data not shown).

It is likely that other features related with the spatial location or conformation of the substituent, the amphipathicity of the resulting lipopeptide or its interfacial activity

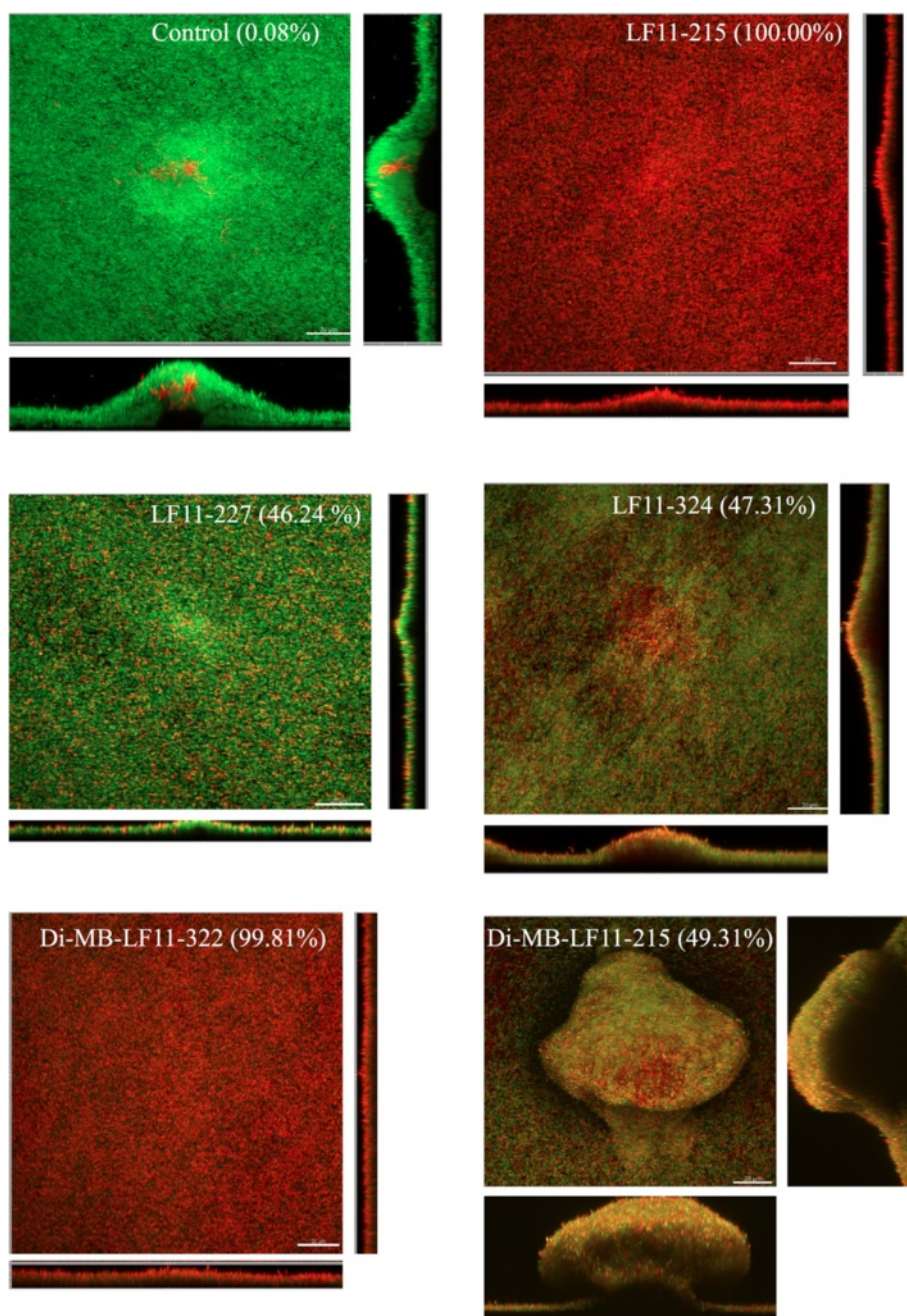


Fig. 4 Bactericidal effect of peptides against *P. aeruginosa* biofilm grown in turbulent flow conditions (CDC-reactor). Antimicrobial activity was observed with CLSM. Live cells emit green fluorescence (due to GFP) and dead cells appear red (due to PI uptake). These images show control biofilm (no peptide treatment) and treated biofilm for 1 h at 10 times the MIC of peptides. The percentage shown in each image represented the percentage of dead cells (determined by volume). Scale Bars = 20 μm

have a great impact on the antimicrobial activity, as shown by others [24–27]. In addition, several authors reported that there is an optimum hydrophobicity window resulting in high antimicrobial activity and that any further increment or decline beyond that window dramatically decreases antimicrobial activity [28–30]. Similar observations were reported regarding the number of positive charges [24, 31].

Our results indicate that not only the acyl chain of lipopeptides plays an important role in the antimicrobial activity, but also the amino acid sequence. Time-kill assays performed with the 3 lipopeptides sharing identical acyl group (6-methyloctanoyl) revealed major differences in kinetics with compound 6-MO-LF11-227 being the fastest acting of all (Table 1 and Fig. 1). This agent has additional

hydrophobic residues in its sequence (F and W) supporting the importance of hydrophobicity balance in antimicrobial activity, as discussed above.

Several studies reported the efficacy of AMPs or peptidomimetics against fungal and bacterial biofilms including those formed by *P. aeruginosa* [32–36]. Although lactoferrin is able to inhibit biofilm formation [37–39] and several investigations evaluated the inhibitory effects of derivatives of lactoferrin against biofilm generated by Gram-negative or Gram-positive organisms [40–45], to the best of our knowledge there are no reports characterizing the antimicrobial activity of lactoferrin derived peptides against *P. aeruginosa* biofilms.

To be useful against mature biofilms, antimicrobials must possess either disinfection activity (i.e. be bactericidal) or removal capacity. In assays on biofilms formed under static conditions (in microplates), we identified several peptides and lipopeptides that decreased more than 50 % cell viability in comparison with non-treated biofilms, whereas one peptide, LF11-227, was able to remove almost 60 % of the biofilm mass. It is possible that the high removal efficacy of this peptide (detected in microplate assays) may have prevented the visualization of more dead cells in fluorescence micrographs of LF11-227 treated biofilms. This phenomenon could also explain why DI-MB-LF11-215, another compound with a significant anti-biofilm activity, had an apparently low anti-biofilm activity when assessed by microscopy. Nevertheless, it is likely that the different methodologies used in those two types of assays, namely microplate (static conditions; 24 h of exposure) vs. CDC reactor (dynamic flow regime; 1 h) could explain the observed discrepancies in anti-biofilm activity.

Assays performed with biofilm grown under dynamic conditions confirmed that LF11-215 and LF11-227 were the agents with the most potent bactericidal activity being able to reduce 10,000 times the number of viable biofilm cells and displayed low cytotoxicity when tested at 10X MIC. Although those peptides have poor antimicrobial activity against planktonic cells (MIC = 64 µg/mL), they exert very potent anti-biofilm activity at only 10 times their planktonic MIC. Apart from direct killing, these agents might operate by additional uncharacterized anti-biofilm mechanisms. Thus, Fuentes-Nuñez and col. identified peptides that despite having high MICs displayed good anti-biofilm activity. These compounds acted by inhibiting a cellular stress response or by dysregulating genes related with biofilm formation, supporting the notion that antimicrobial and antibiofilm activity should be separately evaluated [46, 47].

We also observed regardless of the biofilm model used, that acylation led to a partial loss of the peptide anti-biofilm activity in the case of LF11-215 and LF11-227 derivatives. Interestingly, the lipopeptides that displayed the

best activity against biofilms were DI-MB-LF11-322 and DI-MB-LF11-215, that share the same acyl group (2,2-dimethylbutanoyl), which were the smallest and among the least hydrophobic of the acylated compounds (see Table 1). Compared to other lipopeptides, it is likely that 2,2-dimethylbutanoyl bearing compounds could penetrate deeper into the biofilm matrix than the others. The low anti-biofilm efficacy of hydrophobic compounds could be due to their tendency to interact with EPS components of *P. aeruginosa* biofilms. Thus, high local concentrations of lipopeptides on EPS matrix may promote their aggregation and hinder their penetration. This limitation could theoretically explain the similar anti-biofilm activity detected with the least active peptides (DI-MB-LF11-322 and DI-MB-LF11-215 and LF11-324) at 2 and 10 times their MIC (Fig. 3). Among these peptides, Di-MB-LF11-322 showed certain toxicity, but other anti-biofilm treatment such as antibiotic lock therapy could be an alternative, since antibiotics are not in contact with tissues or patients bloodstream.

Moreover, LF11-324 treated biofilm showed the presence of yellow cells. This might indicate that although cell membranes are damaged, thus allowing the entry of PI, cells remain still alive and emit green fluorescence, explaining the yellow appearance. This permeabilizing effect was previously described by other authors using an unrelated peptide [48], that was reported to be partially bactericidal. This fact together with previous studies by our group that demonstrated synergistic combination between LF11-215 or LF11-227 and antibiotics in planktonic cultures [15], suggests that combination of lactoferrin derived peptides and antibiotics could enhance the efficacy of peptides as anti-biofilm agents [49]. The use of combinations of antimicrobials (AMPs and non-AMP related antimicrobials) as anti-biofilm therapy has already been successfully tested. This approach entailed not only the use of antimicrobials that target biofilm cells in different metabolic states [50, 51] but also the induction of antibiotic uptake due to the membrane disruption caused by another compound [52, 53].

Conclusions

We identified peptides derived from human lactoferrin with potent antimicrobial activity against *P. aeruginosa* growing either in planktonic or in biofilm mode. In general, acylation of peptides increased the bactericidal activity against planktonic bacteria but reduced the anti-biofilm potency. Peptides and some of the least hydrophobic lipopeptides were able to kill efficiently biofilm forming cells of *P. aeruginosa* and to penetrate deep into the innermost layers of the biofilm matrix. Both peptides and lipopeptides displayed very rapid killing kinetics and all of them required less than 21 min to reduce 1,000

times the viability of planktonic cells when tested at 2 times their MBC.

Small and amphipathic cationic peptides are promising anti-biofilm agents, not only due to their broad activity spectrum, rapid mechanism of action and less susceptibility to resistance development, but also to their potential bactericidal activity against slow growing or even non-growing bacteria. Further structure-activity relationship analyses are necessary to optimize the anti-biofilm activity of lipopeptides.

Methods

Bacterial strains

Pseudomonas aeruginosa PAO1 was grown at 37 °C in LB (Luria Bertani, Pronadisa, Madrid, Spain) or TSB (tryptic soy broth, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) broth or supplemented with agar (Pronadisa, Alconbendas-Madrid, Spain). When PAO1 pMF230 (GFP-expressing PAO1) [54] was grown, TSB was supplemented with 150 µg/ml of carbenicillin.

Peptides

Peptides were synthesized with an amidated C-terminus by Polypeptide (Strasbourg, France) using 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) solid phase chemistry and purified by RP-HPLC (Vydac C18 column; 0.1 % TFA/water; Beckman Coulter, Danvers, MA, USA). Mass spectroscopy analysis (Reflex IV, Bruker, Bremen, Germany) verified that their purity was >96 %. Peptide sequences are shown in Table 1.

Susceptibility assays on planktonic cells

MIC and MBC determination

Minimal inhibitory concentrations (MIC) of the peptides were determined in Mueller Hinton (MH) medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) by the broth microdilution assay following recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS) with some modifications [14]. Minimum bactericidal concentration (MBC) was defined as the concentration that caused a 3-log viability decrease in the initial inoculum and was calculated by colony counts on TSA plates incubated for 24 h at 37 °C.

Time-kill curves

Time-kill studies were determined with glass tubes containing 10 ml of MH and different concentrations of the peptides (1, 2 and 4 times their MIC). Overnight cultures of *P. aeruginosa* PAO1 in TSB were adjusted at 5×10^7 CFU/ml turbidimetrically. This biofilm suspension was diluted in the MH tubes (1:50) for the time-kill assay. Tubes were incubated at 37 °C with shaking and samples were taken at the following time points after the beginning of incubation: 15 min, 30 min,

45 min, 1 h, 2 h, 4 h and 6 h. Each sample was serially diluted and plated. The lower limit of detection was 30 CFU/ml ($1.5 \times \log_{10}$ CFU/ml). Previous experiments demonstrated that the carryover effect of the peptides in the most concentrated dilution used for viable counts (a 10^{-1} dilution) was negligible.

To quantify the killing efficiency of the treatments, the parameter $T_{3\log}$ (defined as the time required for the treatment to decrease 3 logs the initial inoculum) was used.

Susceptibility assays on biofilms

Microplate based assay (static flow regime)

In the microplate based assay, biofilms were grown with no fluid shear and the anti-biofilm activity of peptides was assessed as previously described [55] with some modifications. Briefly, overnight cultures of *P. aeruginosa* PAO1 in TSB were adjusted at 5×10^7 CFU/ml turbidimetrically. This suspension was diluted in TSB (1:100) and 100 µl aliquots were added to the wells of a 96-well plate. After 24 h incubation at 37 °C, planktonic bacteria were removed by gently inverting the plate and then the biofilm-containing wells were washed with saline (0.85 % NaCl). The antimicrobial compound was serially diluted in Mueller Hinton (MH) at final concentrations higher than its planktonic MIC and 200 µl of each dilution was added to the wells. After 24 h incubation at 37 °C, biofilms were stained with either MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) or crystal violet (CV). As control, duplicate biofilms were incubated with MH containing no antimicrobial.

To quantify the disinfection (or bactericidal) activity of the antimicrobials on the biofilms, the MTT assay [56] was used and performed as follows. After the treatment, the biofilms were rinsed with saline and 200 µl of a 0.5 mg/ml dilution of MTT in MH, was added to the wells. Incubation of biofilm with MTT was carried out during 4 h at 37 °C with no shaking. As a measure of cell viability, the conversion of MTT to a tetrazolium salt was determined by solubilizing the salt in 100 µl/well of DMSO and reading the absorbance of the resulting solution at 540 nm.

The ability of the antimicrobials to remove the biofilm attached to the microplate well was determined by CV staining [55, 57]. For this purpose, the treated biofilms were stained with CV during 5 min at room temperature. After the incubation, the excess of stain was rinsed with saline and the CV attached to biofilm was dissolved with ethanol (95 % v/v). The absorbance was measured at 595 nm.

Both the disinfection and removal activity of antimicrobials were expressed as “activity percentage”, a

parameter that was calculated using the following formula:

$$\text{Activity Percentage} = \frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)} \times 100$$

Where C is the absorbance value of the control well with non-treated biofilm, T corresponds to the absorbance value of the well with treated biofilm and B is the blank well (i.e. with no biofilm).

CDC reactor based assay (dynamic flow regime)

Biofilm growth was also induced under high fluid shear using the CDC-reactor (model CBR 90–1, BioSurface Technologies Corp., Bozeman, MT) as described before [58]. Briefly, 1 ml of an overnight culture of *P. aeruginosa* PAO1 pMF230 was inoculated into 350 ml of TSB and this suspension was used to fill the reactor chamber. After 24 h of growth in batch culture at 37 °C with magnetic agitation, a continuous flow of TSB (3 g/l) was applied to the reactor chamber at a rate of 11 ml/min. Under these conditions, a dense biofilm develops on the surface of small disks called coupons that are constantly bathed in fresh culture medium. After 24 h incubation, the coupons were removed from the chamber and planktonic cells were eliminated by rinsing the coupons with saline. Then, the coupons were immersed in treated with 10 mL of 20 mM phosphate buffer, pH 7, containing different concentrations of the antimicrobial (1, 2 and 10 times their MIC) and incubated at 37 °C for 10 or 60 min. Finally, the coupons were rinsed and processed for colony counting or microscopic visualization as follows.

For the colony counting method, biofilms were detached from the coupon surface by scraping coupons with a sterile wooden stick. Then, biofilm cells were suspended in saline, samples were homogenized at 20500 rpm using Ultraturrax T2 (Janke & Kunkel, IKA labortechnik; Staufen Germany) and plated out for counting. These count values were used to calculate the so called Log Density of the coupon which corresponds to the CFU/cm² of biofilm cells attached to the coupon. In turn, Log Density allowed the determination of Log₁₀ reduction (LR), which was defined as the difference of Log Density between the untreated and the treated biofilm. The experiments were performed in duplicate and two coupons were treated with the same peptide concentration in each experiment. The ANOVA Scheffé statistical test was used to assess the efficacy of the treatments.

For the microscopic assessment of anti-biofilm activity, biofilms grown and treated on coupons as detailed above were soaked in a 120 μM solution of propidium iodide (PI, live/dead® BacLight™ bacterial viability kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in filter-sterilized distilled water and

incubated for 15 min at room temperature. Then, coupons were rinsed in filter-sterilized distilled water and their surface was examined by fluorescence microscopy using FITC filter (green fluorescence: λ_{excitation}, 499 nm; λ_{emission}, 519 nm) and TRITC filter (red fluorescence: λ_{excitation}, 552 nm; λ_{emission}, 578 nm). To evaluate the ability of the antimicrobial to penetrate into the biofilm structure, biofilms attached to coupons and treated with the most active antimicrobials were incubated with PI as detailed above and then examined with a confocal scanning laser microscope (Leica TCS NT, Solms, Germany). Samples were excited at 480 nm and the emission was measured at 500–550 nm for the green channel, whereas for the red channel the excitation and emission wavelengths were 568 nm and 590–650 nm, respectively. Microscope images were analyzed with the software Imaris® × 64 5.7.2. (Bitplane, Zurich, Switzerland).

Cytotoxicity assays

Cytotoxicity was assayed on HeLa cells using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] protocol [56]. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and adjusted to a concentration of 10⁵ cells/ml (MTT) in 96 wells polystyrene plates. Plates were incubated for 24 h at 37 °C in 5 % CO₂, then supplemented with increasing amounts of peptides diluted in 2 mM Hepes pH 7.2, and incubation carried on for 24 h under the same conditions. After this time, filter-sterilized MTT was added in different plates. After 3 h, the content of the wells was gently solved and mixed with 100 μl of DMSO (MTT). Absorbance was measured at 540 nm. Compound cytotoxicity was expressed as LC50, the concentration of the compound that is lethal to 50 % of the cells.

Abbreviations

MIC: Minimum inhibitory concentration; MBC: Minimum bactericidal concentration; AMP: Antimicrobial peptides; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; CV: Crystal violet; CLSM: Confocal laser scanning microscopy; CFU: Colony forming unit; TSB: Tryptic soy broth; MH: Mueller Hinton; LB: Luria Bertani; GFP: Green fluorescence protein; CLSI: Clinical Laboratory Standard; NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standard; LR: Log₁₀ reduction; PI: Propidium iodide; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; LC50: Concentration of the compound that is lethal to 50 % of the cells.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GMT and KL designed the peptide sequences and GMT conceived and designed the study. RFE participate in killing assays and in microplates biofilm test. SSG designed and carried out most of the experiment under the supervision of GMT, PS and BP. SSG and GMT edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

G.M.T. was funded by a grant from Proyectos de Investigación Universidad de Navarra (PIUNA-P2011-17), Spain. S.S.G. and R.F.E. were recipients of doctoral fellowships from Gobierno Vasco, Spain.

Author details

¹Department of Microbiology, University of Navarra, Irunlarrea 1, E-31008 Pamplona, Spain. ²Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, MT, USA. ³Institute of Molecular Biosciences, Biophysics Division, University of Graz, Graz, Austria. ⁴Present address: Susana Sánchez-Gómez, Bionanoplus, 31110 Noain, Spain.

Received: 18 March 2015 Accepted: 26 June 2015

Published online: 07 July 2015

References

- Lodise TP, Patel N, Kwa A, Graves J, Furuno JP, Graffunder E, et al. Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3510–5.
- Tam VH, Rogers CA, Chang KT, Weston JS, Caeiro JP, Garey KW. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:3717–22.
- Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:999–1007.
- Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64:847–67.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:167–93.
- Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001;358:135–8.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:491–511.
- Lohner K. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *Gen Physiol Biophys.* 2009;28:105–16.
- Navon-Venezia S, Feder R, Gaidukov L, Carmeli Y, Mor A. Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with *in vivo* activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:689–94.
- Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock REW, Falla TJ. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2921–7.
- Batoni G, Maisetta G, Brancatisano FL, Esin S, Campa M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Curr Med Chem.* 2011;18:256–79.
- Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:2588–98.
- Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals.* 2004;17:189–96.
- Sánchez-Gómez S, Lamata M, Leiva J, Blondelle SE, Jerala R, Andra J, et al. 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.
- Sánchez-Gómez S, Japelj B, Jerala R, Moriyon I, Fernández Alonso M, Leiva J, et al. 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;55:218–28.
- Zweytick D, Deutsch G, Andra J, Blondelle SE, Vollmer E, Jerala R, et al. Studies on lactoferricin-derived *Escherichia coli* membrane-active peptides reveal differences in the mechanism of N-acylated versus nonacylated peptides. *J Biol Chem.* 2011;286:21266–76.
- Martínez de Tejada G, Sánchez-Gómez S, Razquin-Olazarán I, Kowalski I, Kaconis Y, Heinbockel L, et al. Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents I. Antimicrobial peptides and lipopolymers. *Curr Drug Targets.* 2012;13:1121–30.
- Zorko M, Japelj B, Hafner-Bratkovic I, Jerala R. Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788:314–23.
- Andra J, Lohner K, Blondelle SE, Jerala R, Moriyon I, Koch MHJ, et al. Enhancement of endotoxin neutralization by coupling of a C12-alkyl chain to a lactoferricin-derived peptide. *Biochem J.* 2005;385:135–43.
- Zweytick D, Pabst G, Abuja PM, Jilek A, Blondelle SE, Andra J, et al. Influence of N-acylation of a peptide derived from human lactoferricin on membrane selectivity. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758:1426–35.
- Japelj B, Zorko M, Majerle A, Pristovsek P, Sanchez-Gomez S, Martinez de Tejada G, et al. The acyl group as the central element of the structural organization of antimicrobial lipopeptide. *J Am Chem Soc.* 2007;129:1022–3.
- Brandenburg K, Howe J, Sanchez-Gomez S, Garidel P, Roessler M, Andra J, et al. Effective antimicrobial and anti-endotoxin activity of cationic peptides based on lactoferricin: a biophysical and microbiological study. *Antimicrob Agents Chem.* 2010;9:9–22.
- Radzishvsky IS, Rotem S, Zaknoon F, Gaidukov L, Dagan A, Mor A. Effects of acyl versus aminoacyl conjugation on the properties of antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2412–20.
- Jiang Z, Vasil AI, Gera L, Vasil ML, Hodges RS. Rational design of α -helical antimicrobial peptides to target gram-negative pathogens, acinetobacter baumannii and pseudomonas aeruginosa: utilization of charge, "Specificity Determinants", total hydrophobicity, hydrophobe type and location as design parameters to improve the therapeutic ratio. *Chem Biol Drug Des.* 2011;77:225–40.
- Rathinakumar R, Walkenhorst WF, Wimley WC. Broad-spectrum antimicrobial peptides by rational combinatorial design and high-throughput screening: the importance of interfacial activity. *J Am Chem Soc.* 2009;131:7609–17.
- Rathinakumar R, Wimley WC. Biomolecular engineering by combinatorial design and high-throughput screening: small, soluble peptides that permeabilize membranes. *J Am Chem Soc.* 2008;130:9849–58.
- Yeaman MR. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2003;55:27–55.
- Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT, Hodges RS. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1398–406.
- Kustanovich I. Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives. *J Biol Chem.* 2002;277:16941–51.
- Zelezetsky I, Pag U, Sahl H-G, Tossi A. Tuning the biological properties of amphipathic α -helical antimicrobial peptides: rational use of minimal amino acid substitutions. *Peptides.* 2005;26:2368–76.
- Jiang Z, Vasil AI, Hale JD, Hancock REW, Vasil ML, Hodges RS. Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 2008;90:369–83.
- Gopal R, Kim YG, Lee JH, Lee SK, Chae JD, Son BK, et al. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:1622–9.
- Zairi A, Ferrieres L, Latour-Lambert P, Beloin C, Tangy F, Ghigo J-M, et al. *In vitro* activities of dermaseptins K4S4 and K4K20S4 against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* planktonic growth and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:2221–8.
- Beckloff N, Laube D, Castro T, Furgang D, Park S, Perlin D, et al. Activity of an antimicrobial peptide mimetic against planktonic and biofilm cultures of oral pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:4125–32.
- Roveta S, Marchese A, Schito GC. Activity of daptomycin on biofilms produced on a plastic support by *Staphylococcus spp.* *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31:321–8.
- Wei GX. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:1100–9.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* 2002;417:552–5.
- Singh PK. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *Biometals.* 2004;17:267–70.
- Kamiya H, Ehara T, Matsumoto T. Inhibitory effects of lactoferrin on biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother.* 2012;18:47–52.
- Arslan SY, Leung KP, Wu CD. The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:411–6.
- Berlutti F, Ajello M, Bosso P, Morea C, Petrucca A, Antonini G, et al. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Biometals.* 2004;17:271–8.
- Caraher EM, Gumulapurapu K, Taggart CC, Murphy P, McClean S, Callaghan M. The effect of recombinant human lactoferrin on growth and the antibiotic susceptibility of the cystic fibrosis pathogen *Burkholderia cepacia* complex when cultured planktonically or as biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:546–54.
- O'May CY, Sanderson K, Roddam LF, Kirov SM, Reid DW. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. *J Med Microbiol.* 2009;58:765–73.

44. Wakabayashi H, Yamauchi K, Kobayashi T, Yaeshima T, Iwatsuki K, Yoshie H. Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyrromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:3308–16.
45. Xu G, Xiong W, Hu Q, Zuo P, Shao B, Lan F, et al. Lactoferrin-derived peptides and Lactoferricin chimera inhibit virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* 2010;109:1311–8.
46. la Fuente-Núñez de C, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock REW. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1004152.
47. la Fuente-Núñez de C, Korolik V, Bains M, Nguyen U, Breidenstein EBM, Horsman S, et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:2696–704.
48. Nagant C, Seil M, Nachtergaeel A, Dulanto S, Dehaye JP. Contribution of the production of quorumones to some phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *J Med Microbiol.* 2013;62:951–8.
49. Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, et al. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5085–90.
50. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, 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;68:223–40.
51. Herrmann G, Yang L, Wu H, Song Z, Wang H, Høiby N, et al. Colistin-Tobramycin combinations are superior to monotherapy concerning the killing of biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis.* 2010;202:1585–92.
52. Eckert R, Brady KM, Greenberg EP, Qi F, Yarbrough DK, He J, et al. Enhancement of antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* by coadministration of G10KHc and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3833–8.
53. Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:2064–9.
54. Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol.* 2001;183:1047–57.
55. Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods.* 2003;54:269–76.
56. Andra J, Monreal D, Martinez de Tejada G, Olak C, Brezesinski G, Gomez SS, et al. 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;282:14719–28.
57. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 1998;30:295–304.
58. Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology (Reading, Engl).* 2005;151:757–62.
59. Wimley WC, Creamer TP, White SH. Solvation energies of amino acid side chains and backbone in a family of host-guest pentapeptides. *Biochemistry.* 1996;35:5109–24.
60. Snider C, Jayasinghe S, Hristova K, White SH. MPEx: a tool for exploring membrane proteins. *Protein Sci.* 2009;18:2624–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

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

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

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

* These authors contributed equally to this work.

* kbrandenburg@fz-borstel.de



OPEN ACCESS

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

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

Received: March 4, 2015

Accepted: June 25, 2015

Published: July 21, 2015

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

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

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

Abstract

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

Material and Methods

LPS purification

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

Peptide synthesis

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

Animal model of endotoxic shock

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

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

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

Stimulation of human monocytes

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

Statistical analysis of the stimulation of human monocytes. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Data of 3 different donors were analysed by using one-way ANOVA with Bonferroni correction as post-hoc test (*p < 0.5, **p < 0.01, ***p < 0.01). All data are shown as mean \pm SEM.

RNA isolation. Total RNA from stimulated human monocytes was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions and stored at -80°C until analysis.

Transcriptome analysis. For microarray analysis, a total of 21 samples from 3 biological replicates were used for evaluation. Quality control of total RNA samples was conducted using the Agilent Bioanalyzer with the RNA 6000 Nano Kit (Agilent, Waldbronn, Germany). For cDNA synthesis, amplification and labelling with Cy3 during reverse transcription by T7 RNA polymerase, the Low Input Quick Amp labelling kit (Agilent, Waldbronn, Germany) was used according to manufacturer's instructions. Cy3-labelled cRNA was purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the specific activity was calculated using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For each sample 1650 ng of labelled cRNA was hybridized to Agilent Human Whole Genome Gene Expression 4x44k V2 arrays and scanned with an Agilent SureScan microarray scanner at a resolution of 5 μ m. Raw data was extracted applying the 1-color gene expression protocol from within the Agilent Feature Extraction Software v11. GeneSpring software version 13 was used for statistical analyses (One-Way ANOVA with Tukey HSD post hoc test and Benjamini-Hochberg multiple testing correction, cut-off $p \leq 0.05$) on probe-level experiment. Before statistical evaluation, intrinsic controls were used to remove compromised and non-detected probes from data set. For displaying expression levels of selected genes (based on statistical evaluation within

GeneSpring), the raw data were quantile-normalized according to Bolstad et al. [25] using the DirectArray software (Oaklabs, Hennigsdorf, Germany). Gene ontology terms for lists of genes were identified by the Gorilla web application [26] using a p-value cut-off of 10^{-7} and the default options. All entities present on the Agilent 4x44K V2 arrays served as background list for analysis of GO term enrichment. Enrichment for pathways was conducted within GeneSpring software from Wikipathways Analysis, Reactome and Biocyc databases (cut-off of ≤ 0.05) from significantly up-regulated genes (Fold Change ≥ 2 , $p \leq 0.05$) against medium control.

The complete dataset has been deposited at Gene Expression Omnibus under ID GSE65855 and will be released upon publication.

Results

Anti-endotoxic activity of ibuprofen and Pep19-2.5 in mice

In preliminary experiments, we found that intraperitoneal (i.p.) inoculation of 400 μg of *S. enterica* Serovar Minnesota R60 LPS caused a mortality of 90% in mice at 48 h post-inoculation. To study if ibuprofen could protect animals against endotoxic shock we inoculated i.p. the compound (40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) at different time-points with respect to LPS challenge. As shown in Fig 1, neither prophylactically nor therapeutically administered ibuprofen improved the survival of mice.

Pep19-2.5 was shown to protect mice against endotoxic shock, although protection progressively diminished if treatment with the peptide was delayed with respect to LPS challenge [11]. Because ibuprofen and Pep19-2.5 are expected to block different pro-inflammatory pathways (COX and TLR4 dependent cascades, respectively), we hypothesized that these compounds could act in synergy *in vivo* to protect against septic shock. To investigate such potential synergistic activity we examined whether ibuprofen could enhance the poor Pep19-2.5 anti-endotoxic performance previously observed at late time points. As shown in Fig 2, administration of a single dose of Pep19-2.5 combined with ibuprofen conferred long-term protection against mortality due to septic shock. Notably, none of the treatments was protective when given alone.

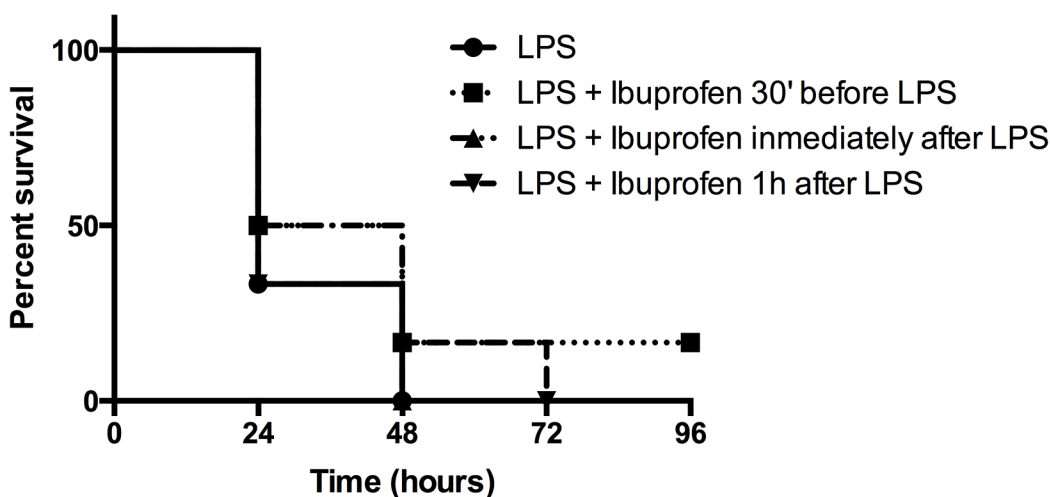


Fig 1. Administration of Ibuprofen to mice before or after LPS challenge has no protective effect. Kinetics of mortality of groups of mice ($n = 6$) intraperitoneally challenged with LPS from *S. enterica* Serovar Minnesota R60 (400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) and treated with (40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) of ibuprofen at different time points with respect to LPS inoculation (30 minutes before or immediately afterwards or 1 h subsequent to challenge). A control group (labeled as "LPS") received only 400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ of LPS. The Kaplan Meier test was used for statistical analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g001

Pep19-2.5 acts mainly on TNF- α rather than PGE2 in the murine endotoxemia model

To study if there is a correlation between animal survival and inhibition of pro-inflammatory cytokines the experiment shown in Fig 2 was repeated and serum levels of TNF α and PGE2 were determined by ELISA 2 h after LPS challenge. Blood was obtained from the retro orbital plexus of anesthetized animals and then exsanguinated mice were sacrificed. Due to its very short half-life *in vivo*, PGE2 levels were measured indirectly by quantifying its metabolic products (“PGE metabolites”; see Material and Methods).

As shown in Fig 3A, all the experimental treatments reduced TNF α levels in comparison to those measured in LPS challenged mice left untreated. This reduction was more pronounced in the case of animals receiving either the combined treatment ($p < 0.01$) or Pep19-2.5 ($p = 0.002$). Mice treated with ibuprofen had significantly higher levels of TNF α ($p = 0.016$) than the Pep19-2.5 treated group. However, addition of the peptide to ibuprofen (i.e. the combined treatment) did not enhance the ability of the NSAID to decrease TNF- α any further. Regarding the activity of the COX-dependent pathway, as shown in Fig 3B, LPS-induced PGE metabolites levels decreased upon treatment with ibuprofen (LPS vs. LPS+ ibuprofen ($p = 0.020$)); LPS vs. combined treatment ($p = 0.021$)). In contrast, presence of Pep19-2.5 alone or in combination with ibuprofen appeared to have little influence on the levels of PGE metabolites.

Pep19-2.5 acts mainly on TNF- α rather than PGE2 response of human monocytes to LPS

Human monocytes were used for the stimulation and closer investigation of the LPS-induced effects on human cells. For a comparison with the mouse data we first analysed the levels of TNF α and PGE2 in the supernatants of the stimulated cells (Fig 4). The results revealed a similar picture for the *in vitro* as for the *in vivo* experiments. Both, the addition of Pep19-2.5 as well as the addition of ibuprofen led to a decreased TNF α response compared to LPS without additives (Fig 4A). This effect was slightly amplified in the combinational treatment. On the

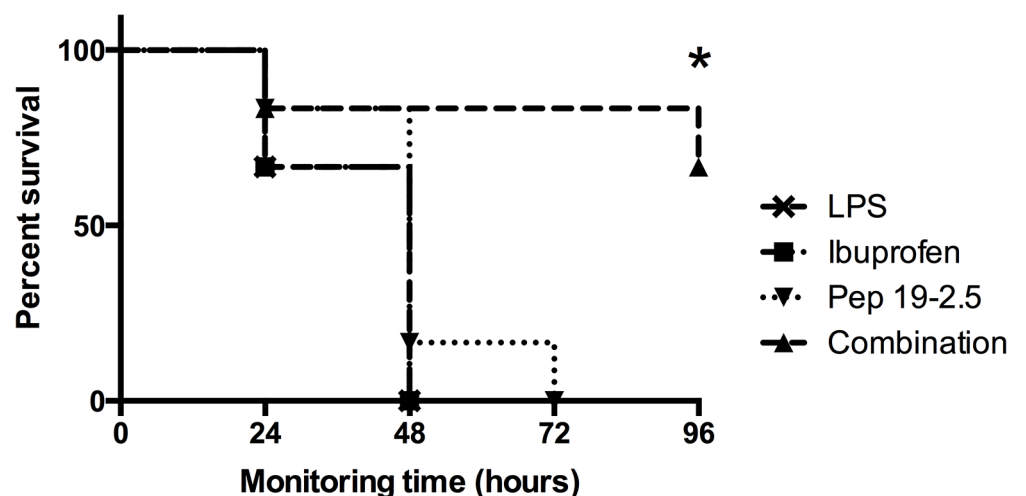


Fig 2. Pep19-2.5 acts in synergy with ibuprofen and protects mice against lethal endotoxemia. Kinetics of mortality of groups of mice ($n = 6$) intraperitoneally inoculated with LPS from *S. enterica* Serovar Minnesota R60 (400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) and treated 1 h later with either ibuprofen (40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$), or Pep19-2.5 (400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) or a combination of both treatments. A control group (labelled as “LPS”) received only 400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ of LPS. The Kaplan Meier test was used for statistical analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g002

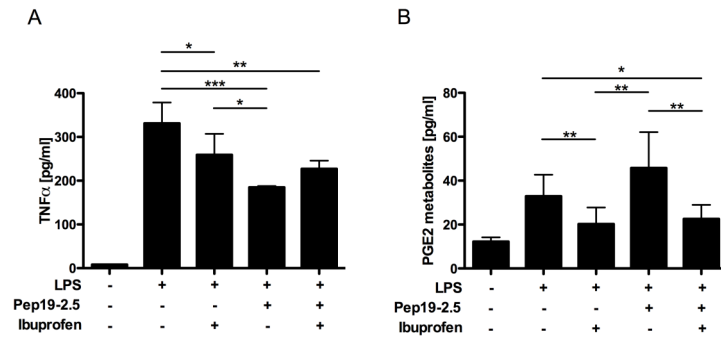


Fig 3. Animals receiving the combined ibuprofen-Pep19-2.5 treatment have low serum levels of both TNF α and PGE 2h after LPS administration. Plasma TNF α (pg/ml) (A) and PGE Metabolites (pg/ml) (B) levels in groups of mice (at least n = 6) intraperitoneally inoculated with LPS from *S. enterica* Serovar Minnesota R60 (400 μ g/mouse). Groups received the same treatments as detailed in Fig 2. Negative control group (n = 3) received neither LPS nor treatment. Statistical differences were analysed using ANOVA followed by DMS (parametrical, A) and Thamhane (no parametrical, B as there was heterogeneity of variances) post hoc tests (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; *** $p < 0.001$). Very significant statistical differences ($p < 0.01$ for PGE2 or $p < 0.001$ for TNF α) were found between the negative control group (labelled with the symbol #) and the rest of the groups.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g003

contrary, no effect was observed for the PGE2 level after peptide treatment, while a strong decrease in PGE2 was observed for the ibuprofen addition, as expected (Fig 4B).

Treatment with Pep19-2.5 and ibuprofen downregulates the global gene expression response to LPS of monocytes

Transcriptomes of challenged human monocytes were analysed by One-Way ANOVA with Tukey post hoc testing (cut-off $p \leq 0.05$) to identify significant differentially expressed genes between experimental groups (see S1 Table). Since the animal survival experiments suggested a possible synergistic effect of Pep19-2.5 and ibuprofen if applied in combination, the microarray data was further evaluated for this purpose. The variance in global gene expression with regards to their range in intensity is plotted in Fig 5A. In general, LPS-stimulation led to more regulated genes which were also found to be more strongly expressed than co-stimulation with ibuprofen or Pep19-2.5 alone. The combination of both compounds with LPS resulted in a decrease of gene expression intensity as well as in the number of highly expressed genes. To further analyse the possible synergistic effect of the combination the set of genes from

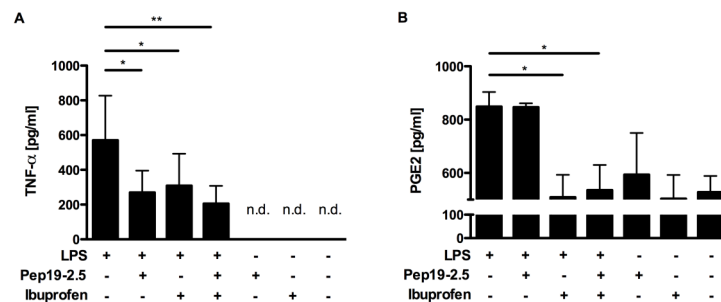


Fig 4. The secretion levels of the inflammatory markers TNF α and PGE2 after LPS stimulation. Expression levels in cell supernatants of TNF α (pg/ml) (A) and PGE2 (pg/ml) (B) of human monocytes after 4 h and 24 h of stimulation, respectively. Not detectable n.d. One-way ANOVA with Bonferroni correction as post-hoc test (* $p < 0.5$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$) was used to statistically analyse cells from 3 different donors. All data are shown as mean \pm SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g004

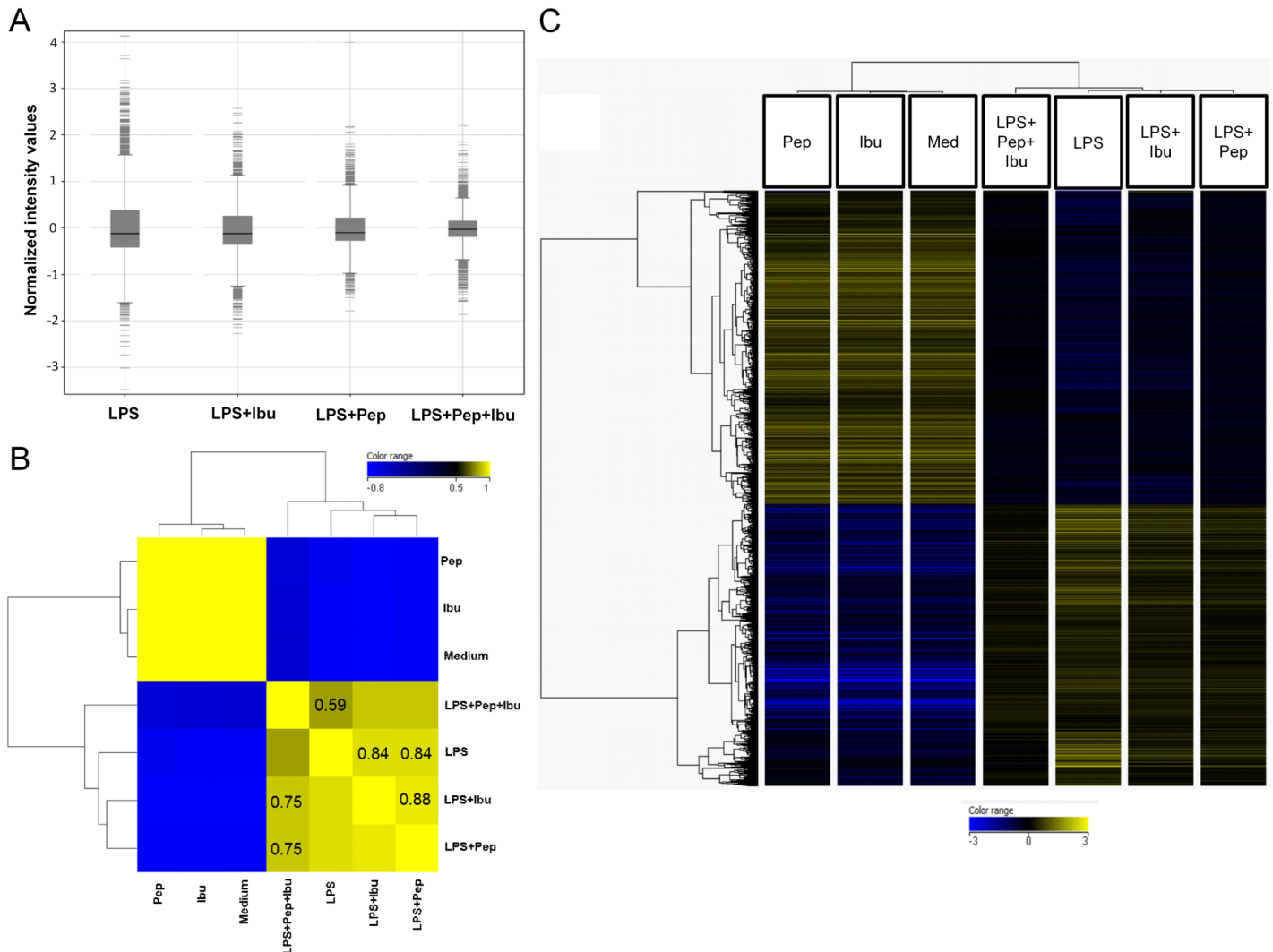


Fig 5. The combination of ibuprofen and Pep19.2–5 alleviates the transcriptional LPS-response of human monocytes. Gene expression analysis of human monocytes stimulated with LPS, ibuprofen, Pep and combinations of both after 4 h of stimulation. Samples from 3 biological replicates of different donors were analysed by 1W-ANOVA with Tukey HSD post hoc testing for detection of differentially expressed genes between parameters with a Benjamini-Hochberg multiple testing correction (cut-off ≤ 0.05). A: Variance in gene expression as indicated by the mean value of gene expression as well as its range with regard to LPS, LPS+Ibu, LPS+Pep and LPS+Ibu+Pep stimulation. The variance in gene expression upon LPS-stimulation is reduced by treatment with anti-inflammatory drugs ibuprofen, Pep or both. B: Pearson correlation analysis of significantly regulated genes from 1W-ANOVA analysis with subsequent hierarchical clustering (squared Euclidian distance; Ward’s linkage rule) on experimental conditions ordered the samples according to their similarity. Correlation coefficients are colour coded and exact numbers provided inside the boxes. C: Hierarchical clustering of significantly regulated genes from those genes that were found to be significantly regulated by LPS were subjected to Hierarchical Clustering (Pearson Centered distance matrix, Wards Linkage Rule) and relative gene expression is displayed for all experimental parameters as a heatmap.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g005

1W-ANOVA was subjected to Pearson correlation analysis and hierarchically clustered according to experimental conditions (Fig 5B). The correlation coefficient of LPS vs. LPS+Ibu +Pep was 0.59 and hence lower than the coefficients from LPS vs. LPS+Pep (0.84) and LPS vs. LPS+Ibu (0.84), suggesting stronger dissimilarities between these conditions (see S2 Table for complete list of correlation coefficients).

Hierarchical clustering of the significantly differentially regulated genes resulted in a distinct pattern of gene expression (Fig 5C). Overall, samples stimulated with either Medium or with one of the drugs (i.e. Pep19-2.5 or ibuprofen) clustered together. This suggests that these

experimental conditions induce a higher degree of similarity in gene expression pattern compared to the other conditions. Treatment with Pep19-2.5 or ibuprofen alleviated expression levels of most of LPS up-regulated genes (Fig 5C), as indicated by the propensity of these samples to cluster together.

The most remarkable effect on the LPS-induced gene expression pattern was caused by the combined treatment ibuprofen-Pep19-2.5. The gene expression intensity of those genes, which were either induced or repressed by LPS was clearly restored to basal levels after application of ibuprofen and Pep19-2.5 in combination.

Treatment with Pep19-2.5 and ibuprofen modulates the innate immune response to LPS

Gene ontology (GO) analysis was conducted to evaluate the effects of monocytes by LPS stimulation. 23 GO-terms were found to be enriched with a factor of ≥ 2 (Table 1) and a p-value cutoff $\leq 10^{-7}$. Among the enriched GO-terms the most prominent were found to be involved in the innate immune response, pattern recognition receptor signalling and different TLR signalling pathways. Fig 6A displays the genes with the GO term “cellular response to lipopolysaccharide” as a heat-map with hierarchical clustering. A strong response to LPS can be observed of prominent genes such as IRG1, IL18 or IL10 and others indicating a LPS-reactive set of genes. Upon stimulation with both anti-inflammatory drugs, the expression of these genes was more reduced compared to the application of either ibuprofen or Pep19-2.5 (Fig 6B) alone.

Table 1. Enriched GO terms among the regulated genes suggest a central involvement of the innate immune response.

GO term	Description	P-value	FDR q-value	Enrichment (N, B, n, b)
GO:0002218	activation of innate immune response	1,98E-015	1,13E-012	2.02 (17671,149,5469,93)
GO:0034142	toll-like receptor 4 signaling pathway	2,23E-015	1,22E-012	2.27 (17671,97,5469,68)
GO:0002758	innate immune response-activating signal transduction	5,50E-015	2,58E-012	2.03 (17671,142,5469,89)
GO:0002221	pattern recognition receptor signaling pathway	2,30E-014	9,17E-012	2.01 (17671,140,5469,87)
GO:0034138	toll-like receptor 3 signaling pathway	2,33E-014	9,02E-012	2.34 (17671,80,5469,58)
GO:0002224	toll-like receptor signaling pathway	2,84E-014	1,07E-011	2.08 (17671,121,5469,78)
GO:0002756	MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway	3,11E-013	8,71E-011	2.29 (17671,79,5469,56)
GO:0032480	negative regulation of type I interferon production	4,36E-013	1,12E-010	2.82 (17671,39,5469,34)
GO:0035666	TRIF-dependent toll-like receptor signaling pathway	7,07E-013	1,72E-010	2.30 (17671,76,5469,54)
GO:0034134	toll-like receptor 2 signaling pathway	1,61E-012	3,64E-010	2.30 (17671,73,5469,52)
GO:0032479	regulation of type I interferon production	6,41E-012	1,30E-009	2.03 (17671,108,5469,68)
GO:0038124	toll-like receptor TLR6:TLR2 signaling pathway	8,62E-012	1,64E-009	2.28 (17671,71,5469,50)
GO:0038123	toll-like receptor TLR1:TLR2 signaling pathway	8,62E-012	1,62E-009	2.28 (17671,71,5469,50)
GO:0002755	MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	1,65E-010	2,55E-008	2.11 (17671,81,5469,53)
GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	9,79E-010	1,24E-007	2.02 (17671,88,5469,55)
GO:0034166	toll-like receptor 10 signaling pathway	1,15E-009	1,42E-007	2.19 (17671,65,5469,44)
GO:0034146	toll-like receptor 5 signaling pathway	1,15E-009	1,40E-007	2.19 (17671,65,5469,44)
GO:0034162	toll-like receptor 9 signaling pathway	2,00E-009	2,37E-007	2.11 (17671,72,5469,47)
GO:0050688	regulation of defense response to virus	2,73E-009	3,12E-007	2.03 (17671,81,5469,51)
GO:0035872	nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing receptor signaling pathway	3,45E-008	3,29E-006	2.30 (17671,45,5469,32)
GO:0031663	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	2,81E-007	2,17E-005	2.54 (17671,28,5469,22)
GO:0007249	I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	9,05E-007	5,92E-005	2.18 (17671,43,5469,29)
GO:0002753	cytoplasmic pattern recognition receptor signaling pathway	9,51E-007	6,13E-005	2.35 (17671,33,5469,24)

Enrichment (N, B, n, b) is defined as follows: N is the total number of genes. B is the total number of genes associated with a specific GO term. n is the number of genes in the top of the input list or in the target set when appropriate. b is the number of genes in the intersection. Enrichment: (b/n)/(B/N)

doi:10.1371/journal.pone.0133291.t001

Treatment with Pep19-2.5 and ibuprofen dampens the LPS-induced expression of pro-inflammatory pathways

We were further interested in the effects of Pep19-2.5 and ibuprofen on underlying signalling pathways in response to LPS. Enrichment analysis was conducted on each experimental

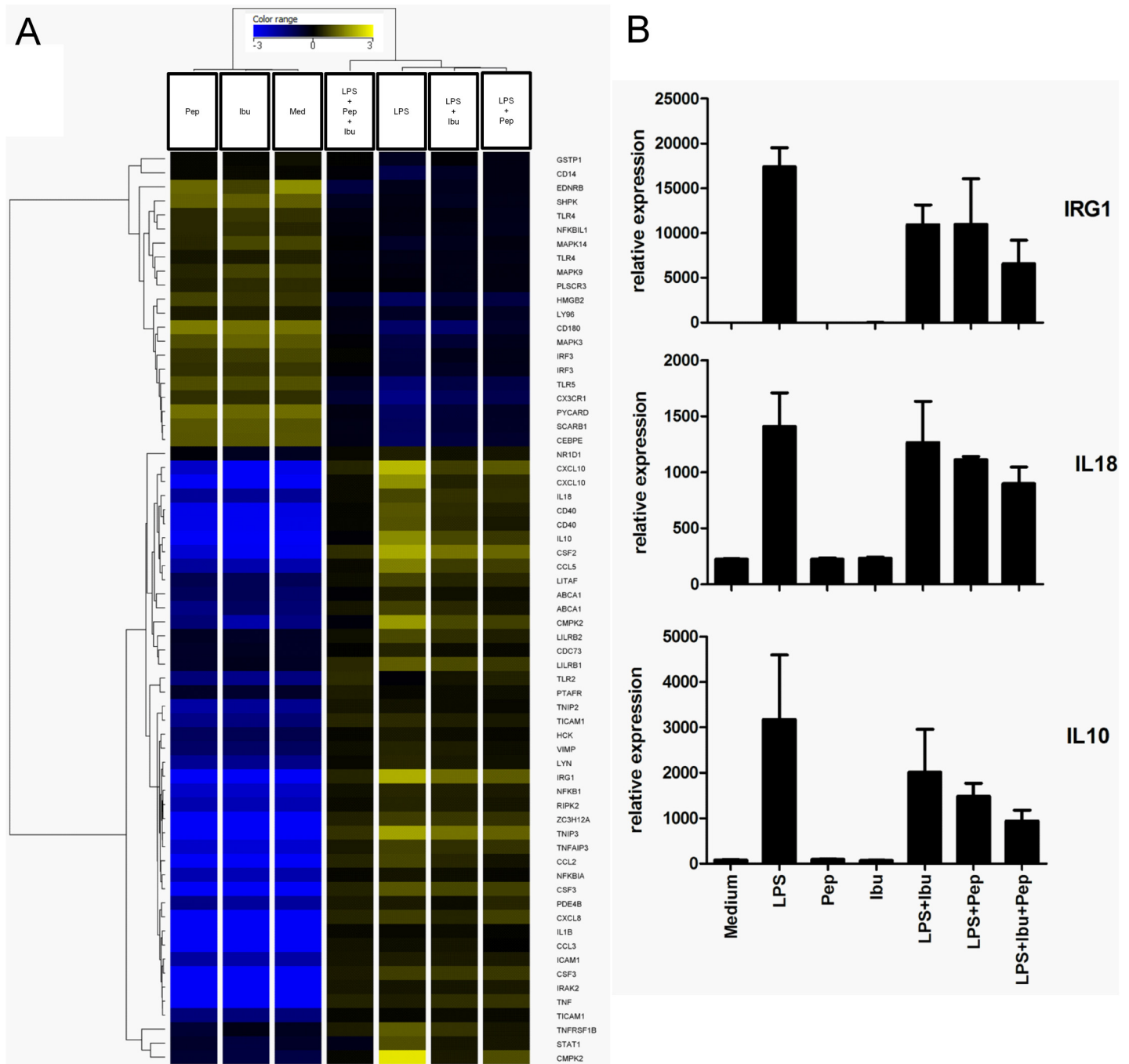


Fig 6. The cellular response to LPS of monocytes is influenced by different combinations of anti-inflammatory drugs. Results from Gene Ontology analysis of data set retrieved from 1W-ANOVA. (A) List of genes belonging to GO term “Cellular Response to LPS” displayed as heatmap of hierarchical clustering (Pearson Centered distance matrix; Ward’s linkage rule) according to their relative expression. (B) Selected single genes from (A) displayed with their relative, quantile-normalized expression.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g006

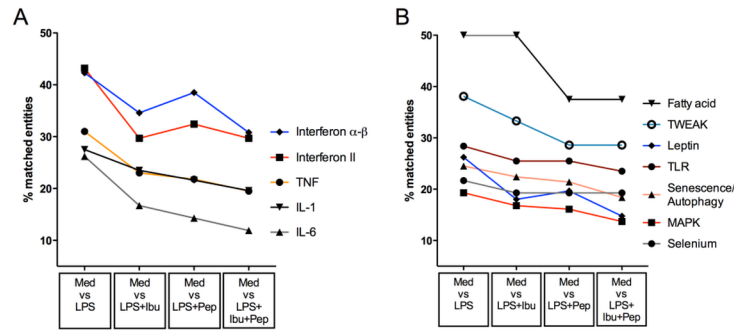


Fig 7. Pep19-2.5 and ibuprofen modulate the LPS-responsive inflammatory signalling pathways. The 10 most significant (lowest p-value) pathways from the LPS stimulation (Med vs LPS) were used as an example for the inflammatory response pattern of monocytes to LPS and compared to the effects of different combinations of anti-inflammatory treatments. Information for pathways is displayed as the % of matched entities to each pathway ($[\text{Number of entities found to be significantly enriched in experimental condition} / \text{Total number of entities in pathway}] * 100$). For means of classical LPS-response we included IL-6 signaling_pathway and fatty acid activation which were also found to be significantly enriched upon LPS-stimulation.

doi:10.1371/journal.pone.0133291.g007

condition and the resulting list from LPS stimulation served as standard for comparison of therapeutic efficacy. The 10 most significantly enriched pathways from each condition were compared to the results of single anti-inflammatory treatment or the combination of ibuprofen and Pep19-2.5 (Fig 7). Not unexpectedly, stimulation of monocytes with LPS resulted in a high number of matched entities that belong to pathways involved in the inflammatory response, such as Interferon or TNF and IL-1 (Fig 7A). The overall percentage of matched entities to these pathways was reduced upon administration of ibuprofen or Pep19-2.5. Here, ibuprofen alone exerted its maximal effect on Interferon $\alpha\beta$ and Type II Interferon signalling cascades, unlike Pep19-2.5 which exhibited its most potent activity on TNF, IL-1 and IL-6 pathways. In general, the combination of both drugs caused a global down-regulation in genes involved in these pathways. Besides this direct effect at the cytokine expression level, upstream pathways that are involved in general processes were also found to be significantly enriched (Fig 7B). Among these, TLR and TWEAK signalling as well as the MAPK signalling cascade were highly upregulated upon LPS stimulation. In general, treatment with either ibuprofen or Pep19-2.5 dampened to a similar extent the level of matched members with a more significant effect when the compounds were applied in combination. Interestingly, fatty acid activation seemed to be an activity exclusively dependent on the presence of Pep19-2.5. Addition of ibuprofen did not enhance the effect any further.

Overall, combination of both drugs resulted in a reduced percentage of matched genes to these inflammatory pathways which were induced by LPS.

Discussion

During sepsis treatment the application of NSAIDs is under discussion since decades. Prostaglandin E2 (PGE2) is a lipid-signalling molecule composed of 20-carbons that plays an essential role in homeostasis and inflammatory reactions. The inhibition of prostaglandin synthesis by a blockade of COX enzymes by NSAIDs is commonly used in a wide variety of medical indications. The convenience of administering NSAIDs to septic patients has been under discussion since decades. We investigated in this study the simultaneous anti-septic activity of the NSAID ibuprofen and Pep19-2.5, a promising anti-septic peptide, currently in preclinical development.

Probably, our most important finding is the demonstration that ibuprofen acts in synergy with Pep19-2.5 to stop LPS-dependent mortality *in vivo*. This could be explained by the simultaneous blockage of different cascades involved in inflammatory activation, as investigated here by transcriptome analysis. However, to study the applicability of our findings to sepsis treatment, it will be necessary to test the combinatorial therapy in more realistic animal models induced by the inoculation of viable microorganisms and as supplement to the recommended antibiotic therapy.

Furthermore, we showed that administration of ibuprofen greatly inhibits PGE₂ production as expected of a drug down-regulating the COX-dependent pathway. However, this inhibitory effect appears to be insufficient for improving mice survival, and might be due to its suboptimal capacity to reduce TNF α levels *in vivo*, as we showed in Fig 3A. Conversely, Pep19-2.5 appears to have an optimal ability to decrease TNF α levels but it has no inhibitory effect on the production of COX dependent metabolites, such as PGE (Fig 3B). Our results suggest that only when both the COX and the TLR4 dependent pathways are inhibited—as it happens when combining both treatments—the protection increases significantly. Nevertheless, blocking the TLR4-dependent inflammatory pathway seems to be more relevant for mice survival, in accordance with previous results [11].

Independently from their ability to bind and neutralize microbial targets, some antimicrobial peptides have been reported to have immuno-modulatory activities [27]. Indeed, this would be an attractive property for an agent intended to be used in anti-sepsis therapy. Schuerholz and collaborators showed that, after induction of sepsis in the mouse model of cecal ligation and puncture (CLP), administration of Pep19-2.5 led to marked reduction of CD14 expression in various tissues and to diminished IL-6 as well as IL-1 levels in plasma after 24 h, compared to the untreated control group. Using the same model, these authors showed that this therapeutic activity was even more pronounced than the inflammation inhibiting effect of Polymyxin B, considered as the standard antimicrobial and LPS neutralizing peptide in clinical use [12]. Interestingly this observation comes in line with our findings from the microarray analysis, where Pep19-2.5 tuned down TNF, IL-1 as well as IL-6 pathways of human monocytes in response to LPS.

In this study, the combination of Pep19-2.5 with ibuprofen caused a decrease of TNF α and PGE₂ levels in the mouse model of endotoxemia. Particularly important, it led to a drastic advantage in survival compared not only to the untreated mice, but also to the single medications. Since the treatment was administered 1 h after LPS challenge, protection was achieved under therapeutically relevant conditions.

Due to numerous reports in the past concerning the discrepancy of the mouse studies and the situation in humans, especially regarding the use of NSAIDs, we further extended our findings by implementing a comprehensive analysis of *in vitro* LPS-stimulated human cells. Here again a significant reduction in TNF α protein and PGE₂ lipid expression levels could be observed by the application of Pep19-2.5 and ibuprofen. The microarray data comes in line with the observations from both, human and mouse experiments. The combined administration of ibuprofen and Pep19-2.5 does not only alleviate the variance as well as expression intensity in global gene expression as indicated in Fig 5, but also restores the expression of those genes which were found to be induced upon LPS stimulation (Fig 5C). A closer examination at the gene ontology term of the cellular response to LPS also indicates the advantage of the combinatorial treatment (Fig 6). Combined administration of Pep19-2.5 and ibuprofen decreases the IL-18 transcription, that was slight in the case of the single Pep19-2.5 treatment, and greatly enhanced upon combination of the peptide with ibuprofen. The IL-18 protein, also known as Interferon- γ inducing factor, has been reported to have pro-inflammatory activity and to play a major role in the development of sepsis [28, 29]. Elevated IL-18 concentrations in the blood

are associated with a poor clinical outcome and this biomarker has been proposed as target for therapeutic intervention as well as a potential diagnostic tool.

Interestingly, our data show that combination of Pep19-2.5 and ibuprofen, led to a decrease in LPS induced IL-10 production, an anti-inflammatory cytokine. At present, we do not know whether this is a consequence of the inhibition of the TLR-4 dependent pathway due to LPS neutralization by the peptide or it results from the blockade of PGE2 production by ibuprofen. IL10 reduction caused by the combination is in line with the described role of PGE2 in combination with LPS regarding the induction of an anti-inflammatory phenotype in macrophages characterized by the IL-10 expression [30]. In accordance, the LPS-induced immune responsive gene 1 (IRG1) transcription is reduced by Pep19-2.5 and ibuprofen. The IRG1 protein is expressed during inflammation in macrophages, but its function is not entirely elucidated yet. This protein has been proposed to have antimicrobial [31] and anti-inflammatory activity. A dominance of the latter activity could lead to immunosuppression, which is frequently observed in sepsis patients and constitutes a common risk of death [32]. Since the combined treatment downregulates IRG1, it could have beneficial effects for sepsis therapy.

To further decipher the transcriptomic responses to LPS and the therapeutic effects, Gene Ontology as well as pathway analyses were conducted. The 10 strongest influenced pathways after LPS stimulation compared to medium control were evaluated for the treatment effects (Fig 7). A significant inhibitory effect of the peptide treatment on LPS-induced inflammation was observed for the pathway of fatty acid activation. The most prominent LPS up regulated genes were found to be the very long-chain acyl-CoA synthetase and the long chain fatty acid CoA-ligase 4. The induction of the expression of the acyl-CoA synthetase by LPS in monocytes and macrophages was proposed by Rubinow et al. to play a role in inflammation and innate immunity [33], further fatty acid induced monocyte inflammation can contribute to various chronic inflammatory and cardiovascular diseases [34, 35].

Another interesting pathway, also with regard to its potential use in the classification of the severity of the sepsis disease status is the TWEAK pathway [36]. Here we show that this pathway is also down-regulated in the treated groups and considerably induced during LPS stimulation.

As expected, well established LPS-induced inflammatory pathways and typical markers for the onset of sepsis, such as IL-1, IL-6, TNF α , are also among the pathways with the most significant up regulation after LPS-challenge.

Our work expands previous sepsis-related research with regard to the comprehensive analysis of LPS-induced pathways and demonstrates the protective effect of therapies based on combined anti-inflammatory treatments.

Supporting Information

S1 Table. Significantly differentially expressed genes among the experimental groups.
(TXT)

S2 Table. Complete table of Pearson Correlation Coefficients for each experimental group.
(TXT)

Acknowledgments

The authors are grateful for the excellent technical support of Sabrina Groth, Jasmin Tiebach and Lisa Niwinski as well as to Rainer Bartels and Volker Grote for the peptide synthesis. Pep19-2.5 patent OCT/EP2009/002565. Research at the laboratories of the authors is supported by the Else-Kröner-Fresenius Stiftung (project 2011_A140), and the Deutsche

Forschungsgemeinschaft (DFG, project DR797/3-1 611672). G.M.T. was also funded by a grant from Proyectos de Investigación Universidad de Navarra (PIUNA-P2011-17), Spain. S.B.V. and R.F.E were recipients of doctoral fellowships from “Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra” and from Gobierno Vasco, Spain, respectively.

The use of blood from human donors was authorised at the 17.06.2011 with the reference number 11–061 from the ethic commission of the University of Lübeck.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LH KB GMT T. Gutschmann T. Goldmann. Performed the experiments: LH SM SBV RFE WM. Analyzed the data: TS DD LH SM KB. Contributed reagents/materials/analysis tools: WM LH T. Gutschmann T. Goldmann GMT SBV RFE. Wrote the paper: LH SM SBV RFE NR T. Gutschmann T. Goldmann WM TS DD KB GMT.


References

1. Kumar A. An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock: implications for optimizing antimicrobial therapy. *Virulence*. 2014; 5(1):80–97. doi: [10.4161/viru.26913](https://doi.org/10.4161/viru.26913) PMID: [24184742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24184742/); PubMed Central PMCID: [PMC3916387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3916387/).
2. Fink MP. Prostaglandins and sepsis: still a fascinating topic despite almost 40 years of research. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001; 281(3):L534–6. Epub 2001/08/16. PMID: [11504677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11504677/).
3. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 1997; 336(13):912–8. Epub 1997/03/27. doi: [10.1056/NEJM199703273361303](https://doi.org/10.1056/NEJM199703273361303) PMID: [9070471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9070471/).
4. Mansilla-Rosello A, Ferron-Orihuela JA, Ruiz-Cabello F, Garrote-Lara D, Fernandez-Mondejar E, Delgado-Carrasco ML. Differential effects of IL-1 beta and ibuprofen after endotoxic challenge in mice. *The Journal of surgical research*. 1997; 67(2):199–204. Epub 1997/02/01. doi: [10.1006/jsre.1996.4982](https://doi.org/10.1006/jsre.1996.4982) PMID: [9073568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9073568/).
5. Celik I, Akbulut A, Kilic SS, Rahman A, Vural P, Canbaz M, et al. Effects of ibuprofen on the physiology and outcome of rabbit endotoxic shock. *BMC infectious diseases*. 2002; 2:26. Epub 2002/11/26. PMID: [12445332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12445332/); PubMed Central PMCID: [PMC137589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC137589/).
6. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013; 369(9):840–51. Epub 2013/08/30. doi: [10.1056/NEJMra1208623](https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623) PMID: [23984731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23984731/).
7. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grund S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*. 2007; 33(4):606–18. Epub 2007/02/27. doi: [10.1007/s00134-006-0517-7](https://doi.org/10.1007/s00134-006-0517-7) PMID: [17323051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17323051/).
8. Fink MP, Warren HS. Strategies to improve drug development for sepsis. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13(10):741–58. Epub 2014/09/06. doi: [10.1038/nrd4368](https://doi.org/10.1038/nrd4368) PMID: [25190187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25190187/).
9. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*. 1998; 9(1):1–11. Epub 1998/02/18. PMID: [9466467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9466467/).
10. Aronoff DM. Cyclooxygenase inhibition in sepsis: is there life after death? *Mediators of inflammation*. 2012; 2012:696897. Epub 2012/06/06. doi: [10.1155/2012/696897](https://doi.org/10.1155/2012/696897) PMID: [22665954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22665954/); PubMed Central PMCID: [PMC3361325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3361325/).
11. Heinbockel L, Sanchez-Gomez S, Martinez de Tejada G, Domming S, Brandenburg J, Kaconis Y, et al. Preclinical investigations reveal the broad-spectrum neutralizing activity of Peptide pep19-2.5 on bacterial pathogenicity factors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(3):1480–7. Epub 2013/01/16. doi: [10.1128/AAC.02066-12](https://doi.org/10.1128/AAC.02066-12) PMID: [23318793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23318793/).
12. Schuerholz T, Doemming S, Hornef M, Martin L, Simon TP, Heinbockel L, et al. The anti-inflammatory effect of the synthetic antimicrobial peptide 19–2.5 in a murine sepsis model: a prospective randomized study. *Crit Care*. 2013; 17(1):R3. Epub 2013/01/11. doi: [10.1186/cc11920](https://doi.org/10.1186/cc11920) PMID: [23302299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23302299/).
13. Hancock RE, Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in biotechnology*. 1998; 16(2):82–8. Epub 1998/03/06. PMID: [9487736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9487736/).
14. Findlay B, Zhanel GG, Schweizer F. Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(10):4049–58. Epub 2010/08/11. doi: [10.1128/AAC.00530-10](https://doi.org/10.1128/AAC.00530-10) PMID: [20696877](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20696877/); PubMed Central PMCID: [PMC2944624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2944624/).

15. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*. 2011; 29(9):464–72. doi: [10.1016/j.tibtech.2011.05.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001) PMID: [21680034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21680034/)
16. Bradshaw J. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2003; 17(4):233–40. Epub 2003/08/06. PMID: [12899640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12899640/).
17. Cohen J. Non-antibiotic strategies for sepsis. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15(4):302–7. Epub 2009/05/07. doi: [10.1111/j.1469-0691.2009.02753.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02753.x) PMID: [19416301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19416301/).
18. Luederitz O, Risse HJ, Schulte-Holthausen H, Strominger JL, Sutherland IW, Westphal O. Biochemical Studies of the Smooth-Rough Mutation in Salmonella Minnesota. *Journal of bacteriology*. 1965; 89:343–54. PMID: [14255700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14255700/); PubMed Central PMCID: [PMC305514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC305514/).
19. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in carbohydrate chemistry*. 1965; 5:83–91.
20. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol*. 2000; 165(2):618–22. PMID: [10878331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10878331/).
21. Leong D, Diaz R, Milner K, Rudbach J, Wilson JB. Some structural and biological properties of Brucella endotoxin. *Infect Immun*. 1970; 1:174–82. PMID: [16557710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16557710/)
22. Garidel P, Rappolt M, Schromm AB, Howe J, Lohner K, Andra J, et al. Divalent cations affect chain mobility and aggregate structure of lipopolysaccharide from Salmonella Minnesota reflected in a decrease of its biological activity. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1715(2):122–31. Epub 2005/09/03. doi: [10.1016/j.bbamem.2005.07.013](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.07.013) PMID: [16137644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16137644/).
23. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum*. 1968; 97:77–89. PMID: [4179068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4179068/).
24. Grage-Griebenow E, Lorenzen D, Fetting R, Flad HD, Ernst M. Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *European journal of immunology*. 1993; 23(12):3126–35. doi: [10.1002/eji.1830231213](https://doi.org/10.1002/eji.1830231213) PMID: [7504990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7504990/).
25. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003; 19(2):185–93. PMID: [12538238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12538238/).
26. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC bioinformatics*. 2009; 10:48. doi: [10.1186/1471-2105-10-48](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-48) PMID: [19192299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19192299/); PubMed Central PMCID: [PMC2644678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2644678/).
27. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology*. 2000; 8(9):402–10. PMID: [10989307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10989307/).
28. Tschoeke SK, Oberholzer A, Moldawer LL. Interleukin-18: a novel prognostic cytokine in bacteria-induced sepsis. *Crit Care Med*. 2006; 34(4):1225–33. doi: [10.1097/01.CCM.0000208356.05575.16](https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000208356.05575.16) PMID: [16540967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16540967/).
29. Opal SM. Dual inhibition of interleukin-1beta and interleukin-18: a new treatment option for sepsis? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014; 189(3):242–4. doi: [10.1164/rccm.201312-2292ED](https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2292ED) PMID: [24484327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24484327/).
30. MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, McGuire VA, Noehren G, Kristariyanto Y, et al. PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J Immunol*. 2013; 190(2):565–77. doi: [10.4049/jimmunol.1202462](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202462) PMID: [23241891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23241891/); PubMed Central PMCID: [PMC3620524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3620524/).
31. Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(19):7820–5. doi: [10.1073/pnas.1218599110](https://doi.org/10.1073/pnas.1218599110) PMID: [23610393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23610393/); PubMed Central PMCID: [PMC3651434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3651434/).
32. Li Y, Zhang P, Wang C, Han C, Meng J, Liu X, et al. Immune responsive gene 1 (IRG1) promotes endotoxin tolerance by increasing A20 expression in macrophages through reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2013; 288(23):16225–34. doi: [10.1074/jbc.M113.454538](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.454538) PMID: [23609450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23609450/); PubMed Central PMCID: [PMC3675562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3675562/).
33. Rubinow KB, Wall VZ, Nelson J, Mar D, Bomsztyk K, Askari B, et al. Acyl-CoA synthetase 1 is induced by Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide and is required for phospholipid turnover in stimulated macrophages. *J Biol Chem*. 2013; 288(14):9957–70. doi: [10.1074/jbc.M113.458372](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.458372) PMID: [23426369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23426369/); PubMed Central PMCID: [PMC3617295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3617295/).

34. Snodgrass RG, Huang S, Choi IW, Rutledge JC, Hwang DH. Inflammasome-mediated secretion of IL-1beta in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. *J Immunol.* 2013; 191(8):4337–47. doi: [10.4049/jimmunol.1300298](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300298) PMID: [24043885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24043885/); PubMed Central PMCID: PMC3825708.
35. Watkins PA. Very-long-chain acyl-CoA synthetases. *J Biol Chem.* 2008; 283(4):1773–7. doi: [10.1074/jbc.R700037200](https://doi.org/10.1074/jbc.R700037200) PMID: [18024425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18024425/).
36. Nagai M, Hirayama K, Ebihara I, Higuchi T, Imaizumi M, Maruyama H, et al. Serum TNF-related and weak inducer of apoptosis levels in septic shock patients. *Therapeutic apheresis and dialysis: official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy.* 2011; 15(4):342–8. doi: [10.1111/j.1744-9987.2011.00966.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-9987.2011.00966.x) PMID: [21884467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21884467/).

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

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

Received: 28 January 2015

Accepted: 24 August 2015

Published: 22 September 2015

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

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

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

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

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

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

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

Results

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

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

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

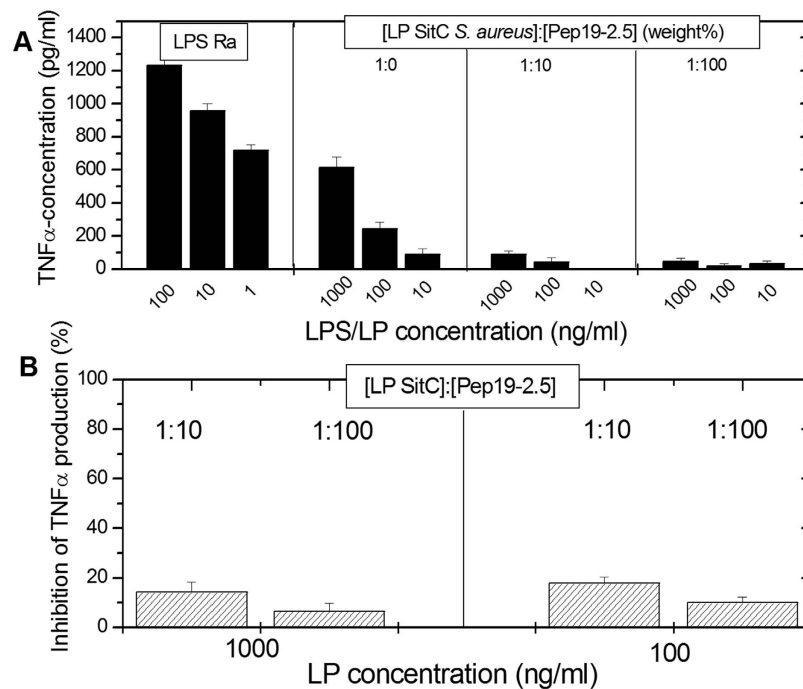


Figure 1. (A) Production of tumor-necrosis-factor α in human macrophages induced by LPS from *Salmonella minnesota* R60, which has a complete core oligosaccharide and corresponds to the bioactive part of wild type LPS, and by the lipoprotein SitC from *Staphylococcus aureus*, each at three different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

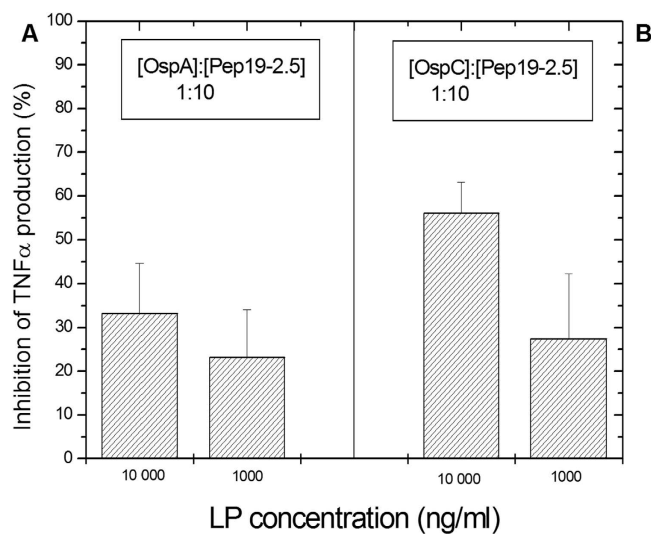


Figure 2. Inhibition of the production of tumor-necrosis-factor α in human mononuclear cells induced by synthetic lipopeptide homologues to the surface antigens of *Borrelia burgdorferi* OspA (A) and OspC (B) at a concentration of 10000 and 1000 ng/ml in the absence and presence of a 10:1 weight % excess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

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

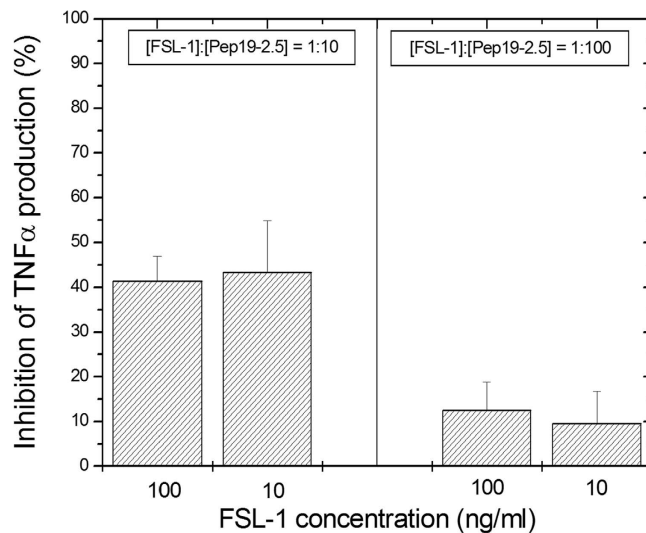


Figure 3. Inhibition of the production of tumor-necrosis-factor α in human mononuclear cells induced by synthetic lipopeptide FSL-1 (fibroblast-stimulating lipopeptide), the N-terminal part of the lipoprotein from *Mycoplasma salivarium* at a concentration of 100 and 10 ng/ml in the absence and presence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

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

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

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

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

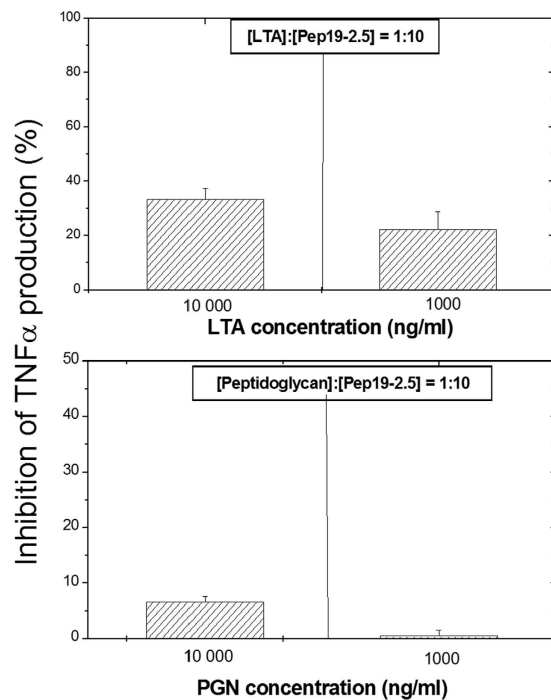


Figure 4. Inhibition of the production of tumor-necrosis-factor α in human mononuclear cells induced by purified lipoteichoic acids (LTA) or by peptidoglycan (PGN) both isolated from *S. aureus* SA113 Δ lgt, each at 10000 and 1000 ng/ml in the absence and presence of Aspidasept[®] at 10:1 excess weight%.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

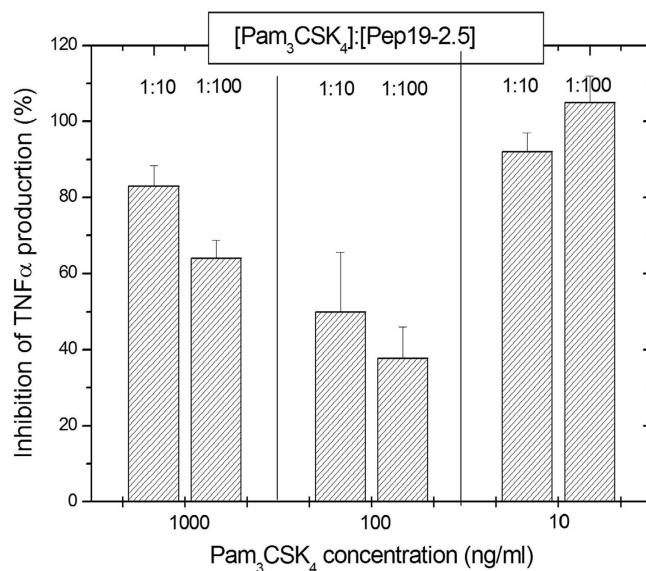


Figure 5. Inhibition of the production of tumor-necrosis-factor α in human mononuclear cells by the synthetic lipid anchored partial structure Pam₃CSK₄ of bacterial lipoproteins at 1000, 100, and 10 ng/ml concentrations in the absence and presence of an excess concentration of Aspidasept[®] 10:1 and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

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

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

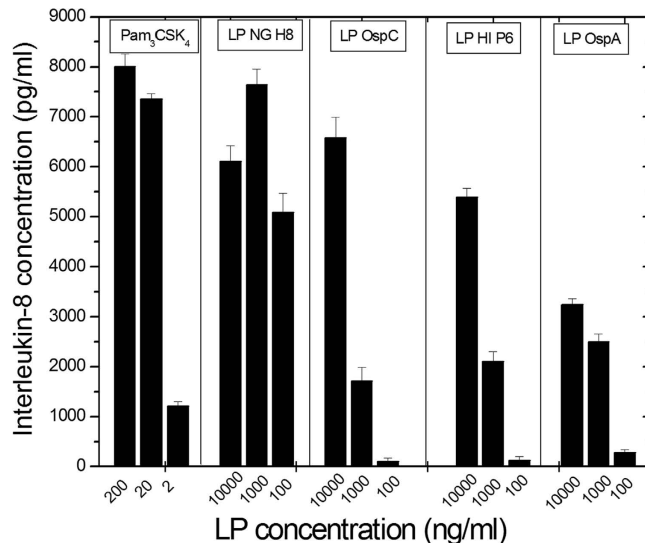


Figure 6. Production of the chemokine interleukin-8 in a HEK cell system transfected with Toll-like-receptor TLR2 by Pam₃CSK₄, LP from *H. influenza* (HI P6), from *N. gonorrhoeae* (NG H8) and from *B. burgdorferi* OspA and OspC. Presented is one exemplary experiment out of two. Errors bars are from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

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

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

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

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

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

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

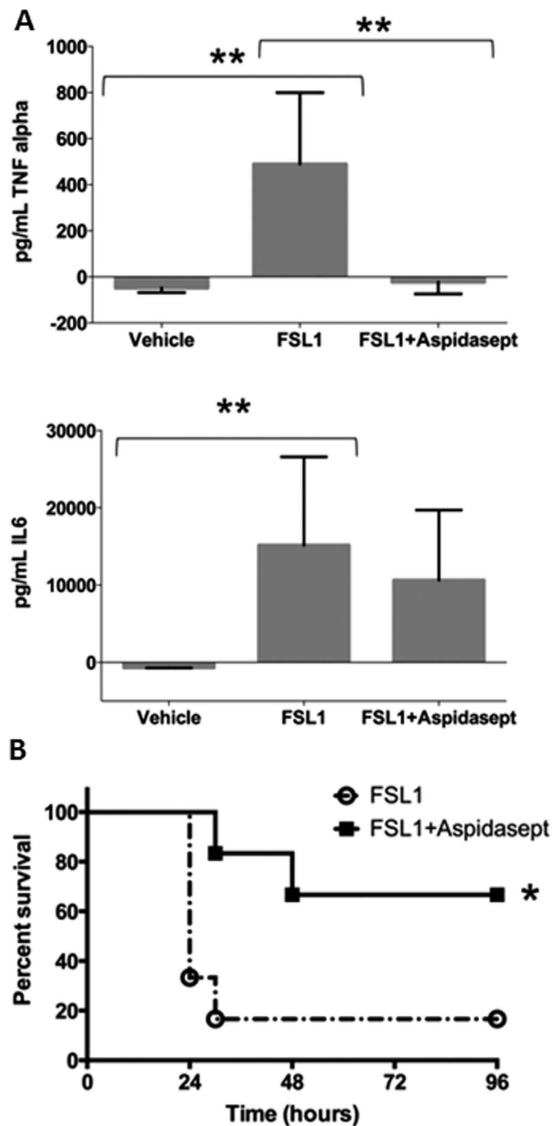


Figure 7. (A) Serum levels of tumor-necrosis-factor α (upper panel), and interleukin-6 (lower panel) in a group of mice ($n = 4$) intraperitoneally (i.p.) inoculated with $40\mu\text{g}$ of FSL-1 (central bars) compared to another group receiving i.p. $400\mu\text{g}$ of Aspidasept[®] immediately after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

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

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

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

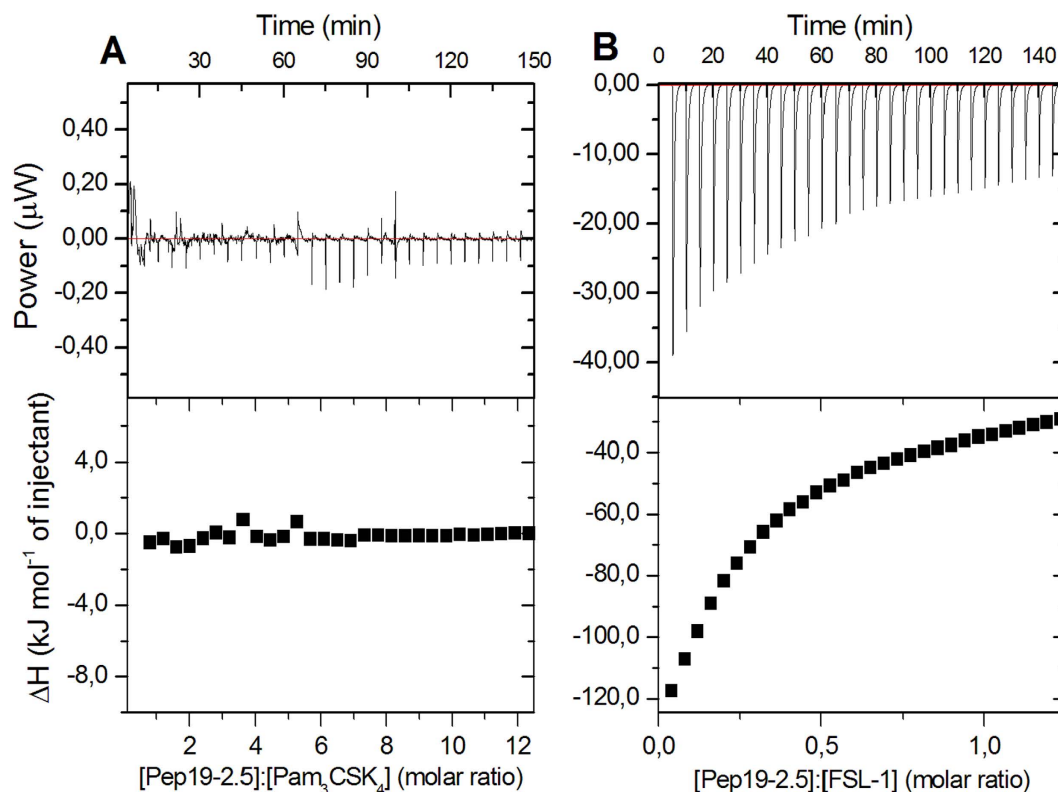


Figure 8. Isothermic calorimetric experiments of the titration of Aspidasept® to the lipopeptide Pam₃CSK₄ (A) and FSL-1 (B). The lipopeptides were prepared as 0.05 mM dispersions and the peptide at a concentration of 1 mM was titrated in 3 µl portions every 5 min at 37 °C.

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

Discussion

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

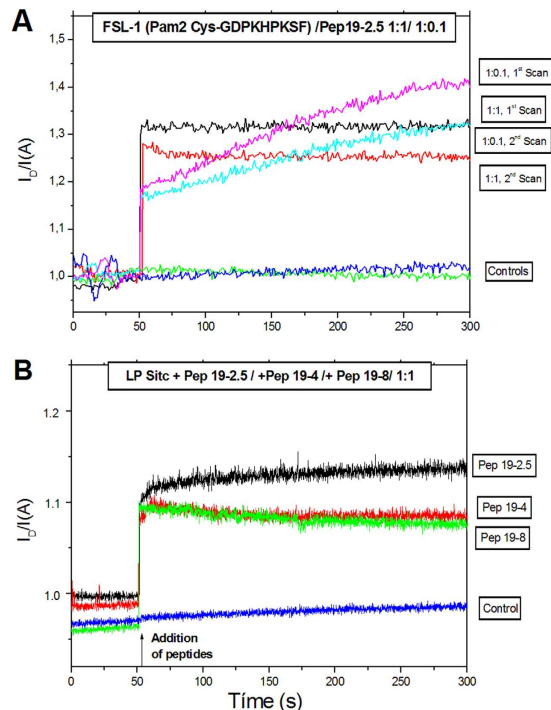


Figure 9. Förster resonance energy transfer (FRET) spectroscopic data of the intercalation of Aspibasept® into FSL-1 aggregates (A) and of Pep19-4, Pep19-8, and Aspibasept® into LP SitC aggregates (B). To the LP at a concentration of $1\ \mu\text{M}$ the peptides were added after 50 s and the concentration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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Methods

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

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

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

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

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

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

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

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

Pam₃Cys-SKSKK.

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

Pam₃Cys-KQNVSSLDEKNSVSV.

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

Pam₃Cys-NNSGKDGNTSANSAD.

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

Pam₃Cys-SSSNDAAGNGAAQT.

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

Pam₃Cys-SQEPAPAAEATPAG.

Synthetic diacyl LP:

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

Pam₂Cys-GDPKHPKSE.

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

Pam₂Cys-GNNDENISFKEK.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References

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

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

Acknowledgements

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

Author Contributions

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

Additional Information

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

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



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

"I don't know where I'm going from here, but I promise it won't be boring"

David Bowie